

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 049**

51 Int. Cl.:

C12P 13/06 (2006.01)

C12P 9/00 (2006.01)

C07F 9/10 (2006.01)

A61K 31/685 (2006.01)

A23J 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2004 E 04770566 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012 EP 1663157**

54 Título: **Formulaciones estabilizadas de fosfatidilserina**

30 Prioridad:

25.09.2003 IL 15813903

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

25.03.2013

73 Titular/es:

ENZYMOTEC LTD. (100.0%)

Sagi 2000 Industrial Park

36584 Kfar Baruch , IL

72 Inventor/es:

PLATT, DORIT;

SHULMAN, AVIDOR;

BEN DROR, GAI;

SCHEINMAN, NETA;

TWITO, YONI y

ZUABI, RASSAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 399 049 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

Formulaciones estabilizadas de fosfatidilserina

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a dispersiones estables de fosfatidilserina en una base de aceite. Las preparaciones de fosfatidilserina se pueden usar como nutracéuticos o como aditivos nutracéuticos para alimentos funcionales o para composiciones farmacéuticas.

Antecedentes de la invención

10 La fosfatidilserina (PS), un nutriente fosfolípido, es activo en las membranas celulares y es el principal componente fosfolípido ácido en la membrana de las células cerebrales. La PS desempeña un papel crucial en muchos procesos de las células nerviosas asociados a la membrana. El fin principal de la PS es ayudar a mantener la fluidez adecuada de la membrana, que tiene implicaciones principales en la mayoría de las funciones de la membrana.

15 La PS ha sido el objeto de numerosos ensayos clínicos en seres humanos sobre pérdida de memoria, estado de ánimo, rendimiento cognitivo y capacidad de aprendizaje. Muchos de los estudios muestran que la PS puede ser útil para las personas con pérdida de memoria relacionada con la edad. Además, la PS puede ayudar incluso a optimizar la cognición en las personas sin deterioro cognitivo.

La PS dietética se absorbe de forma eficaz y rápida en el intestino, se absorbe en la sangre, y atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica para alcanzar las células nerviosas en el cerebro.

20 La PS se puede extraer del cerebro bovino, de plantas o se puede producir a partir de lecitina de soja usando biocatálisis. Mediante el uso de la reacción de transfosfatidilación con fosfolipasas D (PLD), se puede modificar fácilmente el grupo de cabeza de los fosfolípidos. De este modo, la fosfatidilserina se puede producir a partir de fosfatidilcolina o de cualquier otra mezcla de fosfolípidos con serina por medio de catálisis de PLD.

25 Actualmente, la PS se fabrica y se comercializa en las formas de polvo y fluida, a concentraciones diferentes, que varían de un 10 % a un 90 %. La forma fluida de la PS normalmente consiste en una solución clara y transparente de fosfatidilserina, normalmente en medios oleosos de triglicéridos de cadena media (MCT) o de triglicéridos de soja. Esta forma se usa normalmente para suplementos dietéticos en forma de cápsulas de gelatina blanda. Los suplementos de PS entran dentro de la categoría de los nutracéuticos, que se definen como cualquier sustancia que es un alimento, o parte de un alimento y que proporciona beneficios médicos y/o de salud, que incluyen la prevención y el tratamiento de la enfermedad. En la definición amplia, tanto los suplementos dietéticos como los alimentos funcionales se consideran nutracéuticos.

30 Una de las principales dificultades en las preparaciones de fosfatidilserina, en especial en forma líquida, es su baja estabilidad debido a la rápida descomposición. La causa exacta de esta descomposición no se entiende totalmente. Existen muchas hipótesis con relación a la causa de este fenómeno, aunque la mayoría no están científicamente establecidas o aprobadas. La creencia común es que la descomposición está causada principalmente por la actividad biocatalítica residual y/o las reacciones secundarias con agua o con glicerol así como con otros restos de alcohol. Estas reacciones pueden ser especialmente importantes cuando la preparación de PS es fluida, y está encapsulada en cápsulas de gelatina blanda. La encapsulación en gelatina blanda normalmente da como resultado el desplazamiento y la incorporación posterior de bajos niveles de agua y/o de glicerol en el contenido de la cápsula.

35 Las preparaciones de PS, y en especial las preparaciones fluidas, en las que está presente actividad biocatalítica residual de PLD pueden ser susceptibles de degradación biocatalítica de PS por transfosfatidilación, que retira el grupo de cabeza de la serina, dando como resultado la pérdida del principio activo de la PS. Esta actividad de transfosfatidilación puede dar como resultado hidrólisis usando el agua encontrada en la preparación fluida de PS en sí misma o en la preparación fluida que sigue a la encapsulación. La hidrólisis dará lugar a la formación de ácido fosfatídico (PA). En el caso en el que la transfosfatidilación use glicerol u otros restos de alcohol encontrados en la preparación fluida de PS en sí misma o en la preparación fluida que sigue a la encapsulación, esto puede llevar al reemplazo del grupo de cabeza de la serina por otros alcoholes, produciendo fosfatidilglicerol (PG) u otros derivados del fosfolípido correspondiente.

40 También son posibles otras vías de degradación. Estas incluyen degradación química, como por ejemplo descarboxilación del grupo carboxílico de la serina, produciendo productos tales como fosfatidiletanolamina (PE) u otros derivados. La peroxidación de lípidos también puede desempeñar un papel en la degradación de PS. La PS se puede degradar por hidrólisis total o parcial de los ácidos grasos del fosfolípido, produciendo PS desacilada (GPS) o liso-PS (LPS), en la misma medida. Se pueden crear diglicéridos en el caso de la retirada del fosfato de la PS, de forma enzimática mediante enzimas con actividad de tipo (PLC) de la fosfolipasa C o de forma química, dando también como resultado la reducción del principio activo de la PS.

45 Se ha propuesto una forma de superar la degradación en el documento WO 03/088949, en la que el fosfolípido se incrusta en una matriz de tipo dura o de pasta.

Además de lo que se ha sugerido anteriormente, son plausibles otras vías de degradación y pueden ser responsables de la degradación aparente de la PS en las preparaciones comerciales.

Por lo tanto es un objetivo de la presente invención proporcionar dispersiones estabilizadas de PS en una base de aceite.

- 5 Es un objetivo adicional más de la presente invención proporcionar las dispersiones estabilizadas de PS mencionadas en una base de aceite para su uso en aplicaciones de suplementos dietéticos habituales, y en particular en cápsulas de gelatina blanda.

- 10 Es un objetivo adicional más de la presente invención proporcionar las dispersiones estabilizadas de PS mencionadas en una base de aceite para su uso como nutracéuticos independientes o como aditivos para artículos para alimentación o para composiciones farmacéuticas.

Estos y otros objetivos de la presente invención serán obvios a medida del avance de la presente descripción.

Sumario de la invención

- 15 Para superar el problema de la inestabilidad de la fosfatidilserina, los presentes inventores han desarrollado y presentan en el presente documento una composición de PS que es más estable. También se presentan los usos y los procedimientos de producción de dicha PS estable.

La presente invención proporciona una dispersión estable de fosfatidilserina (PS) en una base de aceite, que comprende una composición de fosfatidilserina, comprendiendo dicha composición de un 1 a un 99 % (p/p) de fosfatidilserina, en la que dicha PS está en forma de una sal que es insoluble en aceite, en la que no más de un 5 % de la fosfatidilserina se descompone después de un periodo de almacenamiento de al menos 6 meses.

- 20 En una realización de la composición de la materia de la presente invención, dichas dispersiones de PS en una base de aceite comprenden de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 99 % (p/p) de PS, preferentemente de aproximadamente un 2,5 a un 80 % (p/p), de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 99 % (p/p) de otros ingredientes funcionales, preferentemente de aproximadamente un 5 a un 90 % (p/p), de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 99 % (p/p) de fosfatidilcolina (PC), preferentemente de aproximadamente un 1 a un 25 % (p/p),
25 preferentemente de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 99 % (p/p) de fosfatidiletanolamina (PE), preferentemente de aproximadamente un 1 a un 10 % (p/p), de aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 99 % (p/p) de fosfatidilinositol (PI), preferentemente de aproximadamente un 0,5 a un 10 % (p/p), de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 99 % (p/p) de fuente de Omega-3, preferentemente de aproximadamente un 10 a un 90 % (p/p), de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 99 % (p/p) de fuente de Omega-6, preferentemente de
30 aproximadamente un 10 a un 90 % (p/p), y/o de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 99 % (p/p) de esteroil o de ésteres de esteroil, preferentemente de aproximadamente un 1 a un 65 % (p/p).

Además, la dispersión estable de PS en una base de aceite de la presente invención se caracteriza por que su contenido no supera un 15 % de ácido fosfatídico (PA). Preferentemente, el contenido de PA está por debajo de un 10 %, más preferentemente entre un 1 y un 7 %.

- 35 En otra realización, la dispersión estable de PS en una base de aceite de la presente invención se caracteriza por que no más de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 5 % de la fosfatidilserina se descompone después de un periodo de almacenamiento de al menos 6 meses, preferentemente al menos 12 meses, más preferentemente al menos 24 meses.

- 40 En una realización particular de la presente invención, la dispersión estable de PS en una base de aceite está básicamente desprovista de la actividad de la fosfolipasa, en particular de la actividad de la fosfolipasa D.

En otra realización particular, la dispersión estable de PS de fosfatidilserina en una base de aceite de la presente invención está en forma de polvo.

- 45 La PS comprendida en la composición de la materia de la presente invención está en forma de una sal que es básicamente no soluble en aceite, en particular sales de iones divalentes, preferentemente una sal de calcio. Como alternativa, también puede ser una sal de magnesio.

La PS de la presente invención puede comprender adicionalmente de forma opcional aditivos fisiológicamente/farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de flujo libre, emulgentes, estabilizantes, conservantes, colorantes, agentes antiespumantes y agentes antiapelmazantes, así como diluyentes, excipientes, y vehículos.

- 50 En una realización adicional más, la dispersión estable de PS de fosfatidilserina en una base de aceite de la presente invención es para su uso como suplemento dietético, alimento nutracéutico y/o en forma de un aditivo para fármacos.

5 La presente invención proporciona una dispersión estable de fosfatidilserina que comprende las dispersiones estables de fosfatidilserina en una base de aceite de la presente invención, en la que la PS está presente en forma de una sal que es básicamente no soluble en aceite, dispersa en una base de aceite. Preferentemente, dicha sal es una sal de calcio. Por lo tanto, la dispersión estable de PS es una sal de calcio de PS dispersa en una base de aceite. Como alternativa, la dispersión estable de PS es una sal de magnesio de PS dispersa en una base de aceite.

Preferentemente, dicha dispersión de fosfatidilserina en una base de aceite de la presente invención comprende de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 70 % (p/p) de fosfatidilserina, más preferentemente de aproximadamente un 5 a un 45 % (p/p).

10 En una realización preferente de la dispersión de fosfatidilserina en una base de aceite de la presente invención, dicha base de aceite es una base de triglicérido, en particular triglicéridos de cadena media o aceite vegetal.

15 En otra realización, la dispersión de fosfatidilserina en una base de aceite de la presente invención comprende adicionalmente ingredientes biofuncionales adicionales, preferentemente al menos uno de lecitina, fosfolípidos, vitaminas, antioxidantes, minerales, proteínas o péptidos nutricionales, esteroles y otros derivados, hidratos de carbono nutricionales y sus derivados, aminoácidos, extractos de plantas, productos de fermentación, derivados de glicéridos (mono y diglicéridos), ácidos grasos poliinsaturados, y lípidos Omega-3 y/o Omega-6.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un artículo para alimentación que comprende PS en una cualquiera de las formas proporcionadas por la presente invención, es decir, en forma de una dispersión de fosfatidilserina en una base de aceite.

20 En una realización, dicho artículo para alimentación comprende adicionalmente de forma opcional al menos un ingrediente biofuncional adicional, por ejemplo un ingrediente biofuncional como se ha descrito anteriormente.

25 En un aspecto siguiente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende PS como agente activo en una cualquiera de las formas proporcionadas por la presente invención, *Lie.*, como una dispersión de fosfatidilserina en una base de aceite y adicionalmente de forma opcional que comprende al menos un agente activo adicional y/o al menos un aditivo, diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender agentes farmacéuticamente activos adicionales.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona una cápsula que contiene PS en una cualquiera de las formas proporcionadas por la presente invención, es decir, en forma de una dispersión de fosfatidilserina en una base de aceite. Dicha cápsula es preferentemente una cápsula de gelatina blanda.

30 La presente invención también proporciona el uso de cualquiera de las preparaciones de PS descritas en la presente invención, es decir, en forma de una dispersión de fosfatidilserina en una base de aceite, en forma de un potenciador del rendimiento cognitivo y de la capacidad de aprendizaje.

35 Es un aspecto posterior de la presente invención proporcionar PS, en una cualquiera de las formas proporcionadas por la presente invención, es decir, en forma de una dispersión de fosfatidilserina en una base de aceite, para su uso en la prevención de la pérdida de memoria, en particular la pérdida de memoria relacionada con la edad.

Por la presente se describe un procedimiento para la preparación de una dispersión estable de fosfatidilserina que comprende las etapas de:

- 40 (a) incubar una mezcla acuosa de L-serina y opcionalmente disolventes orgánicos adecuados con lecitina en presencia de una fosfolipasa inmovilizada durante un período de tiempo adecuado para dar fosfatidilserina;
- (b) retirar la fase superior que contiene la fosfatidilserina;
- (c) obtener la fosfatidilserina a partir de dicha fase superior retirada por medios estándar;
- (d) lavar la fosfatidilserina obtenida en la etapa (c) con una solución acuosa adecuada para retirar el exceso de L-serina;
- 45 (e) opcionalmente lavar la fosfatidilserina obtenida en la etapa (d) con un disolvente orgánico adecuado, preferentemente etanol a una temperatura elevada; y
- (f) secar la fosfatidilserina obtenida en la etapa (e).

En particular, en el procedimiento que se ha descrito por la presente, dicha fosfolipasa es preferentemente la fosfolipasa D.

50 Como alternativa, en el procedimiento que se ha descrito por la presente, dicho procedimiento puede comprender adicionalmente la etapa de desactivar cualquier actividad residual de fosfolipasa en la fosfatidilserina obtenida por medios adecuados.

En otra alternativa más del procedimiento que se ha descrito por la presente, dicha fosfolipasa se inmoviliza en una matriz insoluble y se recubre opcionalmente con tensioactivo, y, después de la etapa (a), se permite que la mezcla de reacción repose hasta que la fosfolipasa precipite.

También se describe por la presente un procedimiento para preparar una preparación de fosfatidilserina líquida estable en una base de aceite de fosfatidilserina, que comprende la etapa de disolver la composición de la materia de fosfatidilserina en una base de aceite adecuada en el que la PS está presente en forma de una sal que es básicamente soluble en disolventes orgánicos, se disuelve en un aceite, preferentemente un triglicérido de cadena media. Preferentemente, dicha PS disuelta en aceite está en forma de una sal de sodio. Preferentemente, dicha base de aceite son triglicéridos de cadena media o un aceite vegetal.

También se describe por la presente un procedimiento para preparar dispersiones estables en base a líquido de fosfatidilserina que comprende la etapa de dispersar la composición de fosfatidilserina de la materia de la presente invención en el que la PS está presente en forma de una sal que es básicamente no soluble en disolventes orgánicos, se disuelve en un aceite, preferentemente un triglicérido de cadena media, y en el que preferentemente dicha PS disuelta en un aceite está en forma de una sal de calcio, en una base de aceite adecuada, preferentemente una base de triglicérido y en particular triglicéridos de cadena media o aceite vegetal. Se debe indicar que se pueden añadir a esta preparación líquida ingredientes adicionales, para enriquecer la mezcla.

Descripción Detallada de la Invención

Las siguientes abreviaturas se usan a lo largo de toda la presente especificación:

- EDTA: ácido etilendiamintetraacético
- GC: cromatografía de gas
- GPS: PS desacilada
- HPLC: cromatografía líquida de alto rendimiento
- HPTLC: cromatografía en capa fina de alto rendimiento
- LPS: liso-PS
- MCT: triglicéridos de cadena media
- RMN: resonancia magnética nuclear
- PA: ácido fosfatídico
- PC: fosfatidilcolina
- PE: fosfatidiletanolamina
- PG: fosfatidilglicerol
- PI: fosfatidilinositol
- PLC: fosfolipasa C
- PLD: fosfolipasa D
- PS: fosfatidilserina
- HR: humedad relativa
- TA: temperatura ambiente

Como se ha mencionado anteriormente, la fosfatidilserina (PS) es un componente esencial de las membranas celulares, lo cual es especialmente importante en el buen funcionamiento de las células cerebrales, con una relación conocida con la memoria, estado de ánimo, rendimiento cognitivo y capacidad de aprendizaje. Es deseable complementar la dieta humana con PS debido a todas sus funciones importantes. Aunque existen suplementos en el mercado, son problemáticos con relación a la cantidad que se administra de hecho al consumidor, ya que existe un problema inherente de degeneración y de descomposición de la PS en las composiciones actualmente disponibles para la población en general.

Se conoce que por lo general la PS es inestable. Incluso los polvos secos puros almacenados en condiciones frías son propensos a altas tasas de degradación. Además, las composiciones de altas concentraciones de PS, y de PS pura normalmente son más propensas a problemas de inestabilidad. Se ha descrito que la PS pura es propensa a la degradación en una tasa de un 0,5 % en p/p por día [Catálogo de Sigma]. No se conoce totalmente la causa o el mecanismo exacto de esta degradación. En muchos casos, se culpa a las reacciones de hidrólisis o de transfosfatidilación; sin embargo, en muchos casos no se pueden aislar productos de dichas reacciones.

Para superar este problema de inestabilidad, los presentes inventores han desarrollado y presentan en el presente documento una composición de PS que es más estable. También se presentan los usos y los procedimientos para producir dicha PS estable. Esta estabilidad mejorada se proporciona por diversos medios, dirigiéndose en especial a las diversas causas potenciales de desestabilización de la PS, que se detallan a continuación en el presente documento.

Los términos "estabilizado" y "estable" se usan como sinónimos en el presente documento.

De este modo, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una dispersión estable de fosfatidilserina (PS) en una base de aceite, que comprende una composición de fosfatidilserina, comprendiendo dicha composición de un 1 a un 99 % (p/p) de fosfatidilserina, en la que dicha PS está en forma de una sal que es insoluble en aceite, en la que no más de un 5 % de la fosfatidilserina se descompone después de un periodo de almacenamiento de al menos 6 meses.

Como ya se ha mencionado, las principales causas conocidas de inestabilidad de la PS son una actividad enzimática residual en las preparaciones de PS, así como la degradación química de la PS, como la descarboxilación, peroxidación de lípidos, y la hidrólisis de los ácidos grasos de los fosfolípidos.

5 Por lo tanto, la dispersión estable de PS en una base de aceite proporcionada por la presente invención está desprovista o tiene una actividad enzimática mínima, es químicamente estable y de almacenamiento estable. Dichos atributos se demuestran de forma clara en los siguientes Ejemplos.

10 En una realización de la composición de la materia de la presente invención, dicha composición comprende de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 99 % (p/p) de PS, preferentemente de aproximadamente un 2,5 a un 80 % (p/p), de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 99 % (p/p) de otros ingredientes funcionales, preferentemente de aproximadamente un 5 a un 90 % (p/p), de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 99 % (p/p) de fosfatidilcolina (PC), preferentemente de aproximadamente un 1 a un 25 % (p/p), preferentemente de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 99 % (p/p) de fosfatidiletanolamina (PE), preferentemente de aproximadamente un 1 a un 10 % (p/p), de aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 99 % (p/p) de fosfatidilinositol (PI), preferentemente de aproximadamente un 0,5 a un 10 % (p/p), de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 99 % (p/p) de fuente de Omega-3, preferentemente de aproximadamente un 10 a un 90 % (p/p), de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 99 % (p/p) de fuente de Omega-6, preferentemente de aproximadamente un 10 a un 90 % (p/p), y/o de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 99 % (p/p) de esteroles de ésteres de esteroles, preferentemente de aproximadamente un 1 a un 65 % (p/p).

20 Además, la dispersión estable de PS en una base de aceite de la presente invención se caracteriza por que su contenido no supera un 15 % de ácido fosfatídico (PA). Preferentemente, el contenido de PA está por debajo de un 10 %, más preferentemente entre un 1 y un 7 %.

25 En otra realización, la dispersión estable de PS en una base de aceite de la presente invención se caracteriza por que no más de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 5 % de la fosfatidilserina se descompone después de un periodo de almacenamiento de al menos 6 meses, preferentemente al menos 12 meses, más preferentemente al menos 24 meses.

30 En otras palabras, al menos un 95 % del contenido original de PS de la dispersión estable de PS en una base de aceite de la presente invención se mantiene después de un periodo de almacenamiento de al menos 6 meses, preferentemente al menos 12 meses, más preferentemente al menos 24 meses. Preferentemente, al menos un 97 % del contenido original de PS se mantiene después de dicho periodo de almacenamiento, y más preferentemente se mantiene al menos un 99 % del contenido original de PS.

35 En una realización particular de la presente invención, la dispersión estable de PS en una base de aceite está básicamente desprovista de actividad de la fosfolipasa, en particular la actividad de la fosfolipasa D. Por básicamente desprovista se refiere a que menos de 1 unidad/ml, preferentemente por debajo de 0,1 unidades/ml o incluso de 0,05 unidades/ml es la actividad enzimática residual máxima que se puede encontrar en la composición de la materia de la presente invención. En términos prácticos, esta cantidad de actividad enzimática residual es tan insignificante que está casi en el límite de ser mensurable, como se demuestra en los resultados que se muestran en la Tabla 3.

40 La fosfolipasa D (PLD) (Fosfatidilcolina fosfatidohidrolasa, EC 3.1.4.4) usada en la producción de PS como se ha descrito se puede obtener a partir de fuentes animales, microbianas, fúngicas, o vegetales. Los ejemplos son PLD de repollo, PLD de *Streptomyces sp.*, *Streptomyces chromafuscus*, etc. Usando una preparación de PLD inmovilizada los presentes inventores fueron capaces de minimizar o incluso de evitar la presencia de esta enzima en la preparación del producto final de PS, minimizando o evitando de este modo el riesgo de degradación continua de PS mediante el procedimiento enzimático.

45 En otra realización particular, la dispersión estable de fosfatidilserina en una base de aceite de la presente invención está en forma de polvo. Como se demuestra en el Ejemplo 1, la preparación de PS obtenida por medio del procedimiento de síntesis usado por los inventores está en forma de polvo.

50 Las preparaciones de fosfatidilserina producidas de forma enzimática se producen normalmente en forma de una sal de metales divalentes, más preferentemente de Ca^{+2} . Estas sales no son solubles en muchos disolventes orgánicos, tales como aceites, hexano, e incluso alcoholes. Las sales divalentes se pueden hacer solubles en disolventes orgánicos mediante el uso de diferentes técnicas, que varían desde el uso de mezclas complejas de disolventes, el uso de diferentes aditivos y el intercambio de sales. En esto último, los iones de metal divalente se intercambian con iones de metal monovalente, tales como Na^{+} . Esto se consigue por exposición de las sales divalentes de PS a exceso de iones monovalentes en condiciones que favorezcan el intercambio. Además se pueden usar agentes quelantes selectivos de metal, tales como ácido etilendiamintetraacético (EDTA) o EGTA. Estos agentes quelantes desplazan el equilibrio debido a sus altos coeficientes de asociación a los metales divalentes, y al Ca^{+2} en particular. Los agentes quelantes captan los iones Ca^{+2} en presencia de exceso de iones de sodio que ocupan su lugar en las sales de PS. Esto se lleva a cabo en un medio acuoso con 1 a 3 equivalentes de los agentes quelantes metálicos en condiciones ambientales, y opcionalmente a temperaturas elevadas. La sal de sodio resultante es más fácilmente

soluble en disolventes orgánicos.

Por básicamente soluble en disolventes orgánicos se refiere a las soluciones de PS en el intervalo de un 1 % en p/p a un 40 % e incluso un 60 %, que son factibles y que forman soluciones transparentes.

5 Los disolventes orgánicos son, por ejemplo, hexano, éter de petróleo, tolueno, etanol, aceites y grasas (triglicéridos), ésteres de etilo de ácidos grasos, etc.

La PS comprendida en la composición de la materia de la presente invención está en forma de una sal que es básicamente no soluble en disolventes orgánicos, en particular las sales de iones divalentes, preferentemente una sal de calcio. Como alternativa, también puede ser una sal de magnesio.

10 La dispersión estable de PS de la presente invención puede comprender adicionalmente de forma opcional aditivos fisiológicamente/farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de flujo libre, emulgentes, estabilizantes, conservantes, colorantes, agentes antiespumantes y agentes antiapelmazantes, así como diluyentes, excipientes, y vehículos.

En una realización adicional más, la composición de fosfatidilserina de la materia de la presente invención es para su uso como un suplemento dietético, alimento nutracéutico y/o como un aditivo para fármacos.

15 La presente descripción proporciona una preparación de fosfatidilserina líquida estable que comprende la composición de fosfatidilserina de la materia de la presente invención en la que la PS está presente en forma de una sal que es básicamente soluble en disolventes orgánicos, se disuelve en un aceite, preferentemente un triglicérido de cadena media. Preferentemente, dicha PS disuelta en un aceite está en forma de una sal de sodio.

20 En una primera realización, la preparación líquida comprende de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 90 % (p/p) de fosfatidilserina, preferentemente de aproximadamente un 2,5 a aproximadamente un 55 % (p/p).

25 De forma análoga a la composición de la materia de la presente invención, esto se refiere a que al menos un 95 % del contenido original de PS de la preparación líquida de PS de la presente invención se mantiene después de un periodo de almacenamiento de al menos 6 meses, preferentemente al menos 12 meses, más preferentemente al menos 24 meses. Preferentemente, al menos un 97 % del contenido original de PS se mantiene después de dicho periodo de almacenamiento, y más preferentemente se mantiene al menos un 99 % del contenido original de PS.

30 En una realización adicional, la preparación líquida de fosfatidilserina comprende adicionalmente ingredientes biofuncionales adicionales, preferentemente al menos uno de lecitina, fosfolípidos, vitaminas, antioxidantes, minerales, proteínas nutricionales o péptidos, esteroles y otros derivados, hidratos de carbono nutricionales y sus derivados, aminoácidos, extractos de plantas, productos de fermentación, derivados diglicéridos (mono y diglicéridos), ácidos grasos poliinsaturados, y lípidos Omega-3 y/o Omega-6.

En una realización adicional más, la preparación líquida de fosfatidilserina es para su uso como un suplemento dietético, alimento nutracéutico y/o aditivo para fármacos.

35 La presente invención proporciona una dispersión estable de fosfatidilserina que comprende la dispersión estable de fosfatidilserina en una base de aceite de la presente invención, en la que la PS está presente en forma de una sal que es básicamente no soluble en aceite dispersa en una base de aceite. Preferentemente, dicha sal es una sal de calcio. Por lo tanto, la dispersión estable de PS es una sal de calcio de PS dispersa en una base de aceite. Como alternativa, la dispersión estable de PS es una sal de magnesio de PS dispersa en una base de aceite.

40 Las dispersiones de fosfatidilserina en un vehículo lípido se caracterizan por que este tipo de vehículo no permite la solubilización total de la PS. Dicho vehículo puede ser un aceite comestible (por ejemplo, productos en base a triglicéridos tales como aceite vegetal, aceite de pescado, etc.).

La PS que no es soluble en dicho vehículo se encuentra en una forma cristalina, con diferentes tamaños de partícula. En esta forma, la PS es menos accesible a los factores de descomposición, tales como agua, glicerol, enzimas residuales, y cualquier otro factor que necesite la reacción a un nivel molecular con la molécula de PS o con uno de sus sustituyentes.

45 La dispersión de PS también se puede obtener en forma de un sólido o de un semisólido (forma de viscosidad extremadamente alta). La naturaleza sólida inhibe o retrasa adicionalmente cualquier procedimiento de degradación química o enzimática que pudiera dar como resultado la reducción de los niveles del principio activo de la PS, simplemente debido al hecho de que el perfil genético de dichos procedimientos en fase sólida tienen básicamente coeficientes de velocidad más bajos.

50 Preferentemente, dicha dispersión de fosfatidilserina de la presente invención comprende de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 70 % (p/p) de fosfatidilserina, más preferentemente de aproximadamente un 5 a un 45 % (p/p).

Los inventores han producido una dispersión de PS o una PS fluida que contiene un 40 % de PS, como se muestra

en los Ejemplos.

Un producto habitual para suplementos dietéticos es una PS fluida en aceite de MCT con un 20 % p/p de PS. Esto permite la producción de cápsulas de gelatina blanda de 500 mg con 100 mg de PS, la dosis diaria estándar y más común de PS actualmente disponible en el mercado. Para la encapsulación con gelatina blanda, que es una de las formas más populares de cápsulas hoy en día, se debe tener una preparación fluida en condiciones ambientales o a temperaturas que no superen 35 °C. Estas limitaciones se derivan de la técnica y de la maquinaria para encapsulación con gelatina blanda. Hasta ahora, no había sido posible producir PS fluida con más de un 20 % de contenido de PS. Parece ventajoso producir PS fluida con mayores concentraciones de PS, ya que permitirá tamaños de cápsula más pequeños o la adición de otros ingredientes a la cápsula, sin la necesidad de ampliar la cápsula o de aumentar el número de cápsulas diarias que una persona necesita ingerir. Esto es ventajoso desde el punto de vista tanto económico como por ser más agradable para el cliente.

Los presentes inventores han desarrollado una PS fluida que tiene dichas ventajas, sin poner en peligro su estabilidad. La sal sódica de PS se solubiliza en hexano y se añade a un vehículo oleoso, preferentemente MCT. No se añade PC o lecitina y se cambia la cantidad de MCT usada dando como resultado una forma de PS mucho más concentrada. Esta concentración está por encima de la solubilidad de la sal sódica de PS en MCT y por tanto, parte de la PS precipita. En consecuencia, la PS obtenida en la formulación es parcialmente soluble y parcialmente dispersa, lo que permite propiedades fluidas, facilidad de manejo y de dosificación, así como una alta estabilidad.

En una realización preferente de la dispersión de fosfatidilserina de la presente invención, dicha base de aceite es una base de triglicérido, en particular una base de triglicéridos de cadena media o aceite vegetal.

En otra realización, la dispersión de fosfatidilserina de la presente invención comprende adicionalmente ingredientes biofuncionales adicionales, preferentemente al menos uno de lecitina, fosfolípidos, vitaminas, antioxidantes, minerales, proteínas nutricionales o péptidos, esteroles y otros derivados, hidratos de carbono nutricionales y sus derivados, aminoácidos, extractos de plantas, productos de fermentación, derivados de glicéridos (mono y diglicéridos), ácidos grasos poliinsaturados, y lípidos Omega-3 y/o Omega-6.

En una realización adicional, dicha dispersión de fosfatidilserina de la presente invención es para su uso como un suplemento dietético, alimento nutracéutico y/o aditivo para fármacos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un artículo para alimentación que comprende PS en una cualquiera de las formas proporcionadas por la presente invención, es decir, en forma de una dispersión de fosfatidilserina en una base de aceite.

En una realización, dicho artículo para alimentación comprende adicionalmente de forma opcional al menos un principio activo o un ingrediente biofuncional adicional, por ejemplo un ingrediente biofuncional como se ha descrito anteriormente.

En un aspecto siguiente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende PS como agente activo en una cualquiera de las formas proporcionadas por la presente invención, es decir, en forma de una dispersión de fosfatidilserina en una base de aceite, y opcionalmente comprende de forma adicional al menos un agente activo o un ingrediente bifuncional adicional y/o al menos un aditivo, diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender agentes adicionales farmacéuticamente activos.

La preparación de composiciones farmacéuticas es bien conocida en la técnica y se ha descrito en muchos artículos y libros de texto, véase por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro A. R. ed., Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania, 1990, y en especial las páginas 1521-1712 en éste.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar en formas de dosificación unitaria. Las formas de dosificación también pueden incluir dispositivos de liberación sostenida. Las composiciones se pueden preparar mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Dichas formas de dosificación abarcan vehículos fisiológicamente aceptables que son inherentemente no tóxicos y no terapéuticos. Los ejemplos de dichos vehículos incluyen intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas de suero, tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de diglicéridos parciales de ácidos grasos saturados vegetales, agua, sales, o electrolitos tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinil pirrolidona, sustancias basadas en celulosa, y PEG.

La administración oral es la vía preferente para administrar la composición farmacéutica de la presente invención, aunque también pueden ser factibles otras vías.

La composición farmacéutica se puede administrar a un sujeto en necesidad, en ocasiones únicas o múltiples. La "cantidad de tratamiento eficaz" de la composición de la presente invención se determina por la gravedad de la afección en conjunto con los objetivos terapéuticos, la vía de administración y la condición general del paciente

(edad, sexo, peso y otras consideraciones conocidas por el médico que atiende). Por consiguiente, será necesario para el terapeuta valorar la dosificación y modificar la vía de administración cuando sea necesario para obtener el efecto terapéutico óptimo.

5 En otro aspecto más, la presente invención proporciona una cápsula que contiene PS en una cualquiera de las formas proporcionadas por la presente invención, es decir, en forma de una dispersión de fosfatidilserina en una base de aceite. Dicha cápsula es preferentemente una cápsula de gelatina blanda.

Como se ha mencionado anteriormente, la PS se ha correlacionado con la mejora del estado de ánimo y de la memoria, así como con el rendimiento cognitivo y con la capacidad de aprendizaje.

10 Por lo tanto, la presente invención también proporciona el uso de cualquiera de las preparaciones de PS que se describen en la presente invención, es decir, en forma de una dispersión de fosfatidilserina en una base de aceite, en forma de un potenciador del rendimiento cognitivo y de la capacidad de aprendizaje.

Es un aspecto posterior de la presente invención proporcionar PS, en una cualquiera de las formas proporcionadas por la presente invención, es decir, en forma de una dispersión de fosfatidilserina en una base de aceite, para su uso en la prevención de la pérdida de memoria, en particular la pérdida de memoria relacionada con la edad.

15 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un procedimiento para la preparación de una composición estable de fosfatidilserina de la materia, que comprende las etapas de:

- (a) incubar una mezcla acuosa de L-serina y opcionalmente disolventes orgánicos adecuados con lecitina en presencia de una fosfolipasa inmovilizada durante un período de tiempo adecuado para dar fosfatidilserina;
- 20 (b) retirar la fase superior que contiene la fosfatidilserina;
- (c) obtener la fosfatidilserina a partir de dicha fase superior retirada por medios estándar;
- (d) lavar la fosfatidilserina obtenida en la etapa (c) con una solución acuosa adecuada para retirar el exceso de L-serina;
- (e) opcionalmente lavar la fosfatidilserina obtenida en la etapa (d) con un disolvente orgánico adecuado, preferentemente etanol a una temperatura elevada; y
- 25 (f) secar la fosfatidilserina obtenida en la etapa (e).

En particular en el procedimiento descrito por la presente, dicha fosfolipasa es preferentemente la fosfolipasa D.

En otra alternativa del procedimiento descrito por la presente, dicho procedimiento puede comprender adicionalmente la etapa de desactivación de cualquier actividad residual de fosfolipasa en la fosfatidilserina obtenida por medios adecuados.

30 Dichos medios adecuados pueden ser (a) tratamiento con EDTA, (b) incubación adicional con disolventes orgánicos, preferentemente metanol, etanol o propanol, (c) desactivación térmica, y/o (d) adición de inhibidores de la PLD.

En otra alternativa preferente más del procedimiento descrito por la presente, dicha fosfolipasa se inmoviliza en una matriz insoluble y se recubre opcionalmente con tensioactivo, y, después de la etapa (a), se permite que la mezcla de reacción repose hasta que la fosfolipasa precipita.

35 Las preparaciones de PLD inmovilizada se pueden usar cuando el procedimiento se lleva a cabo en medios orgánicos o en medios acuosos, o en mezclas de los mismos, también conocidos como sistemas bifásicos.

40 En la etapa (a) del procedimiento que se ha descrito anteriormente, la lecitina se añade a una solución acuosa de L-serina, opcionalmente en presencia de disolventes orgánicos adecuados que ayudan en la dispersión y/o a la solubilización de la materia prima de lecitina en la mezcla de reacción. La mezcla se agita preferentemente durante un período de tiempo adecuado, preferentemente aproximadamente 1 hora, para dispersar de forma homogénea los fosfolípidos en los medios de reacción.

La reacción enzimática en sí misma se lleva a cabo durante un periodo de tiempo adecuado, preferentemente al menos 12 horas, mientras que se agita, y después se deja que la mezcla de reacción repose.

45 La fase superior de la reacción, que contiene la fracción de fosfolípidos, se obtiene mediante técnicas estándar, como por ejemplo centrifugación, filtración, filtración a presión, decantación, etc. La fosfatidilserina resultante se lava adicionalmente con una solución acuosa adecuada, para retirar cualquier exceso de L-serina, y se seca, para obtener la fosfatidilserina que está básicamente desprovista de actividad de la fosfolipasa.

50 Cuando se usaron las preparaciones de PLD inmovilizada en la producción de PS, formulaciones en polvo o fluidas, las formulaciones finales de PS presentaron una estabilidad superior en comparación con las formulaciones de PS disponibles en el mercado, como se evidencia por la actividad enzimática residual mínima. El desplazamiento de enzimas de una preparación inmovilizada es un fenómeno muy común, debido a la degradación mecánica de la matriz o a la inmovilización insuficiente. Para evitar este problema, los inventores han usado etapas adicionales para desactivar cualquier actividad enzimática presente en la PS final. Estas etapas adicionales incluyen: (i) desactivación enzimática mediante incubación con disolventes orgánicos, preferentemente metanol, etanol o propanol, o cualquier

otro disolvente orgánico que sea capaz de inactivar la enzima, a temperaturas elevadas (hasta 120 °C); (ii) desactivación térmica; (iii) adición de aditivos que inactiven la enzima, como por ejemplo tratamiento con EDTA; (iv) adición de inhibidores de PLD.

5 El tratamiento de la preparación de PS con inhibidores de enzimas o con reactivos selectivos que retiran los cofactores enzimáticos, tales como los iones Ca^{+2} , se lleva a cabo preferentemente en medio acuoso para asegurar la accesibilidad de dichos inhibidores o reactivos a los cofactores residuales enzimáticos o solubles en agua.

10 El tratamiento con agentes quelantes selectivos de metal-ion, tales como, pero no limitados a, ácido etilendiamintetraacético (EDTA) y sus sales y derivados correspondientes da como resultado una unión de forma selectiva de los iones Ca^{+2} , haciéndolos inaccesibles a cualquier enzima residual. De este modo, incluso si cualquier enzima residual está presente en la preparación no será capaz de ejercer ninguna actividad de transfosfatidilación o hidrolítica debido a la falta del cofactor esencial.

15 La preparación de PS tratada con una sal de EDTA adecuada se lava adicionalmente con soluciones acuosas recién preparadas y obtenidas por filtración y por secado posterior. Preferentemente, la preparación de PS se obtiene por extracción a un medio orgánico. Dichos medios orgánicos pueden estar compuestos por disolvente orgánico o por una mezcla de disolvente orgánico o un sistema lipídico, tal como un aceite, ésteres de etilo de ácidos grasos, ácidos grasos libres, triglicéridos parcialmente hidrolizados, etc. Adicionalmente, dichos medios orgánicos pueden contener tanto disolvente orgánico como vehículo lipídico en diferentes proporciones. Comúnmente se usan los MCT como vehículo lipídico. En el caso en el que se use un disolvente orgánico en la extracción de la preparación de PS tratada, tal como un disolvente orgánico de hidrocarburo, dicho disolvente se retira adicionalmente mediante técnicas estándar.

20

25 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un procedimiento para preparar una preparación de fosfatidilserina líquida estable en una base de aceite de fosfatidilserina, que comprende la etapa de disolver la composición de la materia de fosfatidilserina en una base de aceite adecuada en el que la PS está presente en forma de una sal que es básicamente soluble en disolventes orgánicos, se disuelve en un aceite, preferentemente un triglicérido de cadena media. Preferentemente, dicha PS disuelta en un aceite está en forma de una sal de sodio. Preferentemente, dicha base de aceite son triglicéridos de cadena media o un aceite vegetal.

30 En un último aspecto, la presente descripción proporciona un procedimiento para preparar una dispersión estable de fosfatidilserina en una base líquida que comprende la etapa de dispersar la composición de fosfatidilserina de la materia de la presente invención en el que la PS está presente en forma de una sal que básicamente no es soluble en disolventes orgánicos, se disuelve en un aceite, preferentemente un triglicérido de cadena media, y en el que preferentemente dicha PS disuelta en un aceite está en forma de una sal de calcio, en una base de aceite adecuada, preferentemente una base de triglicérido y en particular en triglicéridos de cadena media o en aceite vegetal. Se debe indicar que se pueden añadir ingredientes adicionales a esta preparación líquida, para enriquecer la mezcla. Por ejemplo, el contenido de fosfatidilcolina se puede aumentar mediante la adición de más lecitina.

35 De este modo, la PS producida mediante los procedimientos descritos en el presente documento se obtiene en forma de polvo estabilizado o en forma de una preparación de fosfatidilserina líquida estable en una base de aceite, estando ambos básicamente desprovistos de actividad de la fosfolipasa.

La presente descripción también proporciona la composición de fosfatidilserina estable de la materia con la condición de que se prepare mediante uno cualquiera de los procedimientos que se han descrito anteriormente.

40 En resumen, se cree que varios mecanismos, conocidos y no conocidos, son la causa de la degradación de la PS. Entre los mecanismos conocidos, se pueden destacar los siguientes: (1) hidrólisis y transfosfatidilación enzimática, produciendo PA o PG; (2) hidrólisis parcial o total de los ácidos grasos de fosfolípidos, produciendo liso-PS o PS desacilada (GPS) de forma correspondiente; (3) retirada del grupo fosfato, produciendo diglicéridos (DAG); (4) descarboxilación del grupo carboxilato de la L-serina para producir PE u otros productos más complejos; (5) hidropoxidación de fosfolípidos; y (6) oxidación del grupo amino primario del grupo de cabeza de la L-Serina, producido por el aire, luz, etc.

45

50 Con respecto a las aminas, y a las aminas primarias en particular, son muy sensibles a la oxidación. Los productos de dicha oxidación son numerosos y su identificación es casi imposible. Por lo tanto, la PS estabilizada que es capaz de soportar la oxidación de la amina se produjo mediante la incorporación de aditivos caracterizados por su capacidad de proteger de la oxidación a grupos químicos sensibles. Estos aditivos, que poseen características antioxidantes se añadieron a PS en polvo así como a PS fluida, y en especial a PS fluida encapsulada en cápsulas de gelatina blanda. Estos últimos son propensos a la degradación de la PS. Los antioxidantes usados consistían en extracto de Romero, Tocoferoles y palmitato de Ascorbilo a niveles de 0-5000 ppm, y BHA, BHT y TBHQ a niveles de 0-200 ppm. Otros antioxidantes o mezclas de antioxidantes, sintéticos son naturales, se incorporan en la presente invención. Los niveles de antioxidantes usados para proteger la PS de la degradación son al menos 100 ppm, y preferentemente 1000-3000 ppm. Estas cápsulas, así como su material a granel, se analizaron a temperatura ambiente y en ensayos acelerados para su estabilidad. El material a granel se almacenó en un envase cerrado herméticamente en un lugar oscuro a temperatura ambiente.

55

La estabilidad de la PS generada mediante los procedimientos descritos en el presente documento se analizó por medio de seguimiento de los diferentes productos de degradación de cada vía de degradación, como se ha indicado anteriormente. La presencia de estos productos se midió por RMN ³¹P, y mediante procedimientos comunes de cromatografía (HPTLC, HPLC-ELSD, y GC). En ninguno de los casos se detectó elevación en presencia de dichos marcadores de degradación, llegando a la conclusión de que ninguna de estas vías de degradación fue capaz de producirse, produciendo una PS de estabilidad muy alta.

Por lo tanto, la presente descripción proporciona preparaciones de fosfatidilserina estable en una cualquiera de las tres formas, composición de materia, líquida o dispersión, que son resistentes a la degradación mediante al menos una de las siguientes vías: hidrólisis y transfosfatidilación enzimática, hidrólisis parcial o total de los ácidos grasos de fosfolípidos, retirada del grupo fosfato, descarboxilación del grupo carboxilato de la L-serina, hidroperoxidación de fosfolípidos, oxidación del grupo amino primario del grupo de cabeza de la L-Serina.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Preparación de fosfatidilserina estable en forma de polvo usando una preparación de enzima inmovilizada

1. Preparación de la enzima inmovilizada

En varias PLD disponibles en el mercado, tales como la Fosfolipasa D de *Streptomyces sp.*, se han usado *repollo*, y *Streptomyces chromofuscus*. En todos los casos, estas enzimas presentaron alta reactividad y se sintetizó PS de alta calidad. Lo más importante, los niveles de ácido fosfatídico fueron normalmente bajos (no se muestran los datos).

Se inmovilizaron varias PLD mediante diferentes técnicas y usando como vehículos diferentes matrices insolubles. La fosfolipasa, preferentemente recubierta con tensioactivo, de matriz inmovilizada se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el documento WO00/6686. También se usaron matrices insolubles disponibles en el mercado, diseñadas para la inmovilización covalente enzimática, tales como matrices epoxi activadas con Eupergit (Rohm y Haas, Alemania).

En breve, la enzima PLD en bruto (300 mg/l de proteína) se disolvió en 1 l de tampón Tris a pH 6,5, que contenía 4 g de matriz insoluble inorgánica u orgánica (Celite, gel de sílice, alúmina o polipropileno). La solución se agitó vigorosamente con un agitador magnético durante 30 minutos a 25 °C. Para las preparaciones de enzima inmovilizada recubiertas con tensioactivo, se añadió gota a gota un tensioactivo no iónico a la solución enzimática agitada. Tanto las fosfolipasas inmovilizadas recubiertas con tensioactivo como las fosfolipasas inmovilizadas en bruto se sonicaron durante 10 minutos y después se agitó durante 8 horas a 25 °C. El precipitado resultante se recogió por filtración o por centrifugación (12.000 rpm, 4 °C), seguido de congelación durante la noche a -20 °C y de liofilización.

Como se muestra en la Tabla 1, estas preparaciones de PLD inmovilizada produjeron fosfatidilserina de forma satisfactoria mediante la transfosfatidilación de lecitina con L-serina. También se puede usar D-serina para estas preparaciones. El rendimiento de PS siempre fue de más de un 30 %. Se pueden producir diferentes calidades de PS dependiendo del material de partida de lecitina. Lo más importante, las preparaciones de PLD inmovilizada presentan alta actividad independientemente del material de partida de lecitina usado en el procedimiento (no se muestran los datos).

2. Preparación estable de PS

Se colocaron 250 g de L-serina (Rexim, Francia) en un reactor de 1 Litro cargado con 750 ml del tampón adecuado (pH 3,5-7), por ejemplo tampón de citrato, que contenía CaCl₂ 200 mM. Después de la disolución total de la serina, se añadieron 53 g de lecitina de soja fraccionada (Solae Company, Estados Unidos de América), opcionalmente con otros disolventes orgánicos, tales como hexano, acetato de etilo, éter dietílico, etc., para ayudar en la dispersión de los fosfolípidos. La mezcla se agitó a temperaturas de 20-60 °C durante 0,5-2 horas, para dispersar de forma homogénea el fosfolípido en el medio de reacción. Se añadieron 1,25 g de preparación enzimática (Reacción 2, PLD2, Tabla 1 a los medios de reacción. La mezcla de reacción se agitó durante 24 horas y después se dejó sin agitación hasta que la preparación enzimática precipitó al fondo del reactor. La fase superior, que contenía la fracción del fosfolípido, se retiró del reactor. La fosfatidilserina se obtuvo a partir de esta fracción y se lavó con soluciones acuosas adecuadas para retirar el exceso de serina. La fosfatidilserina obtenida estaba prácticamente libre de trazas de enzimas, debido principalmente al hecho de que la enzima estaba inmovilizada.

A partir de esta preparación, se obtuvieron 47 g de fosfatidilserina con más de un 30 % de pureza. Este procedimiento se repitió con las preparaciones enzimáticas que se muestran en la Tabla 1 (1, 2, 3 y 4, respectivamente). Los rendimientos fueron como se indica para el 1^{er} Lote. Las preparaciones enzimáticas inmovilizadas se volvieron a usar en lotes adicionales (2^o, 3^o, y 4^o, respectivamente) y los resultados obtenidos también se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1 -Preparaciones de PLD inmovilizada, condiciones de reacción y rendimiento de PS

Reacción	Enzima	Matriz	Temperatura de Reacción (°C)	% de PS en cada lote			
				1°	2°	3°	4°
1	PLD1	Eupergit 1014F	42	31	61		
2	PLD2	Duolite A568	42	39	45	47	43
3	PLD1	Duolite A568	42	46	45	44	55
4	PLD1	Duolite A568	37	39	44	43	44

Ejemplo 2 - Desactivación enzimática

A. Disolventes orgánicos

5 Para desactivar cualquier enzima residual que se pudiera haber desplazado de la matriz insoluble, la PS obtenida como se ha descrito en el Ejemplo 1 se agitó vigorosamente en presencia de un disolvente orgánico de desactivación, preferentemente metanol o etanol, a temperaturas que variaban de 20 °C a 120 °C, durante períodos de tiempo adecuados, variando de 0,5 a 10 horas.

10 El disolvente orgánico puede disolver la PS, asegurando el acceso total del disolvente a cualquier enzima residual encontrada en la PS. El disolvente orgánico seleccionado no disuelve totalmente la PS, y de este modo crea un procedimiento de tipo trituración, que permite que el disolvente disuelva solamente pequeñas cantidades de la PS, lo que asegura la desactivación de cualquier enzima residual. En estas condiciones, después de la finalización del procedimiento de desactivación, la PS se filtró y se secó. Cuando el disolvente orgánico usado en la desactivación disolvió cantidades significativas de PS, la PS se obtuvo después de la finalización del tratamiento de desactivación mediante técnicas estándar tales como retirada y secado del disolvente, opcionalmente con secado por pulverización. Estos tratamientos redujeron de forma significativa la descomposición de las preparaciones de PS tanto en polvo como líquidas. Para la PS en polvo, la concentración de PS inicial fue aproximadamente un 22 %, y no se observó ningún cambio significativo después de 4 meses de almacenamiento. Para la PS líquida, la concentración de PS inicial fue aproximadamente un 22,67 %, y de nuevo no se observó ningún cambio significativo (una disminución de un 0,02 %) después de 4 meses de almacenamiento.

20 La Tabla 2 describe la disminución de la actividad enzimática como una función del tiempo de desactivación, después de la desactivación del disolvente orgánico (etanol) con calentamiento.

Tabla 2 - Desactivación del disolvente orgánico con calentamiento

Duración del calentamiento (80 °C) en horas	Actividad enzimática residual (Unidades/ml)
1	0,0458
2	0,0248
4	0,0088
4,5	0,0082
5	0,0067

La Tabla 3 describe tres lotes de PS preparados por los inventores, que muestran actividad enzimática residual extremadamente baja.

Tabla 3 - Comparación entre las tres preparaciones de PS

Número de Preparación de PS	Actividad enzimática residual en las preparaciones de Enzymotec (unidades/ml)*
1	0,0054
2	0,0058
3	0,0042

*Límite de detección del procedimiento: 0,002-0,003 unidades/ml.

A continuación, los inventores analizaron otras preparaciones de PS producidas por diferentes fabricantes de PS. Los inventores encontraron que la actividad enzimática residual de PLD fue considerablemente más elevada en comparación con la actividad enzimática residual de la PS preparada por los inventores. Por ejemplo, una de dichas preparaciones "ajenas" de PS presentó 0,0242 y 0,0196 unidades/ml en dos lotes de preparaciones de PS de calidad similar.

B. Desactivación enzimática por medio de EDTA - Preparación de fosfatidilserina líquida estable

La PS en polvo obtenida en el Ejemplo 1 se dispersó en una solución de EDTA 0,2 M de una mezcla de agua:etanol a 1:1, y se agitó durante 10 horas a 25 °C. Después, la fosfatidilserina se extrajo con 250 ml de n-hexano. La fase de n-hexano se lavó dos veces con agua. Se añadió MCT (95 g) a la solución de n-hexano y después de la evaporación del n-hexano, se obtuvo un fluido oleoso transparente de la formulación de fosfatidilserina.

La PS en polvo se obtiene mediante el procedimiento del Ejemplo 1 en forma de una sal de calcio, que no es soluble en disolventes orgánicos. El tratamiento con EDTA desempeña un papel doble en esta PS. Por un lado, proporciona la PS soluble en disolventes orgánicos, por captación de los iones de Ca^{+2} , que se sustituyen por Na^{+} , haciendo por lo tanto soluble a la PS, y de este modo se obtiene la forma líquida. Al mismo tiempo, ya que Ca^{+2} es el cofactor de la actividad catalítica de la PLD, la disminución de Ca^{+2} da como resultado la inactivación de la enzima residual.

La preparación de PS tratada con la sal de EDTA adecuada se lavó adicionalmente con soluciones acuosas recién preparadas y la PS se obtuvo por filtración y secado posterior.

La PS resultante se puede obtener como una preparación de fosfatidilserina en forma de polvo estabilizado o en forma de preparación líquida estabilizada en una base de aceite, estando ambas básicamente desprovistas de actividad de la fosfolipasa.

La PS fluida, se trató con EDTA, se mantuvo en un envase cerrado herméticamente en un lugar frío y oscuro. La concentración de PS se analizó por medio de HPLC con un detector ELS, y por medio de RMN ^{31}P .

La Tabla 4 muestra la concentración de PS como se mide inmediatamente después de su fabricación y después de 4 meses de almacenamiento controlado.

Tabla 4 – Estabilidad de la PS después del tratamiento con EDTA (tratamiento posterior con disolvente orgánico)

Descripción del Producto	Duración del Almacenamiento	Concentración de PS cuando se Fabrica (%)	Concentración de PS después del almacenamiento (%)
PS Fluida	4 meses	22,67	22,65

Ejemplo 3 - Determinación de la actividad de la Fosfolipasa D

Se ensayó la actividad de la Fosfolipasa D por espectrofotométrica usando un procedimiento modificado indicado en S. Kato y col. [Kato, S. y col. (1984) Agric. Biol. Chem., 48, 2181-2188].

(1) *Definición de unidad Enzimática*

Una unidad enzimática de fosfolipasa D se define como la cantidad de una enzima que libera un micromol de Colina en un minuto a partir del sustrato en las condiciones que se especifican a continuación.

(2) **Reactivos**

1. 5 % de emulsión de lecitina de soja (Epikuron 200, fosfatidilcolina al 95 %)
2. 5 % de emulsión de la preparación de fosfatidilserina
3. 0,1 mol/l de tampón Tris-maleato-NaOH, pH 5,5
4. 0,1 mol/l de solución de Cloruro de calcio
5. 7,5 % de solución de Triton X-100
6. 0,05 mol/l de EDTA en 1 mol/l de tampón Tris-HCl, pH 8,0
7. Reactivo Colorante: 3 unidades de Colina oxidasa (de *Alcaligenes sp.*), 6 unidades de peroxidasa (de Rábano picante), 1 mg de fenol y 0,6 mg de 4-amino-antipirina en 4 ml de 50 mmol/l de tampón Hepes-NaOH (pH 7,4).
8. 1,43 μ moles/ml (0,2 g/l) de solución estándar de Cloruro de colina
9. 0,01 % de solución de enzima

(3) *Procedimiento*

Se prepararon las siguientes soluciones:

Solución A: En un tubo de ensayo, se mezclaron bien 0,1 ml de emulsión de lecitina de soja al 5 % y emulsión de Fosfatidilserina al 5 %, 0,1 ml de tampón Tris-maleato-NaOH 0,1 mol/l (pH 5,5), 0,05 ml de solución de cloruro de calcio 0,1 mol/l y 0,15 ml de solución de Triton X-100 al 7,5 % y se incubaron durante 5 min. en un baño de agua a 37 °C. Se añadieron a esta solución 0,1 ml de solución de enzimas, y exactamente después de 10 minutos, se añadieron 0,2 ml de solución de EDTA y el tubo de incubación se colocó en agua hirviendo durante 5 min. El tubo después se retiró y se enfrió a temperatura ambiente.

Solución B: En un tubo de ensayo, se mezclaron bien emulsión de Fosfatidilserina al 5 %, 0,1 ml de tampón Tris-maleato-NaOH 0,1 mol/l (pH 5,5), 0,05 ml de solución de cloruro de Calcio 0,1 mol/l y 0,15 ml de solución de Triton X-100 al 7,5 % y se incubaron durante 5 min. en un baño de agua a 37 °C. Se añadieron a esta solución 0,1 ml de solución de enzimas, y exactamente después de 10 minutos de incubación, se añadieron 0,2 ml de solución de EDTA y el tubo se colocó en agua hirviendo durante 5 minutos. El tubo después se retiró y se enfrió a temperatura ambiente.

Solución en blanco: Agua destilada

Solución estándar - Solución estándar de cloruro de colina respectivamente en lugar de la solución de enzimas.

Se añadieron 4 ml de reactivo colorante a cada una de las cuatro soluciones, se mezcló bien y se incubó durante 20 minutos a 37 °C. La densidad óptica de la reacción, así como la de las soluciones estándar, se leyó a 500 nm (paso de luz de 1 cm) frente a la solución en blanco.

(4) *Cálculo de la unidad enzimática*

Actividad de la fosfolipasa D (unidad por ml) = (AE de la Solución A- AE de la solución B)/ Δ E de estándar X 0,143.
AE : densidad óptica a 500 nm frente a la solución en blanco.

Ejemplo 4 - Preparación de fosfatidilserina estable en forma de polvo usando enzima no inmovilizada y desactivación de enzimas

Se colocaron 250 g de L-serina en un reactor de 1 Litro cargado con 750 ml del tampón adecuado (pH 3,5-7), como por ejemplo tampón de citrato, que contenía CaCl₂ 200 mM. Después de la disolución total de la serina, se añadieron 53 g de lecitina de soja fraccionada, opcionalmente con otros disolventes orgánicos para ayudar a la dispersión de los fosfolípidos. La mezcla se agitó a temperaturas de 20-60 °C durante 0,5-2 horas, hasta dispersar el fosfolípido de forma homogénea en los medios de reacción. Se añadieron 1,25 g de enzima (PLD) a los medios de reacción. La mezcla de reacción se agitó durante 24 horas. La fase superior que contenía los fosfolípidos se retiró del reactor. La fosfatidilserina se obtuvo a partir de esta fase y después se lavó con soluciones acuosas. La fosfatidilserina se trató adicionalmente con un disolvente orgánico, preferentemente metanol o etanol, a elevadas temperaturas durante al menos 0,5 horas, para desactivar cualquier traza de enzima. La fosfatidilserina se obtuvo por filtración o por retirada del disolvente y se secó. El rendimiento final de la fracción del fosfolípido fue de 47 g, de los que más de un 60 % consistieron en PS. La PS producida también se usó en la producción de la preparación fluida (véase a continuación). Las preparaciones tanto fluidas como en polvo se analizaron para la estabilidad del producto.

Después de la desactivación enzimática, la PS fluida (disuelta en MCT) y en polvo se mantuvieron en envases cerrados herméticamente en un lugar frío y oscuro. La concentración de PS se analizó usando HPLC equipada con un detector ELS, y también por medio de RMN ³¹P antes y después del almacenamiento. Después de 7 (para la PS fluida) o 7,5 meses (para la PS en polvo) de almacenamiento, no se produjo prácticamente degradación (o menos de un 1 %) a continuación del tratamiento de desactivación (por medio de disolvente orgánico y temperatura elevada).

Ejemplo 5 - Dispersiones de PS (preparaciones de la presente invención)

Se prepararon dispersiones estabilizadas de PS por dispersión de la fosfatidilserina estabilizada (preferentemente básicamente desprovistas de actividad de la fosfolipasa), en una base adecuada de aceite, preferentemente una base de triglicéridos y en particular triglicéridos de cadena media (tales como MCT o ésteres de etilo de aceite de pescado) o aceite vegetal a una temperatura ambiente hasta 80 °C, y dio como resultado una dispersión estabilizada de PS en una base de aceite. La dispersión se consiguió mediante agitación vigorosa, homogeneización, presión-homogeneización, y otros procedimientos de mezcla industrial.

Se verificó la estabilidad de estas formulaciones de la fosfatidilserina como un principio activo a granel y en cápsulas de gelatina blanda.

- Preparación de cápsulas de gelatina blanda

Se preparó PS dispersa como se ha descrito anteriormente y se usó en la fabricación de cápsulas de gelatina blanda, que se prepararon mediante el procedimiento de rutina para la preparación de cápsulas de gelatina blanda. Las cápsulas que contenían PS dispersa se almacenaron en tres condiciones diferentes: (1) en envases cerrados herméticamente en un lugar oscuro a temperatura ambiente; (2) en envases cerrados herméticamente a 35 °C y con un 60 % de HR (condiciones aceleradas); y (3) en envases abiertos a 35 °C y con un 60 % de HR (condiciones aceleradas). Las cápsulas almacenadas a temperatura ambiente (condición 1) se ensayaron para su concentración

de PS al final del procedimiento de fabricación y después de un periodo de almacenamiento de 4 semanas. Las cápsulas almacenadas en condiciones aceleradas (2 y 3) se ensayaron para su concentración de PS al final del procedimiento de fabricación y después de un periodo de almacenamiento de 1, 2, 3 y 4 semanas. La concentración de PS se analizó usando HPLC con un detector ELS y/o HPTLC, y por medio de RMN ³¹P. La Tabla 5 muestra la concentración de PS en las diferentes cápsulas.

5

Tabla 5: Estabilidad de PS en cápsulas de gelatina blanda que contienen preparaciones de PS dispersa

Muestra y condición de almacenamiento	Concentración de PS Antes del Almacenamiento*	Concentración de PS Después del Almacenamiento*			
		1 sem.	2 sem.	3 sem.	1 m.
Cápsulas de dispersión a TA	13,26	n.d	n.d	n.d	13,15
Cápsulas de dispersión en condiciones aceleradas en un envase cerrado herméticamente	13,26	13,04	n.d	n.d	13,28
Cápsulas fluidas no estabilizadas a TA	18,67	n.d	n.d	n.d	17,56
Cápsulas fluidas no estabilizadas en condiciones aceleradas en un envase cerrado	18,67	17,87	n.d	17,04	15,07
Cápsulas fluidas no estabilizadas en condiciones aceleradas en un envase abierto	18,67	n.d	17,9	17,3	n.d

(*) Las concentraciones de PS están en %. Abreviaturas: n.d., no realizado; sem., semana, m., mes.

Además de la concentración de PS, también se ensayaron el contenido de agua y de glicerol en la cápsula al final de la fabricación. Como se ha mencionado anteriormente, el agua y el glicerol, absorbidos por el contenido de la cápsula, pueden promover la degradación de la PS. El contenido de agua se ensayó mediante un procedimiento estándar de Karl-Fischer. El contenido de glicerol se ensayó por valoración de acuerdo con un procedimiento estándar de la AOCS (Sociedad Americana de Químicos del Aceite). La Tabla 6 muestra el contenido de agua y de glicerol en las cápsulas fabricadas a partir de la dispersión y de las cápsulas fabricadas a partir de la PS fluida.

10

Tabla 6: Contenido de agua y de glicerol en las cápsulas fabricadas a partir de PS en dispersión o fluida

Muestra (forma de cápsula)	Contenido de agua (%)	Contenido de glicerol (%)
PS en Dispersión	0,5	0,12
PS Fluida	1,7	1,43

Se puede observar que efectivamente las preparaciones en dispersión también fueron eficaces para minimizar el desplazamiento y la absorción de agua y el glicerol adquirió el contenido de PS de la cápsula. Esto, además de otros medios que se han descrito anteriormente, produce una PS estabilizada en la cápsula.

15 **Ejemplo 6 - Otras PS en fase sólida**

También se proporciona fosfatidilserina estabilizada mediante la creación de preparaciones de PS que son fluidas solamente a temperaturas elevadas y que son sólidas a temperatura ambiente. De esta manera se inhiben todas las reacciones degradación.

Esto se consiguió por diferentes medios:

- 20
- (a) usando diferentes sales de PS, tales como sal de calcio o de sodio creando una semi-dispersión;
 - (b) usando aceites comestibles que son sólidos a temperatura ambiente y lo suficientemente fluidos a temperaturas elevadas para permitir el procedimiento de encapsulación; o
 - (c) usando diferentes aditivos de endurecimiento.

La preparación de fosfatidilserina obtenida en los ejemplos anteriores (2 g) se mezcló con fosfatidilserina que se

trató con la solución de EDTA y se lavó con n-hexano (80 g) como se ha descrito anteriormente. Se añadieron a la solución lecitina de soja (12,26 g) y PKO (26,45 g). El n-hexano se evaporó a 45 °C. El material final es un aceite turbio que es fluido a 45 °C y sólido a temperatura ambiente.

Ejemplo 7 - Aditivos de estabilización/Antioxidantes/fotosensibilizantes

5 Como se ha mencionado anteriormente, se cree que varios mecanismos o fenómenos son la causa de la degradación de la PS, entre los cuales están:

1. Hidrólisis y transfosfatidilación enzimática, produciendo PA o PG;
2. Hidrólisis parcial o total de los ácidos grasos de fosfolípidos, produciendo liso-PS o PS desacilada (GPS) en la misma medida;
- 10 3. Retirada del grupo fosfato, produciendo diglicéridos (DAG);
4. Descarboxilación del grupo carboxilato de la L-serina para producir PE u otros productos más complejos;
5. Hidroperoxidación de los fosfolípidos;
6. Oxidación del grupo amino primario del grupo de cabeza de la L-Serina (mediante aire, luz, etc.)

- Degradación que da como resultado liso-PS, DAG y PE

15 Por ejemplo, una cápsula de gelatina blanda que contiene la PS estabilizada producida mediante procedimiento que se ha descrito en el presente documento se analizó para diferentes marcadores de degradación después de 4 meses de almacenamiento en condiciones ambientales (es decir, temperatura ambiente y humedad sin controlar). Los niveles de liso-PS (0,68 % en p/p), DAG (0,35 % en p/p) y PE (0,79 % en p/p) fueron insignificantes, lo que indica que no se produjo ninguna de las vías de degradación que llevaban a dichos productos secundarios.

20 - Degradación que da como resultado los productos secundarios PA y PG

Los procedimientos analíticos que se ha mencionado anteriormente también se usaron para verificar la estabilidad de las preparaciones de PS producidas mediante el procedimiento que se ha descrito en el presente documento en términos de degradación enzimática. Se supone que esta vía de degradación produce productos secundarios tales como PA y PG. Después de 4 meses de almacenamiento en condiciones ambientales, los niveles de PA y de PG eran idénticos a los niveles del almacenamiento previo (que siguen a la producción de PS), a un 2,58 y un 0,2 % en p/p, respectivamente. Ya que no se detectó ningún aumento de estos productos, se podría concluir que la PS efectivamente está desprovista de cualquier actividad enzimática que pueda llevar a su descomposición.

25

- Hidroperoxidación

30 Otra causa de productos de baja calidad es la hidroperoxidación de lípidos, que lleva a la descomposición de compuestos tales como la PS. Esta oxidación es altamente dependiente del procedimiento de la producción del material y de los tratamientos que ha experimentado el material. La indicación principal de esta oxidación es un valor denominado Valor de Peróxido (VP) que se mide normalmente de forma volumétrica como los equivalentes de peróxidos en una muestra del material.

35 Se analizaron a fondo las preparaciones de PS para sus valores iniciales así como en desarrollo de peróxido. Este análisis se llevó a cabo en dos preparaciones de PS: las tratadas para la desactivación enzimática y opcionalmente se trató con inhibidores de enzimas, tales como EDTA; así como las preparaciones producidas usando enzimas inmovilizadas. Los resultados que se muestran a continuación (Tabla 7) demuestran la alta estabilidad de la PS de la presente invención en términos de estabilidad oxidativa, como resultado del procedimiento de producción de PS y los tratamientos posteriores de desactivación de enzimas.

Tabla 7 - Estabilidad Oxidativa de PS

Muestra	VP de almacenamiento previo (meqO ₂ /Kg)	Tiempo de almacenamiento	VP de almacenamiento posterior (meqO ₂ /Kg)
Cápsula a partir de PS fluida	0	42	0
PS Fluida	0	296 días	0,58
PS en Polvo	2,16	178 días	2,18

40 Se puede observar que siguiendo el procedimiento de producción que se ha descrito en la presente descripción y en los diversos tratamientos posteriores, no se detectó aumento de los Valores de Peróxido, confirmando la estabilidad de las preparaciones de PS de la presente invención con respecto a la hidroperoxidación.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una dispersión estable de fosfatidilserina (PS) en una base de aceite, que comprende una composición de fosfatidilserina, comprendiendo dicha composición de un 1 a un 99 % (p/p) de fosfatidilserina, en la que dicha PS está en forma de una sal que es insoluble en aceite, en la que no más de un 5 % de la fosfatidilserina se descompone después de un periodo de almacenamiento de al menos 6 meses.
2. La dispersión de la reivindicación 1, **caracterizada porque** no más de un 5 % de la fosfatidilserina se descompone después de un periodo de almacenamiento de al menos 12 meses.
3. La dispersión de la reivindicación 2, **caracterizada porque** no más de un 5 % de la fosfatidilserina se descompone después de un periodo de almacenamiento de al menos 24 meses.
- 10 4. La dispersión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende adicionalmente de un 1 a un 99 % (p/p) de otros ingredientes funcionales, de un 1 a un 99 % (p/p) de fosfatidilcolina (PC), de un 1 a un 99 % (p/p) de fosfatidiletanolamina (PE), de un 1 a un 99 % (p/p) de fosfatidilinositol (PI), de un 1 a un 99 % (p/p) de fuente de Omega-3, de un 1 a un 99 % (p/p) de fuente de Omega-6 y/o de un 1 a un 99 % (p/p) de esteroides o de ésteres de esteroles.
- 15 5. La dispersión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que está en forma de polvo.
6. La dispersión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha sal es la sal de calcio o la sal de magnesio.
7. La dispersión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo dicha dispersión de un 1 % a un 70 % (p/p) de fosfatidilserina.
- 20 8. La dispersión de la reivindicación 7, comprendiendo dicha dispersión de un 5 % a un 45 % (p/p) de fosfatidilserina.
9. La dispersión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que dicha base de aceite es una base comestible de triglicérido, aceite vegetal o aceite de pescado.
10. La dispersión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que dicha base de aceite es una base de triglicérido de cadena media (MCT).
- 25 11. La dispersión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende adicionalmente ingredientes biofuncionales adicionales, que están seleccionados entre el grupo que consiste en lecitina, fosfolípidos, vitaminas, antioxidantes, minerales, proteínas o péptidos nutricionales, esteroides, hidratos de carbono nutricionales y sus derivados, aminoácidos, extractos de plantas, productos de fermentación, derivados de glicéridos (mono y diglicéridos) y ácidos grasos poliinsaturados.
- 30 12. La dispersión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizada porque** dicha dispersión es sólida a temperatura ambiente y fluida a temperaturas elevadas, y es adecuada para la encapsulación con gelatina blanda.
13. La dispersión de fosfatidilserina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para su uso como un suplemento dietético, alimento nutracéutico y/o aditivo para fármacos.
- 35 14. Un artículo para alimentación que comprende la dispersión de fosfatidilserina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
15. Una composición farmacéutica que comprende la dispersión de fosfatidilserina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
16. Una cápsula que contiene la dispersión de fosfatidilserina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
17. La cápsula de la reivindicación 16, que es una cápsula de gelatina blanda.
- 40 18. La dispersión de fosfatidilserina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para su uso como un potenciador del rendimiento cognitivo y de la capacidad de aprendizaje.
19. La dispersión de fosfatidilserina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para su uso en la prevención de la pérdida de memoria.
- 45 20. La dispersión de la reivindicación 19, para su uso en la prevención de la pérdida de memoria relacionada con la edad.