



KPI
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 1009897-6

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 1009897-6

(22) Data do Depósito: 17/03/2010

(43) Data da Publicação Nacional: 25/08/2015

(51) Classificação Internacional: C07H 19/00; C12P 19/26; A23C 9/146.

(30) Prioridade Unionista: GB 09 04562.6 de 17/03/2009.

(54) Título: PROCESSO PARA O ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE 3'SIALIL LACTOSE DE SORO

(73) Titular: SEPARATION TECHNOLOGIES INVESTMENTS LIMITED, Sociedade Britânica. Endereço: Mill Race Compton Abdale, Cheltenham, GL54 4DR, REINO UNIDO(GB)

(72) Inventor: STEPHEN NIAL SCOTT; ASHOK KRISHNAPILLAI.

(87) Publicação PCT: WO 2010/106320 de 23/09/2010

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 17/03/2010, observadas as condições legais

Expedida em: 29/10/2019

Assinado digitalmente por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"PROCESSO PARA O ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE 3'SIALIL LACTOSE DE SORO"**.

Descrição

A presente invenção refere-se a um processo para o isolamento e purificação de componentes do soro particularmente, mas não exclusivamente, isolado de permeado de soro, especialmente o isolamento de sialil lactose, especificamente 3'-sialil lactose (de outro modo referida como 3'-SL ou 3-SL ou 3'principal).

A produção de queijo envolve, em geral, a coagulação de proteína de leite (caseína) para capturar os sólidos de leite e gordura de leite em uma matriz de coalhada mediante a ação de enzimas sobre o leite ou redução do pH do leite usando um ácido apropriado. Essa matriz de coalhada é, então, consolidada para expressar uma fração líquida, conhecida como soro de queijo. O soro de queijo contém sólidos de leite que não são mantidos na matriz de coalhada, particularmente sacarídeos de leite e proteínas solúveis. O soro compreende 80-90% do volume total do leite usado no processo de fabricação de queijo e contém mais de metade dos sólidos do leite integral original, incluindo 20% da proteína e a maioria da lactose e tem um teor de orgânicos muito alto.

O descarte de soro sempre foi um problema para a indústria láctea em virtude de seu alto teor de orgânicos. Agora é possível recuperar proteínas solúveis do soro e o valor da lactose e é claramente desejável recuperar tanto do teor de orgânicos quanto possível para reduzir a carga de orgânicos da corrente de efluente e obter um maior retorno do soro. Um grande esforço é empreendido por essas companhias de processamento de queijo para desenvolver usos para essa mercadoria.

Se tornou comum no comércio submeter o soro à ultrafiltração (UF) para proporcionar um concentrado de proteína e permeado de soro. O concentrado de proteína tem encontrado aplicações em ração animal, fertilizante, fermentação e como um enchedor em alimentos. Contudo, o permeado rico em lactose frequentemente continua um produto residual em virtude de sua incapacidade de isolar e purificar satisfatoriamente os compo-

nentes individuais do permeado que o tornaria adequado para outro uso.

O permeado rico em lactose inclui vários oligossacarídeos, tal como 2'-sialil lactose. Descobriu-se que esse tem aplicação valiosa, por exemplo, em aplicações farmacêuticas e alimentos para bebê, mas é necessário proporcionar o componente em uma forma suficientemente pura.

O documento US 6 323 008 (Pelletier) proporciona métodos para a produção de sialil-oligossacarídeos a partir de fontes lácteas e correntes residuais do processamento de queijo por meio do uso da atividade catalítica de α (2-3) trans-sialidasas para explorar as altas concentrações da lactose e sialosídeos que ocorrem naturalmente em resíduos do processamento de queijo para acionar a síntese enzimática de α (2-3) sialil-lactose. A sialil lactose produzida por essa ação enzimática é purificada passando a mistura através de uma resina catiônica, seguido por uma resina aniônica forte. A sialil lactose é captada sobre a resina aniônica e eluída usando uma solução apropriada. Esse processo purifica a sialil lactose, mas sofre da deficiência de que a resina catiônica removerá apenas alguns dos cátions, com as espécies positivas restantes formando um sal com a sialil lactose. Isso, então, requer uma limpeza do material eluído, o qual será rico em outros ânions.

É um objetivo da presente invenção proporcionar um processo para o isolamento e purificação de componentes do soro, especialmente 3'-sialil lactose particularmente, mas não exclusivamente de permeado de soro, que supera ou pelo menos alivia as deficiências mencionadas acima.

Consequentemente, um primeiro aspecto da presente invenção proporciona um processo para o isolamento e/ou purificação de um componente desejado do soro, tal como 3'-sialil lactose do soro, compreendendo as etapas de:

contato do soro com pelo menos uma série de resinas de troca de íons, a referida série compreendendo uma primeira resina catiônica, uma primeira resina aniônica, uma segunda resina catiônica e uma segunda resina aniônica para desmineralizar o soro;

contato desse soro desmineralizado com outras duas ou resinas

finais de troca de íons compreendendo uma resina catiônica de ácido forte e uma de ânions de base fraca em que o componente desejado é captado sobre a resina aniônica; e

5 eluição do componente desejado da resina aniônica final usando um eluente apropriado.

Em uma modalidade preferida da presente invenção, soro bruto é submetido à ultrafiltração antes de contato das resinas de troca de íons, a etapa de ultrafiltração proporcionando um concentrado de proteína e um permeado de soro, em que o permeado de soro contata as resinas de troca
10 de íons. Contudo, soro bruto ou soro desmineralizado pode ser usado para o processo.

O componente desejado é, de preferência, 3'-sialil lactose. Outros componentes podem incluir 6'-sialil lactose e/ou outros oligossacarídeos aniônicos presentes no permeado.

15 De preferência, a primeira resina catiônica é uma resina catiônica de ácido fraco. É preferível que a segunda resina catiônica seja uma resina catiônica de ácido forte. Se a segunda resina catiônica é um cátion de ácido fraco, o pH do material que entra na resina deverá ser mantido em um pH acima de 5, de preferência um pH acima de 5,5.

20 De preferência, os primeiro e segundo ânions de base compreendem ânions de base fracos.

Um segundo aspecto da presente invenção é dirigido a um componente desejado, em particular 3'-sialil lactose, isolado e purificado do soro de acordo com o processo do primeiro aspecto da presente invenção.

25 O permeado de soro ultrafiltrado (UF) pode ser diretamente passado através das resinas de troca de íons ou pode ser submetido a uma etapa de pré-desmineralização total, mais preferivelmente parcial, usando uma técnica tal como diálise, eletrodiálise, nanofiltração ou qualquer combinação dos acima para otimizar a eficácia de custo e/ou eficiência técnica.

30 Em uma modalidade da presente invenção, o permeado de soro UF é concentrado usando nanofiltração antes de contato do material concentrado com a série de resinas, conforme definido no primeiro aspecto da pre-

sente invenção. Nessa modalidade, é preferível contatar o material concentrado com duas séries de resinas, isto é, uma primeira série de cátion de ácido fraco, ânion de base, cátions de ácido forte, ânion de base, seguido por uma segunda série de cátion de ácido fraco, ânion de base, cátions de ácido forte, ânion de base. O ânion de base pode ser forte ou fraco mas, de preferência, é fraco para minimizar a perda e otimizar a eluição.

O permeado pode ser submetido a uma desmineralização parcial por meio de eletrodialise. Esse é, então, passado através de uma série de resinas catiônicas e ânions para permitir uma limpeza completa e subsequente ligação da 3-SL sobre uma resina aniônica final.

Em uma modalidade da presente invenção, o teor relativo de 3'-SL no permeado de soro UF concentrado pode ser aumentado por meio de cromatografia por permeação de íons (ou cromatografia de exclusão de íons) antes de contato com a série de resinas de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção. De preferência, a cromatografia por permeação de íons é realizada em uma temperatura elevada, de preferência sendo pelo menos 50°C, de preferência 50°C a 80°C. O material de eluição compreende uma primeira fração contendo moléculas carregadas, incluindo 3'-sialil lactose, seguido por uma segunda fração contendo moléculas não carregadas, tal como lactose. A primeira fração contendo a 3'-sialil lactose é, então, contatada com a série de resinas, com a 3'-sialil lactose captada sobre uma resina aniônica.

A resina de separação cromatográfica é, de preferência CR1310K conforme fornecido pela Rohm & Haas. Contudo, há outras resinas adequadas. Exemplos incluem, mas não estão limitados a, CR1310Ca & Na ou CR1320 Ca, K ou Na, DOWEX Monosphere 99Ca/320 da Dow ou Diaion UBK530 da Mitsubishi ou PCR145K da Purolite.

A 3'-sialil lactose é eluída da resina aniônica usando uma solução apropriadamente diluída de soluções alcalinas, salinas, tampão ou ácidas. O álcali usado inclui hidróxido de amônio, NaOH, KOH; solução salina inclui NaCl, KCl, cloreto de amônio, acetato de amônio, formiato de amônio, carbonato de amônio, etc.; e ácidos incluem HCl diluído, ácido acético, ácido fórmico e/ou tampões contendo contra-ânions suficientes para eluir eficaz-

mente a 3'-sialil lactose da resina aniônica ou misturas apropriadas dos acima. Contudo, um sal de amônio é preferido, uma vez que ele tende a ser volátil.

A 3'-sialil lactose eluída usando uma base ou sal apropriado da resina aniônica pode ser submetida à remoção de sais usando uma resina de dessalinização, tal como Sephadex G25. Por exemplo, o produto da eluição pode ser concentrado para 20-30% de sólidos usando nanofiltração e o material resultante é cromatografado sobre Sephadex G25 (ou outras resinas de dessalinização disponíveis no mercado). O primeiro material a eluir é 3'-sialil lactose junto com algumas das moléculas maiores, seguido pelas moléculas menores, tais como NPNs e sais. Se foi usada uma solução contendo grandes íons, tais como acetato, formiato, etc., a remoção dessas moléculas pela Sephadex G25 ou sua resina equivalente é um tanto pobre. Todavia, a pureza pode ser aprimorada ajustando a profundidade de leito da resina e taxas de fluxo. Em tal caso, pode-se escolher remover as impurezas usando uma resina aniônica apropriada (resina aniônica de base forte ou base fraca), seguido por uma resina catiônica de ácido fraco para ajustar o pH para neutro. O sal pode também ser removido por meio de diafiltração, nanofiltração, eletrodíalise, diálise ou outros procedimentos.

O material eluído limpo pode ser ainda concentrado por meio de nanofiltração e/ou evaporação e, de preferência, é seco para formar um produto branco.

Quaisquer resinas aniônicas e catiônicas fortes e fracas podem ser usadas no processo da presente invenção. O primeiro cátion de ácido graxo é, de preferência, um cátion de ácido fraco poliacrílico, de preferência aquele fornecido sob a marca comercial IMAC HP336. Cátions fracos poliacrílicos alternativos incluem PWC11 fornecido pela Rohm and Haas, DOWEX MAC-3 conforme fornecido pela Dow ou Diaion WK10 e WK40, conforme fornecido pela Mitsubishi. O primeiro ânion fraco é, de preferência, um ânion de base fraca acrílico, de preferência aquele fornecido sob a marca comercial FPA55. Ânions de base fraca acrílicos alternativos incluem Diaion WA10, WA20, WA21J e WA30 conforme fornecido pela Mitsubishi ou

A847 ou PEA847 conforme fornecido pela Purolite. Resinas aniônicas de base fraca estirênicas também podem ser usadas. Resinas aniônicas de base forte podem também ser usadas, mas isso poderia resultar no uso aumentado de regenerantes para a subsequente limpeza das resinas.

- 5 O segundo cátion de ácido forte é, de preferência, um cátion de ácido forte de Estireno-DVB, mais preferivelmente aquele vendido sob a marca comercial HP1110. Cátions de ácido forte alternativos incluem FPC23 fornecido pela Rohm and Haas, DOWEX 88, DOWEX 88 MB, DOWEX Monosphere 88 conforme fornecido pela Dow, Diaion SK1B, SK104, SKI 10, SKI 12, 10 SKI 16, PK208, PK212, PK216, PK220, PK228 ou HPK25 conforme fornecido pela Mitsubishi ou PFC100 ou PFC150 conforme fornecido pela Purolite.

- O segundo ânion de base fraca é, de preferência, um ânion de base fraca de Estireno-DVB, mais preferivelmente aquele que está sendo vendido sob a marca comercial FPA51. Ânions de base fraca alternativos 15 incluem DOWEX 66, DOWEX Monosphere 66 ou DOWEX Monosphere 77 conforme fornecido pela Dow ou Diaion WA10, WA20, WA21J e WA30 conforme fornecido pela Mitsubishi.

- Em um outro aspecto, a presente invenção também proporciona um processo para o preparo de um produto lácteo enriquecido com um componente de soro desejado, processo o qual compreende o preparo de um 20 componente do soro desejado de acordo com o processo de um primeiro aspecto da presente invenção. O componente do soro desejado pode ser, opcionalmente, 3'-sialil lactose e o processo pode ser, opcionalmente, para o preparo de um produto lácteo enriquecido com 3'-sialil lactose. Opcionalmente, 25 o produto lácteo é um produto do leite, mas qualquer produto lácteo pode ser preparado por meio de contato do componente desejado eluído com uma corrente de produto lácteo. O componente desejado eluído e a corrente láctea podem ser, cada um independentemente, um líquido ou um sólido. Opcionalmente, o componente desejado eluído e a corrente láctea são, cada um independentemente, um líquido. Opcionalmente, o processo para preparo de um 30 produto lácteo compreende a etapa adicional de concentração do produto lácteo. A etapa de concentração pode envolver qualquer um ou uma combinação

de nanofiltração, evaporação e secagem do produto lácteo.

A invenção será agora mais particularmente descrita, à guisa de exemplo apenas, com relação aos exemplos em anexo nos quais o Exemplo 1 descreve o isolamento direto de 3'-sialil lactose de permeado de soro UF usando o processo da presente invenção; o Exemplo 2 descreve o isolamento de 3'-sialil lactose de permeado de soro UF concentrado usando o processo da presente invenção, em que o permeado de soro UF concentrado é primeiro concentrado usando nanofiltração; e os Exemplos 3 a 7 descrevem o isolamento de sialil lactose de permeado de soro UF concentrado usando o processo da presente invenção, em que o permeado de soro UF é primeiro concentrado usando nanofiltração, seguido por cromatografia por permeação de íons e com referência aos desenhos em anexo, nos quais:

a figura 1 é um fluxograma ilustrando as etapas envolvidas no processo do Exemplo 1;

a figura 2 é um fluxograma ilustrando as etapas envolvidas no processo do Exemplo 2; e

a figura 3 é um fluxograma ilustrando as etapas envolvidas no processo do Exemplo 3.

Exemplo 1

A etapa primária na presente invenção para todos os exemplos é uma etapa de ultrafiltração (UF) pela qual uma grande proporção da proteína no soro de queijo é removida. A etapa de UF pode incluir a produção de Concentrado de Proteína do Soro (Whey Proteína Concentrate (WPC) 35, 60, 80 e 85. Um subproduto desse processo é o permeado de soro a ~4 a 7% de sólidos, o qual é composto de aproximadamente 90 a 95% de lactose, 1 a 5% de proteína (NPNs e proteína verdadeira), 4 a 7% de cinzas e 0,05 a 0,25% de 3'-sialil lactose (3-SL). Em determinados períodos do ano, a proporção de 3-SL pode ser significativamente maior, até tanto quanto 0,5% em peso dos sólidos.

No presente exemplo, o permeado UF foi diretamente contatado com uma série de resinas e a 3-SL foi finalmente captada sobre uma resina aniônica. As etapas são resumidas na figura 1 dos desenhos em anexo.

1,035 litros de corrente de permeado de soro UF a ~ 5% de sólidos e ~ 60 ppm de 3'-SL foram diretamente contatados com as resinas a seguir em série ao serem bombeados através das mesmas em colunas de 200 mm de diâmetro:

- 5 • 15 litros de IMAC HP336 (um cátion de ácido fraco poliacrílico);
- 22 litros de FPA55 (um ânion de base fraca acrílico);
- 23 litros de HP 1110 (cátion de ácido forte de Estireno-DVB);
- 23 litros de FPA51 (Ânion de base fraca de Estireno-DVB);
- 17 litros de HP 1110 (Cátion de ácido forte de Estireno-DVB);
- 10 • 17 litros de FPA51 (Ânion de base fraca de Estireno-DVB).

A 3-SL foi captada sobre a última resina, a qual foi eluída com 28 litros de hidróxido de amônio a 4,4%, seguido por 50 litros de água desmineralizada. O material de eluição continha aproximadamente 6 a 15% em peso de 3'-sialil lactose. Essa foi, então, contatada com 30 litros de IMAC

15 HP336 (um cátion de ácido fraco poliacrílico), seguido por 23 litros de FPA51 (Ânion de base fraca de Estireno-DVB) para remover a amônia em excesso e ajustar o pH do produto final para entre 7 e 9,5.

O produto resultante continha uma forma de pureza muito alta de 3'-sialil lactose na região de 12 a 50% em peso de sólidos. O teor de cinzas

20 no material final era de <10%, o resto sendo proteína. Aproximadamente 20 a 50% do valor de proteína eram NPN. Assim, nesse exemplo, o permeado é contatado diretamente por meio de bombeamento da 3-SL em uma taxa de fluxo fixa através das seguintes resinas em série: cátion - ânion - cátion - ânion - cátion - ânion. Isso permite a remoção de moléculas indesejadas e de

25 interferência as quais, então, resultam na 3-SL sendo captada especificamente sobre a última coluna de resina. Especificamente, a sequência a seguir proporcionou os melhores resultados, com uma recuperação máxima de 3-SL:

- 30 • cátion de ácido fraco (WAC) - ânion de base fraca (WBA) - cátion de ácido forte (SAC) - ânion de base fraca (WBA) - cátion de ácido forte (SAC) - ânion de base fraca (WBA).

A 3-SL é captada sobre a última coluna de ânions junto com uma pequena quantidade de proteína (proteína verdadeira + NPNs) e alguns

ânions. A 3-SL é, então, eluída usando hidróxido de amônio (o sal cloreto de amônia, potássio, sódio, magnésio ou cálcio ou combinações dos mesmos podem também ser empregados com sucesso).

Se a queda de pressão através dos leitos for muito grande, pode-se usar um tanque de ruptura em uma posição apropriada para coletar o permeado tratado o qual é, então, bombeado através do resto das colunas.

A 3-SL eluída foi, então, limpa sobre uma resina catiônica, seguido por uma resina aniônica para remover os sais. O sal pode, alternativamente, ser removido por meio de diafiltração, NF, eletrodialise, diálise ou outros procedimentos. Uma vantagem adicional do uso da tecnologia de resinas é a remoção de determinados NPNs indesejados também.

O material resultante tem um teor de 3-SL de entre 7 a 42% em peso de 3-SL, a qual pode ser concentrada por NF e/ou evaporação e é finalmente seca para proporcionar um produto branco com uma concentração muito alta de 3-SL.

A captação de 3'-SL do permeado a resina aniônica de base fraca final estava próxima de 100%, com a eluição sendo 85 a 100% de toda a 3'-SL adsorvida. No processo acima, é possível que aqueles versados no campo de tecnologia de resinas de troca de íons possam considerar alterar a concentração ou volume ou ambos de hidróxido de amônio para otimizar a eluição e, desse modo, obter uma maior pureza com ou sem comprometimento do rendimento. Pode-se também escolher eluir alguns dos materiais indesejados da resina aniônica como uma etapa preliminar usando uma menor concentração de hidróxido de amônio e, então, eluição com uma concentração ótima de hidróxido de amônio para chegar a uma maior pureza e rendimento de 3-SL.

Exemplo 2

O permeado de soro foi novamente submetido a uma etapa de ultrafiltração (UF), conforme no Exemplo 1 acima. O permeado UF foi, então, concentrado para um teor de sólidos de 30% usando nanofiltração (NF) e o material concentrado foi contatado com uma série de resinas de acordo com a presente invenção, enquanto a 3-SL era finalmente captada sobre uma resina

aniônica. As etapas são resumidas na Figura 2 dos desenhos em anexo.

Permeado UF foi concentrado por nanofiltração para proporcionar um retentado de NF a ~15 a 25% de sólidos e contendo entre 186 e 208 ppm de 3'-sialil lactose. 2.500 ml do retentado de NF acima foram passados/bombeados através das seguintes resinas em série ao serem bombeados através das mesmas em colunas de 25 mm de diâmetro:

- 120 ml de IMAC HP336 (um cátion de ácido fraco poliacrílico);
- 180 ml de FPA55 (um ânion de base fraca acrílico);
- 180 ml de HP 1110 (Cátion de ácido forte de Estireno-DVB);
- 180 ml de FPA51 (Ânion de base fraca de Estireno-DVB);
- 100 ml de IMAC HP336 (um cátion de ácido fraco poliacrílico);
- 150 ml de FPA55 (um ânion de base fraca acrílico);
- 150 ml de HP 1110 (Cátion de ácido forte de Estireno-DVB);
- 150 ml de FPA51 (Ânion de base fraca de Estireno-DVB).

Mais uma vez, um tanque de ruptura foi usado com sucesso após a quarta coluna para evitar problemas de queda de pressão.

A 3-SL foi captada sobre a última resina, a qual foi eluída com 180 ml de hidróxido de amônio a 4,4%, seguido por 300 ml de água desmineralizada. O material de eluição continha aproximadamente 6 a 18% em peso de 3'-sialil lactose. Essa foi, então, tratada com 250 ml de IMAC HP336 (um cátion de ácido fraco poliacrílico), seguido por 120 ml de FPA51 (Ânion de base fraca de Estireno-DVB) para remover a amônia em excesso e ajustar o pH do produto final para entre 7 & 9,5. O produto resultante continha uma forma de pureza muito alta de 3'-sialil lactose na região de 20 a 50% em peso de sólidos. O teor de cinzas no material final era <10%, o resto sendo proteína. Aproximadamente 20 a 50% do valor de proteína eram NPN.

Exemplo 3

O permeado de soro foi novamente submetido a uma etapa de ultrafiltração, conforme descrito em relação aos Exemplos 1 e 2. O permeado UF foi, então, concentrado para um teor de sólidos de 20 a 30% (de preferência 25%) usando nanofiltração e o permeado foi, então, submetido a uma cromatografia por permeação de íons (de outro modo frequentemente referida

como cromatografia de exclusão de íons) em uma temperatura elevada de entre 50 e 80°C. O material de eluição foi dividido em duas frações - uma fração inicial contendo as moléculas carregadas que incluíam uma grande proporção da proteína (incluindo NPNs), minerais e 3-SL, seguido por uma fração contendo as moléculas não carregadas, tal como lactose. A fração inicial contendo a 3-SL foi, então, tratada com uma série de resinas conforme mostrado no Exemplo 1 e a 3-SL foi finalmente captada sobre uma resina aniônica. As etapas são resumidas na figura 3 dos desenhos em anexo.

Em maiores detalhes, a etapa de permeação de íons envolvia o uso de uma coluna cromatográfica contendo 650 litros de CR1310K para proporcionar uma altura de leito de 3 metros calibrada com água de processo. Uma temperatura de operação de entre +4 e 75°C foi avaliada, com os melhores resultados tendo sido obtidos nas temperaturas elevadas. Permeado UF foi concentrado por meio de nanofiltração para proporcionar um retentado de NF a ~22 a 25% de sólidos e contendo entre 118 e 304 ppm (média de 220 ppm) de 3'-sialil lactose. Esse material foi, então, submetido a um processo de exclusão de íons por meio de bombeamento do material nanofiltrado através do leito de resina de exclusão de íons, seguido por água. Para resultados ótimos, a proporção de carregamento de resina para retentado NF por ciclo foi mantida a 1:0,1, seguido por 0,9 bv de água (onde 1 bv = volume total de resina, viz. = 650 litros). Uma taxa de fluxo constante de entre 0,3 a 0,86 bv/hora foi avaliada. A variação na taxa de fluxo não teve efeito significativo sobre a natureza do cromatograma obtido. O material de eluição foi dividido em duas frações - uma fração inicial contendo 3'-sialil lactose junto com minerais & proteína (incluindo NPNs), seguido por uma segunda fração contendo uma forma quase pura de lactose. O volume líquido da fração enriquecida em 3'-sialil lactose obtido por ciclo foi de 135 litros. O teor de sólidos variava entre 0,5 a 1% e o nível de 3'-sialil lactose era 0,5 a 1,3% em peso de sólidos. Recuperação de 3'-sialil lactose estava na faixa de 80 a 100%, com uma recuperação média de 85% em mais de 95 ciclos de operação.

950 litros de uma fração enriquecida em 3-SL foram, então, passados através das seguintes resinas em série:

- 15 litros de IMAC HP336 (um cátion de ácido fraco poliacrílico);
- 22 litros de FPA55 (um ânion de base fraca acrílico);
- 17 litros de HP 1110 (Cátion de ácido forte de Estireno-DVB);
- 17 litros de FPA51 (Ânion de base fraca de Estireno-DVB).

5 A 3-SL foi captada sobre a última resina, a qual foi eluída com 28 litros de 4,4% de amônio, seguido por 50 litros de água desmineralizada. O material de eluição continha aproximadamente 6 a 15% em peso de 3'-sialil lactose. Essa foi, então, contatada com 30 litros de IMAC HP336 (um cátion de ácido fraco poliacrílico), seguido por 23 litros de FPA51 (Ânion de

10 base fraca de Estireno-DVB) para remover a amônia em excesso e ajustar o pH do produto final para entre 7 & 9,5. O produto resultante com um teor de sólidos de entre 0,3 a 1% continha 3'-sialil lactose na região de 0,5 a 3% em peso de sólidos. O teor de cinzas no material final era de <10%, o teor de lactose era de 30 a 50%, o resto sendo proteína. Aproximadamente 20 a

15 50% do valor de proteína eram NPN.

Exemplo 4

Em um processo alternativo, 1,600 litros de uma fração enriquecida em 3-SL produzida por meio de nanofiltração e uma etapa de permeação de íons, conforme descrito no Exemplo 3, foram contatados com as seguintes resinas em série ao serem bombeados através das mesmas em co-

20 lunas de 200 mm de diâmetro:

- 15 litros de IMAC HP336 (um cátion de ácido fraco poliacrílico);
- 22 litros de FPA55 (um ânion de base fraca acrílico);
- 17 litros de HP 1110 (Cátion de ácido forte de Estireno-DVB);
- 25 • 17 litros de FPA51 (Ânion de base fraca de Estireno-DVB);
- 17 litros HP1110 (Cátion de ácido forte de Estireno-DVB);
- 17 litros de FPA51 (Ânion de base fraca de Estireno-DVB).

A 3-SL foi captada sobre a última resina, a qual foi eluída com 28 litros de hidróxido de amônio a 4,4%, seguido por 50 litros de água des-

30 mineralizada. O material de eluição continha aproximadamente 6 a 15% em peso de 3'-sialil lactose. Essa foi, então, contatada com 30 litros de IMAC HP336 (um cátion de ácido fraco poliacrílico), seguido por 23 litros de FPA51

(Ânion de base fraca de Estireno-DVB) para remover a amônia em excesso e ajustar o pH do produto final para entre 7 & 9,5. O produto resultante continha uma concentração muito alta de 3'-sialil lactose purificada na região de 20 a 70% em peso de sólidos.

- 5 O teor de cinzas no material final era de <10%, o resto sendo proteína. Aproximadamente 15 a 30% do valor de proteína eram NPN.

Exemplo 5

- 10 O permeado de soro foi novamente submetido a uma etapa de ultrafiltração, conforme descrito em relação aos Exemplos 1 e 2. O permeado UF foi contatado com uma série de resinas em duas fases de acordo com a presente invenção, enquanto a 3-SL era finalmente captada sobre uma resina aniônica. As etapas são uma variante daquelas resumidas na figura 1 dos desenhos em anexo.

- 15 Permeado UF a 2 a 6% de sólidos e contendo entre 30 e 80 ppm de 3'-sialil lactose foi usado.

Na Fase I do presente exemplo, uma quantidade do retentado de UF acima foi passada/bombeada através das seguintes resinas em série ao ser bombeada através das mesmas em colunas de 200 mm de diâmetro:

- 20
- 15 litros de IMAC HP336 (um cátion de ácido fraco poliacrílico);
 - 22 litros de FPA55 (um ânion de base fraca acrílico);
 - 17 litros de HP 1110 (Cátion de ácido forte de Estireno-DVB);
 - 17 litros de FPA51 (Ânion de base fraca de Estireno-DVB);

- 25 O ponto de corte para carregamento do retentado de UF foi determinado como sendo o ponto quando a condutividade do efluente atingia aproximadamente 300 a 400 microSiemens. Três repetições sucessivas do procedimento acima resultaram em carregamentos de retentado de 610 litros, 650 litros e 600 litros, respectivamente. O produto de interesse (retentado) contendo 3'-SL desmineralizada que passou através das quatro colunas de resina acima foi deslocado com 100 litros de água de processo, proporcionando 684 litros, 724 litros e 674 litros de produto da Fase I nas três
- 30 repetições sucessivas descritas acima.

Na Fase II do presente exemplo, 800 litros do material de eluição

da Fase I foram, então, contatados com 17 litros de HP 1110 (Cátion de ácido forte de Estireno-DVB), seguido por 17 litros de FPA51 (Ânion de base fraca de Estireno-DVB). O produto de interesse contendo 3'-SL purificada foi captado sobre a última resina e foi eluído da mesma com 20 litros de cloreto de potássio a 1%, seguido por 45 litros de água de processo.

Em duas repetições da Fase II, um total de 120 litros de produto eluído foi obtido. Esse foi, então, submetido à nanofiltração, seguido por diafiltração, para produzir 7,3 litros de retentado. Esse produto continha 27% em peso de sólidos de 3'-sialil lactose.

Após liofilização, 2,96 litros do produto nanofiltrado e diafiltrado produziram 420 g de produto seco contendo 30% em peso de sólidos de 3'-SL. O teor de cinzas no material final era de 16%, a proteína era 30%, com 2% do valor de proteína sendo NPNs.

Exemplo 6

Em outro processo, uma fração enriquecida em 3-SL da etapa de exclusão de íons descrita no Exemplo 3 foi concentrada para um teor de sólidos de ~ 12% através de nanofiltração. 15 ml desse material foram cromatografados sobre 150 ml de Sephadex G25 para proporcionar um produto final que continha 3-SL a 4 a 6% em peso de sólidos. Recuperação foi de ~98%. Qualquer resina de dessalinização volumosa, tal como Toyopearl HW40 ou Bio-Gel P-4 ou Bio-Gel P-6 ou quaisquer outras de tais resinas de dessalinização, incluindo Sephadex G10, que estão disponíveis no mercado podem ser usadas, conforme ilustrado nos Exemplos acima, no processo de isolamento da presente invenção que envolve, em essência, passar o material permeado (o permeado de UF não tratado no caso do Exemplo 1, permeado nanofiltrado no caso do Exemplo 2 ou material que sofreu exclusão de íons no caso dos Exemplos 3 a 6) através das seguintes resinas:

- resina catiônica de ácido fraco (por exemplo, Imac HP 336 ou WK 40)
- resina aniônica fraca ou forte (por exemplo, FPA55, ou FPA42)
- resina catiônica de ácido forte (por exemplo, Imac HP 1110 ou FPC23)

- resina aniônica fraca ou forte (por exemplo, FPA51, FPA55, ou FPA42)

Isso permite a limpeza do material permeado. Após a limpeza, a 3-SL pode ser absorvida sobre uma resina de troca de ânions apropriada (em uma modalidade preferida, essa era FPA51, uma vez que a mesma permitia a melhor eluição). O material pode ser passado através de uma resina catiônica antes da resina aniônica para permitir que toda a 3'-SL seja captada sobre a resina aniônica. Uso de um ânion de base forte com ou sem um cátion na frente também resultaria na 3'-SL sendo captada sobre a resina, mas requereria uma maior resistência do meio de eluição. Eluição da resina foi obtida usando hidróxido de amônio, cloreto de cálcio, NaCl e KCl ou uma combinação dos mesmos.

Exemplo 7

Em outra série de experimentos realizados ao longo das mesmas frações conforme no Exemplo 5, a fração de eluição de 3'-sialil lactose foi dividida em diversas frações e uma fração de 3'-sialil lactose 100% pura foi obtida com um rendimento reduzido de 19-20%.

A fração pode ser diretamente liofilizada ou seca por pulverização após a concentração dos sólidos por meio de um método apropriado.

O princípio subjacente do processo da presente invenção consiste na remoção de moléculas negativamente carregadas indesejadas e/ou de interferência para um nível que é suficiente para permitir que a 3-SL seja preferencialmente presa à resina aniônica (FPA51). As resinas catiônicas são essenciais para permitir que a 3-SL se torne negativamente carregada, antes que ela seja captada pela resina aniônica.

Pode-se esperar que a 3-SL fosse captada sobre qualquer resina aniônica após a remoção de moléculas positivamente carregadas usando qualquer resina catiônica forte. Surpreendentemente, esse não parece ser o caso, sugerindo que a ligação entre 3'-SL e a resina é muito fraca, a qual é essencialmente rompida pela presença de quaisquer espécies aniônicas competitivas. É essencial ter todas as quatro resinas na série mencionada acima. No caso quando o permeado nanofiltrado é usado como o material de

iniciação (vide Exemplo 2), é altamente desejável ter as quatro resinas mencionadas acima mais essas quatro resinas novamente na ordem para que a 3-SL seja captada sobre a última coluna contendo uma resina aniônica fraca.

A 3-SL, em sua forma pura e inativa, existe como uma molécula
5 negativamente carregada muito fraca. A resina aniônica pode captar a 3-SL apenas se quase todas as espécies catiônicas, excluindo íons de H^+ , foram removidas e a maioria dos ânions competitivos foi removida. O processo da presente invenção objetiva obter uma forma purificada de 3-SL de concentração variada entre 3 a 60% em peso de sólidos. Isso não é fácil de obter.
10 O primeiro cátion de ácido fraco remove a maioria dos cátions divalentes, tais como Ca e Mg e, em um grau menor, Na e K, os quais estão presentes no soro, bem como determinados aminoácidos e proteínas. A segunda resina, um ânion de base fraca, capta algumas das moléculas negativamente carregadas, tais como cloretos, fosfatos e sulfatos e, até certo ponto, citra-
15 tos, lactatos e aminoácidos negativamente carregados e proteína. A terceira resina é uma resina catiônica forte a qual, então, capta quase todos os cátions restantes. A quarta resina é um ânion de base fraca a qual capta quaisquer ânions restantes, de preferência com relação à 3-SL. De forma a assegurar que 3-SL mínima é captada por essa coluna, é preferível super-
20 processar, de modo que qualquer 3-SL captada pela quarta resina seja seletivamente bloqueada pelos ânions competitivos. Uma vez que o material é limpo (até >90% desmineralizado), ele pode ser enviado através de um cátion de ácido forte para reter virtualmente todos os cátions restantes, desse modo, permitindo que a 3-SL exista em seu estado nativo ou livre (mais provavelmente sendo "H-3-SL"). O ânion fraco ou sua forma de -OH então, reagirá prontamente com "H-3-SL" (H reage com OH para formar água) e a 3-SL agora negativamente carregada é prontamente captada pela resina aniô-
25 nica fraca.

Está claro a partir do acima que antes de contato com do mate-
30 rial contendo 3'-SL com as resinas, pode-se optar por reduzir a carga iônica sobre as resinas por meio de procedimentos/técnicas selecionadas do grupo tal como diálise, eletrodiálise, diafiltração, etc. Isso intensificaria a capacida-

de de carregamento das resinas, mas não altera o princípio de isolamento subjacente do oligossacarídeo de interesse.

Em todos os casos, a última resina é um ânion de base fraca, embora tecnicamente um ânion de base forte funcione igualmente bem na
5 captação de 3-SL. Contudo, eluição de um ânion de base forte é mais difícil em comparado com o ânion de base fraca. Um sal cloreto, tal como KCl, NaCl ou CaCl_2 ou uma combinação dos mesmos é preferida. Outros sais voláteis incluiriam hidróxido de amônio, acetato de amônio, formiato de amônio, ácido fórmico, ácido acético, etc.

10 Após eluição da coluna de ânions, o material é contatado com um cátion de ácido fraco para remover a amônia e/ou Ca se CaCl_2 ou K se KCl é usado, seguido por um ânion fraco, tal como FPA51, para ajustar pH de volta para o ponto neutro e, se KCl ou CaCl_2 é usado, então, para remover os cloretos em excesso. alternativamente, o material pode ser nanofiltrado
15 e/ou diafiltrado para obter as especificações desejadas no produto.

Aqueles versados no campo podem também empregar a técnica de tomar seções das frações de eluição contendo a 3'-sialil lactose para, desse modo, obter 100% de pureza do produto desejado, embora com rendimento comprometido.

20 Embora os exemplos que ilustram o processo tenham sido restritos a 3'-SL, existem vários componentes de interesse, tais como proteínas, aminoácidos e outros oligossacarídeos no permeado, os quais podem ser isolados com sucesso usando o mesmo princípio de operação descrito no presente relatório descritivo. Além disso, variando a concentração das solu-
25 ções de eluição, aqueles versados no campo da tecnologia de resinas podem aumentar a pureza fracionando seletivamente o material adsorvido da resina.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para o isolamento e/ou purificação de 3'sialil lactose do soro, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

5 contato do soro com pelo menos uma série de resinas de troca de íons, a referida série compreendendo uma primeira resina catiônica, uma primeira resina aniônica, uma segunda resina catiônica e uma segunda resina aniônica para desmineralizar o soro;

10 contato desse soro desmineralizado com duas outras ou resinas de troca de íons finais compreendendo uma resina catiônica de ácido forte, seguido por uma resina aniônica de base fraca, em que o componente desejado é captado sobre a resina aniônica; e

eluição do componente desejado da resina aniônica.

15 2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente sujeição do soro a uma etapa de ultrafiltração antes de contato com as resinas de troca de íons para proporcionar um concentrado de proteína e um permeado de soro, em que o permeado de soro contata as resinas de troca de íons.

20 3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a primeira resina catiônica é uma resina catiônica de ácido fraco poliacrílico.

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a segunda resina catiônica é uma resina catiônica de ácido forte estireno-DVB.

25 5. Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o soro é mantido em um pH de pelo menos 5,5.

6. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que uma ou ambas das primeira e segunda resinas aniônicas é/são uma resina de ânion de base fraca acrílico ou estireno-DVB.

30 7. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o soro ou permeado de soro é submetido a uma etapa de concentração antes de sua passagem através das resinas.

8. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o soro ou permeado de soro é submetido a procedimentos adicionais para aprimorar o isolamento e purificação do componente desejado, os procedimentos adicionais sendo selecionados de diálise, eletrodiálise, diafiltração, nanofiltração e resinas de troca de íons.

9. Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente concentração do soro ou permeado de soro usando nanofiltração antes de contato do material concentrado com a pelo menos uma série de resinas.

10. Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente contato do material concentrado com duas séries de resinas, a primeira série compreendendo um cátion de ácido fraco, ânion de base, cátion de ácido forte, ânion de base, cátion de ácido fraco e ânion de base e a segunda série compreendendo um cátion de ácido forte e um ânion de base.

11. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente aumento da concentração relativa do componente desejado no soro ou permeado de soro concentrado ou não concentrado por meio de cromatografia por permeação de íons (ou cromatografia de exclusão de íons) para proporcionar uma primeira fração contendo moléculas carregadas, incluindo o componente desejado, seguido por uma segunda fração, em que a primeira fração é, então, contatada com a pelo menos uma série de resinas.

12. Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a primeira fração enriquecida é contatada com pelo menos uma série de resinas para obter uma fração enriquecida desmineralizada.

13. Processo de acordo com a reivindicação 11 ou 12, caracterizado pelo fato de que a fração enriquecida é contatada com pelo menos uma série de resinas para adsorver o componente desejado sobre uma outra resina aniônica.

14. Processo de acordo com a reivindicação 11, 12 ou 13, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente realização da cromatografia.

tografia por permeação de íons em uma temperatura elevada de pelo menos 50°C.

15. Processo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a temperatura elevada é 50°C a 80° C.

5 16. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente eluição do componente desejado da outra resina aniônica usando uma solução apropriadamente diluída de álcali, sal, soluções tampão ou ácido.

10 17. Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que um sal de amônio é usado para a eluição.

18. Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que um sal cloreto de um metal alcalinoterroso ou qualquer cátion divalente é usado para a eluição.

15 19. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente limpeza do material eluído por meio de contato com uma resina catiônica apropriada, seguido por uma resina aniônica de base fraca.

20 20. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente limpeza do material eluído por meio de procedimentos selecionados do grupo consistindo em diafiltração, nanofiltração, eletrodíalise e diálise.

25 21. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente concentração do material eluído por meio de nanofiltração e/ou evaporação e/ou secagem do produto.

22. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo fato de que a terceira resina catiônica é um cátion de ácido forte de Estireno-DVB.

30 23. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizado pelo fato de que a terceira resina aniônica é um ânion de base fraca de Estireno-DVB.