

(19)



SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10)

EP/EP3680249 T3

(12)

**EUROOPPAPATENTIN KÄÄNNÖS
ÖVERSÄTTNING AV EUROPEISKT PATENT
TRANSLATION OF EUROPEAN PATENT SPECIFICATION**

(45)

Käännöksen kuulutuspäivä - Kungörelsedag av översättning -
Translation available to the public

25.04.2023

(97)

Eurooppapatentin myöntämispäivä - Meddelandedatum för
det europeiska patentet - Date of grant of European patent

01.03.2023

(51)

Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassificering -
International patent classification

C07H 1/08 (2006 . 01)

C07H 3/06 (2006 . 01)

A23L 5/00 (2016 . 01)

A23L 29/30 (2016 . 01)

A23L 33/21 (2016 . 01)

A23L 33/00 (2016 . 01)

A61K 31/702 (2006 . 01)

A61P 1/00 (2006 . 01)

A61P 1/04 (2006 . 01)

(96)

Eurooppapatenttihakemus - Europeisk patentansökan -
European patent application

EP19215076.1

Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date

(97)

Patenttihakemuksen julkiseksitulosopäivä - Patentansökans
publiceringsdag - Patent application available to the public

15.07.2020

(30)

Etuoikeus - Prioritet - Priority

20.01.2014 EP EP14151737

(73)

Haltija - Innehavare - Holder

1• Chr. Hansen HMO GmbH , Maarweg 32 , 53619 Rheinbreitbach , (DE)

(72)

Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1• Jennewein, Stefan , Wichfriedweg 14 , 53604 Bad Honnef , (DE)

(74)

Asiamies - Ombud - Agent

Patentia Oy , Vakkatie 26c , 00430 Helsinki , (FI)

(54)

Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä neutraalien äidinmaidon oligosakkaridien (HMOS) tehokkaaseen puhdistamiseen mikrobifermentaatiosta

PROCESS FOR EFFICIENT PURIFICATION OF NEUTRAL HUMAN MILK OLIGOSACCHARIDES (HMOS) FROM MICROBIAL FERMENTATION

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä neutraalin äidinmaidon oligosakkaridin (HMO) puhdistamiseksi panos- tai jatkuvalla tavalla käymisliemestä, joka on saatu mikrobifermentaatiolla käyttämällä rekombinanttia mikro-organismia,
 missä neutraali äidinmaidon oligosakkaridi on valittu ryhmästä, jonka muodostavat 2'-fukosyyililaktoosi, 3-fukosyyililaktoosi, 2',3-difukosyyililaktoosi, lakto-*N*-trioosi II, lakto-*N*-tetraoosi, lakto-*N*-neotetraoosi, lakto-*N*-fukopentaoosi I, lakto-*N*-neofukopentaoosi, lakto-*N*-fukopentaoosi II, lakto-*N*-fukopentaoosi III, lakto-*N*-fukopentaoosi V, lakto-*N*-neofukopentaoosi V, lakto-*N*-difukoheksaoosi I, lakto-*N*-difukoheksaoosi II, 6'-galaktosyyililaktoosi, 3'-galaktosyyililaktoosi, lakto-*N*-heksaoosi ja lakto-*N*-neoheksaoosi,
 missä mainittu fermentaatioliemi sisältää neutraalin HMO:n puhtaudessa < 80 %, biomassaa, väliainekomponentteja ja kontaminantteja, jotka on valittu ryhmästä, jonka muodostavat monovalenttiset suolat, kaksiarvoiset suolat, aminohapot, polypeptidit, proteiinit, orgaaniset hapot ja nukleiinihapot,
 missä käymisliettä sovelletaan seuraaviin puhdistusvaiheisiin:
 - i) biomassan erottaminen käymisliemestä,
 - ii) kationinen ioninvaihdinkäsittely positiivisesti varautuneen materiaalin poistamiseksi protonimuotoisella kationinvaihtimella,
 - iii) anioninen ioninvaihdinkäsittely negatiivisesti varautuneen materiaalin poistamiseksi, ja
 - iv) nanosuodatusvaihe ja/tai elektrodialyysivaihe,
 missä aikaansaadaan puhdistettu liuos, joka sisältää neutraalin HMO:n puhtaudessa > 80 % ja joka on vapaa mikrobifermentaatiokannan DNA:sta ja proteiineista.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, missä puhdistetun HMO:n saanto on > 70 % määritettynä soluttomasta fermentaatiioväliaineesta

HMO-konsentraatiksi.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, missä biomassan erottaminen käymisliemestä saadaan aikaan
 - 5 a) ultrasuodatuksella, edullisesti erottamalla biomassa ja materiaalit > 500 kDa, edullisemmin > 150 kDa; ja/tai
 - b) suodatuksella poikkivirtaussuodattimen läpi, edullisesti raja-arvoilla $100 \leq \text{kDa}$, edullisemmin raja-arvoilla ≤ 10 kDa, vielä edullisemmin raja-arvoilla ≤ 5 kDa;
 - 10 jolloin vaihe a) toteutetaan edullisesti ennen vaihetta b).
4. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 3 mukainen menetelmä, missä vähintään yksi puhdistusvaiheista ii) - iv) toistetaan vähintään kerran prosessin aikana.
- 15 5. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 4 mukainen menetelmä, missä fermentointiliemi levitetään vähintään kerran aktiivihiihikäsittelyyn vähintään yhden puhdistusvaiheen i) - iv) jälkeen värin antavan aineen ja suurempien oligosakkaridien adsorboimiseksi aktiivihiiheeseen.
- 20 6. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 5 mukainen menetelmä, missä
 - a) vähintään yhden puhdistusvaiheen i) - iv) jälkeen; tai
 - b) vähintään yhden aktiivihiihikäsittelyn jälkeen värin antavan materiaalin ja suurempien oligosakkaridien adsorboimiseksi aktiivihiiheeseen; tai
 - 25 c) ennen konsentroitivaihetta, joka toteutetaan vähintään yhden puhdistusvaiheen i) - iv) jälkeen;

neutraalia äidinmaidon oligosakkaridia sisältävä liuos diasuodatetaan ja/tai konsentroidaan edullisesti nanosuodatuskalvolla, edullisemmin nanosuodatuskalvolla, jonka kokoerotusraja on $\leq 20 \text{ \AA}$, jolloin saavutetaan edullisimmin

- 30 liuos diasuodatetaan, kunnes johtokyky on $\leq 15 \text{ mS/cm}$, edullisesti ≤ 10

mS/cm, edullisemmin ≤ 5 mS/cm.

7. Jonkin patenttivaatimuksista 1-6 mukainen menetelmä, missä ennen bio-
massan erottamista käymisliemestä suoritetaan glukosidaasikäsittely, edul-
lisesti β -glukosidaasikäsittely, käymisliemellä, jolloin mainittu käsittely suori-
tetaan edullisesti
 - a) lisäämällä mikro-organismikanta, joka kykenee ekspressoimaan yhtä tai
useampaa glykosidaasientsyymiä, jotka ovat sopivia hajottamaan ei-toi-
vottuja välituotteita, substraatteja ja/tai oligosakkaridisivutuotteita; ja/tai
 - b) käyttämällä fermentaatiokantaa, joka ekspressoi yhtä tai useampaa gly-
kosidaasientsyymiä, edullisesti lisäämällä indusoijaa fermentaa-
tioliemeen ja/tai muuttamalla fermentointiliemen lämpötilaa; ja/tai
 - c) lisäämällä yhtä tai useampaa glykosidaasia, edullisesti vähintään β -glu-
kosidaasia, fermentaatioliemeen raakaentsyyminä tai puhdistettuna ent-
syyminä.
8. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 7 mukainen menetelmä, missä fermentoin-
tiliemi konsentroidaan vähintään yhden puhdistusvaiheen i) - iv) jälkeen
käyttämällä tyhjöhaidutusta tai käänteisosmoosia tai nanosuodatusta
 - a) pitoisuuteen > 100 g/l, edullisesti > 200 g/l, edullisemmin > 300 g/l; ja/tai
 - b) lämpötilassa < 80 °C, edullisesti < 50 °C, edullisemmin 20 °C - 50 °C,
vielä edullisemmin 30 °C - 45 °C, tyhjöhaidutuksen tai käänteisosmoos-
sin aikana; ja/tai
 - c) lämpötilassa < 80 °C, edullisesti < 50 °C, edullisemmin 20 °C - 50 °C.
9. Jonkin patenttivaatimuksista 1-8 mukainen menetelmä, missä puhdistettu
liuos steriilisuodatetaan ja/tai altistetaan endotoksiinin poistolle, edullisesti
suodattamalla puhdistettu liuos 3 kDa:n suodattimen läpi.
10. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 9 mukainen menetelmä, missä puhdistettu
liuos konsentroidaan pitoisuuteen $> 1,5$ M ja jäähdytetään lämpötilaan < 25

°, edullisesti lämpötilaan $< 8\text{ °C}$, neutraalin HMO:n kiteisen aineen saamiseksi.

- 5 11. Jonkin patenttivaatimuksista 1-9 mukainen menetelmä, missä puhdistettu liuos sumutuskuivataan neutraalin HMO:n pitoisuudessa 20-60 % (paino/tilavuus), edullisesti 30-50 % (paino/tilavuus), edullisemmin 35-45 % (paino/tilavuus), suuttimen lämpötilassa $110\text{--}150\text{ °C}$, edullisesti $120\text{--}140\text{ °C}$, edullisemmin $125\text{--}135\text{ °C}$ ja/tai ulostulolämpötilassa $60\text{--}80\text{ °C}$, edullisesti $65\text{--}70\text{ °C}$.