

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 933 959**

51 Int. Cl.:

A23C 9/13 (2006.01)

A23C 9/142 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2019** **PCT/EP2019/063946**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2019** **WO19229118**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2019** **E 19727020 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2022** **EP 3801037**

54 Título: **Un método simple para la purificación de una sialil-lactosa**

30 Prioridad:

01.06.2018 EP 18175602

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

15.02.2023

73 Titular/es:

CHR. HANSEN HMO GMBH (100.0%)

Maarweg 32

53619 Rheinbreitbach, DE

72 Inventor/es:

JENNEWEIN, STEFAN;

HELFRICH, MARKUS y

ENGELS, BENEDIKT

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 933 959 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

Un método simple para la purificación de una sialil-lactosa

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un proceso para la purificación de una sialil-lactosa. Más específicamente, la presente invención se refiere a un proceso simple y económico para separar una sialil-lactosa de otros carbohidratos como lactosa y monosacáridos, así como de oligosacáridos más grandes, como la disialil-lactosa, que pueden estar presentes como carbohidratos contaminantes en un caldo de fermentación, si dicha sialil-lactosa es producido por fermentación microbiana.

Antecedentes

La leche humana es considerada como la mejor dieta para el desarrollo de un bebé. Está compuesta por grasas, proteínas, vitaminas, minerales, oligoelementos y oligosacáridos complejos. Además de la lactosa, la leche humana, así como la leche de otros mamíferos, contiene diversos oligosacáridos estructuralmente diversos que también se conocen como oligosacáridos de la leche humana (HMO) (Urashima T. et al., (2011) Milk Oligosaccharides, Nova Biomedical Books, New York ISBN 978-1-61122-831-1). Entre los HMO, se observó que los HMO sialilados (SHMO) respaldan la resistencia a bacterias y virus enteropatógenos. Curiosamente, estudios recientes demostraron además un efecto protector de los SHMO de cadena larga contra la enterocolitis necrotizante, que es una de las enfermedades más comunes y letales en los bebés prematuros. Además, se cree que los SHMO apoyan el desarrollo del cerebro de un bebé y sus capacidades cognitivas. Además, se ha demostrado que los oligosacáridos sialilados neutralizan las enterotoxinas de diversos microbios patógenos, incluidos *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* y *Salmonella*. Además, se encontró que los oligosacáridos sialilados interfieren con la colonización del intestino por *Helicobacter pylori* y por lo tanto prevenir o inhibir las úlceras gástricas y duodenales.

Entre los oligosacáridos sialilados, 3'-sialil-lactosa y 6'-sialil-lactosa son los miembros más abundantes en la leche humana.

Dado que los oligosacáridos sialilados tienen una estructura compleja, su síntesis química o (químio)enzimática es desafiante y está asociada con grandes dificultades, por ejemplo, control de la estereoquímica, formación de enlaces específicos, disponibilidad de materias primas, etc. Como consecuencia, los oligosacáridos sialilados disponibles comercialmente han sido muy caros por su baja cantidad en fuentes naturales.

Por lo tanto, se han realizado esfuerzos en la ingeniería metabólica de microorganismos para producir oligosacáridos sialilados, ya que este enfoque es la forma más prometedora para producir HMO a escala industrial. Para la producción de SHMO por fermentación microbiana, el microorganismo se cultiva normalmente en presencia de ácido siálico exógeno.

Las publicaciones internacionales WO 2007/101862 A1 y WO 2014/153252 A1 divulgan métodos y composiciones para manipular bacterias para producir oligosacáridos sialilados. Sin embargo, se sabe que la producción fermentativa de 6'-sialil-lactosa está asociada con la biosíntesis de otros carbohidratos como la disialil-lactosa. Drouillard, S. et al. (2010) Efficient synthesis of 6'-sialyllactose, 6,6'-disialyllactose, and 6'-KDO-lactose by metabolically engineered *E. coli* expressing a multifunctional sialyltransferase from the Photobacterium sp. JT-ISH-224. Carbohydrate Research 345: 1394-1399, que se genera a partir de 6'-sialil-lactosa debido a la actividad de la sialiltransferasa que se expresa en las bacterias modificadas genéticamente. Además, la esterilización en autoclave (tratamiento térmico) de carbohidratos (por ejemplo, lactosa) conduce a la formación de subproductos no deseados, como productos aldólicos o de Maillard, o reacciones de reordenamiento (por ejemplo, conversión de lactosa en lactulosa). La presencia de dichos contaminantes en el producto final, en particular en grandes cantidades, no es deseable o incluso inaceptable.

Además, el uso de bacterias manipuladas genéticamente para producir oligosacáridos da como resultado la contaminación del caldo de fermentación con material recombinante tal como moléculas de ácido nucleico o polipéptidos resultantes del microorganismo. Sin embargo, la contaminación de un producto para consumo humano con ADN recombinante o proteínas no es aceptable ni para las autoridades reguladoras ni para los consumidores en la actualidad. Por lo tanto, cualquier ácido nucleico y proteína resultante del microorganismo recombinante debe eliminarse del oligosacárido de leche humana deseado. Los límites de detección para las moléculas de ADN recombinante son muy bajos hoy en día, lo que requiere esquemas de purificación exhaustivos. En el caso de la detección de ADN basada en qPCR, incluso se puede detectar una sola molécula de ADN en una muestra.

Los procesos "estado de la técnica" para purificar oligosacáridos individuales a partir de un caldo de fermentación son técnicamente complejos y, a menudo, antieconómicos, en particular cuando dicho oligosacárido está destinado a ser utilizado en aplicaciones alimentarias. Para la purificación del disacárido lactosa o sacarosa a partir de mezclas complejas como suero o melaza, se han desarrollado procesos a escala industrial que involucran múltiples etapas de cristalización. Sin embargo, dichos métodos son elaborados y solo conducen a bajos rendimientos. Además, estos procesos no son aplicables para hacer que un oligosacárido obtenido por fermentación microbiana sea adecuado para

su uso en la industria alimentaria, ya que dicho caldo de fermentación, aparte del suero y la melaza, no es ya un producto alimentario.

Sin embargo, los procesos de filtración como la ultrafiltración, la microfiltración y la nanofiltración son técnicamente fáciles de realizar, si se conocen y optimizan todos los parámetros del proceso. La diafiltración es otro proceso adecuado que implica la adición de agua dulce a una solución para eliminar los componentes permeables de la membrana. La ultrafiltración y la microfiltración generalmente se usan para separar moléculas mucho más grandes, como proteínas o células, de un caldo de fermentación o una solución acuosa. Además, la eliminación de agua, minerales y moléculas muy pequeñas por nanofiltración es bien conocida y utilizada en la industria láctea para la concentración y desmineralización del suero. En la mayoría de los casos, los materiales de membrana para nanofiltración y ultrafiltración se basan en materiales como piperazina, poliamida, polietersulfona, polietilenglicol y cerámica. Las membranas se pueden ensamblar, por ejemplo, como módulos de fibra hueca, módulos enrollados en espiral y membranas de láminas planas y el ensamblaje puede conducir a diferentes rendimientos de separación. En general, las membranas de nanofiltración poseen un límite de peso molecular en el rango de 150-300 Daltons. Las membranas con un límite de peso molecular en el rango de 400-600 Daltons son muy raras, especialmente para la producción industrial a gran escala. Esto hace que la separación de oligosacáridos sea todavía compleja porque son necesarias otras técnicas de separación como la cromatografía, ya sea por lotes o de forma continua.

La Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. US 2014/0170293 A1 se refiere a un concentrado derivado de la leche o un producto lácteo que comprende sialil-lactosa en cantidades superiores a las cantidades normales que se encuentran en la leche o el producto lácteo, y un proceso para la preparación de tal concentrado por ultrafiltración y diafiltración utilizando una membrana basada en poliamida de película delgada.

La publicación abierta china CN 103788144 A se refiere a un método para extraer gangliósido GM1 de cerebro de cerdo fresco, en el que un extracto primario se somete a ultrafiltración y nanofiltración.

La solicitud de patente europea EP 2 484 686 A1 divulga un método para separar una sialil-lactosa del material lácteo, en el que el método comprende eliminar proteínas del material lácteo, ajustar el pH del líquido sin proteínas así obtenido y concentrar el líquido con pH ajustado mediante una membrana de ultrafiltración.

La Publicación Internacional No. WO 2017/220697 A1 se refiere a un proceso para la producción de un producto nutricional que contiene proteína de leche y sacárido de leche. El proceso comprende someter un alimento lácteo a microfiltración o microfiltración/diafiltración para obtener un retenido enriquecido con respecto a la caseína micelar y un permeado enriquecido con respecto a la proteína del suero de la leche, sometiendo el permeado a nanofiltración o nanofiltración/ultrafiltración, y sometiendo el retenido a la nanofiltración a electrodiálisis.

Mientras que la cromatografía de filtración en gel es un método conveniente a escala de laboratorio, solo la cromatografía de lecho móvil simulado representa un método adecuado para la purificación de 6-SL a escalas compatibles con la producción de alimentos. Sin embargo, todos los demás procesos publicados adolecen del problema de que los carbohidratos contaminantes no pueden eliminarse eficazmente del producto deseado.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención era proporcionar un método simple y rentable para la purificación de una sialil-lactosa de fermentaciones microbianas, en el que los ácidos nucleicos y los polipéptidos que se originan en el microorganismo recombinante pueden eliminarse del oligosacárido deseado, así como de dichos otros carbohidratos.

Resumen

Se proporciona un método para la purificación de una sialil-lactosa que es simple, rentable y escalable. El método para la purificación de una sialil-lactosa se puede realizar sin el uso de un disolvente orgánico para la cristalización de dicha sialil-lactosa. Además, el método para la purificación de una sialil-lactosa se puede realizar sin una etapa cromatográfica discontinuo.

Las sialil-lactosas representan oligosacáridos de la leche humana cuya inclusión en fórmulas infantiles y alimentos médicos es muy deseable. El alto coste de las sialil-lactosas impide su uso generalizado, en particular en fórmulas infantiles. En particular, la purificación de productos de fermentación microbiana suele ser complicada y costosa. Además, el uso de disolventes orgánicos y las etapas cromatográficas discontinuas hacen que la 6'-sialil-lactosa y otros oligosacáridos neutros sean prohibitivamente caros. Además, el uso de etanol no es aceptable según ciertos estándares alimentarios religiosos, por ejemplo, Halal. Por lo tanto, la invención se refiere a un método económico simple para purificar una sialil-lactosa de la fermentación microbiana usando un auxiliar de procesamiento recombinante, produciendo un producto de sialil-lactosa adecuado para el consumo humano, en particular adecuado para alimentos infantiles y productos de nutrición médica.

El proceso de purificación se basa en el uso de dos membranas diferentes para la purificación/separación de una sialil-lactosa de los carbohidratos contaminantes por medio de filtración y comprende dos etapas de filtración por membrana, en la que una membrana tiene un límite de peso molecular de entre aproximadamente 300 y aproximadamente 500

Dalton, y en la que la otra membrana tiene un límite de peso molecular de entre aproximadamente 600 y aproximadamente 800 Dalton.

Descripción detallada

Se proporciona un método para la purificación de una sialil-lactosa a partir de otros carbohidratos, en el que el método comprende las etapas de someter una solución acuosa que contiene una sialil-lactosa y dichos otros carbohidratos a dos etapas de filtración de membrana utilizando membranas diferentes, en la que una membrana tiene un peso límite de corte de entre aproximadamente 300 y aproximadamente 500 Dalton, y en la que la otra membrana tiene un límite de peso molecular de entre aproximadamente 600 a aproximadamente 800 Dalton.

La membrana que tiene un límite de peso molecular de entre aproximadamente 300 y aproximadamente 500 Dalton permite la eliminación de la mayor parte de los carbohidratos que tienen un peso molecular que es menor que el de una sialil-lactosa. Tras la filtración, SL y los carbohidratos que tienen un peso molecular mayor que el de SL se retienen en el retenido.

En una realización adicional y/o alternativa, la membrana que tiene un límite de peso molecular de entre aproximadamente 300 y aproximadamente 500 Dalton tiene un tamaño de poro de 1 a 2 nm.

Las membranas adecuadas que tienen un límite de peso molecular que es menor que el peso molecular de SL son, por ejemplo, TriSep XN-45 (TriSep Corporation, EE. UU.), Dairy DK (Suez Water Technologies, anteriormente GE) y Filmtech NF270 (Dow).

La membrana que tiene un límite de peso molecular de entre aproximadamente 600 y aproximadamente 800 Dalton posee permeabilidad para la sialil-lactosa y los carbohidratos que tienen un peso molecular menor que el de SL. Tras la filtración, SL está presente en el filtrado mientras que los carbohidratos que tienen un peso molecular mayor que el de SL permanecen en el retenido.

En una realización adicional y/o alternativa, la membrana que tiene un límite de peso molecular de entre aproximadamente 600 y aproximadamente 800 Dalton tiene un tamaño de poro de 2.5 a 3 nm.

Las membranas adecuadas para poseer permeabilidad para 6-SL y retener carbohidratos que tienen un peso molecular mayor que el de 6-SL en el retenido son, por ejemplo, membrana TangenX SIUS TFF 0.65 kDa (Repligen Corporation), módulos de circonia 3nm (Pervatech BV) y S-CUT YSNF-YS600 (CUT/Bürkert).

El método evita el uso de costosas etapas cromatográficas discontinuas y también hace innecesarias las etapas de precipitación o cristalización usando solventes orgánicos. Así, en una realización adicional y/o alternativa, el método no comprende una o más etapas de cromatografía discontinua y/o una o más etapas de precipitación y/o cristalización de 6-SL mediante el uso de un solvente orgánico.

En una realización adicional y/o alternativa, la solución acuosa se obtiene a partir de un proceso de fermentación o enzimático para la producción de una sialil-lactosa.

El método descrito en el presente documento es adecuado para la purificación de los oligosacáridos 3'-sialil-lactosa o 6'-sialil-lactosa de la leche humana de una reacción de biocatálisis o fermentación microbiana en cantidades de varias toneladas, porque es económicamente factible y escalable.

En una realización adicional y/o alternativa, la solución acuosa se obtiene a partir de una fermentación, es decir, cultivando células microbianas que son capaces de producir una sialil-lactosa en un medio de cultivo (caldo de fermentación) y en condiciones que permiten que las células microbianas produzcan la sialil-lactosa, separando la biomasa del caldo de fermentación. Preferiblemente, la separación de la biomasa del caldo de fermentación comprende al menos una etapa de ultrafiltración, preferiblemente dos etapas de ultrafiltración, más preferiblemente una primera ultrafiltración que usa una membrana que tiene un límite de peso molecular de aproximadamente 500 kDa y una segunda ultrafiltración que usa una membrana que tiene un límite de peso molecular de aproximadamente 150 kDa.

En una realización adicional y/o alternativa, la solución acuosa se trata con una resina de intercambio catiónico, preferiblemente en forma de H⁺ y con una resina de intercambio aniónico, preferiblemente en la forma Cl⁻. Preferiblemente, la solución acuosa que contiene la sialil-lactosa y otros carbohidratos se trata con resinas de intercambio iónico antes de someterse a las etapas de filtración por membrana para la eliminación de otros carbohidratos.

En una realización adicional y/o alternativa, el método comprende además una etapa de diálisis, preferiblemente una etapa de electrodiálisis, para la eliminación de iones. Preferiblemente, la solución acuosa que contiene la sialil-lactosa se somete a diálisis y/o electrodiálisis después de que dichos otros carbohidratos se hayan eliminado de la solución acuosa.

El producto se puede suministrar más convenientemente como un concentrado estéril o como un producto secado por aspersión.

5 El método permite purificar 3'-sialil-lactosa o 6'-sialil-lactosa, es decir, separar 3-SL o 6-SL de otros carbohidratos, en la que la pureza de la sialil-lactosa en la solución acuosa es $\leq 70\%$, $\leq 60\%$, $\leq 50\%$, $\leq 40\%$, $\leq 30\%$, $\leq 20\%$; $\leq 10\%$ o $\leq 5\%$ antes de la purificación y/o la solución acuosa contiene la sialil-lactosa con una pureza de $\geq 80\%$, preferiblemente de $\geq 85\%$ o más preferiblemente $\geq 90\%$ después de la purificación.

10 En una realización adicional y/o alternativa, la purificación comprende las siguientes etapas:

i.) separar la biomasa del caldo de fermentación;

15 ii.) someter el caldo de fermentación libre de células a al menos un tratamiento con resina de intercambio iónico para eliminar el material cargado, preferiblemente a un tratamiento con resina de intercambio aniónico y un tratamiento con resina de intercambio catiónico;

20 iii.) someter la solución acuosa obtenida en la etapa ii. a una etapa de filtración por membrana usando una membrana que tiene un límite de peso molecular de aproximadamente 300 a aproximadamente 500 Dalton para eliminar los carbohidratos que tienen un peso molecular menor que el de una sialil-lactosa;

iv.) someter el retenido obtenido en la etapa iii. a una etapa de filtración por membrana usando una membrana que tiene un límite de peso molecular de aproximadamente 600 a aproximadamente 800 Dalton para eliminar carbohidratos que tienen un peso molecular mayor que el de una sialil-lactosa; y - opcionalmente -

25 v.) aumentar la concentración de la sialil-lactosa presente en el filtrado de la etapa iv.

30 Mientras que otros procedimientos utilizados para la purificación de sialil-lactosa son bastante complejos y, por lo tanto, costosos, el método descrito anteriormente en el presente documento se basa principalmente en el uso de dos etapas de filtración por membrana.

35 Ciertas realizaciones comprenden una o más etapas adicionales, como etapas de diálisis (para la eliminación de sales), electrodiálisis (para la eliminación de moléculas cargadas), tratamiento con carbón activado (para la decoloración de la solución del producto) y/u otros procesos de filtración (como eliminación de endotoxinas y/o filtración estéril). Aunque no es necesario, el proceso puede comprender el tratamiento de la solución acuosa que contiene la sialil-lactosa con un disolvente orgánico (como alcoholes de cadena corta como metanol) para la precipitación de oligosacáridos contaminantes o para la elución después de la adsorción en carbón activado con mezclas de alcoholes de cadena corta y agua, y/o para la cristalización de la sialil-lactosa.

40 La solución acuosa resultante del método contiene la sialil-lactosa, pero no los ácidos nucleicos ni los polipéptidos de las células microbianas. Además, dicha solución acuosa apenas contiene, si es que contiene algo, monosacáridos y/o disialil-lactosa.

45 La presente invención se describirá con respecto a realizaciones particulares, pero la invención no se limita a ellas sino únicamente a las reivindicaciones. Además, los términos primero, segundo y similares en la descripción y en las reivindicaciones se utilizan para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir una secuencia, ya sea temporal, espacial, en clasificación o de cualquier otra manera. Debe entenderse que los términos así usados son intercambiables bajo las circunstancias apropiadas y que las realizaciones de la invención descritas en este documento son capaces de operar en secuencias distintas a las descritas o ilustradas en este documento.

50 Debe notarse que el término "que comprende", usado en las reivindicaciones, no debe interpretarse como restringido a los medios listados a continuación; éste no excluye otros elementos o etapas. Por lo tanto, debe interpretarse como que especifica la presencia de las características, enteros, etapas o componentes indicados a los que se hace referencia, pero no excluye la presencia o adición de una o más características, enteros, etapas o componentes, o grupos de los mismos. Por lo tanto, el alcance de la expresión "un dispositivo que comprende los medios A y B" no debe limitarse a los dispositivos que consisten únicamente en los componentes A y B. Significa que, con respecto a la presente invención, los únicos componentes relevantes del dispositivo son A y B.

60 La referencia a lo largo de esta especificación a "una realización" o "una realización" significa que un rasgo, estructura o característica particular descrita en relación con la realización está incluida en al menos una realización de la presente invención. Por lo tanto, las apariciones de las frases "en una realización" o "en una realización" en diversos lugares a lo largo de esta especificación no se refieren necesariamente a la misma realización, pero pueden referirse. Además, los rasgos, estructuras o características particulares pueden combinarse de cualquier manera adecuada, como sería evidente para un experto en la materia a partir de esta divulgación, en una o más realizaciones.

65

De manera similar, debe apreciarse que, en la descripción de realizaciones ejemplares de la invención, varios rasgos de la invención a veces se agrupan en una sola realización, figura o descripción de la misma con el fin de simplificar la divulgación y ayudar en la comprensión de una o más de los diversos aspectos inventivos. Este método de divulgación, sin embargo, no debe interpretarse como que refleja la intención de que la invención reivindicada requiera más rasgos de los que se mencionan expresamente en cada reivindicación. Más bien, como reflejan las siguientes reivindicaciones, los aspectos inventivos se encuentran en menos de todas las características de una sola realización descrita anteriormente. Por lo tanto, las reivindicaciones que siguen a la descripción detallada se incorporan expresamente en esta descripción detallada, siendo cada reivindicación independiente como una realización separada de esta invención.

Además, aunque algunas realizaciones descritas en el presente documento incluyen algunos pero no todos los rasgos incluidos en otras realizaciones, las combinaciones de características de diferentes realizaciones están destinadas a estar dentro del alcance de la invención y forman diferentes realizaciones, como entenderán los expertos en la técnica. Por ejemplo, en las siguientes reivindicaciones, cualquiera de las realizaciones reivindicadas se puede utilizar en cualquier combinación.

Además, algunas de las realizaciones se describen aquí como un método o una combinación de elementos de un método que puede implementarse mediante un procesador de un sistema informático o mediante otros medios para llevar a cabo la función. Así, un procesador con las instrucciones necesarias para llevar a cabo tal método o elemento de un método constituye un medio para llevar a cabo el método o elemento de un método. Además, un elemento descrito en este documento de una realización de aparato es un ejemplo de un medio para llevar a cabo la función realizada por el elemento con el fin de llevar a cabo la invención.

En la descripción y los dibujos proporcionados en este documento, se exponen numerosos detalles específicos. Sin embargo, se entiende que las realizaciones de la invención pueden practicarse sin estos detalles específicos. En otros casos, los métodos, estructuras y técnicas bien conocidos no se han mostrado en detalle para no oscurecer la comprensión de esta descripción.

La invención se describirá ahora mediante una descripción detallada de varias realizaciones de la invención. Es evidente que otras realizaciones de la invención pueden configurarse según el conocimiento de los expertos en la materia sin apartarse del verdadero espíritu o enseñanza técnica de la invención, estando la invención limitada únicamente por los términos de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1. Producción fermentativa de 6'-sialil-lactosa

Se efectuó una fermentación por lotes de alimentación de 6'-sialil-lactosa que emplea cepas de *E. coli* que sintetizan 6'-sialil-lactosa recombinante (*E. coli* BL21(DE3) $\Delta lacZ$) que expresa el gen de la α -2,6-sialiltransferasa *pl T6* del *Photobacterium leiognathi* JT-SHIZ-119. Para mejorar la biosíntesis de ácido siálico-CMP, los genes que codifican la glucosamina-6-fosfato sintasa *GlmS* de *E. coli*, la N-acetilglucosamina 2-epimerasa *Slr1975* de *Synechocystis sp.*, la glucosamina 6-fosfato N-acetiltransferasa *Gna1* de *Saccharomyces cerevisiae*, la fosfoenolpiruvato sintasa *PpsA* de *E. coli*, la N-acetilneuraminato sintasa *NeuB*, y el ácido siálico- CMP sintetasa *NeuA*, las últimas dos de *Campylobacter jejuni*, se integraron cromosómicamente en el *E. coli* anfitrión BL21 (DE3). Además, el gen que codifica la lactosa permeasa *LacY* de *E. coli*, y los genes *cscB* (sacarosa permeasa), *cscK* (fructoquinasa), *cscA* (sacarosa hidrolasa), y *cscr* (regulador transcripcional) de *E. coli* W se integraron en el genoma BL21 de tal manera que la transcripción de los genes integrados se inicia a partir de promotores constitutivos, ya sea del promotor de tetraciclina P_{tet} o el promotor $PT5$. Un gal-operón funcional que consiste en y expresa los genes *galE* (UDP-glucosa-4-epimerasa), *galE* (galactosa-1-fosfato uridililtransferasa), *galK* (galactoquinasa), y *galM* (galactosa-1-epimerasa) se transfirió de *E. coli* K12 al genoma de la cepa BL21. Para evitar la degradación de N-acetilglucosamina 6-fosfato, se eliminaron los genes que codifican N-acetilglucosamina-6-fosfato desacetilasa (*NagA*), glucosamina-6-fosfato desaminasa (*NagB*) y la proteína PTS específica de N-acetilglucosamina IIABC (*NagE*) del cromosoma bacteriano. Además, se eliminó el operón *manXYZ*, que codifica un transportador de azúcar del sistema *E. coli* PTS para manosa, glucosa, glucosamina y N-acetilglucosamina, así como los genes *nanA*, *nanK*, *nanE*, y *nanT*, que codifica la N-acetilneuraminato liasa, la N-acetilmanosamina quinasa, la N-acetilmanosamina-6-fosfato epimerasa y el transportador de ácido siálico, respectivamente. El gen que codifica la N-acetilgalactosamina-6-fosfato desacetilasa (*AgaA*) también se eliminó.

La cepa de *E. coli* que produce 6'-sialil-lactosa se cultivó en un medio de sales minerales definido, que comprende 7 g·l⁻¹ NH₄H₂PO₄, 7 g·l⁻¹ K₂HPO₄, 2 g·l⁻¹ KOH, 0.3 g·l⁻¹ ácido cítrico, 5 g·l⁻¹ NH₄Cl, 1 ml·l⁻¹ antiespumante (Struktol J673, Schill + Seilacher), 0.1 mM CaCl₂ 8 mM MgSO₄, oligoelementos y 2 % de sacarosa como fuente de carbono. Los oligoelementos consistieron en 0.101 g·l⁻¹ ácido nitrilotriacético, pH 6.5, 0.056 g·l⁻¹ citrato férrico amónico, 0.01 g·l⁻¹ MnCl₂ × 4 H₂O, 0.002 g·l⁻¹ CoCl₂ × 6 H₂O, 0.001 g·l⁻¹ CuCl₂ × 2 H₂O, 0.002 g·l⁻¹ ácido bórico, 0.009 g·l⁻¹ ZnSO₄ × 7 H₂O, 0.001 g·l⁻¹ Na₂MoO₄ × 2 H₂O, 0.002 g·l⁻¹ Na₂SeO₃, 0.002 g·l⁻¹ NiSO₄ × 6 H₂O

La alimentación de sacarosa (500 g·l⁻¹) se complementó con 8 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂, oligoelementos y 5 g·l⁻¹ NH₄Cl. Para la formación de 6'-sialil-lactosa, se empleó una alimentación de lactosa de 216 g·l⁻¹. El pH del medio de

cultivo se controló utilizando solución de amoníaco (25 % v/v). La fermentación discontinua se llevó a cabo a 30 °C con aireación y agitación constantes durante 72 horas aplicando una tasa de alimentación de sacarosa de 5.5 - 7 ml·l⁻¹·h⁻¹, refiriéndose al volumen inicial. A las 72 horas del inicio de la fermentación, la mayor parte de la lactosa añadida se convirtió en 6'-sialil-lactosa. Para eliminar la lactosa residual en el sobrenadante de fermentación, se añadió β-galactosidasa al recipiente de fermentación.

Ejemplo 2: Preparación de un caldo de fermentación libre de células.

La masa celular (alrededor del 10 % del caldo de fermentación) se separó del medio mediante ultrafiltración (límite de 0.05 µm) (tecnología de membrana CUT, Erkrath, Alemania) seguida de filtraciones de flujo cruzado utilizando un filtro con un MWCO de 150 kDa (Microdyn-Nadir, Wiesbaden, Alemania).

Ejemplo 3: Tratamiento con resina de intercambio iónico de un caldo de fermentación libre de células que contiene 6'-sialil-lactosa

El caldo de fermentación sin células obtenido del ejemplo 2 contenía 6'-sialil-lactosa (con una pureza del 9 % en peso seco) en un volumen de 1000 litros y se pasó sobre una resina de intercambio iónico catiónico fuerte (Lewatit® S2568 obtenido de la compañía Lanxess, Alemania) en forma H⁺ para eliminar los contaminantes cargados positivamente (el tamaño del volumen del lecho del intercambiador de iones era de 200 l). La elución de 6-SL de la resina de intercambio iónico se continuó con agua desionizada. A continuación, la solución obtenida se ajustó a pH 7 mediante la adición de solución de hidróxido de sodio. A continuación, la solución se pasó (sin demora) por una columna de intercambiador de iones aniónico (el volumen del lecho del intercambiador de iones era de 200 l). El intercambiador de iones aniónico fuerte usado Lewatit® S6368 A (Lanxess, Alemania) estaba en la forma de cloruro (Cl⁻). Se continuó la elución de 6-SL con agua desionizada. La solución obtenida se neutralizó nuevamente a pH 7.

Ejemplo 4: Primera filtración para la eliminación de moléculas más pequeñas/carbohidratos

La solución obtenida mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico expuesto en el ejemplo 3 se diafiltró utilizando una membrana de nanofiltración TriSep XN-45 (TriSep Corporation, EE. UU) y 500 l de agua desionizada. La solución resultante se concentró aún más utilizando la membrana de nanofiltración (RE 8040-BE, CSM-Saehan) en la que se obtuvo una solución de 6'-sialil-lactosa con una pureza del 31 % (en peso seco) y una conductividad de 8 mS/cm.

Ejemplo 5: Segunda filtración para la eliminación de moléculas/carbohidratos más grandes

Para separar la 6'-sialil-lactosa del subproducto disialil-lactosa producido por fermentación, se empleó un segundo tratamiento de membrana. Se usó una membrana TangenX SIUS TFF con un límite nominal de 0.65 kDa (Repligen Corporation) para la filtración. La solución que contenía 94.4 % de 6'-sialil-lactosa y 6.6 % de disialil-lactosa (proporción 15:1) se filtró en flujo cruzado con el sistema descrito y se determinó la concentración de 6'-sialil-lactosa y disialil-lactosa dentro del permeado y el retenido. Los resultados muestran una reducción significativa de la cantidad de disialil-lactosa dentro del permeado del 6.6 % al 0.2 % (la proporción de 6'-sialil-lactosa a disialil-lactosa fue de 55:1), mientras que la proporción de 6'-sialil-lactosa a disialil-lactosa dentro del retenido fue de 14:1. Este resultado muestra que la 6'-sialil-lactosa podría separarse de la disialil-lactosa usando una etapa de filtración adicional. Esta observación también podría mostrarse usando un segundo tipo de membrana con un límite similar de un proveedor diferente. Mediante el uso de una membrana S-CUT YSNF-YS600-2540-M46D-ATD (CUT Membrane Technology GmbH) con un límite nominal de 600-800 Da, la 6'-sialil-lactosa también se separó de la disialil-lactosa mediante filtración de flujo cruzado.

Ejemplo 6: Tratamiento de electrodiálisis

El permeado obtenido en el ejemplo 5 se electrodializó a 2 mS/cm usando un aparato de electrodiálisis PC-Cell 15 (PC-Cell, Heusweiler, Alemania) equipado con una pila de membranas PC-Cell ED 1000H. Esta pila de membranas estaba equipada con las siguientes membranas: membrana de intercambio catiónico CEM: PK SK y la membrana de intercambio aniónico AEM: PcAcid60 con un límite de exclusión de tamaño de 60 Da. Se utilizó una solución de ácido sulfámico (ácido amidosulfónico) 0.025 M como electrolito en el proceso de electrodiálisis. Después de la electrodiálisis se obtuvo una solución que contenía 6'-sialil-lactosa con una pureza del 83 % (en peso seco). Como alternativa al tratamiento de electrodiálisis, podría emplearse un proceso de diafiltración.

Ejemplo 7: Concentración y tratamiento de carbón activado.

Se eliminó algo de agua de la solución acuosa utilizando un filtro de ósmosis inversa y evaporación rotatoria a 45 °C para obtener una solución de 6'-sialil-lactosa al 25 % (m/v). A continuación, la solución acuosa resultante se trató con carbón activado (Norit SA2). Se emplearon 125 g de carbón activado para 1 l de 6'-sialil-lactosa al 25 % (m/v).

Ejemplo 8: Filtración estéril y eliminación de endotoxinas

Posteriormente, la solución obtenida en el ejemplo 7 se sometió a filtración estéril pasando la solución a través de un filtro de 6 kDa (módulo de fibra hueca de ultrafiltración Pall Microza SEP-2013, Pall Corporation, Dreieich, Alemania). A continuación, la solución estéril se almacenó a TA hasta que se secó por pulverización.

5 Ejemplo 9: Secado por aspersión de 6'-sialil-lactosa

10 A continuación, la 6'-sialil-lactosa estéril así obtenida (ejemplo 8) se secó por aspersión usando un secador por aspersión NUBILOSALTC-GMP (NUBILOSA, Konstanz, Alemania). Para el secado por aspersión de la 6'-sialil-lactosa, la solución se pasó bajo presión con 3.5 bar a través de las boquillas del secador por aspersión ajustadas a 130 °C y el flujo se ajustó para mantener una temperatura de escape entre 67 °C a 69 °C. Con estos ajustes se puede obtener un polvo secado por aspersión con menos del 9 % de humedad. Los contenidos de humedad se determinaron por titulación de Karl-Fischer.

15 Ejemplo 10: Análisis LC-MS/MS de 6'-sialil-lactosa

20 Para la cuantificación, el análisis de espectrometría de masas se realizó mediante MRM (monitorización de reacciones múltiples) utilizando un sistema de detección LC Triple-Quadrupole MS. Los iones precursores se seleccionan y analizan en el cuadrupolo 1, la fragmentación tiene lugar en la celda de colisión utilizando argón como gas CID, la selección de iones de fragmentos se realiza en el cuadrupolo 3. La separación cromatográfica de los sacáridos se realizó en una columna HPLC XBridge Amide (3.5 µm, 2.1 × 50 mm (Waters, EE. UU.) con un cartucho de protección XBridge Amide (3.5 µm, 2.1 × 10 mm) (Waters, EE. UU.). La temperatura del horno de columna del sistema de HPLC fue de 50 °C. La fase móvil estuvo compuesta por acetonitrilo/H₂O con acetato de amonio 10 mM. Se inyectó una muestra de 1 µl en el instrumento; la ejecución se realizó durante 3.60 min con un caudal de 400 µl/min. La 6'-sialil-lactosa se analizó mediante MRM en modo de ionización positiva ESI. El espectrómetro de masas se hizo funcionar a resolución unitaria. La sialil-lactosa forma un ion de m/z 656.2 [M + Na]. El ion precursor de sialil-lactosa se fragmentó adicionalmente en la celda de colisión en los iones de fragmento m/z 612.15, m/z 365.15 y m/z 314.15. La energía de colisión, Q1 y Q3 Pre Bias se optimizó para cada analito individualmente. Los métodos de cuantificación se establecieron utilizando estándares comercialmente disponibles (Carbosynth, Compton, Reino Unido).

30

REIVINDICACIONES

1. Un método para la purificación de una sialil-lactosa a partir de otros carbohidratos, caracterizado porque el método comprende las etapas de someter una solución acuosa que contiene la sialil-lactosa y otros carbohidratos a dos etapas de filtración de membrana usando diferentes membranas, en la que
 - una membrana tiene un límite de peso molecular de entre aproximadamente 300 a aproximadamente 500 Dalton, y
 - la otra membrana tiene un límite de peso molecular de entre aproximadamente 600 a aproximadamente 800 Dalton.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la solución acuosa se obtiene a partir de un proceso de fermentación o enzimático para la producción de la sialil-lactosa.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la solución acuosa se obtiene a partir de una fermentación separando la biomasa del caldo de fermentación.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en la que separar la biomasa del caldo de fermentación comprende al menos una etapa de ultrafiltración, preferiblemente dos etapas de ultrafiltración, más preferiblemente una primera ultrafiltración usando una membrana que tiene un límite de peso molecular de aproximadamente 500 kDa y una segunda ultrafiltración usando una membrana que tiene un límite de peso molecular de aproximadamente 150 kDa.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la solución acuosa que contiene la sialil-lactosa se trata con una resina de intercambio catiónico, preferiblemente en la forma H^+ y una resina de intercambio aniónico, preferiblemente en la forma Cl^- , más preferiblemente antes de someter la solución acuosa a las etapas de filtración de membrana.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el método comprende además una etapa de diálisis, preferiblemente de electrodiálisis.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la pureza de la sialil-lactosa en la solución acuosa es $\leq 70\%$, $\leq 60\%$, $\leq 50\%$, $\leq 40\%$, $\leq 30\%$, $\leq 20\%$; $\leq 10\%$ o $\leq 5\%$ antes de la purificación y/o la solución acuosa contiene la sialil-lactosa con una pureza de $\geq 80\%$, preferiblemente de $\geq 85\%$ o más preferiblemente $\geq 90\%$ después de la purificación.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la sialil-lactosa es 3'-sialil-lactosa o 6'-sialil-lactosa.