



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104428307 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 18

(21) 申请号 201380030808. 8

代理人 王旭

(22) 申请日 2013. 06. 14

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C07H 1/06(2006. 01)

PA201270329 2012. 06. 14 DK

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 12. 11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/DK2013/050197 2013. 06. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/185780 EN 2013. 12. 19

(71) 申请人 格礼卡姆股份公司

地址 丹麦灵比

(72) 发明人 安德烈亚斯·施罗温 久洛·戴卡尼

彼得·埃尔德曼 安德烈·施瓦茨

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

权利要求书2页 说明书11页

(54) 发明名称

增强人乳寡糖或其前体或掺合物的稳定性和
纯度以及增加其生物利用度

(57) 摘要

本申请公开了用于增强人乳寡糖 (HMO) 或 HMO 前体或 HMO 掺合物当在高于 25°C 的温度长期储存时的稳定性的方法, 所述方法通过喷雾干燥 HMO 或 HMO 前体的水溶液以除去至少 90% 的水并且提供具有特定玻璃化转变温度的 HMO 或 HMO 前体或 HMO 掺合物。还公开了用于通过喷雾干燥从人乳寡糖 (HMO) 或 HMO 前体或 HMO 掺合物除去有机溶剂残留物的方法。还公开了通过喷雾干燥增强人乳寡糖 (HMO) 或 HMO 前体或 HMO 掺合物的生物利用度的方法。

1. 用于增强人乳寡糖 (HMO) 或 HMO 前体或 HMO 掺合物当在高于 25°C 的温度长期储存时的稳定性的方法, 所述方法包括以下步骤:

a) 提供在水溶液中的所述 HMO 或 HMO 前体或掺合物, 和

b) 接着对所述水溶液进行喷雾干燥以除去至少约 90% 的水并且提供具有至少为 40°C 的较高玻璃化转变温度 (T_g) 的所述 HMO 或 HMO 前体或掺合物。

2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述水溶液在约 130-210°C 进行喷雾干燥以提供约 8-10% 以下的水含量并由此将其 T_g 升高至约 40°C 以上。

3. 根据权利要求 1 和 2 中任一项所述的方法, 其中所述 HMO 选自 LNT、LNnT、2'-FL、3-FL、DFL、LNFP I、3'-SL、6'-SL、FSL、LST a 和 DS-LNT, 并且所述 T_g 升高至约 80°C 以上。

4. 根据权利要求 3 所述的方法, 其中所述 HMO 选自 LNT、LNnT、2'-FL、3-FL、3'-SL 和 6'-SL, 优选选自 LNnT、2'-FL 和 6'-SL。

5. 根据权利要求 1 和 2 中任一项所述的方法, 其中所述 HMO 掺合物包含 2 种以上 HMO 和 / 或 HMO 前体, 并且所述 T_g 升高至约 60°C 以上。

6. 根据权利要求 5 所述的方法, 其中所述 HMO 掺合物包含 2 种以上 HMO, 优选 5 种以上 HMO, 所述 HMO 选自由以下各项组成的组: LNT、LNnT、2'-FL、3-FL、DFL、LNFP I、3'-SL、6'-SL、FSL、LST a 和 DS-LNT。

7. 人乳寡糖 (HMO) 或 HMO 前体或 HMO 掺合物, 其以无定形形式存在并且具有至少 40°C 的玻璃化转变温度 (T_g)。

8. 根据权利要求 7 所述的 HMO, 所述 HMO 选自 LNT、LNnT、2'-FL、3-FL、DFL、LNFP I、3'-SL、6'-SL、FSL、LST a 和 DS-LNT, 并且具有为至少 80°C 的 T_g 。

9. 根据权利要求 8 所述的 HMO, 所述 HMO 选自 LNT、LNnT、2'-FL、3-FL、3'-SL 和 6'-SL、FSL、LST a 以及 DS-LNT, 优选选自 LNnT、2'-FL 和 6'-SL。

10. 根据权利要求 7 所述的 HMO 掺合物, 所述 HMO 掺合物包含 2 种以上 HMO 和 / 或 HMO 前体, 并且具有至少 60°C 的 T_g 。

11. 根据权利要求 10 所述的 HMO 掺合物, 所述 HMO 掺合物包含 2 种以上 HMO, 优选 5 种以上 HMO, 所述 HMO 选自由以下各项组成的组: LNT、LNnT、2'-FL、3-FL、DFL、LNFP I、3'-SL、6'-SL、FSL、LST a 和 DS-LNT。

12. 用于除去人乳寡糖 (HMO) 或 HMO 前体或 HMO 掺合物之中或之上的有机溶剂残留物或至少充分地降低所述有机溶剂残留物的量或浓度的方法, 所述方法包括以下步骤:

a) 提供在水溶液中的所述 HMO 或 HMO 前体或掺合物, 和

b) 接着对所述水溶液进行喷雾干燥以从所述 HMO 或 HMO 前体或掺合物除去至少约 90% 的水并且除去至少约 75% 的有机溶剂残留物。

13. 根据权利要求 12 所述的方法, 其中所述 HMO 或 HMO 前体或掺合物通过催化氢解所述 HMO 或 HMO 前体或掺合物的被保护的衍生物而制得, 所述被保护的衍生物具有通过催化氢解可去除的保护基, 并且除去的有机溶剂是被氢解的保护基。

14. 根据权利要求 12 所述的方法, 其中所述 HMO 或 HMO 前体或掺合物通过在质子溶剂中的所述 HMO 或 HMO 前体或掺合物的被保护的衍生物的催化氢解而制得, 并且除去的有机溶剂是所述质子溶剂。

15. 根据权利要求 14 所述的方法, 其中所述有机溶剂包括低级链烷醇, 特别是甲醇。

16. 根据权利要求 12 所述的方法,其中有机溶剂的残留物从 2 种以上、优选 5 种以上已单独地结晶自一种以上有机溶剂的 HMO 和 / 或 HMO 前体的掺合物中除去。

17. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述 HMO 已结晶自有机溶剂。

18. 根据权利要求 17 所述的方法,其中所述 HMO 是 2'-FL 并且所述有机溶剂是低级链烷醇,特别是甲醇。

19. 用于增强人乳寡糖 (HMO) 或 HMO 前体或 HMO 掺合物对于哺乳动物的生物利用度的方法,所述方法包括以下步骤:

a) 提供在水溶液中的所述 HMO 或 HMO 前体或掺合物,和

b) 接着对所述水溶液进行喷雾干燥以除去至少约 90% 的水并且提供具有无定形物理状态的所述 HMO 或 HMO 前体或掺合物。

增强人乳寡糖或其前体或掺合物的稳定性和纯度以及增加 其生物利用度

发明领域

[0001] 本发明涉及纯化人乳寡糖 (HMO) 及其前体和衍生物 (特别是当通过催化氢解生产时) 的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 人乳寡糖 (HMO) 由于其在人发育中的重要功能而在过去几年中受到极大关注。至今, 已确定了至少 115 种 HMO 的结构 (参见 Urashima 等人: Milk Oligosaccharides (乳寡糖), Nova Biomedical Books, New York, 2011, ISBN:978-1-61122-831-1), 并且显著更多数量可能存在于人乳中。对于所述 115 种 HMO, 至今鉴定的 13 种核心结构列于表 1:

[0004]

编号	核心名称	核心结构
1	乳糖(Lac)	Gal β 1-4Glc
2	乳-N-四糖(lacto-N-tetraose) (LNT)	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
3	乳 -N- 新 四 糖 (lacto-N-neotetraose) (LNnT)	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
4	乳-N-六糖(lacto-N-hexaose) (LNH)	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4Glc
5	乳 -N- 新 六 糖 (lacto-N-neohexaose) (LNnH)	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4Glc
6	对 - 乳 -N- 六 糖 (para-lacto-N-hexaose) (para-LNH)	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
7	对 - 乳 -N- 新 六 糖 (para-lacto-N-neohexaose) (para-LNnH)	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
8	乳-N-八糖(lacto-N-octaose) (LNO)	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4Glc
9	乳 -N- 新 八 糖 (lacto-N-neooctaose) (LNnO)	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3(Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4Glc
10	异 - 乳 -N- 八 糖 (iso-lacto-N-octaose) (iso-LNO)	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3(Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4Glc
11	对 - 乳 -N- 八 糖 (para-lacto-N-octaose) (para-LNO)	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
12	乳 -N- 新 十 糖 (lacto-N-neodecaose) (LNnD)	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3[Gal β 1-4GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4GlcNAc β 1-6]Gal β 1-4Glc

[0005]

13	乳-N-十糖(lacto-N-decaose) (LND)	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3[Gal β 1-3GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4GlcNAc β 1-6]Gal β 1-4Glc
----	-------------------------------	--

[0006] 表 1. 核心 HMO 结构

[0007] 已寻求低成本方式用于制备工业量的尽可能多的 HMO, 以便可以通过世界范围的

研究人员发现、开发和开拓其在用于婴幼儿、以及可能的儿童和成人的营养和治疗制剂中的用途。最近几种HMO已以高收率化学合成,例如通过在从被保护的苄基化衍生物除去其他保护基后氢化该被保护衍生物然后使其自有机溶剂结晶。参见WO 2010/115935(2'-O-岩藻糖基乳糖或2'-FL)、WO 2011/100980(乳-N-新四糖或LNnT)、WO 2012/155916(乳-N-四糖或LNT)、WO 2011/100979(6'-O-唾液乳糖或6'-SL)和WO2012/007585(多种HMO),以及WO 2011/150939(2'-FL多晶型物)。

[0008] 然而,根据上述方法合成的相对纯的结晶的HMO仍然会被以下中的一种或多种的少量残留物(即约1000至2000ppm,但至少100ppm)污染:i) 甲苯,其来自苄基糖苷保护基,所述苄基糖苷保护基通过氢解从其保护的前体去除,和ii) 质子溶剂如C₁-C₆醇,其在氢解步骤中用作溶剂或与水用作共溶剂和/或在随后的HMO的结晶或重结晶中用作溶剂或共溶剂。为了在用于哺乳动物、尤其是人类、特别是婴幼儿的营养和治疗制剂中使用HMO,必需充分地降低这样的残留污染物,例如降低至500ppm以下,优选降低至100ppm以下。迄今为止,这需要额外的高成本的HMO加工。

[0009] 因此,本发明的一个目的是提供一种用于除去HMO、HMO前体和掺合物(特别是若干种HMO和/或HMO前体的掺合物)之中和/或之上的有机溶剂残留物、或充分地降低所述有机溶剂残留物的量和/或浓度的方法。

[0010] 此外,当在没有冷藏的情况下长期储存时,结晶的HMO显示是较不稳定的。它们趋于熔化并且由此变为粘性的且形成团块。

[0011] 因此,本发明另一个目的是提供一种用于增强HMO(尤其是HMO掺合物)的稳定性的方法,以便它们可以在例如高至30°C或者甚至更高(优选高至40°C或者甚至更高)的温度,在没有冷藏的情况下长期储存。

[0012] 此外,结晶的HMO、以及它们的前体和掺合物较难溶于水,使得它们可以容易地与其他活性成分和合适的助剂混合以制备液体和粉末、营养和治疗制剂。另外,它们在哺乳动物、特别是人、更特别是婴幼儿的胃中的酸水中溶解较慢,这降低了它们对于哺乳动物的生物利用度。

[0013] 因此,本发明的另一个目的是提供一种用于增强HMO及其前体和掺合物在水中和在哺乳动物的胃酸中溶解的能力的方法。

[0014] 近期,CN 102154163A公开了喷雾干燥通过发酵生产的HMO,即3'-SL。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明的第一方面涉及用于增强人乳寡糖(HMO)或HMO前体或掺合物当在高于25°C的温度长期储存时的稳定性的方法,所述方法包括以下步骤:

[0017] a) 提供在水溶液中的HMO或HMO前体或掺合物,优选以大约其最大浓度,尤其是以至少约30-60wt%,特别是至少约40-50wt%的浓度,和

[0018] b) 接着对所述水溶液进行喷雾干燥以除去基本上所有,优选至少约90%,特别是至少约95%的水,并且提供具有至少为40°C,优选至少50°C,更优选至少60°C,甚至更优选至少70°C,特别是至少80°C的较高玻璃化转变温度(T_g)的HMO或HMO前体或掺合物。

[0019] 本发明该第一方面的一个实施方案涉及在约130-210°C,优选140至180°C,特别是140至160°C喷雾干燥水溶液,以提供约8-10%以下,优选约4-6%以下的水含量,并由此将其T_g升高至约40°C以上,优选升高至约50°C以上,更优选升高至约60°C以上,甚至更优

选升高至约 70°C 以上,特别是升高至约 80°C 以上。

[0020] 本发明的第二方面涉及人乳寡糖 (HMO) 或 HMO 前体或掺合物,其以无定形形式存在并且具有为至少 40°C,优选至少 50°C,更优选至少 60°C,甚至更优选至少 70°C,特别是至少 80°C 的玻璃化转变温度 (T_g)。

[0021] 该第二方面的一个实施方案涉及人乳寡糖 (HMO),其优选选自以下各项组成的组:LNT、LNnT、LNH、LNnH、para-LNH、para-LNnH、2'-FL、3-FL、DFL、LNFP I、LNFP II、LNFP III、LNFP V、F-LNnH、DF-LNH I、DF-LNH II、DF-LNH I、DF-para-LNH、DF-para-LNnH、3'-SL、6'-SL、FSL、F-LST a、F-LST b、F-LST c、LST a、LST b、LST c 和 DS-LNT,更优选选自 LNT、LNnT、2'-FL、3-FL、DFL、LNFP I、3'-SL、6'-SL、FSL、LST a 和 DS-LNT,甚至更优选选自 LNT、LNnT、2'-FL、3-FL、3'-SL 和 6'-SL,特别是选自 LNnT、2'-FL 和 6'-SL,其以无定形形式存在并且具有至少为 40°C 的玻璃化转变温度 (T_g)。

[0022] 该第二方面的另一个实施方案涉及人乳寡糖 (HMO),其选自 LNT、LNnT、2'-FL、3-FL、DFL、LNFP I、3'-SL、6'-SL、FSL、LST a 和 DS-LNT,甚至更优选选自 LNT、LNnT、2'-FL、3-FL、3'-SL 和 6'-SL,特别是选自 LNnT、2'-FL 和 6'-SL,其以无定形形式存在并且具有至少 50°C,优选至少 60°C,更优选至少 70°C,特别是至少 80°C 的玻璃化转变温度 (T_g)。

[0023] 本发明第二方面的另一个实施方案涉及掺合物,所述掺合物包含 2 种以上,优选 5 种以上 HMO 和 / 或 HMO 前体,其以无定形形式存在并且具有至少 50°C,优选至少 60°C 的玻璃化转变温度 (T_g)。

[0024] 本发明第二方面的另一个实施方案涉及掺合物,所述掺合物包含 2 种以上,优选 5 种以上 HMO,所述 HMO 选自 LNT、LNnT、2'-FL、3-FL、DFL、LNFP I、3'-SL、6'-SL、FSL、LST a 和 DS-LNT,优选选自 LNT、LNnT、2'-FL、3-FL、3'-SL 和 6'-SL,其以以无定形形式存在并且具有至少 60°C 的玻璃化转变温度 (T_g)。

[0025] 本发明第三方面涉及用于除去人乳寡糖 (HMO) 或 HMO 的前体或 HMO 掺合物之中或之上(特别是结晶的 HMO 或 HMO 前体或掺合物之中或之上)的有机溶剂残留物,或至少充分地降低所述有机溶剂残留物的量或浓度的方法,所述方法包括以下步骤:

[0026] a) 提供在水溶液中的 HMO 或 HMO 前体或掺合物,优选以大约其最大浓度,尤其是以至少约 30-60wt%,特别是至少约 40-50wt% 的浓度;和

[0027] b) 接着对所述水溶液进行喷雾干燥以从所述 HMO 或 HMO 前体或掺合物除去基本上所有,优选至少约 90%,特别是至少约 95% 的水并且除去基本上所有,优选至少约 75%,特别是至少约 85% 的有机溶剂残留物。

[0028] 本发明该第三方面的一个实施方案涉及使用所述方法用于从 HMO 或 HMO 前体或掺合物除去或降低有机溶剂残留物,所述 HMO 或 HMO 前体或掺合物是通过催化氢解所述 HMO 或 HMO 前体或掺合物的被保护的衍生物制得的,所述被保护的衍生物具有通过催化氢解可去除的保护基,优选苄基。在一个优选的实施方案中,有机溶剂残留物包含被氢解的保护基,其是甲苯或取代的甲苯,优选甲苯。

[0029] 本发明第三方面的另一个实施方案涉及使用所述方法用于从 HMO 或 HMO 前体或掺合物除去或降低有机溶剂残留物,所述 HMO 或 HMO 前体或掺合物是通过所述 HMO 或 HMO 前体或掺合物的被保护的衍生物在质子溶剂(优选低级链烷醇或含水低级链烷醇溶剂)中的催化氢解制得的。在一个优选实施方案中,有机溶剂残留物包括所述质子溶剂的残留物,优

选低级链烷醇,特别是甲醇的残留物。

[0030] 本发明第三方面的另一个实施方案涉及使用所述方法用于从 HMO 或 HMO 前体或掺合物除去或降低两种以上有机溶剂的残留物,所述 HMO 或 HMO 前体或掺合物是通过所述 HMO 或 HMO 前体或掺合物的被保护的衍生物在质子溶剂(优选低级链烷醇或含水低级链烷醇溶剂)中的催化氢解制得的,所述被保护的衍生物具有通过催化氢解可去除的保护基,优选苄基。在一个优选实施方案中,一种有机溶剂残留物包含被氢解的保护基,其是甲苯或取代的甲苯,优选甲苯,并且另一种有机溶剂残留物包含质子溶剂的残留物,优选低级链烷醇,特别是甲醇的残留物。

[0031] 本发明第三方面的另一个实施方案涉及使用所述方法用于从 2 种以上,优选 5 种以上已单独地结晶自一种或多种有机溶剂的 HMO 和 / 或 HMO 前体的掺合物或混合物除去或减少一种或多种有机溶剂残留物。

[0032] 本发明第三方面的另一个实施方案涉及使用所述方法用于从已自有机溶剂结晶的 HMO 或 HMO 前体或衍生物或掺合物除去有机溶剂残留物。在该方面的一个实施方案中,有机溶剂残留物包含低级链烷醇,优选甲醇。

[0033] 本发明第四方面涉及用于增强 HMO 或 HMO 前体或 HMO 掺合物对于哺乳动物,特别是人,更特别是婴幼儿的生物利用度的方法,所述方法包括以下步骤:

[0034] a) 提供在水溶液中的 HMO 或 HMO 前体或掺合物,优选以大约其最大浓度,尤其是以至少约 30-60wt%,特别是至少约 40-50wt% 的浓度;和

[0035] b) 接着对所述水溶液进行喷雾干燥以除去基本上所有,优选至少约 90%,特别是至少约 95% 的水并且提供具有无定形物理状态的 HMO 或 HMO 前体或衍生物或掺合物。

[0036] 发明详述

[0037] 根据本发明,对人乳寡糖(HMO)或其前体或者 HMO 和 / 或 HMO 前体的掺合物的水溶液进行喷雾干燥,优选在单个喷雾干燥步骤中,从而:

[0038] - 从其除去基本上所有,优选至少约 90%,特别是至少约 95% 的水;并由此

[0039] - 从其除去基本上所有,优选至少约 75%,尤其是至少约 85% 的有机溶剂(优选低级链烷醇,更优选甲醇)的残留物;并且还

[0040] - 增强其当在高于 25°C 的温度长期储存时的稳定性;和 / 或还

[0041] - 增强其对于哺乳动物,特别是人,更特别是婴幼儿的生物利用度。

[0042] 而且,在本发明中,术语“通过催化氢解可去除的保护基”是指这样的基团,其 C-O 键通过在氢解催化剂存在下加入氢而裂解。氢化催化剂在压力下的氢气存在下使用。氢解催化剂可以例如是钯、拉尼镍(Raney nickel)、碳载钯或钯黑或者已知用于氢解的另一种恰当金属催化剂。氢解导致已被保护的 OH- 基团再生。这种类型的保护基是已知的(参见,例如 P. G. M. Wuts 和 T. W. Greene: Protective Groups in Organic Synthesis(有机合成中的保护基), John Wiley & Sons(2007))。适当的保护基包括苄基、二苯基甲基(二苯甲基)、1- 萘基甲基、2- 萘基甲基或三苯基甲基(三苯甲基)基团,其每一个可以任选地被选自以下各项的一个或多个基团取代:烷基,烷氧基,苯基,氨基,酰氨基,烷氨基,二烷基氨基,硝基,羧基,烷氧羰基,氨基甲酰基, N- 烷基氨基甲酰基, N, N- 二烷基氨基甲酰基,叠氮基,卤代烷基或卤素。优选地,如果存在,这样的取代在芳环上。特别优选的保护基是任选被一个或多个选自烷基或卤素的基团取代的苄基。更优选地,保护基选自未取代苄基、4- 氯苄基和

4-甲基苄基。这些特别优选且更优选的保护基具有这样的优势,即氢解的副产物(如被氢解的保护基)排他地是甲苯或取代的甲苯。这样的副产物可以容易地经由蒸发和/或萃取过程从水溶性寡糖产物中甚至以多吨规模被除去。

[0043] 此外,在本发明中,术语“低级链烷醇”优选是指具有1至6个碳原子的羟基-或二羟基-链烷醇,如甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、乙二醇、二乙二醇、1,2-丙二醇、1,3-丙二醇、丁醇和异己醇,尤其是“C₁-C₄醇”,如甲醇、乙醇、异丙醇、1,2-丙二醇和叔丁醇,特别是甲醇。

[0044] 而且,在本发明中,术语“HMO”是指在母乳中发现的三糖、四糖和寡糖(参见Urashima等人:Milk Oligosaccharides(乳寡糖),Nova Biomedical Books,New York,2011,ISBN:978-1-61122-831-1)。优选地,HMO选自以下各项组成的组:LNT、LNnT、LNH、LNnH、para-LNH、para-LNnH、2'-FL、3-FL、DFL、LNFP I、LNFP II、LNFP III、LNFP V、F-LNnH、DF-LNH I、DF-LNH II、DF-LNH I、DF-para-LNH、DF-para-LNnH、3'-SL、6'-SL、FSL、F-LST a、F-LST b、F-LST c、LST a、LST b、LST c和DS-LNT,更优选选自LNT、LNnT、2'-FL、3-FL、DFL、LNFP I、3'-SL、6'-SL、FSL、LST a和DS-LNT,甚至更优选选自LNT、LNnT、2'-FL、3-FL、3'-SL和6'-SL,特别是选自LNnT、2'-FL和6'-SL。

[0045] 还是在本发明中,HMO前体优选是指作为HMO的部分的单糖、二糖和三糖,即葡萄糖、半乳糖、N-乙酰-葡糖胺、岩藻糖、唾液酸、乳糖、乳-N-二糖(Gal β 1-3GlcNAc)、N-乙酰-乳糖胺(Gal β 1-4GlcNAc)和乳-N-三糖(GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)。优选的HMO前体选自以下各项组成的组:岩藻糖,唾液酸,乳-N-二糖,N-乙酰-乳糖胺和乳-N-三糖。

[0046] 而且,在本发明中,术语“掺合物(blend)”或“HMO掺合物”是指两种以上,优选5种以上HMO和/或HMO前体的混合物。优选地,所述掺合物由两种以上,优选5种以上选自以下各项的HMO组成:LNT、LNnT、LNH、LNnH、para-LNH、para-LNnH、2'-FL、3-FL、DFL、LNFP I、LNFP II、LNFP III、LNFP V、F-LNnH、DF-LNH I、DF-LNH II、DF-LNH I、DF-para-LNH、DF-para-LNnH、3'-SL、6'-SL、FSL、F-LST a、F-LST b、F-LST c、LST a、LST b、LST c和DS-LNT,更优选选自LNT、LNnT、2'-FL、3-FL、DFL、LNFP I、3'-SL、6'-SL、FSL、LST a和DS-LNT,甚至更优选选自LNT、LNnT、2'-FL、3-FL、3'-SL和6'-SL。

[0047] 在实施本发明中,HMO或HMO前体或HMO掺合物的被保护的衍生物(所述被保护的衍生物具有通过催化氢解可去除的保护基,优选苄基),可以在质子溶剂,优选低级链烷醇或含水低级链烷醇溶剂中,或在具有质子溶剂的水溶液中以常规方式被催化氢解,从而生成HMO或HMO前体或掺合物的溶液。参见通过引用结合于此的WO 2012/007585。所得的溶液-其含有有机溶剂残留物,通常为约1000至2000ppm的在氢解期间产生的甲苯或取代甲苯和通常为约1000至2000ppm的在氢解中使用的质子溶剂-优选被加热以部分地蒸发质子溶剂,浓缩所述溶液,并且部分地蒸发甲苯或取代甲苯和所述质子溶剂。优选地,所得的水溶液接着用水稀释一次或多次并且再次浓缩从而充分地降低所述有机溶剂残留物中的每一种。在这方面,所得水溶液优选具有的质子溶剂含量为不超过约500ppm,尤其是不超过约100ppm,特别是不超过约50ppm,并且甲苯或取代甲苯含量为不超过约200ppm,优选不超过约50ppm,特别是不超过约20ppm。此外,所得水溶液具有的HMO或HMO前体或HMO掺合物的浓度为约10-50wt%,优选约20-40wt%,特别是约25-35wt%。

[0048] 备选地,在实施本发明中,无水HMO或HMO前体或掺合物(优选晶体形式的)可以

以常规方式溶解于水中。所述水优选稍微被加热,例如达到约 40–50°C,以促进 HMO 或 HMO 前体或掺合物在所得水溶液中的溶解,优选达到其最大浓度(例如约 10–50wt%),尤其是达到约 20–40wt%,特别是约 25–35wt% 的浓度。

[0049] 所得水溶液然后可以利用热空气或热惰性气体(优选热空气中),在约 130–210°C,优选 140 至 180°C,特别是 140 至 160°C 以常规方式进行喷雾干燥,以产生 HMO 或 HMO 前体或掺合物的基本上无水的、无定形的、自由流动的粉末。在这方面,可以使用任何常规的喷雾干燥设备,如并流(co-current)或多效喷雾干燥机,优选两级(two-stage)喷雾干燥机(具有流化床附件)。同样,不认为喷雾干燥机中的雾化器或喷嘴的选择是关键,并且可以适当地利用任何常用旋转盘(rotary disk)或高压旋流喷嘴。

[0050] 优选地,获得这样的 HMO 或 HMO 前体或掺合物的喷雾干燥粉末,其中基本上所有,优选至少约 90%,特别是至少约 95% 的其水含量被除去并且在喷雾干燥之前在进料溶液中已存在的基本上所有,尤其是至少约 75%,特别是至少约 85% 的其有机溶剂残留物,特别是甲苯或取代甲苯(优选甲苯)的残留物和/或低级链烷醇(优选甲醇)的残留物被除去。喷雾干燥的粉末的玻璃化转变温度(T_g)是其水含量的函数,但约 8–10% 以下,优选约 4–6% 以下的水含量可以提供至少 40°C,优选至少 50°C,更优选至少 60°C,甚至更优选至少 70°C,特别是至少 80°C 的 T_g 。这样的 T_g 可以通过在约 130–210°C,优选 140 至 180°C,特别是 140 至 160°C 喷雾干燥 HMO 或 HMO 前体或掺合物而容易获得。有利地,当对选自 LNT、LNnT、2'-FL、3-FL、DFL、LNFP I、3'-SL、6'-SL、FSL、LST a 和 DS-LNT,优选选自 LNT、LNnT、2'-FL、3-FL、3'-SL 和 6'-SL,更优选选自 LNnT、2'-FL 和 6'-SL 的 HMO 进行喷雾干燥时, T_g 可以升高至约 80°C 以上。同样有利地,在对包含 2 种以上 HMO 和/或 HMO 前体,优选 5 种以上选自自由 LNT、LNnT、2'-FL、3-FL、DFL、LNFP I、3'-SL、6'-SL、FSL、LST a 和 DS-LNT 组成的组,甚至更优选选自 LNT、LNnT、2'-FL、3-FL、3'-SL 和 6'-SL 的 HMO 的 HMO 掺合物进行喷雾干燥的情况下, T_g 可以升高至约 60°C 以上。所得的 T_g 为至少 60°C 的 HMO 或 HMO 前体或掺合物的无定形粉末可以在最高约 50°C 储存,并且 T_g 为至少 80°C 的 HMO 或 HMO 前体或掺合物的无定形粉末可以在最高约 60°C 下储存,并且这样的粉末可以在其保持无定形的同时在其组成没有显著变化且没有显著分解的情况下长期储存。

[0051] 而且,优选地,通过本发明的方法获得的 HMO 或 HMO 前体或掺合物的喷雾干燥粉末仅含有小的量或浓度的有机溶剂残留物。一些 HMO、掺合物或 HMO 前体可以具有极大亲和性而吸附通过常规干燥方法仅可以部分除去的有机溶剂。结晶的岩藻糖基化 HMO,特别是 2'-FL,强有力地结合低级醇,尤其是甲醇(其量不能被降低到一定值以下)。这可能阻止这样的 HMO 用于食品和药物应用。这个问题可以通过喷雾干燥而不是结晶在化学或化学-酶促合成后具有高的有机溶剂残留物浓度的 HMO 或 HMO 前体或掺合物(尤其是 2'-FL)得以克服。

[0052] 通过本发明方法获得的 HMO 或 HMO 前体或掺合物的无定形粉末可以有益地用于制备意在用于婴幼儿、儿童、成人或老年人的营养制剂(如食品、饮料或饲料)、食品增补剂、消化健康功能食品或其他消费品。

[0053] 因此,本发明的另一个方面涉及用于治疗婴幼儿、儿童、成人和/或老年人并且特别是具有特殊需求(例如,患有代谢障碍)的受试者的药物组合物,所述药物组合物包含根据第二方面的 HMO 或 HMO 前体或掺合物的无定形粉末。根据第二方面的 HMO 或 HMO 前体或

掺合物的无定形粉末可以加入至药用载体,如常规添加剂、助剂、赋形剂和稀释剂(水,明胶,滑石,糖,淀粉,阿拉伯树胶,植物胶,植物油,聚亚烷基二醇,调味剂,防腐剂,稳定剂,乳化剂,润滑剂,着色剂,填料,润湿剂等)。合适的载体描述于雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)(本领域的标准参考文本)的最新版本。当根据第二方面的HMO或HMO前体或掺合物的无定形粉末加入到药用载体中时,可以制备例如但不限于片剂、粉剂、颗粒剂、混悬剂、乳剂、灌注剂、胶囊、注射液、液体、酏剂、提取物和酏剂形式的剂量。如果需要,向上述制剂中,还可以进一步添加益生菌(probiotics),例如乳酸菌(lactobacteria),双歧杆菌物种(Bifidobacterium species),益生元如果寡糖和半乳寡糖,来自酪蛋白、大豆、乳清或脱脂乳的蛋白质,碳水化合物如乳糖、蔗糖、麦芽糊精、淀粉或其混合物,脂质(例如棕榈油(palm olein)、葵花油、红花油)以及日常饮食中必需的维生素和矿物质。

[0054] 包含根据第二方面的HMO或HMO前体或掺合物的无定形粉末的药物组合物可以通过本领域已知的任何通常方式(例如描述于作为本领域的标准参考文本的雷明顿药物科学的最新版本中的)制造。

[0055] 本发明的另一个方面是营养制剂,如食品、饮料或饲料,其含有根据第二方面的HMO或HMO前体或掺合物的无定形粉末和常规可食用微量营养物、维生素和矿物质。这样的成分的量可以变化,这取决于消费品是否意图用于婴幼儿、儿童、成人、老年人或具有特殊需求(例如患有代谢障碍)的受试者。微量营养物包括例如食用油、脂肪或脂肪酸(如椰子油,大豆油,甘油一酸酯,甘油二酸酯,棕榈油,葵花油,鱼油,亚油酸,亚麻酸等)、碳水化合物(如葡萄糖,果糖,蔗糖,麦芽糊精,淀粉,水解玉米淀粉等)和来自酪蛋白、大豆、乳清或脱脂乳的蛋白质,或这些蛋白质的水解物,但也可以使用来自其他来源的蛋白质(完整的或水解的)。可以选择维生素,如维生素A、B1、B2、B5、B6、B12、C、D、E、H、K、叶酸、肌醇和烟酸。营养制剂可以含有以下矿物质和微量元素:Ca、P、K、Na、Cl、Mg、Mn、Fe、Cu、Zn、Se、Cr或I。此外,可以添加额外的益生菌,例如乳酸菌、双歧杆菌物种,还可以进一步添加益生元如果寡糖和半乳寡糖,来自酪蛋白、大豆、乳清或脱脂乳的蛋白质,碳水化合物如乳糖、蔗糖、麦芽糊精、淀粉或其混合物,脂质(例如棕榈油,葵花油,红花油)以及日常饮食中必需的维生素和矿物质。

[0056] 在一个优选实施方案中,包含根据第二方面的HMO或HMO前体或掺合物的无定形粉末的营养制剂可以是食品增补剂。这样的食品增补剂优选含有如针对以上营养食品限定的成分,例如维生素、矿物质、微量元素和其他微量营养物等。所述食品增补剂可以例如为片剂、胶囊、锭剂或液体的形式。所述增补剂可以含有选自但不限于以下各项的常规添加剂:粘合剂、包衣、乳化剂、增溶剂、包封剂、成膜剂、吸附剂、载体、填料、分散剂、润湿剂、凝胶化剂(jellifying agent)、胶凝剂(gel forming agent)等。

[0057] 在另一个优选实施方案中,包含根据第二方面的HMO或HMO前体或掺合物的无定形粉末的营养制剂可以是消化健康功能食品,因为施用HMO或HMO前体或掺合物对消化健康提供有益作用。消化健康功能食品优选是这样的加工食品,其意图用于通过以片剂、胶囊、粉剂等形式利用根据本发明的寡糖的混合物作为生理学功能成分或组分而增强和保持消化健康。也可以使用不同的术语如膳食增补剂、营养药物(nutraceutical)、设计食品、保健品来指消化健康功能食品。包含根据第二方面的HMO或HMO前体或掺合物的无定形粉末

的营养制剂可以以任何通常方式制备。例如,其可以通过掺混适当比例的微量营养物组分来制备。然后,添加维生素和矿物质,但为了避免热降解或分解,可以在均化之后添加热敏性维生素。亲脂性维生素可以在混合之前溶解在脂肪来源中。液体混合物使用水形成,其温度优选为约 50-80°C 以有助于所述成分的溶解或分散。可以在这个阶段添加根据第二方面的 HMO 或 HMO 前体或掺合物的无定形粉末。然后所得混合物借助于蒸汽喷射、换热器或高压釜通过急骤加热至约 80-150°C 而被均化。这种热处理也显著减少细菌负载。该热混合物然后快速冷却至约 60-80°C。如果需要,可以在约 2-30MPa 的高压下在该温度进行进一步的均化。在冷却后,可以在这个阶段添加热敏性组分,并且可以方便地调整 pH 和固体含量。然后所得混合物通过常规方法如喷雾干燥或冷冻干燥进行干燥至粉末。可以在此时通过干混加入益生菌。

实施例

[0058] 以 10°C /min 的加热速率,使用 Perkin Elmer DSC-7 进行用来确定无定形样品的玻璃化转变温度的量热实验;将样品 (5-7mg) 置于开口铝坩埚中。

[0059] 实施例 1- 乳-N- 新四糖 (LNnT)

[0060] 将 10g (14.1mmol) 的 LNnT 的苄基糖苷 (根据 WO 2011/100980 合成) 溶解在 40ml 水中,加入 0.3g 的 Pd-C 和 80 μ l 的乙酸,并将该混合物在 H₂- 气氛 (大约 40 巴) 下在室温搅拌 2 天。反应混合物用去离子水 (10.0ml) 稀释,并过滤掉催化剂。将该混合物浓缩至 20ml,然后用去离子水 (30.0ml) 稀释并浓缩至 20ml (22g ;41% LNnT)。

[0061] 将该浓缩的溶液在以下条件下在 Büchi Mini Spray Dryer B290 上用于喷雾干燥:

[0062]

入口温度: 160 °C

出口温度: 75 °C

吸气器: 38 m³/h

压缩空气: 600 l/h

泵: 8 ml/min

[0063] 存在于进料溶液中的 96% 的甲醇被除去,并且经喷雾干燥的 LNnT 变为无定形的、非粘性的物质,其在 40°C 储存温度以下展示出优异的贮藏寿命。T_g:81.6°C。这表明对于此 LNnT 物质的约 60°C 的储存温度极限。两个月 (40°C, 相对湿度 75%) 后的稳定性试验显示该物质在分析数据和粉末 X- 射线图方面没有变化。

[0064] 以上获得的 LNnT 的无定形喷雾干燥样品与根据 WO 2011/100980 生产的 LNnT 的结晶样品的比较:

[0065]

	MeOH (通过 GC)	水
无定形的喷雾干燥的 L _{Nn} T	14 ppm	3.2 %
结晶的 L _{Nn} T	34 ppm	8.5 %

[0066] 该数据显示在喷雾干燥的无定形材料中可以发现显著更低量的有机溶剂残留物和水。

[0067] 实施例 2-2'-0-岩藻糖基乳糖 (2'-FL)

[0068] 将 (2-0- 苄基 - α -L- 吡喃岩藻糖基)-(1 \rightarrow 2)- β -D- 吡喃半乳糖基-(1 \rightarrow 4)-D- 葡萄糖 (根据 WO 2010/115935 合成) (10.0g) 悬浮在甲醇 (60ml) 中并添加悬浮在甲醇 (5.0ml) 中的 Pd/C (10%, 500mg)。然后将反应混合物在 H₂ 压力 (3 巴) 下搅拌 40h。反应混合物用去离子水 (35ml) 稀释, 并过滤掉催化剂。将无色溶液浓缩至 30ml, 然后用去离子水 (35ml) 稀释并浓缩至 20ml (22g ; 38% 2'-FL)。

[0069] 将该浓缩的溶液在以下条件下在 Büchi Mini Spray Dryer B290 上用于喷雾干燥:

[0070]

入口温度: 140 °C
 出口温度: 67 °C
 吸气器: 38 m³/h
 压缩空气: 600 l/h
 泵: 8 ml/min

[0071] 存在于进料溶液中的 75% 的甲醇被除去。经喷雾干燥的 2'-FL 变为无定形的、非粘性的物质, 其含有 2.8% 的水并且在 40°C 储存温度以下展示出优异的贮藏寿命。T_g: 83.9°C。这表明对于此 2'-FL 物质的约 60°C 的储存温度极限。两个月 (40°C, 相对湿度 75%) 后的稳定性试验显示该物质在分析数据和粉末 X- 射线图方面没有变化。

[0072] 以上获得的 2'-FL 的无定形喷雾干燥样品与根据 WO 2010/115935 生产的 2'-FL 的结晶样品的比较:

[0073]

	MeOH (通过 GC)
无定形的喷雾干燥的 2'-FL	9 ppm
结晶的 2'-FL	190 ppm

[0074] 该数据显示在所述喷雾干燥的无定形物质中可以发现显著更低的有机溶剂残留物。

[0075] 实施例 3-6'-0-唾液乳糖 (6'-SL)

[0076] 将 6'-SL 的苄基糖苷的钠盐 (根据 WO 2011/100979 合成, 10.0g) 溶解在去离子水

(15.0ml) 中, 并加入 1.5M HCl 水溶液 (2.20ml), 接着加入 Pd/C(10%, 580mg)。该混合物在 40°C 在 H₂ 压力 (5 巴) 下搅拌 20h。将催化剂过滤掉, 并将滤液浓缩至 10ml。加入去离子水 (15.0ml), 并将混合物浓缩至 15ml (17g; 52% 6'-SL)。将该溶液在以下条件下在 Büchi Mini Spray Dryer B290 上用于喷雾干燥:

[0077]

入口温度: 140 °C
 出口温度: 57 °C
 吸气器: 38 m³/h
 压缩空气: 600 l/h
 泵: 8 ml/min

[0078] 存在于进料溶液中的 84% 的甲醇被除去。经喷雾干燥的 6'-SL 变为无定形的、非粘性物质, 其含有 6.9% 的水并且在 40°C 储存温度以下展示优异的贮藏寿命。T_g: 84.0°C。这表明对于此 6'-SL 物质的大约 60°C 的储存温度极限。

[0079] 实施例 4 - 唾液酸 (Neu5Ac)

[0080] 将无水 Neu5Ac (5.00g) 通过温和加热溶解在去离子水 (25.0ml) 中。该溶液温热过滤, 加入 2000ppm 甲醇, 并且立即将该溶液在以下条件下在 Büchi Mini Spray Dryer B290 上进行喷雾干燥:

[0081]

进口温度: 150 °C
 出口温度: 64 °C
 吸气器: 38 m³/h
 压缩空气: 600 l/h
 泵: 8 ml/min

[0082] 在所给条件下, 存在于进料溶液中的 84% 的甲醇被除去。经喷雾干燥的 Neu5Ac 变为无定形的、非粘性物质, 其在 40°C 储存温度以下展示出优异的贮藏寿命。

[0083] 实施例 5-HMO 掺合物

[0084] 将以下 HMO 通过温和加热溶解在去离子水 (9.50ml) 中:

[0085]

2'-FL	3.38 g
3-FL	0.87 g
LNT	1.20 g
LNnT	0.35 g
3'-SL	0.27 g
6'-SL	0.72 g

[0086] 将 2000ppm 甲醇加入到 HMO 的水溶液中, 并且立即将该溶液在以下条件下在 Büchi

Mini Spray Dryer B290 上进行喷雾干燥：

[0087]

进口温度：150 °C

出口温度：63 °C

吸气器：38 m³/h

压缩空气：600 l/h

泵：8 ml/min

[0088] 存在于该溶液中的 73% 的甲醇被除去。经喷雾干燥的 HMO 的掺合物变为无定形的、非粘性物质，其在 40°C 储存温度以下展示出优异的贮藏寿命。T_g: 63.6°C。这表明对于该掺合物物质的大约 50°C 的储存温度极限。