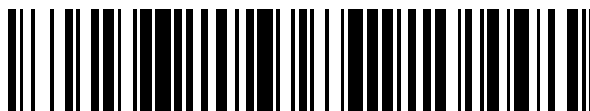


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 398**

51 Int. Cl.:

**C07H 5/06**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2002 PCT/JP2002/005787**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2002 WO02100875**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2002 E 02733463 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 1405856**

54 Título: **Cristales de oligosacáridos y procesos para la preparación de los mismos**

30 Prioridad:

**11.06.2001 JP 2001175930**

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

**04.02.2019**

73 Titular/es:

**KYOWA HAKKO BIO CO., LTD. (100.0%)  
1-6-1 Ohtemachi, Chiyoda-ku  
Tokyo 100-8185, JP**

72 Inventor/es:

**SHIMOSE, TSUYOSHI;  
NAGANO, HIROSHI;  
ARIMOTO, MASARU y  
MURATA, HIDEKI**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 698 398 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

Cristales de oligosacáridos y procesos para la preparación de los mismos

## 5 Campo técnico

La presente invención se refiere a cristales de un oligosacárido útil, por ejemplo, como materiales de partida o como compuestos intermedios para alimentos saludables, composiciones farmacéuticas, cosméticos, etc., y un proceso para producir cristales de un oligosacárido.

10

## Antecedentes de la técnica

Los oligosacáridos son útiles, por ejemplo, como materiales de partida o como compuestos intermedios para alimentos saludables, composiciones farmacéuticas, cosméticos, etc. Por lo tanto, existe una demanda de oligosacáridos con una buena estabilidad durante su almacenamiento y de una pureza elevada que no contengan impurezas, productos de descomposición o similares. Se han realizado algunos informes sobre métodos para síntesis o fermentación de oligosacáridos [Chem. Rev., Vol. 100, p. 4465 (2000); Curr. Opin. in Drug Discovery & Develop., Vol. 3, p. 756 (2000); documento WO98/12343; documento WO99/40205]. En estos métodos, los productos finales normalmente se tienen en forma de polvos (amorfos) mediante tratamiento de liofilización, y se considera que su obtención en forma de cristales es difícil. Generalmente se sabe que los polvos (amorfos) obtenidos mediante tratamiento de liofilización tienen un problema con respecto a la estabilidad debido a su higroscopia, delicuescencia, etc., y por lo tanto es necesario refrigerarlos o congelarlos cuando se almacenan, transportan, distribuyen, etc. Por lo tanto, existe una demanda de cristales de un oligosacárido que se puedan almacenar a temperaturas ordinarias y un proceso para la producción de los mismos para un gran suministro de oligosacáridos a escala industrial.

Kuhn *et al.*, (Chemische Berichte, 1956 vol. 89 (11), pp 2513-23) desvelan la cristalización de la Fucosillactosa e Imberty *et al.*, (carb. Res. 181 (1988) 41-55) la cristalización de panosa. Otro ejemplo conocido de cristales de un oligosacárido son los cristales de Lewis X [Gal  $\beta$ 1, 4 (Fuc $\alpha$ 1, 2) GlcNAc], y se conoce un proceso para la producción de los mismos [Glycobiology, Vol. 6, p. 537 (1996)]. Sin embargo, el proceso necesita un periodo de tiempo extremadamente largo tal como dos años para cristalización, y por lo tanto no es adecuado para síntesis o industrialización a gran escala. Por lo tanto, existe una demanda de un proceso para producir cristales de un oligosacárido que se pueda cristalizar en un breve periodo de tiempo.

## 35 Divulgación de la invención

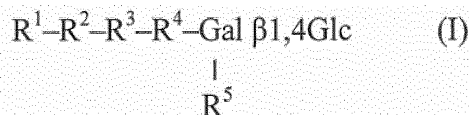
Un objeto de la presente invención es proporcionar cristales de un oligosacárido útil, por ejemplo, como materiales o como con costos intermedios para alimentos saludables, composiciones farmacéuticas, cosméticos, etc., y un proceso para producir cristales de un oligosacárido que sea adecuado para síntesis o industrialización a gran escala.

40

La presente invención se refiere a los siguientes (1) a (11).

(1) Un proceso para producir cristales de un oligosacárido que comprende añadir una solución acuosa que contiene un oligosacárido representado por la fórmula general (I):

45



[en la que Gal representa galactosa (en lo sucesivo en el presente documento abreviado de la misma manera); Glc representa glucosa (en lo sucesivo en el presente documento abreviado de la misma manera); R<sup>1</sup> representa GlcNAc (en el que GlcNAc representa N-acetilglucosamina, que en lo sucesivo en el presente documento se abrevia de la misma manera), NeuAc (en el que NeuAc representa ácido N-acetilneuramínico, que en lo sucesivo en el presente documento se abrevia de la misma manera), Gal, Fuc (en el que Fuc representa fucosa, que en lo sucesivo en el presente documento se abrevia de la misma manera) o GalNAc (en el que GalNAc representa N-acetilgalactosamina, que en lo sucesivo en el presente documento se abrevia de la misma manera); R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup>, que pueden ser iguales o diferentes, cada uno representa un enlace sencillo, GlcNAc, NeuAc, Gal, Fuc o GalNAc; y R<sup>5</sup> representa un átomo de hidrógeno, GlcNAc, NeuAc, Gal, Fuc o GalNAc] con respecto a un disolvente orgánico miscible en agua, en el que en el que el disolvente orgánico miscible en agua es metanol o acetona.

(2) El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con (1), en el que R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup>, que pueden ser iguales o diferentes, son cada uno GlcNAc, NeuAc, Gal, Fuc o GalNAc.

(3) El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con (1), en el que R<sup>4</sup> es un enlace sencillo.

(4) El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con (1), en el que R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno un enlace sencillo.

(5) El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con (1), en el que R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno un enlace sencillo.

(6) El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con (3), en el que R<sup>1</sup> es GlcNAc; R<sup>2</sup> es Gal; R<sup>3</sup> es GlcNAc; y R<sup>5</sup> es un átomo de hidrógeno.

(7) El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con (4), en el que R<sup>1</sup> es NeuAc o Gal; R<sup>2</sup> es GlcNAc o GalNAc; y R<sup>5</sup> es un átomo de hidrógeno.

(8) El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con (5), en el que R<sup>1</sup> es GlcNAc, Gal, NeuAc o Fuc; y R<sup>5</sup> es un átomo de hidrógeno o GalNAc.

(9) El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con (1), en el que al menos uno de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> es un resto de desoxi azúcar, y la solución acuosa que contiene un oligosacárido es una solución acuosa obtenida por tratamiento con una resina de adsorción sintética.

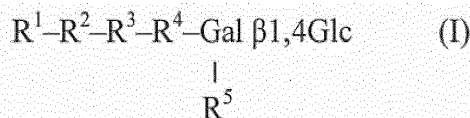
(10) El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con (9), en el que el resto de desoxi azúcar es Fuc.

(11) El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con (9), en el que R<sup>1</sup> es Fuc; R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno un enlace sencillo; y R<sup>5</sup> es un átomo de hidrógeno.

En el presente documento se describen los siguientes (a) a (x).

(a) Un proceso para producir cristales de un oligosacárido que comprende tres o más restos de monosacárido que comprende añadir una solución acuosa que contiene el oligosacárido que comprende tres o más restos de monosacárido con respecto a un disolvente orgánico miscible en agua.

(b) Un proceso para producir cristales de un oligosacárido que comprende añadir una solución acuosa que contiene un oligosacárido representado por la fórmula general (I):



[en la que Gal representa galactosa (en lo sucesivo en el presente documento abreviado de la misma manera); Glc representa glucosa (en lo sucesivo en el presente documento abreviado de la misma manera); R<sup>1</sup> representa un resto de monosacárido, un resto de azúcar, o un derivado del resto de monosacárido o el resto de azúcar; R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup>, que pueden ser iguales o diferentes, cada uno representa un resto de monosacárido, un resto de azúcar, un derivado del resto de monosacárido o el resto de azúcar, -X(-Y)- (en el que X e Y, que pueden ser iguales o diferentes, cada uno representa un resto de monosacárido, un resto de azúcar, o un derivado del resto de monosacárido o el resto de azúcar) o un enlace sencillo; y R<sup>5</sup> representa un átomo de hidrógeno, un resto de monosacárido, un resto de azúcar, o un derivado del resto de monosacárido o el resto de azúcar] con respecto a un disolvente orgánico miscible en agua.

(c) El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con el apartado (b) que se ha mencionado anteriormente, en el que R<sup>1</sup> es GlcNAc (GlcNAc representa N-acetilglucosamina, que en lo sucesivo en el presente documento se abrevia de la misma manera), NeuAc (NeuAc representa ácido N-acetilneuramínico; que en lo sucesivo en el presente documento se abrevia de la misma manera), Gal, Fuc (Fuc representa fucosa, que en lo sucesivo en el presente documento se abrevia de la misma manera) o GalNAc (GalNAc representa N-acetilgalactosamina, que en lo sucesivo en el presente documento se abrevia de la misma manera); R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup>, que pueden ser iguales o diferentes, cada uno son un enlace sencillo, GlcNAc, NeuAc, Gal, Fuc o GalNAc; y R<sup>5</sup> es un átomo de hidrógeno, GlcNAc, NeuAc, Gal, Fuc o GalNAc.

(d) El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con los apartados (b) o (c) que se han mencionado anteriormente, en los que R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup>, que pueden ser iguales o diferentes, son cada uno GlcNAc, NeuAc, Gal, Fuc o GalNAc.

(e) El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con los apartados (b) o (c) que se han mencionado anteriormente, en los que R<sup>4</sup> es un enlace sencillo.

(f) El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con los apartados (b) o (c) que se han mencionado anteriormente, en los que R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno un enlace sencillo.

(g) El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con los apartados (b) o (c) que se han mencionado anteriormente, en los que R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno un enlace sencillo.

(h) El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con el apartado (e) que se ha mencionado anteriormente, en el que R<sup>1</sup> es GlcNAc; R<sup>2</sup> es Gal; R<sup>3</sup> es GlcNAc; y R<sup>5</sup> es un átomo de hidrógeno.

(i) El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con el apartado (f) que se ha mencionado anteriormente, en el que R<sup>1</sup> es NeuAc o Gal; R<sup>2</sup> es GlcNAc o GalNAc; y R<sup>5</sup> es un átomo de hidrógeno.

(j) El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con el apartado (i) que se ha mencionado anteriormente, en el que R<sup>1</sup> es GlcNAc, Gal, NeuAc o Fuc; y R<sup>5</sup> es un átomo de hidrógeno o GalNAc.

(k) El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con el apartado (b) que se ha mencionado anteriormente, en el que al menos uno de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> es un resto de desoxi azúcar, y la solución acuosa que contiene un oligosacárido es una solución acuosa obtenida por tratamiento con una resina de adsorción sintética.

(l) El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con el apartado (k) que se ha mencionado anteriormente, en el que el resto de desoxi azúcar es Fuc.

(m) El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con el apartado (k) que se ha mencionado anteriormente, en el que  $R^1$  es Fuc;  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son cada uno un enlace sencillo; y  $R^5$  es un átomo de hidrógeno.

(n) El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con uno cualquiera de los apartados (a) a (m) que se han mencionado anteriormente, en los que en el que el disolvente orgánico miscible en agua es un alcohol o una cetona.

(o) El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con uno cualquiera de los apartados (a) a (m) que se han mencionado anteriormente, en los que en el que el disolvente orgánico miscible en agua es metanol o acetona.

(p) Un Cristal de un oligosacárido representado por la fórmula general (I) de acuerdo con el apartado (b) que se ha mencionado anteriormente.

(q) El cristal de un oligosacárido de acuerdo con el apartado (p) que se ha mencionado anteriormente, en el que  $R^1$  es GlcNAc, NeuAc, Gal, Fuc o GalNAc;  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$ , que pueden ser iguales o diferentes, son cada uno un enlace sencillo, GlcNAc, NeuAc, Gal, Fuc o GalNAc; y  $R^5$  es un átomo de hidrógeno, GlcNAc, NeuAc, Gal, Fuc o GalNAc.

(r) El cristal de un oligosacárido de acuerdo con los apartados (p) o (q) que se han mencionado anteriormente, en los que  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$ , que pueden ser iguales o diferentes, son cada uno GlcNAc, NeuAc, Gal, Fuc o GalNAc.

(s) El cristal de un oligosacárido de acuerdo con los apartados (p) o (q) que se han mencionado anteriormente, en los que  $R^4$  es un enlace sencillo.

(t) El cristal de un oligosacárido de acuerdo con los apartados (p) o (q) que se han mencionado anteriormente, en los que  $R^3$  y  $R^4$  son cada uno un enlace sencillo.

(u) El cristal de un oligosacárido de acuerdo con los apartados (p) o (q) que se han mencionado anteriormente, en los que  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son cada uno un enlace sencillo.

(v) El cristal de un oligosacárido de acuerdo con el apartado (s) que se ha mencionado anteriormente, en el que  $R^1$  es GlcNAc;  $R^2$  es Gal;  $R^3$  es GlcNAc; y  $R^5$  es un átomo de hidrógeno.

(w) El cristal de un oligosacárido de acuerdo con el apartado (t) que se ha mencionado anteriormente, en el que  $R^1$  es NeuAc o Gal;  $R^2$  es GlcNAc o GalNAc; y  $R^5$  es un átomo de hidrógeno.

(x) El cristal de un oligosacárido de acuerdo con el apartado (u) que se ha mencionado anteriormente, en el que  $R^1$  es GlcNAc, Gal, NeuAc o Fuc; y  $R^5$  es un átomo de hidrógeno o GalNAc.

En lo sucesivo en el presente documento, los oligosacáridos que comprenden tres o más restos de monosacárido o los oligosacáridos representados por la fórmula general (I) se denominan Oligosacáridos (I), y los cristales de un Oligosacárido (I) se denominan Cristales de Oligosacárido (I).

A continuación, se explican las definiciones de los grupos en la fórmula general (I).

(i) El monosacárido del resto de monosacárido incluye Gal, Glc, alosa (All), arabinosa (Ara), altrosa (Alt), gulosa (Gul), manosa (Man), talosa (Tal), fructosa (Fru), ribosa (Rib), xilosa (Xil) y similares.

(ii) El amino azúcar del resto de amino azúcar incluye ácido neuramínico (Neu), ácido murámico (Mur), glucosamina (GlcN), manosamina (ManN), galactosamina (GalN), 2-amino-2-desoxiglucopiranososa (GlcPN) y similares.

(iii) Los derivados del resto de monosacárido o el resto de azúcar incluyen ácidos urónicos; desoxi azúcares; derivados en los que dos miembros seleccionados entre el grupo que consiste en restos de monosacárido [el resto de monosacárido tienen el mismo significado que el resto de monosacárido (i) que se ha mencionado anteriormente], restos de amino azúcar [el resto de amino azúcar tiene el mismo significado que el resto de amino azúcar (ii) que se ha mencionado anteriormente] y derivados del resto de monosacárido o el resto de azúcar (los derivados del resto de amino azúcar y el resto de amino azúcar incluyen desoxi azúcares, etc.), que son los mismos o diferentes, están unidos por un enlace glicosido; y derivados en los que un grupo hidroxilo o un grupo amino en los mismos está protegido con acetilo o similar. Los ejemplos de los ácidos urónicos son ácido glucurónico (GlcA) y ácido galacturónico (GalA); los ejemplos de los desoxi azúcares son Fuc y ramnosa (Rha); y los ejemplos de los derivados en el que un grupo hidroxilo, o un grupo amino en los mismos está protegido con acetilo o similar son GlcNAc, NeuAc, GalNAc y N-acetilmanosamina (ManNAc).

(iv) Los enlaces glicosido entre  $R^1$  y  $R^2$ ,  $R^2$  y  $R^3$ ,  $R^3$  y  $R^4$ ,  $R^4$  y Gal, y  $R^5$  y Gal ( $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  tienen los mismos significados como se ha definido anteriormente, respectivamente) pueden ser iguales o diferentes, y los ejemplos de los enlaces incluyen un enlace  $\alpha$ -1,2, un enlace  $\alpha$ -2,3, un enlace  $\alpha$ -1,4, un enlace  $\beta$ -1,3 y un enlace  $\beta$ -1,4. Los ejemplos de Oligosacáridos (I) formados por enlaces glicosido específicamente preferentes incluyen trisacáridos tales como GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc, Gal $\alpha$ 1, 4Gal $\beta$ 1, 4Glc, NeuAc $\alpha$ 2, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc y Fuca $\alpha$ 1, 2Gal- $\beta$ 1, 4Glc, tetrasacáridos tales como Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal- $\beta$ 1, 4Glc y NeuAc $\alpha$ 2, 3(GalNAc $\beta$ 1,4)Gal $\beta$ 1, 4Glc, y pentasacáridos tales como GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal- $\beta$ 1, 4Glc.

A continuación, la presente divulgación se describe adicionalmente.

(v) El oligosacárido que comprende tres o más restos de monosacárido incluye oligosacáridos de cadena ramificada o lineal en los que de 3 a 20 miembros, preferentemente de 3 a 10 miembros, más preferentemente de 3 a 6 miembros seleccionados entre el grupo que consiste en restos de monosacárido [el resto de monosacárido tienen el mismo significado que el resto de monosacárido (i) que se ha mencionado anteriormente], restos de amino azúcar [el resto de amino azúcar tiene el mismo significado que el resto de amino azúcar (ii) que

se ha mencionado anteriormente] y derivados del resto de monosacárido o el resto de azúcar [el derivado del resto de monosacárido o el resto de azúcar tiene el mismo significado que el resto de monosacárido o el resto de azúcar (iii) que se han mencionado anteriormente], que son los mismos o diferentes, están unidos entre sí con enlaces glicosídico que pueden ser iguales o diferentes (los ejemplos de los enlaces glicosídico son un enlace  $\alpha$ -1,2, un enlace  $\alpha$ -2,3, un enlace  $\alpha$ -1,4, un enlace  $\beta$ -1,3 y un enlace  $\beta$ -1,4).

(vi) La solución acuosa que contiene el oligosacárido puede ser cualquier solución acuosa que contenga el oligosacárido, pero la pureza de sacárido del oligosacárido es preferentemente es de un 50 % o superior, más preferentemente un 70 % o superior. La solución acuosa también puede comprender un disolvente orgánico tal como un alcohol (por ejemplo, metanol, etanol o alcohol isopropílico) o una cetona (por ejemplo, acetona o metil etil cetona). El contenido de agua de la solución acuosa es preferentemente de un 20 % o superior. Los ejemplos específicos de la solución acuosa son las que se preparan sometiendo una solución de oligosacárido (por ejemplo, una solución de reacción, un medio de cultivo o un medio de cultivo sin células obtenido por síntesis o fragmentación) a tratamiento previo (por ejemplo, tratamiento con una membrana, filtración en gel, tratamiento con carbono activado, tratamiento con una resina de intercambio iónico, tratamiento con una resina de adsorción sintética o precipitación con disolvente). Los tratamientos previos preferentes son tratamiento con carbono activado, tratamiento con una resina de intercambio iónico, tratamiento con una resina de adsorción sintética y precipitación con disolvente, entre los cuales son particularmente precedentes la precipitación con disolvente y el tratamiento con una resina de adsorción sintética. Estos tratamientos se pueden usar de forma apropiada en combinación. En particular, tratamiento con una resina de adsorción sintética es preferente como el tratamiento previo para obtener una solución acuosa que contiene Oligosacárido (I) en la que al menos uno de los restos de monosacárido es Fuc.

(vii) El disolvente orgánico miscible en agua incluye cualquier disolvente orgánico que sea miscible con agua. Son preferentes los alcoholes tales como metanol, etanol y alcohol isopropílico, y cetonas tales como acetona y metil etil cetona.

(viii) La resina de adsorción sintética incluye resinas de adsorción no polares y porosas tales como resinas de DIAION HP (por ejemplo, HP10, HP20, HP21, HP30, HP40 y HP50; Mitsubishi Chemical Corporation), resinas de DIAION SP800 (por ejemplo, SP800, SP825, SP850 y SP875; Mitsubishi Chemical Corporation), resinas de DIAION SP200 (por ejemplo, SP205, SP206, SP207 y SP207SS; Mitsubishi Chemical Corporation) y resinas de Amberlite XAD (por ejemplo, XAD4, XAD7HP, XAD16 y XAD1600; Rohm y Haas).

(ix) El cristal o los cristales de un oligosacárido pueden ser de cualquier forma cristalina, por ejemplo, columnas, placas o agujas. Las columnas son particularmente preferentes.

El proceso para producir Cristales de Oligosacárido (I) se describe con detalle a continuación.

Proceso de producción:

Una solución de reacción, un medio de cultivo o un medio de cultivo sin células que contienen Oligosacárido (I) obtenido con un método de síntesis o un método de fermentación se trata previamente de acuerdo con un método conocido [por ejemplo, Chem. Rev., Vol. 100, p. 4465 (2000); Curr. Opin. in Drug Discovery & Develop, Vol. 3, p. 756 (2000); documento WO98/12343; y documento WO99/40205] para preparar una solución acuosa que contiene el Oligosacárido (I) cuya pureza de sacárido es de un 50 % o superior, preferentemente un 70 % o superior. La solución obtenida que contiene el Oligosacárido (I) se añade gota a gota con respecto a un disolvente orgánico miscible en agua que es un mal disolvente a una temperatura entre -20 °C y el punto de ebullición del disolvente orgánico miscible en agua o a reflujo durante un minuto a 10 horas, preferentemente de 10 minutos a 2 horas. Después de finalizar el goteo, la mezcla resultante se agita a una temperatura entre -20 °C y el punto de ebullición del disolvente orgánico miscible en agua o a reflujo de 1 a 20 horas, preferentemente de 2 a 4 horas para depositar los cristales. Los cristales depositados se separan mediante filtración en centrifugadora, decantación o similares, se lavaron con agua o un disolvente orgánico miscible en agua, y a continuación se secaron a presión reducida o mediante flujo de aire para obtener los Cristales de Oligosacárido (I). Los Cristales de Oligosacárido (I) se pueden purificar adicionalmente llevando a cabo operaciones tales como lavado, secado y recristalización.

Los tratamientos previos para obtener la solución acuosa que contiene el Oligosacárido (I) incluyen tratamiento con una membrana, filtración en gel, tratamiento con carbono activado, tratamiento con una resina de intercambio iónico, tratamiento con una resina de adsorción sintética y precipitación con disolvente. Son precedentes el tratamiento con carbono activado, tratamiento con una resina de intercambio iónico, tratamiento con una resina de adsorción sintética y precipitación con disolvente, entre los cuales son particularmente preferentes la precipitación con disolvente y el tratamiento con una resina de adsorción sintética. Estos tratamientos se pueden usar de forma apropiada en combinación. En particular, escalamiento con una resina de adsorción sintética es preferente como el tratamiento previo para obtener una solución acuosa que contiene el Oligosacárido (I) en el que al menos uno de los restos de monosacárido es Fuc.

El disolvente orgánico miscible en agua se puede usar solo, o como una mezcla de dos o más tipos o una mezcla con agua.

Además del proceso que se ha descrito anteriormente, los Cristales de Oligosacárido (I) también se pueden obtener mediante métodos generales de cristalización tales como un método en el que la solución acuosa que contiene el

Oligosacárido (I) se concentra, se enfría y se neutraliza, y un método en el que el disolvente orgánico miscible en agua como un mal disolvente se añade a la solución acuosa que contiene el Oligosacárido (I) para estimular la formación de Cristales de Oligosacárido (I).

5 Los Cristales de Oligosacárido (I) obtenidos con los procesos que se han mencionado anteriormente se pueden obtener como aductos con agua o con diversos disolventes orgánicos miscibles en agua.

10 En ocasiones los Cristales de Oligosacárido (I) obtenidos con los procesos que se han mencionado anteriormente existen en diferentes formas cristalinas o diferentes tamaños de grano, y éstos se pueden obtener solos o como una mezcla.

Los ejemplos específicos de Cristales de Oligosacárido (I) obtenidos con los procesos que se han mencionado anteriormente se muestran en la Tabla 1.

15 Tabla 1

Ejemplo N.º	N.º de Cristales	Cristales de Oligosacárido
1	1	GlcNAcβ1, 3Galβ1, 4Glc
2	2	Galβ1, 4GlcNAcβ1, 3Galβ1, 4Glc
3	3	GlcNAcβ1, 3Galβ1, 4GlcNAcβ1, 3Galβ1, 4Glc

La estabilidad durante el almacenamiento de los Cristales de Oligosacárido (I) de la presente invención se ilustra en el ejemplo de ensayo que sigue a continuación.

20 Ejemplo de Ensayo: Comparación de Estabilidad de Cristales de Oligosacárido (I) y polvos de Oligosacárido (I) liofilizados

25 La estabilidad durante el almacenamiento de los Cristales de Oligosacárido (I) obtenidos en los Ejemplos 1 a 3 y los polvos de Oligosacárido (I) liofilizados obtenidos en los Ejemplos de Referencia 1 a 3 se examinaron manteniéndolos a 105 °C en la atmósfera a presión ordinaria durante 20 días y midiendo la tasa residual de Oligosacáridos (I). Los resultados se muestran en la Tabla 2.

30 La tasa residual de Oligosacáridos (I) en las muestras se midió mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y se expresó en términos de pobreza por HPLC (%).

Las condiciones de medición para HPLC son las que siguen a continuación.

35 Analizador: producto de Dionex Corporation  
 Columna: CarboPac PA 10  
 Temperatura de la columna: 30 °C  
 Fase móvil: solución acuosa de NaOH al 10-100 % (500 mmol/l) (Gradiente de elución en 11 minutos)  
 Caudal: 08 ml/minuto  
 Detección: detección electroquímica (método de PAD)

40 Tabla 2

	Tasa residual de oligosacáridos: pureza por HPLC (%)				
	Días que transcurrieron				
	0	1	4	7	20
Cristales de GlcNAcβ1, 3Galβ1, 4Glc (N.º de Cristales 1)	98,0	99,7	99,7	99,7	98,9
Polvos de GlcNAcβ1, 3Galβ1, 4Glc liofilizados	99,8	99,7	97,0	98,8	93,8
Cristales de Galβ1, 4GlcNAcβ1, 3Galβ1, 4Glc (N.º de Cristales 2)	99,3	99,0	99,2	99,0	98,8
Polvos de Galβ1, AGlcNAc-β1, 3Galβ1, 4Glc liofilizados	99,3	98,6	97,6	96,2	90,9
Cristales de GlcNAcβ1, 3Galβ1, 4GlcNAcβ1, 3Galβ1, 4Glc (N.º de Cristales 3)	98,8	99,3	99,0	99,0	99,3
Polvos de GlcNAcβ1, 3Galβ1, 4GlcNAcβ1, 3Galβ1, 4Glc liofilizados	98,6	98,2	97,4	95,4	85,2

Como es evidente a partir de la Tabla 2, el análisis de HPLC desveló una disminución en la tasa residual de Oligosacáridos (I) y una descomposición notable de los polvos liofilizados de Oligosacárido (I) obtenidos en los

ejemplos de referencia. Por el contrario, no se observó disminución en la tasa residual de Oligosacárido (I) en Cristales de Oligosacárido (I) obtenidos por el proceso de la presente invención. Esto indica que los Cristales de Oligosacárido (I) son extremadamente estables.

5 Mejores Modos Para Realizar la Invención

Ciertas realizaciones de la presente invención se ilustran con detalle en los siguientes ejemplos y ejemplos de referencia. Estos ejemplos y ejemplos de referencia no se deben interpretar como limitantes del alcance de la presente invención.

10

Ejemplo 1: Producción de Cristales de GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc

15

La solución de reacción de GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc obtenida en el Ejemplo de Referencia 4 se centrifugó para retirar células y se pasó a través de una columna de DIAION SK-1B (tipo H, Mitsubishi Chemical Corporation) y a continuación una columna de DIAION WA-30 (tipo OH, Mitsubishi Chemical Corporation) para su desalación. La solución resultante se ajustó a pH 6,5 con HCl y se concentró a presión reducida para obtener una solución tratada de GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc (solución acuosa: 100 ml, 200 g/l). La solución obtenida se añadió gradualmente a metanol calentó a 60 °C (500 ml) en aproximadamente 30 minutos, y la mezcla resultante se calentó a reflujo a 60 °C durante aproximadamente 3 horas para cristalización. La mezcla resultante se enfrió a 20 °C y se agitó durante una hora. A continuación, los cristales se separaron por filtración y se lavaron con metanol. Los cristales obtenidos se secaron mediante flujo de aire, de modo que se obtuvieron 14 g de Cristales de GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc.

20

Los datos de difracción de rayos X con el método de polvo de los cristales se muestran en la Tabla 3.

25

Tabla 3

Datos de difracción de rayos X con el método de polvo de Cristales de GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc			
d (Å)	I/I <sub>0</sub> (%)	d (Å)	I/I <sub>0</sub> (%)
10,773	41	4,027	42
9,253	74	3,855	28
6,992	36	3,774	36
5,336	22	3,697	24
4,779	100	3,558	21
4,618	46	3,311	54
4,537	49	3,030	33
4,491	98	2,811	19
4,236	59	2,630	22
4,129	65		

Ejemplo 2: Producción de Cristales de Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc

30

La solución de reacción de Gal $\beta$ 1,4 GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc obtenida en el Ejemplo de Referencia 5 se centrifugó para retirar células y se pasó a través de una columna de DIAION SK-1B (tipo H, Mitsubishi Chemical Corporation) y a continuación una columna de DIAION WA-30 (tipo OH, Mitsubishi Chemical Corporation) para su desalación. La solución resultante se ajustó a pH 6,5 con HCl y se concentró a presión reducida para obtener una solución tratada de Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc (solución acuosa: 70 ml, 300 g/l). La solución obtenida se añadió gradualmente a acetona calentó a 58 °C (500 ml) en aproximadamente 30 minutos, y la mezcla resultante se calentó a reflujo a 58 °C durante aproximadamente 2 horas para cristalización. La mezcla resultante se enfrió a 20 °C y se agitó durante una hora. A continuación, los cristales se separaron por filtración y se lavaron con acetona. Los cristales obtenidos se secaron mediante flujo de aire, de modo que se obtuvieron 16 g de Cristales de Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc.

35

40

Los datos de difracción de rayos X con el método de polvo de los cristales se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Datos de difracción de rayos X con el método de polvo de Cristales de Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc			
d (Å)	I/I <sub>0</sub> (%)	d (Å)	I/I <sub>0</sub> (%)
18,588	15	4,560	100

Datos de difracción de rayos X con el método de polvo de Cristales de Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc			
d (Å)	I/I <sub>0</sub> (%)	d (Å)	I/I <sub>0</sub> (%)
13,281	22	4,381	98
11,182	30	4,277	52
10,644	34	4,055	34
9,253	16	3,888	27
8,147	10	3,580	23
7,824	11	3,299	19
6,804	20	3,235	20
6,167	12	2,708	15
5,843	14	2,453	14
5,639	21	2,354	18
4,897	18	2,321	18
4,679	66		

**Ejemplo 3:** Producción de Cristales de GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc

- 5 La solución de reacción de GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc obtenida en el Ejemplo de Referencia 6 se centrifugó para retirar células y se pasó a través de una columna de DIAION SK-1B (tipo H, Mitsubishi Chemical Corporation) y a continuación una columna de DIAION WA-30 (tipo OH, Mitsubishi Chemical Corporation) para su desalación. La solución resultante se ajustó a pH 6,5 con HCl y se concentró a presión reducida para obtener una solución tratada de GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc (solución acuosa: 100 ml, 200 g/l). La solución
- 10 obtenida se añadió gradualmente a metanol calentó a 60 °C (500 ml) en aproximadamente 30 minutos, y la mezcla resultante se calentó a reflujo a 60 °C durante aproximadamente 3 horas para cristalización. La mezcla resultante se enfrió a 20 °C y se agitó durante una hora. A continuación, los cristales se separaron por filtración y se lavaron con metanol. Los cristales obtenidos se secaron mediante flujo de aire, de modo que se obtuvieron 16 g de Cristales de GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc.
- 15 Los datos de difracción de rayos X con el método de polvo de los cristales se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Datos de difracción de rayos X con el método de polvo de Cristales de GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc			
d (Å)	I/I <sub>0</sub> (%)	d (Å)	I/I <sub>0</sub> (%)
20,5322	8	3,5037	16
12,0996	16	3,4242	20
11,2531	15	3,3607	16
10,7084	17	3,2936	13
9,4509	40	3,1729	18
7,1037	8	3,1026	9
6,3887	7	3,0305	10
5,7863	9	2,8915	7
5,3042	9	2,8466	9
5,0350	8	2,8074	10
4,6189	100	2,6728	11
4,3710	28	2,6384	9
4,2874	32	2,5687	9
4,0920	26	2,5232	8



Datos de difracción de rayos X con el método de polvo de Cristales de GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc			
d (Å)	I/I <sub>0</sub> (%)	d (Å)	I/I <sub>0</sub> (%)
3,9397	20	2,4728	10
3,7985	18	2,3600	11
3,6672	14	2,3335	10
3,5729	13		

Ejemplo de Referencia 1: Producción de polvos de GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc liofilizados

5 Los Cristales de GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc obtenidos en el Ejemplo 1 (5 g) se disolvieron en agua para obtener una solución de GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc (10 ml, 500 g/l). La solución se congeló a -30 °C y a continuación se secó en un aparato de liofilización para obtener 4,8 g de polvos de GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc liofilizados.

Ejemplo de Referencia 2: Producción de polvos de Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc liofilizados

10 Los Cristales de Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc obtenidos en el Ejemplo 2 (5 g) se disolvieron en agua para obtener una solución de Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc (10 ml, 500 g/l). La solución se congeló a -30 °C y a continuación se secó en un aparato de liofilización para obtener 4,5 g de polvos de Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc liofilizados.

15 Ejemplo de Referencia 3: Producción de polvos de GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc liofilizados

20 Los Cristales de GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc obtenidos en el Ejemplo 3 (5 g) se disolvieron en agua para obtener una solución de GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc (10 ml, 500 g/l). La solución se congeló a -30 °C y a continuación se secó en un aparato de liofilización para obtener 4,7 g de polvos GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc liofilizados.

Ejemplo de Referencia 4: Solución de reacción de GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc

25 Una solución de reacción de GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc se obtuvo a partir de uridina difosfato-N-acetilglucosamina obtenida con el método que se describe en el documento WO98/12343 y lactosa usando Escherichia coli recombinante que expresa en alta medida la enzima que se describe en Glycobiology, Vol. 9, p. 1061 (1999) de acuerdo con el método para producir cadenas de azúcar que se describe en el documento WO98/12343.

Ejemplo de Referencia 5: Solución de reacción de Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc

30 Una solución de reacción de A Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc se obtuvo usando la solución de reacción de GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc obtenida en el Ejemplo de Referencia 4 y uridina difosfato-galactosa de acuerdo con el método que se describe en el Ejemplo de Referencia 4.

35 Ejemplo de Referencia 6: solución de reacción de GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc $\beta$ 2, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc

40 Una solución de reacción de GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc se obtiene a partir de uridina difosfato-N-acetilglucosamina obtenida con el método que se describe en el documento WO98/12343 y la solución de reacción de Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc $\beta$ 1, 3Gal $\beta$ 1, 4Glc obtenida en el Ejemplo de Referencia 5 de acuerdo con el método que se describe en el Ejemplo de Referencia 4.

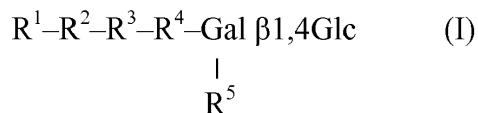
Aplicabilidad Industrial

45 La presente invención proporciona cristales de un oligosacárido útil, por ejemplo, como materiales de partida O como compuestos intermedios de alimentos saludables, composiciones farmacéuticas, cosméticos, etc., y un proceso para producir cristales de un oligosacárido que es adecuado para síntesis o industrialización a gran escala.

## REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir cristales de un oligosacárido que comprende añadir una solución acuosa que contiene un oligosacárido representado por la fórmula general (I):

5



[en la que Gal representa galactosa (en lo sucesivo en el presente documento abreviado de la misma manera); Glc representa glucosa (en lo sucesivo en el presente documento abreviado de la misma manera); R<sup>1</sup> representa GlcNAc (en el que GlcNAc representa N-acetilglucosamina, que en lo sucesivo en el presente documento se abrevia de la misma manera), NeuAc (en el que NeuAc representa ácido N-acetilneuramínico, que en lo sucesivo en el presente documento se abrevia de la misma manera), Gal, Fuc (en el que Fuc representa fucosa, que en lo sucesivo en el presente documento se abrevia de la misma manera) o GalNAc (en el que GalNAc representa N-acetilgalactosamina, que en lo sucesivo en el presente documento se abrevia de la misma manera); R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup>, que pueden ser iguales o diferentes, cada uno representa un enlace sencillo, GlcNAc, NeuAc, Gal, Fuc o GalNAc; y R<sup>5</sup> representa un átomo de hidrógeno, GlcNAc, NeuAc, Gal, Fuc o GalNAc] con respecto a un disolvente orgánico miscible en agua, en el que en el que el disolvente orgánico miscible en agua es metanol o acetona.

10

15

20

25

30

35

40

45

2. El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup>, que pueden ser iguales o diferentes, son cada uno GlcNAc, NeuAc, Gal, Fuc o GalNAc.

3. El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R<sup>4</sup> es un enlace sencillo.

4. El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno un enlace sencillo.

5. El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno un enlace sencillo.

6. El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con la reivindicación 3, en el que R<sup>1</sup> es GlcNAc; R<sup>2</sup> es Gal; R<sup>3</sup> es GlcNAc; y R<sup>5</sup> es un átomo de hidrógeno.

7. El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con la reivindicación 4, en el que R<sup>1</sup> es NeuAc o Gal; R<sup>2</sup> es GlcNAc o GalNAc; y R<sup>5</sup> es un átomo de hidrógeno.

8. El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con la reivindicación 5, en el que R<sup>1</sup> es GlcNAc, Gal, NeuAc o Fuc; y R<sup>5</sup> es un átomo de hidrógeno o GalNAc.

9. El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que al menos uno de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> es un resto de desoxi azúcar, y la solución acuosa que contiene un oligosacárido es una solución acuosa obtenida por tratamiento con una resina de adsorción sintética.

10. El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el resto de desoxi azúcar es Fuc.

11. El proceso para producir cristales de un oligosacárido de acuerdo con la reivindicación 9, en el que R<sup>1</sup> es Fuc; R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno un enlace sencillo; y R<sup>5</sup> es un átomo de hidrógeno.