

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 992 209**

51 Int. Cl.:

**C07H 19/20** (2006.01)

**C07H 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.09.2020 PCT/KR2020/012693**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.04.2021 WO21071130**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2020 E 20874856 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2024 EP 4043472**

54 Título: **Método de preparación de un cristal de heptahidrato de 5'-guanilato disódico**

30 Prioridad:

**08.10.2019 KR 20190124774**

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

**10.12.2024**

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)  
Ssangnim-dong330 Dongho-roJung-gu  
Seoul 04560, KR**

72 Inventor/es:

**CHOI, JUNG HWA;  
KIM, MIN JONG;  
OH, CHANG YUB;  
LIM, HWA YEON;  
KANG, SEOK HYUN;  
KIM, YU SHIN;  
KANG, JI HUN;  
KIM, IL CHUL y  
YU, JAE HUN**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 992 209 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

Método de preparación de un cristal de heptahidrato de 5'-guanilato disódico

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere a un método de preparación de cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico. En particular, la presente divulgación se refiere a un método de obtención de cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico mediante cristalización por concentración sin usar un disolvente orgánico.

10

**Antecedentes de la técnica**

Generalmente se sabe que los cristales de 5'-guanilato disódico tienen una forma amorfa, una forma de tetrahidrato en forma de placa, y una forma de heptahidrato en forma de columna. Como es difícil la separación de cristales de forma amorfa mediante separación sólido-líquido, su transporte y su almacenamiento, en la industria se usa principalmente la forma de heptahidrato.

15

Un método de obtención industrial de los cristales emplea un disolvente orgánico hidrófilo tal como el metanol, etanol, etc., que es un antisolvente a base de alcohol.

20

El método de cristalización que usa un disolvente orgánico hace que los cristales tengan disolvente orgánico hidrófilo residual en su interior incluso después del secado, que provoca ansiedad en los usuarios. Adicionalmente, es necesario obtener el disolvente orgánico con una gran pureza en un proceso de recuperación del disolvente orgánico hidrófilo usado en el proceso, lo que requiere elevados costes, incluida la inversión en una columna de destilación y costes de servicios públicos relacionados, así como los costes de seguridad de los trabajadores para evitar explosiones.

25

De acuerdo con ello, los presentes inventores han llevado cabo experimentos para perfeccionar el método anterior, y han descubierto que se pueden obtener cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico sin usar un disolvente orgánico, completando de este modo la presente divulgación.

30

El documento CN 101 654 469 A describe un método de cristalización de 5'-guanosina-fosfato disódico que comprende añadir una sal sódica que es 0,2-2 veces el 5'-guanosina-fosfato disódico y desolvatar con un volumen que es 0,3-3 veces el de la solución de 5'-guanosina-fosfato disódico en una solución acuosa del producto bruto 5'-guanosina-fosfato disódico con una concentración del 5-20 % en peso, controlar la temperatura de cristalización entre 10 y 60 °C, controlar la velocidad de rotación de mezcla a 50-300 rpm, y una vez completada la cristalización, filtrar y secar la solución para obtener cristales de 5'-guanosina-fosfato disódico.

35

El documento US 3 190 877 A describe una sal disódica cristalina de ácido 5'-guanílico y un método de preparación de dicho compuesto que comprende disolver ácido 5'-guanílico o una sal sódica del mismo en una solución que tiene un pH alcalino, dejarlo hasta que precipite la sal disódica amorfa del ácido 5'-guanílico y dejar dicha sal amorfa en la solución hasta que se forme la sal disódica cristalina del ácido 5'-guanílico.

40

El documento CN 1 955 189 A describe la preparación de cristales del 5'-nucleótido controlando la temperatura de una solución de nucleótido para que esté en el intervalo de 40 a 70 °C durante un tiempo de 20 minutos a 1 hora. Se dice que se preparan cristales grandes calentando los nucleótidos adecuados y sales de sodio.

45

**Descripción de las realizaciones**50 **Problema técnico**

Un aspecto proporciona un método de preparación de cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico sin usar un disolvente orgánico, y el método incluye la mezcla de una solución acuosa de sal y una solución acuosa de ácido 5'-guanílico para formar sólidos amorfos en una solución mixta de tal manera que la concentración de sal en la solución mixta sea de 160 g/l a 360 g/l, en donde la solución acuosa de sal es una solución acuosa de NaCl; y la adición de cristales de siembra a la solución mixta para formar cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico, en donde la adición de los cristales de siembra se realiza manteniendo la temperatura entre 25 °C y 45 °C.

55

**Solución al problema**

60

Un aspecto proporciona un método de preparación de cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico sin usar un disolvente orgánico, y el método incluye la mezcla de una solución acuosa de sal y una solución acuosa de ácido 5'-guanílico para formar sólidos amorfos en una solución mixta de tal manera que la concentración de sal en la solución mixta sea de 160 g/l a 360 g/l, en donde la solución acuosa de sal es una solución acuosa de NaCl; y la adición de cristales de siembra a la solución mixta para formar cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico, en donde la adición de los cristales de siembra se realiza manteniendo la temperatura entre 25 °C y 45 °C.

65

En el método, la solución acuosa de sal puede tener un pH de 7 a 10. La adición se puede efectuar manteniendo la temperatura de la solución mixta entre 25 °C y 45 °C.

5 La solución acuosa de sal puede tener una concentración de sal que se mezcla con la solución acuosa de ácido 5'-guanílico para formar la solución mixta que tiene una concentración de sal de 160 g/l a 360 g/l. Por ejemplo, la solución acuosa de sal puede ser una solución acuosa de sal de 200 g/l a 400 g/l.

10 La solución acuosa de ácido 5'-guanílico se puede preparar añadiendo ácido 5'-guanílico a agua. La solución acuosa de ácido 5'-guanílico puede ser una solución acuosa de ácido 5'-guanílico de 50 g/l a 400 g/l. La solución acuosa de ácido 5'-guanílico puede incluir una sal, por ejemplo, puede ser una solución acuosa de 5'-guanilato disódico. La solución acuosa de ácido 5'-guanílico puede incluir los obtenidos por cultivo microbiano. Los obtenidos por cultivo microbiano pueden ser un sobrenadante obtenido eliminando células de un cultivo microbiano que incluye ácido 5'-guanílico. Los obtenidos por cultivo microbiano pueden ser los obtenidos purificando el sobrenadante mediante  
15 cromatografía de intercambio iónico o con carbón activado. La purificación con carbón activado puede incluir la mezcla de carbón activado y el cultivo para permitir que las impurezas se unan al carbón activado, y la eliminación, de la mezcla, del carbón activado al que se unen las impurezas.

20 En el método, la mezcla de la solución acuosa de ácido 5'-guanílico se puede efectuar hasta que la concentración de sal en la solución mixta sea de 160 g/l a 360 g/l. La mezcla de la solución acuosa de ácido 5'-guanílico se puede efectuar hasta que la concentración de NaCl en la solución mixta sea de 160 g/l a 360 g/l.

25 En el método, la formación de los sólidos amorfos puede incluir el secado de la solución mixta de tal manera que la concentración de sal llegue a ser de 160 g/l a 360 g/l. La mezcla de la solución acuosa de ácido 5'-guanílico puede incluir la adición de la solución acuosa en porciones. La adición puede ser gota a gota. La adición se puede efectuar durante un tiempo de 1 minuto a 1000 minutos. La mezcla de la solución acuosa de ácido 5'-guanílico se puede efectuar con agitación.

30 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "sólido amorfo" se refiere a un sólido blanco que no tiene ninguna forma cristalina como un cristal, sino que precipita aleatoriamente. Los sólidos amorfos flotan en una solución y tienen una forma no transparente, irregular y opaca, porque son amorfos. Cuando este sólido amorfo se seca, se puede identificar como anhídrido en el análisis de hidratos del mismo.

35 En el método, la adición de los cristales de siembra se puede efectuar mientras se mantiene la temperatura de la solución mixta entre 25 °C y 45 °C. Los cristales de siembra pueden incluir cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico. La adición de los cristales de siembra se puede efectuar mientras se agita un reactor. La adición de los cristales de siembra puede ser una adición de los cristales en porciones. La adición puede ser gota a gota. La adición se puede efectuar durante un tiempo de 1 minuto a 1000 minutos. La cantidad de cristales de siembra añadidos puede basarse en el peso de 5'-guanilato en la solución mixta de la solución acuosa de ácido 5'-guanílico y la solución acuosa  
40 de sal. La cantidad de cristales de siembra añadidos puede ser de 0,1 partes en peso a 5,5 partes en peso, o de 0,1 partes en peso a 5,0 partes en peso, basadas en 100 partes en peso de 5'-guanilato. El 5'-guanilato puede ser, por ejemplo, 5'-guanilato disódico.

45 El método puede incluir además el enfriamiento de la solución que incluye los cristales formados después de la formación de los cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico. El enfriamiento se puede efectuar a 25 °C o menos, por ejemplo, a una temperatura de 4 °C a 25 °C, de 4 °C a 20 °C, de 4 °C a 15 °C, de 4 °C a 10 °C, de 10 °C a 25 °C, de 15 °C a 25 °C, o de 10 °C a 20 °C.

50 El método puede incluir además la separación de los cristales de la solución que incluye los cristales formados después de la formación de los cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico. La separación se puede efectuar por centrifugación o filtración. La centrifugación se puede efectuar entre 100 x g y 1000 x g. La centrifugación se puede efectuar durante un tiempo de 1 minuto a 30 minutos. La filtración se puede efectuar utilizando un filtro de 0,22 µm a 200 µm.

55 En el método, la solución acuosa de sal es una solución acuosa de NaCl.

Una realización puede proporcionar un método de preparación de cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico, y el método incluye la formación de sólidos amorfos en una solución mixta mezclando una solución acuosa de sal y una  
60 solución acuosa de ácido 5'-guanílico de tal manera que la concentración de sal en la solución mixta llegue a ser de 160 g/l a 360 g/l; y la formación de cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico mediante la adición de cristales de siembra a la solución mixta, en donde la temperatura de la solución mixta puede ser de 25 °C a 45 °C. La solución acuosa de sal puede ser una solución acuosa de sal de 200 g/l a 400 g/l. La solución acuosa de ácido 5'-guanílico puede ser una solución acuosa de ácido 5'-guanílico de 50 g/l a 400 g/l. La solución acuosa de sal puede tener un pH de 7 a 10. Los cristales de siembra pueden ser cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico. La solución acuosa de ácido 5'-guanílico puede incluir los obtenidos por cultivo microbiano. La solución acuosa de ácido 5'-guanílico puede  
65 incluir un cultivo obtenido por cultivo microbiano, o un sobrenadante de cultivo obtenido por eliminación de células del

mismo, o un ácido 5'-guanílico purificado a partir del mismo. El microbio puede ser capaz de producir ácido 5'-guanílico. La cantidad de cristales de siembra añadidos puede ser de 0,1 partes en peso a 5,5 partes en peso, basadas en 100 partes en peso de 5'-guanilato formado en la solución mixta. La sal puede ser NaCl. El 5'-guanilato puede ser, por ejemplo, 5'-guanilato disódico.

Una realización puede proporcionar un método de preparación de cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico, y el método incluye la formación de sólidos amorfos en una solución mixta que se prepara mezclando una solución acuosa de NaCl y una solución acuosa de ácido 5'-guanílico de tal manera que la concentración de sal en la solución mixta llegue a ser de 160 g/l a 360 g/l; y la formación de cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico añadiendo, a la solución mixta, cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico como cristales de siembra en una cantidad de 0,1 a 5,5 partes en peso basadas en 100 partes en peso de 5'-guanilato formado en la solución mixta, en donde la temperatura de la solución mixta puede ser de 25 °C a 45 °C. La solución acuosa de sal puede ser una solución acuosa de sal de 200 g/l a 400 g/l. La solución acuosa de ácido 5'-guanílico puede ser una solución acuosa de ácido 5'-guanílico de 50 g/l a 400 g/l. La solución acuosa de sal puede tener un pH de 7 a 10. La solución acuosa de ácido 5'-guanílico puede incluir los obtenidos por cultivo microbiano. La solución acuosa de ácido 5'-guanílico puede incluir un cultivo obtenido por cultivo microbiano, o un sobrenadante de cultivo obtenido por eliminación de células del mismo, o un ácido 5'-guanílico purificado a partir del mismo. El microbio puede ser capaz de producir ácido 5'-guanílico. La cantidad de cristales de siembra añadidos puede ser de 0,1 partes en peso a 5,5 partes en peso, basadas en 100 partes en peso de 5'-guanilato.

### Efectos ventajosos de la divulgación

Según un método de preparación de cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico a partir de una solución acuosa de ácido 5'-guanílico según un aspecto de la presente divulgación, los cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico se pueden preparar eficazmente a partir de la solución acuosa de ácido 5'-guanílico.

Específicamente, según el método de preparación del heptahidrato de 5'-guanilato disódico de la presente divulgación, los cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico se pueden obtener sin añadir un disolvente orgánico. Según el método de preparación de la presente divulgación, es ventajoso en términos de problemas de seguridad para el trabajador que pueden ser causados por el disolvente orgánico, y los productos finales no incluyen ningún disolvente orgánico residual, respondiendo de este modo a las preocupaciones de los usuarios finales sobre la toxicidad del disolvente orgánico. Adicionalmente, el método es económico porque se puede reducir la inversión en equipos a prueba de explosiones y los costes de mantenimiento de los equipos, o la inversión en una columna de destilación y los costes de servicios públicos relacionados para recuperar los disolventes orgánicos usados con alta pureza, así como el coste de los servicios públicos usados para el funcionamiento del proceso.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una imagen de cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico obtenidos según el ejemplo 1, fotografiados con un microscopio; la figura 2 muestra una imagen de cristales de tetrahidrato de 5'-guanilato disódico de tipo placa obtenidos según el ejemplo comparativo 2, fotografiados con un microscopio; y la figura 3 muestra una imagen de cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico obtenidos usando metanol, que es un disolvente orgánico hidrófilo según el ejemplo comparativo 3, fotografiados con un microscopio.

### Modo de la divulgación

En lo sucesivo en el presente documento, la presente divulgación se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos. Sin embargo, los ejemplos sirven únicamente para ilustrar la presente divulgación, y el alcance de la misma no debe limitarse a los mismos.

#### Ejemplo 1

En el ejemplo, se formaron cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico a partir de una solución acuosa de 5'-guanilato disódico sin usar un disolvente orgánico, y se aislaron.

Se añadieron lentamente 0,875 l de una solución acuosa de 380 g/l de 5'-guanilato disódico a 1 l de una solución acuosa de 300 g/l de cloruro sódico a un pH de 9 y una temperatura de 40 °C en un matraz de 3 l durante 30 minutos. Como resultado, se formaron sólidos amorfos en la solución mixta. Adicionalmente, el 5'-guanilato disódico se obtuvo purificando un producto de fermentación que incluía ácido 5'-guanílico, que se obtuvo mediante fermentación microbiana del propio inventor. El pH de la solución acuosa de 300 g/l de cloruro sódico se ajustó usando 2 ml de NaOH a una concentración del 50 % p/p. Los sólidos amorfos se convirtieron en cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico a una concentración de cloruro sódico de 160 g/l en la solución mixta.

Manteniendo la temperatura de la solución mixta de la solución acuosa de cloruro sódico y la solución acuosa de 5'-guanilato disódico a 42 °C, se añadieron a la solución cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico como cristales

de siembra en una cantidad del 1 % en peso basado en el peso de 5'-guanilato disódico formado en la solución mixta, seguido de incubación en las mismas condiciones. En el plazo de 1 hora después de la incubación, los sólidos amorfos se convirtieron en heptahidrato de 5'-guanilato disódico en forma de columna. Como resultado, la solución mixta estaba en forma de una suspensión que incluía cristales. El término "suspensión" se refiere a una suspensión viscosa en la que se mezclan cristales en fase sólida y un líquido. En lo sucesivo en el presente documento, la solución mixta que incluye cristales también se denomina suspensión de cristales.

Esto demuestra que el heptahidrato de 5'-guanilato disódico en forma de columna se puede formar incubando la solución mixta de la solución acuosa de cloruro sódico y la solución acuosa de ácido 5'-guanílico en presencia de heptahidrato de 5'-guanilato disódico como cristales de siembra. Esto demuestra que el heptahidrato de 5'-guanilato disódico en forma de columna se puede formar incubando la solución mixta sin usar un disolvente orgánico. Esto constituye un efecto notable que no habría esperado un experto en la materia.

A continuación, después de 1 hora de incubación, la temperatura de la suspensión de cristales se enfrió de forma natural a 25 °C o menos durante dos horas.

Esta suspensión de cristales se colocó en una centrifugadora de cesta H-110F (KOKUSAN Co. Ltd., Japón) y se centrifugó a una fuerza G de 340 x g durante 20 minutos. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante para obtener una suspensión de cristales. A partir de la suspensión de cristales obtenida se obtuvieron 285 g de cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico.

La centrifugadora H-110F tiene una cesta perforada instalada en su interior y conectada a un suministro de rotación externo. La cesta perforada está hecha de tejido filtrante de fibra multifilamento de poliamida, y la permeabilidad al aire del filtro es de 250 l/m<sup>2</sup>/s a 200 Pa (2 mbar). Los cristales filtrados se secaron a temperatura ambiente durante 24 horas.

La pureza y la concentración de los cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico separados se analizaron mediante HPLC. Específicamente, se disolvieron 1,0 g del cristal de heptahidrato de 5'-guanilato disódico seco y del cristal de heptahidrato de 5'-guanilato disódico patrón (Sigma, ≥ 99,0 % p/p (HPLC)) en 1 l de agua destilada terciaria para preparar 1,0 g/l de solución del ejemplo y 1,0 g/l de soluciones patrón, respectivamente. La pureza del heptahidrato de 5'-guanilato disódico en la solución patrón se confirmó mediante el certificado del fabricante del reactivo patrón. Posteriormente, la concentración de 5'-guanilato disódico en el producto patrón se calculó por 1,0000 g/l x [pureza del producto patrón].

Se cargaron respectivamente 5 µl de la solución del ejemplo y de la solución patrón en una columna de un sistema LC cuaternario Agilent 1260 Infinity (Agilent Technology Inc.). La columna era Shiseido CAPCELL PAK C18 ACR (150 mm x 4,6 mm, 3 µm). A continuación, mientras se aplicaban a la columna, 2 % (v/v) de acetonitrilo/98 % (v/v) de tampón fosfato (pH 2,4) a un caudal de 1 ml/min, se midió la absorbancia a 254 nm de un eluido que salía. El tampón fosfato incluía 2 g/l de fosfato amónico, 0,2 g/l de fosfato de tetrabutil amonio y 0,82 g/l de ácido fosfórico. En ese momento, la temperatura era de 35 °C. Estas condiciones de HPLC se aplicaron también para medir la concentración del 5'-GMP en el filtrado. Como resultado, se calculó la pureza según la siguiente fórmula.

$$\text{Pureza} = \text{Cantidad de 5'-GMP} / \text{Peso total de sólidos} \times 100$$

Adicionalmente, se colocaron 5 µl de la solución del ejemplo y de la solución patrón respectivamente en una celda rectangular del instrumento CARY 100 UV-VIS (Agilent Technology Inc.), y se midió la transmitancia a 420 nm.

En consecuencia, secando de forma natural la suspensión de cristales resultante a 25 °C durante 12 horas se obtuvieron cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico seco. Los cristales secados tenían un contenido de humedad residual del 23,6 % p/v. Los cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico secados obtenidos tenían un peso de 261 g, un rendimiento del 78,0 % y una pureza del 95,0 %. Tal como se especifica para la solución acuosa de cristales al 5 % p/v, el % de transmitancia (T) fue del 95,0 % y el pH de 7,0 a 8,5.

La figura 1 muestra una imagen de los cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico obtenidos según el ejemplo 1, fotografiados con un microscopio. En la figura 1, los cristales de 5'-guanilato disódico se mostraban en forma de columna, indicando que los cristales obtenidos según el ejemplo 1 eran heptahidrato de 5'-guanilato disódico.

#### Ejemplo comparativo 1

Se efectuaron experimentos de la misma manera que en el ejemplo 1, con la excepción de que se añadieron 1,3 l de la solución acuosa de 380 g/l de 5'-guanilato disódico en lugar de 0,875 l, y la concentración de cloruro sódico en la solución mixta fue de 130,4 g/l. Como resultado, aunque se añadieron cristales de siembra y se observaron durante 6 horas, no se observó la conversión de los sólidos amorfos en heptahidrato de 5'-guanilato disódico. Cuando la temperatura de la solución mixta se enfrió lentamente a 25 °C o menos durante dos horas, los sólidos amorfos permanecieron tal cual, por lo que no podían separarse mediante centrifugación utilizando un separador de cesta.

Ejemplo comparativo 2

5 Cuando se añadieron lentamente 0,875 l de una solución acuosa de 380 g/l de 5'-guanilato disódico a 1 l de una solución acuosa de 300 g/l de cloruro sódico a una temperatura de 40 °C, cuyo pH se ajustó a 9 usando 0,3 g de NaOH al 5 %, los cristales no cristalinos, es decir, los cristales amorfos, se convirtieron en cristales de tetrahidrato de tipo placa a una concentración de cloruro sódico de 160 g/l. Se añadió un 1 % en peso de cristales de siembra con respecto al peso del 5'-guanilato disódico a la solución mixta de la solución acuosa de sal y la solución acuosa de 5'-guanilato disódico, manteniendo la temperatura interna de la solución mixta a aproximadamente 52 °C, y la conversión cristalina se completó en 1 hora. Sin embargo, los cristales obtenidos no eran cristales de heptahidrato de tipo columna, sino cristales de tetrahidrato de tipo placa.

La figura 2 muestra una imagen de los cristales de tetrahidrato de 5'-guanilato disódico de tipo placa obtenidos según el ejemplo comparativo 2, fotografiados con un microscopio.

15 Ejemplo comparativo 3: Cristal preparado usando un disolvente orgánico

Se añadieron 4,4 g de Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y se disolvieron completamente en 1,5 l de solución de 200 g/l de 5'-guanilato disódico, seguido de agitación a 120 rpm a una temperatura de 38 °C durante un tiempo de 10 minutos a 20 minutos. Tras añadir 0,2 l de metanol a la misma a un caudal de 3,4 ml por minuto, se añadió a la solución heptahidrato de 5'-guanilato disódico como cristales de siembra en una cantidad del 1 % en peso basada en el peso de 5'-guanilato disódico. Cuando el sistema estaba completamente equilibrado, se utilizó repetidamente 1 l de metanol a 3,4 ml por minuto durante un total de 5 horas para obtener cristales de tipo columna, cuyo peso era de 259 g tras la deshidratación de los mismos.

25 Los cristales resultantes se secaron de forma natural a 25 °C durante 12 horas para obtener cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico secados. Los cristales secados tenían un contenido de humedad residual del 23,6 % p/v.

30 La tabla 1 muestra la cantidad de metanol usada en los métodos descritos en el ejemplo 1 y en el ejemplo comparativo 3, la pureza de los cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico producidos de este modo, y el contenido de metanol que queda en ellos. En la tabla 1, la cantidad de metanol usada se basa en los 100 g de heptahidrato de 5'-guanilato disódico obtenidos. Adicionalmente, la pureza (%) del heptahidrato de 5'-guanilato disódico se midió según el método descrito en el ejemplo 1. El contenido residual de metanol representa el metanol que queda en la solución acuosa de cristales al 5 % p/v.

35 [Tabla 1]

	Cantidad de metanol usada (g)	Pureza del heptahidrato de 5'-guanilato disódico (%)	Cantidad de metanol residual (ppm)
Ejemplo Comparativo 3	270	95,06	850
Ejemplo 1	0	95,00	No detectada

Tal como se muestra en la tabla 1, los cristales del ejemplo 1 mantenían una pureza del 95 % o más, que era similar a la del ejemplo comparativo 3.

40 Adicionalmente, en el ejemplo comparativo 3, se usaron 270 g de metanol como disolvente orgánico para obtener 100 g de cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico, pero en el ejemplo 1 no se usó ningún disolvente orgánico.

45 La figura 3 muestra una imagen de cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico obtenidos usando metanol, un disolvente orgánico hidrófilo según el ejemplo comparativo 3, fotografiados con un microscopio.

**Ejemplo de evaluación 1. Efecto de la concentración de sal en la solución mixta sobre la formación de cristales**

50 En esta sección, se efectuaron experimentos de la misma manera que en el ejemplo 1, con la excepción de que se usaron 400 g/l de solución acuosa de cloruro sódico en lugar de 300 g/l de solución acuosa de cloruro sódico, y se añadieron diferentes cantidades de solución acuosa de 5'-guanilato disódico de modo que las concentraciones de NaCl en la solución mixta fueran de 120 g/l a 380 g/l.

Como resultado, se observaron al microscopio sólidos amorfos o cristales formados en la solución mixta. Los resultados se muestran en la tabla 2.

55

[Tabla 2]

Concentración de cloruro sódico (g/l)	Morfología del material sólido	Tiempo de conversión (min)
120	Sólido amorfo	-
140	Sólido amorfo	-

(continuación)

Concentración de cloruro sódico (g/l)	Morfología del material sólido	Tiempo de conversión (min)
160	Cristal de heptahidrato en forma de columna	30
200	Cristal de heptahidrato en forma de columna	25
300	Cristal de heptahidrato en forma de columna	25
360	Cristal de heptahidrato en forma de columna	25
380	Cristal de heptahidrato en forma de columna, aunque el cristal es pequeño y mezclado con cloruro sódico	25

Tal como se muestra en la tabla 2, cuando la concentración de cloruro sódico en la solución mixta era de 160 g/l o más, la forma sólida amorfa del 5'-guanilato disódico se convirtió en el heptahidrato. Al mismo tiempo, cuando la concentración de cloruro sódico en la solución mixta superaba los 360 g/l, se obtuvieron cristales más pequeños mezclados con cloruro sódico, lo que dificultaba la separación del 5'-guanilato disódico de la suspensión de cristales. Cuanto mayor es el tamaño del cristal, más fácil es separar los cristales de 5'-guanilato disódico de la suspensión de cristales. Como resultado, teniendo en cuenta los resultados de la sección 2, se confirmó que se formaba heptahidrato de 5'-guanilato disódico a una concentración de sal de 160 g/l a 360 g/l en la solución mixta.

Ejemplo de evaluación 2. Solubilidad del ácido 5'-guanílico en la solución mixta

Con la solución acuosa de ácido 5'-guanílico añadida a diferentes concentraciones de las soluciones acuosas de cloruro sódico a una temperatura de 40 °C y 25 °C, se examinó la solubilidad del ácido 5'-guanílico.

Específicamente, la solución acuosa de ácido 5'-guanílico se disolvió suficientemente en cada una de las soluciones acuosas de cloruro sódico a 40 °C y 25 °C, respectivamente, para preparar soluciones saturadas. Como resultado, se prepararon de 160 g/l a 360 g/l de solución saturada de cloruro sódico. Tal como se muestra en las tablas 3 y 4, se precipitaron cristales de cloruro sódico en soluciones que incluían 400 g/l o más de cloruro sódico en la solución mixta. Después, se midieron las concentraciones (g/l) de ácido 5'-guanílico en los sobrenadantes obtenidos mediante centrifugación de cada una de las soluciones saturadas, es decir, las soluciones mixtas.

La tabla 3 y la tabla 4 muestran las concentraciones de heptahidrato de 5'-guanilato disódico en soluciones acuosas de cloruro sódico a 40 °C y 25 °C, respectivamente.

[Tabla 3]

Concentración de cloruro sódico (g/l)	160	200	230	280	300	310	350	360	400	superior a 400
Concentración de ácido 5'-guanílico (g/l) en la solución mixta	86,5	62,7	57,1	50,1	49,9	49,5	48,9	49,8	49,6 Cristales de cloruro sódico precipitados	48,7 Cristales de cloruro sódico precipitados

[Tabla 4]

Concentración de cloruro sódico (g/l)	160	200	230	280	300	310	350	360	400	420
Concentración de ácido 5'-guanílico en la solución mixta (g/l)	40,1	26,4	22,2	19,2	18,1	18,2	18,2	18,2	18,3 Cristales de cloruro sódico precipitados	18,2 Cristales de cloruro sódico precipitados

Tal como se muestra en las tablas 3 y 4, se confirmó que el heptahidrato de 5'-guanilato disódico tiene baja solubilidad en cada solución acuosa de cloruro sódico de 160 g/l a 360 g/l, por ejemplo, de 160 g/l a 360 g/l. Al mismo tiempo, el heptahidrato de 5'-guanilato disódico se disolvió en cada solución acuosa de cloruro sódico con menos de 160 g/l sin mantener la forma de columna.

### Ejemplo de evaluación 3. Efecto de la temperatura de la solución mixta en la formación de cristales

A 1 l de una solución acuosa de cloruro sódico de 300 g/l, cuyo pH se ajustó a 9 usando 0,3 g de NaOH al 5 %, se añadieron lentamente 0,875 l de una solución acuosa de 5'-guanilato disódico de 380 g/l. A la solución mixta que tenía una concentración de cloruro sódico de 160 g/l y una concentración de 5'-guanilato disódico de 200 g/l, manteniendo la temperatura interna de la misma según se muestra en tabla 5 siguiente, se añadieron cristales de siembra en una cantidad del 1 % en peso, basado en el peso del 5'-guanilato disódico, mientras se examinaba al microscopio la conversión de sólidos amorfos de 5'-guanilato de sodio en cristales de heptahidrato. La tabla 5 muestra los cristales obtenidos en función de la temperatura de la solución mixta.

[Tabla 5]

Temperatura (°C)	Morfología de los cristales	Tiempo de conversión (min)
20	Cristal de heptahidratado en forma de columna	180
25	Cristal de heptahidratado en forma de columna	80
30	Cristal de heptahidratado en forma de columna	60
35	Cristal de heptahidratado en forma de columna	42
40	Cristal de heptahidratado en forma de columna	30
45	Cristal de heptahidratado en forma de columna	25
50	Cristal de tetrahidrato de tipo placa	30

5 Tal como se muestra en la tabla 5, la conversión en cristales de heptahidrato de tipo columna se observó incluso a 20 °C, aunque llevó un tiempo la conversión. Se observó una rápida conversión de los sólidos amorfos en heptahidrato desde una temperatura de 25 °C o superior. Al mismo tiempo, los sólidos amorfos se convirtieron en tetrahidrato a una temperatura superior a 45 °C.

Ejemplo de evaluación 4. Efecto de la cantidad de cristal de siembra añadido en la formación de los cristales

10 A 1 l de una solución acuosa de cloruro sódico de 300 g/l, cuyo pH se ajustó a 9 usando 0,3 g de NaOH al 5 %, se añadieron lentamente 0,875 l de una solución acuosa de 380 g/l de 5'-guanilato disódico. En la solución mixta, la concentración de cloruro sódico era de 160 g/l, la concentración de ácido 5'-guanílico era de 200 g/l, y la temperatura de la solución mixta era de 40 °C.

15 Una vez formados los sólidos amorfos, se añadieron cristales de siembra tal como se muestra en la tabla 6 siguiente, y se observó al microscopio la tasa de conversión en cristales. La tabla 6 muestra los cristales según la cantidad de cristales de siembra añadidos a la solución mixta.

[Tabla 6]

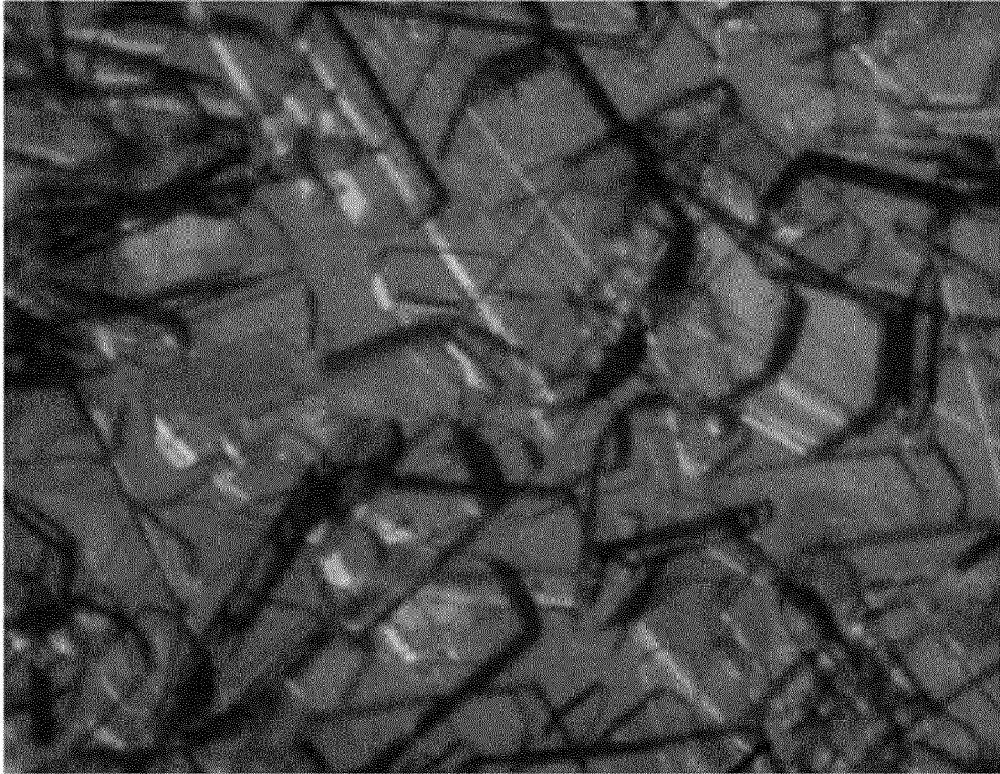
Peso del cristal de siembra (basado en 100 partes en peso de 5'-guanilato de sodio)	Morfología de los cristales	Tiempo de conversión (min)
0,05	Cristal de heptahidratado en forma de columna	80
0,1	Cristal de heptahidratado en forma de columna	60
0,5	Cristal de heptahidratado en forma de columna	40
1,0	Cristal de heptahidratado en forma de columna	30
2,5	Cristal de heptahidratado en forma de columna	30
5,0	Cristal de heptahidratado en forma de columna	25
5,5	Cristal de heptahidratado en forma de columna	25

20 Tal como se muestra en la tabla 6, a medida que aumentaba la cantidad de cristales de siembra añadidos, tendía a disminuir el tiempo necesario para que el 5'-guanilato disódico pasara del sólido amorfo al heptahidrato en forma de columna. Sin embargo, se confirmó que cuando la cantidad de cristales de siembra añadida superaba las 5,0 partes en peso, el tiempo de conversión ya no disminuía.

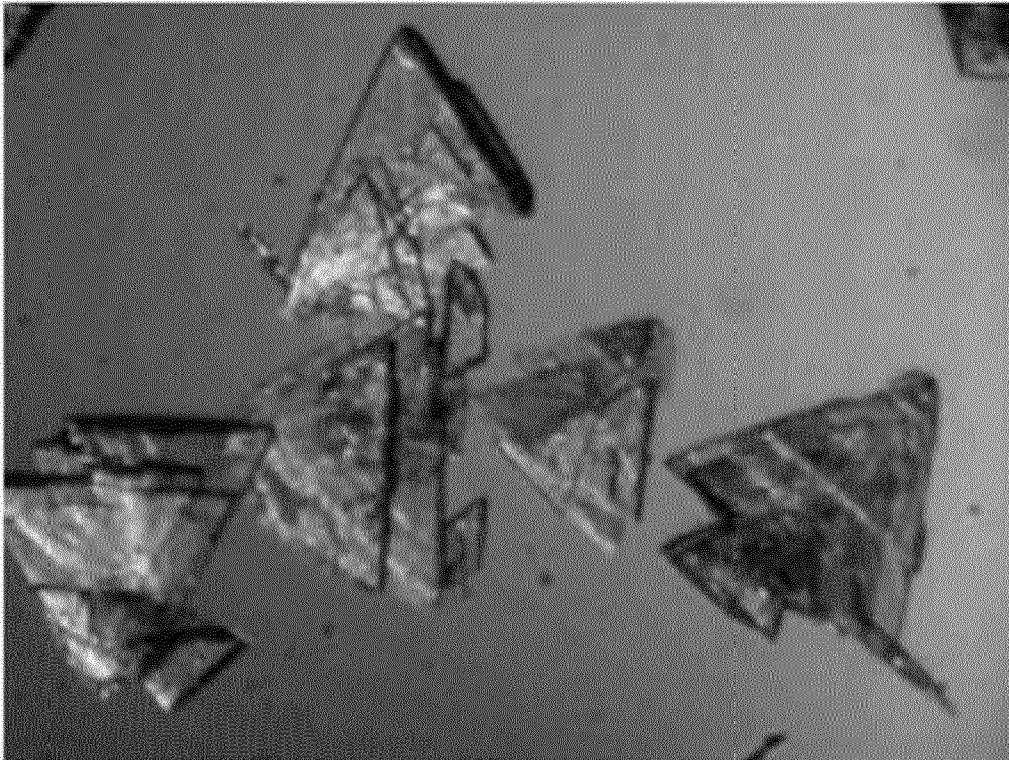
REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico sin usar un disolvente orgánico, comprendiendo el método:
- 5 la mezcla de una solución acuosa de sal y una solución acuosa de ácido 5'-guanílico para formar sólidos amorfos en una solución mixta de tal manera que la concentración de sal en la solución mixta sea de 160 g/l a 360 g/l, en donde la solución acuosa de sal es una solución acuosa de NaCl; y
- 10 la adición de cristales de siembra a la solución mixta para formar cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico, en donde la adición de los cristales de siembra se realiza manteniendo la temperatura entre 25 °C y 45 °C.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la solución acuosa de sal tiene un pH de 7 a 10.
3. El método de la reivindicación 1, en donde la concentración de sal en la solución acuosa de sal es de 200 g/l a 15 400 g/l.
4. El método de la reivindicación 1, en donde la concentración de ácido 5'-guanílico en la solución acuosa de ácido 5'-guanílico es de 50 g/l a 400 g/l.
- 20 5. El método de la reivindicación 1, en donde la solución acuosa de ácido 5'-guanílico comprende los obtenidos por cultivo microbiano.
6. El método de la reivindicación 1, en donde los cristales de siembra comprenden cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico.
- 25 7. El método de la reivindicación 1, en donde la cantidad de cristales de siembra añadidos es de 0,1 partes en peso a 5,5 partes en peso basadas en 100 partes en peso de 5'-guanilato.
8. El método de la reivindicación 1, que comprende además enfriar una solución que comprende los cristales formados después de la formación de los cristales de heptahidrato de 5'-guanilato disódico.
- 30 9. El método de la reivindicación 8, en donde el enfriamiento se efectúa a 25 °C o menos.

**FIG. 1**



**FIG. 2**



**FIG. 3**

