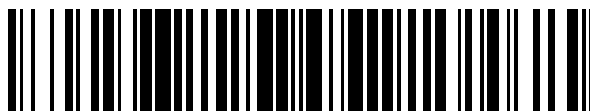


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 777 838**

51 Int. Cl.:

C07H 7/027 (2006.01)

C07F 9/00 (2006.01)

C07H 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2016 PCT/JP2016/052311**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2016 WO16121810**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2016 E 16743413 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3252065**

54 Título: **Cristal de anhidrato de N-acetilneuraminato de amonio y procedimiento para producir el mismo**

30 Prioridad:

28.01.2015 JP 2015014541

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

06.08.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

FUKUMOTO, KAZUNARI

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 777 838 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

Cristal de anhídrido de N-acetilneuraminato de amonio y procedimiento para producir el mismo.

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un cristal de anhídrido de N-acetilneuraminato de amonio, que es útil, por ejemplo, como un producto, una materia prima, o como un producto intermedio de, por ejemplo, alimentos saludables, productos farmacéuticos, y sustancias cosméticas, y a un procedimiento de producción del mismo.

10

Técnica anterior

El ácido N-acetilneuramínico (en adelante, denominado en la presente memoria NeuAc) es un tipo de aminoazúcar ácido genéricamente denominado ácido siálico, y se usa ampliamente como materia prima de productos farmacéuticos, tal como un medicamento contra la gripe, o como un componente de alimentos, cosméticos y medios de cultivo celular.

15

El NeuAc se puede producir, por ejemplo, mediante un método de fermentación, un método enzimático, un método de extracción de un producto natural, o un método de síntesis química. Como el cristal de NeuAc conocido, se conocen cristales de un dihidrato (documento 1 no de patente) y un anhídrido (documento 2 no de patente), pero una disolución de dicho cristal muestra una acidez fuerte, y el grado de solubilidad del mismo es relativamente bajo de alrededor de 100 g/l a temperatura normal. Además, existe un problema con la estabilidad durante el almacenamiento, por ejemplo el cristal y una disolución del mismo se decoloran gradualmente a marrón oscuro.

20

Por otro lado, en cuanto al cristal de una sal de amonio de NeuAc, se conoce un cristal de monohidrato (documento 1 de patente). Este cristal presenta un problema de estabilidad en condiciones de alta temperatura debido a su bajo punto de fusión próximo a 105°C.

25

En tales circunstancias, se demanda un cristal de una sal de amonio de NeuAc, que presente una alta estabilidad de almacenamiento a temperatura normal, así como en condiciones de alta temperatura.

30

El documento 2 de patente describe trihidrato de N-acetilneuraminato de sodio, y un método para la preparación del mismo.

35 Técnica relacionada

Documento de patente

Documento 1 de patente: JP-A-61-68418

40

Documento 2 de patente: EP 0 386 721 A1

Documento no de patente

Documento 1 no de patente: Acta Crystallographica Section B : Structural Crystallography and Crystal Chemistry (1973), 29, p. 1881-1886

45

Documento 2 no de patente Chemistry letters (1984), 6, p. 1003-1066

50 Sumario de la invención

Problemas que la invención debe resolver

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un cristal de una sal de amonio de NeuAc, que presente una alta estabilidad de almacenamiento a temperatura normal así como en condiciones de alta temperatura, y proporcionar un procedimiento de producción del mismo.

55

Medios para resolver los problemas

La presente invención se refiere a los (1) a (6) siguientes.

60

(1) Un cristal de anhídrido de sal de amonio de NeuAc.

(2) El cristal descrito en (1) anterior, en el que el cristal presenta picos en ángulos de difracción (2θ) de $12.3\pm 0.2^\circ$, preferentemente $\pm 0.1^\circ$, $13.7\pm 0.2^\circ$, preferentemente $\pm 0.1^\circ$, $14.2\pm 0.2^\circ$, preferentemente $\pm 0.1^\circ$, $22.4\pm 0.2^\circ$, preferentemente $\pm 0.1^\circ$, y $22.6\pm 0.2^\circ$, preferentemente $\pm 0.1^\circ$, en una difracción de rayos X de

65

polvo.

(3) El cristal descrito en (2) anteriormente, en el que el cristal presenta además picos en ángulos de difracción (2θ) de $17.1 \pm 0.2^\circ$, preferentemente $\pm 0.1^\circ$, $21.2 \pm 0.2^\circ$, preferentemente $\pm 0.1^\circ$, $21.6 \pm 0.2^\circ$, preferentemente $\pm 0.1^\circ$, $23.5 \pm 0.2^\circ$, preferentemente $\pm 0.1^\circ$, y $24.8 \pm 0.2^\circ$, preferentemente $\pm 0.1^\circ$, en una difracción de rayos X de polvo.

(4) El cristal descrito en (3) anteriormente, en el que el cristal presenta además picos en ángulos de difracción (2θ) de $27.7 \pm 0.2^\circ$, preferentemente $\pm 0.1^\circ$, $28.1 \pm 0.2^\circ$, preferentemente $\pm 0.1^\circ$, $28.4 \pm 0.2^\circ$, preferentemente $\pm 0.1^\circ$, $28.6 \pm 0.2^\circ$, preferentemente $\pm 0.1^\circ$, y $42.3 \pm 0.2^\circ$, preferentemente $\pm 0.1^\circ$, en una difracción de rayos X de polvo.

(5) Un procedimiento para producir un cristal de anhidrato de sal de amonio de NeuAc, que comprende añadir o añadir gota a gota un disolvente seleccionado de entre el grupo que consiste en alcoholes y cetonas a una disolución acuosa de NeuAc que contiene un compuesto que contiene amonio, y que presenta un pH de 3.0 a 9.0, para precipitar un cristal de anhidrato de sal de amonio de NeuAc, y recoger el cristal de anhidrato de sal de amonio de NeuAc de la disolución acuosa.

(6) El procedimiento de producción descrito en (5) anterior, en el que el disolvente seleccionado de entre el grupo que consiste en alcoholes y cetonas es un disolvente seleccionado de alcoholes de C1-C6, acetona, metil etil cetona, y dietil cetona.

Efectos de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un cristal de anhidrato de sal de amonio de NeuAc, que presenta una alta estabilidad de almacenamiento a temperatura normal, así como en condiciones de alta temperatura, y un procedimiento de producción del mismo.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] Representa los resultados de la difracción de rayos X de polvo del cristal de anhidrato de sal de amonio de NeuAc obtenido en el ejemplo 1.

[Figura 2] Representa los resultados de la difracción de rayos X de polvo del cristal de anhidrato de sal de amonio de NeuAc obtenido en el ejemplo 2.

[Figura 3] Representa los resultados de la difracción de rayos X de polvo del cristal de anhidrato de sal de amonio de NeuAc obtenido en el ejemplo 3.

[Figura 4] Representa los resultados del análisis espectroscópico de infrarrojos (IR) del cristal de anhidrato de sal de amonio de NeuAc obtenido en el ejemplo 1.

[Figura 5] Representa los grados de solubilidad del cristal de anhidrato de sal de amonio de NeuAc obtenido en el ejemplo 1 y un cristal de dihidrato de NeuAc conocido; el eje vertical indica la concentración (g/l) de NeuAc en términos de un anhidrato, y el eje horizontal indica la temperatura (°C).

Formas de realización para poner en práctica la invención

1. Cristal de anhidrato de sal de amonio de NeuAc de la presente invención

La presente invención se refiere a un cristal de anhidrato de sal de amonio de NeuAc.

Se puede confirmar si el cristal de NeuAc es un cristal de un anhidrato a partir del hecho de que el contenido de agua medido usando el método de Karl-Fisher descrito a continuación en los ejemplos de Análisis es 1.0% en peso o menos, preferentemente 0.95% en peso o menos, todavía más preferentemente 0.9% en peso o menos.

Se puede confirmar si el cristal de NeuAc es un cristal de una sal de amonio midiendo el contenido de iones de amonio contenidos en el cristal usando el método de HPLC descrito a continuación en los ejemplos de análisis.

Por ejemplo, se puede confirmar si el cristal de anhidrato de NeuAc es un cristal de una sal de monoamonio por el hecho de que el contenido de amonio en el cristal es $5.2 \pm 1.0\%$ en peso, preferentemente $5.2 \pm 0.5\%$ en peso, todavía más preferentemente $5.2 \pm 0.3\%$ en peso.

El cristal de la presente invención incluye un cristal de anhidrato de sal de amonio de NeuAc cuyo patrón de difracción de rayos X de polvo usando $\text{CuK}\alpha$ como fuente de rayos X se define por los valores mostrados en las

figuras 1 a 3 y tablas 1, 3 y 6. En la presente memoria, las figuras 1, 2 y 3 corresponden a los resultados de difracción de cristales de anhídrido de sal de amonio de NeuAc de las tablas 1, 3 y 6, respectivamente.

5 Además, el cristal de la presente invención incluye un cristal de anhídrido de sal de amonio de NeuAc que muestra el espectro de absorción de infrarrojos ilustrado en la figura 4 cuando se somete al análisis espectroscópico (IR) de infrarrojos descrito a continuación en los ejemplos de análisis.

2. Procedimiento para producir cristal de anhídrido de sal de amonio de NeuAc de la presente invención

10 El procedimiento para producir el cristal de anhídrido de sal de amonio de NeuAc de la presente invención es un procedimiento que comprende añadir o añadir gota a gota un disolvente seleccionado de entre el grupo que consiste en alcoholes y cetonas a una disolución acuosa de NeuAc que contiene un compuesto que contiene amonio y presenta un pH de 3.0 a 9.0, preferentemente 4.5 a 8.5, todavía más preferentemente 5.5 a 8.0, para precipitar un cristal de anhídrido de sal de amonio de NeuAc, y recoger el cristal de anhídrido de sal de amonio de NeuAc de la disolución acuosa.

15 El NeuAc contenido en la disolución acuosa de NeuAc puede producirse mediante cualquiera de los métodos de fermentación, un método enzimático, un método de extracción de un producto natural, un método de síntesis química y otros métodos de producción.

20 En el caso en el que un material sólido que obstruye la cristalización esté contenido en la disolución acuosa de NeuAc, el material sólido puede eliminarse usando, por ejemplo, separación centrífuga, filtración, o un filtro cerámico. En el caso de que una impureza o sal soluble en agua que obstruye la cristalización esté contenida en la disolución acuosa de NeuAc, la impureza o sal soluble en agua se puede eliminar haciendo pasar la disolución acuosa a través de una columna empaquetada, por ejemplo, con una resina de intercambio iónico.

25 La concentración de NeuAc en la disolución acuosa es 200 g/l o más, preferentemente 300 g/l o más, más preferentemente 400 g/l o más, todavía más preferentemente 500 g/l o más, todavía más preferentemente 600 g/l o más. Para ajustar la concentración en la disolución acuosa a la concentración anterior, la disolución acuosa puede concentrarse mediante un método de concentración general, tal como un método de concentración de calentamiento o un método de concentración a vacío.

30 El compuesto que contiene amonio incluye compuestos básicos tales como una disolución acuosa de amoníaco y gas amoníaco, y sales neutras tales como carbonatos de amonio, sulfatos de amonio, nitratos de amonio, y cloruros de amonio. Los ejemplos de las sales neutras incluyen carbonato de amonio, sulfato de amonio, nitrato de amonio, y cloruro de amonio.

35 En el caso en el que se use un compuesto básico como el compuesto que contiene amonio, una disolución acuosa de NeuAc, que contiene un compuesto que contiene amonio y que presenta un pH de 3.0 a 9.0, preferentemente 4.5 a 8.5, todavía más preferentemente 5.5 a 8.0, se puede obtener ajustando el pH de la disolución acuosa de NeuAc usando el compuesto básico.

40 Los alcoholes pueden ser alcoholes de C1-C6, más preferentemente alcoholes de C1-C3, todavía más preferentemente alcoholes seleccionados de entre el grupo que consiste en metanol, etanol, n-propanol y alcohol isopropílico, todavía más preferentemente alcoholes seleccionados del grupo que consiste en metanol y etanol.

45 Las cetonas pueden ser cetonas seleccionadas de acetona, metil etil cetona, y dietil cetona, preferentemente acetona.

50 La temperatura de la disolución acuosa en el momento de añadir o añadir gota a gota un disolvente seleccionado de entre el grupo que consiste en alcoholes y cetonas puede ser cualquier temperatura siempre que NeuAc no se descomponga, pero para disminuir el grado de solubilidad y mejorar así la velocidad de cristalización del cristal de anhídrido de sal de amonio de NeuAc, la temperatura puede ser 80°C o menos, preferentemente 70°C o menos, más preferentemente 60°C o menos, todavía más preferentemente 50°C o menos.

55 La cantidad del disolvente seleccionado de entre el grupo que consiste en alcoholes y cetonas a añadir o añadir gota a gota puede ser de 1 a 10 veces, preferentemente de 2 a 8 veces, todavía más preferentemente de 3 a 6 veces la cantidad de la disolución acuosa.

60 El tiempo durante el cual se añade o añade gota a gota el disolvente seleccionado de entre el grupo que consiste en alcoholes y cetonas puede ser de 1 a 48 horas, preferentemente de 3 a 30 horas, todavía más preferentemente de 5 a 20 horas.

65 En la etapa de añadir o añadir gota a gota el disolvente seleccionado de entre el grupo que consiste en alcoholes y cetonas, antes de la precipitación de un cristal de anhídrido de sal de amonio de NeuAc, se puede añadir un

crystal de anhídrido de sal de amonio de NeuAc como un cristal de siembra, de manera que la concentración en la disolución acuosa sea de 0.2 a 25 g/l, preferentemente de 0,5 a 10 g/l, todavía más preferentemente de 2 a 5 g/l.

5 El tiempo en el que se añade el cristal de siembra puede estar dentro de 1 a 5 horas, preferentemente dentro de 1 a 4 horas, todavía más preferentemente dentro de 1 a 3 horas después de que comience la adición o adición gota a gota del disolvente seleccionado de entre el grupo que consiste en alcoholes y cetonas.

10 Después de precipitar un cristal de anhídrido de sal de amonio de NeuAc como se describe anteriormente, el cristal precipitado puede madurar adicionalmente durante 1 a 48 horas, preferentemente durante 1 a 24 horas, todavía más preferentemente durante 1 a 12 horas.

La palabra "madurar" significa hacer crecer el cristal una vez que se detiene la etapa de añadir o añadir gota a gota el disolvente seleccionado de entre el grupo que consiste en alcoholes y cetonas.

15 Después de madurar el cristal, se puede reiniciar la etapa de añadir o añadir gota a gota el disolvente seleccionado de entre el grupo que consiste en alcoholes y cetonas.

20 El método para recoger el cristal de anhídrido de sal de amonio de NeuAc no está particularmente limitado, pero puede incluir filtración a presión, filtración por succión y separación centrífuga. Además, para reducir la adhesión del líquido madre y mejorar así la calidad del cristal, el cristal se puede lavar adecuadamente. La disolución usada para lavar los cristales no está particularmente limitada, pero se puede usar agua, metanol, etanol, acetona, n-propanol, alcohol isopropílico, y una disolución preparada mezclando un tipo o una pluralidad de tipos de miembros seleccionados de éstos, en una relación arbitraria.

25 El cristal húmedo así obtenido se seca, con lo que se puede obtener un producto final. En cuanto a las condiciones de secado, se puede usar cualquier método siempre que se pueda mantener la forma del anhídrido de sal de amonio de NeuAc, y, por ejemplo, se puede aplicar secado a presión reducida, secado en lecho fluidizado, y secado al aire forzado. La temperatura de secado puede ser cualquier temperatura siempre que se pueda eliminar el agua adherida, pero la temperatura puede ser preferentemente 80°C o menos, más
30 preferentemente 60°C o menos.

35 Al utilizar las condiciones de cristalización descritas anteriormente, se puede obtener un cristal de alta pureza de anhídrido de sal de amonio de NeuAc. La pureza del cristal de anhídrido de sal de amonio de NeuAc puede ser 97% o más, preferentemente 98% o más, más preferentemente 99% o más, todavía más preferentemente 99.5% o más.

40 El cristal de anhídrido de sal de amonio de NeuAc, que se puede producir mediante el procedimiento de producción anterior, incluye, por ejemplo, un cristal de anhídrido de sal de amonio de NeuAc cuyo patrón de difracción de rayos X de polvo usando CuK α como fuente de rayos X está definido por los valores mostrados en las figuras 1 a 3 y tablas 1, 4 y 6.

[Ejemplos de análisis]

45 (1) Difracción de rayos X de polvo

La medida se realizó usando un aparato de difracción de rayos X de polvo (XRD), Ultima IV (fabricado por Rigaku Corporation), de acuerdo con el libro de instrucciones.

50 (2) Medida del grado de solubilidad

Se añadió un cristal de anhídrido de sal de amonio de NeuAc, o un cristal de dihidrato de NeuAc conocido, a agua ajustada a las temperaturas respectivas hasta que cada cristal permaneció sin disolver, y después de mantener la disolución durante un tiempo suficiente bajo agitación, se recogió el sobrenadante que no contenía cristal, y la concentración de NeuAc en el mismo se midió usando las siguientes condiciones de HPLC.

55 Columna protectora: Shodex SUGAR SH-G ϕ 6.0 \times 50 mm

Columna: SUGAR SH1011 ϕ 8.0 \times 300 mm \times 2 columnas en serie

60 Temperatura de la columna: 60°C

Amortiguador: una disolución acuosa de ácido sulfúrico 0.005 moles/l

65 Caudal: 0.6 ml/min

Detector: detector de UV (longitud de onda: 210 nm)

(3) Medida del contenido de agua del cristal por el método de Karl-Fisher

5 La medida se realizó usando un dispositivo automático de medida del contenido de agua Aqv-2200 (fabricado por Hiranuma Sangyo Co., Ltd.) de acuerdo con el libro de instrucciones.

(4) Medida del contenido de amonio

10 Se disolvió un cristal de anhídrido de sal de amonio de NeuAc en agua, y se midió la concentración de iones de amonio contenidos en el cristal usando las siguientes condiciones de HPLC.

Columna: YMC-Pack ODS-AQ ϕ 6.0 \times 150 mm

15 Temperatura de la columna: 40°C

Amortiguador: se disuelven en agua desionizada dihidrato de citrato trisódico (14.7 g), sulfato de sodio anhidro (7.1 g), lauril sulfato de sodio (15 g), y 1-propanol (600 ml), y el volumen final se completa hasta 5 l, y el pH se ajusta a 3.8 usando ácido sulfúrico.

20 Disolución de reacción: se disuelven en agua desionizada ácido bórico (18.5 g), hidróxido de sodio (10.7 g), N-acetilcisteína (4.6 g), o-ftalaldehído (0.6 g) y Brij-35 (4.1 ml), y el volumen final se completa hasta 1 l.

Caudal: 1,2 ml/min (fase móvil), 0,4 ml/min (disolución de reacción)

25 Detector: longitud de onda de excitación: 355 nm, longitud de onda de fluorescencia: 455 nm

(5) Medida del punto de fusión

30 La medida se realizó usando Melting Point M-565 (fabricado por BUCHI) de acuerdo con el libro de instrucciones.

(6) Análisis espectroscópico de infrarrojos (IR)

35 La medida se realizó usando el Modelo FTIR-8400 (fabricado por Shimadzu Corporation) de acuerdo con el libro de instrucciones.

[Ejemplo 1 de referencia]

Adquisición de sal de amonio de NeuAc amorfa no cristalina

40 Se disolvió en agua un cristal de anhídrido de NeuAc (519.4 g), y el pH se ajustó a 6.80 usando agua amoniacal, con lo que se preparó una disolución acuosa que contiene sal de amonio de NeuAc (650 ml). Una porción de esta disolución acuosa se liofilizó, con lo que se obtuvo un polvo blanco. Se midió la difracción de rayos X de polvo del polvo, y como resultado, no se confirmó un pico de difracción de rayos X. Por lo tanto, se encontró que el polvo está en un estado amorfo no cristalino.

45 A continuación se describen ejemplos, pero la presente invención no se limita a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

50 Adquisición de cristal de anhídrido de sal de amonio de NeuAc (1)

Se disolvió en agua NeuAc (1,546.7 g en términos de un anhídrido), y el pH se ajustó a 7.67 usando agua amoniacal, y el volumen final se completó hasta 3,800 ml. Esta disolución acuosa se concentró hasta 1,800 ml, y se usó una porción de 500 ml de la disolución concentrada obtenida para la etapa siguiente.

55 Mientras se mantenía la porción de 500 ml de la disolución concentrada a 45°C, se añadieron gota a gota 1,500 ml (3 veces la cantidad) de metanol a lo largo de 3 horas, y luego, se añadieron 400 ml de acetona a la misma. Después de la maduración durante 1 hora, se le añadieron adicionalmente 1,100 ml (cantidad de adición final: 3 veces la cantidad) de acetona durante 3 horas para precipitar un cristal. La suspensión cristalina se enfrió hasta 5°C y se maduró durante 3 horas, y el cristal se recogió entonces por filtración, se lavó con una disolución acuosa de metanol al 80%, y se secó a presión reducida a 25°C, con lo que se obtuvieron 430.8 g del cristal.

65 Los resultados de la difracción de rayos X de polvo del cristal se muestran en la tabla 1. En la tabla, "2 θ " indica el ángulo de difracción (2 θ), e "Intensidad relativa" indica la relación de intensidad relativa (I/I₀). Se muestran los resultados cuando la relación de intensidad relativa fue 5 o mayor.

[Tabla 1]

29	Intensidad relativa
6.6	6
12.4	39
13.1	10
13.8	55
14.3	88
16.6	7
16.9	11
17.1	27
17.6	7
18.4	13
21.3	35
21.6	36
22.5	77
22.7	100
23.6	27
24.1	16
24.9	46
25.4	14
25.7	14
27.3	10
27.8	26
28.2	23
28.5	26
28.7	23
30.0	7
30.6	12
31.0	10
31.8	12
32.3	15
33.0	12
34.5	14
34.7	12
35.7	11
37.5	15
38.2	13
40.2	15
42.4	23
43.6	13

5 El contenido de amonio del cristal según se mide por el método de HPLC fue 5.3% en peso, y coincidió sustancialmente con el valor teórico (5.2% en peso) de una sal de monoamonio. Además, la cantidad de agua contenida en el cristal fue 1.0% en peso o menos.

10 A partir de estos resultados, se encontró que el cristal es un cristal de anhidrato de sal de amonio de NeuAc.

En la tabla 2 se muestran diversas propiedades físicas del cristal. En cuanto al pH, se midió una disolución acuosa a 100 g/l en términos de sal de amonio de NeuAc.

[Tabla 2]

15

Contenido de agua	Contenido de amonio	Punto de fusión	pH
%	%	°C	
0.95	5.3	166.2	7.07

En la figura 5 se ilustran los grados de solubilidad en agua del cristal de anhidrato de sal de amonio de NeuAc obtenido anteriormente y un cristal de dihidrato de NeuAc.

20 Se reveló que el cristal de anhidrato de sal de amonio de NeuAc presenta un alto grado de solubilidad en comparación con el grado de solubilidad del cristal del dihidrato de NeuAc conocido, y presenta una excelente solubilidad.

Además, el punto de fusión del cristal de anhídrido de sal de amonio de NeuAc es 166.2°C, y es mayor que el punto de fusión de alrededor de 105°C de la sal de monohidrato de sal de amonio de NeuAc conocida. Por lo tanto, se reveló que el cristal de anhídrido de sal de amonio de NeuAc es estable incluso en condiciones de alta temperatura.

5 Ejemplo 2

Adquisición de cristal de anhídrido de sal de amonio de NeuAc (2)

10 Se disolvió en agua NeuAc (1,475.8 g en términos de un anhídrido), y el pH se ajustó a 6.81 usando agua amoniaca, y el volumen final se completó hasta 4,000 ml. Esta disolución acuosa se concentró hasta 1,810 ml, y para la etapa siguiente se usó una porción de 40 ml de la disolución concentrada obtenida.

15 A la porción de 40 ml de la disolución concentrada, se le añadieron 10 ml de agua, para completar el volumen hasta 50 ml. Mientras se mantenían los 50 ml de la disolución a 40°C, se le añadieron gota a gota 40 ml de etanol durante 1 hora. Se le añadió el cristal obtenido en el ejemplo 1 como un cristal de siembra para precipitar un cristal. Después de que el cristal maduró durante 9 horas, se añadieron gota a gota 110 ml (cantidad de adición final: 3 veces la cantidad) de etanol adicionalmente a lo largo de 8 horas. La suspensión cristalina se enfrió hasta 10°C y se maduró durante 3 horas, y el cristal se recogió entonces por filtración, se lavó con una disolución acuosa de etanol al 80% y se secó a presión reducida a 25°C, con lo que se obtuvieron 32.9 g del cristal.

20 En la tabla 3 se muestran los resultados de la difracción de rayos X de polvo del cristal. En la tabla, "2θ" indica el ángulo de difracción (2θ), e "Intensidad relativa" indica la relación de intensidad relativa (I/I₀). Se muestran los resultados cuando la relación de intensidad relativa fue 5 o mayor.

25

[Tabla 3]

2θ	Intensidad relativa
6.5	8
12.3	46
13.0	12
13.7	73
14.2	98
16.5	7
16.8	10
17.1	28
17.6	6
18.3	13
21.2	33
21.6	31
22.4	72
22.6	100
23.5	28
24.0	14
24.8	42
25.3	13
25.6	14
27.2	9
27.7	22
28.1	20
28.4	23
28.6	21
29.9	7
30.5	10
30.9	9
31.8	10
32.3	16
32.9	12
34.4	13
34.5	12
35.6	10
37.4	13
38.2	12
40.1	13
42.3	24

2 θ	Intensidad relativa
43.5	12

El patrón de difracción de rayos X de polvo y las propiedades físicas del cristal fueron sustancialmente iguales que los del cristal de anhídrido de sal de amonio de NeuAc obtenido en el ejemplo 1, y por lo tanto, se encontró que el cristal asimismo es un cristal de anhídrido de sal de amonio de NeuAc.

En la tabla 4 se muestran diversas propiedades físicas del cristal. En cuanto al pH, se midió una disolución acuosa a 100 g/l en términos de sal de amonio de NeuAc.

[Tabla 4]

Contenido de agua	Contenido de amonio	Punto de fusión	pH
%	%	°C	
0.67	5.3	168.7	6.60

Con respecto al cristal de anhídrido de sal de amonio de NeuAc y la sal de amonio de NeuAc amorfa no cristalina adquirida en el ejemplo 1 de referencia, se comparó el cambio de peso en una atmósfera de 25°C y una humedad del 60%, y los resultados se muestran en la tabla 5.

[Tabla 5]

Tiempo transcurrido [h]	0	3	7	24
Cristal de sal de amonio	0.00	-0.08	-0.10	-0.06
Amorfa no cristalina	0.00	6.58	10.4	13.5
(Porcentaje de cambio de peso [%])				

La sal de amonio de NeuAc amorfa no cristalina exhibió un marcado aumento de peso debido a la absorción de humedad y sufrió deliquesencia después de 24 horas. Por otro lado, en el cristal de anhídrido de sal de amonio de NeuAc, no se observó un aumento de peso, y por lo tanto, se reveló que la absorción de humedad puede suprimirse mediante la cristalización.

Ejemplo 3

Adquisición de cristal de anhídrido de sal de amonio de NeuAc (3)

Mientras se mantenían 50 ml de la disolución concentrada ajustada en el ejemplo 2 a 40°C, se le añadieron gota a gota 25 ml (0.5 veces la cantidad) de metanol durante 1 hora. A esto se le añadió un cristal de siembra y el cristal se maduró durante 4 horas, y después, se añadieron gota a gota 225 ml (cantidad de adición final: 5 veces la cantidad) de metanol a lo largo de 12 horas, para precipitar un cristal. La suspensión cristalina se enfrió hasta 10°C y se maduró durante 3 horas, y después, el cristal se recogió por filtración, se lavó con una disolución acuosa de metanol al 80% y se secó a presión reducida a 25°C, con lo que se obtuvieron 40.6 g de un cristal.

En la tabla 6 se muestran los resultados de la difracción de rayos X de polvo del cristal. En la tabla, "2 θ " indica el ángulo de difracción (2 θ°), e "Intensidad relativa" indica la relación de intensidad relativa (I/I_0). Se muestran los resultados cuando la relación de intensidad relativa fue 5 o mayor.

[Tabla 6]

2 θ	Intensidad relativa
6.5	11
12.3	52
13.0	14
13.7	74
14.2	92
16.5	8
16.8	12
17.0	28
17.6	7
18.3	15
21.2	36
21.6	36
22.4	85
22.6	100

2θ	Intensidad relativa
23.5	31
24.0	16
24.8	41
25.3	15
25.6	13
27.2	10
27.7	25
28.1	23
28.4	26
28.6	21
29.9	8
30.5	12
30.9	9
31.7	12
32.3	17
32.9	13
34.4	14
34.6	13
35.6	12
37.4	15
38.1	13
40.1	15
42.3	22
43.5	13

El patrón de difracción de rayos X de polvo del cristal fue sustancialmente igual al de los cristales de anhidratos de sal de amonio de NeuAc obtenidos en los ejemplos 1 y 2, y por lo tanto, se encontró que el cristal es asimismo un cristal de anhidrato de sal de amonio de NeuAc.

5

En la tabla 7 se muestran diversas propiedades físicas del cristal. En cuanto al pH, se midió una disolución acuosa a 100 g/l en términos de sal de amonio de NeuAc.

[Tabla 7]

10

Contenido de agua	Contenido de amonio	Punto de fusión	pH
%	%	°C	
0.60	5.2	167.5	6.39

Con respecto al cristal de anhidrato de sal de amonio de NeuAc y un cristal de dihidrato de NeuAc conocido, se comparó el grado de coloración cuando se almacenaron en un sistema cerrado a 60°C, y los resultados se muestran en la tabla 8. El grado de coloración se expresa por transmitancia $T\% 430 \text{ nm} = 100 \times 10^{-A}$ ($A = \text{Abs: } 430 \text{ nm, } 1 \text{ cm}$), que se obtuvo disolviendo cada cristal a 100 g/l en términos de un anhidrato y realizando medidas para la disolución.

15

[Tabla8]

Tiempo transcurrido [días]	0	3	6
Cristal de sal de amonio	99.73	98.87	98.49
Cristal de dihidrato	100.1	73.26	50.46
(Transmitancia T % 430 nm)			

Se encontró que la coloración del cristal de anhidrato de sal de amonio de NeuAc durante el almacenamiento es extremadamente baja en comparación con el cristal de hidrato de NeuAc conocido.

Aplicabilidad industrial

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un cristal de anhidrato de sal de amonio de NeuAc, que es útil, por ejemplo, como un producto, una materia prima o un intermedio de, por ejemplo, alimentos saludables, productos farmacéuticos, y sustancias cosméticas, y un procedimiento de producción de los mismos.

30

Descripción de números de referencia y signos

En la figura 5, el diamante negro indica el cristal de anhidrato de sal de amonio de NeuAc, y el diamante blanco

indica el cristal de dihidrato de NeuAc.

REIVINDICACIONES

1. Cristal de anhídrido de N-acetilneuraminato de amonio.
- 5 2. Cristal según la reivindicación 1, en el que el cristal presenta unos picos en ángulos de difracción (2θ) de $12.3\pm 0.2^\circ$, $13.7\pm 0.2^\circ$, $14.2\pm 0.2^\circ$, $22.4\pm 0.2^\circ$ y $22.6\pm 0.2^\circ$ en una difracción de rayos X de polvo que utiliza $\text{CuK}\alpha$ como la fuente de rayos X.
- 10 3. Cristal según la reivindicación 2, en el que el cristal presenta además unos picos en ángulos de difracción (2θ) de $17.1\pm 0.2^\circ$, $21.2\pm 0.2^\circ$, $21.6\pm 0.2^\circ$, $23.5\pm 0.2^\circ$ y $24.8\pm 0.2^\circ$ en una difracción de rayos X de polvo que utiliza $\text{CuK}\alpha$ como la fuente de rayos X.
- 15 4. Cristal según la reivindicación 3, en el que el cristal presenta además unos picos en ángulos de difracción (2θ) de $27.7\pm 0.2^\circ$, $28.1\pm 0.2^\circ$, $28.4\pm 0.2^\circ$, $28.6\pm 0.2^\circ$ y $42.3\pm 0.2^\circ$ en una difracción de rayos X de polvo que utiliza $\text{CuK}\alpha$ como la fuente de rayos X.
- 20 5. Procedimiento para producir un cristal de anhídrido de N-acetilneuraminato de amonio, que comprende añadir o añadir gota a gota un disolvente seleccionado de entre el grupo que consiste en alcoholes y cetonas a una disolución de ácido N-acetilneuramínico acuosa que contiene un compuesto que contiene amonio y que presenta un pH de 3.0 a 9.0 para precipitar un cristal de anhídrido de N-acetilneuraminato de amonio y recoger el cristal de anhídrido de N-acetilneuraminato de amonio a partir de la disolución acuosa.
- 25 6. Procedimiento de producción según la reivindicación 5, en el que el disolvente seleccionado de entre el grupo que consiste en alcoholes y cetonas es un disolvente seleccionado de entre alcoholes de C1-C6, acetona, metil etil cetona y dietil cetona.

Fig. 1

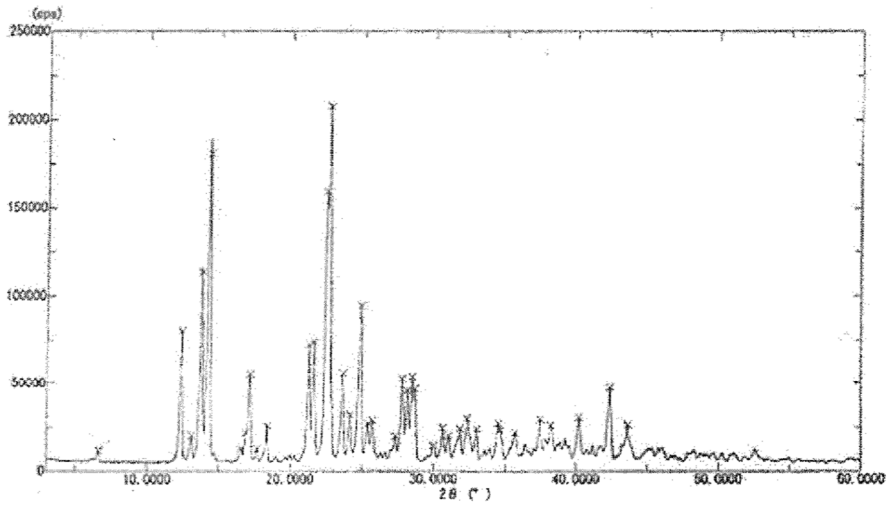


Fig. 2

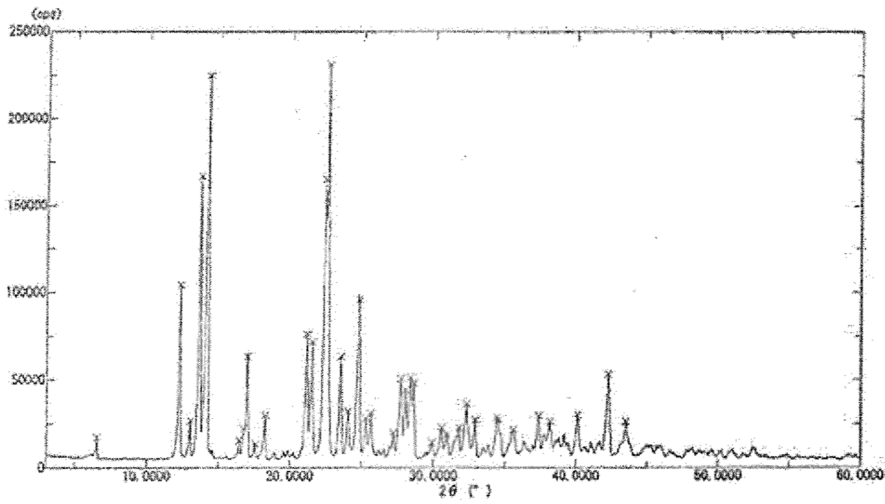


Fig. 3

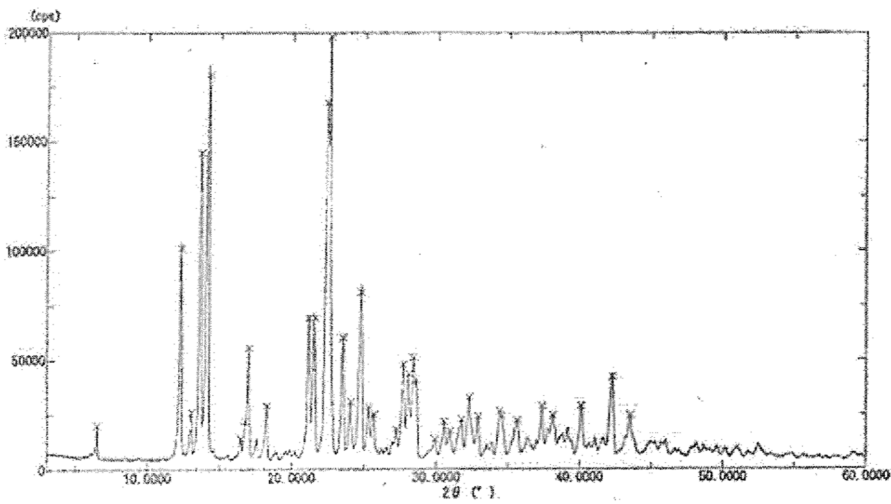


Fig. 4

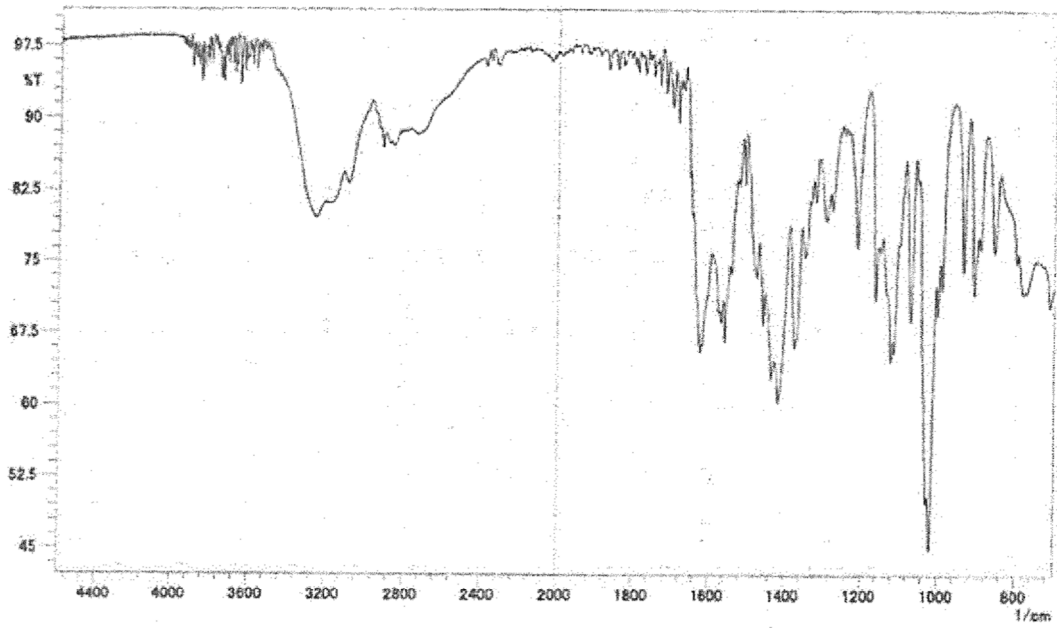


Fig. 5

