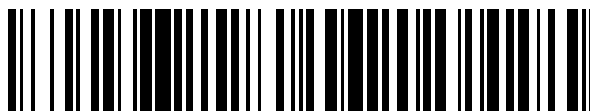


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 432**

51 Int. Cl.:

C07H 1/06 (2006.01)

C07H 3/06 (2006.01)

A61K 31/702 (2006.01)

A61P 1/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2015 PCT/JP2015/062673**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2015 WO15166903**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2015 E 15785433 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3138848**

54 Título: **Método de preparación para una composición de 4'-galactosil-lactosa de alta pureza**

30 Prioridad:

02.05.2014 JP 2014095142

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

21.07.2020

73 Titular/es:

**KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA (100.0%)
1-19, Higashi-Shinbashi 1-chome, Minato-ku
Tokyo 105-8660, JP**

72 Inventor/es:

**YAMADA TETSUYA;
HATANO HIROSHI;
KIMURA KAZUMASA;
SOTOYA HIDETSUGU y
MORI YOKO**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 774 432 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

Método de preparación para una composición de 4'-galactosil-lactosa de alta pureza

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para preparar una composición que contiene 4'-GL de alta pureza a partir de un galacto-oligosacárido que contiene 4'-GL (4'-galactosil-lactosa: Gal β 1-4Gal β 1-4Glc).

10 **Técnica anterior**

La 4'-GL es conocida como el componente principal del galacto-oligosacárido que puede promover la proliferación de bifidobacterias entéricas. La 4'-GL también se utiliza como índice de análisis de galacto-oligosacáridos.

15 La producción industrial de galacto-oligosacáridos que contienen 4'-GL utiliza una reacción de transferencia por β -galactosidasa, utilizando lactosa como carga de alimentación. Sin embargo, la pureza del galacto-oligosacárido en sí mismo es típicamente baja cuando no se realiza una etapa de purificación y similares.

20 Como una técnica que mejora la pureza a través de la purificación de oligosacáridos, PTL 1 describe un método de purificación de glucosamino-oligosacáridos en el que se utiliza un polímero preparado mediante la introducción de un grupo carboximetilo en un polímero que tiene un grupo hidroxilo como carga de cromatografía. Sin embargo, no hay ningún informe de un método que esté destinado a mejorar la pureza de los componentes del galacto-oligosacárido, particularmente 4'-GL, mediante la purificación del galacto-oligosacárido. Incluso las composiciones disponibles como patrón de referencia de 4'-GL no tienen suficiente pureza.

25 PTL 2 describe un proceso de producción de galactosacáridos, especialmente 4'-GL y un tetrasacárido. La 4'-GL se aísla utilizando una columna que contiene una mezcla 1:1 de carbón activado y celite y un eluyente de etanol al 10%. PTL 3 describe la purificación de trisacáridos utilizando cromatografía en columna de carbón activado. PTL 4 se refiere a sustitutos de grasa de poliéster de ácido graso de alquilglicósido. En el Ejemplo III, se menciona el aislamiento de 4'-GL por medio de cromatografía en columna de carbón activado y cristalización. PTL5 se refiere a un método de fabricación de un galactosacárido con una galactosidasa a partir de un microorganismo, como *Sporobolomyces* y *Saccharomyces*

35 **Lista de citas**

Bibliografía relacionada con patentes

PTL 1: Documento JP-B-6-55766
 PTL 2: Documento JP S60 251896 A
 40 PTL 3: Documento JP 2 904687 B2
 PTL 4: Documento WO 90/13555 A1
 PTL 5: Documento JP 2003 325166 A

45 **Compendio de la invención**

Problema técnico

50 Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar un método para preparar de manera conveniente y económica una composición que tenga una alta pureza de 4'-GL y que se pueda utilizar como un patrón de referencia para diversos análisis.

Solución al problema

55 Los autores de la presente invención realizaron amplios estudios para resolver los problemas anteriores, y descubrieron que se puede obtener una composición que tiene un 4'-GL de alta pureza combinando la elución por etapas utilizando un disolvente orgánico con cristalización. La presente invención se completó sobre la base de este hallazgo.

60 Específicamente, la presente invención es un método para preparar una composición de 4'-GL de alta pureza, incluyendo el método las etapas de:

(A) someter un galacto-oligosacárido que contiene 4'-GL a cromatografía en columna de carbón activado, y realizar una elución por etapas con varias soluciones acuosas de disolventes orgánicos, en donde las soluciones acuosas de disolventes orgánicos se utilizan de tal manera que la concentración del disolvente

orgánico en la solución acuosa de disolvente orgánico es más alta que la concentración del disolvente orgánico en la solución acuosa de disolvente orgánico inmediatamente anterior con respecto a una serie de eluciones; y

(B) añadir un disolvente orgánico a la fracción final eluida en la etapa (A), y cristalizar la 4'-GL.

5 La presente invención es una composición de 4'-GL de alta pureza obtenida utilizando el método de preparación anterior.

10 Efectos ventajosos de la invención

El método para preparar una composición de 4'-GL de alta pureza de la presente invención es un método en el que la elución por etapas utilizando un disolvente orgánico se combina con la cristalización, por lo que se puede preparar una composición que contiene 4'-GL de alta pureza de manera conveniente y económica a partir de un galacto-oligosacárido que contiene 4'-GL.

15 La composición de 4'-GL de alta pureza obtenida utilizando el método para preparar una composición de 4'-GL de alta pureza de la presente invención se puede utilizar como un patrón de referencia para diversos análisis.

20 Descripción de las realizaciones

La etapa (A) en el método para preparar una composición de 4'-GL de alta pureza de la presente invención (en lo sucesivo, denominado "método de preparación de la presente invención") es una etapa en la que un galacto-oligosacárido que contiene 4'-GL se somete a cromatografía en columna de carbón activado, y en el que la elución por etapas se realiza con varias soluciones acuosas de disolventes orgánicos, en donde las soluciones acuosas de disolventes orgánicos se utilizan de tal manera que la concentración del disolvente orgánico en la solución acuosa de disolventes orgánicos es mayor que la concentración del disolvente orgánico en la solución acuosa de disolvente orgánico inmediatamente anterior con respecto a una serie de eluciones.

25 El galacto-oligosacárido que contiene 4'-GL no está particularmente limitado, siempre que sea un galacto-oligosacárido que contenga 4'-GL. Los ejemplos de tales galacto-oligosacáridos incluyen un galacto-oligosacárido producido mediante el uso de una reacción de transferencia por β -galactosidasa.

30 Específicamente, para la producción de galacto-oligosacáridos que contienen 4'-GL utilizando una reacción de transferencia por β -galactosidasa, la β -galactosidasa, o los microorganismos que producen β -galactosidasa, pueden actuar sobre la lactosa. Preferiblemente, se puede actuar sobre la lactosa mediante una combinación de β -galactosidasa y un microorganismo que utiliza azúcar para aumentar la proporción de trisacáridos en los galacto-oligosacáridos.

35 Los ejemplos de microorganismos productores de β -galactosidasa incluyen microorganismos del género *Kluyveromyces*, tales como *Kluyveromyces lactis*, y microorganismos del género *Sporobolomyces*, tales como *Sporobolomyces singularis*. Otros ejemplos incluyen *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus leichmannii*, *Lactobacillus helveticus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, and *Bifidobacterium adolescentis*. Se prefieren los microorganismos del género *Sporobolomyces*, más preferiblemente *Sporobolomyces singularis*, particularmente preferiblemente el *Sporobolomyces singularis* ISK - ##2B6 previamente referido por el solicitante de esta solicitud de patente. *Sporobolomyces singularis* ISK - ##2B6 ha sido depositado por el presente solicitante como FERM P-18817 en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, he International Patent Organism Depository (Tsukuba Center, Chuou Dairoku, 1-1-1, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki, 305-8566) a partir del 10 de abril de 2002. (Cabe destacar que a partir del 1 de abril de 2013, The International Patent Organism Depository ha sido renombrado como The National Institute of Technology and Evaluation, International Patent Organism Depository, y reubicado en 120, 5-8, 2-chome, Kazusa-Kamatari, Kisarazu, Chiba, 292-0818). *Sporobolomyces singularis* JCM5356, una cepa parental del *Sporobolomyces singularis* ISK - ##2B6, también se puede utilizar preferiblemente como *Sporobolomyces singularis*. Esta cepa está disponible por una tarifa en Riken BRC (3-1-1, Koyadai, Tsukuba, Ibaraki, Japón, 305-0074). Estos microorganismos se pueden utilizar solos o en combinaciones de dos o más.

40 Los ejemplos de los microorganismos que utilizan azúcar incluyen *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces unisporus*, levaduras panaderas típicas disponibles en el mercado. Estos microorganismos se pueden utilizar solos o en combinaciones de dos o más. Los azúcares utilizados por los microorganismos que utilizan azúcar no están particularmente limitados. Sin embargo, los microorganismos son preferiblemente los que utilizan glucosa, para aumentar la proporción de trisacáridos en los galacto-oligosacáridos.

45 La producción de galacto-oligosacáridos que contienen 4'-GL mediante el uso de microorganismos tales como los anteriores no se limita a condiciones particulares. Por ejemplo, se añade un microorganismo productor de β -

galactosidasa y, opcionalmente, un microorganismo que utiliza azúcar a una solución calentada (aproximadamente a 40°C) de lactosa en agua, y la mezcla se cultiva durante aproximadamente 1 día mientras se agita. La cantidad de microorganismo productor de β-galactosidasa añadido no está particularmente limitada. Por ejemplo, el microorganismo se puede añadir para hacer que la actividad de la β-galactosidasa sea de 100 a 600 U por kilogramo de lactosa. La cantidad de microorganismo que utiliza azúcar añadido tampoco está particularmente limitada. Por ejemplo, el microorganismo se puede añadir en una cantidad de 0,0001 a 10% en masa (de 1×10^7 a 1×10^{12} ufc) en términos de polvo seco del microorganismo por kilogramo de lactosa. La actividad β-galactosidasa se mide de la manera descrita en los Ejemplos de Producción a continuación. La reacción que genera galacto-oligosacáridos se puede sofocar, por ejemplo, calentando la mezcla de reacción a aproximadamente 85°C y manteniendo la temperatura durante aproximadamente 10 minutos. Preferiblemente, las células se eliminan por centrifugación o filtración después de la reacción.

La cromatografía en columna de carbón activado se puede realizar cargando los galacto-oligosacáridos que contienen 4'-GL en una columna cargada con carbón activado, y realizando una elución gradual utilizando una solución acuosa de disolvente orgánico.

El tipo de carbón activado cargado en la columna no está particularmente limitado, y el carbón activado puede estar, por ejemplo, en forma de polvo o gránulo, o en estado triturado. El método para cargar el carbón activado en la columna tampoco está particularmente limitado. Por ejemplo, el carbón activado se puede añadir al agua, se puede cargar en la columna en forma de suspensión y se puede dejar reposar en la columna. La cantidad de carbón activado cargado en la columna no está particularmente limitada, y es, por ejemplo, 1/3 a 1/4 del volumen de la columna utilizada. El material de la columna no está particularmente limitado y puede ser, por ejemplo, vidrio o plástico. El diámetro y la altura de la columna no están particularmente limitados, y la columna puede tener un diámetro, por ejemplo, de 2 a 15 cm, y una altura, por ejemplo, de 30 a 100 cm.

La elución por etapas utilizando un disolvente orgánico se realiza de tal manera que la concentración del disolvente orgánico en la solución acuosa de disolvente orgánico es mayor que la concentración del disolvente orgánico en la solución acuosa de disolvente orgánico inmediatamente anterior con respecto a una serie de eluciones. Específicamente, el proceso de elución comienza con el lavado de la columna de carbón activado haciendo pasar agua. Después de eso, se pasa una solución acuosa de disolvente orgánico a través de la columna, seguido del paso de otra solución acuosa de disolvente orgánico que tiene una concentración de disolvente orgánico más alta que la concentración de disolvente orgánico de la elución precedente. El término "elución por etapas" se utiliza para hacer referencia a un procedimiento en el que una solución acuosa de disolvente orgánico de una concentración diferente se hace pasar a través de la columna de carbón activado al menos dos veces. Preferiblemente, se hace pasar una solución acuosa de disolvente orgánico dos veces. La cantidad de la solución acuosa de disolvente orgánico utilizada para la elución simple (pase) no está particularmente limitada, y es, por ejemplo, de 2 a 6 veces el volumen del carbón activado utilizado. La velocidad de elución por etapas tampoco está particularmente limitada, y es, por ejemplo, una velocidad tal que el nivel de líquido del eluato se mueve de 2 a 6 cm/min.

El disolvente orgánico utilizado en la etapa (A) es metanol. La concentración del disolvente orgánico es preferiblemente de 5 a 40% en masa (en adelante, simplemente "%"), particularmente preferiblemente de 10 a 30%.

La elución por etapas utilizando una solución acuosa de disolvente orgánico se realiza primero con una solución acuosa de disolvente orgánico que tiene una concentración de disolvente orgánico de 10 a 20%, y a continuación con una solución acuosa de disolvente orgánico que tiene una concentración de disolvente orgánico de 15 a 30%, preferiblemente primero con una solución acuosa de disolvente orgánico que tiene una concentración de disolvente orgánico de 15 a 20%, y después con una solución acuosa de disolvente orgánico que tiene una concentración de disolvente orgánico de 20 a 30%.

Los procesos de concentración y dilución, tales como la filtración, la centrifugación o la reducción de la presión, se pueden realizar durante el procedimiento de elución. La fracción final eluida en la etapa (A) se puede utilizar directamente, o se puede utilizar preferiblemente después de secar el componente sólido mediante concentración.

Los trisacáridos contenidos en los galacto-oligosacáridos se hacen eluir específicamente después de la etapa (A) descrita anteriormente. La proporción de trisacáridos en los galacto-oligosacáridos se puede medir utilizando el método descrito en los Ejemplos de Producción a continuación.

La etapa (B) del método de preparación de la presente invención es una etapa de adición de un disolvente orgánico a la fracción final eluida en la etapa (A), y cristalización de la 4'-GL.

El disolvente orgánico utilizado en la etapa (B) no está particularmente limitado, y es preferiblemente un disolvente orgánico que es miscible con agua. El disolvente orgánico que es miscible con agua es preferiblemente al menos uno seleccionado entre metanol, acetona y etanol, y es particularmente preferiblemente metanol. La cantidad de disolvente orgánico añadido no está particularmente limitada, y es, por ejemplo, de 10 a 30 veces el contenido

(volumen) de agua en la fracción utilizada para la cristalización. La concentración del disolvente orgánico que se va a añadir no está particularmente limitada, y es preferiblemente de aproximadamente 100%.

5 La cristalización de 4'-GL se realiza, por ejemplo, añadiendo un disolvente orgánico a la fracción final eluida en la etapa (A), y permitiendo que la solución repose. Para la cristalización, por ejemplo, se pueden aplicar ondas ultrasónicas para facilitar la precipitación de los cristales, antes de permitir que la solución repose.

10 En la etapa (B) descrita anteriormente, solo los trisacáridos cristalizan, y los otros azúcares (incluidos los monosacáridos, disacáridos y tetrasacáridos) no cristalizan. Los isómeros tales como 4'-GL y Gal β 1-4Gal β 1-3Glc están presentes en los azúcares trisacáridos en los galacto-oligosacáridos, y la 4'-GL se cristaliza en mayores proporciones que otros isómeros trisacáridos en la etapa (B). Esto aumenta la proporción (pureza) de 4'-GL en los isómeros trisacáridos. La proporción de 4'-GL en los isómeros trisacáridos se puede medir utilizando el método descrito en los Ejemplos a continuación.

15 Después de la etapa (B), la composición de 4'-GL de alta pureza cristalizada se puede someter a procesos posteriores, incluyendo el lavado con el mismo disolvente orgánico utilizado para la cristalización y el secado.

20 La composición obtenida utilizando el método de preparación de la presente invención es una composición que contiene 4'-GL de alta pureza, específicamente 90% o más, preferiblemente 94% o más, más preferiblemente 95% o más en términos del contenido de 4'-GL en los isómeros trisacáridos contenidos en la composición. La composición de 4'-GL de alta pureza obtenida utilizando el método de preparación de la presente invención tiene un contenido sólido de 95% o más, y los azúcares distintos de los isómeros trisacáridos (incluidos monosacáridos, disacáridos y tetrasacáridos) no cristalizan en la etapa de cristalización. Debido a que los isómeros trisacáridos representan todo el componente sólido de la composición, el contenido de 4'-GL en la composición se puede determinar como el producto del "contenido sólido de la composición y la proporción de 4'-GL en los isómeros trisacáridos". La composición contiene 4'-GL en una cantidad de 88% o más, preferiblemente 90% o más, más preferiblemente 92% o más, adicionalmente preferiblemente 95% o más.

30 La composición de 4'-GL de alta pureza obtenida de la manera descrita anteriormente se puede utilizar, por ejemplo, como un patrón de referencia para diversos análisis, o como materia prima de productos tales como alimentos y bebidas, y fármacos.

Ejemplos

35 La presente invención se describe a continuación con mayor detalle haciendo referencia a Ejemplos de Producción y Ejemplos. La presente invención, sin embargo, no está limitada de ninguna manera por estos ejemplos.

Ejemplo de Producción 1

40 Preparación de Solución de Azúcar

Se disolvieron dos kilogramos de lactosa en 2,7 kg de agua caliente que tenía una temperatura de 80°C. La mezcla se enfrió a 40°C, y la temperatura se mantuvo en un baño termostático. A continuación se añadieron a la mezcla 157 g de una solución celular de *Sporobolomyces singularis* YIT10047 (ISK - ##2B6; FERM P-18817; actividad β -galactosidasa: 4.000 U/kg), y 63 g de *Saccharomyces cerevisiae* (disponible de Oriental Yeast Co., Ltd.: Regular Yeast; $6,3 \times 10^{11}$ ufc). Se dejó que reaccionaran durante 22 h a una temperatura mantenida de 40°C mientras se agitaba. La reacción se sofocó después de elevar la temperatura a 85°C y se mantuvo la temperatura durante 10 min. Después de la reacción, la mezcla de reacción se centrifugó (12.000 x g, 30 min), y las células utilizadas para la reacción se eliminaron para obtener una solución de azúcar. La solución de azúcar (producto) se analizó por HPLC de exclusión por tamaño en las siguientes condiciones, y se realizó un análisis de composición basado en la longitud de la cadena de azúcar utilizando el porcentaje de área. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Medición de la Actividad β -galactosidasa en Solución Celular de *Sporobolomyces singularis*

55 La actividad β -galactosidasa (U) de la solución celular de *Sporobolomyces singularis* YIT10047 (ISK - ##2B6; FERM P-18817) se midió utilizando el mismo método que el método de medición descrito en el documento WO2012/141244.

Condiciones de HPLC

60 Aparato: Shimadzu Prominence UFLC
 Columna: SUGAR KS-802 (8,0 ϕ x 300 mm; Showa Denko)
 Temperatura de la columna: 80°C
 Cantidad de inyección: 10 μ L

Fase móvil: agua purificada
 Tiempo de análisis: 30 min.
 Velocidad de flujo: 0,5 mL/min
 Detección: índice de refracción diferencial

5

[Tabla 1]

	Producto	Oligomate 55N ^{*1}
Tetrasacáridos y superiores	7,0%	7,1%
Trisacáridos	65,6%	34,4%
Disacáridos	26,7%	27,5%
Monosacáridos	0,7%	31%

*1: Galacto-oligosacárido fabricado por Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd, producido a partir de lactosa sobre la que actúa una solución celular de *Sporobolomyces singularis* y β -galactosidasa derivada de *Kluyveromyces lactis*.

10

A partir de estos resultados, se descubrió que el contenido de trisacáridos aumenta cuando se utilizan *Sporobolomyces singularis* y *Saccharomyces cerevisiae* que utiliza azúcar combinados, en comparación con el producto galacto-oligosacárido comercialmente disponible obtenido por reacción con β -galactosidasa derivada de *Sporobolomyces singularis* y *Kluyveromyces lactis*.

Ejemplo 1

15 Evaluación de las Condiciones de Elución (1)

20

25

La solución de azúcar preparada en el Ejemplo de Producción 1 se concentró con un evaporador para obtener una solución de azúcar concentrada con un Bx de 72,3. Una porción de 1,3 g de la solución de azúcar concentrada se diluyó con agua para elaborar una solución de azúcar diluida de 25 mL. La solución de azúcar diluida se cargó a continuación en una cromatografía de columna abierta (diámetro de la columna: 2 cm, altura: 30 cm) que se había cargado con 25 mL de carbón activado (carbón activado para cromatografía, fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) utilizando un método ordinario. La columna cargada con solución de azúcar diluida se lavó con agua purificada, y el azúcar se hizo eluir realizando una elución única o una elución por etapas como se muestra en la Tabla 2 a continuación. El disolvente se utilizó en una cantidad de 100 mL en cada elución. Cada fase de lavado y elución llevó aproximadamente 10 min. El lavado y la elución se realizaron a una velocidad tal que los niveles líquidos de agua purificada y el eluato disminuyeron a 5 cm/min.

30

35

El eluato obtenido después de la primera elución en la elución única, y el eluato obtenido después de la segunda elución en la elución por etapas en la Tabla 2 se recogieron y se concentraron con un evaporador a presión reducida. El eluato resultante se ajustó a una concentración apropiada y se pasó a través de un filtro de 0,45 μ m. El producto filtrado se analizó por HPLC de exclusión por tamaño en las mismas condiciones utilizadas en el Ejemplo de Producción 1, y se realizó un análisis de composición basado en la longitud de la cadena de azúcar para cada eluato utilizando el porcentaje de área. La proporción de trisacáridos en todos los azúcares se determinó a continuación a partir del resultado del análisis de composición basado en la longitud de la cadena de azúcar. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

[Tabla 2]

	Lavado	Primera elución	Segunda elución	Proporción de trisacáridos en todos los azúcares
Elución única	Agua purificada	Solución de metanol al 20%	Ninguna	70,59%
Elución por etapas 1	Agua purificada	Solución de metanol al 15%	Solución de metanol al 20%	95,72%

40

Como se puede observar a partir de estos resultados, la elución por etapas hizo eluir específicamente los trisacáridos.

Ejemplo 2

45

Evaluación de las Condiciones de Elución (2)

El azúcar se hizo eluir de la misma manera que en la elución por etapas 1 del Ejemplo 1, excepto que la concentración de la solución acuosa de metanol se varió como se muestra en la Tabla 3. La proporción de trisacáridos en todos los azúcares también se determinó de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

5

[Tabla 3]

	Lavado	Primera elución	Segunda elución	Proporción de trisacáridos en todos los azúcares
Elución por etapas 2	Agua purificada	Solución de metanol al 5%	Solución de metanol al 10%	83,07%
Elución por etapas 3	Agua purificada	Solución de metanol al 10%	Solución de metanol al 15%	94,06%
Elución por etapas 1	Agua purificada	Solución de metanol al 15%	Solución de metanol al 20%	95,72%
Elución por etapas 4	Agua purificada	Solución de metanol al 20%	Solución de metanol al 30%	95,47%
Elución por etapas 5	Agua purificada	Solución de metanol al 25%	40% Solución de metanol	86,24%

A partir de estos resultados, se encontró que la proporción de trisacáridos en el eluato después de la segunda elución se convierte en 80% o más cuando la solución acuosa de metanol utilizada para la primera elución tiene una concentración de metanol de 5 a 25%, y la solución acuosa de metanol utilizada para la segunda elución tiene una concentración de metanol de 10 a 40%. Particularmente, se encontró que la proporción de trisacáridos en el eluato después de la segunda elución se convierte en 90% o más cuando la solución acuosa de metanol utilizada para la primera elución tiene una concentración de metanol de 10 a 20%, y la solución acuosa de metanol utilizada para la segunda elución tiene una concentración de metanol de 15 a 30%. También se descubrió que la proporción de trisacáridos en el eluato después de la segunda elución se vuelve aún mayor, 95% o más, cuando la solución acuosa de metanol utilizada para la primera elución tiene una concentración de metanol de 15 a 20%, y la solución acuosa de metanol utilizada para la segunda elución tiene una concentración de metanol de 20 a 30%.

10

15

Ejemplo 3

20

Evaluación de las Condiciones de Cristalización (1)

25

30

La solución de azúcar preparada de la misma manera que en el Ejemplo de producción 1 se concentró con un evaporador a presión reducida para obtener una solución de azúcar concentrada con un Bx de 72,3. Una porción de 22,1 g de la solución de azúcar concentrada se diluyó con agua purificada para elaborar una solución de azúcar diluida de 400 mL. La solución de azúcar diluida se cargó a continuación en una cromatografía en columna abierta (diámetro de la columna: 6 cm, altura: 40 cm) que se había cargado con 400 mL de carbón activado (carbón activado para cromatografía, fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) utilizando un método ordinario. La columna cargada con solución de azúcar diluida se lavó con agua purificada, y el azúcar se hizo eluir de la misma manera que en la elución por etapas 1 del Ejemplo 1, utilizando una solución acuosa de metanol al 15% y una solución acuosa de metanol al 20%, en este orden. El disolvente se utilizó en una cantidad de 1.600 mL en cada elución. El eluato obtenido después de la elución se concentró con un evaporador a presión reducida y se secó en un desecador a presión reducida para obtener 2,3 g de un producto concentrado (contenido sólido de 2,3 g).

35

40

45

El producto concentrado se disolvió en 2,5 mL de agua purificada. Después de eso, se añadieron 50 mL de metanol a la solución en pequeñas porciones mientras se agitaba la mezcla hasta que la concentración final de metanol alcanzó 95,2% (v/v). La mezcla se colocó después bajo ondas ultrasónicas para promover la formación de cristales, y se dejó reposar durante la noche a temperatura ambiente. Los cristales generados se filtraron con un embudo equipado con filtro, y los cristales se lavaron con metanol y se secaron en un desecador. Para confirmar los cambios en la concentración de 4'-GL en los isómeros trisacáridos después de la cristalización, los isómeros trisacáridos que contenían 4'-GL se cuantificaron utilizando el siguiente método, y se determinó la proporción de 4'-GL en los isómeros trisacáridos. También se determinaron las proporciones de isómeros trisacáridos distintos de 4'-GL. La proporción de 4'-GL en los isómeros trisacáridos del producto concentrado, y las proporciones de isómeros trisacáridos distintos de 4'-GL también se determinaron antes de la cristalización de la misma manera. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Método de cuantificación de 4'-GL

Se colocaron aproximadamente 5 mg de una muestra en un tubo de ensayo roscado, y se concentró con un evaporador a presión reducida. Después de la concentración, la muestra se secó en un desecador a presión reducida. A continuación, se añadieron 200 μL de una solución de ácido acético que contenía aproximadamente 50 equivalentes de 2-aminopiridina a la muestra sólida, y estos se hicieron reaccionar en una reacción con calor realizada a 90°C durante 1 h. Después, a la mezcla de reacción se le añadieron 250 μL de un reactivo de borano-dimetilamina preparado a una concentración de 195 mg/mL (ácido acético), y el azúcar se redujo a 80°C durante 50 minutos para obtener un derivado piridilaminado. El derivado piridilaminado se transfirió a un tubo Falcon de 50 mL y se diluyó a aproximadamente 25 mL con agua purificada. A continuación se añadió una solución acuosa de hidróxido de sodio 1 M a la solución diluida para hacer que el pH fuera de débilmente ácido a neutro. Esto estuvo seguido de diálisis utilizando un MicroAcilyzer S1 (fabricado por Asahi Kasei). La diálisis se realizó con una membrana de diálisis AC-120-10 (fabricada por Astom), y una solución acuosa de nitrato de sodio al 0,5% utilizada como solución de electrodo. El punto final se ajustó a 0 A. El líquido procesado se concentró con un evaporador a presión reducida y se secó con un desecador a presión reducida. La muestra se disolvió en agua purificada y el producto filtrado a través de un filtro de 0,45 μm se analizó por HPLC. Debido a que se observaron residuos de reactivo piridilaminado, la proporción de 4'-GL en los isómeros trisacáridos se determinó a partir del porcentaje del área del pico detectada después de 22 minutos desde el inicio del análisis. También se determinaron las proporciones de isómeros trisacáridos distintos de 4'-GL. Apareció un pico para 4'-GL después de 26,8 minutos desde el inicio del análisis, mientras que apareció un pico para Gal β 1-4Gal β 1-3Glc después de 41,2 minutos desde el inicio del análisis.

Condiciones de HPLC

Aparato: Shimadzu Prominence UFLC
 Columna: PEGASIL ODS SP300 (4,6 mm ϕ x 250 mm; fabricado por Senshu Scientific Co., Ltd.)
 Temperatura de la columna: 25°C
 Cantidad de inyección: 10 μL
 Fase móvil: tampón de citrato de sodio 0,2 M (pH 5,7)
 Tiempo de análisis: 70 min
 Velocidad de flujo: 0,5 mL/min.
 Detección: UV (310 nm)

[Tabla 4]

Isómeros trisacáridos	Antes de la cristalización	Después de la cristalización
Gal β 1-4Gal β 1-4Glc (4'-GL)	90,0%	95,8%
Gal β 1-4Gal β 1-3Glc	6,8%	1,7%
Otro	3,2%	2,5%

A partir de estos resultados, se encontró que la pureza de 4'-GL en los isómeros trisacáridos puede mejorar después de la cristalización con metanol. Los cristales del producto eran al menos 95% sólidos, y los azúcares distintos de los isómeros trisacáridos no cristalizaron en la etapa de cristalización. Debido a que los isómeros trisacáridos representan todos los componentes sólidos de los cristales, la proporción de 4'-GL en la composición es de 91% o más (= 95% x 95,8%).

Ejemplo 4**Evaluación de las Condiciones de Cristalización (2)**

La solución de azúcar preparada de la misma manera que en el Ejemplo de Producción 1 se concentró con un evaporador a presión reducida para obtener una solución de azúcar concentrada con un Bx de 72,3. Una porción de 120 g de la solución de azúcar concentrada se diluyó con agua purificada para elaborar una solución de azúcar diluida de 2.000 mL. La solución de azúcar diluida se cargó a continuación en una cromatografía en columna abierta (diámetro de la columna: 9 cm, altura: 80 cm) que se había cargado con 2.000 mL de carbón activado (carbón activado para cromatografía, fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) utilizando un método ordinario. La columna cargada con solución de azúcar diluida se lavó con agua purificada, y el azúcar se hizo eluir de la misma manera que en la elución por etapas 1 del Ejemplo 1, utilizando una solución acuosa de metanol al 15% y una solución acuosa de metanol al 20%, en este orden. El disolvente se usó en una cantidad de 8,000 mL en cada elución. El eluato obtenido después de la elución se concentró con un evaporador a presión reducida y se secó en un desecador a presión reducida para obtener 12,5 g de un producto concentrado (contenido sólido de 12,5 g). El producto concentrado se disolvió en 12,5 mL de agua purificada y se separó en porciones de 2,5 mL. Después de eso, se añadieron 50 mL de acetona o etanol - un disolvente que es miscible con agua - en pequeñas porciones a la

solución de producto concentrado hasta que la concentración final alcanzó 95,2% (v/v). La mezcla se colocó después bajo ondas ultrasónicas para promover la formación de cristales, y se dejó reposar durante la noche a temperatura ambiente. Los cristales generados se filtraron con un embudo equipado con filtro, y los cristales se lavaron con el mismo disolvente orgánico utilizado para la cristalización, y se secaron en un desecador. Para confirmar los cambios en la concentración de 4'-GL en los isómeros trisacáridos después de la cristalización, los isómeros trisacáridos que contenían 4'-GL se cuantificaron de la misma manera que en el Ejemplo 3, y se determinó la proporción de 4'-GL en los isómeros trisacáridos. Los resultados se muestran en la Tabla 5. La Tabla 5 también muestra la proporción de 4'-GL en los isómeros trisacáridos después de la cristalización con metanol realizada en el Ejemplo 3.

[Tabla 5]

Disolvente de cristalización	Proporción de 4'-GL en isómeros trisacáridos antes de la cristalización	Proporción de 4'-GL en isómeros trisacáridos después de la cristalización.
Acetona	90,0%	94,4%
Etanol	90,0%	94,4%
Metanol	90,0%	95,8%

A partir de estos resultados, se encontró que la pureza de 4'-GL en los isómeros trisacáridos puede mejorar después de la cristalización con acetona o etanol, como en el caso del metanol. Sin embargo, la proporción de 4'-GL en los isómeros trisacáridos después de la cristalización fue la más alta cuando se usó metanol. Como en el caso del metanol, los cristales producto eran al menos 95% sólidos, y los azúcares distintos de los isómeros trisacáridos no cristalizaron en la etapa de cristalización con acetona o metanol. Debido a que los isómeros trisacáridos representan todo el componente sólido de los cristales, la proporción de 4'-GL en la composición es de 89,6% o más (= 95% x 94,4%).

Ejemplo 5

Evaluación con Otras Cepas

Se preparó una solución de azúcar de la misma manera que en el Ejemplo de Producción 1, la elución por etapas se realizó en las mismas condiciones utilizadas para la elución por etapas 1 del Ejemplo 1, y la 4'-GL se cristalizó en las mismas condiciones utilizadas en el Ejemplo 3, excepto que la solución celular de *Sporobolomyces singularis* YIT10047 (ISK - ##2B6) fue reemplazada por una solución celular de *Sporobolomyces singularis* JCM5356. Esta solución celular se utilizó en una cantidad que produce el mismo nivel de actividad β -galactosidasa que la producida con la cantidad de la solución *Sporobolomyces singularis* YIT10047 utilizada en el Ejemplo de Producción 1. Como resultado, la proporción de 4'-GL en los trisacáridos fue 95% o más en los cristales producidos. Los cristales eran al menos 95% sólidos, y los azúcares distintos de los isómeros trisacáridos no cristalizaron en la etapa de cristalización. Debido a que los isómeros trisacáridos representan todos los componentes sólidos de los cristales, la proporción de 4'-GL en la composición es de 90,3% o más (= 95% x 95%).

Aplicabilidad industrial

El método para preparar una composición de 4'-GL de alta pureza de la presente invención proporciona una manera de obtener convenientemente una composición de 4'-GL de alta pureza. La composición de 4'-GL de alta pureza obtenida mediante el método de preparación se puede utilizar como un patrón de referencia para diversos análisis, o como materia prima de productos tales como alimentos y bebidas, y fármacos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una composición de 4'-galactosil-lactosa (4'-GL) de alta pureza, comprendiendo el método las etapas de:

5 (A) someter un galacto-oligosacárido que contiene 4'-GL a cromatografía en columna de carbón activado, y realizar una elución por etapas con soluciones acuosas de disolventes orgánicos plurales, en donde las soluciones acuosas de disolventes orgánicos se utilizan de tal manera que la concentración del disolvente orgánico en la solución acuosa de disolvente orgánico más alta que la concentración del disolvente orgánico en la solución acuosa de disolvente orgánico inmediatamente anterior con respecto a una serie de eluciones, en donde el disolvente orgánico utilizado en la etapa (A) es metanol y la elución por etapas se realiza con una solución acuosa de disolvente orgánico que contiene el disolvente orgánico a una concentración de 10 a 20% en masa, y una solución acuosa de disolvente orgánico que contiene el disolvente orgánico a una concentración de 15 a 30% en masa, en este orden; y
10
15 (B) añadir un disolvente orgánico a una fracción final eluida en la etapa (A), y cristalizar la 4'-GL.

2. El método para preparar una composición de 4'-GL de alta pureza de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la elución por etapas de la etapa (A) se realiza con una solución acuosa de disolvente orgánico que contiene el disolvente orgánico a una concentración de 15 a 20% en masa, y una solución acuosa de disolvente orgánico que contiene el disolvente orgánico a una concentración de 20 a 30% en masa, en este orden.
20

3. El método para preparar una composición de 4'-GL de alta pureza de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el disolvente orgánico utilizado en la etapa (B) es al menos uno seleccionado entre metanol, acetona y etanol.
25

4. El método para preparar una composición de 4'-GL de alta pureza de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el galacto-oligosacárido que contiene 4'-GL utilizado en la etapa (A) es uno generado utilizando *Sporobolomyces singularis* y *Saccharomyces cerevisiae*.