

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6666243号  
(P6666243)

(45) 発行日 令和2年3月13日(2020.3.13)

(24) 登録日 令和2年2月25日(2020.2.25)

(51) Int.Cl.	F 1
C07H 5/04 (2006.01)	C07H 5/04
C07H 7/02 (2006.01)	C07H 7/02
B01D 15/00 (2006.01)	B01D 15/00
B01D 15/36 (2006.01)	B01D 15/36
B01D 15/12 (2006.01)	B01D 15/00 101A

請求項の数 13 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-520025 (P2016-520025)	(73) 特許権者	511297753 イエンネワイン バイオテクノロジー ゲ ーエムベーハー J e n n e w e i n B i o t e c h n o l o g i e G m b H ドイツ国 53619 ラインブライトバ ッハ、マールヴェク 32 M a a r w e g 32 53619 R h e i n b r e i t b a c h G e r m a n y
(86) (22) 出願日	平成26年10月2日(2014.10.2)	(74) 代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
(65) 公表番号	特表2016-535724 (P2016-535724A)	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(43) 公表日	平成28年11月17日(2016.11.17)		
(86) 國際出願番号	PCT/EP2014/071145		
(87) 國際公開番号	W02015/049331		
(87) 國際公開日	平成27年4月9日(2015.4.9)		
審査請求日	平成29年9月29日(2017.9.29)		
(31) 優先権主張番号	13187369.7		
(32) 優先日	平成25年10月4日(2013.10.4)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	歐州特許庁(EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】擬似移動床クロマトグラフィーを用いる中性ヒトミルクオリゴ糖の精製方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

中性ヒトミルクオリゴ糖および夾雜物を含む粗製溶液から中性ヒトミルクオリゴ糖を連続クロマトグラフィーで精製する方法であつて、

中性ヒトミルクオリゴ糖および夾雜物を含む粗製溶液が、微生物発酵抽出液、生体触媒反応溶液、化学合成溶液、およびその組合せからなる群から選択される溶液を含むかまたはそれからなり、その際、溶液中の中性ヒトミルクオリゴ糖の純度は<80%であり、

粗製溶液に、擬似移動床クロマトグラフィーを用いる少なくとも1つの精製工程を適用し、その際、純度80%の中性ヒトミルクオリゴ糖を含む精製溶液が得られることを特徴とする方法。

## 【請求項 2】

粗製溶液中の中性ヒトミルクオリゴ糖の純度が70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%もしくは5%であり、および/または精製溶液が純度85%の中性ヒトミルクオリゴ糖を含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 3】

少なくとも1つの擬似移動床クロマトグラフィーが、

i) 少なくとも4つのカラムを有し、その際、少なくとも1つのカラムが弱または強力チオノン交換樹脂を含む；および/または

ii) 流速の異なる4つのゾーンI、II、III、IVを有する；

iii) 水を含むかまたは水からなる溶離剤を有する；および/または

10

20

i v ) 15 ~ 60 の操作温度を有する；  
ことを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

精製溶液に、擬似移動床クロマトグラフィーを用いる少なくとも 1 つのさらなる精製工程を適用し、その際、純度 92 % の中性ヒトミルクオリゴ糖を含む精製溶液が得られることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

さらなる擬似移動床クロマトグラフィーが、  
i ) 少なくとも 4 つのカラムを有し、その際、少なくとも 1 つのカラムが弱または強力チオノン交換樹脂を含む；および / または  
i i ) 流速の異なる 4 つのゾーン I、II、III、IV を有する；  
i i i ) 水を含むかまたは水からなる溶離剤を有する；および / または  
i v ) 15 ~ 60 の操作温度を有する；  
ことを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

中性ヒトミルクオリゴ糖および夾雜物を含む粗製溶液が微生物発酵抽出液を含むかまたはそれからなり、その際、微生物発酵抽出液が少なくとも 1 つの微生物発酵工程、それに続く少なくとも 1 つの下記の工程で得られることを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法：

- a ) 微生物発酵後に可溶性物質を不溶性物質から分離するための、溶液の濾過；
- b ) 溶液のイオン交換クロマトグラフィー、それに続くアニオン交換クロマトグラフィー；
- c ) 溶液の濃縮；
- d ) 溶液の透析；
- e ) 溶液の擬似移動床クロマトグラフィーを用いるクロマトグラフィー；
- f ) 中性ヒトミルクオリゴ糖を有色夾雜物から分離するための溶液の濾過；ならびに
- g ) 中性ヒトミルクオリゴ糖を含む精製溶液の噴霧乾燥。

【請求項 7】

溶液に少なくとも 1 つの擬似移動床クロマトグラフィー工程を適用する前に、中性ヒトミルクオリゴ糖を含む溶液を  
i ) 濾過して不溶性物質をすべて除去する；および / または  
i i ) カチオノンおよび / またはアニオノン交換クロマトグラフィーを用いる少なくとも 1 つの精製工程を適用する；  
ことを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

溶液に擬似移動床クロマトグラフィーを用いる少なくとも 1 つの精製工程を適用する前に、または擬似移動床クロマトグラフィーを用いる精製工程の後に、中性ヒトミルクオリゴ糖を含む溶液を電気透析および / または透析濾過することを特徴とする、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

透析後に、中性ヒトミルクオリゴ糖を含む溶液を、  
i ) 100 g / L の濃度にまで；および / または  
i i ) 真空濃縮機を用いて；および / または  
i i i ) ナノ濾過により；および / または  
i v ) 4 ~ 50 の温度で  
濃縮することを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

精製溶液を、無菌濾過および / またはエンドトキシン除去することを特徴とする、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

精製溶液を噴霧乾燥することを特徴とする、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

中性ヒトミルクオリゴ糖が中性ヒトミルク三糖、四糖、五糖または六糖であることを特徴とする、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

中性ヒトミルクオリゴ糖を連続クロマトグラフィーで精製する方法が中性ヒトミルクオリゴ糖を連続的に精製する方法であることを特徴とする、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本出願は、中性ヒトミルクオリゴ糖(neutral human milk oligosaccharide)（中性HMO）の精製方法を開示する。本方法は、大量の高純度HMOの連続精製を可能にする擬似移動床(simulated moving bed)（SMB）クロマトグラフィーを使用する。中性HMOの化学合成経路およびそれらの後続精製と対照的に、提示した方法は有害化学物質、たとえば痕跡量の重金属または有機溶媒を含まないHMOを提供できる。個々の中性HMO製品は、噴霧乾燥により固体状で、または濃縮シロップとして得ることができる。提供される中性HMOは食品用として使用するのにきわめて好適である。

【背景技術】

20

【0002】

ヒトミルク（人乳）は、炭水化物、脂肪、タンパク質、ビタミン、無機質および微量元素の複雑な混合物である。明らかに最も多量に存在する画分は炭水化物であり、それはさらにラクトースとより複雑なオリゴ糖に分類される。乳児によりラクトースはエネルギー源として使われるのに対し、複雑なオリゴ糖は代謝されない。複雑なオリゴ糖の画分は最大で総炭水化物画分の1/10を占め、おそらく150種類を超えるオリゴ糖からなる。これらの複雑なオリゴ糖の存在および濃度はヒトに特有であり、よって他の哺乳動物、たとえば家畜化された酪農動物のミルクには多量にはみられない。

【0003】

ヒトミルクにこれらの複雑なオリゴ糖が存在することは以前から既に知られており、これらのオリゴ糖の生理的機能について数十年間にわたって医学的研究が行なわれてきた。より多量に存在するヒトミルクオリゴ糖のうちあるものについては、特異的機能が既に同定されている。

30

【0004】

個々のHMOの純粋な画分の供給量に限界があり、入手が困難であることにより、これらの複雑な分子のうちあるものに対して化学的経路が開発された。しかし、化学合成、酵素合成または発酵によるHMOの合成は困難であることが証明された。今日まで、少なくとも大規模な量および食品用として適した量は提供できなかった。これに関して、特に特定のHMOの化学合成経路（たとえば、HMOである2'-フコシルラクトース；WO 2010/115935 A1を参照）は、幾つかの有害化学物質を伴ない、それらは最終製品の汚染のリスクを伴なう。

40

【0005】

ヒトミルクオリゴ糖の化学合成に伴なう困難さのため、幾つかの酵素法および発酵法が開発された。しかし、これらの方法は複雑なオリゴ糖混合物を生成する；すなわち、目的生成物には出発物質、たとえばラクトース、生合成中間体、ならびに基質、たとえば個々の单糖類およびポリペプチドなどが混在する。

【0006】

これらの複雑な混合物から個々のオリゴ糖製品を精製するための従来技術水準の方法は技術的に複雑であり、かつ食品用として経済的ではない。二糖であるラクトースまたはスクロースを乳清や糖蜜などの複雑な混合物から精製するために、多数回の結晶化を伴なう

50

工業規模の方法が開発された。それらの方法の欠点は、それらが複雑であり、低い収率が得られるにすぎないことがある。

【0007】

複雑なオリゴ糖、たとえばHMOの精製のためには、現在までゲルfiltrationクロマトグラフィーが一般に好まれる方法であった。ゲルfiltrationクロマトグラフィーの欠点は、それが効率的にスケールアップできないこと、および連続操作に適さないことがある。よって、ゲルfiltrationクロマトグラフィーは経済的でなく、特定のHMO - たとえばHMOである2'-フコシルラクトース - をヒトの食品に使用するのに妥当な量および品質で提供するには不可能である。

【0008】

10

擬似移動床 (SMB) クロマトグラフィーはそのルーツが石油化学および鉱工業にある。今日、SMBクロマトグラフィーは医薬産業により鏡像異性体をラセミ混合物から分離するために用いられている。SMBクロマトグラフィーは、単糖フルクトースをフルクトース - グルコース溶液から分離するために、また二糖スクロースをテンサイまたはサトウキビのシロップから大規模に分離するために、既に用いられている。しかし、SMBクロマトグラフィーはHMOまたは発酵由来の他のいずれかの複雑なオリゴ糖を精製するためにはまだ採用されていない。

【0009】

擬似移動床 (SMB) クロマトグラフィーは、精留などの連続的な化学物質分離法と同様に連続分離法として開発された。精留においては、液相と気相の間に向流が樹立され、こうしてそれにより供給と製品（単数または複数）取出しの連続適用が可能になる。さらに、向流クロマトグラフィー操作は理論的には一般的な交差流操作より優れた分離を達成するはずである。しかし、クロマトグラフィー向流操作には反対方向に移動する移動相と固定相が必要であろう。よって、連続クロマトグラフィー分離法における移動性固体クロマトグラフィー材料の概念に関係する難点に対する実際的な解決策として、SMBクロマトグラフィーが開発された。

20

【0010】

標準的なSMBの概念は、4つの外部適用流を備えた4つの異なるゾーンを伴なう；分離すべき成分を含む供給材料の流れ、脱着剤または移動相の流れ、エクストラクト(extract)およびラフィネート(raffinate)の流れ（ラフィネート流は保持した成分（単数または複数）がより少ない）。これらの液流は、SMBシステムを下記のタスクをもつ4つの異なるゾーン（それぞれのゾーンまたはセクションは1以上のカラムを含むことができる）に分割する：ゾーンIは固相の再生のために必要であり、ゾーンIIの目的は脱着度がより弱い物質の脱着であり、ゾーンIIIのタスクは吸着度が強い物質の吸着であり、最後にゾーンIVのタスクは吸着性がより弱い物質の吸着である。よって、より強く吸着する成分はゾーンIIで濃縮波(concentration wave)を樹立してエクストラクトポートへ輸送され、これに対し、より弱く吸着する成分はラフィネートポートへ向かって移動する。

30

【0011】

原理的に、ゾーンIおよびIVは固相の再生に用いられ（再生ゾーン）、これに対しゾーンIIおよびIIIはそのシステムの実際の分離ゾーンとみなすことができる（分離ゾーン）。4つの液流および得られるゾーンのほかに、このシステムは（閉ループ操作について）移動相（脱着剤）のための再循環ポンプを含み、移動相は固定ゾーン内を1方向に通過する。次いで周期的なシフティング、ならびに順にシステム内の1カラムから次のカラムへの供給材料、脱着剤および製品の連続的な供給または取出しにより、向流が達成される。

40

【0012】

標準的な閉ループ、4ゾーンSMBシステムのほかに、開ループ、3ゾーンシステムも使用できる。3ゾーン - 開ループシステムは、新鮮な溶媒がかなり安価である場合、たとえば水または水 / エタノールを移動相として用いる場合には経済的である。3ゾーン - 開ループ構造を用いると、液相の再生はもはや必要がなく、よってゾーンIVは採用されな

50

くなる。

【0013】

2成分混合物の分離のための標準的なSMBシステムのほかに、2成分より多い成分の分離のために8ゾーン・閉ループまたは5ゾーン・閉ループSMBシステムも開発された。

【0014】

SMBシステムは、連続操作モードおよびかなり大きなカラムサイズを使用できるため、原理的に数百トンの生産体積にまで規模を拡大できる。

【先行技術文献】

【特許文献】

10

【0015】

【特許文献1】WO 2010/115935 A1

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

この先行技術から出発すると、技術的な課題は、高純度で有害化学物質を含まない中性HMOを大量に得るための新規な方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0017】

技術的な課題は、請求項1による方法、請求項14による中性HMO、および請求項18による中性HMOの使用により解決される。従属請求項は有利な態様を示す。

20

本発明は、中性HMO（たとえば、2'-フコシルラクトース）および夾雑物を含む粗製溶液から中性ヒトミルクオリゴ糖を連続クロマトグラフィーで（または連続的に）精製する方法を提供し、その際、中性HMO（たとえば、2'-フコシルラクトース）および夾雑物を含む粗製溶液が、微生物発酵抽出液、生体触媒反応溶液、化学合成溶液、およびその組合せからなる群から選択される溶液を含むかまたはそれからなり、その際、溶液中の中性HMO（たとえば、2'-フコシルラクトース）の純度は<80%である。本方法は、粗製溶液に、擬似移動床クロマトグラフィーを用いる少なくとも1つの精製工程を適用することを特徴とする。この方法で、純度80%の所望の中性HMO（たとえば、2'-フコシルラクトース）を含む精製溶液が得られる。

30

【0018】

中性HMOを連続クロマトグラフィーで精製する方法は、中性HMOを連続的に精製する方法であってもよい。これに関して、中性HMOは2'-フコシルラクトースまたはラクト-N-テトラオースであってもよい。

【0019】

本出願人は、擬似移動床クロマトグラフィーを用いる精製工程を伴なうこの開発された方法によれば、高純度で重金属夾雑物を含まないHMOを連続的に提供できることを見出した。よって、大量の高純度HMOをきわめて簡便かつ経済的に、たとえば微生物発酵に由来する粗製溶液から提供できる。本発明方法は、擬似移動床クロマトグラフィー工程に用いるカラム材料（たとえば、カチオン性カラム材料）の再生工程が無くても高度に安定であることも分かった。事実、全プロセスを数か月間にわたって安定かつ連続的に操作できる。

40

【0020】

好ましい態様において、粗製溶液中の中性HMOの純度は70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%もしくは5%であり、および/または精製溶液は純度80%、好ましくは90%の中性HMOを含む。用語“粗製溶液”は1つの移動床クロマトグラフィー精製工程の前の中性HMO含有溶液を表わし、これに対し精製溶液は1つの移動床クロマトグラフィー工程の後の溶液を表わす。

【0021】

少なくとも1つの擬似移動床クロマトグラフィー工程は、

50

i ) 少なくとも 4 つのカラム、好ましくは少なくとも 8 つのカラム、より好ましくは少なくとも 12 のカラムを有し、その際、少なくとも 1 つのカラムが弱または強力チオノン交換樹脂、好ましくは  $H^+$  - 形または  $Ca^{2+}$  - 形のカチオノン交換樹脂を含む；および／または

i i ) 流速の異なる 4 つのゾーン I 、 I I 、 I I I 、 I V を有する；および／または

i i i ) 水、好ましくはエタノールおよび水、より好ましくは 5 ~ 15 体積% (vol %) のエタノールおよび 85 ~ 95 体積% の水、最も好ましくは 9 ~ 11 体積% のエタノールおよび 89 ~ 91 体積% の水を含むかまたはそれからなる溶離剤を有し、その際、溶離剤は場合によりさらに硫酸、好ましくは 10 mM の硫酸；より好ましくは 2 ~ 5 mM の硫酸を含む；および／または

i v ) 15 ~ 60 、好ましくは 20 ~ 55 、より好ましくは 25 ~ 50 の操作温度を有する

ことができる。

#### 【 0022 】

精製すべき HMO が 2' - フコシルラクトースであれば、少なくとも 1 つの擬似移動床クロマトグラフィー工程は、

i ) 流速の異なる 4 つのゾーン I 、 I I 、 I I I および I V を有し、その際、流速は好ましくは：ゾーン I において 28 ~ 32 mL / 分、ゾーン I I において 19 ~ 23 mL / 分、ゾーン I I I において 21 ~ 25 mL / 分、および／またはゾーン I V において 16 ~ 20 mL / 分である；および／または

i i ) 2 ~ 4 mL / 分、好ましくは 3 mL / 分の供給速度を有する；および／または

i i i ) 10 ~ 13 mL / 分、好ましくは 11.5 mL / 分の溶離剤流速を有する；および／または

i v ) 16 ~ 20 分、好ましくは 17 ~ 19 分、より好ましくは 18 分のスイッチング時間を有する

ことができる。

#### 【 0023 】

好ましくは、少なくとも 1 つのカラムは 0.1 ~ 5000 kg のカチオノン交換樹脂、好ましくは 0.2 ~ 500 kg のカチオノン交換樹脂、より好ましくは 0.5 ~ 50 kg のカチオノン交換樹脂、最も好ましくは 1.0 ~ 20 kg のカチオノン交換樹脂を含む。

#### 【 0024 】

重要なことは、カチオノン交換材料の量、種々のゾーンにおける流速、供給速度、溶離剤流速および／またはスイッチング時間のスケールアップが可能なことである。スケールアップは 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 10 、 20 、 30 、 40 、 50 、 60 、 70 、 80 、 90 、 100 、 1000 倍またはそれらの数値の間のあらゆる可能なスケールアップ倍率であってもよい。

#### 【 0025 】

カラム中に、強いカチオノン交換樹脂を固定相として使用できる。好ましくは、カチオノン交換樹脂はスルホン酸樹脂、より好ましくは Purolite (登録商標) PCR833H (Purolite, ドイツ、ラーティンゲン) 、 Lewatit MDS 2368 および／または Lewatit MDS 1368 樹脂である。カチオノン性イオン交換樹脂をカラム中に用いる場合、それは硫酸で再生できる。硫酸を溶離剤中に、好ましくは 10 mM 以下の硫酸濃度で使用できる。(強) カチオノン交換樹脂は  $H^+$  - 形または  $Ca^{2+}$  - 形で存在することができる。

#### 【 0026 】

擬似移動床クロマトグラフィーに際して 60 を超える操作温度は好ましくない。特に、固定相としての強力カチオノン性イオン交換樹脂 ( $H^+$  - 形または  $Ca^{2+}$  - 形のもの) の存在下で、適用した中性オリゴ糖が有意に脱安定化、すなわち解重合し、それは中性 HMO の最終収率に対して有害であることが見出された。

#### 【 0027 】

10

20

30

40

50

本発明の有利な態様において、本発明は精製溶液に擬似移動床クロマトグラフィーを用いる少なくとも1つのさらなる精製工程を適用することを特徴とし、その際、90%、好ましくは92%、より好ましくは93%の純度をもつ中性ヒトミルクオリゴ糖を含む精製溶液が得られる。特に、本発明は、組換えDNAを含まずかつ宿主株タンパク質を含まないHMO製品を生成する。

#### 【0028】

このさらなる擬似移動床クロマトグラフィーは、

i) 少なくとも4つのカラム、好ましくは少なくとも8つのカラム、最も好ましくは少なくとも12のカラムを有し、その際、少なくとも1つのカラムが弱または強力チオノン交換樹脂、好ましくはH<sup>+</sup>-形またはCa<sup>2+</sup>-形のカチオノン交換樹脂を含む；および／または

ii) 流速の異なる4つのゾーンI、II、III、IVを有する；および／または  
iii) 水、好ましくはエタノールおよび水、より好ましくは5～15体積%のエタノールおよび85～95体積%の水、最も好ましくは9～11体積%のエタノールおよび89～91体積%の水を含むかまたはそれからなる溶離剤を有し、その際、溶離剤は場合によりさらに硫酸、好ましくは10mMの硫酸；より好ましくは2～5mMの硫酸を含む；および／または

iv) 15～60、好ましくは20～55、より好ましくは25～50の操作温度を有する  
ことができる。

#### 【0029】

精製すべきHMOが2'-フコシルラクトースであれば、このさらなる擬似移動床クロマトグラフィー工程は、

i) 流速の異なる4つのゾーンI、II、IIIおよびIVを有し、その際、流速は好ましくは：ゾーンIにおいて28～32ml／分、ゾーンIIにおいて19～23ml／分、ゾーンIIIにおいて21～25ml／分、および／またはゾーンIVにおいて16～20ml／分である；および／または

ii) 2～4ml／分、好ましくは3ml／分の供給速度を有する；および／または  
iii) 10～13ml／分、好ましくは11.5ml／分の溶離剤流速を有する；および／または

iv) 16～20分、好ましくは17～19分、より好ましくは18分のスイッチング時間を有する  
ことができる。

#### 【0030】

特に、少なくとも1つのカラムは0.1～5000kgのカチオノン交換樹脂、好ましくは0.2～500kgのカチオノン交換樹脂、より好ましくは0.5～50kgのカチオノン交換樹脂、最も好ましくは1.0～20kgのカチオノン交換樹脂を含む。

#### 【0031】

重要なことは、カチオノン交換材料の量、種々のゾーンにおける流速、供給速度、溶離剤流速および／またはスイッチング時間のスケールアップが可能なことである。スケールアップは2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、1000倍またはそれらの数値の間のあらゆる可能なスケールアップ倍率であってもよい。

#### 【0032】

擬似移動床クロマトグラフィーを用いる精製工程の後、好ましくは塩基の添加によって、より好ましくはNaOH（たとえば、0.2M NaOH）の添加によって、精製溶液のpHをpH7に調整することができる。

#### 【0033】

本発明によれば、中性HMOおよび夾雜物を含む粗製溶液は、微生物発酵、微生物発酵抽出液、生体触媒反応溶液、化学合成溶液、およびその組合せからなる群から選択され

10

20

30

40

50

る溶液を含むかまたはそれからなる。中性HMOの供給源としての発酵は、それが化学合成または生体触媒（すなわち、酵素）合成よりコスト効果が大きいという利点をもつ。よって、微生物発酵抽出液が好ましい。

【0034】

好ましくは、溶液に少なくとも1つの擬似移動床クロマトグラフィー工程を適用する前に、中性ヒトミルクオリゴ糖を含む溶液（好ましくは、微生物発酵溶液）を

i ) 濾過または遠心してバイオマスおよび／または不溶性物質をすべて除去し、好ましくは活性炭、チャコール、セライトで濾過し、および／またはクロスフロー濾過により、不溶性物質および有機夾雜物をすべて除去し、より好ましくはクロスフロー濾過により濾過し、最も好ましくは精密濾過膜を用いるクロスフロー濾過により濾過する；および／または

10

ii ) カチオンおよび／またはアニオン交換クロマトグラフィーを用いる少なくとも1つの精製工程、好ましくは最初に少なくとも1つのカチオン交換クロマトグラフィー工程、次いで少なくとも1つのアニオン交換クロマトグラフィー工程を適用する。

【0035】

さらなる好ましい態様において、溶液に擬似移動床クロマトグラフィーを用いる少なくとも1つの精製工程を適用する前に、または擬似移動床クロマトグラフィーを用いる精製工程の後に、中性HMOを含む溶液を電気透析および／または透析濾過し、好ましくはナノ濾過膜で透析濾過し、より好ましくはサイズ排除限界 20 を有するナノ濾過膜で透析濾過する。最も好ましくは、溶液を 15 mS/cm、好ましくは 10 mS/cm、より好ましくは 5 mS/cm の導電率にまで透析する。

20

【0036】

溶液に擬似移動床クロマトグラフィーを用いる少なくとも1つの精製工程を適用する前に粗製溶液を透析する場合、主な夾雜物は中性HMO画分の由来（すなわち、化学合成、生体触媒反応または発酵）に依存する。一般的な夾雜物は单糖類（たとえば、グルコース、ガラクトース、フコースなど）、二糖類（たとえば、ラクトース）および副産物（たとえば、ラクトロース）である。発酵を中性HMOの供給源として用いた場合、粗製溶液は通常は用いた炭素源（たとえば、グリセロール、スクロースおよび／またはグルコース）および用いた微生物の副産物（たとえば、より高分子量のオリゴ糖）を夾雜物として含む。さらなる夾雜物として、用いたグリコシルトランスフェラーゼ（たとえば、合成する細胞中のグリコシルトランスフェラーゼであって、目的生成物、基質または中間生成物を汚染オリゴ糖に変換するもの）の作用混乱(promiscuity)のため生成したオリゴ糖が存在する可能性もある。それらの夾雜物は、擬似移動床（SMB）クロマトグラフィーを用いる精製工程によって効率的に除去することができる。

30

【0037】

透析後に、好ましくは電気透析および／または透析濾過の後に（場合により、溶液にSMBクロマトグラフィープロセスを適用する前に）HMOを含む溶液を、特に

i ) 50 g / l 、 100 g / l 、好ましくは 200 g / l 、より好ましくは 300 g / l の濃度にまで；および／または

ii ) 真空濃縮を用いて；および／または

iii ) ナノ濾過により；および／または

iv ) 4 ~ 50 、好ましくは 10 ~ 45 、場合により 20 ~ 40 または 30 ~ 35 の温度で

40

濃縮することができる。

【0038】

より好ましくは、ナノ濾過を用いてHMO含有画分を濃縮する。ナノ濾過工程はさらに、汚染塩類を透析除去するために使用できる。この場合、HMO画分をまずナノ濾過によって濃縮し、次いで得られた濃縮HMO画分をその後、水、好ましくは2回蒸留H<sub>2</sub>O（ddH<sub>2</sub>O）または脱イオン水で希釈し、次いでこの希釈HMO画分を再びナノ濾過膜を用いて濃縮することができる。

50

## 【0039】

ナノ濾過による濃縮は、高温への中性HMOの曝露を免れることができるので、特に好み。よって、その濃縮方法はHMOの構造に対する破壊性が熱処理より低い；すなわち、それは濃縮に際して中性HMOに対する熱的損傷を誘発しない。ナノ濾過のさらに他の利点は、それを中性HMOの濃縮と透析の両方（透析濾過）のために使用できることである。言い換えると、本発明方法において濃縮工程と透析工程を連続して実施すれば、ナノ濾過に用いる膜を交換する必要がない。さらに、中性HMOを含有する溶液の塩濃度を有意に低下させることができる。これにより材料および時間が節約され、プロセス全体がより経済的になる。好ましくは、ナノ濾過を電気透析と組み合わせる。この組合せは濃縮および脱塩において卓越した結果を与えることが分かった。

10

## 【0040】

本発明の好ましい態様において、精製溶液を、好ましくは3kDaフィルターによる精製溶液の濾過により、無菌濾過し、および／またはエンドトキシン除去する。

精製溶液を噴霧乾燥すること、特に、20～60%（w/v）、好ましくは30～50%（w/v）、より好ましくは35～45%（w/v）の中性HMO濃度、110～150、好ましくは120～140、より好ましくは125～135の入口温度、および／または60～80、好ましくは65～70の出口温度で噴霧乾燥することができる。

## 【0041】

本発明の方法の好ましい態様において、精製すべき中性HMOは3以上の単糖単位を有する中性HMO、好ましくは中性ヒトミルク三糖、四糖、五糖または六糖である。より好ましくは、中性HMOは、2'-フコシルラクトース、3-フコシルラクトース、2'，3-ジフコシルラクトース、ラクト-N-トリオースII、ラクト-N-テトラオース、ラクト-N-ネオテトラオース、ラクト-N-フコペントオースI、ラクト-N-ネオフコペントオースI、ラクト-N-フコペントオースII、ラクト-N-フコペントオースIII、ラクト-N-フコペントオースV、ラクト-N-ネオフコペントオースV、ラクト-N-ジフコヘキサオースI、ラクト-N-ジフコヘキサオースII、6'-ガラクトシルラクトース、3'-ガラクトシルラクトース、ラクト-N-ヘキサオース、ラクト-N-ネオヘキサオース、パラ-ラクト-N-ヘキサオース、パラ-ラクト-N-ネオヘキサオースおよびジフコシル-ラクト-N-ネオヘキサオースからなる群から選択される。最も好ましくは、中性HMOは2'-フコシルラクトースまたはラクト-N-ネオテトラオースである。

20

## 【0042】

場合により、中性HMOは2'-フコシルラクトースではなくてもよい。

本発明の有利な態様において、本発明の方法は、中性ヒトミルクオリゴ糖および夾雑物を含む粗製溶液が微生物発酵抽出液を含むかまたはそれからなり、その際、微生物発酵抽出液が少なくとも1つの微生物発酵工程、好ましくはそれに続く少なくとも1つの下記の工程で得られることを特徴とする：

a) 微生物発酵後に可溶性物質を不溶性物質から分離するための、溶液、好ましくは粗製溶液の濾過；および／または

40

b) 溶液、好ましくは工程a)で得られた溶液の、イオン交換クロマトグラフィー、好ましくはカチオン交換クロマトグラフィー、より好ましくはカチオン交換クロマトグラフィーに続くアニオン交換クロマトグラフィー；および／または

c) 溶液、好ましくは工程b)で得られた溶液の濃縮、より好ましくは水の蒸発による濃縮、および／またはナノ濾過による濃縮、場合により1回より多い濃縮；および／または

d) 溶液、好ましくは工程c)で得られた溶液の透析、より好ましくは電気透析および／または透析濾過による透析、最も好ましくはナノ濾過膜を用いる透析濾過による透析、場合により1回より多い透析；および／または

e) 溶液、好ましくは工程d)で得られた溶液の、擬似移動床クロマトグラフィーを用

50

いるクロマトグラフィー；および／または

f ) 中性ヒトミルクオリゴ糖を有色夾雑物から分離するための、溶液、好ましくは工程

e ) 得られた溶液の濾過、より好ましくは活性炭による濾過；および／または

g ) 中性ヒトミルクオリゴ糖を含む精製溶液、好ましくは工程 f ) 得られた精製溶液の、噴霧乾燥。

【0043】

最も好ましくはすべての工程 a ) ~ g ) を連続的に実施する。すべての工程 a ) ~ g ) を連続的に実施するのは本発明方法の最も有利な態様であることが見出された。その方法は、コストおよび時間効果が高く、大量の高純度の噴霧乾燥した（すなわち、非晶質）中性HMOを微生物発酵（抽出液）から得ることができる。特に、ナノ濾過を用いるHMO溶液の濃縮工程および脱塩工程は、きわめてコスト効果が高く、望ましくない副産物の形成が阻止される緩和な操作工程である。

10

【0044】

よって、本発明は本発明方法により製造できる中性HMOを提供する。中性HMO（たとえば、2'-フコシルラクトースまたはラクト-N-テトラオース）を、好ましくは噴霧乾燥する。精製した中性HMOは、高純度でありかつ重金属夾雑物および／または有機溶媒を含まないという利点をもつ。

【0045】

本発明による中性HMOは、

i ) 固体顆粒形態；および／または

20

i i ) 示差走査熱量測定により測定して、60~90、好ましくは62~88、より好ましくは64~86のガラス転移温度；および／または

i i i ) レーザー回折により測定して、5~500μm、好ましくは10~300μmの粒径；および／または

i v ) レーザー回折により測定して、10~100μm、好ましくは20~90μm、より好ましくは30~80μm、最も好ましくは40~70μmの平均粒径；および／または

v ) 非晶質状態、好ましくはX線粉末回折で結晶性物質の特徴的なピークをもたない非晶質状態；および／または

v i ) 10%、好ましくは8%、より好ましくは<5%の含水率

30

をもつことができる。

【0046】

中性HMOは、医薬、好ましくは胃腸障害の予防または治療に使用できる。それは、栄養補給、好ましくは医療栄養補給または乳製品栄養補給（たとえば、シリアル製品）にも使用できる。

【0047】

本発明の好ましい態様において、中性ヒトミルクオリゴ糖は3以上の単糖単位を有する中性HMO、好ましくは中性ヒトミルク三糖、四糖、五糖または六糖である。より好ましくは、中性HMOは、2'-フコシルラクトース、3-フコシルラクトース、2',3-ジフコシルラクトース、ラクト-N-トリオースII、ラクト-N-テトラオース、ラクト-N-ネオテトラオース、ラクト-N-フコペントオースI、ラクト-N-ネオフコペントオースI、ラクト-N-フコペントオースII、ラクト-N-フコペントオースII、ラクト-N-フコペントオースV、ラクト-N-ネオフコペントオースV、ラクト-N-ジフコヘキサオースI、ラクト-N-ジフコヘキサオースII、6'-ガラクトシルラクトース、3'-ガラクトシルラクトース、ラクト-N-ヘキサオース、ラクト-N-ネオヘキサオース、パラ-ラクト-N-ヘキサオース、パラ-ラクト-N-ネオヘキサオースおよびジフコシル-ラクト-N-ネオヘキサオースからなる群から選択される。最も好ましくは中性HMOは2'-フコシルラクトースまたはラクト-N-ネオテトラオースである。

40

【0048】

50

場合により、中性HMOは2'-フコシルラクトースではなくてもよい。

さらに、本発明による中性HMOを食品における添加剤として、好ましくはヒトの食品および/またはペットフードにおける添加剤として、より好ましくはヒトのベビーフードにおける添加剤として使用することを提唱する。

【0049】

以下の図面および実施例に関して、本発明による主題をより詳細に説明するものとするが、その主題を本明細書に示す特定の態様に限定するためのものではない。

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図1】図1は、擬似移動床クロマトグラフィーを用いる1つの精製工程を模式的に示す。擬似移動床クロマトグラフィーは、たとえば直列配列1の12のカラムをもつことができ、その配列は4つの異なるゾーンI、II、IIIおよびIVに分割されている。中性HMOである2'-フコシルラクトースおよび夾雑物を含有する粗製溶液は、ゾーンIIとIIIの間で供給材料入口2へ適用される。エクストラクトはゾーンIとゾーンIIの間の出口4から取り出され、これに対しラフィネートはゾーンIIIとゾーンIVの間の出口3で取り出される。出口3のラフィネートは精製されたHMOである2'-フコシルラクトースを含有し、これに対し出口4のエクストラクトは低分子量の夾雑物（たとえば、単糖類および二糖類）を含有する。

【図2】図2は、擬似移動床クロマトグラフィーを用いる2つの連続精製工程を模式的に示す。それぞれの擬似移動床クロマトグラフィーは、たとえば直列配列1、1'の12のカラムをもつことができ、各配列はそれぞれ4つの異なるゾーンIa、IIa、IIIaおよびIVa、またはゾーンIb、IIb、IIIbおよびIVbに分割されている。中性HMOである2'-フコシルラクトースおよび夾雑物を含有する粗製溶液は、第1配列1のゾーンIIIaとIIIaの間で供給材料入口2へ適用される。エクストラクトはゾーンIaとゾーンIIaの間の出口4で取り出され、これに対しラフィネートはゾーンIIaとゾーンIVaの間の出口3で第1直列配列1を出て、第2直列配列1'へゾーンIIbとIIIbの間で適用される。第2直列配列1'において、エクストラクトは出口6で取り出され、これに対しラフィネートはゾーンIIbとゾーンIVbの間の出口5で取り出される。出口5のラフィネートは高度に精製された2'-フコシルラクトースを含有し、これに対し出口6のエクストラクトは高分子量の夾雑物（たとえば、より高級のオリゴ糖）を含有する。

【図3】図3は、本発明による好ましい精製スキームを模式的に示す。最初に、中性HMOである2'-フコシルラクトースおよび夾雑物を含有する溶液7が、電気透析工程8に、0.5mS/cmの導電率が得られるまで適用される。その溶液は、溶液がおよそ40% (w/v) の2'-フコシルラクトース濃度に達するまで濃縮される。その後、その溶液は擬似移動床クロマトグラフィーを用いる少なくとも1つの精製工程9に適用される。擬似移動床クロマトグラフィーの後、高純度の2'-フコシルラクトースを含む精製溶液が得られる。その精製溶液に、無菌濾過11が（好ましくは、エンドトキシン除去も）施される。無菌濾過11の前に、場合により追加の電気透析工程10を後続の濃縮と共に実施してもよい。無菌濾過11の後に、2'-フコシルラクトースを含有する精製溶液に噴霧乾燥12を施すと、純粋な噴霧乾燥2'-フコシルラクトース13が固体顆粒形態で得られる。

【図4】図4は、本発明により噴霧乾燥した2'-フコシルラクトースの2つの試料（試料#1および試料#2）のX線粉末回折分析の結果を示す。得られた2つの回折図は、試料#1および試料#2の両方が完全に非晶質状態である（結晶性物質の特徴的ピークがない）ことを明らかにする。

【図5】図5は、本発明により噴霧乾燥した2'-フコシルラクトース（試料#1および試料#2）のレーザー回折による粒度分布を示す。試料#1についてはおよそ68μmの平均粒径が測定された。試料#2は約44μmの平均粒径をもっていた。両方の数値とも噴霧乾燥製品について高いとみなされる。

10

20

30

40

50

【図6】図6は、中性ヒトミルク四糖ラクト-N-ネオテトラオース17の合成を示す。この合成は二糖ラクトース14から開始し、それが-1,3-N-アセチル-グルコサミントラヌスフェラーゼ15により三糖ラクト-N-トリオース16に変換される。この三糖ラクト-N-トリオース16は、その後、酵素1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ17により四糖ラクト-N-ネオテトラオース18に変換される。in vivoで、あるパーセントのラクト-N-ネオテトラオース18がさらに、酵素-1,3-N-アセチル-グルコサミントラヌスフェラーゼ15および1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ17によって、より大きなオリゴ糖19、20、21に変換される。本発明方法の目的がラクト-N-ネオテトラオース17の精製であれば、より大きなオリゴヌクレオチド、ならびにより小さなオリゴヌクレオチド(抽出物(educts))であるラクトース14およびラクト-N-トリオース16は、ラクト-N-ネオテトラオース17を含有する粗製溶液中に夾雑物22として存在する可能性がある。本発明方法は、それらの夾雑物22を効率的に除去できる。

【図7】図7は、ナノ濾過による2'-フコシルラクトース含有溶液の濃縮について、2種類の異なるナノ濾過膜の比較を示す(VCF:volumetric concentration factor(体積濃縮係数)、ラックス:水がナノ濾過膜を透過する速度を表す)。Alfa Lavalナノ濾過膜タイプNF99(NF)およびAlfa Lavalナノ濾過膜タイプNF99HFをナノ濾過膜として用いた。VCF 6で、NF99HFナノ濾過膜はより高いラックス、すなわちより速やかな溶液濃縮が可能であることが分かる。

【図8】図8は、実施例6のSMBクロマトグラフィーの供給材料(図8A)およびラフィネート(図8B)のHPLC分析を示す(サッカロースを内部標準として用いた;図8Aを参照)。分析用カラムとして、ReproSil Carbohydrateカラム(アミノ官能化シリカカラム;5μm;250×4.6mm;Dr.Maisch GmbH;アンマーブーフ)を1.4ml/分の流速で用いた。溶離剤として、アセトニトリルと水の混合物(68体積%:32体積%)を用いた。溶離は均一濃度であった。注入体積は20μlであった。オープン温度は35であった。SMBクロマトグラフィーには、H<sup>+</sup>-形で存在する強力チオノ交換樹脂を用いた。

【図9】図9は、実施例6のSMBクロマトグラフィーのエクストラクトのHPLC分析を示す。分析用カラムとして、ReproSil Carbohydrateカラム(アミノ官能化シリカカラム;5μm;250×4.6mm;Dr.Maisch GmbH;アンマーブーフ)を1.4ml/分の流速で用いた。溶離剤として、アセトニトリルと水の混合物(68体積%:32体積%)を用いた。溶離は均一濃度であった。注入体積は20μlであった。オープン温度は35であった。SMBクロマトグラフィーには、H<sup>+</sup>-形で存在する強力チオノ交換樹脂を用いた。

【図10】図10は、実施例6の2回目のSMBクロマトグラフィー(=本発明によるさらなるSMBクロマトグラフィー)のエクストラクトのHPLC分析を示す。分析用カラムとして、ReproSil Carbohydrateカラム(アミノ官能化シリカカラム;5μm;250×4.6mm;Dr.Maisch GmbH;アンマーブーフ)を1.4ml/分の流速で用いた。溶離剤として、アセトニトリルと水の混合物(68体積%:32体積%)を用いた。溶離は均一濃度であった。注入体積は20μlであった。オープン温度は35であった。SMBクロマトグラフィーには、H<sup>+</sup>-形で存在する強力チオノ交換樹脂を用いた。

【図11】図11は、実施例7の供給材料(図11A)およびSMBクロマトグラフィーのラフィネート(図11B)のHPLC分析を示す。分析用カラムとして、ReproSil Carbohydrateカラム(アミノ官能化シリカカラム;5μm;250×4.6mm;Dr.Maisch GmbH;アンマーブーフ)を1.4ml/分の流速で用いた。溶離剤として、アセトニトリルと水の混合物(68体積%:32体積%)を用いた。溶離は均一濃度であった。注入体積は20μlであった。オープン温度は35であった。このSMBクロマトグラフィーには、Ca<sup>2+</sup>-形で存在する強力チオノ交換樹脂を用いた。

【図12】図12は、実施例7のSMBクロマトグラフィーのエクストラクトのHPLC分析を示す。分析用カラムとして、ReproSil Carbohydrateカラム(アミノ官能化シリカカラム；5 μm；250×4.6mm；Dr. Maisch GmbH；アンマーブーフ)を1.4ml/分の流速で用いた。溶離剤として、アセトニトリルと水の混合物(68体積%：32体積%)を用いた。溶離は均一濃度であった。注入体積は20 μlであった。オーブン温度は35度であった。このSMBクロマトグラフィーには、Ca<sup>2+</sup>-形で存在する強力チオノン交換樹脂を用いた。

【発明を実施するための形態】

【実施例】

【0051】

実施例1：擬似移動床クロマトグラフィー(SMBクロマトグラフィー)を用いる2'-フコシルラクトースの精製

濃度250g/Lの2'-フコシルラクトースを含有する透明な、粒子を含まない溶液を、0.5mS/cmになるまで、PC-Cell E200膜積層体を備えたPC-Cell BED 1-3電気透析装置(PC-Cell, ドイツ、ホイスヴァイラー)を用いて電気透析した。その積層体はサイズ排除限界60Daをもつ下記の膜から構成されていた：カチオノン交換膜(cation exchange membrane)CEM：PC SK、およびアニオノン交換膜(anion exchange membrane)AEM：Pc Acid 60。

【0052】

SMB精製のために、真空濃縮装置を用いて40度で2'-フコシルラクトース溶液を300g/Lにまで濃縮した。SMBクロマトグラフィーには、4ゾーンに配列された12のカラム(Prosep(登録商標)カラム；寸法：40mm×740mm(Lattek, ドイツ、エッペルハイム))を備えた閉ループSMBシステムを用いた。各カラムには760gのPurolite(登録商標)PCR833H+(Purolite, ドイツ、ラーティンゲン)強力チオノン性イオン交換樹脂が含まれていた。

【0053】

このシステムを25度において下記の設定フローパラメーターで操作した：ゾーンIの流速を30.00ml/分に設定し、ゾーンIIの流速を21.00ml/分に設定し、ゾーンIIIの流速を21.48ml/分に設定し、ゾーンIVの流速を18.44ml/分に設定し、供給を3.00ml/分に設定し、溶離剤流速を11.56ml/分に設定し、スイッチング時間を17.92分に設定した。溶離剤として、10%(v/v)の食品用エタノールを含む水を用いた。

【0054】

主な夾雑物、たとえばラクトース、単糖類、たとえばフコース、グルコース、ガラクトースおよびグリセロールは、エクストラクト中へ分画された。2'-フコシルラクトースおよびより大きなオリゴ糖夾雑物(たとえば、ジフコシルラクトース)は、ラフィネート中へ分画された。

【0055】

2'-フコシルラクトースはSMB精製工程でわずかに希釈されたラフィネート中の2'-フコシルラクトースの濃度は200g/lと測定された。0.2N NaOHを用いてラフィネートのpHをpH7に調整した。上記のセッティングでこのSMBシステムは少なくとも3か月間は連続操作できた。

【0056】

次いで、得られた溶液に、0.5mS/cm未満の導電率が得られるまで再び電気透析を施し、濃縮して40%(w/v)の2'-フコシルラクトース溶液を得た。

溶液を3kDaフィルター(Pall Microza限外濾過中空纖維モジュールSEP-2013, Pall Corporation, ドライアイヒ)に通すことにより、この溶液に次いで無菌濾過およびエンドトキシン除去を施した。

【0057】

このプロトコルを用いて、純度90.4%の2'-フコシルラクトースを得ることがで

10

20

30

40

50

きた。主な夾雑物は、3' - フコシルラクトース(2.6%)、ジフコシルラクトース(1.5%)およびラクトース(1.4%)であった。精製の収率はおよそ80%であった。

#### 【0058】

実施例2：マルチコンポーネントSMBクロマトグラフィー分離を用いる2' - フコシルラクトースの精製

濃度250g/Lの2' - フコシルラクトースを含有する透明な、粒子を含まない溶液を、0.5mS/cmになるまで、PC-Cel1 E200膜積層体を備えたPC-Cel1 BED 1-3電気透析装置(PC-Cel1, ドイツ、ホイスヴァイラー)を用いて電気透析した。その積層体はサイズ排除限界60Daをもつ下記の膜から構成されていた：カチオン交換膜CEM：Pc SK、およびアニオン交換膜AEM：Pc Acid 60。

10

#### 【0059】

SMB精製のために、真空濃縮装置を用いて40で2' - フコシルラクトース溶液を300g/Lにまで濃縮した。SMBクロマトグラフィーには、2×4ゾーンに配列された24のカラム(Prosep(登録商標)カラム；寸法：40mm×740mm(Latек, ドイツ、エッペルハイム))を備えた閉ループマルチコンポーネントSMBシステムを用いた。各カラムには760gのPurolite(登録商標)PCR833H+(Purolite, ドイツ、ラーティンゲン)強力チオニ性イオン交換樹脂が収容されていた。

20

#### 【0060】

このシステムを25において下記の設定フローパラメーターで操作した：ゾーンIaの流速を30.00ml/分に設定し、ゾーンIIaの流速を21.00ml/分に設定し、ゾーンIIIaの流速を21.48ml/分に設定し、ゾーンIVaの流速を18.44ml/分に設定し、供給を3.00ml/分に設定し、溶離剤流速を11.56ml/分に設定し、スイッチング時間を17.92分に設定した。

30

#### 【0061】

1回目の分離のラフィネートを3.04ml/分の流速で第2分離工程へ送った。ゾーンIbの流速を30ml/分に維持し、ゾーンIIbの流速を19.61ml/分に設定し、ゾーンIIIbの流速を21.63ml/分に設定し、ゾーンIVbの流速を18.46ml/分に設定し、溶離剤流速を同様に11.56ml/分に設定し、ゾーンIbからIVbへのスイッチング時間は10.46分であった。

#### 【0062】

溶離剤として、10%(v/v)の食品用エタノールを含む水を用いた。

マルチコンポーネント分離において、夾雑物、たとえばラクトース、単糖類、たとえばフコース、グルコース、ガラクトースおよびグリセロールは第1分離工程のエクストラクト中にみられ、より大きなオリゴ糖夾雑物(たとえば、ジフコシルラクトース)は第2分離工程のラフィネート中に分画された。

#### 【0063】

2' - フコシルラクトースは第1分離工程のラフィネート中に分画され、よって第2分離工程のエクストラクトは低分子量および高分子量の夾雑物を含まなかった。2' - フコシルラクトースはこのSMB精製工程でわずかに希釈されたにすぎない - 第2精製工程のエクストラクト中の2' - フコシルラクトースの濃度は200g/lと測定された。

40

#### 【0064】

0.2N NaOHを用いて第1分離工程後のラフィネートのpHをpH7に調整した。

このプロトコルを用いて、純度93.0%の2' - フコシルラクトースを得ることができた。主な夾雑物は、3' - フコシルラクトース(1.1%)、ジフコシルラクトース(0.9%)およびラクトース(1.0%)であった。

#### 【0065】

50

## 実施例3：噴霧乾燥による固体状2' - フコシルラクトースの取得

SMBクロマトグラフィーにより得られた2' - フコシルラクトース画分に、0.5mS/cm未満の導電率が得られるまで再び電気透析処理を施した。これらの画分を次いで真空下で濃縮して、40% (w/v) の2' - フコシルラクトースを含有する2' - フコシルラクトース画分を得た。その後、溶液を3kDaフィルター (Pall Microza 限外濾過中空纖維モジュールSEP-2013, Pall Corporation, ドイツ、ドライアイヒ) に通すことにより、これらの溶液に無菌濾過およびエンドトキシン除去を施した。

## 【0066】

こうして得られた無菌2' - フコシルラクトース溶液を、次いでNUBILOSA LTC-GMP噴霧乾燥器 (NUBILOSA, ドイツ、コンスタンツ) を用いて噴霧乾燥した。2' - フコシルラクトースの噴霧乾燥のために、40% (w/v) 溶液を加圧下で入口温度130に設定した噴霧乾燥器ノズルに通した。66 ~ 67の出口温度を維持するように流速を調整した。

## 【0067】

これらの設定を用いて、含水率5%未満の噴霧乾燥粉末を得ることができた。含水率をカールフィッシャー滴定法により測定した。

## 実施例4：噴霧乾燥した2' - フコシルラクトースの特性分析

## 1. 示差走査熱量測定 (DSC)

Mettler Toledo 821e (Mettler Toledo, ドイツ、ギーセン) を用いて、噴霧乾燥した2' - フコシルラクトースの2つの試料 (試料#1および試料#2) の熱事象を測定した。

## 【0068】

およそ25mgの噴霧乾燥試料を、クリンプ加工Al製るつぼ (Mettler Toledo, ドイツ、ギーセン) 内で分析した。試料を10K/分で0にまで冷却し、10K/分の走査速度で100にまで再加熱した。2回目の加熱サイクルで試料を0にまで冷却した後、試料を150に加熱した。加熱走査におけるベースラインの吸熱シフトの中間点をTgとして採用した。発熱および吸熱のピークを、この事象のピーク温度および正規化したエネルギーにより報告する。試料のDSC分析の結果を表1にまとめた。

## 【0069】

## 【表1】

試料	1回目の加熱走査					2回目の加熱走査			
	Tg	吸熱		発熱		Tg1	Tg2	発熱	
		°C	°C	J/g	°C	J/g	°C	°C	J/g
#1	63.9	87.9	-0.5	82.8	0.7	67.4	122.6	n.d.	n.d.
#2	87.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	84.6	n.d.	125.9	1.1

n.d.: 検出しなかった

表1

## 【0070】

試料#1のDSC分析により、2回目の加熱走査で67.4に主ガラス転移 (Tg) がみられた。2回目の加熱走査において122.6にも小さな第2のTgが検出された。1回目の加熱走査においては主ガラス転移が検出され、続いてそのTgより高い温度で発熱および吸熱事象が検出された。これらの事象は試料における緩和効果 (relaxation effect) に起因する。

## 【0071】

試料#2のDSC分析は、2回目の加熱走査において実質的なより高い84.6の主

10

20

30

40

50

ガラス転移 (  $T_g$  ) を示し、これは 1 回目の加熱走査中にも検出された。これは試料 # 1 と比較して試料 # 2 の残留含水率がより低いことを指摘している可能性がある。ガラス転移は 1 回目の加熱走査の最終温度付近で検出されたので、潜在的な弛緩現象は検出できなかった。この試料において、第 2 ガラス転移は検出できなかったが、2 回目の加熱走査中に 125.9 に小さな発熱ピークがみられた。

【 0072 】

2. X 線粉末回折

広角 X 線粉末回折 ( XRD ) を用いて試料 # 1 および # 2 の形態を調べた。銅アノード ( 45 kV, 40 mA, 波長  $0.154 \text{ nm}$  における  $K_{\alpha}$  発光 ) および PANalytical Empyrean ( Panalytical, オランダ、アルメロ ) を用いた。およそ 100 mg の噴霧乾燥試料を、反射モードで、角度範囲  $5^{\circ}$  ~  $45^{\circ}$  、ステップサイズ  $0.04^{\circ}$  、およびステップ当たりのカウンティング時間 100 秒で分析した。

【 0073 】

試料 # 1 および # 2 の XRD 分析は、両試料の完全非晶質状態を明らかにし、結晶性物質の特徴的ピークを示さなかった ( 両回折図のオーバーレイについては図 4 を参照 )。

3. レーザー回折

> 500 nm の粒子を検出するための 605 nm レーザーダイオードおよび < 500 nm の粒子を検出するための 405 nm 青色発光ダイオード ( LED ) を備えた、Partica LA-950 レーザー回折粒度分布分析計 ( 堀場, 日本、京都 ) を用いて、レーザー回折測定を実施した。イソオクタン ( 1.391 の屈折率 ) を分散媒として用いた。試料の屈折率は未知であったので、ショ糖 ( 二糖 ) 粒子の屈折率 ( 1.530 ) を用いた。最大 5 分間の超音波処理によりイソオクタン中に試料を分散させた。測定前に、システムをイソオクタンでブランкиングした。各試料の分散液を 3 回測定し、平均値および標準偏差を報告する。

【 0074 】

平均粒径 ( 体積粒度の重み付き平均 ) およびモード粒径 ( mode particle size ) ( 分布のピーク ) を記録した。体積粒度分布 ( q % ) のほかに、下記の結果を記録した :

$d(v, 10)$  : 10 体積 % の累積ふるい下分布 ( cumulative undersize distribution ) に対応する粒径

$d(v, 50)$  : 50 体積 % の累積ふるい下分布に対応する粒径

$d(v, 90)$  : 90 体積 % の累積ふるい下分布に対応する粒径

試料 # 1 および # 2 の粒度分布を図 5 に示す。最高強度の粒径を表わすモード径は両試料について同等である。全体として、それぞれ  $67.85 \mu\text{m}$  ( 試料 # 1 ) および  $43.65 \mu\text{m}$  ( 試料 # 2 ) の平均粒度を噴霧乾燥粒子について異例に高いとみなす。より高い粒径で検出された画分はおそらく凝集粉末粒子により生じたものであろう。

【 0075 】

表 2 に試料 # 1 および # 2 の粒子サイズ特性をまとめた。

【 0076 】

【表2】

粒径	試料 #1	試料 #2
平均 [μm]	67.84±38.12	43.65±0.57
モード [μm]	12.60±0.07	13.92±0.01
D10 [μm]	10.39±0.17	10.65±0.01
D50 [μm]	25.67±4.41	19.68±0.03
D90 [μm]	68.13±26.30	52.37±0.76

表2

## 【0077】

実施例5：2' - フコシルラクトースを含む上清のナノ濾過による体積低減および脱塩  
2' - フコシルラクトースを含む培養上清の濃縮および脱塩のために、NF99 (Alfa Laval NF99) または NF99HF (Alfa Laval NF99HF) ナノ濾過膜のいずれかを備えた、Alfa Laval M-20 膜濾過モジュールを用いた。用いた2' - フコシルラクトース含有培養上清 (25g / 1の2' - フコシルラクトースを含有) は、発酵微生物バイオマスからクロスフロー濾過を用いて分離された。クロスフロー濾過膜の分子カットオフは150kDaであった (Strassburg Filter Micro Cross Module (登録商標) FS10L FC-FUS1582)。

## 【0078】

無細胞濾液を次いでカチオン性イオン交換体 (Lewatit S2568, プロトン形 (Lanxess)) およびアニオン性イオン交換体 (Lewatit S6368, カーボネット形 (Lanxess)) で処理した後、ナノ濾過した。各イオン交換工程の後、それぞれ水酸化ナトリウム溶液または塩酸を用いて溶液を中和した。膜モジュールの入口圧力は42バールであり、出口圧力は40バールであり、膜モジュール内の供給材料の流速は8リットル / 分であった。透過液をプロセスから除去し、これに対し残留物を溜めおよび膜モジュールへ戻した。膜積層体に接続した溜めの体積は6リットルであった。2' - フコシルラクトース含有溶液の濃縮に際して、8倍濃縮溶液が得られるまで、溜めに連続的に2' - フコシルラクトース培養上清溶液を満たした。

## 【0079】

図7は、用いた2種類の膜について得られたフラックス (L / m<sup>2</sup> / 時) を体積濃度係数 (VCF) に対してプロットしたものを示す。2' - フコシルラクトースがおおよそ200g / 1の2' - フコシルラクトースに8倍濃縮されると、透過液が膜モジュールから得られるのと同じ速度で脱イオン水を添加することにより、濃縮溶液を脱塩のために透析濾過した。HF99HF膜を用いて、透析濾過工程により2' - フコシルラクトース濃縮液の導電率を25mSから7mS未満にまで低下させることができた。

## 【0080】

このナノ濾過法を用いることにより、緩和な条件下で(熱曝露を避けて)2' - フコシルラクトース溶液を2' - フコシルラクトース 200g / 1の2' - フコシルラクトース濃度に8倍濃縮することができ、透析濾過工程で大画分の塩含有物を除去することができた。この2' - フコシルラクトース濃縮物に、塩含量をさらに低減するために電気透析を施した。

## 【0081】

実施例6：2つの擬似移動床クロマトグラフィー工程およびH<sup>+</sup>形イオン交換樹脂を用いるラクト - N - テトラオースの精製

細菌発酵から得られた透明な、粒子を含まないラクト- N - テトラオース溶液 ( 3 0 g / 1 ) を、 P C - C e 1 1 電気透析装置を用いて 0 . 5 m S / c m の導電率にまで電気透析した ( 前記を参照 ) 。 S M B クロマトグラフィーのために、ラクト- N - テトラオース溶液を真空中に 4 0 ℃ で 5 0 g / 1 にまで濃縮した。あるいは、ラクト- N - テトラオース含有溶液をナノ濾過膜 ( たとえば、ナノ濾過膜 H F 9 9 H F , A l f a L a v a l から ) により脱塩および濃縮することができる。

#### 【 0 0 8 2 】

S M B クロマトグラフィーのために、 4 ゾーンに配列された 1 2 カラム ( P r o s e p ( 登録商標 ) ガラスカラム ; 寸法 : 4 0 m m × 7 4 0 m m ( L a t e k , ドイツ、エッペルハイム ) ) を備えた閉ループ S M B システムを用いた。各ガラスカラムには 7 6 0 g の P u r o l i t e ( 登録商標 ) P C R 8 3 3 H + 強力チオノン性イオン交換樹脂が収容されていた。強力チオノン交換樹脂は H + - 形で存在していた。

#### 【 0 0 8 3 】

このシステムを 2 5 ℃ において下記のパラメーターセッティングで操作した : ゾーン I の流速を 3 0 . 0 0 m l / 分に設定し、ゾーン I I の流速を 1 9 . 0 7 m l / 分に設定し、ゾーン I V の流速を 1 8 . 4 4 m l / 分に設定した。供給を 1 m l / 分に維持し、溶離剤流速を 1 1 . 5 6 m l / 分に設定し、スイッチング時間を 1 7 . 9 2 分に設定した。溶離剤として、 1 0 % ( v / v ) の食品用エタノールを含む水を用いた。

#### 【 0 0 8 4 】

これらのパラメーターダー下で、ラクト- N - テトラオースおよびより大きな中性オリゴ糖はラフィネート中へ分画された。ラクト- N - テトラオースの純度は、 S M B 供給材料における 3 3 . 4 % の代わりに 8 6 . 3 % であった ( S M B 供給材料の H P L C 分析については図 7 A 、 S M B ラフィネートの H P L C 分析については図 7 B を参照 ) 。夾雑物、たとえばラクトース、単糖類およびグリセロールは S M B エクストラクト画分中にみられた ( S M B エクストラクト画分の H P L C 分析については図 8 を参照 ) 。ラクト- N - テトラオース含有ラフィネートを、 0 . 2 N N a O H 溶液を用いて中性 p H に調整した。

#### 【 0 0 8 5 】

得られたラクト- N - テトラオース含有エクストラクトの p H を、 0 . 2 N N a O H を用いて p H 7 に調整した。次いで、得られた溶液に 0 . 5 m S 未満の導電率が再び得られるまで電気透析を施した。この溶液を次いで真空中でおよそ 5 0 g / 1 のラクト- N - テトラオースにまで濃縮し、次いで 3 k D a クロスフローフィルター ( P a l l M i c r o z a 限外濾過中空纖維モジュール S E P - 2 0 1 3 , P a l l C o r p o r a t i o n , ドライアイヒ ) に通すことにより無菌濾過した。

#### 【 0 0 8 6 】

より大きなオリゴ糖夾雑物をラクト- N - テトラオースから分離除去するために、 2 回目の S M B クロマトグラフィー分離を実施した。同じ S M B システムを用い、パラメーターを下記のように変更した : ゾーン I の流速 3 0 m l / 分、ゾーン I I の流速 1 9 . 2 7 m l / 分、ゾーン I V の流速 1 7 . 3 0 m l / 分。供給を 2 . 0 8 m l / 分に設定し、溶離剤流速を 1 2 . 7 0 m l / 分に設定した。ラフィネート流速は 4 . 0 4 m l / 分であり、エクストラクト流速は 1 0 . 7 3 m l / 分であった。 S M B 分離のスイッチング時間を 1 0 . 4 6 分に設定した。溶離剤として、この場合もに水 / エタノール混合物 9 : 1 ( v / v ) を用いた。 S M B クロマトグラフィーによる 2 回目のラクト- N - テトラオース分離のエクストラクトの H P L C 分析を図 1 0 に示す。

#### 【 0 0 8 7 】

これらの条件下で、ラクト- N - テトラオースはエクストラクト中へ分画され、総量の 5 ~ 1 0 % のより大きな中性オリゴ糖がラフィネート中にみられた。このプロトコル ( 2 回目の S M B 工程後のアミノ官能化シリカカラム ) を用いて、純度 9 3 . 1 % のラクト- N - テトラオースを得ることができた。

#### 【 0 0 8 8 】

実施例 7 : C a 2 + 形イオン交換樹脂による擬似移動床クロマトグラフィーを用いるラ

10

20

30

40

50

### クト - N - テトラオースの精製

細菌発酵から得られた透明な、粒子を含まないラクト - N - テトラオース溶液 (30 g / l) を、P C - C e l l 電気透析装置を用いて 0.5 mS / cm の導電率にまで電気透析した (前記を参照)。

#### 【0089】

対イオンとしてカルシウムを含む S M B クロマトグラフィーのために、ラクト - N - テトラオース溶液を真空下に 40 度で 50 g / l にまで濃縮した。S M B クロマトグラフィーには、4 ゾーンに配列された 12 のカラム (P r o s e p (登録商標) ガラスカラム ; 尺寸 : 40 mm × 740 mm (L a t e k , ドイツ、エッペルハイム) ) を備えた閉ループ S M B システムを用いた。

10

#### 【0090】

各カラムには 760 g の P u r o l i t e (登録商標) P C R 8 3 3 H + 強力チオニ性イオン交換樹脂が収容されていた。カチオニ性イオン交換樹脂を 50 リットルの 200 mM C a C l 2 で洗浄して、H + イオンを C a 2 + イオンにより交換した。よって、この強力チオニ性イオン交換樹脂は C a 2 + - 形で存在していた。

#### 【0091】

このシステムを 25 において下記のパラメーターセッティングで操作した : ゾーン I の流速を 30.00 ml / 分に設定し、ゾーン II の流速を 20.07 ml / 分に設定し、ゾーン IV の流速を 17.04 ml / 分に設定した。供給を 2.5 ml / 分に維持し、溶離剤流速を 11.56 ml / 分に設定し、スイッチング時間を 17.92 分にした。溶離剤として、10% (v / v) の食品用エタノールを含む水を用いた。

20

#### 【0092】

##### 実施例 8 : 噴霧乾燥による固体状ラクト - N - テトラオースの取得

ラクト - N - テトラオースを含有する画分を真空下で濃縮して、ラクト - N - テトラオース濃度 25% (w / v) を得た。この溶液を次いで無菌濾過およびエンドトキシン除去のために 3 k D a フィルター (P a l l M i c r o z a 限外濾過中空纖維モジュール S E P - 1 0 1 3 , P a l l C o r p o r a t i o n , ドイツ、ドライアイヒ) に通した。

#### 【0093】

こうして得られた無菌ラクト - N - テトラオース溶液を、次いでミニ噴霧乾燥器 B - 290 (B u e c h i L a b o r t e c h n i k G m b H , ドイツ、エッセン) を用いて噴霧乾燥した。ラクト - N - テトラオースの噴霧乾燥のために、溶液を加圧下で出口温度 120 ~ 130 の噴霧乾燥器ノズルに通し、排出温度 66 ~ 67 を維持するよう流速を調整した。これらのセッティングを用いて、含水率 7 ~ 9 % および収率 72 % の噴霧乾燥ラクト - N - テトラオースを含む噴霧乾燥粉末を得ることができた。含水率をカールフィッシャー滴定法により測定した。

30

本発明には、以下の態様もある。

#### 態様 1

中性ヒトミルクオリゴ糖および夾雜物を含む粗製溶液から中性ヒトミルクオリゴ糖を連続クロマトグラフィーで精製する方法であって、

40

中性ヒトミルクオリゴ糖および夾雜物を含む粗製溶液が、微生物発酵抽出液、生体触媒反応溶液、化学合成溶液、およびその組合せからなる群から選択される溶液を含むかまたはそれからなり、その際、溶液中の中性ヒトミルクオリゴ糖の純度は < 80 % であり、

粗製溶液に、擬似移動床クロマトグラフィーを用いる少なくとも 1 つの精製工程を適用し、その際、純度 80 % の中性ヒトミルクオリゴ糖を含む精製溶液が得られることを特徴とする方法。

#### 態様 2

粗製溶液中の中性ヒトミルクオリゴ糖の純度が 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 % もしくは 5 % であり、および / または精製溶液が純度 85 %、好ましくは 90 % の中性ヒトミルクオリゴ糖を含むことを特徴とする、態

50

様 1 に記載の方法。

態 様 3

少なくとも 1 つの擬似移動床クロマトグラフィーが、

i ) 少なくとも 4 つのカラム、好ましくは少なくとも 8 つのカラム、より好ましくは少なくとも 12 のカラムを有し、その際、少なくとも 1 つのカラムが弱または強カチオン交換樹脂、好ましくは  $H^+$  - 形または  $Ca^{2+}$  - 形のカチオン交換樹脂を含む；および / または

ii ) 流速の異なる 4 つのゾーン I 、 II 、 III 、 IV を有する；

iii ) 水、好ましくはエタノールおよび水、より好ましくは 5 ~ 15 体積 % のエタノールおよび 85 ~ 95 体積 % の水、最も好ましくは 9 ~ 11 体積 % のエタノールおよび 89 ~ 91 体積 % の水を含むかまたはそれからなる溶離剤を有し、その際、溶離剤は場合によりさらに硫酸、好ましくは 10 mM またはそれより少ない硫酸を含む；および / または

iv ) 15 ~ 60 、好ましくは 20 ~ 55 、より好ましくは 25 ~ 50 の操作温度を有する；

ことを特徴とする、態様 1 または 2 に記載の方法。

態 様 4

精製溶液に、擬似移動床クロマトグラフィーを用いる少なくとも 1 つのさらなる精製工程を適用し、その際、純度 92 % の中性ヒトミルクオリゴ糖を含む精製溶液が得られることを特徴とする、態様 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

態 様 5

さらなる擬似移動床クロマトグラフィーが、

i ) 少なくとも 4 つのカラム、好ましくは少なくとも 8 つのカラム、より好ましくは少なくとも 12 のカラムを有し、その際、少なくとも 1 つのカラムが弱または強カチオン交換樹脂、好ましくは  $H^+$  - 形または  $Ca^{2+}$  - 形のカチオン交換樹脂を含む；および / または

ii ) 流速の異なる 4 つのゾーン I 、 II 、 III 、 IV を有する；

iii ) 水、好ましくはエタノールおよび水、より好ましくは 5 ~ 15 体積 % のエタノールおよび 85 ~ 95 体積 % の水、最も好ましくは 9 ~ 11 体積 % のエタノールおよび 89 ~ 91 体積 % の水を含むかまたはそれからなる溶離剤を有し、その際、溶離剤は場合によりさらに硫酸、好ましくは 10 mM またはそれより少ない硫酸を含む；および / または

iv ) 15 ~ 60 、好ましくは 20 ~ 55 、より好ましくは 25 ~ 50 の操作温度を有する；

ことを特徴とする、態様 4 に記載の方法。

態 様 6

中性ヒトミルクオリゴ糖および夾雜物を含む粗製溶液が微生物発酵抽出液を含むかまたはそれからなり、その際、微生物発酵抽出液が少なくとも 1 つの微生物発酵工程、好ましくはそれに続く少なくとも 1 つの下記の工程で得られ：

a ) 微生物発酵後に可溶性物質を不溶性物質から分離するための、溶液、好ましくは粗製溶液の濾過；

b ) 溶液、好ましくは工程 a ) で得られた溶液の、イオン交換クロマトグラフィー、好ましくはカチオン交換クロマトグラフィー、より好ましくはカチオン交換クロマトグラフィーに続くアニオン交換クロマトグラフィー；

c ) 溶液、好ましくは工程 b ) で得られた溶液の濃縮、より好ましくは水の蒸発による濃縮、および / またはナノ濾過による濃縮、場合により 1 回より多い濃縮；

d ) 溶液、好ましくは工程 c ) で得られた溶液の透析、より好ましくは電気透析および / または透析濾過による透析、最も好ましくはナノ濾過膜を用いる透析濾過による透析、場合により 1 回より多い透析；

e ) 溶液、好ましくは工程 d ) で得られた溶液の、擬似移動床クロマトグラフィーを用

10

20

30

40

50

いるクロマトグラフィー；

f ) 中性ヒトミルクオリゴ糖を有色夾雑物から分離するための、溶液、好ましくは工程 e ) で得られた溶液の濾過、より好ましくは活性炭による濾過；ならびに

g ) 中性ヒトミルクオリゴ糖を含む精製溶液、好ましくは工程 f ) で得られた精製溶液の、噴霧乾燥；

その際、最も好ましくはすべての工程 a ) ~ g ) を連続的に実施することを特徴とする、態様 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

#### 態様 7

溶液に少なくとも 1 つの擬似移動床クロマトグラフィー工程を適用する前に、中性ヒトミルクオリゴ糖を含む溶液を

i ) 濾過して不溶性物質をすべて除去し、好ましくは活性炭、チャコールおよび／またはセライトで濾過して不溶性物質および有機夾雑物をすべて除去し、より好ましくはクロスフロー濾過により濾過し、最も好ましくは精密濾過膜を用いるクロスフロー濾過により濾過する；および／または

i i ) カチオンおよび／またはアニオン交換クロマトグラフィーを用いる少なくとも 1 つの精製工程、好ましくは最初に少なくとも 1 つのカチオン交換クロマトグラフィー工程、次いで少なくとも 1 つのアニオン交換クロマトグラフィー工程を適用する；ことを特徴とする、態様 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

#### 態様 8

溶液に擬似移動床クロマトグラフィーを用いる少なくとも 1 つの精製工程を適用する前に、または擬似移動床クロマトグラフィーを用いる精製工程の後に、中性ヒトミルクオリゴ糖を含む溶液を電気透析および／または透析濾過し、好ましくはナノ濾過膜で透析濾過し、より好ましくはサイズ排除限界 20 を有するナノ濾過膜で透析濾過し、その際、最も好ましくは溶液を 15 mS/cm、好ましくは 10 mS/cm、より好ましくは 5 mS/cm の導電率にまで透析することを特徴とする、態様 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

#### 態様 9

透析後に、中性ヒトミルクオリゴ糖を含む溶液を、

i ) 100 g/L、好ましくは 200 g/L、より好ましくは 300 g/L の濃度にまで；および／または

i i ) 真空濃縮機を用いて；および／または

i i i ) ナノ濾過により；および／または

i v ) 4 ~ 50 、好ましくは 10 ~ 45 、場合により 20 ~ 40 または 30 ~ 35 の温度で

濃縮することを特徴とする、態様 8 に記載の方法。

#### 態様 10

精製溶液を、好ましくは 3 kDa フィルターによる精製溶液の濾過により、無菌濾過および／またはエンドトキシン除去することを特徴とする、態様 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

#### 態様 11

精製溶液を噴霧乾燥すること、特に、20 ~ 60 % (w/v) 、好ましくは 30 ~ 50 % (w/v) 、より好ましくは 35 ~ 45 % (w/v) の中性ヒトミルクオリゴ糖濃度、110 ~ 150 、好ましくは 120 ~ 140 、より好ましくは 125 ~ 135 のノズル温度、および／または 60 ~ 80 、好ましくは 65 ~ 70 の出口温度で噴霧乾燥することを特徴とする、態様 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

#### 態様 12

中性ヒトミルクオリゴ糖が 3 以上の単糖単位を有する中性ヒトミルクオリゴ糖、好ましくは中性ヒトミルク三糖、四糖、五糖または六糖であり、より好ましくは中性ヒトミルクオリゴ糖が 2 ' - フコシルラクトース、3 - フコシルラクトース、2 ' , 3 - ジフコシルラクトース、ラクト - N - トリオース II 、ラクト - N - テトラオース、ラクト - N - ネ

10

20

30

40

50

オテトラオース、ラクト- N - フコペントオース I 、ラクト- N - ネオフコペントオース I 、ラクト- N - フコペントオース I I 、ラクト- N - フコペントオース I I I 、ラクト- N - フコペントオース V 、ラクト- N - ネオフコペントオース V 、ラクト- N - ジフコヘキサオース I 、ラクト- N - ジフコヘキサオース I I 、 6' - ガラクトシルラクトース、 3' - ガラクトシルラクトース、ラクト- N - ヘキサオース、ラクト- N - ネオヘキサオース、パラ - ラクト- N - ヘキサオース、パラ - ラクト- N - ネオヘキサオースおよびジフコシル - ラクト- N - ネオヘキサオースからなる群から選択され、最も好ましくは中性ヒトミルクオリゴ糖が 2' - フコシルラクトースまたはラクト- N - テトラオースであることを特徴とする、態様 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

態様 1 3

10

中性ヒトミルクオリゴ糖を連続クロマトグラフィーで精製する方法が中性ヒトミルクオリゴ糖を連続的に精製する方法であり、その際、中性ヒトミルクオリゴ糖は好ましくは 2' - フコシルラクトースまたはラクト- N - テトラオースであることを特徴とする、態様 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

態様 1 4

態様 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法で製造できる中性ヒトミルクオリゴ糖、好ましくは噴霧乾燥された中性ヒトミルクオリゴ糖。

態様 1 5

態様 1 4 に記載の中性ヒトミルクオリゴ糖であって、

i ) 固体顆粒形態；および / または

20

i i ) 示差走査熱量測定により測定して、 60 ~ 90 、好ましくは 62 ~ 88 、より好ましくは 64 ~ 86 のガラス転移温度；および / または

i i i ) レーザー回折により測定して、 5 ~ 500 μm 、好ましくは 10 ~ 300 μm の粒径；および / または

i v ) レーザー回折により測定して、 10 ~ 100 μm 、好ましくは 20 ~ 90 μm 、より好ましくは 30 ~ 80 μm 、最も好ましくは 40 ~ 70 μm の平均粒径；および / または

v ) 非晶質状態、好ましくは X 線粉末回折で結晶性物質の特徴的なピークをもたない非晶質状態；および / または

v i ) 10 % 、好ましくは 8 % 、より好ましくは < 5 % の含水率を有する中性ヒトミルクオリゴ糖。

30

態様 1 6

医薬に使用するための、好ましくは胃腸障害の予防または治療に使用するための、態様 1 4 または 1 5 に記載の中性ヒトミルクオリゴ糖。

態様 1 7

中性ヒトミルクオリゴ糖が 3 以上の单糖単位を有する中性ヒトミルクオリゴ糖、好ましくは中性ヒトミルク三糖、四糖、五糖または六糖であり、より好ましくは中性ヒトミルクオリゴ糖が 2' - フコシルラクトース、 3 - フコシルラクトース、 2' , 3 - ジフコシルラクトース、ラクト- N - トリオース I I 、ラクト- N - テトラオース、ラクト- N - ネオテトラオース、ラクト- N - フコペントオース I 、ラクト- N - ネオフコペントオース I 、ラクト- N - フコペントオース I I 、ラクト- N - フコペントオース I I I 、ラクト- N - フコペントオース V 、ラクト- N - ネオフコペントオース V 、ラクト- N - ジフコヘキサオース I 、ラクト- N - ジフコヘキサオース I I 、 6' - ガラクトシルラクトース、 3' - ガラクトシルラクトース、ラクト- N - ヘキサオース、ラクト- N - ネオヘキサオース、パラ - ラクト- N - ヘキサオース、パラ - ラクト- N - ネオヘキサオースおよびジフコシル - ラクト- N - ネオヘキサオースからなる群から選択され、最も好ましくは中性ヒトミルクオリゴ糖が 2' - フコシルラクトースまたはラクト- N - テトラオースであることを特徴とする、態様 1 4 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の中性ヒトミルクオリゴ糖。

態様 1 8

食品における添加剤としての、好ましくはヒトの食品および / またはペットフードにお

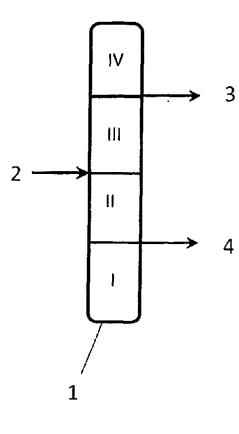
40

50

ける添加剤としての、より好ましくはヒトのベビーフードにおける添加剤としての、態様 14 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の中性ヒトミルクオリゴ糖の使用。

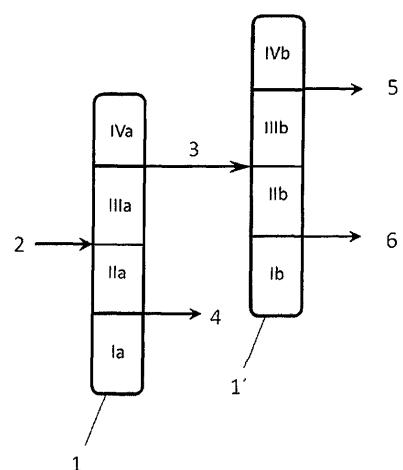
【図 1】

Figure 1



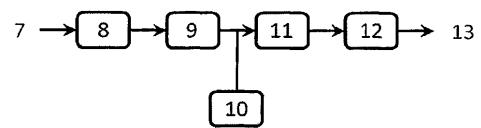
【図 2】

Figure 2



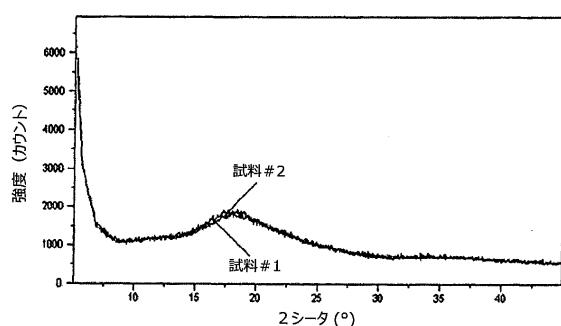
【図 3】

Figure 3



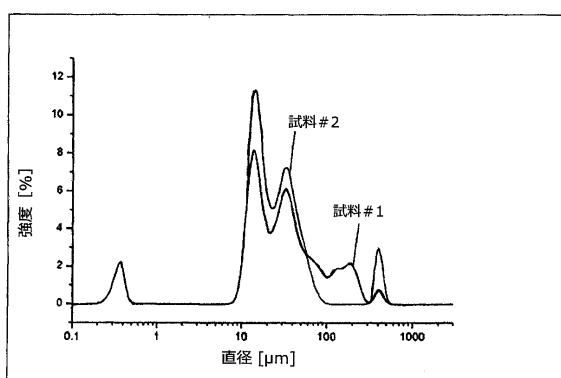
【図4】

Figure 4



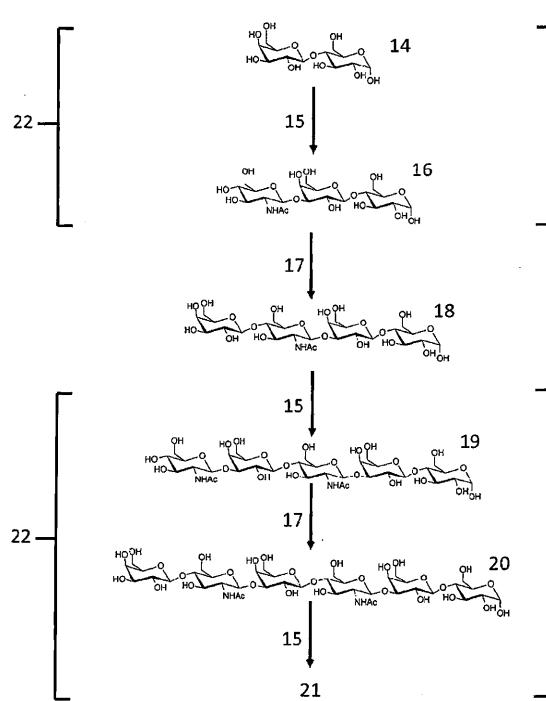
【図5】

Figure 5



【図6】

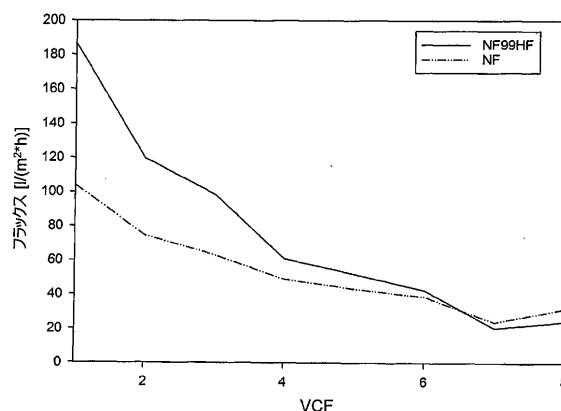
Figure 6



【図7】

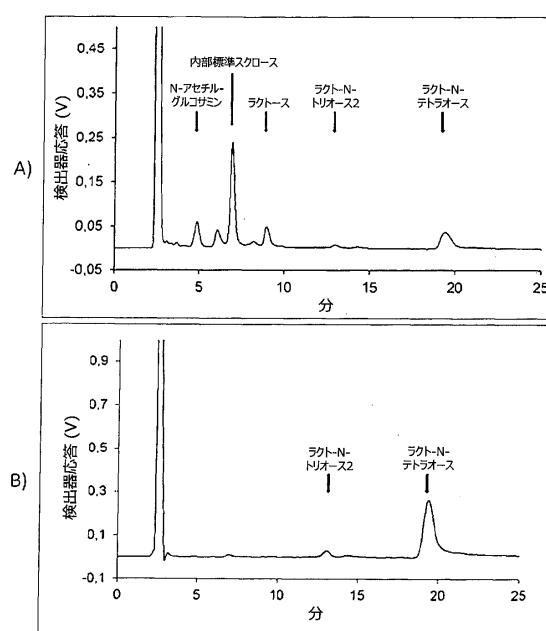
Figure 7

フランクス 対 VCF



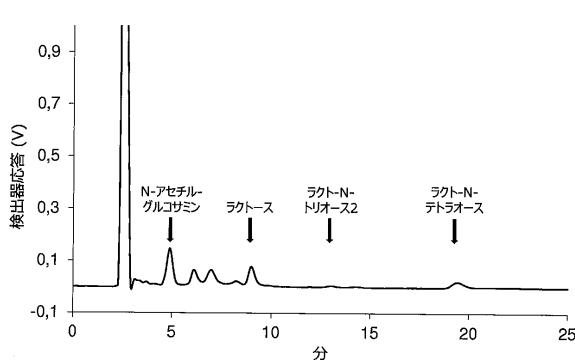
【図8】

Figure 8



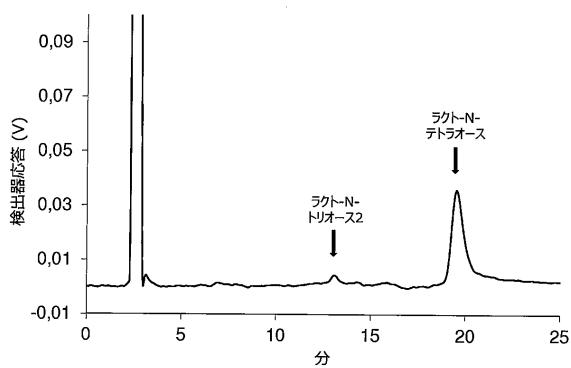
【図9】

Figure 9



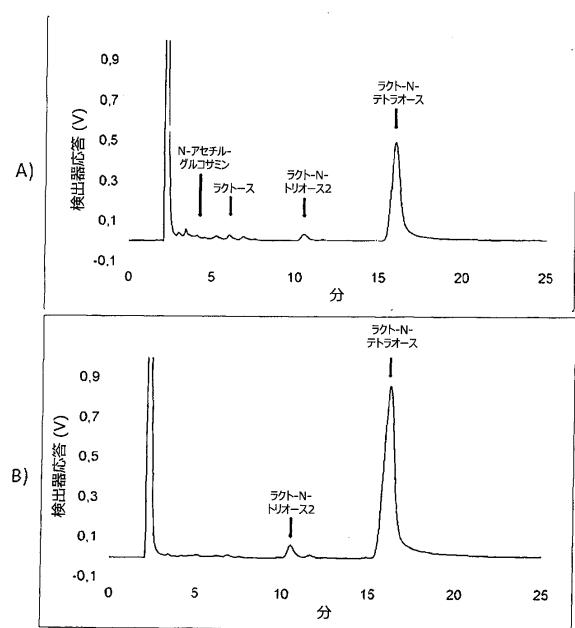
【図10】

Figure 10



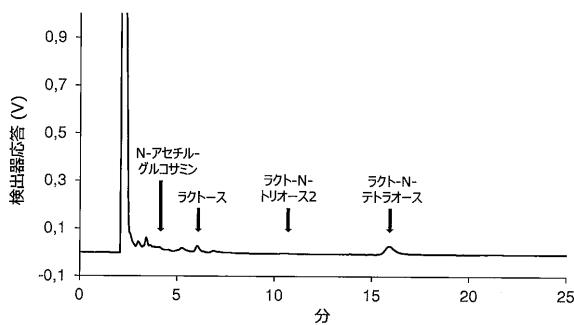
【図11】

Figure 11



【図12】

Figure 12



## フロントページの続き

		F I		
A 6 1 K	31/702	(2006.01)	B 0 1 D	15/00 1 0 1 B
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	B 0 1 D	15/12
A 2 3 L	33/125	(2016.01)	A 6 1 K	31/702
			A 6 1 P	1/00
			A 2 3 L	33/125

(74)代理人 100101373

弁理士 竹内 茂雄

(74)代理人 100118902

弁理士 山本 修

(74)代理人 100106080

弁理士 山口 晶子

(72)発明者 イエンネヴァイン, シュテファン

ドイツ国 5 3 6 0 4 パート・ホンネフ, ヴィヒフリー・ヴェーク 1 4

(72)発明者 ヘルフリッヒ, マルクス

ドイツ国 5 3 5 5 7 パート・ヘニンゲン, ルドルフ - ブーゼ - シュトラーセ 1 3

審査官 西澤 龍彦

(56)参考文献 国際公開第2 0 1 2 / 1 1 2 7 7 7 (WO, A1)

中国特許出願公開第1 0 2 6 7 6 6 0 4 (CN, A)

特表2 0 1 2 - 5 2 9 2 7 4 (JP, A)

特開平0 6 - 0 3 9 2 0 6 (JP, A)

国際公開第2 0 1 2 / 1 5 6 8 9 8 (WO, A1)

特開2 0 0 8 - 0 6 1 5 3 1 (JP, A)

特開平0 2 - 2 8 6 6 9 5 (JP, A)

特開平0 6 - 2 5 3 8 7 9 (JP, A)

Andreas Geisser, Tatjana Hendrich, Gunther Boehm, Bernd Stahl, Separation of lactose from human milk oligosaccharides with simulated moving bed chromatography, Journal of Chromatography A, 2 0 0 5 年, Vol. 1092, pp.17-23

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 H

B 0 1 D

C 1 2 N

C 1 2 P

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / R E G I S T R Y ( S T N )