



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104768971 B

(45)授权公告日 2017.12.05

(21)申请号 201380055328.7

(22)申请日 2013.10.08

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104768971 A

(43)申请公布日 2015.07.08

(30)优先权数据
2012904391 2012.10.08 AU
2013204858 2013.04.12 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.04.22

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2013/001152 2013.10.08

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/056025 EN 2014.04.17

(73)专利权人 墨累古尔本合作有限公司
地址 澳大利亚维多利亚州

(72)发明人 A·布朗

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266
代理人 须一平 马莉华

(51)Int.Cl.
C07K 14/79(2006.01)
C07K 1/34(2006.01)
A61K 38/40(2006.01)

(56)对比文件
CN 102348387 A, 2012.02.08,
GB 2179947 A, 1987.03.18,
US 2005208638 A1, 2005.09.22,
CN 101501059 A, 2009.08.05,
审查员 苗荻

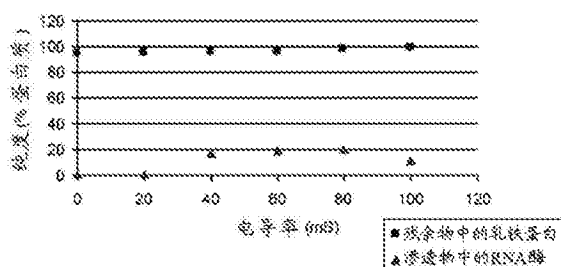
权利要求书1页 说明书13页 附图6页

(54)发明名称

用于从乳纯化乳铁蛋白的改进方法及其产品

(57)摘要

本发明提供了用于从乳纯化乳铁蛋白的方法,所述方法包括对乳进行过滤以将所述乳分离成含有乳铁蛋白的残余物级分和含有生长因子和/或RNA酶的渗透物级分,其中在过滤之前和/或过滤期间对所述乳进行盐处理,使得生长因子和/或RNA酶流入渗透物中。本发明还提供了由本发明的方法获得的乳铁蛋白及其用途。



1. 一种用于从乳或包含乳铁蛋白、分子量小于30kD的生长因子或RNA酶的乳级分纯化乳铁蛋白的方法,所述方法包括采用截留分子量MWC0为30kD-50kD的过滤器对所述乳或乳级分进行过滤以将其分离成含有乳铁蛋白的残余物级分和含有分子量小于30kD的生长因子和/或RNA酶的渗透物级分,其中,在采用MWC0为30kD-50kD的过滤器过滤期间对所述乳或乳级分进行盐处理,使得分子量小于30kD的生长因子和/或RNA酶流入所述渗透物中,所述盐处理包括在所述采用MWC0为30kD-50kD的过滤器过滤期间将所述乳或乳铁蛋白维持在至少0.2M NaCl或等同物的盐浓度或至少20mS/cm的电导率。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述盐处理解聚或解离任何质量的所述RNA酶或生长因子,使得所述生长因子和/或RNA酶流入所述渗透物中。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述盐处理使任何RNA酶或生长因子与所述膜分离,使得生长因子和/或RNA酶流入所述渗透物中。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的方法,其特征在于,所述盐处理持续至少4小时。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的方法,其特征在于,所述过滤在50-70摄氏度下进行。

用于从乳纯化乳铁蛋白的改进方法及其产品

技术领域

[0001] 本发明一般涉及用于从乳纯化目标蛋白质的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 多年来来自家畜的乳已被用作蛋白质和其他用于食品和制药行业的产品来源，并且已知各种技术用于分离这些产品。乳是由脂肪、乳糖和水中的蛋白质组成的胶体悬浮液。在反刍动物和实验室动物中，乳包含平均30至140克蛋白质/升，或按重量计约4-17%，这取决于该物种。这些蛋白质的本体(bulk)是酪蛋白，它们与钙及磷酸盐复合成被称为胶束的超分子结构。乳蛋白的其他主要种类是由 β -乳球蛋白和 α -乳清蛋白组成的乳清蛋白，而且还包括乳铁蛋白、免疫球蛋白和血清白蛋白。

[0004] 通常通过包括膜过滤技术以及离子交换吸附方法在内的方法的组合分离乳蛋白。

[0005] 乳铁蛋白是天然地存在于生物液体中的80kD的铁结合糖蛋白，该生物液体如唾液、胆汁、支气管粘液、胃肠液、宫颈-阴道粘液、精液和乳。乳铁蛋白的最丰富的来源是哺乳动物乳和初乳。乳铁蛋白在脱脂牛乳中的浓度通常较低，典型地在80-200mg/ml之间，这取决于各种因素，其包括脱脂乳的巴氏杀菌和其他预处理经历。在存在于乳中的酪蛋白沉淀后，牛乳清中的乳铁蛋白的浓度典型地为10-100mg/ml，这取决于该乳清的物理和化学预处理。

[0006] 乳铁蛋白具有多重假定生物学作用，包括调节铁代谢、免疫功能和胚胎发育。乳铁蛋白具有针对一系列的病原体(包括革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌)和真菌(包括酵母)的抗微生物活性。乳铁蛋白的抗微生物作用是基于其结合铁的能力，铁对病原体的生长是必需的。乳铁蛋白还能抑制多种病毒的复制，并通过结合至细菌膜上的脂多糖的脂质A组分来增加一些细菌对抗生素和溶菌酶的敏感性。

[0007] 本发明的优选实施方案的目的是提供用于从乳、特别是牛乳纯化乳铁蛋白的改进方法，以提高纯度。

[0008] 本说明书中引用的所有参考文献(包括任何专利或专利申请)通过引用并入本文。应当清楚地理解，虽然在本文中引述了许多现有技术出版物，此引用并非承认这些文献中的任一个构成本领域公知常识的一部分。

[0009] 概述

[0010] 第一方面提供了用于从乳纯化乳铁蛋白的方法，该方法包括对乳进行过滤以将乳分离成含有乳铁蛋白的残余物级分和含有生长因子和/或RNA酶的渗透物级分，其中，在过滤之前和/或过滤期间对乳进行盐处理，使得生长因子和/或RNA酶流入渗透物中。

[0011] 当使用具有30kD或50kD的截断值的膜过滤从乳纯化乳铁蛋白时，本发明人发现乳铁蛋白残余物被生长因子和RNA酶污染。由于这些生长因子和RNA酶具有小于30kD的分子量，因此它们应已通过膜并进入渗透物中，而且不应作为残余的乳铁蛋白级分中的杂质存在。因此，生长因子和RNA酶在残余物中的发现是令人惊讶的。带着进一步纯化乳铁蛋白级分的目的，本发明人发现，在过滤之前加入大量的盐从残余物中除去了生长因子和RNA酶，从而进一步纯化乳铁蛋白。在盐条件下，生长因子和RNA酶被发现于渗透物中。

[0012] 不希望受理论的束缚,本发明人提出在正常条件下,乳中的RNA酶和生长因子聚集或以其他方式形成比它们各自的分子量都大的质量。提出了盐处理导致RNA酶和生长因子解聚或解离。

[0013] 因此,在可选形式中,第一方面的方法提供了用于从乳纯化乳铁蛋白的方法,其包括对乳进行过滤以将乳分离成含有乳铁蛋白的残余物级分和含有生长因子和/或RNA酶的渗透物级分,其中,在过滤之前和/或过滤期间对乳进行能够解聚或解离任何质量的RNA酶或生长因子的盐处理,使得生长因子和/或RNA酶流入渗透物中。

[0014] 不希望受理论的束缚,本发明人可选地提出了在低离子强度的条件下,蛋白质聚集体可能变得与膜相关联,从而形成表观孔尺寸小于该膜的表观孔尺寸的层,该层防止乳中的RNA酶和生长因子穿过该膜。提出了盐处理防止蛋白质层的形成或去除,允许任何RNA酶和生长因子穿过该膜进入该渗透物中。

[0015] 因此,在可选形式中,第一方面的方法提供了一种用于从乳纯化乳铁蛋白的方法,该方法包括对乳进行膜过滤以将乳分离成含有乳铁蛋白的残余物级分和含有生长因子和/或RNA酶的渗透物级分,其中,在过滤之前和/或过滤期间对乳进行能够使任何RNA酶或生长因子与膜分离的盐处理,使得生长因子和/或RNA酶流入渗透物中。

[0016] 第二方面提供了由第一方面的方法获得的乳铁蛋白。

[0017] 在一个实施方案中,对第二方面的乳铁蛋白进行进一步纯化。

[0018] 第三方面提供了第二方面的乳铁蛋白作为抗癌剂、抗病毒剂、抗微生物剂或抗炎剂的用途,该用途用于治疗包括癌症的增殖性病症,特别是涉及实体瘤的那些癌症,用于治疗恶性肿瘤和过度增殖性疾病,用于通过促进骨生成治疗骨骼病症,用于治疗病毒或微生物感染,用于角膜伤口治疗,用于增强免疫力,用于治疗B细胞非霍奇金淋巴瘤,用于治疗败血性休克,用于通过改善双歧数目来改善肠道健康同时减少大肠杆菌、链球菌和梭菌,用于治疗IBD,用于提升免疫力和抗病能力,用于控制系统炎症,用于防止器官移植排斥反应和移植物抗宿主病,用于改善孕产妇和胎儿健康,用于改善神经元健康和婴儿肠道发育,用于减少尤其是具有血铁过少症或缺铁性贫血的妇女中的妊娠并发症的可能性,如先兆子痫、早产、妊娠糖尿病、流产、宫内胎儿死亡、早产、低出生体重、胎盘早剥和宫内生长受限,用于治疗尤其是孕妇中的缺铁和贫血,用于预防早产儿中的新生儿败血症,用于伤口愈合,用于促进生物膜的形成,用于治疗包括牙周炎的口腔感染,用于治疗糖尿病性溃疡,用于囊性纤维化的治疗,用于减轻疼痛,用于治疗蛋白尿症,用于促进皮肤细胞的生长,用作辐射防护剂,用于泌尿道感染的治疗,用于退行性关节疾病的治疗,用于糖尿病的治疗,用于呼吸系统病症的治疗,用于降低循环胆固醇、血管炎症、动脉粥样硬化和心血管疾病,以及用于本领域技术人员已知的乳铁蛋白的所有其他用途。

[0019] 在可选形式中,第三方面提供了由第一方面的方法获得的乳铁蛋白,其用于如第三方面中提出的用途或用于制造用于如第三方面中提出的用途的药物。

附图说明

[0020] 图1示出了穿过50kDa的膜的渗透物通量随电导率增加而增加。

[0021] 图2示出了在增加的氯化钠的存在下的超滤通过增加低分子量污染物(用作实例的RNA酶)的渗透而提高了截留的乳铁蛋白的纯度。

[0022] 图3示出了在来自50kDa的UF膜的渗透物中的乳铁蛋白(※)、低分子量蛋白质(用作实例的RNA酶,⊗)和蛋白质(▲)的浓度。

[0023] 图4A、4B、4C和4D示出了在浓度增加的氯化钠中的乳铁蛋白的尺寸排阻HPLC分析,显示出增加的浓度使大颗粒解聚。在最初的50分钟内,氯化钠浓度是四个谱图之间的重要区别:A,0M NaCl;B,0.16M NaCl;C,0.32M NaCl和D,0.48M NaCl。

[0024] 图5A和图5B示出了通过被保持在Vivacell装置中的50kDa的膜的乳铁蛋白溶液在氯化钠(0、1.5、3、4、5或6%NaCl)的存在下的超滤,显示出在氯化钠的存在下,50kDa的膜选择性地允许RNA酶和其他生长因子的传输。A:渗透物样品;B,渗透物样品。

[0025] 图6A和图6B示出了通过被保持在Vivacell装置中的50kDa的膜的乳铁蛋白溶液在氯化钠(0、1.5、3、4、5或6%NaCl)的存在下的超滤,显示出在氯化钠的存在下,50kDa的膜选择性地允许RNA酶和其他生长因子的传输。A:渗透物样品;B,渗透物样品。

[0026] 图7示出了在存在增加的电导率下的超滤提高了被截留的乳铁蛋白的纯度。

[0027] 图8示出了观察到的增加的乳铁蛋白的纯度是由于污染生长因子(如RNA酶)的传输增加所导致。生长因子传输在0mS和20mS之间迅速增加。

[0028] 图9示出了乳铁蛋白起始材料、主要的阳离子交换色谱峰以及通过50kDa的UF进一步纯化的材料中的乳铁蛋白纯度。目标乳铁蛋白纯度为98%。

[0029] 图10示出了在用50kDa的膜处理的期间乳铁蛋白纯度的增加。以液体形式通过阳离子HPLC分析的样品以灰色表示,而以粉末形式通过阳离子交换HPLC分析的样品以黑色表示。

[0030] 图11示出了当通过超滤处理含氯化钠的乳铁蛋白溶液时,增加的膜分子量截断值允许更多量的蛋白质进入渗透物(□▲□)中,并改善蛋白质(⊗※)和乳铁蛋白(※※)的截留。结果已通过测试用具有所示孔隙率的Sartorius Stedium Vivacell 250UF膜分离含6%的氯化钠的2mg/mL的乳铁蛋白溶液获得。

[0031] 图12示出了膜的通量随分子量截断值增加(通过Synder Filtration获得的数据,水在25℃和3.4巴下处理),但30kDa和50kDa之间并没有明显的不同。

[0032] 图13示出了当通过超滤处理含氯化钠的乳铁蛋白溶液时,增加的膜分子量截断值提高了纯度,直至膜的孔隙率是50kDa。结果已通过测试用具有所示孔隙率的Sartorius Stedium Vivacell 250UF膜分离含6%的氯化钠的2mg/mL的乳铁蛋白溶液获得。

[0033] 图14示出了因通过装有传统的5kDa的膜或新型的50kDa的膜的UF7处理而导致的乳铁蛋白纯度的增加。绘出的值是平均值,而且条表示95%置信区间。

[0034] 详述

[0035] 本发明提供了用于从乳纯化乳铁蛋白或针对乳铁蛋白富集乳的改进方法。

[0036] 本发明人已经认识到需要允许以有效的方式制备富集的乳铁蛋白的方法。

[0037] 本文中使用的与乳铁蛋白有关的术语“纯化的”或“富集的”是指存在于残余物中的乳铁蛋白:总蛋白质的比例相对于存在于过滤步骤之前的乳中的该比例有所增加。对于要考虑被富集或被纯化的级分而言,它应具有比过滤步骤之前的乳中高至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、25、27、28或30、40、50、60、70、80、90、95、96、97、98、98或99%w/w的乳铁蛋白含量。

[0038] 第一方面的方法寻求使乳铁蛋白残余物的纯度增加至可达100%纯。

[0039] 如本文所用,术语“级分”是指乳的部分被纯化的部分。

[0040] 术语“有效的”的使用旨在表示当相较于目前使用的用于富集蛋白质的方法时经济且快速的方法。

[0041] 本文中提及的乳包括全脂乳、脱脂乳、酪乳、乳清(如酸或乳酪或/凝乳清)或乳清衍生物(例如乳清蛋白浓缩物或乳清分离蛋白隔离溢流物)和初乳。它还包括乳级分,例如已经历纯化步骤如阳离子交换色谱法的级分。这样的级分包括乳碱性蛋白级分和富乳铁蛋白级分。

[0042] 对本领域技术人员将是显而易见的是,乳可获自任何泌乳动物,例如反刍动物如牛、绵羊、水牛、山羊和鹿,包括灵长类如人的非反刍动物以及单胃动物如猪。优选地,源自全牛乳的脱脂乳被用在本发明的方法中。

[0043] 在第一方面的方法中使用的过滤包括膜过滤。在一个实施方案中,膜具有25kD、30kD、35kD、40kD、45kD、50kD、55kD、60kD、65kD、70kD或75kD的尺寸截断值。截断值优选为30kD或更大和50kD或更小。

[0044] 过滤可以包括超滤或渗滤或两者。

[0045] 在第一方面的方法中使用的盐处理包括加入足量的盐,使乳的离子强度为至少0.2M(1.1%)NaCl或等同物。在一个实施方案中,将离子强度维持在至少这个水平一段为获得要求的乳铁蛋白纯度的增加所需的期限。该期限可以是至少10分钟、15分钟、20分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时或更长,这取决于乳原料和所需纯度的增加。

[0046] 或者,在第一方面的方法中使用的盐处理包括加入足量的盐,使得乳的电导率为至少20mS。在一个实施方案中,在整个过滤步骤期间将电导率至少维持在这个水平。

[0047] 通常,乳将具有基本低于0.2M NaCl或等同物的离子强度或小于20mS的电导率,因此盐处理包括加入盐以将乳的离子强度或电导率增加至所需水平。然而,在某些情况下,例如当乳是已进行阳离子交换的级分时,乳将具有可为至少0.2M NaCl或等同物的离子强度或电导率将为20mS或更大。通常,对来自阳离子交换的级分进行处理以去除盐(例如用水渗滤)。然而,根据第一方面的方法,盐处理是以便在过滤步骤期间将乳的离子强度维持在至少0.2M(1.1%)NaCl或等同物或在过滤步骤期间将乳的电导率维持在至少20mS。

[0048] 如本文使用的,“电导率”是材料传导电流的能力。通常使用电导率计例如Hach Sension 5测量电导率。本领域技术人员将知道合适的测量电导率的可选装置。在钠离子浓度和电导率之间存在大致的线性关系。

[0049] 对盐处理中使用的盐没有限制,而且针对氯化钠的替代物将是本领域技术人员已知的。例如,可以使用任何可溶性无毒缓冲液,例如氯化物、柠檬酸、磷酸、乙酸、硫酸、碳酸氢、氢氧化物、咪唑、马来酸的可溶性钠盐、钾盐、钙盐、镁盐或锂盐。还可使用合成的两性离子缓冲液,例如Trizma、HEPES或甘氨酸。

[0050] 为了实现RNA酶和生长因子与乳铁蛋白的分离,在过滤步骤之前的乳的离子强度必须为至少0.2M(1.1%)NaCl或等同物。在一个实施方案中,通过加入1.1%的盐、1.5%的盐、2%的盐、2.5%的盐、3%的盐、3.5%的盐、4%的盐、4.5%的盐、5%的盐、5.5%的盐、6%的盐或更多来增加乳的离子强度。在另一个实施方案中,乳的离子强度被增加至0.2M、0.22M、0.24M、0.26M、0.28M、0.30M、0.32M、0.34M、0.36M、0.38M、0.40M、0.42M、0.44M、

0.46M、0.48M、0.50M、0.6M、0.7M、0.8M、0.9M、1.0M NaCl或等同物或更多。在另一个实施方案中,电导率是20mS、30mS、40mS、50mS、60mS、70mS、80mS、90mS、100mS、110mS、120mS或更大。

[0051] 在优选的实施方案中,盐处理包括在过滤步骤之前将0.2-0.5M NaCl或KCl加入至乳。

[0052] 在一个实施方案中,盐处理在4-10度下进行。

[0053] 在一个实施方案中,盐处理在10-30度下进行。

[0054] 在一个实施方案中,盐处理在30-50度下进行。

[0055] 在一个实施方案中,盐处理在50-70度下进行。

[0056] 在一个实施方案中,盐处理在低于20度下进行。

[0057] 在另一个实施方案中,因为在超过50度的温度下大肠菌的形成减少,所以在50度或更高下进行盐处理。然而,由于乳铁蛋白在大约70度变性,因此在60度或更高进行盐处理可能会导致产率下降。

[0058] 在一个实施方案中,过滤步骤在4-10度下进行。

[0059] 在一个实施方案中,过滤步骤在10-30度下进行。

[0060] 在一个实施方案中,过滤步骤在30-50度下进行。

[0061] 在一个实施方案中,过滤步骤在50-70度下进行。

[0062] 在一个实施方案中,盐处理在大气压力下进行。

[0063] 在一个实施方案中,过滤步骤在每膜小于2.5巴、更可能小于2.0巴、更可能再小于1.5巴、但理想1.0-1.4巴的跨膜压力下进行,虽然0.0-1.0巴的压力也可以合意地运行,但具有较低的跨膜通量。

[0064] “治疗(Treating)”或“治疗(treatment)”是指治疗性治疗和预防性或防范性措施,其中目的是预防、改善、减少或减缓(减轻)或改进病状、疾病或病症。

[0065] 如本文所用的“治疗(Treating)”或“治疗(treatment)”涵盖对脊椎动物、哺乳动物,特别是人类中的病状的任何治疗或预防。

[0066] “预防(Preventing)”、“预防(prevention)”、“预防的(preventative)”或“预防性的(prophylactic)”是指防止发生,或阻碍、抵御或防止包括异常或症状在内的病状、疾病、病症或表型。需要预防的受试者可能容易形成病状。

[0067] 术语“改善(ameliorate)”或“改善(amelioration)”是指包括异常或症状在内的病状、疾病、病症或表型的降低、减少或消除。需要治疗的受试者可能已经具有病状,或可能容易具有病状,或可能处于待被预防的病状中。

[0068] 如本文所用的术语“维持”是指延续治疗前水平的状态。

[0069] 第二方面的乳铁蛋白可以作为药物、兽药或营养素组合物或作为食品提供。

[0070] 药物组合物是一种适于施用给人类的组合物。兽药组合物是指一种适于施用给动物的组合物。通常这样的组合物将含有纯化的乳铁蛋白或至少组合物的所有组分将是可验证的。

[0071] 药物或兽药组合物可包含一种或多种载体和任选的其他治疗剂。每种载体、稀释剂、佐剂和/或赋形剂可以是“可接受的”。

[0072] “可接受的”是指其在生物学或其他方面不是不适宜的材料,即,在不引起任何不希望的生物作用或与包含它的药物或兽药组合物中的任何其他组分的有害方式的相互作用

用下,可以将材料连同所选的活性剂一起施用给个体。同理地,本文所提供的新型化合物的“可接受的”盐或酯是其在生物学或其他方面不是不适宜的盐或酯。

[0073] 如本文所使用的,“载体”是用于将试剂递送至受试者的可接受的溶剂、悬浮剂或媒介物。载体可以是液体或固体,并采用考虑中的计划施用方式选择。每种载体必须是在生物学或其他方面不是不适宜的意义上的“可接受的”,即载体可以在不引起任何或实质性的不良反应下连同试剂一起施用给受试者。

[0074] 药物或兽药组合物可以包含常规的无毒可接受的载体、佐剂和媒介物的制剂口服地、局部地或胃肠外施用。

[0075] 本文所用的术语胃肠外包括静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、皮下、结膜下、腔内、经皮和皮下注射、用于施用至肺或鼻腔的气雾剂或通过例如渗透泵输注的施用。

[0076] 药物或兽药组合物可以作为片剂、水性或油性悬浮剂、锭剂(lozenge)、口含片(troche)、粉剂、颗粒剂、乳剂、胶囊剂、糖浆剂或酏剂口服地施用。用于口服使用的组合物可以包含一种或多种选自甜味剂、调味剂、着色剂和防腐剂的组的试剂,以产生药学上美观和可口的制剂。合适的甜味剂包括蔗糖、乳糖、葡萄糖、阿斯巴甜(aspartame)或糖精。合适的崩解剂包括玉米淀粉、甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、黄原胶、膨润土、海藻酸或琼脂。合适的调味剂包括薄荷油、冬青油、樱桃、橙子或覆盆子调味剂。合适的防腐剂包括苯甲酸钠、维生素E、 α -生育酚、抗坏血酸、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯或亚硫酸氢钠。合适的润滑剂包括硬脂酸镁、硬脂酸、油酸钠、氯化钠或滑石。合适的延时剂包括单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。片剂可以包含与适于制造片剂的无毒的药学上可接受的赋形剂混合的试剂。

[0077] 这些赋形剂可以是,例如(1)惰性稀释剂,如碳酸钙、乳糖、磷酸钙或磷酸钠;(2)粒化剂和崩解剂,如玉米淀粉或海藻酸;(3)结合剂,如淀粉、明胶或阿拉伯胶;和(4)润滑剂,如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。这些片剂可以是未包衣的或通过已知技术包衣的,以延迟在胃肠道中的崩解和吸收,从而提供较长时期的持续作用。例如,可以采用例如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯的延时材料。

[0078] 用于胃肠外施用的制剂包括无菌水性或非水性溶液剂、悬浮剂和乳剂。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油以及可注射的有机酯如油酸乙酯。水性载体包括水、醇/水溶液、乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。胃肠外媒介物包括氯化钠溶液、林格氏葡聚糖、葡聚糖和氯化钠,乳酸林格氏静脉内媒介物包括液体和营养补充剂、电解质补充剂(例如基于林格氏葡聚糖的那些补充剂)等。还可以存在防腐剂和其他添加剂,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂、生长因子和惰性气体等。

[0079] 药物或兽药组合物还可含有其他提供补充的、额外的或增强的治疗功能的活性化合物。药物或兽药组合物还可以连同施用说明书一起被包括在容器、包装或分配器中。

[0080] 药物或兽药组合物可按一个剂量施用,或以一定间隔,例如每天一次、每周一次和每月一次施用。

[0081] 可以根据活性剂的半衰期或受试者的病状严重程度调整剂量时间表。

[0082] 通常,药物或兽药组合物作为单次剂量施用,以使对于剂量后的最大时间长度而言的活性剂的循环水平最大化。在单次剂量后还可以使用连续输注。

[0083] 第二方面的乳铁蛋白可以以营养素组合物或食品来提供。

[0084] 在本文使用的术语“营养素”是指从食品分离或纯化的可食用产品,在从乳制品分离或纯化的情况下,当口服施用其被证明具有生理有益效果或提供对急性或慢性疾病或损伤的保护或减弱。因此营养素可以膳食制剂或补充剂的形式,或单独地或与可食用的食品或饮料混合地呈现。

[0085] 营养素组合物可以是可溶性粉末、液体或即饮制剂的形式。或者,营养素组合物可以是作为食物的固体形式;例如,以即食棒或早餐谷物的形式。还可以存在各种调味剂、纤维、甜味剂和其他添加剂。

[0086] 营养素优选具有可接受的感官性质(如可接受的气味、味道和可口性),并且可以进一步包括选自维生素A、维生素B1、维生素B2、维生素B3、维生素B5、维生素B6、维生素B11、维生素B12、生物素、维生素C、维生素D、维生素E、维生素H和维生素K以及钙、镁、钾、锌和铁中的至少一种的维生素和/或矿物质。

[0087] 营养素组合物可如常规地制备;例如,该组合物可以通过将蛋白质和其他添加剂共混在一起制备。如果使用的话,乳化剂可以被包括在共混物中。可在此时加入另外的维生素和矿物质,但通常稍后加入以避免热降解。

[0088] 如果期望生产粉末状营养素组合物,则蛋白质可以与粉末状的其他组分混合。该粉末应具有按重量计小于约5%的含水量。然后可混入水,优选已进行过反渗透的水,以形成液体混合物。

[0089] 如果营养素组合物将以即用液体形式提供,则可以加热该营养素组合物以减少细菌载量。如果期望生产液体营养组合物,则优选将液体混合物无菌地装入合适的容器中。容器的无菌灌装可使用本领域中通常可用的技术进行。用于实施这种性质的无菌灌装的合适的装置是市售的。

[0090] 优选地,营养素组合物还包含一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。营养素组合物可包含缓冲液,例如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水化合物如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖;甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸例如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂例如EDTA;佐剂和防腐剂。

[0091] 营养素可以是婴儿配方乳,特别是用于施用给婴儿的人源化配方乳。

[0092] 当作为食品提供时,第二方面的乳铁蛋白可以采用食品补充剂、营养制剂、运动营养补充剂或婴儿配方乳的形式。在一个实施方案中,食品是动物饲料。

[0093] 贯穿本说明书,除非上下文另有要求,词语“包括/包含(comprise)”,或变体如“包括/包含(comprises)”或“包括/包含(comprising)”将被理解为暗示包括所示的元素或整体或元素或整体的组,但不排除任何其他元素或整体或元素或整体的组。

[0094] 还必须注意,如在本说明书所使用的,单数形式“一个(a)”、“一个(an)”和“所述”包括复数形式,除非上下文另有明确说明。

[0095] 对于本领域技术人员将是显而易见的是,为了清楚和理解的目的,虽然已经较详细地描述了本发明,但在不脱离本说明书中公开的本发明构思的范围下可以对本文描述的实施方案和方法作出各种修改和改变。

实施例:

[0096] 现在通过参考下列实施例进一步详细地描述本发明。实施例仅出于说明的目的而

被提供,并不旨在限制,除非另有规定。因此,本发明包括因本文所提供的教导而导致显而易见的任何和所有变化。

[0097] 实施例1:乳铁蛋白的超滤以去除小分子并提高乳铁蛋白纯度

[0098] 将APV中试规模的超滤设备装有6英寸的50kDa的膜(Synder),然后稳定化,使得基线压力为3.2-3.4巴且跨膜压力为1.2-1.4巴。将乳铁蛋白溶液(2mg/mL)溶液分成六个2L的批次。在六次除了电导率(0、20、40、60、80或100mS)之外都相同的实验中,将2L的乳铁蛋白溶液加入到UF进料罐,用水覆盖至170L并通过加入氯化钠溶液调节到指定的电导率。残余物被回收至进料罐并收集渗透物。用具有相同电导率的渗滤溶液代替被去除的渗透物。通过阳离子交换HPLC评估纯度。

[0099] 发现增加的盐浓度提高了渗透物通量(图1)。乳铁蛋白纯度从95%(0mS)增加至98.4%(100mS)(图2)。渗透的组分的浓度示于图3中,其示出了在100mS时乳铁蛋白和总蛋白质的量增加。既提高纯度又增加通量表明额外的氯化钠改善了该过程,并且至少40mS的电导率对于最佳地进行该过程而言是必要的。洗脱色谱设备并收集在UF4中的乳铁蛋白溶液旨在是96mS,所以发生在80mS和100mS之间的区域中的乳铁蛋白纯度的最佳增加与现有工艺是相容的,而无需进一步处理。

[0100] 实施例2:盐解聚乳铁蛋白

[0101] 将乳铁蛋白(95%的乳铁蛋白,作为蛋白质的百分数)按10mg/mL溶解于水中。将HPLC装有Superdex 20010/300GL柱(GE Healthcare),并采用0.5mL/分钟的流量的缓冲液A(Tris.HCl(pH 7,1g/L))平衡。缓冲液B是含1M氯化钠(pH 7)的Tris.HCl(1g/L),并且注入的样品为100 μ L。缓冲液B的量在0分钟至50分钟之间为0%,在50分钟和90分钟之间增加至100%缓冲液B,然后从90分钟到150分钟增加至16%缓冲液B。在每个随后的试验中,在0分钟至50分钟以及90分钟至150分钟之间,该盐增加了16%B。

[0102] 如图4所示,乳铁蛋白在约28分钟时以单一的主峰、之后是几个较小的峰洗脱,较小的峰包括乳铁蛋白片段和非乳铁蛋白。含0.48M NaCl的谱图D显示出典型的乳铁蛋白分布的实例。不含NaCl的谱图A示出了较小的乳铁蛋白的峰的存在以及在94分钟时较大的峰。在94分钟时的峰是不溶性乳铁蛋白,直到开始于50分钟时的较高的盐解离聚集的乳铁蛋白,并允许该乳铁蛋白通过包含在柱中的树脂床移动。

[0103] 图4中示出的结果证实了盐解离以95%的乳铁蛋白粉末存在的蛋白质,但是被解离的蛋白质不一定是乳铁蛋白,并导致将通过50kDa的膜的单个的蛋白质。结果表明,大于0.32M的NaCl对于发生解离作用而言是必需的。

[0104] 已经通过液体样品重复了实验并观察到类似的结果。

[0105] 实施例3:乳铁蛋白的超滤以去除小分子并提高乳铁蛋白纯度

[0106] 将六个Vivacell 250单元(Sartorius)装有50kDa的膜。用1mg/mL的乳铁蛋白溶液将每一个填充到250mL系(line),但是每一个具有不同的氯化钠浓度(0、1.5、3、4、5或6% NaCl)。将细胞加压至3巴。收集残余物和渗透物的样品并通过阳离子交换HPLC分析。

[0107] 发现增加的盐浓度提高了生长因子的传输(作为代表物的RNA酶),并增加了残余物中的乳铁蛋白的纯度(图5和图6)。

[0108] 实施例4:乳铁蛋白的超滤以去除小分子并提高乳铁蛋白纯度

[0109] 将超滤设备装有6英寸的50kDa的膜(Synder),然后稳定化,使得基线压力为3.2-

3.4巴且跨膜压力为1.2-1.4巴。将乳铁蛋白溶液(2mg/mL)溶液分成六个2L的批次。在六次除了电导率(0、20、40或60mS)之外都相同的实验中,将2L的乳铁蛋白溶液加入到UF进料罐,用水覆盖至170L并通过加入氯化钠溶液调节到指定的电导率。残余物被回收至进料罐并收集渗透物。用具有相同电导率的渗滤溶液代替被去除的渗透物。通过阳离子交换HPLC评估纯度。

[0110] 乳铁蛋白纯度从90.9%(0mS)增加至93.5%(60mS)(图7),这表示纯度增加了2.5%。乳铁蛋白纯度的增加是通过选择性去除生长因子(用作实例的RNA酶,图8)实现的。

[0111] 实施例5:在有或无超滤下使用二级阳离子交换色谱以改善增加的乳铁蛋白纯度

[0112] 通过Stomacher将乳铁蛋白粉末(40g,95.2%的乳铁蛋白)溶解在水(200mL)中。收集样品并通过阳离子交换HPLC分析。将乳铁蛋白溶液施加到填充有SP Fast Flow树脂(GE Healthcare)的柱(50mmD×1000mmL)。结合的乳铁蛋白从具有从0%至5.8%(1M)范围的氯化钠的3L线性梯度的树脂洗脱。收集主要的乳铁蛋白峰并通过阳离子交换HPLC分析。

[0113] 将少量的主要的乳铁蛋白峰(5mL)置于离心机驱动的50kDa的UF设备(Sartorius Stedim)中,用水稀释到3倍的初始体积(15mL),离心(8,000g×20分钟)直至1.5mL的乳铁蛋白被截留并最终通过阳离子交换HPLC分析。

[0114] 阳离子交换色谱和50kDa的UF组合得到98.9%的纯度,这超过了所需要的98%的蛋白质纯度,这是单独使用色谱法(97.8%)做不到的(图9)。阳离子交换色谱使乳铁蛋白的纯度提高了2.7%,并且随后的50kDa的UF步骤使纯度进一步提高了0.9%。给人希望地,50kDa的UF提高了纯度(即使在已经非常纯净的材料中),并且显示出50kDa的UF本身就值得试用。

[0115] 实施例6:初始实验以确定是否乳铁蛋白的超滤可以充分地增加乳铁蛋白纯度

[0116] 将乳铁蛋白粉末(1kg,纯度为96.3%的蛋白质)溶解在100L的水中。将乳铁蛋白溶液置于装有单个的Synder 6.3”的50kDa的膜(BX-5XB-6338)的APV UF设备中。乳铁蛋白溶液和存在于UF设备中的水的总体积为180L,并且因加入的氯化钠导致电导率为58mS。在10分钟内去除渗透物(100L)。加入水(100L)和盐以获得121mS的电导率。在10分钟内去除渗透物(100L)。之后通过水渗滤(400L渗透物)将乳铁蛋白残余物的电导率降低到1300μS。然后将乳铁蛋白残余物冷冻干燥(48h,1毫巴,40℃)。通过阳离子交换HPLC在MGC分析液体样品,并且通过外部实验室经由阳离子交换HPLC分析粉末样品(以粉末形式分析的样品应被认为是更准确的)。

[0117] 当在装有50kDa的膜的UF设备中已发生充分的渗滤时,乳铁蛋白纯度可提高约2%(基于蛋白质)。最终的纯度结果为98.1%(基于蛋白质)(图10),这表明该过程可能是可行的,而且进一步的发展是必要的。

[0118] 实施例7:膜分子量截断值对膜性能的影响

[0119] 膜分子量截断值(MWCO)是膜性能的最重要的影响因素。当膜的孔尺寸增加时,该膜允许较大的蛋白质通过(图11)并且通量增加(图12)。膜具有分离混合物中的组分的能力,但只有当一种或一些组分小于膜MWCO以及一种或一些组分大于膜MWCO时。在一般情况下,对于理想的分离而言,需要至少两个数量级的分子量差(即28Da的水和58Da的氯化钠可以几乎完全与78kDa的乳铁蛋白分离),但当这样的显著尺寸差不存在时有些分离也是可能的。如果目的是提高乳铁蛋白溶液的纯度,则50kDa的膜显示出是可用的最佳选择(图13)。

[0120] 实施例8:超滤膜

[0121] UF4

[0122] 类型:螺旋缠绕聚醚砜 (PES) MWC0:30kDa

[0123] 品牌:Synder 型号:MK2B-6338

[0124] 被称为UF4的超滤设备用于:

[0125] 1. 浓缩从阳离子交换柱洗脱的乳铁蛋白,以及

[0126] 2. 将乳铁蛋白洗脱盐回收至6%的盐罐以重新用在色谱法中。

[0127] 在更广泛的乳铁蛋白制造方法内的方法可行性:

[0128] -氯化钠 (2,000kg/批次) 是乳铁蛋白制造方法中的主要成本 (\$1,200元/批次), 而回收氯化钠的能力显著地降低了生产成本。

[0129] -通过回收氯化钠降低了对环境的损害。在Leongatha的三级处理以除去有机固体之后,含氯化钠的流出物通过海洋排水口处置,并且必须采取的所有步骤,以减少产生的废物量。盐回收过程减少了所需盐量的80%,这意味着被释放到环境中的氯化钠的量减少了8,000kg/批次 (三分之二是因UF4导致)。

[0130] 膜类型的可行性:

[0131] -螺旋膜是获得大面积的膜的相对便宜的方式,其在具有较小足迹的设备中实现了高通量。

[0132] -PES是迅速且完全地浸湿的固有亲水膜,导致具有优异的流速和高吞吐量的快速过滤。PES膜还是极其低的蛋白质结合,以将靶向蛋白质结合的可能性降至最低,这意味着高产率、稳定的跨膜通量和一致的表观膜孔隙率。

[0133] MWC0的可行性:

[0134] -30kDa的膜成功地截留了收获的乳铁蛋白 (通过该膜的蛋白质传输是存在的蛋白质的0.6%),其通过允许重要的污染物 (特别是RNA酶) 通过该膜来提高纯度。

[0135] -氯化钠 (58Da) 未被30kDa的膜截留,而乳铁蛋白 (80kDa) 被该膜截留,为此,从柱上洗脱的低浓度 (0.1%的蛋白质) 的乳铁蛋白可被浓缩至3%的蛋白质,在盐浓度或蛋白质损失中无相应的增加。

[0136] UF5

[0137] 类型:螺旋缠绕聚醚砜 (PES) MWC0:5kDa

[0138] 品牌:Synder 型号:MT2B-6338

[0139] 被称为UF5的超滤设备用于:

[0140] 1. 浓缩从阳离子交换柱洗脱的乳铁蛋白,以及

[0141] 2. 将2.5%的盐回收至2.5%的盐罐以重新用在色谱法中。

[0142] 在更广泛的乳铁蛋白制造方法内的方法可行性:

[0143] -氯化钠 (2,000kg/批次) 是乳铁蛋白制造方法中的主要成本 (\$1,200元/批次), 而回收氯化钠的能力显著地降低了生产成本。

[0144] -通过回收氯化钠降低了对环境的损害。在Leongatha的三级处理以除去有机固体之后,含氯化钠的流出物通过海洋排水口处置,并且必须采取的所有步骤,以减少产生的废物量。盐回收过程减少了所需盐量的80%,这意味着被释放到环境中的氯化钠的量减少了8,000kg/批次 (三分之二是因UF5导致)。

[0145] 膜类型的可行性:

[0146] -螺旋膜是获得大面积的膜的相对便宜的方式,其在具有较小足迹的设备中实现了高通量。

[0147] -PES是迅速且完全地浸湿的固有亲水膜,导致具有优异的流速和高吞吐量的快速过滤。PES膜还是极其低的蛋白质结合,以将靶向蛋白质结合的可能性降至最低,这意味着高产率、稳定的跨膜通量和一致的表现膜孔隙率。

[0148] MWC0的可行性:

[0149] -5kDa的膜截留了非乳铁蛋白杂质,这防止了它们返回至色谱法以及在后续的乳铁蛋白洗脱期间污染该乳铁蛋白。因为蛋白质混合物包含多种较小的蛋白质,其中的许多蛋白质为生长因子,所以需要较小的膜。

[0150] -氯化钠(58Da)未被5kDa的膜截留,而乳过氧化物酶(80kDa)、免疫球蛋白(150至420kDa)和生长因子(5至17kDa)被该膜截留,为此,从柱上洗脱的低浓度(0.1%的蛋白质)的蛋白质可被浓缩至3%的蛋白质,在盐浓度或蛋白质损失中无相应的增加。

[0151] MF6

[0152] 类型:陶瓷管(氧化铝) MWC0:0.8 μ m

[0153] 品牌:Pa11 型号:Membralox GP 19

[0154] 被称为MF6的微滤设备用于:

[0155] 1.减少存在于乳铁蛋白溶液中的微生物的数量;以及

[0156] 2.去除不溶性物质。

[0157] 膜类型的可行性:

[0158] -陶瓷膜具有针对化学清洗剂的高耐受性,可被积极清洗,以确保完全去除微生物。它们也是不会撕裂的非常强健的膜,这可允许污染材料通过该膜。

[0159] MWC0的可行性:

[0160] -减少不溶性材料(增加的透明度)和微生物污染。

[0161] -设备是0.8 μ m,而不是0.22 μ m,以允许蛋白质以合理的体积和固体浓度通过该膜。由于主要原料(脱脂乳)先前已被巴氏消毒,所以过滤器并不旨在为完整的微生物去除步骤。

[0162] UF7

[0163] 类型:螺旋缠绕聚偏氟乙烯(PVDF) MWC0:50kDa

[0164] 品牌:Synder 型号:BN4B-6338

[0165] 被称为UF7的超滤设备用于:

[0166] 1.通过减少非乳铁蛋白的蛋白质来提高乳铁蛋白纯度,以及

[0167] 2.通过去除氯化钠和残余的乳糖将蛋白质增加至>95%的固体。

[0168] 在更广泛的乳铁蛋白制造方法内的方法可行性:

[0169] -旨在用于制造铁蛋白OB的乳铁蛋白具有高于标准乳铁蛋白的乳铁蛋白纯度。较高的纯度通过用50kDa的膜取代历史上曾经使用的5kDa的膜获得(图14)。

[0170] 膜类型的可行性:

[0171] -螺旋膜是获得大面积的膜的相对便宜的方式,其在具有较小足迹的设备中实现了高通量和相对短的处理时间。

[0172] -亲水性聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜具有高的跨膜通量和对蛋白质的低附着力。为此, 因为很少有蛋白质污染膜孔, 所以在该方法期间保持着高通量以及高产率。

[0173] MWC0的可行性:

[0174] -对于较小的膜 (历史上曾经的5kDa的膜) 而言, 50kDa的膜是优选使用的, 因为它们可以改善非乳铁蛋白的蛋白质 (RNA酶、生长因子) 的传输, 同时截留乳铁蛋白。增加的非乳铁蛋白的传输导致较高的乳铁蛋白纯度 (纯度平均增加1.8%蛋白质, $P < 0.001$)。进一步的细节可以从 'Increasing Lactoferrin Purity by Diafiltration with Salt Solution in an Ultrafiltration Plant Fitted with 50kDa Membranes' (JR0010) 中获得。

[0175] -氯化钠 (58Da) 未被50kDa的膜截留, 而乳铁蛋白 (80kDa) 被该膜截留, 为此, 从柱上洗脱的低浓度 (3%的蛋白质) 的乳铁蛋白可被浓缩至 >20%的蛋白质, 在盐浓度或蛋白质损失中无相应的增加。

[0176] -通过去除水来增加总固体, 且因此将冷冻-干燥的固体吞吐量最大化。

[0177] 实施例9: 完全商业规模试验以证实乳铁蛋白的纯度可通过50kDa的UF提高

[0178] 为了实现对变化的有效性的比较, 将来自色谱法的一个批次分成两半。一半通过装有5kDa的膜的UF7在无盐渗滤下处理, 而另一半通过装有50kDa的膜的UF7在盐渗滤下处理。

[0179] 通过用与实验1和实验6中使用的那些膜相同的Synder 50kDa的膜替换存在于UF7中的5kDa的膜来修改常规商业规模的方法。商业方法中还加入了盐渗滤步骤。渗滤溶液使用的盐通过将150kg氯化钠加入至3000kg水来制备。

[0180] 在表1中呈现的结果表明, 50kDa的UF膜和额外的氯化钠渗滤步骤可以将乳铁蛋白纯度提高2.4% (基于蛋白质)。最终的乳铁蛋白纯度为97.8% (基于蛋白质), 并接近98.0% (基于蛋白质) 的目标纯度。蛋白质的组成在其他方面是相似的, 这表明方法没有负面影响。

[0181] 表1. 通过标准UF7方法和高纯度UF7方法制成的组合物乳铁蛋白的比较, 表明粉末除了乳铁蛋白纯度的增加之外都是相似的。

		标准方法	高纯度方法
		LLL17FEB12B6	LLL21FEB12B6
[0182]	水分 (% w/w)	2.3	3.1
	脂肪 (% w/w)	0.3	0.4
	乳铁蛋白 (% 蛋白质)	95.4	97.8
	灰分 (% w/w)	<0.1	<0.1
	蛋白质 (% w/w)	>97.3	>96.4

[0183] 总之, 商业规模试验产生了具有98.0% (基于蛋白质) 的乳铁蛋白纯度的粉末, 这比通过源自乳铁蛋白的UF4溶液的纯度高1.1%。该方法再次显示可以在完全商业规模下成功地运行。

[0184] 在装有50kDa的膜的UF设备中乳铁蛋白溶液通过盐溶液的渗滤已经显示出成功地将乳铁蛋白的纯度提高了1%和2.4% (基于蛋白质) 之间, 并且能够产生具有98%的乳铁蛋白纯度 (基于蛋白质) 的产物。显示出对于在最佳水平下运行的方法而言, 需要5%至6%的

氯化钠浓度,这是容易的,原因是6%的氯化钠用于从阳离子交换柱洗脱乳铁蛋白。

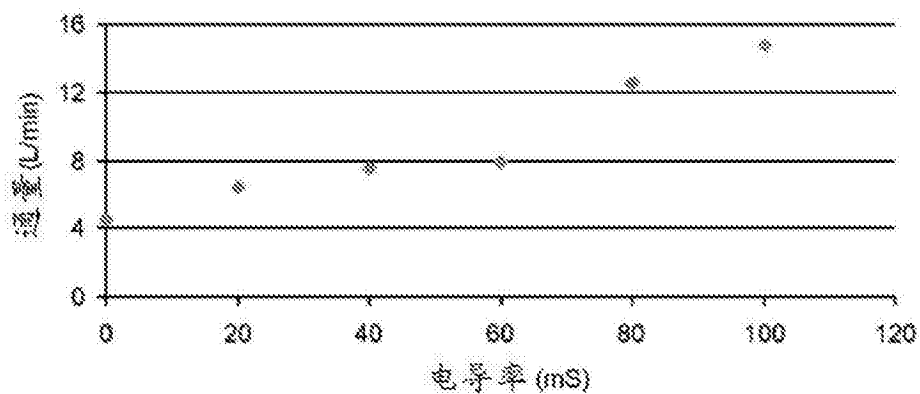


图1

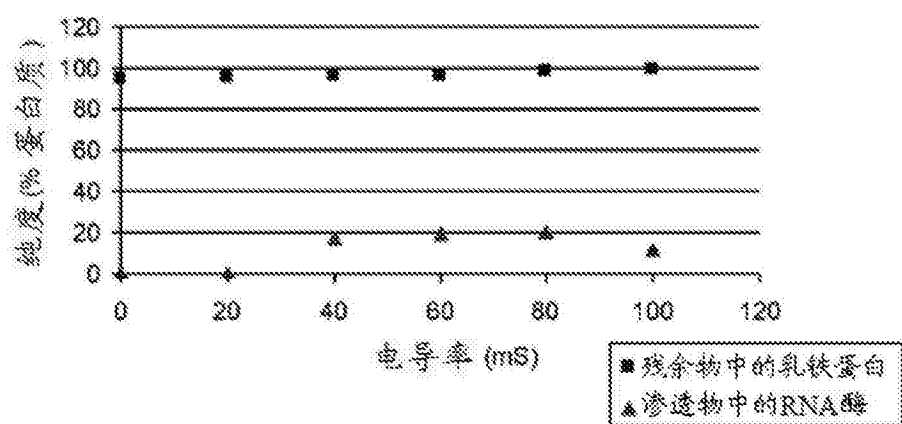


图2

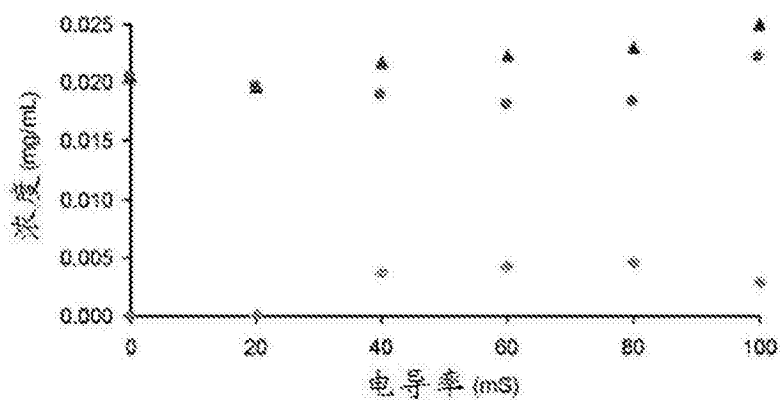


图3

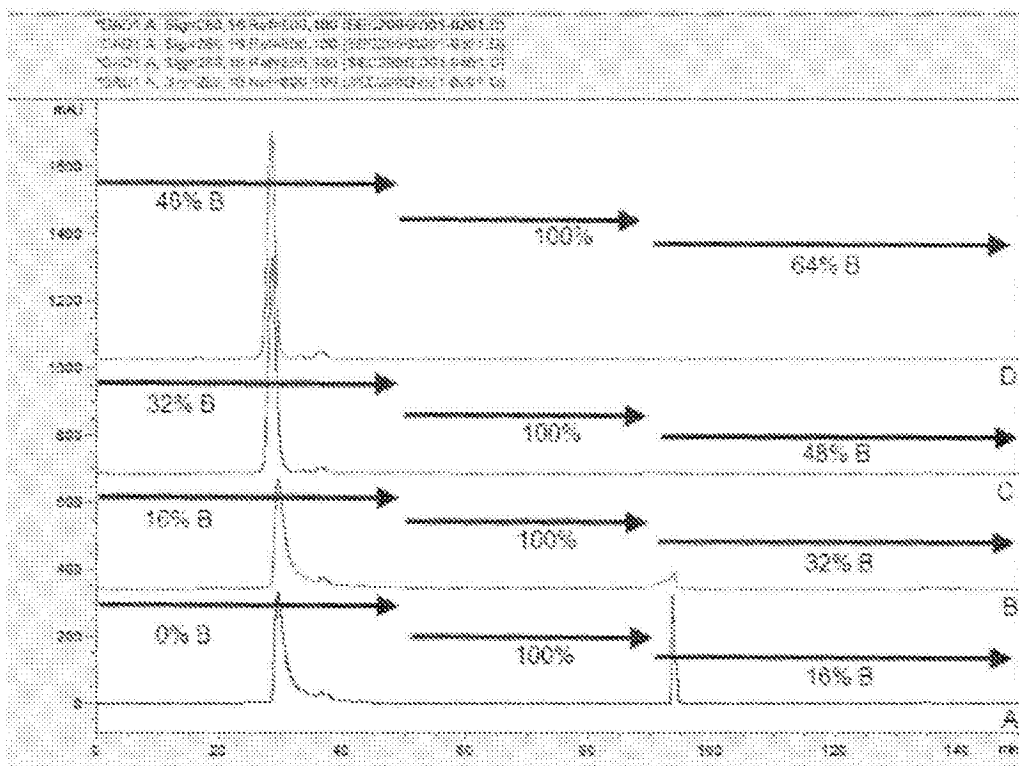


图4

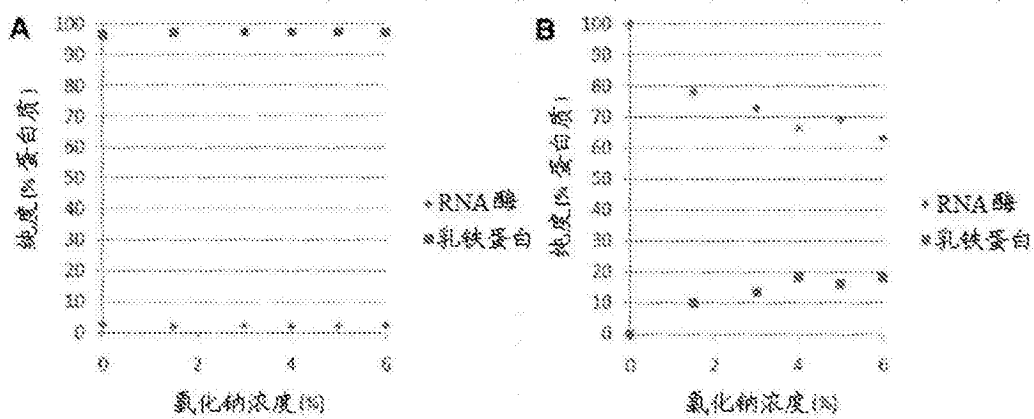


图5

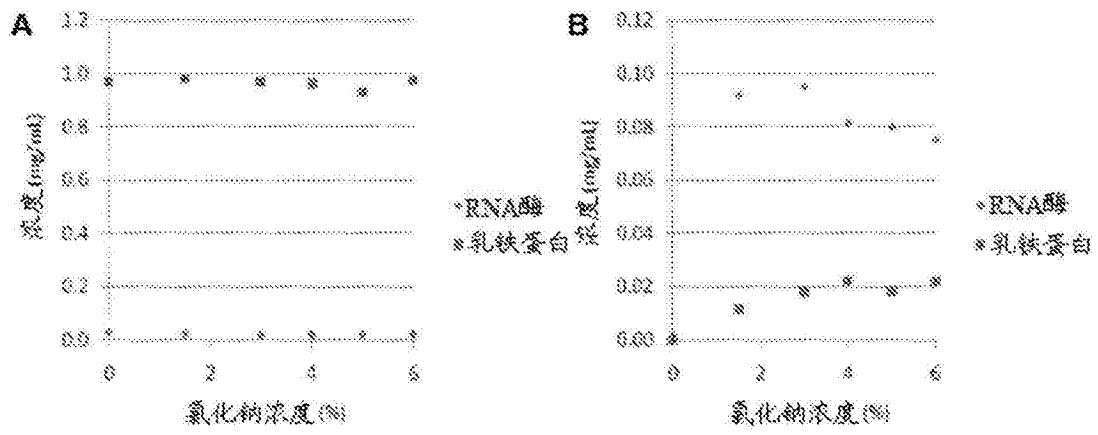


图6

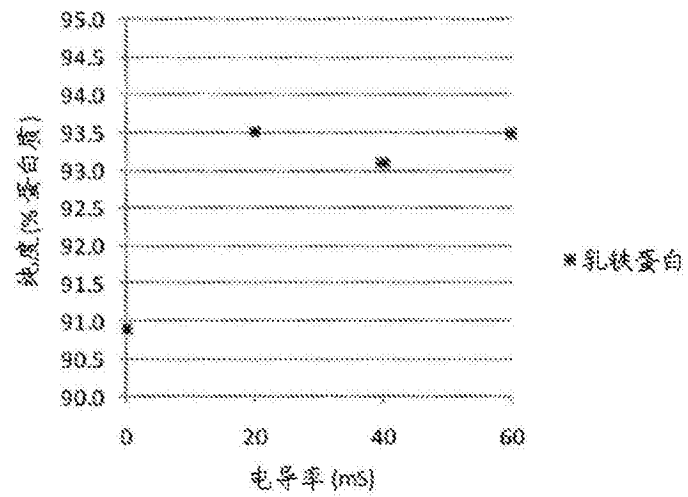


图7

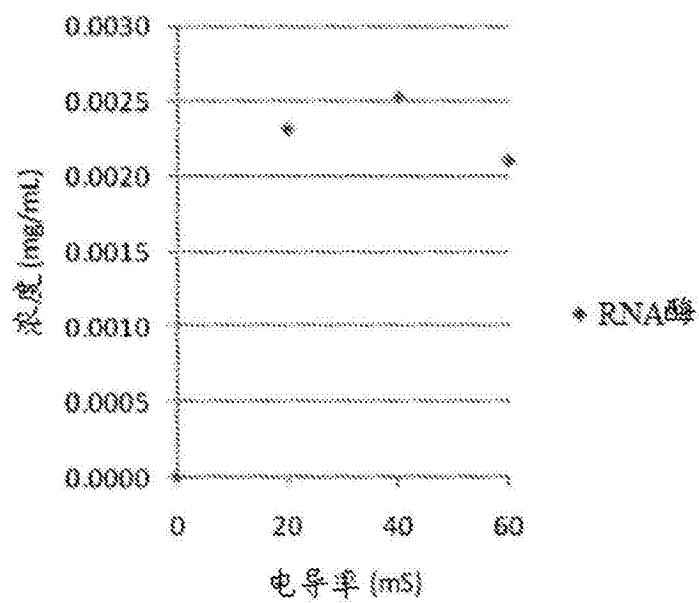


图8

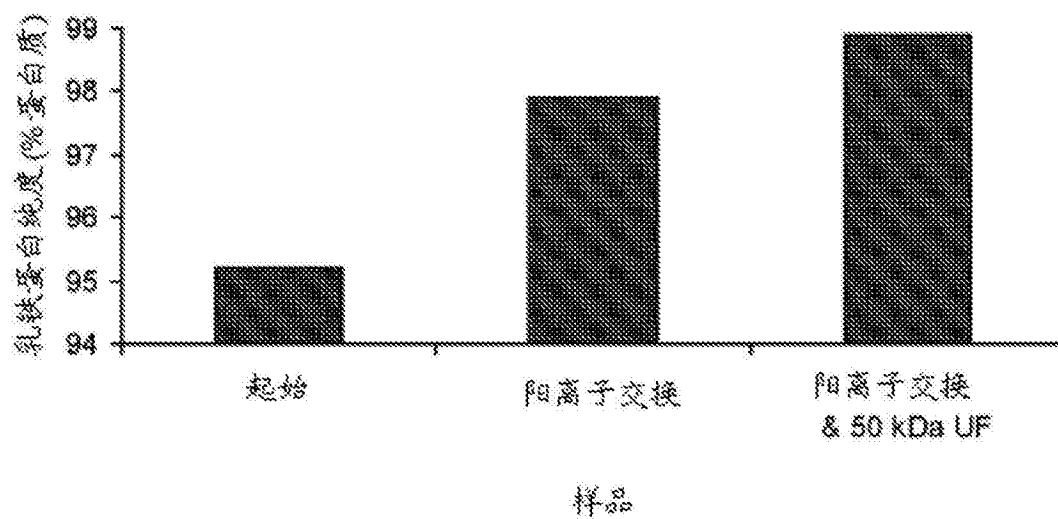


图9

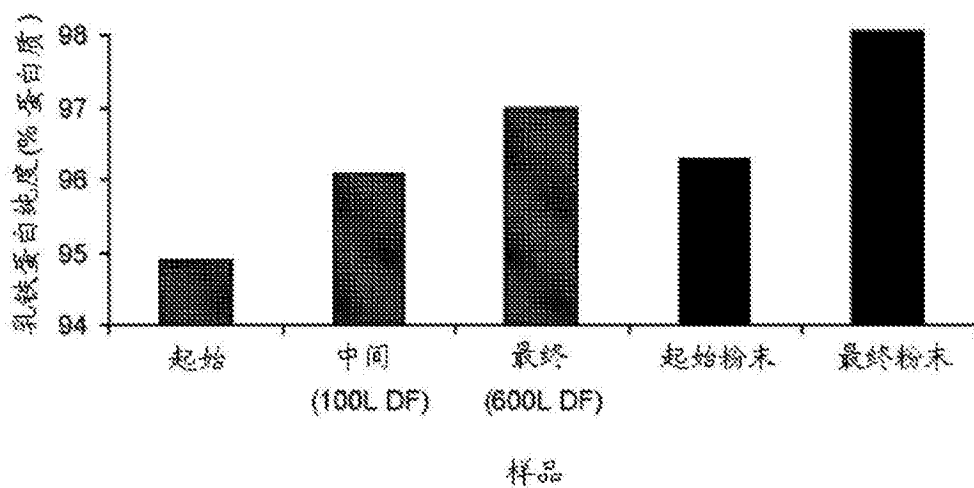


图10

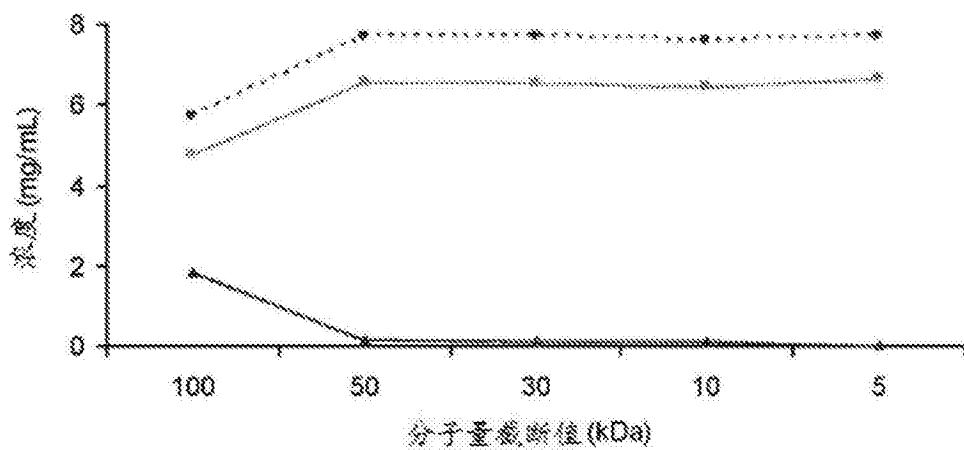


图11

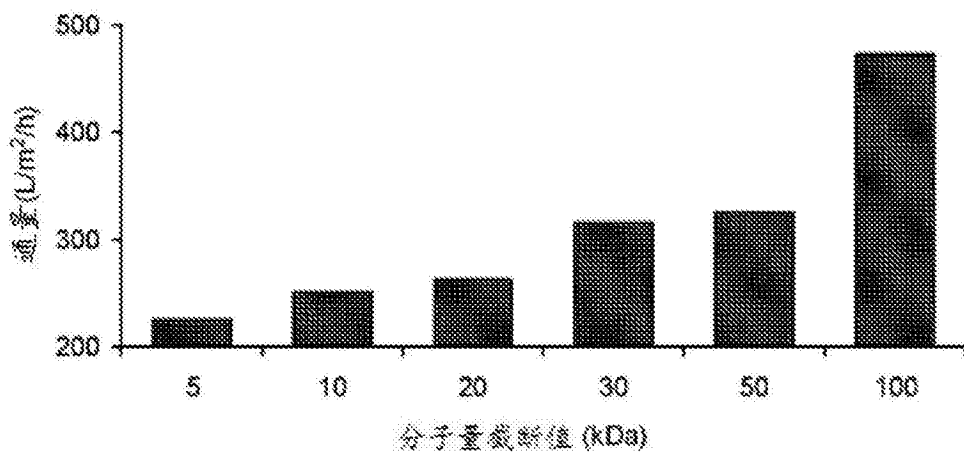


图12

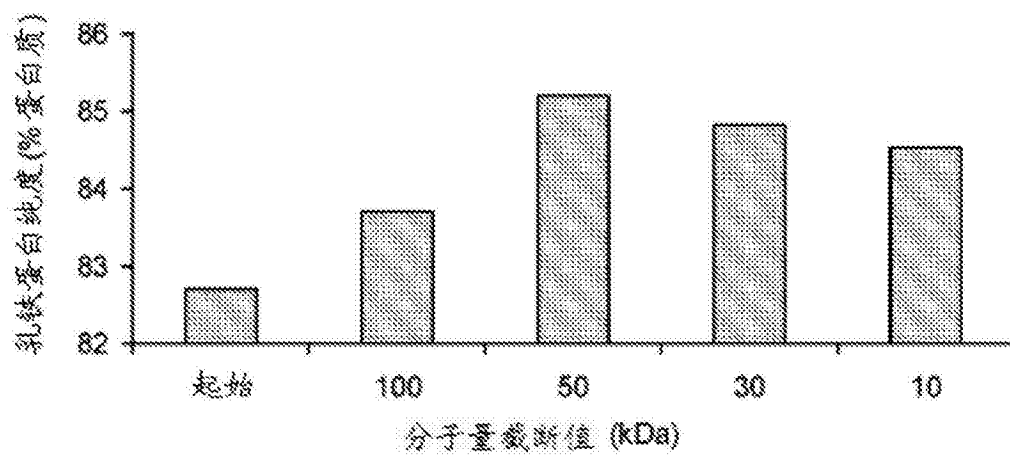


图13

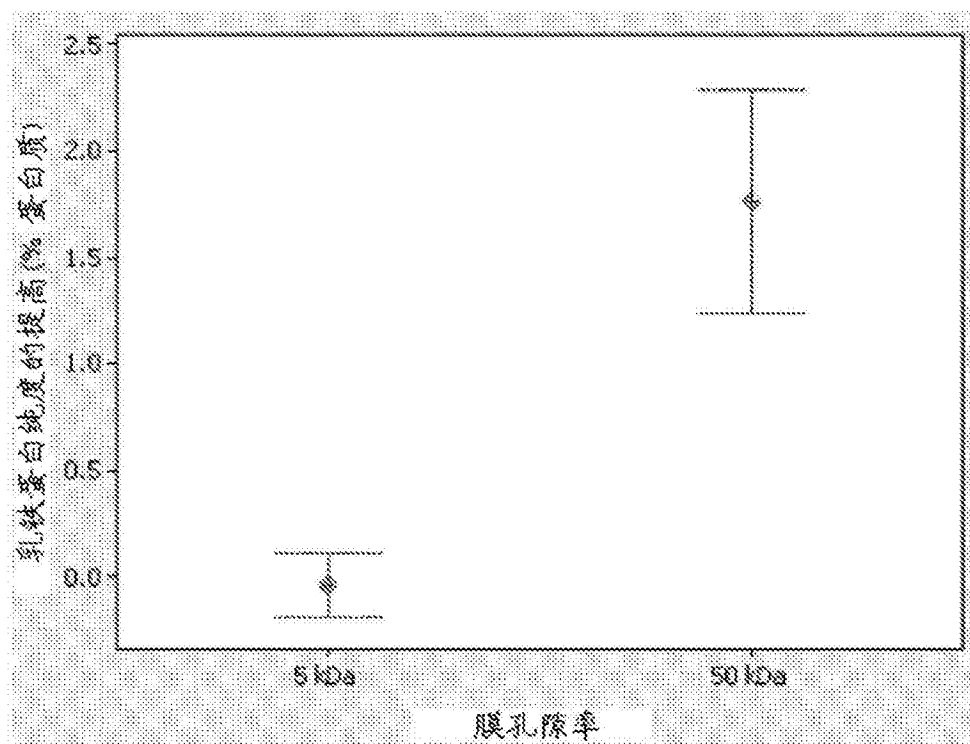


图14