

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 748**

51 Int. Cl.:
A61K 31/685 (2006.01)
A61K 8/14 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A23J 7/00 (2006.01)
C07F 9/10 (2006.01)
C12P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06753893 .4**
96 Fecha de presentación: **26.05.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1890706**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.02.2008**

54 Título: **Procedimiento de preparación y aislamiento de fosfátidos**

30 Prioridad:
30.05.2005 IT PD20050164
01.08.2005 US 703870 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.06.2012

73 Titular/es:
FIDIA FARMACEUTICI S.P.A.
VIA PONTE DELLA FABBRICA 3-A
35031 ABANO TERME (PADOVA), IT

72 Inventor/es:
ZANELLATO, Anna, Maria;
PITTARELLO, Mara;
GAMBILLARA, Antonio y
VACCARO, Susanna

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 382 748 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

Procedimiento de preparación y aislamiento de fosfátidos

Objeto de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos para la producción y la purificación de fosfatidilserina (PS), para obtener el producto final con un alto rendimiento, por medio de óxidos de metales bivalentes (BMO).

Campo de la invención

El declive funcional del Sistema Nervioso Central (SNC), que ocurre durante el proceso fisiológico del envejecimiento cerebral, causa, frecuentemente, el deterioro de las funciones cognitivas en las personas mayores, lo que, a su vez, puede provocar trastornos de conducta y alteraciones de la memoria temporal y espacial.

10 Este declive funcional en la actividad del SNC está vinculado tanto con la aparición de alteraciones bioquímicas y estructurales en la composición lipídica de las membranas neuronales como en la disminución de la actividad de las enzimas cerebrales, que puede reducir las sinapsis neuronales.

15 La fosfatidilserina (PS) es el principal fosfolípido ácido en el cerebro. Por lo tanto, la investigación científica se ha centrado durante algún tiempo en la búsqueda de un tratamiento farmacológico para los trastornos cognitivos relacionados con la edad, basado en fosfolípidos, que puede prevenir (y/o reconstruir parcialmente) el déficit estructural y funcional de las membranas neuronales envejecidas.

20 Estudios preclínicos y clínicos en seres humanos han demostrado que la administración de PS por vía oral, especialmente en los ancianos, puede determinar un incremento significativo en la capacidad de aprendizaje y la memoria temporal y espacial, incluso en el caso de patologías particularmente discapacitantes, tales como la enfermedad de Alzheimer (Cenacchi T. et al.; Aging Clin Exp Res, 1993, 5:123-133; Nunzi MG et al.; Adv Exp Med Biol, 1992; 318:393-8).

Además, se ha demostrado que la fosfatidilserina es capaz de combatir el incremento en la hormona cortisol en sujetos sometidos a estrés físico (Monteleone P. et al.; Neuroendocrinology, 1990, 52(3):243-8), reduciendo, de esta manera, el catabolismo de la glucosa, con una mayor recuperación funcional después de un esfuerzo físico intenso.

25 La presente invención se refiere a un procedimiento para la síntesis y la purificación de PS y al uso de PS como el principio activo en fármacos (y/o complementos alimenticios) para la prevención de las patologías relacionadas con la edad, indicadas anteriormente, y en la preparación de suplementos alimenticios indicados para todos los casos de estrés físico intenso y, además, en la producción de liposomas para su uso en el campo de la cosmética y/o como un sistema de liberación controlada para los fármacos que contienen.

30 Los procedimientos de producción y purificación de PS, ya conocidos en la literatura científica y en patentes, describen la conversión enzimática de fosfatidilcolina (PC) en PS mediante una reacción de transfosfatidilación catalizada por la enzima fosfolipasa D (PLD), con la subsiguiente purificación realizada principalmente mediante la extracción de la PS con solventes orgánicos.

35 En los últimos años, se han perfeccionado diversos procedimientos para la síntesis de PS mediante conversión enzimática en sistemas de dos fases de agua/solvente orgánico o en un medio acuoso.

El documento EP 0776976 describe un procedimiento de preparación enzimática de PS en un sistema que consiste en agua/tolueno, en el que la fase orgánica contiene el fosfolípido de partida a partir del cual se forma la PS, la fase acuosa contiene el aceptor hidroxilo y la reacción de síntesis ocurre en la interfaz agua/solvente, en presencia de fosfolipasa D cruda, a partir de caldos de fermentación de cepas de microorganismos que producen PLD.

40 Por primera vez, en 1990, los investigadores trataron de eludir el sistema de dos fases, ya que requería grandes cantidades de solvente, que luego eran difíciles de eliminar, con los altos costos correspondientes para la producción y la purificación de PS (Comfurius P. et al., Journal of Lipid Research 1990, 31:1719-1721).

45 Por lo tanto, el solvente orgánico fue sustituido por un detergente/tensoactivo capaz de dispersar el fosfolípido de partida en forma micelar, con el objetivo de realizar la reacción enzimática de síntesis exclusivamente en un medio acuoso.

De hecho, el documento EP 1048738 se refiere a un procedimiento para la síntesis enzimática de PS en un medio acuoso, absolutamente libre de cualquier contaminación por solventes orgánicos, en presencia de concentraciones determinadas de detergentes específicos y sales de calcio.

El documento DE 19917249 describe un procedimiento para la producción enzimática de PS en un medio acuoso sin

usar tensoactivos, exclusivamente con la adición de sal de cloruro de calcio (CaCl_2), sin embargo, no se especifican el porcentaje de conversión enzimática y el grado de pureza de la PS obtenida.

5 El documento EP 1310563 describe un procedimiento para la preparación de PS en una fase acuosa sin usar detergentes y/o sales de calcio, basado en la homogeneización de la mezcla de partida que consiste en fosfolípido, aceptor hidroxilo y PLD en agua, para proporcionar un homogeneizado final con una estructura similar a la de una membrana de fosfolípidos bi-laminar en la que, subsiguientemente, puede ocurrir la reacción de transfosfatidilación.

10 El documento EP 1427839 se describe la síntesis enzimática de fosfolípidos, incluyendo PS, en agua, sin detergentes, pero en presencia de iones metálicos que son liberados desde las sales correspondientes cuando las mismas son preparadas/disueltas en agua. Dicho procedimiento ocurre en dos fases distintas en las que, a partir de mezclas de fosfolípidos, una primera reacción de hidrólisis enzimática es catalizada por PLD para producir ácido fosfatídico, seguido por una segunda reacción de transfosfatidilación, en la que se forma PS en presencia de un exceso de serina.

15 El documento WO 00/77183 divulga un procedimiento de realización de hidrólisis o transesterificación catalizada por enzimas de un fosfolípido, que comprende disolver dicha enzima en un medio acuoso que contiene (i) una suspensión liposomal de dicho fosfolípido, (ii) un reactivo que contiene hidroxilo, seleccionado de entre agua, un alcohol o un derivado de alcohol, y (iii) cuando se requiera por la enzima, un catión de metal divalente, añadiendo gel de sílice a dicho medio, y agitando la mezcla resultante. Preferentemente, el catión de metal divalente es calcio. Solo se ejemplifica el cloruro de calcio.

20 Por último, el documento EP 1231213 reivindica un procedimiento para la síntesis enzimática de PS usando, en agua, una fracción de la enzima PLD producida y purificada a partir de la cepa *Streptovercillium hachijoense*, para un rendimiento más abundante en la producción final de PS.

25 En relación a la purificación de PS (obtenida por transfosfatidilación en un medio acuoso/solvente orgánico o en un medio acuoso), el documento EP 1213294 reivindica un procedimiento de purificación basado en el uso de una mezcla que consiste en agua/solvente orgánico polar (tal como isopropanol), para extraer el fosfolípido indicado anteriormente de la solución que lo contiene, que a su vez es representada por un solvente hidrocarbonado (tal como tolueno), mientras que el documento EP 0922707 se refiere a un procedimiento para la extracción/purificación de PS a partir de una mezcla de fosfolípidos, usando un sistema difásico de solventes orgánicos, tales como heptano y metanol.

La presente invención se refiere a procedimientos para la producción y la purificación de la fosfatidilserina (PS) que proporcionan el producto final en un rendimiento muy alto, gracias a una conversión eficiente de PC en PS, por medio de la acción específica de los óxidos de metales bivalentes (BMO).

30 Además, el procedimiento de transfosfatidilación catalizado por la enzima PLD, permite que un alto porcentaje de PC sea convertido en PS, independientemente del medio en el que se produce la reacción enzimática.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de PS catalizada por PLD y BMO, cuyo procedimiento se caracteriza porque se realiza

en un medio hidroalcohólico que consiste en agua/alcoholes alifáticos, o

35 en un medio aprótico que consiste en agua/solventes apróticos polares, o

en un sistema de dos fases que consiste en agua/solventes orgánicos.

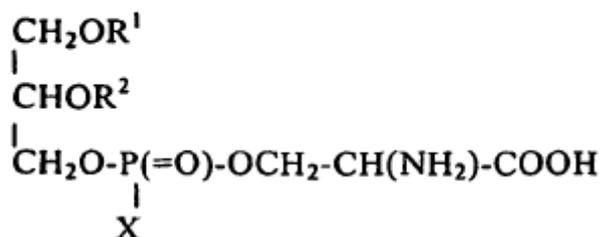
Descripción detallada de la invención

40 La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de PS (Fórmula I), en el que se realiza una transfosfatidilación mediante la enzima PLD, en presencia de BMO, alcanzando así la transferencia de una fracción de fosfatidilo desde fosfatidilcolina (PC) (Fórmula II) a serina (que, en este caso, representa el aceptor hidroxilo); esta reacción enzimática proporciona la conversión de PC en PS en un grado muy alto, independientemente del medio en el que ocurre la reacción enzimática. Por lo tanto, dicha reacción puede tener lugar:

- en un medio hidroalcohólico que consiste en agua/alcoholes alifáticos que no forman un sistema de dos fases, o
- 45 • en un medio aprótico que consiste en agua/solventes apróticos polares que no forman un sistema de dos fases, o
- en un sistema de dos fases que consiste en agua/solventes orgánicos.

Fórmula I

5

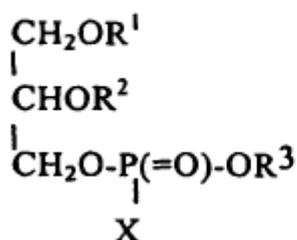


en la que R¹ y R² representan, independientemente, un acilo C₁₀-C₃₀, saturado, mono-insaturado y/o poli-insaturado, X = OH o OM, en la que M = metal alcalinotérreo o alcalino, amonio, alquilamonio (incluida la sal interna).

10

Fórmula II

15



en la que R¹ y R² y X tienen los significados definidos anteriormente y R³ = CH₂-CH₂-NH₂ o CH₂-CH₂-N⁺(CH₃)₃.

20

Sorprendentemente, se ha encontrado que BMO modifica drásticamente el sustrato de reacción representado por la fosfatidilcolina de partida, determinando un cambio, de manera que la acción de la enzima PLD aumenta significativamente en términos del rendimiento final en PS, permitiendo, de esta manera, una producción altamente ventajosa de PS, a escala industrial. Este cambio sustancial ocurre en la estructura del propio sustrato, independientemente del medio en el que tiene lugar la reacción enzimática. De hecho, BMO favorece la fisuración de las vesículas de PC y, con ello, la penetración de la enzima en las mismas, determinando un incremento en el porcentaje de conversión de PC en PS, ya que, al penetrar en el interior de las vesículas, la enzima PLD puede actuar también sobre la capa lipídica en el interior de la vesícula, que no podía ser penetrada anteriormente por soluciones hidrófilas, tales como las que contienen la propia enzima.

25

30

Según la invención, se ensayaron diversos óxidos de metales bivalentes, tales como óxido de calcio (CaO), óxido de magnesio (MgO) y óxido de zinc (ZnO), tanto en medio aprótico como hidroalcohólico, así como en sistemas de dos fases en los que proporcionaron resultados excelentes, tal como se muestra en los Ejemplos siguientes, en comparación con los resultados obtenidos por medio de los mismos procedimientos pero en presencia de cloruro de calcio (CaCl₂).

35

De hecho, se conoce que las sales de calcio y, en particular, de CaCl₂, como fuentes de iones de calcio añadidas al medio en el que ocurre la reacción de transfosfatilación (Comfurius P. et al, Journal of Lipid Research 1990, 31:1719 - 1721; Comfurius P. et al, Biochem Biophys Acta, 1977, 488:36-42), promueven la actividad catalítica de la enzima PLD y, por lo tanto, incrementa la conversión de fosfatidilcolina en PS (Okawa Y. et al.; J Biochem.; 1975; 78:363-372).

40

Con el fin de diferenciar y aclarar que los BMO son completamente diferentes de las sales de metales y para demostrar su eficacia en los nuevos sistemas de producción que son el objeto de la presente invención, el presente solicitante ha realizado experimentos que comparan los diferentes rendimientos de la conversión de PC en PS, en presencia de sales de calcio y en presencia de BMO.

Tal como puede observarse a partir de los resultados obtenidos, el rendimiento de la conversión de fosfatidilcolina en PS demostró, de manera consistente, que no sólo era muy diferente, sino también decidida y significativamente mayor que el obtenido con CaCl₂.

45

Además de los óxidos descritos anteriormente, pueden usarse diversos BMO diferentes en el nuevo procedimiento para la producción de PS, tales como óxido de manganeso, óxido de hierro bivalente, óxido de cobalto, óxido de cobre y todos los óxidos de metales bivalentes restantes en la Tabla de los Elementos.

Los ejemplos de solventes en los que el procedimiento de la presente invención puede ser realizado, son alcoholes alifáticos, tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropanoles; solventes polares apróticos, tales como dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida, acetonitrilo, N-metil-pirrolidona; y solventes orgánicos, tales como n-hexano, tolueno, n-butanol, benceno.

5 El alcohol preferente es isopropanol, el solvente aprótico preferente es DMSO y el solvente orgánico preferente es hexano.

10 El Ejemplo 1 describe la conversión de PC en PS a partir de un medio hidroalcohólico que contiene porcentajes determinados de isopropanol añadido a una solución de partida que consiste en tampón de acetato, en el que se ha disuelto el CaO (o MgO o ZnO), en comparación con el procedimiento de producción de PS realizado en el mismo medio hidroalcohólico, pero en presencia de sal de CaCl₂.

El porcentaje de alcohol (en particular, isopropanol) que puede ser usado en el presente procedimiento (expresado como % en volumen, en el volumen del tampón de partida) puede variar del 0,1 al 50%, preferentemente del 1,25 al 20% y, más preferentemente, del 10%, en un medio hidroalcohólico que contiene una concentración de BMO (en particular, CaO), que varía entre 0,1 y 1M, preferentemente entre 0,3 y 0,6 M y, más preferentemente, es igual a 0,54M.

15 El máximo rendimiento de la conversión de PC en PS es del 90%, el cual está muy lejos del rendimiento obtenido mediante el mismo procedimiento de producción, pero en presencia de CaCl₂.

20 Por otra parte, el Ejemplo 2 demuestra que es posible obtener rendimientos incluso superiores al 80% de la conversión de PC/PS, añadiendo cantidades determinadas de DMSO (expresadas como % en volumen en el volumen de tampón usado) a la solución tampón de partida que contiene concentraciones molares determinadas de CaO (o MgO o ZnO), y que los rendimientos de PS, indicados anteriormente, son muy diferentes de los obtenidos mediante el mismo procedimiento de producción, pero en presencia de CaCl₂.

25 El porcentaje de solvente aprótico (y en particular, DMSO) a usar puede variar del 0,1 al 50%, preferentemente del 1,25 al 10% y, más preferentemente, puede ser del 1,25%, en un medio aprótico que contiene una concentración de BMO (en particular, CaO), que varía entre 0,1 y 1M, preferentemente entre 0,3 y 0,6 M y, aún más preferentemente, puede ser igual a 0,33 M.

La reacción enzimática de transfosfatidilación proporciona un rendimiento muy alto de conversión PC/PS, incluso en un sistema de dos fases que consiste en agua/solvente orgánico.

30 El Ejemplo 3 describe la producción de PS en un sistema de dos fases que consiste en agua/hexano, de nuevo en presencia de CaO, MgO y ZnO. La cantidad de solvente usada en los nuevos procedimientos, que son el objeto de la presente invención, es muy baja (tal como se demuestra más adelante), tan baja que los costos de producción son limitados y no es difícil eliminar el solvente del producto final.

35 La concentración de solvente a usar en dicho procedimiento puede variar del 0,1 al 40% v/v (expresado como % en volumen en el volumen de tampón de partida), preferentemente del 1 al 5% v/v y, más preferentemente, del 1,25% v/v y del 2,5% v/v, en presencia de BMO (y en particular, CaO) a una concentración que varía entre 0, y 1M, preferentemente entre 0,3 y 0,6 M y, más preferentemente, es igual a 0,54M.

En este caso también, el máximo rendimiento de la conversión de PC en PS fue superior al 80%, muy diferente del obtenido por el mismo procedimiento, pero en presencia de CaCl₂.

La reacción de transfosfatidilación puede ser realizada a diferentes temperaturas, en el intervalo entre 20 y 70°C, preferentemente a 45 ó 55°C.

40 El sustrato fosfátido de partida está representado por fosfatidilcolina de origen animal y/o vegetal, natural o sintética, presente en forma purificada o como materia prima, a concentraciones de partida en el intervalo entre 10 y 500 mg/ml, preferentemente entre 200 y 300 mg/ml.

45 El medio acuoso de partida a ser mezclado/asociado con el alcohol, el solvente aprótico o el solvente orgánico para obtener un medio final hidroalcohólico, aprótico o de dos fases, está representado por agua o una solución salina no tamponada o una solución tampón formada, por ejemplo, por trihidrato de acetato sódico y ácido acético a concentraciones de entre 0,02 y 0,2 M.

El aceptor de hidroxilo está representado por serina, que puede estar presente en forma D, L o racémica. La concentración óptima de serina, preferentemente en forma L, puede variar entre 1 g/g (gg) de fosfátido de partida, hasta 5 gg, preferentemente entre 2 y 3 gg/gg de fosfátido.

50 El pH óptimo de la solución tampón puede variar entre 4 y 9, ya que depende del origen de la PLD usada, pero,

preferentemente, varía entre 5 y 6 y, más preferentemente, es igual a 5,6 si se usa una PLD de origen fermentativo, derivada del micro-organismo *Streptovercillium hachijoense*.

Dicha enzima puede ser usada en forma purificada o parcialmente purificada, o en una forma no purificada después de una filtración simple del microorganismo de su caldo de cultivo.

5 El Ejemplo 4 (y la Figura 1) describe un nuevo sistema para la purificación parcial de PLD para obtener una enzima que está sustancialmente no-contaminada por proteínas de una naturaleza diferente que podría interferir con la actividad catalítica de PLD, un procedimiento que no implica demasiadas etapas, ya que los procedimientos largos conducen a costes industriales excesivos y a la consiguiente falta de viabilidad a escala industrial.

10 La enzima parcialmente purificada, descrita en el Ejemplo 4, fue ensayada en el procedimiento de producción descrito en el Ejemplo 3, en comparación con una enzima presente en forma no purificada (después de una eliminación simple del microorganismo productor) y con preparaciones enzimáticas altamente purificadas (obtenidas usando resinas cromatográficas de intercambio de iones y anticuerpos mono/policonales dirigidos hacia la enzima PLD, pero que pueden ser purificados también usando todos los procedimientos de purificación conocidos por una persona con conocimientos en la materia): el porcentaje de la conversión PC/PS era igual para todas las preparaciones enzimáticas ensayadas (purificada, parcialmente purificada y no purificada).

15 La cantidad óptima de PLD para garantizar una conversión de PC en PS superior al 80% está en el intervalo entre 1 y 100 unidades/g de fosfátido de partida, ya que depende del origen de la PLD usada. Por ejemplo, cuando se usa PLD de *Streptovercillium hachijoense*, la concentración óptima varía entre 1 y 10 unidades/g de fosfátido.

20 Algunos antioxidantes, tales como ácido ascórbico y/o vitamina E, pueden ser incluidos en el procedimiento de preparación y purificación de PS.

La invención se divulga, con más detalle, en los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1

Preparación de PS a partir de PC vegetal en un medio hidroalcohólico (con la presencia de isopropanol) con CaO, MgO y ZnO 0,54M o con CaCl₂ 0,54M

25 Se prepararon dos soluciones hidroalcohólicas diferentes, formadas por dos concentraciones de isopropanol (igual al 1,25 y al 10% del volumen del tampón de partida) en tampón de acetato que contenía CaO (o MgO o ZnO) 0,54M, en comparación con la preparación de PS mediante el mismo procedimiento, pero en presencia de sal de CaCl₂, 0,54M.

30 Los óxidos ensayados y el cloruro de calcio son disueltos en 40 ml de tampón acetato 0,2 M (pH 5,6), al cual se añade, a continuación, 0,5 ml de isopropanol, con el fin de alcanzar el 1,25% v/v (sólo para CaO), o 4 ml de isopropanol, con el propósito de alcanzar el 10% v/v (los alcoholes pueden ser añadidos también a la solución tampón que contiene BMO después de la solubilización de la serina).

35 Las soluciones resultantes son agitadas en un reactor encamisado con condensador, durante aproximadamente 10 minutos, a continuación, se añaden 20 g de serina L a una temperatura de 55°C, agitando hasta la disolución completa. Subsiguientemente, se añaden 10 g de fosfatidilcolina de soja y se agita durante 10 minutos. A continuación, se añaden 5,5 U de enzima PLD por gg de PC y la mezcla es agitada durante 24-48 horas a 55°C.

Finalmente, se toma una muestra de cada producto y la transformación exitosa de PC en PS es ensayada mediante cromatografía en capa fina (TLC).

Rendimiento de la conversión de PC en PS:

40 distribución de los productos presentes al final de la reacción, expresada como % de PA (ácido fosfatídico liberado por la PC como un resultado de la acción de la PLD) y PS obtenida después del procedimiento de transfosfatidilación. PA y PC deben considerarse residuos de la reacción.

Rendimiento de la conversión de PC en PS, obtenido con isopropanol, 1,25% v/v, en presencia de CaO:

PA 8,0%

PS 85,5%

45 PC 6,5%

Rendimiento de la conversión de PC en PS, obtenido con isopropanol, 10% v/v, en presencia de CaO:

PE-OH 4,0%

PA 3,5%

PS 89,5%

PC 3,0%

Rendimiento de la conversión de PC en PS, obtenido con isopropanol, 10% v/v, en presencia de CaCl₂:

5 **PE-OH** 15,8%

PA 10,7%

PS 70,1%

PC 3,4%

Rendimiento de la conversión de PC en PS, obtenido con isopropanol, 10% v/v, en presencia de MgO:

10 **PE-OH** 9,0%

PA 4,5%

PS 84,0%

PC 2,5%

Rendimiento de la conversión de PC en PS con isopropanol, 10% v/v, en presencia de ZnO:

15 **PE-OH** 10,0%

PA 8,0%

PS 80,0%

PC 2,0%

20 (el producto definido como PE-OH se forma durante la reacción de transfosfatidilación porque la reacción ocurre en presencia de alcohol).

Ejemplo 2

Preparación de PS a partir de PC vegetal en un medio aprótico (con la presencia de DMSO) con CaO, MgO y ZnO 0,33M o con CaCl₂ 0,33M

25 El DMSO fue usado en diferentes concentraciones que variaban entre un porcentaje de 1,25 y 10%, en términos del volumen de tampón de partida, en todos los casos en presencia de CaO (o MgO o ZnO) 0,33 M en comparación con la preparación de PS mediante el mismo procedimiento, pero en presencia de sal de CaCl₂.

30 Los óxidos de calcio ensayados y el cloruro de calcio son disueltos en 40 ml de tampón de acetato 0,2 M, a pH 5,6. Las soluciones, obtenidas de esta manera, son agitadas en un reactor encamisado con condensador. Después de aproximadamente 10 minutos de agitación, se añaden 20 g de serina L a una temperatura de 45°C y, a continuación, se continúa la agitación hasta que se logra la solubilización completa.

Subsiguientemente, se añaden 10 g de PC de soja y 0,5 ml de DMSO (correspondiente al 1,25% v/v) o 4 ml de DMSO (correspondiente al 10% v/v) y la mezcla es agitada (el DMSO puede ser añadido durante la fase inicial del procedimiento, después de la solubilización del BMO, como en el ejemplo anterior). Diez minutos más tarde, se añaden 5,5 U de enzima PLD por gg de PC y la mezcla es agitada durante 24-48 horas a 45°C.

35 Subsiguientemente, las muestras de los productos respectivos obtenidos son tomadas al final de la reacción y son ensayadas para la transformación exitosa de PC en PS.

Rendimiento de la conversión de PC en PS:

Rendimiento de la conversión de PC en PS, obtenido con DMSO 1,25% v/v en presencia de CaO:

PA 7,1%

40 **PS** 86,3%

PC 6,6%

Rendimiento de la conversión de PC en PS, obtenido con DMSO 1,25% v/v en presencia de CaCl₂:

PA 8,1%

PS 66,7%

5 **PC** 25,2%

Rendimiento de la conversión de PC en PS, obtenido con DMSO al 10% v/v en presencia de CaCl₂:

PA 6%

PS 69%

PC 25%

10 Rendimiento de la conversión de PC en PS, obtenido con DMSO al 10% v/v en presencia de CaO:

PA 7,5%

PS 72,5%

PC 20%

Rendimiento de la conversión de PC en PS, obtenido con DMSO al 10% v/v en presencia de MgO:

15 **PA** 9,0%

PS 71,0%

PC 20%

Rendimiento de la conversión de PC en PS, obtenido con DMSO al 10% v/v en presencia de ZnO:

PA 8,5%

20 **PS** 71,5%

PC 20%

Ejemplo 3a

Preparación de PS a partir de PC vegetal en un sistema de dos fases (con la presencia del solvente orgánico, hexano) con CaO, MgO y ZnO 0,54M con CaCl₂ 0,54M

25 Se preparó un sistema de dos fases que consistía en tampón de acetato que contenía CaO (o MgO o ZnO) 0,54M y, a continuación, se añadió una cantidad de hexano igual al 1,25% del volumen de partida del tampón, en comparación con la preparación de PS mediante el mismo procedimiento de producción, pero en presencia de CaCl₂ 0,54 M.

30 A continuación, los óxidos ensayados y el cloruro de calcio son disueltos en 40 ml de tampón de acetato 0,2 M (pH 5,6), al cual se añade, a continuación, una cantidad de hexano igual a 0,5 ml, con el fin de alcanzar el 1,25% v/v (el solvente orgánico de elección puede ser añadido a la solución tampón que contiene el BMO antes o después de la solubilización de la serina).

Las soluciones, obtenidas de esta manera, son agitadas en un reactor encamisado con condensador.

A continuación, el procedimiento continúa tal como se describe en el Ejemplo 1.

35 Finalmente, se toma una muestra de cada producto obtenido y es ensayada para la transformación exitosa de PC en PS.

Rendimiento de la conversión de PC en PS:

Rendimiento de la conversión de PC en PS, obtenido con hexano 1,25% v/v en presencia de CaO:

PA 7,5%

PS 87,0%

PC 5,5%

Rendimiento de la conversión de PC en PS, obtenido con hexano 1,25% v/v en presencia de CaCl₂:

PA 8,1%

5 **PS** 68,4%

PC 23,5%

Rendimiento de la conversión de PC en PS, obtenido con hexano 1,25% v/v en presencia de MgO:

PA 8,5%

PS 82,5%

10 **PC** 9,0%

Rendimiento de la conversión de PC en PS, obtenido con hexano 1,25% v/v en presencia de ZnO:

PA 11,0%

PC 80,0%

PS 9,0%

15 **Ejemplo 3 b**

Preparación de PS a partir de PC vegetal en un sistema de dos fases (con la presencia del solvente orgánico, hexano) con CaO 0,54M o con CaCl₂ 0,54M

20 Se preparó un sistema de dos fases que consistía en tampón de acetato que contenía CaO 0,54M y, a continuación, se añadió una cantidad de hexano igual al 2,5% del volumen de partida del tampón, en comparación con la preparación de PS mediante el mismo procedimiento de producción, pero en presencia de CaCl₂, 0,54 M. A partir de este punto, el procedimiento es el mismo que en el Ejemplo 3a.

Rendimiento de la conversión de PC en PS:

Rendimiento de la conversión de PC en PS, obtenido con hexano 2,5% v/v en presencia de CaO:

PA 7,5%

25 **PS** 86,0%

PC 6,5%

Rendimiento de la conversión de PC en PS, obtenido con hexano 2,5% v/v en presencia de CaCl₂:

PA 10,0%

PS 65,0%

30 **PC** 25,0%

Ejemplo 4

Purificación parcial de la enzima PLD

La enzima PLD usada en el nuevo procedimiento de producción puede ser purificada parcialmente mediante las etapas siguientes:

- 35
- eliminación del agente productor mediante micro filtración de flujo tangencial a través de filtros (preferentemente con membranas de polietersulfona, PES) con un tamaño de poro de 0,2 µm;
 - ultrafiltración de flujo tangencial a través de filtros (preferentemente en PES) con un corte molecular de 10.000 D;

- ultrafiltración de flujo tangencial a través de filtros con membranas (preferentemente en PES) con un corte molecular de 300.000 D;
- ultrafiltración final de flujo tangencial a través de membranas (preferentemente en PES) con un corte molecular de 10.000 D para volver a concentrar la enzima y dializar contra tampón TRIS-HCl, 50 mM, pH = 8.

5 La Figura 1 muestra los resultados de un análisis cromatográfico de la enzima PLD parcialmente purificada, según se ha descrito anteriormente, en comparación con un análisis de un caldo de fermentación purificado únicamente del agente productor de la propia enzima (Figura 2).

Ejemplo 5a

Separación y purificación de PS según el procedimiento 1

10 El medio de reacción en el que se ha preparado la PS es suplementado con 1,5 volúmenes (en términos del volumen de reacción de partida) de una solución al 5% de NaCl, y la mezcla es agitada a una temperatura de 30°C durante al menos 30 minutos. La PS, que ha sido depositada en la parte superior del medio de reacción, es aislada, a continuación, mediante separación y eliminación del subnadante. El sobrenadante (PS) es suplementado con 4 volúmenes de una solución al 3% de NaCl y es agitado a $30 \pm 10^\circ\text{C}$ durante al menos 30 minutos. A continuación, el sobrenadante es separado y eliminado (esta etapa se repite 2 veces), mientras que al subnadante (representado por PS) se le añaden 2 volúmenes de una solución de EDTA (ácido etilen diaminotetraacético) (a una concentración de 40 gg/litros) preparada en un tampón de acetato, 0,1 M pH 7,5.

15 Después de un mezclado adicional (a $25 \pm 10^\circ\text{C}$ durante al menos 1 hora), mediante agitación de la mezcla, obtenida de esta manera, el pH es ajustado a 7,7,5 y se añaden 2 volúmenes (en términos del volumen de EDTA) de 95% de etanol, agitando la mezcla a $25 \pm 10^\circ\text{C}$ durante al menos 1 hora.

20 Después de un período de sedimentación de la PS, esta es recogida y el sobrenadante (la fase que consiste en etanol en agua) es eliminado porque la PS no se disolverá en una fase hidroalcohólica. El lavado con etanol/agua (con un porcentaje de etanol de 70-95%) se repite, después de lo cual se realiza un lavado final con etanol al 100%, y como etapa final, la PS puede ser secada.

25 Producto final: distribución de las fracciones lipídicas aisladas según el procedimiento 1, con la PS preparada tal como se describe en el Ejemplo 3 con CaO 0,54M.

PA 5,8%

PS 94,2%

Ejemplo 5 b

30 Separación y purificación de PS según el procedimiento 1

El medio de reacción en el que se ha preparado la PS es suplementado con 1,5 volúmenes (en términos del volumen de reacción de partida) de una solución al 5% de NaCl, y la mezcla es agitada a una temperatura de 20°C durante al menos 30 minutos. La PS, que ha sido depositada en la parte superior del medio de reacción, es aislada, a continuación, mediante la separación y la eliminación del subnadante. El sobrenadante (PS) es suplementado con 3 volúmenes de una solución de NaCl al 3% y es agitado a $20 \pm 10^\circ\text{C}$, durante al menos 30 minutos. A continuación, el sobrenadante es separado y eliminado (esta etapa se ha repetido 3 veces), mientras que al subnadante (representado por PS) se le añaden 3 volúmenes de una solución de EDTA (a una concentración de 30 gg/litro) preparada en un tampón de acetato, 0,1 M de pH 7,0.

35 Después de un mezclado adicional (a $20 \pm 10^\circ\text{C}$ durante al menos 1 hora) mediante agitación de la mezcla, obtenida de esta manera, el pH es ajustado a 7,7,5 y se añaden 2 volúmenes (en términos del volumen de EDTA) de 100% de etanol, agitando la mezcla a $20 \pm 10^\circ\text{C}$ durante al menos 1 hora.

40 Después de un período de sedimentación de la PS, esta es recogida y el sobrenadante (la fase que consiste en etanol en agua) es eliminado. El lavado con etanol/agua (con un porcentaje de etanol del 70%) se repite, después de lo cual se realiza un lavado final con etanol al 100% y, como etapa final, la PS puede ser secada.

45 Producto final: distribución de las fracciones lipídicas aisladas según el procedimiento 1, con PS preparada según se describe en el Ejemplo 3, con CaO 0,54M.

PA 6,8%

PS 93,2%

Ejemplo 5 c

Separación y purificación de PS según el procedimiento 1

5 Antes de añadir la solución de NaCl, la PS es filtrada para eliminar inmediatamente todos los componentes residuales del medio de reacción. A continuación, se añade NaCl y el proceso de aislamiento y purificación se continúa tal como se describe en el Ejemplo 5a.

Producto final: distribución de las fracciones lipídicas aisladas según el procedimiento 1, con la PS preparada según se describe en el Ejemplo 3, con CaO 0,54M.

PA 5,0%

PS 95,0%

10 Después de la reacción de transfosfatidilación, un análisis TLC del producto obtenido (Vitello F. et al.; J Chromatog; 1978; 166 (2):637-40) muestra una concentración del 2% de la serina residual.

La cantidad de PLD en esta fase fue determinada mediante procedimientos del estado de la técnica (Aurich I. et al., Anal Biochem, 1999, 268:337-342) y fue menor o igual que 2 U/g.

15 La concentración de serina fue medida de nuevo al final del procedimiento de purificación de PS, descrito anteriormente, y resultó ser menor o igual que el 0,2%.

La actividad residual de la enzima PLD también fue determinada de nuevo, y resultó ser menor que el límite para la determinación mediante este procedimiento.

20 Para demostrar la ausencia total de incluso la más mínima traza del solvente orgánico usado en el procedimiento de preparación de PS (descrito en el Ejemplo 3) y, de esta manera, confirmar la novedad y la etapa inventiva de la presente invención, el presente solicitante analizó la PS parcialmente purificada, descrita en el Ejemplo 5, en la fase inmediatamente anterior a la adición de la solución alcohólica.

Este análisis fue realizado mediante la conocida técnica de "cromatografía de gases con inyección de espacio de cabeza estática", tal como se describe en European Pharmacopoeia 5.0, sección 2.4.24: Identification and control of residual solvents.

25 El cromatograma de calibración (Figura 3) fue obtenido usando un estándar que consiste en acetato de etilo y n-hexano correspondiente a 1.000 ppm cada uno, equivalente a 100 mg del producto de ensayo.

La Figura 4 muestra la ausencia total de n-hexano en la PS purificada según el Procedimiento 1.

Ejemplo 6

Separación y purificación de PS según el procedimiento 2

30 El medio de reacción en el que se preparó la PS es suplementado con 1,5 volúmenes (en términos del volumen de reacción de partida) de una solución de NaCl al 5% y el conjunto es agitado a 45°C, durante al menos 30 minutos, seguido por un período de separación de la PS, que dura al menos 1 hora.

35 Se forman dos fases: estas son separadas y el subnadante es descartado, mientras que el sobrenadante es suplementado con 2,5 volúmenes de una solución de EDTA de 22 gg/litro, preparada en agua. Una vez alcanzada una temperatura de 28°C, se realiza una ultrafiltración. Preferentemente, deben usarse filtros que tienen poros de un tamaño determinado, de manera que atraparán moléculas con un peso molecular de 100.000/300.000 Daltons.

A continuación, el producto final puede ser liofilizado.

Producto final: distribución de las fracciones lipídicas asiladas según el procedimiento 2, con la PS preparada, por ejemplo, según el Ejemplo 1 con CaO 0,54M.

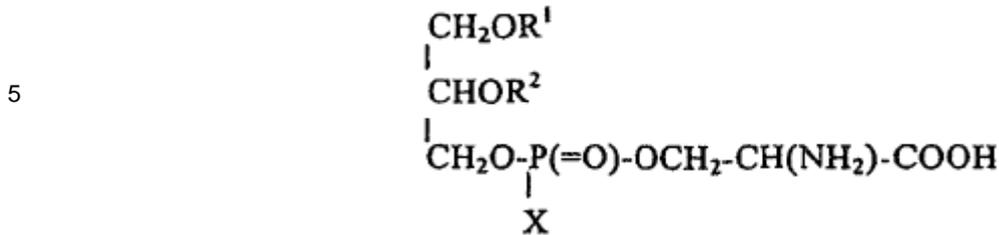
40 **PA** 6,0%

PS 94,0%

La concentración de serina fue medida al final del procedimiento de purificación de PS, descrito anteriormente, y resultó ser menor o igual que el 0,2%, mientras que una determinación adicional de la actividad residual de la enzima PLD demostró ser menor que el límite para la determinación mediante este procedimiento.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de fosfatidilserina de fórmula



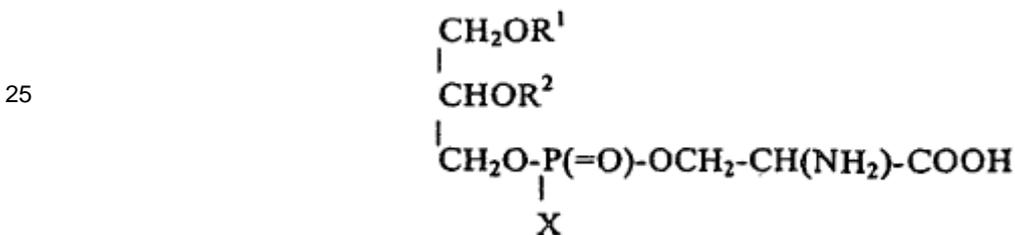
10 en la que R¹ y R² representan, independientemente, un acilo C₁₀-C₃₀, saturado, mono-insaturado o poliinsaturado, X=OH o OM, en la que M = metal alcalino o alcalinotérreo, amonio, alquilamonio (incluyendo la sal interna), incluyendo la reacción de transfosfatidilación entre un compuesto de la fórmula general



en la que R¹ y R² y X tienen los significados especificados anteriormente, R³ = CH₂-CH₂-NH₂ o CH₂-CH₂-N⁺(CH₃)₃ y serina en forma D, L o racémica catalizada por la enzima fosfolipasa D (PLD),

20 **caracterizado porque** dicha reacción es llevada a cabo en un medio hidroalcohólico que contiene un alcohol alifático y en presencia de óxido de metal bivalente.

2. Procedimiento de preparación de fosfatidilserina de fórmula



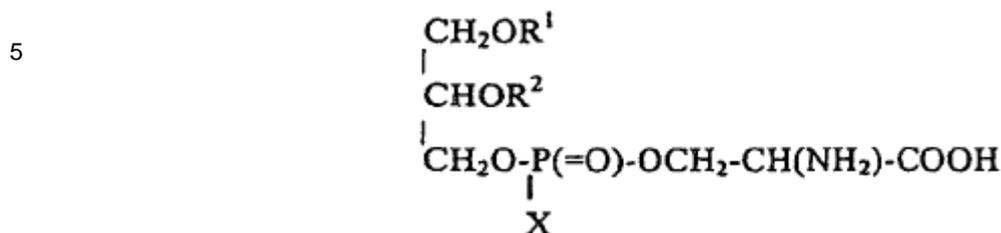
que incluye la reacción de transfosfatidilación entre un compuesto de fórmula general



en la que R₁, R₂, R₃ y X tienen los mismos significados de la reivindicación 1, y serina en forma D, L o racémica catalizada por la enzima fosfolipasa D (PLD),

caracterizado porque dicha reacción ocurre en un medio que contienen un solvente polar aprótico y en presencia de un óxido de metal bivalente.

3. Procedimiento de preparación de fosfatidilserina de fórmula



10 que incluye la reacción de transfosfatidilación entre el compuesto de fórmula general



en la que R₁, R₂, R₃ y X tienen los mismos significados de la reivindicación 1, y serina en forma D, L o racémica catalizada por la enzima fosfolipasa D (PLD),

20 **caracterizado porque** dicha reacción es realizada en un medio que consiste en un sistema de dos fases formado por agua/solvente orgánico aprótico y en presencia de un óxido de metal bivalente.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los alcoholes alifáticos son seleccionados de entre metanol, etanol, n-propanol, isopropanol.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el alcohol alifático es isopropanol en una concentración entre el 0,1 y el 50%, expresada como % en volumen, sobre el volumen del tampón de partida.

25 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que la concentración de isopropanol es del 10%.

7. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que los solventes polares apróticos son seleccionados de entre dimetilsulfóxido, acetonitrilo, dimetilformamida y N-metil-pirrolidona.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el solvente polar aprótico es dimetilsulfóxido en una concentración entre el 0,1 y el 50%, expresada como % en volumen, sobre el volumen del tampón de partida.

30 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la concentración de dimetilsulfóxido es del 1,25%.

10. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que los solventes orgánicos son seleccionados de entre n-hexano, tolueno, benceno y n-butanol.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el solvente orgánico es n-hexano en una concentración entre el 0,1 y el 40%, expresada como % en volumen, sobre el volumen del tampón de partida.

35 12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que la concentración de n-hexano es de 1,25% ó 2,5%.

13. Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, en el que el óxido de metal bivalente es óxido de calcio o magnesio o zinc, en una concentración de entre 0,1 y 1M.

14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que la concentración de los óxidos seleccionados es de 0,33 o 0,54 M.

40 15. Procedimiento según las reivindicaciones 1-3, en el que el compuesto es fosfatidilcolina y la concentración de

serina está en el intervalo entre 1 y 5 g/g de fosfatidilcolina.

16. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que la concentración de serina está en el intervalo entre 2 y 3 g/g de fosfatidilcolina.

5 17. Procedimiento según las reivindicaciones 1-3, en el que el compuesto es fosfatidilcolina y la fosfatidilcolina es de origen animal y/o vegetal, natural o sintética, presente en forma purificada o como materia prima, a una concentración inicial de entre 10 y 500 mg/ml, preferentemente entre 200 y 300 mg/ml.

18. Procedimiento según todas las reivindicaciones anteriores, en el que la reacción de transfosfatidilación ocurre a una temperatura de entre 20°C y 60°C y, preferentemente, a 45°C.

10 19. Procedimiento según todas las reivindicaciones anteriores, en el que la reacción de transfosfatidilación ocurre a una temperatura de entre 20°C y 60°C y, preferentemente, a 55°C.

20. Procedimiento según todas las reivindicaciones anteriores, en el que la enzima PLD es de origen fermentativo, derivada del microorganismo *Streptoverticillium hachijoense*, usada en forma purificada, parcialmente purificada o no purificada.

15 21. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que el compuesto es fosfatidilcolina y la concentración de PLD usada varía entre 1 y 100 unidades/g de fosfatidilcolina.

22. Procedimiento según la reivindicación 21, en el que la concentración de PLD usada varía entre 1 y 10 unidades/g de fosfatidilcolina.

23. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que la enzima PLD, derivada del microorganismo *Streptoverticillium hachijoense*, es purificada siguiendo las etapas siguientes:

20 I) eliminación del agente productor mediante microfiltración con un tamaño de poro de 0,2 µm;

II) ultrafiltración a través de filtros con un corte molecular de 10.000 D;

III) ultrafiltración a través de filtros con membranas con un corte molecular de 300.000 D;

IV) ultrafiltración a través de membranas con un corte molecular de 10.000 D para volver a concentrar la enzima y dializarla contra tampón Tris-HCl.

25

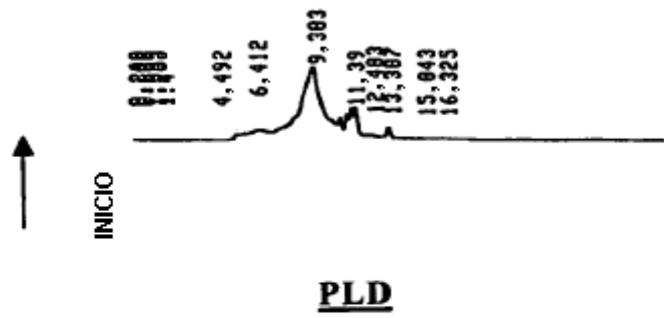


Figura 1

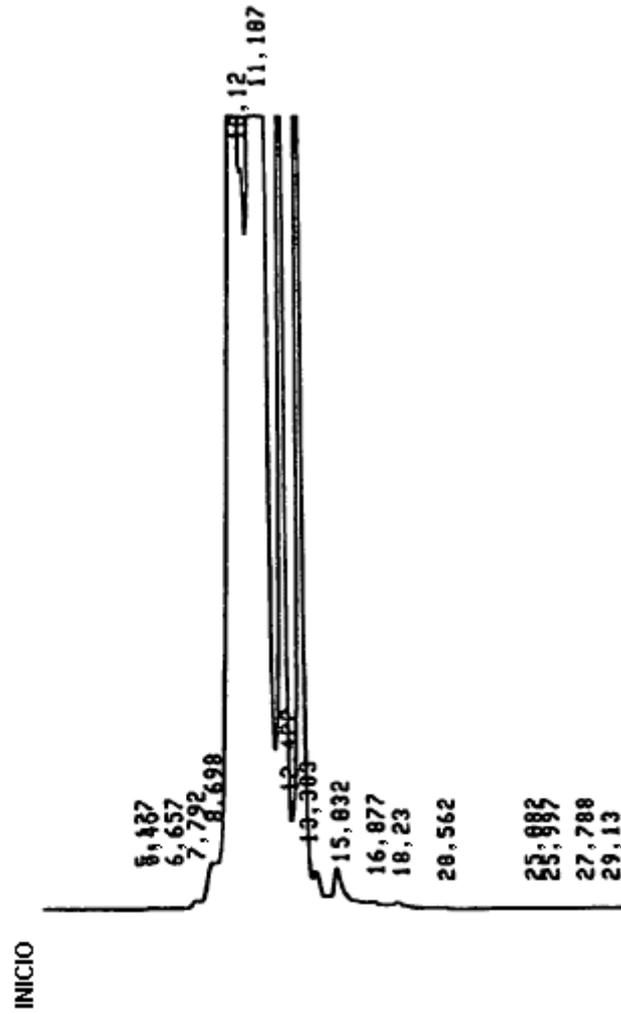
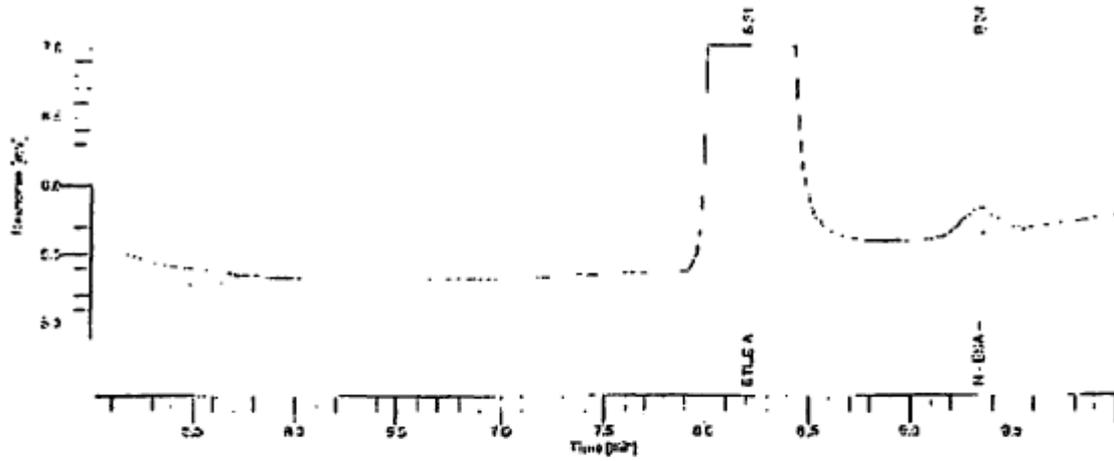


Figura 2



Peak #	Component Name	Time (min)	Area (a.u.*sec)	Height (a.u.)	Area (%)	BL	Solvent
1	BTLS A	8.213	567730	47554	31.5	BB	1002
2	N-Etara	9.337	2101	160	0.1	DD	1000

Making Component Report
 Component Exported Resentier (Colibri (en File))
 All components were found

Figura 3

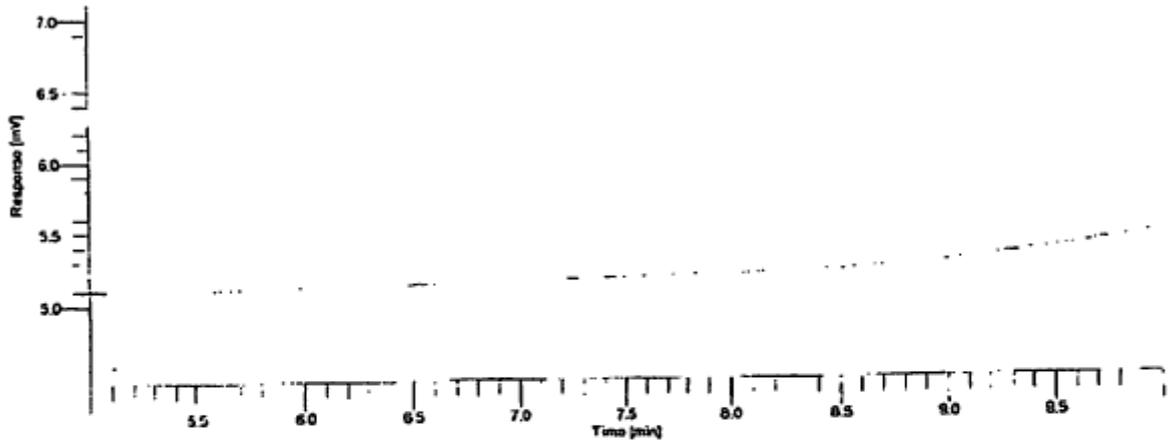


Figure 4