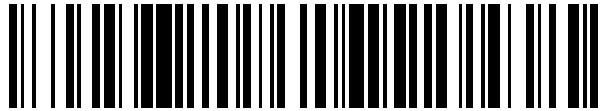


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 180**

51 Int. Cl.:

C12P 19/26 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2007 E 07849680 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2049692**

54 Título: **Proceso para la preparación de ácido polisialico de gran pureza**

30 Prioridad:

13.07.2006 IN MU11102006
20.12.2006 IN MU20832006

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.04.2016

73 Titular/es:

SERUM INSTITUTE OF INDIA LTD, (100.0%)
212/2, OFF SOLI POONAWALLA ROAD
HADAPSAR MAHARASHTRA
PUNE 411 028, IN

72 Inventor/es:

KAPRE, SUBHASH V. y
SHALIGRAM, UMESH

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 565 180 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proceso para la preparación de ácido polisialico de gran pureza.

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un proceso a escala comercial para la producción de ácido polisialico de gran pureza con altos rendimientos.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El ácido polisialico (PSA), conocido como ácido colominico, es un polímero del ácido siálico cuyo grado de polimerización (DP) es de 8 a 200 restos (Barker, S. A., Jones, R. G., Somers, P. J.; Improvements in the production and isolation of Colominic acid; Carbohydrate research; 369-376, 3, (1967). La estructura más común del PSA es el polímero de Neu5Ac, con enlaces α 2→8 entre sus restos. La conformación del PSA es una estructura helicoidal, en la cual la sustitución de *N*-acetilo en la posición C5 está enfrentada al espacio exterior de la hélice. El PSA es un componente importante de las glucoproteínas, gangliósidos y oligosacáridos y normalmente se encuentra en sus posiciones terminales.

El PSA es un constituyente natural del cuerpo humano y también de ciertas bacterias. El PSA ha evolucionado a lo largo de millones de años en las bacterias para desafiar al sistema de defensa del cuerpo. Al ser químicamente idéntico al PSA del cuerpo humano, el PSA bacteriano, por su mimetismo estructural, carece totalmente de inmunogenicidad, incluso cuando está acoplado a proteínas. A diferencia de otros polímeros (por ejemplo, PEG), el PSA es biodegradable. Esto es especialmente importante cuando se usa un polímero para tratamientos administrados a largo plazo o en grandes dosis.

El ácido polisialico tiene amplias aplicaciones en la farmacología. Para un uso óptimo de los agentes terapéuticos, a menudo se necesita su presencia exclusiva en una forma estable en el cuerpo. Sin embargo, numerosos agentes terapéuticos, por ejemplo, citocinas, hormonas, enzimas y otras proteínas tales como fragmentos de anticuerpos, así como fármacos convencionales se inactivan o eliminan del cuerpo rápidamente, antes de que puedan alcanzarse concentraciones efectivas en la sangre o en los tejidos diana. A este respecto, el ácido polisialico puede usarse para mejorar la farmacocinética y la farmacodinámica de moléculas terapéuticas. El PSA como vehículo de administración para moléculas farmacológicas, especialmente de pequeño tamaño, puede evitar muchos de los problemas que se encuentran en el uso directo de tales moléculas farmacológicas. Puede mantener su funcionalidad en la conjugación, mejorar su estabilidad *in vivo*, prolongar su presencia en la circulación sanguínea, prolongar su acción farmacológica y reducir su inmunogenicidad y antigenicidad. El PSA presenta ciertas ventajas que pueden ser esenciales para la próxima generación de agentes terapéuticos. En particular, para actuar como vehículo para moléculas farmacológicas, será deseable un PSA de alto peso molecular.

Con el fin de satisfacer la creciente demanda de PSA comercial, se necesita una producción económica a gran escala de un PSA de alto grado de pureza. Solamente se han explorado algunas fuentes naturales, tales como nidos de golondrina, suero de leche de la producción quesera, chalaza, membranas de huevo y los productos de procesos de fermentación microbiana, para la preparación práctica de PSA a escala industrial.

El documento JP 1-144989A describe la producción de ácido colominico por *E. coli* M12, pero con rendimientos muy bajos, ~40 mg/l.

El documento JP 05084091 describe el uso de ácido L-málico como fuente de C y de sulfato de amonio como fuente de N con el fin de aumentar la producción el ácido colominico. La patente no describe los rendimientos finales, el proceso de aislamiento ni la pureza del producto.

El documento JP 06245786A2 describe la fermentación de un material de partida líquido mediante *E. coli* con el fin de producir el ácido colominico y su purificación posterior por cromatografía de afinidad en columna usando lectina como fase estacionaria. La desventaja asociada con este procedimiento es que implica la inmovilización de la lectina sobre el gel, un largo proceso en varias etapas, para su uso como fase estacionaria. Además, durante el proceso de purificación posterior, se requieren etapas de elución adicionales con un tampón de acetato de sodio para eliminar la *N*-acetil-D-glucosamina usada como agente inhibidor de la lectina y glucoproteína de germen de trigo.

Mushtaq y col. (2004 Antimicrob. Agents Chemother. 48(5) 1503-1508) describen *E. coli* K1 LP 1674 que produce

PSA, donde *E. coli* produce el PSA en el cuerpo del paciente para causar la infección.

Weisgerber y col. (1990 JBC 265/3 1578-1587) y Pelkonen y col. (1988 J. Bacteriol. 170(6) 2646-2653) describen medios que contienen casaminoácidos para la producción de PSA. El artículo expone la biosíntesis de una cápsula de PSA en *E.coli* K1. Todo el trabajo realizado en este documento es a escala de laboratorio/caracterización.

Zhan y col. (2002 Biochem. Engg J. 11(2) 210-204) describen la producción de PSA por fermentación por lotes o lotes alimentados, con el pH controlado a 6,4 durante la fase estacionaria. La desventaja de este procedimiento es que el PSA producido por este procedimiento es de bajo peso molecular.

10 Ringenberg y col. (2001 Glycobiology 11(7) 533-539) describen el aislamiento de PSA mediante ultrafiltración y su análisis mediante HPLC en una columna CarboPac PA 1. Los volúmenes manejados en este caso son del orden de μ l.

15 Lin y col. (1999 Glycobiology 9(8) 807-814) e Inoue y col. (2001 Glycobiology 11(9) 759-769) describen la preparación de muestras de ácido oligo/polisiálico mediante Prep DEAE Sephadex A25 donde, a partir de diversas fuentes, se obtienen muestras puras de ácido colomínico o Neu5Ac que después se separan por cromatografía preparativa de intercambio iónico.

20 L. Puente-Polledo y col., 1998, Glycoconjugate Journal 15, 855-861, describen un proceso para la producción de PSA con una pureza superior al 95 %.

Ohe y col. (2002 Glycobiology 12(1) 47-63), Miyata y col. (2004 Glycobiology 14(9) 827-840) y Hallenbeck y col. (1987 Anal. Biochem., 15 de febrero; 161(1), 181-6) desvelan el análisis de muestras de PSA mediante HPLC con una columna de intercambio aniónico.

La patente JP08-070882 de NGK Insulators Ltd. describe un proceso para la purificación de ácido siálico después de la hidrólisis de PSA, donde el PSA se aísla mediante ultrafiltración y cromatografía de intercambio iónico. La patente no describe los rendimientos de PSA ni la pureza del mismo. Tampoco queda clara la escala de la operación.

30 Adam y col. 1995 Anal. Biochem., 1 de marzo; 225(2), 321-7, describen que ni ultracentrifugación, DetoxiGel ni cromatografía de intercambio iónico eliminan las endotoxinas, con excepción de la cromatografía de filtración en gel llevada a cabo a 60 °C en un tampón de desoxicolato de sodio.

35 Para la eliminación del ADN, proteínas, lípidos y otras impurezas, se usan procesos de purificación como extracción con fenol, detergentes y precipitación con disolventes, etc. La desventaja del fenol es que es corrosivo y peligroso de usar al aumentar la escala. Los procedimientos de extracción y separación de fases con disolventes son laboriosos al emplear equipamientos a gran escala de acuerdo con las normas GMP, el manejo de grandes cantidades de fenol a 65 °C es poco práctico en el procedimiento de extracción.

40 Otro procedimiento de purificación que implica precipitación presenta la desventaja de una operación poco práctica y laboriosa a escala comercial, falta de uniformidad entre lotes, escasa obtención y un bajo grado de purificación.

Para precipitar las proteínas se usa normalmente ácido tricloroacético (TCA); sin embargo, el TCA puede hidrolizar los productos como el ácido polisiálico durante las etapas de purificación.

El uso del detergente CTAB para la precipitación [(Bolanos, R., Dewitt, C. W., Isolation and characterization of the K1 (L) antigen of *Escherichia coli*, J. Bacteriology 1987-1996, 19, 3, (1966)] presenta la desventaja de escasos rendimientos. También es difícil eliminar el detergente, el cual interfiere con otros procedimientos de purificación, por lo que se requiere otra etapa de eliminación. Además, una etapa adicional en forma de una precipitación con etanol reduce aún más la obtención, debido a la precipitación simultánea de productos como PSA y proteínas. Es necesario añadir una etapa adicional de redisolución del precipitado y etapas de precipitación fraccionada.

Para eliminar las impurezas de carbohidratos en el proceso cromatográfico, se usa boronato de fenilo, del que se sabe que presenta una afinidad general por carbohidratos (Hage, D. S., Affinity chromatography: A review of clinical applications, Clin. Chem. 593-615, 45:5, (1999). La columna requiere mayores cantidades de resina al aumentar la escala. La mayor dificultad en el uso de boronato de fenilo es que retiene las impurezas proteínicas en una mezcla sin separación, lo que afecta a la pureza.

Se ha descrito en la bibliografía el uso de hidroxapatito (HA) para la separación del ADN de muestras, ya que muestra una gran afinidad de unión por las moléculas de ADN. La desventaja es que las proteínas también permanecen junto con el ADN más allá de los límites permisibles.

- 5 Pocas etapas de procesamiento posibles darían como resultado el modo más eficiente de alcanzar una alta eficiencia y bajos costes en el proceso de producción total. Los procesos de purificación más usados actualmente todavía incluyen múltiples etapas de procesamiento, lo que aumenta los costes y las pérdidas de producto y ofrece oportunidades de contaminación.
- 10 El estado de la técnica descrito anteriormente presenta una o más de las desventajas seleccionadas de entre:
1. procedimientos de escala analítica o preparativa
 2. bajos rendimientos
 - 15 3. producto bruto o impuro

Por consiguiente, existe la necesidad de un proceso de producción y purificación de PSA que supere los problemas observados en el estado de la técnica y proporcione mayores rendimientos de ácido polisiálico con un alto grado de pureza.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un proceso a escala comercial para la producción de ácido polisiálico de gran pureza.

En particular, la invención se refiere a un proceso de alto rendimiento que comprende fermentación y purificación.

El proceso para la producción de ácido polisiálico de acuerdo con la reivindicación 1 comprende:

- 30 a. fermentación para producir ácido polisiálico con altos rendimientos;
- b. aislamiento y purificación de ácido polisiálico de gran pureza.

35 El ácido polisiálico obtenido por la presente invención tiene mayor peso molecular. El peso molecular del ácido polisiálico es de entre 70.000 y 100.000 Da.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

40 La presente invención se refiere a un proceso a escala comercial para la producción de ácido polisiálico de gran pureza.

La presente invención es un proceso para la producción de ácido polisiálico de gran pureza con altos rendimientos, de acuerdo con la reivindicación 1.

45 Específicamente, el ácido polisiálico de gran pureza tiene una pureza superior al 95 %, preferentemente una pureza superior al 99,0 %, con mayor preferencia, una pureza superior al 99,9 %. Las impurezas totales encontradas en el PSA preparado de acuerdo con el proceso de la invención son inferiores al 5 %, preferentemente inferiores al 1 %, con mayor preferencia, inferiores al 0,1 %. El PSA preparado de acuerdo con el proceso de la invención muestra un contenido de endotoxinas inferior a 100 UE/μg, preferentemente inferior a 10 UE/mg.

El PSA preparado de acuerdo con el proceso de la invención tiene un peso molecular de entre 70.000 y 100.000 Da.

El proceso de la presente invención comprende etapas de fermentación y purificación que producen altos rendimientos de PSA con muy pequeñas cantidades de impurezas como proteínas, ácidos nucleicos o endotoxinas.

La etapa de fermentación de la presente invención se lleva a cabo con el empleo de un microorganismo adecuado capaz de producir PSA. El microorganismo puede ser natural o modificado genéticamente mediante técnicas convencionales o dirigidas. El organismo es una *E. coli* capaz de producir PSA, pertenece al serogrupo O7:K1 y no

muestra O-acetilación del ácido polisialico, preferentemente *E.coli* LP 1674.

El medio de fermentación contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y macro y micronutrientes conocidos por un experto en la técnica o el estado de la técnica. Los ingredientes preferidos se seleccionan de entre glicerol, azúcares, preferentemente glucosa y sal.

El medio nutriente comprende 8-12 g/l de sorbitol, 0,4-0,6 g/l de extracto de levadura, 8 g/l de casaminoácidos, 8-12 g/l de hidrogenofosfato de potasio, 0,001-0,003 g/l de sulfato de cobre y 0,4-0,6 g/l de sulfato de magnesio.

10 Sorprendente e inesperadamente, se ha encontrado que, cuando se le añaden a *E. coli* compuestos seleccionados de entre casaminoácidos, extracto de levadura, sorbitol y sulfato de cobre, se obtienen mayores rendimientos de PSA en comparación con el medio conocido del estado de la técnica.

15 Sorprendente e inesperadamente se encontró que si se incubaba el medio nutriente inoculado a un pH de 6-8 y una temperatura de 30 °C a 40 °C, con un porcentaje de oxígeno disuelto del 35 % al 45 % y una agitación de 100 a 150 rpm, la producción de PSA de alto peso molecular podía llevarse a cabo por lotes, lotes alimentados o en modo continuo, sin afectar a la productividad de PSA. A su vez, la productividad de PSA aumenta considerablemente cuando la fermentación se lleva a cabo en condiciones controladas y se añaden los ingredientes del medio especificados.

20 La etapa de fermentación de la presente invención se lleva a cabo en condiciones controladas de pH, temperatura y oxígeno disuelto por lotes, lotes alimentados o en modo continuo. En una realización especialmente preferida, el proceso de la presente invención se lleva a cabo por lotes alimentados durante un tiempo prolongado, por ejemplo, más de cinco días o 150 h, sin afectar a la productividad de PSA.

25 El pH preferido en la etapa de fermentación es de 7 (\pm 0,5), el oxígeno disuelto (OD) preferido en la etapa de fermentación es del 40 % (\pm 5) y la temperatura preferida de la fermentación es de 37 °C (\pm 5).

En el modo de fermentación por lotes alimentados, la fermentación puede llevarse a cabo durante 100 a 150 h.

30 Después de una producción suficiente de PSA en el caldo de fermentación, dicho caldo puede someterse a una etapa de aislamiento de la masa celular. La etapa puede seleccionarse de entre centrifugación o filtración de flujo cruzado. El sobrenadante obtenido contiene el PSA y, por lo tanto, la masa celular puede recircularse al fermentador para una fermentación continua, si se desea. Generalmente, en esta etapa el contenido de proteína es aproximadamente del 7 % y el contenido de ácidos nucleicos es aproximadamente del 2 % p/p con respecto al PSA. El sobrenadante que contiene el producto puede someterse a un proceso de concentración. La concentración del sobrenadante puede llevarse a cabo por ultrafiltración.

40 La masa que contiene el producto puede someterse a purificación mediante cromatografía. El producto puede purificarse con adsorbentes seleccionados de entre hidrófobos, iónicos o de afinidad. La adsorción/desorción puede llevarse a cabo de tal manera que el producto no se absorba en el adsorbente mientras se adsorben las impurezas.

El adsorbente hidrófobo preferido puede seleccionarse de entre una matriz ligada con octilo, fenilo o un grupo hidrófobo adecuado de la matriz o unido a la matriz.

45 El adsorbente iónico puede seleccionarse de entre una matriz cargada con DEAE, Q o un intercambiador iónico adecuado.

50 También puede emplearse un intercambiador catiónico (por ejemplo, carboximetilo, SP o PS-DVB SO_3^-) en la purificación de PSA, si se requiere.

El adsorbente de afinidad puede seleccionarse para adsorber las impurezas. El adsorbente preferido se selecciona de tal manera que se adsorban las endotoxinas pero no se adsorba el producto en el adsorbente. El adsorbente que más se prefiere es DetoxiGel.

55 El producto puede someterse a filtración estéril con una membrana de 0,2 μm u otro procedimiento adecuado.

Inesperadamente, se ha encontrado que el producto final obtenido después de la purificación muestra niveles de pureza muy elevados. Las impurezas totales encontradas fueron inferiores al 5 %. El contenido de proteína

encontrado fue inferior al 1 % p/p de proteína/péptidos. El contenido de ácidos nucleicos encontrado fue inferior al 1 % y el contenido de endotoxinas encontrado fue ≤ 100 UE/ μ g de PSA.

El producto de mayor pureza obtenido mediante la presente invención contenía menos del 1 % de impurezas totales, 5 menos del 0,5 % de proteínas/péptidos, menos del 0,5 % de ácidos nucleicos y menos de 10 UE/mg de endotoxinas.

El PSA puede presentar una pureza superior al 99,5 % con rendimientos superiores al 50 %.

La invención se describirá a continuación en conexión con ciertas realizaciones preferidas en los ejemplos 10 siguientes, de manera que los aspectos de la misma puedan entenderse y apreciarse más plenamente.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

15

Fermentación por lotes

Se inoculó 1 ml de un MWCB (banco de células de trabajo del fabricante) en un frasco de agitación de 200 ml con un medio que comprendía extracto de levadura (12 g/l), digerido pancreático de caseína (24 g/l) hidrogenofosfato de 20 dipotasio (9,4 g/l) y dihidrogenofosfato de potasio (2,2 g/l) y se incubó a 37 °C y 150 rpm durante 5 h.

Este frasco de agitación se usó para inocular un fermentador con 10 l de un medio que comprendía hidrogenofosfato de dipotasio (10 g/l), extracto de levadura (0,5 g/l), sulfato de magnesio (0,5 g/l), sulfato de cobre (0,002 g/l), casaminoácidos (8 g/l) y sorbitol (10 g/l), preparado y esterilizado en un fermentador de 30 l. La fermentación se 25 llevó a cabo a una temperatura de 37 °C, rpm: 300, tasa de flujo de aire: 1 vvm, pH: 7, oxígeno disuelto (OD): 40 % (en cascada con agitación, presión de cabeza y alimentación de sustrato), la concentración de CuSO₄ en el medio se mantuvo aproximadamente a 0,002 g/l. El lote se recogió después de un total de 15 h de fermentación, al alcanzar el OD el 100 %. El rendimiento de PSA obtenido fue de 1,5 g/l.

30 Ejemplo 2

Fermentación por lotes alimentados

Se inoculó 1 ml de un MWCB (banco de células de trabajo del fabricante) en un frasco de agitación de 200 ml con un 35 medio que comprendía extracto de levadura (12 g/l), digerido pancreático de caseína (24 g/l), hidrogenofosfato de dipotasio (9,4 g/l) y dihidrogenofosfato de potasio (2,2 g/l) y se incubó a 37 °C y 150 rpm durante 4 a 6 h. Este frasco de agitación se usó para inocular un fermentador con 10 l de un medio que comprendía hidrogenofosfato de dipotasio (10 g/l), extracto de levadura (0,5 g/l), sulfato de magnesio (0,5 g/l), sulfato de cobre (0,002 g/l), casaminoácidos (8 g/l) y sorbitol (10 g/l), preparado y esterilizado en un fermentador de 30 l. La fermentación se 40 llevó a cabo a una temperatura de 37 °C, rpm: 300, tasa de flujo de aire: 1 vvm, pH: 7, oxígeno disuelto (OD): 40 % (en cascada con agitación, presión de cabeza y alimentación de sustrato), en todo el lote el OD se mantuvo aproximadamente en el 40 %. La concentración de CuSO₄ en el medio se mantuvo aproximadamente a 0,002 g/l. Después de un total de 48 h de fermentación, se inició la alimentación automática de sustrato concentrado basada en los niveles de OD. La fermentación continuó durante 150 h con la retirada repetida de caldo (10 l), cada vez que 45 el volumen de dicho caldo alcanzó los 25 l y la concentración de PSA los 3 g/l.

Ejemplo 3

Purificación del PSA

50

El caldo (20 l) que contenía el PSA se sometió a microfiltración de flujo cruzado con membranas de 0,45 μ m en un sistema cerrado. El permeado/sobrenadante (18 l) se sometió a ultrafiltración con un punto de corte de 10 kDa. El caldo ultrafiltrado (2 l) se cargó en una resina de DEAE y se eluyó con NaCl 0,3 M en tampón de fosfato de sodio 8 mM, pH 7,2. El eluato de DEAE (22 l) se cargó en Q-Sepharose y se eluyó con NaCl 0,5 M en tampón de fosfato de 55 sodio 8 mM, pH 7,2. El eluato (20 l) se sometió a concentración y diafiltración y después a filtración estéril con membranas de 0,2 μ m. El producto final contenía el 0,4 % p/p de proteína, 10 ng/mg de ácidos nucleicos y 90 UE/ μ g de endotoxinas. El rendimiento de PSA fue del 60 %.

Ejemplo 4

Purificación del PSA

El caldo (20 l) que contenía el PSA se sometió a microfiltración de flujo cruzado con membranas de 0,45 µm en un sistema cerrado. En este momento, la concentración de proteínas era del 7 % y el contenido de ácidos nucleicos del 2 % con respecto a la concentración de PSA. El permeado/sobrenadante (18 l) se sometió a ultrafiltración con un casete de ultrafiltración de 10 kDa. La masa (2 l) que contenía el PSA se cargó en una cromatografía de interacción hidrófoba (HIC; octil-Sepharose) con un tampón de fosfato de sodio 8 mM y cloruro de sodio 1 M. Se recogió el flujo a través que contenía el PSA. El flujo a través resultante (3 l) se diafiltró frente a un tampón de fosfato de sodio 8 mM, pH 7,2. El filtrado (2 l) se cargó en una cromatografía de intercambio iónico (IEC, Q-Sepharose). El PSA se eluyó con tampón de fosfato de sodio 8 mM, pH 7,2 y cloruro de sodio.

El eluato (20 l) de la IEC se diluyó cinco veces, se cargó en DetoxiGel y se recogió el flujo a través. El flujo a través se concentró (hasta 2,5 l) y se sometió a filtración estéril con membranas de 0,2 µm. El producto final contenía el 0,35 % p/p de proteína, 8 ng/mg de ácidos nucleicos y 10 UE/mg de endotoxinas.

El rendimiento de PSA fue del 55 %.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la producción de ácido polisiálico con una pureza superior al 95 % y un peso molecular de 70.000 Da a 100.000 Da, en que el proceso comprende:
- 5 (a) la obtención de un medio nutriente que comprende sorbitol en una cantidad de 8 g/l a 12 g/l, extracto de levadura en una cantidad de 0,4 g/l a 0,6 g/l, casaminoácidos en una cantidad de 8 g/l, hidrogenofosfato de potasio en una cantidad de 8 g/l a 12 g/l, sulfato de cobre en una cantidad de 0,001 g/l a 0,003 g/l y sulfato de magnesio en una cantidad de 0,4 g/l a 0,6 g/l;
- 10 (b) la inoculación de bacterias productoras de ácido polisiálico pertenecientes al serogrupo O7:K1 de *E. coli*, que no muestran O-acetilación del ácido polisiálico en dicho medio nutriente, opcionalmente donde la bacteria productora de ácido polisiálico es *E. coli* LP 1674;
- 15 (c) la incubación del medio inoculado a una temperatura de 30 °C a 40 °C, a un pH de 6-8, un porcentaje de oxígeno disuelto del 35 % al 45 % y una agitación de 100 a 150 rpm;
- (d) la recogida del ácido polisiálico producido en la etapa (c);
- 20 (e) la purificación del ácido polisiálico obtenido en la etapa (d); y
- (f) opcionalmente la concentración del ácido polisiálico obtenido en la etapa (e).
2. Un proceso para la producción de ácido polisiálico de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho
- 25 ácido polisiálico contiene menos del 1 % de impurezas totales que comprenden proteínas, ácidos nucleicos y endotoxinas.
3. Un proceso para la producción de ácido polisiálico de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho
- 30 ácido polisiálico contiene menos del 0,5 % de proteínas/péptidos, menos de 100 ng/mg de ácidos nucleicos y menos de 10 UE/ μ g de endotoxinas.
4. Un proceso para la producción de ácido polisiálico de acuerdo con la reivindicación 1, donde:
- (a) dicho porcentaje de oxígeno disuelto es el 40 %;
- 35 (b) dicho medio nutriente comprende oligoelementos; o
- (c) dicho medio nutriente comprende sulfato de cobre en una cantidad de 0,002 g/l.
- 40 5. Un proceso para la producción de ácido polisiálico de acuerdo con la reivindicación 1, donde:
- (a) dicha inoculación es mediante un inóculo con una densidad óptica de 2 o 3; o
- (b) dicha incubación se lleva a cabo en un fermentador de 20 l a 50 l de capacidad.
- 45 6. Un proceso para la producción de ácido polisiálico de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicha incubación se lleva a cabo en un fermentador de 30 l de capacidad.
7. Un proceso para la producción de ácido polisiálico de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha
- 50 incubación se lleva a cabo a una temperatura de 37 °C, a un pH de 7 y a aproximadamente 150 rpm durante 4 a 6 h.
8. Un proceso para la producción de ácido polisiálico de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha recogida se lleva a cabo por:
- 55 (a) microfiltración de flujo cruzado; o
- (b) centrifugación a 4.000 rpm para eliminar todos los restos celulares.
9. Un proceso para la producción de ácido polisiálico de acuerdo con la reivindicación 8 (a), donde dicha

microfiltración de flujo cruzado se lleva a cabo con una casete de 0,45 μm y preferentemente en un sistema cerrado.

- 5 10. Un proceso para la producción de ácido polisiálico de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho proceso se lleva a cabo en un sistema de cultivo por lotes alimentados o un cultivo continuo.
11. Un proceso para la producción de ácido polisiálico de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho sistema de cultivo puede continuarse durante más de cinco días.
- 10 12. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la etapa (e) comprende:
- (a) una ultrafiltración mediante filtros centrífugos de 10 Da;
- (b) someter el producto retenido a un intercambio de tampón a un pH de 6,5 a 7,5; y
- 15 (c) opcionalmente, una ultrafiltración con un filtro de 0,2 μm .
13. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la etapa (e) comprende:
- (a) la separación de las impurezas por cromatografía de intercambio aniónico;
- 20 (b) el lavado del ácido polisiálico separado; y
- (c) opcionalmente, una ultrafiltración con un filtro de 0,2 μm .
- 25 14. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 13, donde dicha cromatografía emplea adsorbentes seleccionados de entre iónico, de afinidad e hidrófobo.
15. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 13, donde dicho lavado se lleva a cabo con urea 6 M, para una elución a pH 4,5.