

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 163**

51 Int. Cl.:

C07H 1/08 (2006.01)
C07H 3/06 (2006.01)
A23L 29/30 (2006.01)
A23L 33/00 (2006.01)
A23L 33/21 (2006.01)
A61K 31/702 (2006.01)
C12P 19/14 (2006.01)
A23L 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2014** **E 14151737 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018** **EP 2896628**

54 Título: **Procedimiento para la purificación eficiente de oligosacáridos de la leche humana (HMO) neutros a partir de la fermentación microbiana**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2019

73 Titular/es:
JENNEWEIN BIOTECHNOLOGIE GMBH (100.0%)
Maarweg 32
53619 Rheinbreitbach, DE

72 Inventor/es:
JENNEWEIN , DR. STEFAN

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 701 163 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

Procedimiento para la purificación eficiente de oligosacáridos de la leche humana (HMO) neutros a partir de la fermentación microbiana

5 La presente solicitud describe un procedimiento simple para la purificación de oligosacáridos de la leche humana (HMO) neutros producidos por fermentación microbiana. El procedimiento utiliza una combinación de un tratamiento de intercambio de iones catiónicos, un tratamiento de intercambio de iones aniónicos y electrodiálisis, que permite la purificación eficiente de grandes cantidades de HMO neutros con alta pureza. Contrariamente a la purificación utilizada actualmente en la producción fermentativa de HMO neutros, el procedimiento presentado permite la provisión de HMO sin la necesidad de una separación cromatográfica. Los HMO así purificados se pueden obtener
10 en forma sólida mediante secado por pulverización, como material cristalino o como concentrado filtrado estéril. Los HMO proporcionados están exentos de proteínas y material recombinante procedente de las cepas microbianas recombinantes utilizadas y, por lo tanto, son muy bien adecuados para uso en aplicaciones de alimentos y piensos.

15 La leche humana representa una mezcla compleja de hidratos de carbono, grasas, proteínas, vitaminas, minerales y oligoelementos. La fracción más predominante con diferencia está representada por los hidratos de carbono, que se pueden dividir adicionalmente en lactosa y oligosacáridos más complejos. Mientras que la lactosa se utiliza como fuente de energía, los oligosacáridos complejos no son metabolizados por el niño. La fracción de oligosacáridos complejos representa hasta 1/10 de la fracción total de hidratos de carbono y consiste en probablemente más de 150 oligosacáridos diferentes. La aparición y la concentración de estos oligosacáridos complejos son específicas para los seres humanos y, por lo tanto, no se pueden encontrar en grandes cantidades en la leche de otros mamíferos, tales como, por ejemplo, los animales lecheros domesticados.
20

La existencia de estos oligosacáridos complejos en la leche humana ya se conoce desde hace mucho tiempo y las funciones fisiológicas de estos oligosacáridos fueron objeto de investigación médica durante muchas décadas. Para algunos de los oligosacáridos de la leche humana más abundantes ya se han identificado funciones específicas.

25 El suministro limitado y las dificultades para obtener fracciones puras de oligosacáridos de la leche humana individuales conducen al desarrollo de rutas químicas a algunas de estas moléculas complejas. Sin embargo, la síntesis de oligosacáridos de la leche humana por síntesis química, síntesis enzimática o fermentación demostró ser un reto. Hasta el día de hoy, no se pueden proporcionar al menos cantidades a gran escala ni cualidades suficientes para las aplicaciones alimentarias. A este respecto, en particular las rutas químicas sintéticas a los oligosacáridos de la leche humana (p. ej., 2'-fucosil-lactosa; véase el documento WO 2010/115935 A1) implican a varios productos químicos nocivos, que imponen el riesgo de contaminar el producto final.
30

Debido a los retos implicados en la síntesis química de los oligosacáridos de la leche humana, se desarrollaron varios métodos enzimáticos y enfoques fermentativos. Sin embargo, estos métodos - proporcionan mezclas complejas de oligosacáridos, es decir, el producto deseado está contaminado con material de partida, tal como lactosa, productos intermedios biosintéticos y sustratos tales como monosacáridos y polipéptidos individuales, etc.

35 Los procedimientos en el estado de la técnica para purificar productos de oligosacáridos individuales a partir de estas mezclas complejas son técnicamente complejos y tampoco son económicos para aplicaciones alimentarias. Para la purificación de los disacáridos lactosa o sacarosa de mezclas complejas, tales como suero o melazas, se han desarrollado procedimientos a escala industrial que implican múltiples cristalizaciones. La desventaja de dichos métodos es que son complejos y solo conducen a bajos rendimientos.

40 Para la purificación de oligosacáridos complejos de la fermentación microbiana, tales como determinados oligosacáridos de leche humana, el método de elección hasta ahora es la cromatografía de filtración en gel. La desventaja de la cromatografía de filtración en gel es que no se puede ampliar de manera eficiente y no es adecuada para un funcionamiento continuo. Por lo tanto, la cromatografía de filtración en gel no es económica y hace imposible proporcionar determinados oligosacáridos de la leche humana - tales como 2'-fucosil-lactosa o lacto-N-tetraosa - en cantidades y calidad razonables para utilizarlos en alimentos humanos.
45

Otro problema se presenta mediante el uso de cepas recombinantes (cepas bacterianas o de levadura recombinantes) en la fermentación microbiana, lo que resulta en la contaminación del producto de fermentación con material recombinante. Sin embargo, la contaminación con ADN o proteínas recombinantes no es aceptable hoy en día por los reguladores y los consumidores. Los límites de detección, en particular para las moléculas de ADN recombinante, son muy bajos. En el caso de que se utilice la detección basada en qPCR, que actualmente se considera como el patrón de oro para la detección, se puede detectar incluso tan poco como moléculas de ADN individuales.
50

55 La electrodiálisis (ED) representa una técnica que combina diálisis y electrolisis y puede utilizarse para la separación o concentración de iones en soluciones basadas en su electromigración selectiva a través de membranas semipermeables. Las primeras aplicaciones industriales de electrodiálisis se remontan a principios de los años 60 con la desmineralización del suero de queso para el uso en fórmulas infantiles. Otras aplicaciones desarrolladas de

electrodialisis incluyen el ajuste del pH de bebidas tales como vinos, mosto de uva, zumo de manzana y zumo de naranja.

La desalinización de agua salobre para la producción de agua potable y la desmineralización del suero de leche para la producción de alimentos infantiles representa el área de aplicación más amplia en la actualidad.

5 El principio básico de la electrodialisis consiste en una celda electrolítica compuesta de un par de electrodos sumergidos en un electrolito para la conducción de iones conectados a un generador de corriente continua. El electrodo conectado al polo positivo del generador de corriente continua es el ánodo, y el electrodo conectado al polo negativo se denomina cátodo. La solución electrolítica soporta entonces el flujo de corriente, que resulta del movimiento de iones de carga negativa y positiva hacia el ánodo y el cátodo, respectivamente. Las membranas empleadas en la electrodialisis son esencialmente láminas de resinas de intercambio iónico porosas, que poseen grupos de carga negativa o positiva y, por lo tanto, se tratan como membrana catiónica o aniónica, respectivamente. 10 Las membranas del intercambiador de iones generalmente están hechas de poliestireno que porta un grupo funcional adecuado (tal como ácido sulfónico o un grupo de amonio cuaternario para las membranas catiónicas o aniónicas, respectivamente) reticuladas con divinilbenceno. Como electrolito se puede emplear cloruro de sodio o acetato de sodio, propionato de sodio, etc. La pila de electrodialisis se ensambla entonces de tal manera que las membranas aniónicas y catiónicas son paralelas como en una prensa de filtro entre dos bloques de electrodos, que la corriente que está experimentando un agotamiento de iones está bien separada de la corriente que experimenta el enriquecimiento de iones (también se hace referencia a las dos soluciones como diluido (que experimenta agotamiento de iones) y concentrado (que experimenta enriquecimiento de iones). El núcleo del proceso de electrodialisis es la pila de membranas, que consiste en varias membranas de intercambio de aniones y cationes separadas por separadores, y está instalada entre dos electrodos. Al aplicar una corriente eléctrica continua, los aniones y los cationes migrarán a través de las membranas hacia los electrodos generando una corriente de diluido (desalada) y una corriente de concentrado. 20

En general, el tamaño de poro de las membranas empleadas es más bien pequeño con el fin de evitar la difusión del producto del diluido en la corriente de concentrado, impulsada por las diferencias de concentración a menudo altas entre las dos corrientes. Después de la separación de la biomasa, las proteínas y, en particular, las moléculas de ADN recombinante (con el tamaño de genomas completos) deben separarse cuantitativamente del producto deseado. Si fuera posible, la electrodialisis de moléculas tan grandes (en comparación con el tamaño molecular de los HMO) sería más bien larga y seguramente iría acompañada de pérdidas significativas del producto deseado del diluido en el concentrado. 25 30

Albermann C. et al. (Carbohydrate Research, 2001, vol. 334, págs. 97-103) describen la síntesis del oligosacárido de la leche 2'-fucosil-lactosa utilizando enzimas bacterianas recombinantes.

El documento EP 2 479 263 A1 describe un método para producir 2'-fucosil-lactosa utilizando una alfa-1,2-fucosiltransferasa de *E. coli*.

35 El documento WO2012/112777 describe la purificación de 2'-fucosil-lactosa a partir de un caldo de fermentación de *E. coli*.

Partiendo de esta técnica anterior, el problema técnico es la provisión de un nuevo procedimiento para proporcionar HMO neutros en altas cantidades, alta pureza y excelentes rendimientos.

40 El problema técnico se resuelve mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1. Las reivindicaciones dependientes muestran realizaciones ventajosas.

La presente invención proporciona un procedimiento para la purificación de oligosacáridos de la leche humana (HMO) neutros de manera discontinua o de manera continua a partir de un caldo de fermentación obtenido por fermentación microbiana, en el que se proporciona una solución purificada que contiene un HMO neutro con una pureza de $\geq 80\%$. El caldo de fermentación contiene el HMO neutro, la biomasa, los componentes del medio y los contaminantes. La pureza del HMO neutro en el caldo de fermentación es $<80\%$. 45

Durante el procedimiento, el caldo de fermentación se aplica a las siguientes etapas de purificación:

- i) Separación de biomasa del caldo de fermentación,
- ii) Tratamiento de intercambio de iones catiónicos para la separación de material cargado positivamente,
- 50 iii) Tratamiento de intercambio de iones aniónicos para la separación de material cargado negativamente,
- iv) Etapa de electrodialisis para la separación de materiales cargados.

Los contaminantes que están presentes en el caldo de fermentación son, p. ej., otros HMO que el HMO neutro deseado obtenido a una pureza de $\geq 80\%$ en la solución purificada.

5 La solicitante ha descubierto que con el uso de la electrodiálisis y la separación de biomasa en combinación con el tratamiento con intercambio de iones se puede lograr una purificación eficiente de HMO neutros a partir de la fermentación microbiana, que suministra el HMO con una pureza adecuada para aplicaciones de alimentos y piensos.

10 Una ventaja del procedimiento de acuerdo con la presente es que los HMO neutros deseados se obtienen libres de ADN y proteínas a partir de la cepa de fermentación microbiana recombinante utilizada. Además, el HMO neutro obtenido está libre de material recombinante, según se juzga por PCR cuantitativa con hasta 50 ciclos de amplificación. Además, el producto obtenido del procedimiento de acuerdo con la invención se caracteriza por bajas cantidades o ausencia de proteínas.

Además, la purificación de HMO neutro de acuerdo con la invención es altamente eficiente con rendimientos aún desconocidos de $>75\%$ del HMO purificado (determinado a partir de medio de fermentación libre de células a concentrado de HMO).

15 Por lo tanto, se proporciona un procedimiento híbrido que comprende las etapas de separación de biomasa, intercambio de iones y electrodiálisis, y preferiblemente que comprende, además, un tratamiento con carbono activado, para la provisión eficiente de HMO neutros con alta pureza libres de material genético recombinante, endotoxinas y proteínas de procesos de la fermentación que utilizan cepas de fermentación recombinantes. Con el procedimiento de acuerdo con la invención, pueden proporcionarse grandes cantidades de oligosacáridos de la leche humana de alta calidad de una manera muy conveniente y económica.

20 En una realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, la fermentación se realiza en un medio mínimo químico definido tal como el medio M9 (Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York) o tal como se describe en Samain et al., 1999 (Samain et al., (1999) *Production of O-acetylated and sulfated chitooligosaccharides by recombinant Escherichia coli strains harboring different combinations of nod. genes*. *J. Biotechnol* 72: 33-47) o medios similares a base de sal capaces de soportar el crecimiento microbiano.

En otra realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, el HMO neutro se purifica a partir de un caldo de fermentación obtenido mediante fermentación microbiana utilizando un microorganismo recombinante de bacterias o levaduras cultivadas en un medio químico definido.

30 En otra realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, la pureza del HMO neutro en el caldo de fermentación es $\leq 70\%$, $\leq 60\%$, $\leq 50\%$ o $\leq 40\%$, y/o la solución purificada contiene el HMO neutro con una pureza de $\geq 85\%$, preferiblemente de $\geq 90\%$.

En otra realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, el rendimiento del HMO neutro es $> 75\%$ y/o la solución purificada está libre de ADN, proteínas y/o material genético recombinante.

35 De acuerdo con la invención, el HMO neutro se selecciona del grupo que consiste en 2'-fucosil-lactosa, 3-fucosil-lactosa, 2',3-difucosil-lactosa, lacto-N-triosia II, lacto-N-tetraosa, lacto-N-neo-tetraosa, lacto-N-fucopentaosa I, lacto-N-neofucopentaosa, lacto-N-fucopentaosa II, lacto-N-fucopentaosa III, lacto-N-fucopentaosa V, lacto-N-neofucopentaosa V, lacto-N-difucohexaosa I, lacto-N-difucohexaosa II, 6'-galactosil-lactosa, 3'-galactosil-lactosa, lacto-N-hexaosa y lacto-N-neo-hexaosa.

40 En una realización particularmente preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, el HMO neutro es 2'-fucosil-lactosa.

En otra realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, la separación de biomasa del caldo de fermentación se logra mediante filtración a través de un filtro de flujo cruzado, preferiblemente con un corte de ≤ 100 kDa, más preferiblemente con un corte de ≤ 10 kDa.

45 En otra realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, al menos una de las etapas de purificación ii) a v) se repite al menos una vez durante el procedimiento.

50 En otra realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, el caldo de fermentación se aplica al menos una vez a un tratamiento con carbono activado después de al menos una de las etapas de purificación i) a iv) para la adsorción del material que da color y oligosacáridos más grandes a carbono activado. Al aplicar el caldo de fermentación a esta etapa de purificación adicional, se puede separar del caldo de fermentación el material que da color y oligosacáridos más grandes.

En otra realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, el caldo de fermentación se concentra después de al menos una de las etapas de purificación i) a iv), preferiblemente después de la etapa de purificación iv), utilizando evaporación en vacío u ósmosis inversa

- 5 i) a una concentración de ≥ 100 g/L, preferiblemente ≥ 200 g/L, más preferiblemente ≥ 300 g/L; y/o
ii) a una temperatura de 30 °C a 50 °C, preferiblemente de 35 °C a 45 °C.

En otra realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, la solución purificada se filtra en condiciones estériles y/o se somete a separación de endotoxinas, preferiblemente mediante filtración de la solución purificada a través de un filtro de 3 kDa.

10 En otra realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, la solución purificada se concentra a una concentración de $> 1,5$ M y se enfría a una temperatura de $< 25^\circ$, más preferiblemente $< 8^\circ$ C, para obtener material cristalino del HMO neutro.

15 En otra realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, la solución purificada se seca por pulverización, particularmente se seca por pulverización a una concentración del HMO neutro de 20-60 (p/v), preferiblemente 30-50 (p/v), más preferiblemente 35-45 (p/v), a una temperatura de la boquilla de $110-150$ °C, preferiblemente $120-140$ °C, más preferiblemente $125-135$ °C y/o una temperatura de escape de $60-80$ °C, preferiblemente $65-70$ °C.

El objeto de acuerdo con la solicitud pretende ser explicado con más detalle con referencia a las figuras y ejemplos posteriores sin desear restringir dicho objeto a las realizaciones especiales.

20 La Figura 1 muestra un esquema de una realización preferida del procedimiento de acuerdo con la presente invención para la purificación de 2'-fucosil-lactosa a partir de un caldo de fermentación que contiene las etapas: filtración de flujo cruzado, tratamiento de intercambio de iones catiónicos y aniónicos, tratamiento con carbono activado, concentración, electrodiálisis, concentración, tratamiento de intercambio de iones catiónicos y aniónicos, tratamiento con carbono activado y filtración con 3 kDa de corte.

25 La Figura 2 muestra un esquema de otra realización preferida del procedimiento de acuerdo con la presente invención para la purificación de 2'-fucosil-lactosa a partir de un caldo de fermentación que contiene las etapas: filtración de flujo cruzado, tratamiento de intercambio de iones catiónicos y aniónicos, concentración, electrodiálisis, concentración, tratamiento con carbono activado y filtración con 3 kDa de corte.

30 La Fig. 3 muestra un esquema de otra realización preferida del procedimiento de acuerdo con la presente invención para la purificación de 2'-fucosil-lactosa a partir de un caldo de fermentación que contiene las etapas: filtración de flujo cruzado, tratamiento de intercambio de iones catiónicos y aniónicos, concentración, tratamiento con carbono activado, electrodiálisis, concentración, tratamiento con intercambio aniónico, tratamiento con carbono activado y filtración con 3 kDa de corte.

Ejemplo 1: Purificación de 2'-fucosil-lactosa de la fermentación utilizando una cepa de producción microbiana recombinante I.

35 Una fermentación microbiana de 1 m^3 que contenía 2'-fucosil-lactosa a una concentración de 40 g/L se filtró a través de un filtro de flujo cruzado con un corte de 100 kDa (Microdyn Nadir) para obtener un medio de fermentación libre de células. Como medio de fermentación se empleó el siguiente medio: componentes principales del medio: glicerol 30 g/l, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 7 g/l, K_2HPO_4 7 g/l, citrato 0,3 g/l, KOH 2 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g/l; oligoelementos: $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mg/l, ácido nitrilotriacético 101 mg/l, citrato férrico de amonio 56 mg/l, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 9,8 mg/l, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,6 mg/l, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/l, H_3BO_3 1,6 mg/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 9 mg/l, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,2 mg/l, Na_2SeO_3 1,2 mg/l; sustancias alimenticias: glicerol y lactosa. El medio de fermentación libre de células se hizo pasar entonces a través de un intercambiador de iones cationes fuerte (Lewatit S 6368 A (Lanxess) en forma H^+ , el tamaño del volumen del lecho del intercambiador de iones fue de 100 l), con el fin de separar los contaminantes cargados positivamente. La solución obtenida se ajustó luego a pH 7 mediante la adición de una solución de hidróxido de sodio 2 M. Después, la solución se hizo pasar sin demora a través de una columna de intercambio de iones aniónicos (el volumen del lecho del intercambiador de iones fue de 100 l) que contenía el intercambiador de iones aniones fuerte Lewatit S 2568 (Lanxess) en forma de formiato (CH_3CO_2^-). La solución obtenida se neutralizó nuevamente a pH 7 utilizando ácido clorhídrico (HCl). La solución, así obtenida, se concentró luego en vacío a 40°C para obtener una solución de 2'-fucosil-lactosa de 200 g/l.

50 La solución concentrada de 2'-fucosil-lactosa se trató luego con carbono activado con el fin de separar el material que da color, tal como los productos de reacción de maillard. Como carbono activado se utilizaron 20 g de Norit GAC EN por l de solución concentrada de 2'-fucosil-lactosa, proporcionando una solución significativamente decolorada. La solución de 2'-fucosil-lactosa concentrada, así obtenida, se electrodializó luego a 0,3 mS/cm utilizando un aparato de electrodiálisis PC-Cell BED 1-3 (PC-Cell, Heusweiler, Alemania) equipado con una pila de membranas PC-Cell

E200. Dicha pila contenía las siguientes membranas: membrana de intercambio catiónico CEM: PC SK y la membrana de intercambio aniónico AEM:PcAcid60 con un límite de exclusión de tamaño de 60 Da. Se utilizó una solución de ácido sulfámico (ácido amidosulfónico) 0,025 M como electrólito en el procedimiento de la ED.

5 Luego, la solución obtenida se concentró para obtener una solución de 50% de 2'-fucosil-lactosa. La solución concentrada se trató nuevamente con intercambiadores de iones, Lewatit S 6368 A (Lanxess) en forma de Na^+ (el volumen del lecho del intercambiador de iones utilizado fue de 10 l) y después de la neutralización con el intercambiador de iones aniones Lewatit S 2568 (Lanxess) en forma Cl^- (el volumen del lecho del intercambiador de iones empleado fue de 10 l). La solución de 2'-fucosil-lactosa obtenida se trató con carbono activado (Norit DX1 Ultra). Para 1 l de una solución de 2'-fucosil-lactosa al 50% se emplearon 40 g de carbono activado. La solución se sometió nuevamente a electrodiálisis hasta obtener una conductividad de menos de 0,3 mSi/cm.

La solución se sometió luego a filtración en condiciones estériles y separación de endotoxinas, haciendo pasar la solución a través de un filtro de 3 kDa (módulo de fibra hueca de ultrafiltración Pall Microza SEP-2013, Pall Corporation, Dreieich).

Parte de la solución obtenida se secó luego por pulverización para su análisis.

15 Para el registro de los espectros de RMN el producto secado por pulverización se disolvió en sulfóxido de hexadeuterodimetilo (DMSO-d_6). Para el análisis de protones y ^{13}C se observaron los siguientes desplazamientos químicos:

20 $^1\text{H RMN}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 6,63 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H), 6,28 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H), 5,21 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 5,19 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 5,01 (d, $J = 2,2$, 2H), 4,92 (d, $J = 5,0$ Hz, 1H), 4,89 (dd, $J = 4,6$, 1,3 Hz, 2H), 4,78 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H), 4,74 (d, $J = 5,1$ Hz, 1H), 4,63 (m, 6H), 4,53 (t, d, $J = 5,5$, 1H), 4,46 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H), 4,44 (d, $J = 5,0$ Hz, 1H), 4,38 – 4,26 (m, 5H), 4,23 (d, $J = 0,9$, 1H), 4,05 (d, $J = 0,9$, 1H), 4,00 (quin, $J = 3,3$, 1H), 3,68 – 3,60 (m, 7H), 3,59 – 3,50 (m, 13H), 3,50-3,37 (m, 6H), 3,24 (dt, $J = 8,8$, 2,2 Hz, 1H), 3,14 (m, 2H), 2,96 (td, $J = 8,4$, 4,7 Hz, 1H), 1,04 (d, $J = 6,1$ Hz, 3H), 1,03 (d, $J = 6,1$ Hz, 3H).

25 $^{13}\text{C RMN}$ (126 MHz, DMSO-d_6) δ 100,99, 100,85, 100,35, 100,25, 96,59, 92,02, 78,13, 77,78, 77,16, 77,01, 75,27, 75,05, 74,67, 73,70, 72,33, 71,62, 71,56, 70,91, 69,90, 69,64, 68,75, 68,16, 66,33, 60,17, 59,82, 59,67, 16,37, 16,36.

Se asignaron desplazamientos químicos y se encontró que eran consistentes con la estructura de 2'-fucosil-lactosa.

30 Utilizando este protocolo, se pudo obtener 2'-fucosil-lactosa con una pureza de 95,4% (determinada por análisis de HPLC). Los principales contaminantes fueron 3'-fucosil-lactosa (1,9%), difucosil-lactosa (3,3%) y lactosa (0,2%). El rendimiento de la purificación fue de aproximadamente el 80%. La mayor parte de todo el material no recombinante se pudo determinar en 10 g de material de congelación utilizando 50 ciclos de qPCR. Cantidad de proteína del material obtenido determinada como < 50 $\mu\text{g/g}$ de material liofilizado utilizando un ensayo de nano-bradford (Roth, Karlsruhe, Alemania). La cantidad total de ceniza se determinó con 0,37%. Los metales pesados fueron para todos los exámenes (arsénico, cadmio, plomo y mercurio) por debajo de 0,1 $\mu\text{g/g}$ de material. Las cenizas totales se determinaron como 0,37%. Se determinó que los niveles de endotoxinas eran $< 0,005$ EU/mg de material de 2'-fucosil-lactosa.

Ejemplo 2: Purificación de 2'-fucosil-lactosa de la fermentación utilizando una cepa II de producción microbiana recombinante.

40 Una fermentación microbiana de 1 m^3 que contenía 2'-fucosil-lactosa a una concentración de 40 g/L se filtró a través de un filtro de flujo cruzado con un corte de 100 kDa (Microdyn Nadir) para obtener un medio de fermentación libre de células. Como medio de fermentación se empleó el siguiente medio: componentes principales del medio: glicerol 30 g/l, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 7 g/l, K_2HPO_4 7 g/l, citrato 0,3 g/l, KOH 2 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g/l; oligoelementos: $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mg/l, ácido nitrilotriacético 101 mg/l, citrato férrico de amonio 56 mg/l, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 9,8 mg/l, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,6 mg/l, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/l, H_3BO_3 1,6 mg/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 9 mg/l, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,2 mg/l, Na_2SeO_3 1,2 mg/l; sustancias alimenticias: glicerol y lactosa. El medio de fermentación libre de células se hizo pasar luego sobre un intercambiador de iones cationes (Lewatit S 6368 A (Lanxess) en forma H^+ (el volumen del lecho del intercambiador de iones fue de 100 l), con el fin de separar los contaminantes cargados positivamente. La solución obtenida se ajustó luego a pH 7 mediante la adición de una solución de hidróxido de sodio 2 M. Luego, la solución se hizo pasar sin demora sobre una columna de intercambiador de iones aniones (el volumen del lecho del intercambiador de iones utilizado fue de 100 l) que contenía el intercambiador de iones aniones fuerte Lewatit S 2568 (Lanxess) en forma de carbonato de hidrógeno. La solución obtenida se neutralizó nuevamente a pH 7. La solución, así obtenida, se concentró luego en vacío a 40°C para obtener una solución de 2'-fucosil-lactosa de 200 g/l.

La solución concentrada de 2'-fucosil-lactosa se trató luego con carbono activado, utilizando 20 g de Norit GAC EN por l de solución concentrada de 2'-fucosil-lactosa. A la solución de 2'-fucosil-lactosa filtrada se añadieron 40 g/l de carbono activado Norit DX1 Ultra. La solución se expuso luego al carbono activado a 4°C durante aproximadamente

ES 2 701 163 T3

18 h, después de 18 h, el carbono activado se separó de la solución de 2'-fucosil-lactosa por filtración. Se obtuvo una solución con una conductividad de aprox. 40 mSi/cm.

A continuación, la solución se electrodiálizó a una conductividad de < 0,3 mS/cm utilizando un aparato de electrodiálisis PC-Cell BED 1-3 (PC-Cell, Heusweiler, Alemania) equipado con una pila de membrana PC-Cell E200.

- 5 Dicha pila contenía las siguientes membranas: membrana de intercambio catiónico CEM: PC SK y la membrana de intercambio aniónico AEM:PcAcid60 con un límite de exclusión de tamaño de 60 Da. Se utilizó una solución de ácido sulfámico (ácido amidosulfónico) 0,025 M como electrólito en el procedimiento de la ED.

La solución obtenida se concentró luego para obtener una solución al 50% de 2'-fucosil-lactosa. Después, la solución de 2'-fucosil-lactosa obtenida se hizo pasar sobre un Lewatit S 2568 (Lanxess) forma Cl⁻ (volumen de lecho de 10 l) y se trató con carbono activado (Norit DX1 Ultra) a 8°C durante 18 h. La solución se sometió luego a filtración en condiciones estériles y separación de endotoxinas haciendo pasar la solución a través de un filtro de 3 kDa (módulo de fibra hueca de ultrafiltración Pall Microza SEP-2013, Pall Corporation, Dreieich) y se secó por pulverización utilizando un secador por pulverización NUBILOSA LTC-GMP (NUBILOSA), Konstanz, Alemania).

- 10
- 15 Utilizando este protocolo, se pudo obtener 2'-fucosil-lactosa con una pureza del 93,5% (determinada por análisis de HPLC). Los contaminantes principales fueron 3'-fucosil-lactosa (1,7%), difucosil-lactosa (3,4%) y lactosa (0,3%). El rendimiento de la purificación fue de aproximadamente el 80%.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la purificación de oligosacáridos de la leche humana (HMO) neutros de manera discontinua o de manera continua a partir de un caldo de fermentación obtenido por fermentación microbiana, conteniendo el caldo de fermentación un HMO neutro, biomasa, componentes del medio y contaminantes, en donde la pureza del HMO neutro en el caldo de fermentación es < 80%,
en donde el caldo de fermentación se aplica a las siguientes etapas de purificación:
- i) separación de biomasa del caldo de fermentación,
 - ii) tratamiento de intercambio de iones catiónicos para la separación de material cargado positivamente,
 - 10 iii) tratamiento de intercambio de iones aniónicos para la separación de material cargado negativamente,
 - iv) etapa de electrodiálisis para la separación de materiales cargados,
- en el que se proporciona una solución purificada que contiene el HMO neutro con una pureza de $\geq 80\%$,
- 15 en el que se proporciona una solución purificada que contiene el HMO neutro del grupo que consiste en 2'-fucosil-lactosa, 3-fucosil-lactosa, 2',3-difucosil-lactosa, lacto-*N*-triosa II, lacto-*N*-tetraosa, lacto-*N*-neo-tetraosa, lacto-*N*-fucopentaosa I, lacto-*N*-neofucopentaosa, lacto-*N*-fucopentaosa II, lacto-*N*-fucopentaosa III, lacto-*N*-fucopentaosa V, lacto-*N*-neo-fucopentaosa V, lacto-*N*-difucohexaosa I, lacto-*N*-difucohexaosa II, 6'-galactosil-lactosa, 3'-galactosil-lactosa, lacto-*N*-hexaosa y lacto-*N*-neo-hexaosa,
en el que se excluye una separación cromatográfica.
- 20 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el HMO neutro se purifica a partir de un caldo de fermentación obtenido por fermentación microbiana, utilizando un microorganismo recombinante, bacteria o levadura, cultivado en un medio químico definido.
3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que la pureza del HMO neutro en el caldo de fermentación es $\leq 70\%$, $\leq 60\%$, $\leq 50\%$ o $\leq 40\%$, y/o la solución purificada contiene el HMO neutro con una pureza de $\geq 85\%$, preferiblemente de $\geq 90\%$.
- 25 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que
- i) el rendimiento del HMO neutro es $> 75\%$; y/o
 - ii) la solución purificada está libre de ADN, proteínas y/o material genético recombinante.
- 30 5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la separación de biomasa del caldo de fermentación se logra mediante filtración a través de un filtro de flujo cruzado, preferiblemente con un corte de ≤ 100 kDa, más preferiblemente con un corte de ≤ 10 kDa.
6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que al menos una de las etapas de purificación ii) a iv) se repite al menos una vez durante el procedimiento.
- 35 7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que el caldo de fermentación se aplica al menos una vez a un tratamiento con carbono activado después de al menos una de las etapas de purificación i) a iv) para la adsorción del material que da color y oligosacáridos más grandes a carbono activado.
8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que el caldo de fermentación se concentra después de al menos una de las etapas de purificación i) a iv), preferiblemente después de la etapa de purificación iv), utilizando evaporación en vacío u ósmosis inversa
- 40 i) a una concentración de ≥ 100 g/L, preferiblemente ≥ 200 g/L, más preferiblemente ≥ 300 g/L; y/o
- ii) a una temperatura de 30 °C a 50 °C, preferiblemente de 35 °C a 45 °C.
9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que la solución purificada se filtra en condiciones estériles y/o se somete a separación de endotoxinas, preferiblemente mediante filtración de la solución purificada a través de un filtro de 3 kDa.
- 45 10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que la solución purificada se concentra a una concentración de $> 1,5$ M y se enfría a una temperatura de $< 25^\circ$, más preferiblemente $< 8^\circ\text{C}$, para obtener material cristalino del HMO neutro.

11. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado por que la solución purificada se seca por pulverización, particularmente se seca por pulverización a una concentración del HMO neutro de 20-60 (p/v), preferiblemente 30-50 (p/v), más preferiblemente 35-45 (p/v), a una temperatura de la boquilla de 110-150 °C, preferiblemente 120-140 °C, más preferiblemente 125-135 °C y/o una temperatura de escape de 60-80 °C, preferiblemente 65-70 °C.
- 5

Figura 1

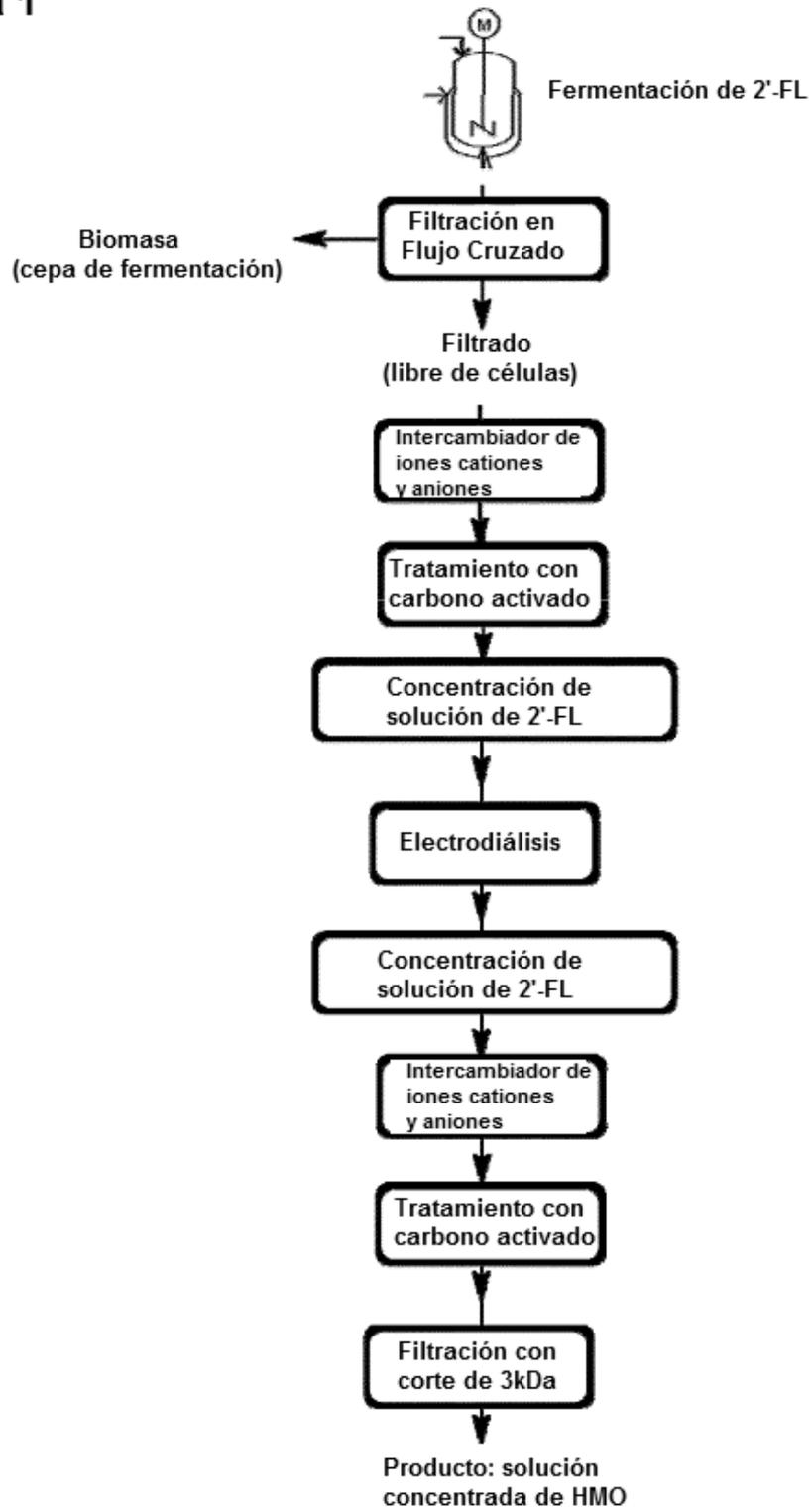


Figura 2

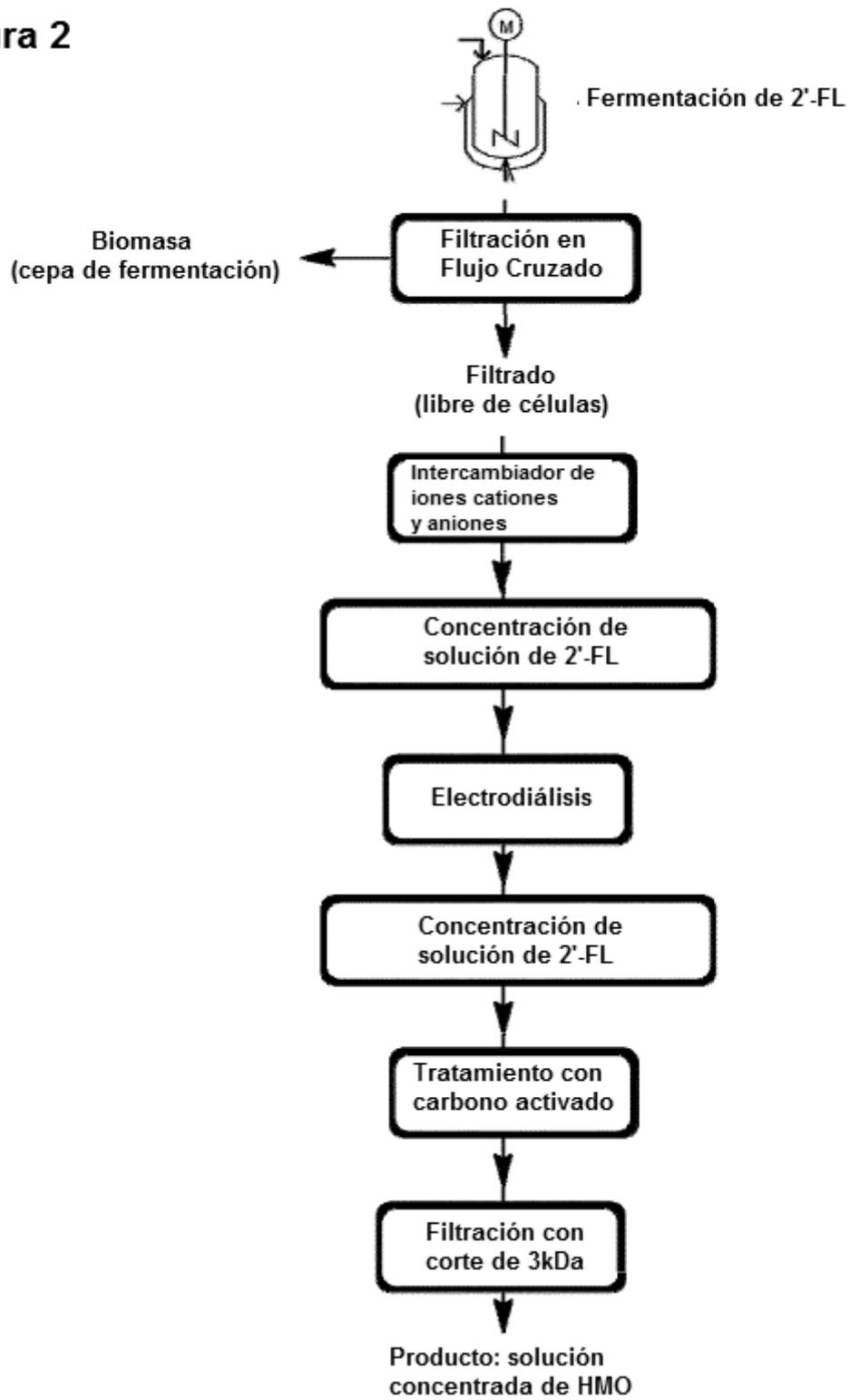


Figura 3

