

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 968 677**

51 Int. Cl.:

C07H 1/06 (2006.01)

C07H 3/06 (2006.01)

B01D 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2015** **PCT/DK2015/050158**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015** **WO15188834**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2015** **E 15806229 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2023** **EP 3154995**

54 Título: **Separación de 2-O-fucosil-lactosa de caldo de fermentación**

30 Prioridad:

11.06.2014 DK 201470348

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

13.05.2024

73 Titular/es:

GLYCOM A/S (100.0%)
Kogle Allé 4
2970 Hørsholm, DK

72 Inventor/es:

MATWIEJUK, MARTIN;
CHASSAGNE, PIERRE;
OSZTROVSZKY, GYÖRGYI;
HORVÁTH, FERENC y
DEKANY, GYULA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 968 677 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

Separación de 2'-O-fucosil-lactosa de caldo de fermentación

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un método de cristalización de 2'-O-fucosil-lactosa (2'-FL) selectivamente de un medio acuoso, particularmente procedente de la producción biotecnológica de 2'-FL.

Antecedentes de la invención

10 Se conocen muchos procedimientos para la producción biotecnológica de 2'-FL, tales como mediante fermentación con *E. coli* transformada. Algunos de ellos se han investigado solo con métodos analíticos cualitativos sin mencionar el rendimiento de 2'-FL o cómo aislarla del caldo (documentos WO 2010/070104, WO 2012/007481, Lee y cols. Microb. Cell Fact. 11:48 (2012)). Se han realizado métodos preparativos a escala de laboratorio y no superaban el título final de 25 g/l con respecto a la 2'-FL (Drouillard y cols. Angew. Chem. Int. Ed. 45, 1778 (2006); M. Randrianntsoa: Synthèse microbiologique des antigènes glucidiques des groupes sanguins, Thèse de Doctorat soutenue le 30/09/2008 à l'Université Joseph Fourier, Grenoble, Francia; documentos WO 2012/097950, WO 2012/112777; Baumgärtner y cols. Microb. Cell Fact. 12:40 (2013)). Según estas publicaciones, a continuación la 2'-FL se aislaba del medio de cultivo o el sobrenadante acuoso, en el que se fermentaba la *E. coli*, mediante:

- separación del sobrenadante que contiene el producto mediante centrifugación,
- adsorción del producto sobre un lecho de carbón vegetal activado que se lavaba con agua para eliminar contaminantes hidrosolubles como sales, aminoácidos y fragmentos de proteína, a continuación el producto se eluía con alcohol o alcohol acuoso, y a continuación z
- 20 - separación de 2'-FL de otros carbohidratos como lactosa y fucosa mediante cromatografía de permeación en gel o cromatografía flash sobre un lecho de carbón vegetal-Celite.

25 La principal desventaja de este método de aislamiento ha sido la necesidad de una separación cromatográfica a fin bien de conseguir la sustancia pura o bien de obtener al menos una mezcla que esté enriquecida en el compuesto buscado aunque todavía contenga derivados no deseados. Aunque las separaciones cromatográficas repetidas pueden dar como resultado la mejora de la pureza, su alto coste y tiempo tecnológicos relativamente prolongados para manejar la solución alimentada y el relleno de la columna, para llevar a cabo la separación y opcionalmente para regenerar el relleno, especialmente a gran escala o industrial, pueden ser poco ventajosos y/o engorrosos.

30 La cristalización o recristalización es uno de los métodos más simples y económicos para aislar un producto de una mezcla de reacción, separarlo de contaminaciones y obtener una sustancia pura. El aislamiento o la purificación que usa cristalización hace robusto y rentable todo el procedimiento tecnológico, así, es ventajoso y atractivo en comparación con otros procedimientos. Por esta razón, la 2'-FL, producida mediante procedimientos químicos sintéticos, se ha aislado mediante cristalización (documentos WO 2010/070616, WO 2011/150939, WO 2014/009921), o la producida mediante fermentación (documentos WO 98/12343, EP0870841) se ha aislado mediante cristalización (documento WO 2014/ 069625).

35 Sin embargo, debido a los subproductos producidos en medio de cultivo acuoso durante la fermentación de 2'-FL, sigue existiendo una necesidad de un procedimiento eficaz para cristalizar 2'-FL del medio de cultivo acuoso.

Sumario de la invención

40 La invención se refiere a un método para la cristalización selectiva de 2'-FL de una solución acuosa, derivada de un medio de cultivo acuoso que comprende 2'-FL y un carbohidrato fucosilado diferente de 2'-FL, al añadir uno o más alcoholes C₁-C₄ a la solución, solución acuosa que se produce mediante un procedimiento que comprende las etapas de:

- i. cultivar, en un medio de cultivo acuoso que contiene lactosa, una célula, preferiblemente una célula de *E. coli*, modificada genéticamente que tiene un gen recombinante que codifica una 1,2-fucosil transferasa y es capaz de producir 2'-FL al fucosilar lactosa, y
- 45 ii. separar la solución acuosa de materiales en partículas no glucídicos y contaminantes del medio de cultivo acuoso,

50 donde la 2'-FL cristalina presenta reflexiones de difracción de rayos X del polvo, basadas en una medición usando radiación de CuK α , a ángulos 2 θ 16,98 $\pm$ 0,20, 13,65 $\pm$ 0,20 y 18,32 $\pm$ 0,20 2 θ , más preferiblemente a ángulos 2 θ 16,98 $\pm$ 0,20, 13,65 $\pm$ 0,20, 18,32 $\pm$ 0,20 y 21,70 $\pm$ 0,20, aún más preferiblemente a ángulos 2 θ 16,98 $\pm$ 0,20, 13,65 $\pm$ 0,20, 18,32 $\pm$ 0,20, 21,70 $\pm$ 0,20 y 15,22 $\pm$ 0,20, lo más preferiblemente a ángulos 2 θ 16,98 $\pm$ 0,20, 13,65 $\pm$ 0,20, 18,32 $\pm$ 0,20, 21,70 $\pm$ 0,20, 15,22 $\pm$ 0,20 y 20,63 $\pm$ 0,20, en particular a ángulos 2 θ 16,98 $\pm$ 0,20, 13,65 $\pm$ 0,20, 18,32 $\pm$ 0,20, 21,70 $\pm$ 0,20, 15,22 $\pm$ 0,20, 20,63 $\pm$ 0,20 y 11,94 $\pm$ 0,20 .

También preferiblemente, la solución acuosa es de 35-80% p/p con respecto a su contenido de carbohidratos, 45-95% de la cual es 2'-FL en peso, y la relación 2'-FL/DFL no es menor de alrededor de 1:1.

Descripción detallada de la invención

Como resultado de investigaciones recientes en la producción de 2'-FL al cultivar *E. coli* genéticamente modificada, se han producido caldos de fermentación acuosos con un título significativamente superior de 2'-FL, p. ej. al menos 75 gramos, más preferiblemente al menos 100 gramos, particularmente a alrededor de o más de 115 gramos de 2'-FL por litro del medio de cultivo. Sin embargo, carbohidratos fucosilados distintos de 2'-FL, particularmente 2',3-di-O-fucosil-lactosa (DFL), así como 2'-O-fucosil-lactulosa, también se han encontrado como subproductos en estos caldos de fermentación acuosos de título alto en una relación DFL/2'-FL de 2:8 a 1:9 en peso. Por otra parte, dependiendo del protocolo de fermentación, también podría detectarse lactosa en estos caldos acuosos de título alto.

Se ha descubierto ahora que la 2'-FL se puede cristalizar selectivamente en una solución acuosa de título alto, obtenida a partir de tal caldo de fermentación de título alto, al tratar la solución acuosa con uno o más alcoholes C₁-C₄, preferiblemente metanol. Esta cristalización selectiva es particularmente ventajosa y sorprendente cuando la solución acuosa también contiene otros carbohidratos fucosilados y/o lactosa. Esta cristalización selectiva proporciona 2'-FL de alta pureza en una etapa y, típicamente, se puede alcanzar la cristalización de lotes de al menos 100 g de 2'-FL, tal como al menos 1 kg, o al menos 100 kg, o incluso al menos 1 tonelada de 2'-FL, con un amplio intervalo de concentraciones de los compuestos de tipo sacarino contaminantes en el caldo de fermentación acuoso.

Según esto, un aspecto de esta invención es un método para la cristalización selectiva de 2'-FL, caracterizado por que la cristalización se lleva a cabo a partir de una solución acuosa, preferiblemente un caldo de fermentación, que comprende 2'-FL y un carbohidrato fucosilado distinto de 2'-FL, al añadir uno o más alcoholes C₁-C₄ a la solución acuosa. La 2'-FL cristalina resultante es un polimorfo II según se describe en el documento WO 2011/150939.

El término "alcohol C₁-C₄" se refiere preferiblemente a un alcohol mono- o dihidroxilado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono tal como metanol, etanol, n-propanol, i-propanol, n-butanol, i-butanol, s-butanol, t-butanol, etilenglicol, propilenglicol, etc. Preferiblemente, se usa un alcohol o alcoholes monohidroxilados tales como metanol, etanol, n-propanol, i-propanol, n-butanol, i-butanol, s-butanol o t-butanol.

En una realización preferida, la solución acuosa contiene 35-80% p/p, preferiblemente 40-68% p/p, más preferiblemente 45-60% p/p, particularmente 50-56% p/p de carbohidratos totales incluyendo 2'-FL y otros carbohidratos fucosilados y no fucosilados. Los intervalos de concentración anteriores se pueden conseguir fácilmente al concentrar el sobrenadante acuoso procedente de la fermentación, preferiblemente después de retirar, p. ej., células, proteínas, fragmentos de proteína, ADN, subproductos caramelizados, sales y/o moléculas cargadas. Estos intervalos de concentración se pueden conseguir de forma convencional, p. ej. al destilar agua a presión reducida (20-100 mbar) y a temperatura ambiente hasta 40-60°C o mediante nanofiltración.

A continuación, la solución acuosa resultante se mantiene a alrededor de 40-60°C, y uno o más alcoholes C₁-C₄, preferiblemente calientes, se añaden a la solución. La solución acuoso-alcohólica resultante se agita a la misma temperatura típicamente durante 0,5-3 horas y se deja enfriar hasta temperatura ambiente mientras se produce cristalización espontánea. La cristalización se puede iniciar al añadir cristales de siembra.

Preferiblemente, 45-95% del contenido de carbohidratos total, incluyendo 2'-FL y otros carbohidratos fucosilados y no fucosilados, en la solución acuosa, antes de la cristalización, es 2'-FL. Las condiciones de cristalización definidas anteriormente permiten un amplio intervalo de contenido de 2'-FL con relación al contenido de carbohidratos total bajo el cual se puede efectuar una cristalización selectiva de 2'-FL con alto rendimiento y buena pureza. Según esto, la cristalización selectiva se puede llevar a cabo a partir de una solución acuosa que es de 35-80% p/p con respecto al contenido de carbohidratos total que comprende 2'-FL y otros carbohidratos fucosilados y no fucosilados, y alrededor de 50%, o alrededor de 60%, o alrededor de 70%, o alrededor de 80%, o alrededor de 90% de los cuales es 2'-FL.

Preferiblemente, el volumen del uno o más alcoholes C₁-C₄ a añadir a la solución acuosa descrita anteriormente es aproximadamente 3-9 veces con relación al peso de 2'-FL en esa solución acuosa, más preferiblemente aproximadamente 4-8 volúmenes y aún más preferiblemente aproximadamente 5-7 volúmenes con relación al peso de 2'-FL que se puede añadir en una, dos o incluso más porciones.

Además, preferiblemente, el carbohidrato fucosilado distinto de 2'-FL en la solución acuosa es una lactosa fucosilada distinta de 2'-FL y/o una lactulosa fucosilada, preferiblemente una lactosa fucosilada distinta de 2'-FL. Una lactosa fucosilada distinta de 2'-FL puede ser cualquier lactosa monofucosilada distinta de 2'-FL que puede formarse durante la fermentación como resultado de una fucosilación deficiente, defectuosa o alterada distinta de una α-1,2-fucosilación sobre el resto de galactosa de la lactosa (p. ej. una que conduzca a 3-O-fucosil-lactosa, 3-FL), o de la migración de fucosa de 2'-FL bajo la condición de cultivo o después de operaciones fermentativas, o de hidrólisis de fucosa a partir de lactosa multifucosilada, preferiblemente lactosa difucosilada. Una lactosa fucosilada distinta de 2'-FL también puede ser una lactosa multifucosilada, preferiblemente difucosilada, que se puede formar como resultado de la sobrefucosilación de lactosa bajo la condición de cultivo. La lactosa difucosilada es preferiblemente 2,2'-di-O-fucosil-lactosa o 2',3-di-O-fucosil-lactosa (DFL), particularmente DFL como un subproducto característico formado en una producción fermentativa de 2'-FL.

En una realización más preferida de un método para la cristalización selectiva de 2'-FL a partir de una solución acuosa que comprende 2'-FL y DFL, la relación 2'-FL/DFL en peso puede variar en amplios intervalos sin el peligro de que la DFL se cocrystalice significativamente junto con la 2'-FL, pero no es menor de 1:1. Así, la cristalización selectiva trabaja eficazmente a una relación 2'-FL/DFL mayor de 1:1, preferiblemente mayor de 2:1, más preferiblemente mayor de 4:1, aún más preferiblemente mayor de 6:1, particularmente alrededor de entre 8:1 y 12:1.

La solución acuosa que contiene 2'-FL y DFL de la que la 2'-FL se puede cristalizar selectivamente puede comprender además contaminantes de tipo glucídico como 2-O-fucosil-lactulosa, lactosa, lactulosa, fucosa, glucosa, galactosa y similares. Estos contaminantes podrían haberse formado durante la fermentación o en las etapas de purificación/aislamiento posfermentativas p. ej. mediante transposición (p. ej. 2-O-fucosil-lactulosa, lactulosa) o mediante hidrólisis (p. ej. fucosa, glucosa, galactosa, lactosa), o puede ser un educto o ingrediente no consumido añadido durante la fermentación (p. ej. lactosa como aceptor, glucosa como fuente de carbono). Estos contaminantes de tipo sacarino se detectan en la solución acuosa que se va a usar para la cristalización en una concentración no mayor de 1-2% p/p (individualmente), o 5-7% p/p (en conjunto). Típicamente, la solución acuosa que contiene 2'-FL y DFL y destinada al uso con fines de cristalización, puede contener además lactosa como aceptor no usado añadido durante la fermentación para formar 2'-FL a partir de lactosa mediante fucosilación en menos de 1% p/p.

No obstante, preferiblemente, el método para la cristalización de 2'-FL a partir de una solución acuosa que comprende 2'-FL y un carbohidrato fucosilado distinto de 2'-FL, preferiblemente DFL, se efectúa al añadir solo un alcohol C₁-C₄, más preferiblemente un alcohol C₁-C₂ (esto es, metanol o etanol), entre los que el metanol es la elección más preferible para un alcohol.

Según una realización preferida del método para cristalizar selectivamente 2'-FL, la solución acuosa usada para la cristalización comprende 2'-FL, DFL y opcionalmente lactosa en una concentración de 40-68% p/p, más preferiblemente 45-60% p/p, particularmente 50-56% p/p. La proporción de 2'-FL en la masa de carbohidratos definida anteriormente de la solución acuosa definida anteriormente es mayor de alrededor de 80%, más preferiblemente mayor de aproximadamente 85% y particularmente aproximadamente 90%. La relación 2'-FL/DFL en la masa de carbohidratos definida anteriormente es de alrededor de 8:1 a 12:1 en peso. A esta solución acuosa, preferiblemente después de calentarla hasta alrededor de 45-55°C y mientras se agita, se añade metanol, preferiblemente en 2-3 porciones aproximadamente iguales, mientras la temperatura se mantiene en el intervalo dado. Después de la adición de toda la cantidad de metanol, que es típicamente 4-8 volúmenes, más preferiblemente 5-7 volúmenes con relación al peso de 2'-FL en la solución acuosa, la temperatura de la mezcla agitada se mantiene al mismo nivel que al que se añadía el metanol durante 0,5-2 horas, a continuación la mezcla se deja enfriar hasta temperatura ambiente a la que la agitación se continúa durante 12-24 horas. La cristalización se produce espontáneamente durante la adición de metanol o en la fase de enfriamiento, pero la cristalización se puede facilitar mediante la adición de cristales de siembra de 2'-FL.

Según otra realización preferida del método para cristalización selectiva de 2'-FL, la mezcla acuosa de partida comprende 2'-FL, DFL y opcionalmente lactosa en una concentración de 50-80% p/p, más preferiblemente 55-70% p/p, particularmente alrededor de 60-68% p/p. La proporción de 2'-FL en la masa de carbohidratos definida anteriormente de la solución acuosa definida anteriormente es de alrededor de 48-65%, y la relación 2'-FL/DFL en la masa de carbohidratos definida anteriormente es de alrededor de 1:1 a 2:1 en peso. A esta solución acuosa, preferiblemente después de calentarla hasta alrededor de 55-60°C y mientras se agita, se añade metanol, preferiblemente en 2-3 porciones aproximadamente iguales, mientras la temperatura se mantiene en el intervalo dado. Después de la adición de toda la cantidad de metanol, que es típicamente de alrededor de 5-8,5 volúmenes, más preferiblemente alrededor de 6,5-7,5 volúmenes con relación al peso de 2'-FL en la solución acuosa, la temperatura de la mezcla agitada se mantiene a la misma temperatura a la que se añadía el metanol durante 0,5-2 horas, a continuación la mezcla se deja enfriar hasta temperatura ambiente a la que la agitación se continúa durante de 12 horas as 3 días. La cristalización se produce espontáneamente durante la adición de metanol o en la fase de enfriamiento, pero la cristalización se puede facilitar mediante la adición de cristales de siembra de 2'-FL.

La solución acuosa que comprende 2'-FL y un carbohidrato fucosilado distinto de 2'-FL, preferiblemente DFL, para cristalizar selectivamente 2'-FL según la presente invención descrita anteriormente con detalle se produce mediante un procedimiento que comprende las etapas:

i. cultivar, en un medio de cultivo acuoso que contiene lactosa, una célula, preferiblemente una célula de *E. coli*, modificada genéticamente que tiene un gen recombinante que codifica una α -1,2-fucosil-transferasa y es capaz de producir 2'-FL al fucosilar lactosa, y

ii. separación de la fracción acuosa de carbohidratos que comprende 2'-FL y una lactosa fucosilada distinta de 2'-FL, preferiblemente DFL, de materiales en partículas no glucídicos y contaminantes del caldo de fermentación.

La etapa ii) en el procedimiento anterior puede comprender una etapa de desmineralización convencional durante la cual se extraen minerales, sales y otras moléculas cargadas de la solución acuosa antes de la cristalización. La desmineralización se puede efectuar al usar resinas de intercambio iónico convencionales, a saber haciendo pasar la solución acuosa a través de una resina de intercambio catiónico en forma H⁺ y una resina de intercambio aniónico en forma de base libre. La resina de intercambio catiónico es preferiblemente un intercambiador fuerte, y la resina de

intercambio aniónico es un intercambiador débil. Las resinas de intercambio iónico, además de retirar sales y moléculas cargadas de la solución, pueden absorber físicamente proteínas, ADN y cuerpos colorantes/caramelizados que opcionalmente quedan en la solución después de etapas de purificación previas. Alternativamente, la desmineralización se puede efectuar por medio de una electrodiálisis convencional. La solución obtenida mediante cualquiera de los modos anteriores puede concentrarse a continuación bien mediante una etapa de evaporación convencional o bien mediante una etapa de nanofiltración convencional.

Además, la etapa ii) en el procedimiento anterior puede comprender además un tratamiento convencional con carbón vegetal, preferiblemente antes de la etapa de desmineralización, para retirar cuerpos coloreados y opcionalmente biobasura hidrosoluble que quede opcionalmente de etapas de purificación previas. Los compuestos glucídicos tienen una fuerte afinidad para ser adsorbidos sobre carbón vegetal en medio acuoso, así, los contaminantes hidrosolubles se pueden separar fácilmente por lavado con agua (destilada). Los carbohidratos se pueden eluir a continuación del lecho de carbón vegetal con alcohol o alcohol acuoso.

Por otra parte, la etapa ii) en el procedimiento anterior puede comprender una etapa de clarificación convencional para retirar células, fragmentos de células y proteínas después de la fermentación, preferiblemente antes del tratamiento con carbón vegetal descrito anteriormente. La clarificación se puede realizar de manera convencional, p. ej. mediante sedimentación en una centrífuga produciendo una solución sobrenadante clarificada o parcialmente clarificada. Alternativamente, el caldo de fermentación se puede someter a ultrafiltración de manera convencional para retirar componentes de alto peso molecular. La membrana semipermeable usada para ultrafiltrar un caldo de fermentación de 2'-FL puede tener adecuadamente un corte de 5-50 kDa, preferiblemente 10-25 kDa, más preferiblemente alrededor de 15 kDa. Dependiendo de las características del caldo de fermentación a clarificar, se puede emplear una combinación de membranas de corte superior e inferior (en este orden) dentro del intervalo dado anteriormente. Opcionalmente, la centrifugación o ultrafiltración puede estar seguida de nanofiltración, durante la cual la solución acuosa que contiene 2'-FL y carbohidratos adjuntos se concentra de manera convencional antes de tratarse con carbón vegetal. En esta etapa de nanofiltración, su membrana puede tener un tamaño de poro que asegure la retención de 2'-FL que tiene un peso molecular de 488; así, típicamente, se puede usar una membrana de 200-300 Da de corte.

La etapa i) en el procedimiento anterior comprende preferiblemente la producción de 2'-FL con alto título. Se usa una cepa de *E. coli*, particularmente una cepa de *E. coli* LacZ⁺Y⁺, que tiene solo una glicosil transferasa recombinante que es una α -1,2-fucosil transferasa, preferiblemente una α -1,2-fucosil transferasa codificada por el gen *futC* de *Helicobacter pylori*. Para elaborar una mezcla de 2'-FL con alto rendimiento, el método comprende preferiblemente: a) proporcionar al medio de cultivo una fuente de carbono y energía y al menos 50, preferiblemente al menos 75, más preferiblemente al menos 100, aún más preferiblemente al menos 125 gramos de lactosa basándose en 1 litro de volumen de cultivo inicial. El método también comprende preferiblemente: b) proporcionar lactosa al medio de cultivo durante más de 4 días, preferiblemente hasta 7 días, preferiblemente de manera continua. Se prefiere particularmente que el método comprenda ambas etapas a) y b). También se prefiere particularmente que el volumen final del medio de cultivo no sea más de tres veces, más preferiblemente no más de dos veces, particularmente menos de dos veces del volumen del medio de cultivo antes de proporcionar la lactosa y la fuente de carbono y energía, preferiblemente glicerol, al medio de cultivo. El cultivo se realiza preferiblemente del siguiente modo:

- una primera fase de crecimiento celular exponencial asegurada por un sustrato basado en carbono, y
- una segunda fase de crecimiento celular limitado por una fuente de carbono y energía que se añade continuamente, junto con la lactosa que se añade continuamente.

La *E. coli* preferiblemente se cultiva continuamente, preferiblemente durante al menos 4 días, particularmente hasta 7 días, pero no más de aproximadamente 9-10 días, preferiblemente a una temperatura de 30 a 35°C, y preferiblemente con agitación continua, aireación continua y alimentación continua de la fuente de carbono y energía y la lactosa. El caldo de fermentación así producido comprende preferiblemente al menos 75 gramos, más preferiblemente al menos 100 gramos, particularmente hasta 115 gramos por litro del medio de cultivo en el sobrenadante. Además, la fracción extracelular contiene DFL hasta alrededor de 2,5-20% p/p con relación a 2'-FL. La mezcla de 2'-FL + DFL contiene opcionalmente lactulosa fucosilada ((2'-O-fucosil-lactulosa), que se produce en el medio de cultivo, y/o lactosa como aceptor no consumido.

Ejemplos

Ejemplo 1

Producción de 2'-FL con alto rendimiento

Cepas bacterianas y preparación del inóculo:

- 5 Se construyó *E. coli* manipulada a partir de la cepa de *E. coli* K según el documento WO 01/04341 y Drouillard y cols. Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 45, 1778 (2006), al eliminar genes que son propensos a degradar lactosa, los productos de oligosacárido y sus productos intermedios metabólicos, entre otros los genes lacZ, lacA y wcaJ, manteniendo los genes manB, manC, gmd y wcaG implicados en la biosíntesis de GDP-fucosa, e insertando el gen futC de *H. pylori* para la α -1,2-fucosil transferasa, como única glicosil transferasa.

- 10 Condición de fermentación:

Cada uno de la glucosa, el glicerol, el isopropil-tio- β -D-galactopiranosido (IPTG) y la lactosa se esterilizó a 120°C.

- 15 El cultivo se llevó a cabo en un fermentador de 3 l que contenía 1,5 l de medio de cultivo mineral (Samain y cols. J. Biotechnol. 72, 33 (1999)). La temperatura se mantuvo a 33°C y el pH se reguló a 6,8 con 28% de NH₄OH. El inóculo (1% del volumen del medio basal) consistía en un medio de LB y el cultivo de la cepa productora. La fase de crecimiento exponencial empezaba con la inoculación y se detenía cuando se agotaba la fuente de carbono (glucosa 17,5 g/l) añadida inicialmente al medio. El inductor (isopropil-tio- β -D-galactopiranosido, IPTG, 1-2 ml de una solución de 50 mg/ml) se añadió al final de la fase exponencial. A continuación, se realizó una alimentación discontinua, usando 1 l de una solución de alimentación que contenía 500 g de glicerol y 160-200 g de lactosa disuelta en agua, que se añadió al cultivo durante 4-7 días. Al final de la fermentación, la concentración de 2'-FL variaba entre 68-114 g/l, y la relación 2'-FL:DFL variaba entre alrededor de 80:20 y 88:12 en la mezcla producida. La lactulosa fucosilada (2'-O-fucosil-lactulosa) no era más de 1% en esta mezcla.
- 20

Ejemplo 2

Purificación del caldo

- 25 Se retiraron células y proteínas mediante ultrafiltración y la solución obtenida se concentró mediante nanofiltración hasta alrededor de 400 ml (la solución contenía $\approx$ 93 g de 2'-FL, $\approx$ 10,5 g de DFL y $\approx$ 0,5 g de lactosa). A continuación la solución se trató con carbón vegetal (8 g) para la decoloración. La solución decolorada se eluyó a través de una resina de intercambio catiónico fuerte (forma H⁺) y una resina de intercambio aniónico débil (forma de base libre) para desmineralizarla y atrapar el color restante (eluyente: agua desmineralizada). No se observó separación de carbohidratos. Las fracciones positivas a carbohidratos se reunieron y se concentraron hasta 216 g a presión reducida (20-30 mbar) a 40°C. El análisis de la solución casi incolora resultante no mostraba pérdida de 2'-FL, DFL ni lactosa por adsorción sobre el carbón vegetal y las resinas, y la presencia de $\approx$ 10-15 g de otros contaminantes no analizados.
- 30

Ejemplo 3

Cristalización selectiva de 2'-FL de una mezcla de 2'-FL/DFL $\approx$ 8,9:1

- 35 El concentrado procedente del Ejemplo 2 se calentó a continuación hasta 50°C y se añadieron lentamente 280 ml de metanol bajo agitación mientras se mantenía la temperatura. Después de la adición de cristales de siembra (50 mg), se añadió lentamente otra porción de metanol (280 ml) a 50°C y la agitación restante se continuó a esta temperatura durante 1 hora. La solución de cristalización se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 18 horas. El sólido se filtró, se lavó con metanol frío y se secó bajo vacío (15 mbar) a 50°C durante 16 horas para dar 82 g de cristales blancos. Ensayo de 2'-FL mediante HPLC: 97,8%, mediante IC: 97,1%; contenido de agua: 0,64% (KF); pureza rel. de 2'-FL mediante HPLC: 99,1%, mediante IC: 99,4%; rendimiento de la cristalización selectiva: 86%.
- 40

Ejemplo 4

Cristalización selectiva de 2'-FL a partir de una mezcla de 2'-FL/DFL $\approx$ 1:1

- 45 Las aguas madres del Ejemplo 3 se liofilizaron. Una muestra del polvo liofilizado (20 g, que contenía $\approx$ 8,4 g de 2'-FL, $\approx$ 8,4 g de DFL y $\approx$ 0,3 g de lactosa) se recogió en agua (5 ml) y metanol (60 ml) a 60°C, la mezcla se sembró y se agitó durante 1 hora y a continuación se enfrió hasta temperatura ambiente y se agitó durante 3 días. Los cristales blancos se separaron por filtración y se secaron para dar 6,9 g. Ensayo de 2'-FL mediante HPLC: 93,3 %.

Ejemplo 5

Cristalización selectiva de 2'-FL de una mezcla de 2'-FL/DFL $\approx$ 1,7:1

- 50 La cristalización se realizó según el Ejemplo 3 a partir de una solución que contenía $\approx$ 23 g de 2'-FL, $\approx$ 2,5 g de DFL y $\approx$ 0,15 g de lactosa (100 ml) obtenida a partir de un caldo de fermentación después de ultra- y nanofiltración para dar

- 5 18,7 g de 2'-FL. El metanol se separó por destilación de las aguas madres y se concentró hasta un peso de 11 g (que contenían $\approx 4,2$ g de 2'-FL y $\approx 2,5$ g de DFL). El jarabe resultante se calentó hasta 60°C y se añadió metanol (30 ml) en porciones, entre dos porciones de metanol la solución se sembró. Después de 1 hora de agitación a reflujo, la suspensión se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, los cristales se separaron por filtración, se lavaron y se secaron para proporcionar 3,2 g de 2'-FL.

Ejemplo 6

Cristalización selectiva de 2'-FL de una mezcla de 2'-FL/DFL $\approx 10,2:1$

- 10 Una solución acuosa que contenía 173 g de 2'-FL, 17 g de DFL y 4 g de lactosa (600 ml), obtenida a partir de un caldo de fermentación después de ultrafiltración, nanofiltración y tratamiento con carbón vegetal y resinas de intercambio iónico según se divulga en el Ejemplo 2 se concentró mediante destilación a vacío (70-100 mbar, 50-60°C) hasta alrededor de 270 ml. A la mezcla resultante se añadió metanol (1040 ml) mientras se mantenía la solución a alrededor de 50°C. A continuación, se añadieron cristales de siembra y la agitación se continuó a 50°C durante 1 hora y a temperatura ambiente durante 15 horas. Los cristales se separaron por filtración, se lavaron con metanol frío y se secaron bajo vacío para dar 158 g de sólido blanco (91%).

REIVINDICACIONES

1. Método para la cristalización de 2'-FL, caracterizado por que la cristalización se lleva a cabo a partir de una solución acuosa que comprende 2'-FL y un carbohidrato fucosilado distinto de 2'-FL al añadir uno o más alcoholes C₁-C₄ a la solución, solución acuosa que se produce mediante un procedimiento que comprende las etapas de:

- 5 i. cultivar, en un medio de cultivo acuoso que contiene lactosa, una célula, preferiblemente una célula de *E. coli*, modificada genéticamente que tiene un gen recombinante que codifica una 1,2-fucosil-transferasa y es capaz de producir 2'-FL al fucosilar lactosa, y
- ii. separar la solución acuosa de materiales en partículas no glucídicos y contaminantes del medio de cultivo acuoso,
- 10 donde la 2'-FL cristalina presenta reflexiones de difracción de rayos X del polvo, basadas en una medición que usa radiación de CuK α , a ángulos 2 Θ 16,98 $\pm$ 0,20, 13,65 $\pm$ 0,20 y 18,32 $\pm$ 0,20, más preferiblemente a ángulos 2 Θ 16,98 $\pm$ 0,20, 13,65 $\pm$ 0,20, 18,32 $\pm$ 0,20 y 21,70 $\pm$ 0,20, aún más preferiblemente a ángulos 2 Θ 16,98 $\pm$ 0,20, 13,65 $\pm$ 0,20, 18,32 $\pm$ 0,20, 21,70 $\pm$ 0,20 y 15,22 $\pm$ 0,20, lo más preferiblemente a ángulos 2 Θ 16,98 $\pm$ 0,20, 13,65 $\pm$ 0,20, 18,32 $\pm$ 0,20, 21,70 $\pm$ 0,20, 15,22 $\pm$ 0,20 y 20,63 $\pm$ 0,20, en particular a ángulos 2 Θ 16,98 $\pm$ 0,20, 13,65 $\pm$ 0,20, 18,32 $\pm$ 0,20, 21,70 $\pm$ 0,20, 15,22 $\pm$ 0,20, 20,63 $\pm$ 0,20 y 11,94 $\pm$ 0,20 .
- 15 2. El método según la reivindicación 1, donde la solución acuosa es de 35-80% p/p con respecto a su contenido de carbohidratos.
3. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde 45-95% de los carbohidratos en la solución acuosa es 2'-FL en peso.
- 20 4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde se añaden 3-9 volúmenes de alcohol con relación al peso de 2'-FL.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la lactosa fucosilada distinta de 2'-FL es DFL.
6. El método según la reivindicación 5, donde la relación 2'-FL/DFL no es menor de alrededor de 1:1 en peso.
7. El método según la reivindicación 6, donde la relación 2'-FL/DFL es mayor de 1:1, preferiblemente mayor de 2:1, más preferiblemente mayor de 4:1, aún más preferiblemente mayor de 6:1, particularmente entre 8:1 y 12:1
- 25 8. El método según la reivindicación 6 o 7, donde la solución acuosa es de 40-68% p/p, más preferiblemente 45-60% p/p, particularmente 50-56% p/p, y la relación 2'-FL/DFL es de alrededor de 8:1 a 12:1 en peso.
9. El método según la reivindicación 6 o 7, donde la solución acuosa es de 50-80% p/p, más preferiblemente 55-70% p/p, particularmente alrededor de 60-68% p/p y la relación 2'-FU/DFL es de alrededor de 1:1 a 2:1 en peso.
- 30 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la solución acuosa contiene además lactosa.
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el alcohol C₁-C₄ es metanol o etanol, preferiblemente metanol.
12. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la etapa ii. comprende además un tratamiento con resina de intercambio iónico para desmineralizar y/o decolorar el caldo de fermentación obtenido en la etapa i.
- 35 13. El método según la reivindicación 12, donde el tratamiento con resina de intercambio iónico está precedido por la ultrafiltración del caldo de fermentación obtenido en la etapa i.
14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la célula modificada genéticamente es una célula de *E. coli* LacZ-Y⁺ que tiene una glicosil transferasa recombinante que es una α -1,2-fucosil transferasa.
- 40