

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 501 015**

51 Int. Cl.:

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)
A61K 8/55 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
C12P 13/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2006 E 11171047 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014 EP 2431020**

54 Título: **Procedimiento de preparación y purificación de fosfatidilserina**

30 Prioridad:

30.05.2005 IT PD20050164
01.08.2005 US 703870 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.10.2014

73 Titular/es:

FIDIA FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)
Via Ponte della Fabbrica 3/A
35031 Abano Terme (PD), IT

72 Inventor/es:

ZANELLATO, ANNA MARIA;
PITTARELLO, MARA;
GAMBILLARA, ANTONIO y
VACCARO, SUSANNA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 501 015 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 purificación de fosfatidilserina

Objeto de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos de 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 con 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 pueda evitar (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 de síntesis y purificación de PS y al uso de PS como el principio activo en fármacos (y/o suplementos 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 disolventes orgánicos.

35 En los últimos años, se han perfeccionado diversos procedimientos para sintetizar PS mediante conversión enzimática en sistemas de dos fases de agua/disolvente 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 que se forma la PS, la fase acuosa contiene el aceptor hidroxilo y la reacción de síntesis ocurre en la interfaz agua/disolvente, en presencia de fosfolipasa D en bruto 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 disolvente que luego eran difíciles de eliminar, con los altos costos correspondientes para la producción y la purificación de PS (Comfurios P. et al., Journal of Lipid Research 1990, 31: 1719-1721).

Por lo tanto el disolvente orgánico se sustituyó por un detergente/tensioactivo 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.

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

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

tensioactivos, exclusivamente con la adición de sal de cloruro de calcio (CaCl₂), sin embargo, no se especifican el porcentaje de conversión enzimática ni el grado de pureza de la PS obtenida.

5 El documento EP 1310563 describe un procedimiento de 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-

10 laminar en la que subsiguientemente puede ocurrir la reacción de transfosfatidilación. El documento EP 1427839 describe la síntesis enzimática de fosfolípidos, incluyendo PS, en agua, sin detergentes, pero en presencia de iones metálicos que se liberan desde las sales correspondientes cuando las mismas se preparan/disuelven en agua. Dicho procedimiento ocurre en dos fases distintas en las que, a partir de mezclas de fosfolípidos, una primera reacción de hidrólisis enzimática se cataliza por PLD para producir ácido fosfatídico, seguida por una segunda reacción de transfosfatidilación en la que se forma PS en presencia de un exceso de serina.

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

15 En relación a la purificación de PS (obtenida por transfosfatidilación en un medio acuoso/disolvente 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/disolvente orgánico polar (tal como isopropanol) para extraer el fosfolípido indicado anteriormente de la solución que lo contiene, que a su vez se representa por un disolvente hidrocarbonado (tal como tolueno), mientras que el documento EP 0922707 se refiere a un procedimiento de extracción/purificación de PS a partir de una mezcla de fosfolípidos usando un sistema difásico de disolventes orgánicos, tales como heptano y metanol.

20 La presente invención se refiere a procedimientos de purificación de la fosfatidilserina (PS) que proporcionan el producto final en un rendimiento muy alto.

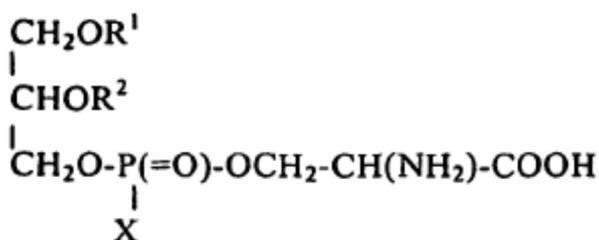
Además, el procedimiento de transfosfatidilación catalizado por la enzima PLD, permite que un alto porcentaje de PC se convierta en PS independientemente del medio en el que se produzca la reacción enzimática.

25 **Descripción detallada de la invención**

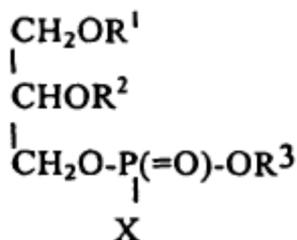
La patente EP 1890 706 divulga un procedimiento de preparación de PS (Fórmula I), en el que se realiza una transfosfatidilación mediante la enzima PLD, en presencia de BMO, alcanzando así la transferencia de un resto de fosfatidilo desde fosfatidilcolina (PC) (Fórmula II) a serina (que en este caso representa 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
- en un medio aprótico que consiste en agua/disolventes apróticos polares que no forman un sistema de dos fases, o
- en un sistema de dos fases que consiste en agua/disolventes orgánicos.

Fórmula I



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

Fórmula II

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

5 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 de este modo, 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 penetrarse anteriormente por soluciones hidrófilas tales como las que contienen la propia enzima.

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

15 De hecho, se conoce que las sales de calcio y en particular CaCl₂, como fuentes de iones de calcio añadidas al medio en el que ocurre la reacción de transfosfatidilación (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).

20 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 sistemas de producción, el 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.

25 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 solo era muy diferente, sino también decidida y significativamente mayor que el obtenido con CaCl₂.

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 del resto de los metales bivalentes en la Tabla de los Elementos.

30 Los ejemplos de disolventes en los que el procedimiento divulgado en el documento EP 1890706 se puede realizar son alcoholes alifáticos, tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropanoles; disolventes polares apróticos, tales como dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida, acetonitrilo, N-metil-pirrolidona; y disolventes orgánicos, tales como n-hexano, tolueno, n-butanol, benceno.

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

35 La Preparación 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.

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

El máximo rendimiento de la conversión de PC en PS es del 90 %, lo que está muy lejos del rendimiento obtenido mediante el mismo procedimiento de producción pero en presencia de CaCl_2 .

5 Por otra parte, la Preparación 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 CaCl_2 .

10 El porcentaje de disolvente aprótico (y en particular, DMSO) a usarse puede variar del 0,1 al 50 %, preferentemente del 1,25 al 10 % y lo 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 1 M, 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/disolvente orgánico.

15 La Preparación 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 disolvente usada en los procedimientos es muy baja (tal como se demuestra más adelante), tan baja que los costos de producción son limitados y no es difícil eliminar el disolvente del producto final.

20 La concentración de disolvente a ser usado en dicho procedimiento puede variar del 0,1 al 40 % v/v (expresado como % en volumen sobre el volumen de tampón de partida), preferentemente del 1 al 5 % v/v y lo 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 1 M, preferentemente entre 0,3 y 0,6 M y lo más preferentemente es igual a 0,54 M.

En este caso también el máximo rendimiento de la conversión de PC en PS fue superior al 80 %, bastante diferente del obtenido por el mismo procedimiento pero en presencia de CaCl_2 .

25 La reacción de transfosfatidilación puede realizarse a diferentes temperaturas, que varían entre 20 y 70 °C, preferentemente a 45 o 55 °C.

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

30 El medio acuoso de partida a mezclarse/asociarse con el alcohol, el disolvente aprótico o el disolvente 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.

35 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.

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 microorganismo *Streptovercillium hachijoense*.

40 Dicha enzima puede usarse en forma purificada o parcialmente purificada, o en una forma no purificada después de filtración simple del microorganismo a partir de su caldo de cultivo.

La Preparación 4 (y la Figura 1) describe un sistema de purificación parcial de PLD para obtener una enzima que está sustancialmente no-contaminada por proteínas de una naturaleza diferente que podrían 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.

45 La enzima parcialmente purificada, descrita en la Preparación 4 se ensayó en el procedimiento de producción descrito en la Preparación 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/policlonales dirigidos hacia la enzima PLD, pero que pueden purificarse 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, 50 parcialmente purificada y no purificada).

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 *Streptovorticillium hachijoense*, la concentración óptima varía entre 1 y 10 unidades/g de fosfátido.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de separación y purificación de PS a partir de serina, PC y PLD (que representan impurezas) que permanecen en el medio en el que ha tenido lugar la reacción de transfosfatidilación.

Con el fin de separar y purificar PS, se han desarrollado los siguientes procedimientos.

1. al final de la reacción de transfosfatidilación enzimática, la PS se separa añadiendo una solución de cloruro de sodio, a una concentración de entre el 2 y el 6 % (preferentemente el 5 %), al medio de reacción en el que el fosfolípido producido recientemente está presente: se obtendrán así dos fases ya que la PS permanece insoluble en esta solución mientras que los componentes residuales (que son los más solubles) permanecen mayoritariamente en el subnadante. La PS, que se ha depositado en la parte superior del medio de reacción, se aísla después separando y eliminando el subnadante. Alternativamente, es posible comenzar un nuevo procedimiento de separación y purificación de PS, objeto de la presente invención, filtrando el recipiente de PS en el medio de reacción para eliminar inmediatamente todos los componentes residuales. Se añade después una solución de NaCl. Se forman dos fases y el sobrenadante se elimina debido a que la PS se encuentra en el subnadante. Los lavados de NaCl se pueden repetir dos o más veces, ajustando la concentración de sal si es necesario. Estos procedimientos de lavado permiten la eliminación completa de los alcoholes, disolventes apróticos u orgánicos usados en los procedimientos para producir PS descritos anteriormente, como se demuestra en el Ejemplo 1. Subsiguientemente, después del tratamiento de los iones presentes en el medio de reacción con un agente quelante, el producto se precipita/lava con una solución de etanol (a un porcentaje de entre el 50 y el 100 %, preferentemente del 95 %), o con una mezcla de disolventes de cetona (tales como acetona) en agua (a un porcentaje de entre el 50 y el 100 %, preferentemente del 95 %); lavar con etanol se puede repetir varias veces (ajustando el porcentaje de etanol presente, si es necesario). Finalmente, se lleva a cabo un lavado final con etanol a entre el 90 y el 100 %, después de lo que el producto finalizado puede o no puede secarse;

2. la separación y la purificación de PS se lleva a cabo por ultrafiltración al final de la reacción enzimática de transfosfatidilación, usando una membrana de tamaño de poro tal como para permitir el paso de moléculas pequeñas atrapando mientras las grandes. Por esta razón, es preferible usar filtros con poros lo suficientemente pequeños para atrapar moléculas con un peso molecular de 1000.000/3000.000 daltons o superior.

Dichos procedimientos para el aislamiento y purificación de PS permiten la eliminación de los residuos de las sustancias que se dejan después de la reacción enzimática y estaban contenidas inicialmente en el medio de transfosfatidilación tal como serina, PC, sales minerales, colina que se libera de PC, PA, sales/óxidos y sobre todo, permiten la purificación completa de la PS a partir de la enzima PLD, de la que no queda ninguna traza, como se demuestra en el Ejemplo 1. La PS final así obtenida tiene un grado muy alto de pureza.

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

35 Las preparaciones de PS se describen en más detalle en las siguientes preparaciones 1-4 (correspondientes a los Ejemplos 1-4 del documento EP 1890706).

Preparación 1

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

40 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) 0,54 M, en comparación con la preparación de PS mediante el mismo procedimiento pero en presencia de sal de CaCl₂, 0,54 M.

45 Los óxidos ensayados y el cloruro de calcio se disuelven en 40 ml de tampón acetato 0,2 M (pH 5,6) al que se añaden a continuación 0,5 ml de isopropanol con el fin de alcanzar el 1,25 % v/v (solo para CaO), o 4 ml de isopropanol con el propósito de alcanzar el 10 % v/v (los alcoholes pueden añadirse también al tampón que contiene BMO después de la solubilización de la serina).

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

Finalmente, se toma una muestra de cada producto y la transformación exitosa de PC en PS se ensaya mediante

cromatografía en capa fina (TLC).

Rendimiento de la conversión de PC en PS:

- 5 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 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 %

PC 6,5 %

- 10 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 %

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

PE-OH 15,8 %

PA 10,7 %

PS 70,1 %

PC 3,4 %

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

PE-OH 9,0 %

PA 4,5 %

PS 84,0 %

PC 2,5 %

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

PE-OH 10,0 %

PA 8,0 %

PS 80,0 %

PC 2,0 %

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

Preparación 2

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

- 35 El DMSO se usó en diferentes concentraciones que variaban entre un porcentaje del 1,25 y el 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.

Los óxidos de calcio ensayados y el cloruro de calcio se disuelven en 40 ml de tampón de acetato 0,2 M, a pH 5,6. Las

ES 2 501 015 T3

soluciones obtenidas de esta manera se agitan en un reactor encamisado con condensador. Después de aproximadamente 10 minutos de agitación, se añaden 20 g de L-serina a una temperatura de 45 °C y a continuación se continúa la agitación hasta que se logra la solubilización completa.

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

Subsiguientemente, las muestras de los productos respectivos obtenidos se toman al final de la reacción y se ensayan para la transformación exitosa de PC en PS.

10 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 %

PS 86,3 %

PC 6,6 %

15 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 %

PC 25,2 %

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

20 **PA** 6 %

PS 69 %

PC 25 %

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

PA 7,5 %

25 **PS** 72,5 %

PC 20 %

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

PA 9,0 %

PS 71,0 %

30 **PC** 20 %

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

PA 8,5 %

PS 71,5 %

PC 20 %

35 **Preparación 3 a**

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

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 CaCl_2 , 0,54 M.

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

Las soluciones obtenidas de esta manera se agitan en un reactor encamisado con condensador.

A continuación el procedimiento continúa tal como se describe en la Preparación 1.

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

Rendimiento de la conversión de PC en PS:

10 Rendimiento de la conversión de PC en PS obtenido con hexano al 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 al 1,25 % v/v en presencia de CaCl_2 :

15 PA 8,1 %

PS 68,4 %

PC 23,5 %

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

20 PA 8,5 %

PS 82,5 %

PC 9,0 %

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

25 PA 11,0 %

PC 80,0 %

PS 9,0 %

Preparación 3 b

Preparación de PS a partir de PC vegetal en un sistema de dos fases (con la presencia del disolvente orgánico, hexano) con CaO 0,54 M o con CaCl_2 0,54 M

30 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 CaCl_2 , 0,54 M. A partir de este punto, el procedimiento es el mismo que en la Preparación 3 a.

Rendimiento de la conversión de PC en PS:

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

35 PA 7,5 %

PS 86,0 %

PC 6,5 %

Rendimiento de la conversión de PC en PS obtenido con hexano al 2,5 % v/v en presencia de CaCl_2 :

PA 10,0 %

PS 65,0 %

PC 25,0 %

Preparación 4

5 Purificación parcial de la enzima PLD

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

- eliminación del agente productor mediante microfiltración de flujo tangencial a través de filtros (preferentemente con membranas de polietersulfona, PES) con un tamaño de poro de 0,2 μm ;
- 10 • 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 de flujo tangencial final a través de membranas (preferentemente en PES) con un corte molecular de 10.000 D para volver a concentrar la enzima y dializarla contra tampón de TRIS-HCl, 50 mM, pH = 8.

15 La Figura 1 muestra los hallazgos de un análisis cromatográfico de la enzima PLD parcialmente purificada según se describe anteriormente, en comparación con un análisis de un caldo de fermentación purificado únicamente del agente que produce la propia enzima (Figura 2).

La invención se divulga en más detalle en los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1 a

20 Separación y purificación de PS de acuerdo con el Procedimiento 1

El medio de reacción en el que se ha preparado la PS se suplementa con 1,5 volúmenes (en términos del volumen de reacción de partida) de una solución al 5 % de NaCl y la mezcla se agita a una temperatura de 30 °C durante al menos 30 minutos. La PS, que se ha depositado en la parte superior del medio de reacción, se aísla a continuación, mediante separación y eliminación del subnadante. El sobrenadante (PS) se suplementa con 4 volúmenes de una solución al 3 % de NaCl y se agita a 30 \pm 10 °C durante al menos 30 minutos. A continuación, el sobrenadante se separa y elimina (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/litro) preparada en un tampón de acetato, 0,1 M pH 7,5.

30 Después de mezclado adicional (a 25 \pm 10 °C durante al menos 1 hora) agitando la mezcla así obtenida, el pH se ajusta a 7/7,5 y se añaden 2 volúmenes (en términos del volumen de EDTA) de etanol al 95 %, agitando la mezcla a 25 \pm 10 °C durante al menos 1 hora.

Después de un período de sedimentación de la PS, ella se recoge y el sobrenadante (la fase que consiste en etanol en agua) se elimina 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 que se realiza un lavado final con etanol al 100 % y como una etapa final la PS puede secarse.

35 Producto final: distribución de las fracciones lipídicas aisladas de acuerdo con el Procedimiento 1, con la PS preparada tal como se describe en la Preparación 3 con CaO 0,54 M.

PA 5,8 %

PS 94,2 %

40 Ejemplo 1 b

Separación y purificación de PS de acuerdo con el Procedimiento 1

El medio de reacción en el que se ha preparado la PS se suplementa con 1,5 volúmenes (en términos del volumen de reacción de partida) de una solución al 5 % de NaCl y la mezcla se agita 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, se aísla a continuación separando y

eliminando el subnadante. El sobrenadante (PS) se suplementa con 3 volúmenes de una solución de NaCl al 3 % y se agita a 20 ± 10 °C, durante al menos 30 minutos. A continuación, el sobrenadante se separa y elimina (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.

5 Después de un mezclado adicional (a 20 ± 10 °C durante al menos 1 hora) agitando la mezcla así obtenida, el pH se ajusta a 7,7,5 y se añaden 2 volúmenes (en términos del volumen de EDTA) de etanol al 100 %, agitando la mezcla a 20 ± 10 °C durante al menos 1 hora.

10 Después de un período de sedimentación de la PS, ella se recoge y el sobrenadante (la fase que consiste en etanol en agua) se elimina. Se ha repetido lavar con etanol/agua (con un porcentaje de etanol del 70 %) después de lo que se realiza un lavado final con etanol al 100 % y como una etapa final la PS puede secarse.

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

PA 6,8 %

PS 93,2 %

15 Ejemplo 1 c

Separación y purificación de PS de acuerdo con el Procedimiento 1

Antes de añadir la solución de NaCl, la PS se filtra para eliminar inmediatamente todos los componentes residuales del medio de reacción. A continuación se añade NaCl y el procedimiento de aislamiento y purificación se continúa tal como se describe en el Ejemplo 1 a.

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

PA 5,0 %

PS 95,0 %

25 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 se determinó 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.

La concentración de serina se midió de nuevo al final del procedimiento de purificación de PS descrito anteriormente y demostró ser menor que/igual que el 0,2 %.

30 La actividad residual de la enzima PLD también se determinó de nuevo y resultó ser menor que el límite para la determinación mediante este procedimiento.

35 Para demostrar la ausencia total de incluso la más mínima traza del disolvente orgánico usado en el procedimiento de preparación de PS (descrito en la Preparación 3) y de esta manera confirmar la novedad y la actividad inventiva de la presente invención, el solicitante analizó la PS parcialmente purificada descrita en el Ejemplo 1, en la fase inmediatamente anterior a la adición de la solución alcohólica.

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

40 El cromatograma de calibración (Figura 3) se obtuvo usando un estándar que consiste en acetato de etilo y n-hexano correspondiendo 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 de acuerdo con el Procedimiento 1.

Ejemplo 2

Separación y purificación de PS de acuerdo con el Procedimiento 2

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

período de separación de la PS que dura al menos 1 hora.

5 Se forman dos fases: se separan y el subnadrante se descarta, mientras que el sobrenadrante se suplementa con 2,5 volúmenes de una solución de EDTA de 22 gg/litro, preparada en agua. Una vez se ha alcanzado una temperatura de 28 °C, se realiza una ultrafiltración. Preferentemente, deben usarse filtros que tienen poros de un tamaño 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 aisladas de acuerdo con el Procedimiento 2, con la PS preparada, por ejemplo, de acuerdo con la Preparación 1 con CaO 0,54 M.

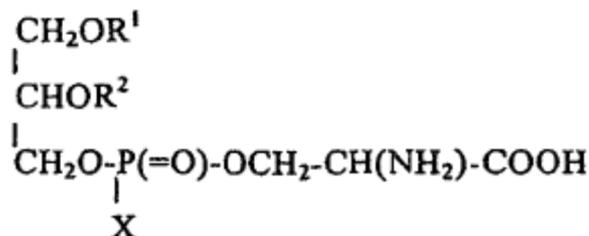
PA 6,0 %

10 **PS 94,0 %**

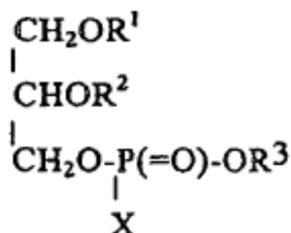
La concentración de serina se midió al final del procedimiento de purificación de PS descrito anteriormente y resultó ser menor o igual que el 0,2 %, mientras que una determinación adicional de la actividad residual de la enzima PLD demostró ser menor que el límite para la determinación mediante este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

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de separación y purificación de fosfatidilserina (PS) de fórmula



5 en la que R¹ y R² representan independientemente un acilo C₁₀-C₃₀, saturado, mono-insaturado o poliinsaturado, X=OH u OM, en la que M = metal alcalino o alcalinotérreo, amonio, alquilamonio (incluyendo la sal interna) de serina en forma D, L o racémica, a partir de un compuesto de fórmula



10 en la que R¹ y R² y X tienen los significados especificados anteriormente, R³=CH₂-CH₂-NH₂ o CH₂-CH₂-N⁺(CH₃)₃ y de una enzima fosfolipasa D (PLD) que queda en un medio en el que la reacción de transfosfatidilación ha tenido lugar, estando dicho medio seleccionado de:

- un medio hidroalcohólico que contiene un alcohol alifático y en presencia de óxido de metal bivalente;
- un medio aprótico que consiste en disolventes acuosos/polares y en presencia de un óxido de metal bivalente; o
- un sistema de dos fases formado por disolvente acuoso/orgánico y en presencia de un óxido de metal bivalente,

15 implicando dicho procedimiento las siguientes etapas:

I) añadir una solución salina de cloruro de sodio al medio de reacción que contiene la PS que se ha producido, con la subsiguiente mezcla y separación de la PS;

II) recogida y eliminación del sobrenadante;

20 III) las etapas I y II pueden repetirse modificando la concentración de partida de solución de cloruro de sodio y eliminando el sobrenadante;

IV) añadir una solución de EDTA para quelar los iones presentes en la solución y la mezcla subsiguiente;

25 V) añadir una solución de etanol que consiste en etanol en un porcentaje del 50 al 100 % o una mezcla de agua/acetona que consiste en acetona a un porcentaje del 50 al 95 % con mezclado y sedimentación de la PS subsiguientes;

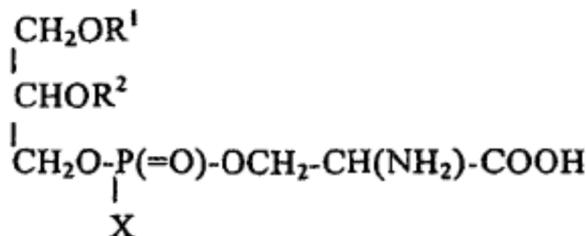
VI) la etapa V se puede repetir modificando el porcentaje de etanol;

VII) añadir una solución de etanol que consiste en etanol a un porcentaje del 90 al 100 %;

VIII) recogida y eliminación del sobrenadante;

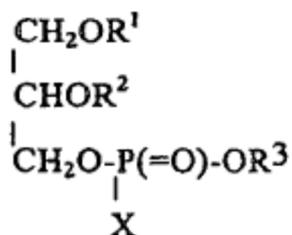
30 IX) secado del producto final.

2. Procedimiento de separación y purificación de fosfatidilserina (PS) de fórmula



en la que R¹ y R² representan independientemente un acilo C₁₀-C₃₀, saturado, mono-insaturado o poliinsaturado,

X=OH u OM, en la que M = metal alcalino o alcalinotérreo, amonio, alquilamonio (incluyendo la sal interna) de serina en forma D, L o racémica, a partir de un compuesto de fórmula



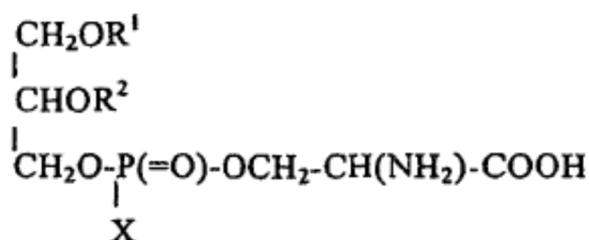
5 en la que R¹ y R² y X tienen los significados especificados anteriormente, R³=CH₂-CH₂-NH₂ o CH₂-CH₂-N⁺(CH₃)₃ y de una enzima fosfolipasa D (PLD) que queda en un medio en el que la reacción de transfosfatidilación ha tenido lugar, estando dicho medio seleccionado de:

- un medio hidroalcohólico que contiene un alcohol alifático y en presencia de óxido de metal bivalente;
- un medio aprótico que consiste en disolventes acuosos/polares y en presencia de un óxido de metal bivalente; o
- un sistema de dos fases formado por disolvente acuoso/orgánico y en presencia de un óxido de metal bivalente,

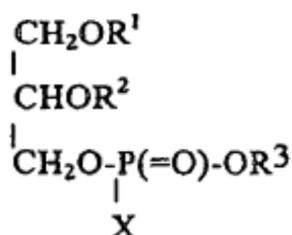
10 implicando dicho procedimiento las siguientes etapas:

- I) añadir una solución salina de cloruro de sodio a la PS que se ha filtrado previamente, con el subsiguiente mezclado y separación de la PS;
- 15 II) recogida y eliminación del sobrenadante;
- III) las etapas I y II pueden repetirse modificando la concentración de partida de solución de cloruro de sodio y eliminando el sobrenadante;
- IV) añadir una solución de EDTA para quelar los iones presentes en la solución y la mezcla subsiguiente;
- V) añadir una solución de etanol que consiste en etanol en un porcentaje del 50 al 100 % o una mezcla de
- 20 agua/acetona que consiste en acetona a un porcentaje del 50 al 95 % con mezclado y sedimentación de la PS subsiguientes;
- VI) la etapa V se puede repetir modificando el porcentaje de etanol;
- VII) añadir una solución de etanol que consiste en etanol a un porcentaje del 90 al 100 %;
- VIII) recogida y eliminación del sobrenadante;
- 25 IX) secado del producto final.

3. Procedimiento de separación y purificación de fosfatidilserina (PS) de fórmula



30 en la que R¹ y R² representan independientemente un acilo C₁₀-C₃₀, saturado, mono-insaturado o poliinsaturado, X=OH u OM, en la que M = metal alcalino o alcalinotérreo, amonio, alquilamonio (incluyendo la sal interna) de serina en forma D, L o racémica, a partir de un compuesto de fórmula



en la que R¹ y R² y X tienen los significados especificados anteriormente, R³=CH₂-CH₂-NH₂ o CH₂-CH₂-N⁺(CH₃)₃ y de una enzima fosfolipasa D (PLD) que queda en un medio en el que la reacción de transfosfatidilación ha tenido

lugar, estando dicho medio seleccionado de:

- un medio hidroalcohólico que contiene un alcohol alifático y en presencia de óxido de metal bivalente;
- un medio aprótico que consiste en disolventes acuosos/polares y en presencia de un óxido de metal bivalente; o
- un sistema de dos fases formado por disolvente acuoso/orgánico y en presencia de un óxido de metal bivalente,

5

implicando dicho procedimiento las siguientes etapas:

- I) añadir una solución salina de cloruro de sodio al medio de reacción que contiene la PS que se ha producido, con la subsiguiente mezcla y separación de la PS;
- II) recogida y eliminación del sobrenadante;
- III) añadir una solución salina de cloruro de sodio y llevar a cabo ultrafiltración a través de una membrana porosa;
- IV) secar el producto final.

10

4. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-3 en el que dicho medio de reacción es un medio hidroalcohólico y los alcoholes están seleccionados de metanol, etanol, n-propanol, isopropanol.

15

5. El procedimiento de acuerdo con 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.

6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la concentración de isopropanol es del 10 %.

20

7. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-3 en el que dicho medio de reacción contiene un disolvente polar aprótico seleccionado de dimetilsulfóxido, acetonitrilo, dimetilformamida y N-metil-pirrolidona.

8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7 en el que el disolvente polar aprótico es dimetilsulfóxido en una concentración entre el 0,1 y el 50 % expresada como un % en volumen sobre el volumen del tampón de partida.

25

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8 en el que la concentración de dimetilsulfóxido es del 1,25 %.

10. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-3 en el que dicho medio de reacción es un sistema de dos fases formado por disolvente acuoso/orgánico en el que los disolventes orgánicos están seleccionados de n-hexano, tolueno, benceno y n-butanol.

30

11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10 en el que el disolvente 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.

12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11 en el que la concentración de n-hexano es del 1,25 % o del 2,5 %.

13. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones anteriores 1-12 en el que el óxido de metal bivalente es óxido de calcio o de magnesio o de cinc en una concentración de entre 0,1 y 1 M.

35

14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13 en el que la concentración de los óxidos seleccionados es 0,33 o 0,54 M.

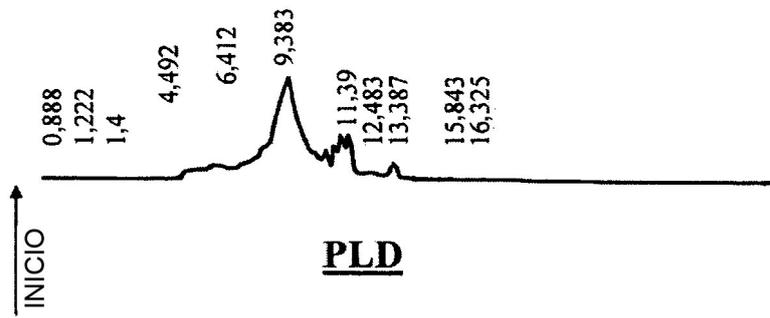


Figura 1

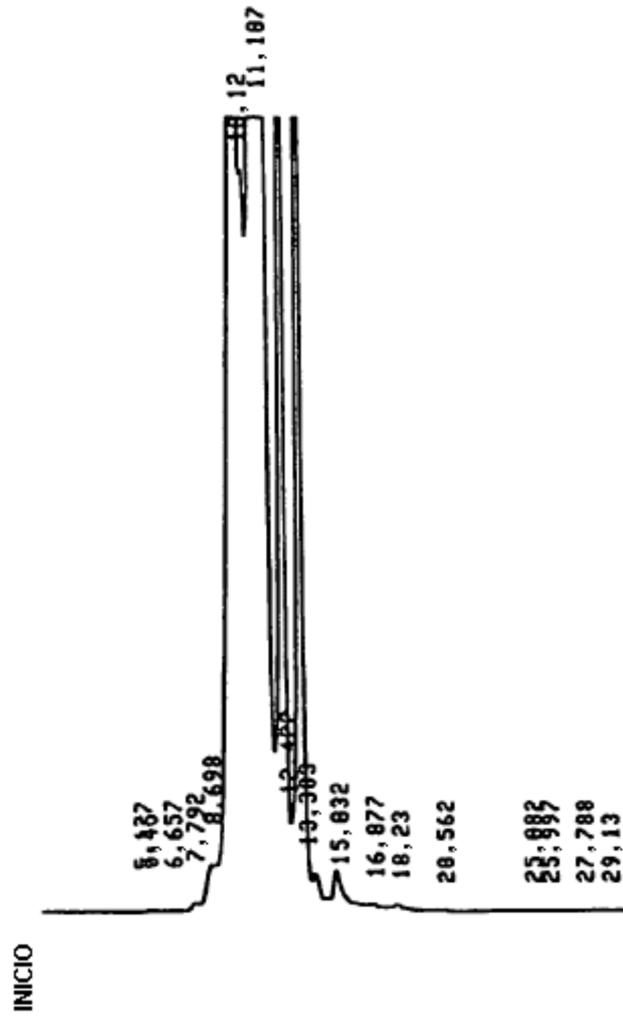


Figura 2

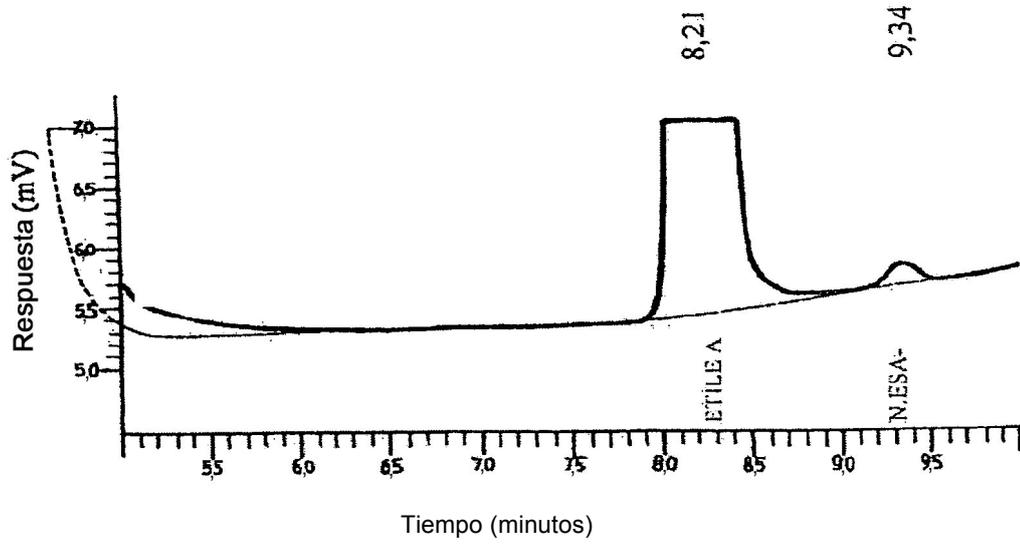


Figura 3

Número del Pico	Nombre del Componente	Tiempo [minutos]	Área [uV * seg.]	Altura [uV]	Área [%]	BL	Disolvente PPM
1	Acetato de etilo	8,213	567730	47554	31,5	BB	1002
2	N-esano	9,337	2101	184	0,1	BB	1000

Informe del componente que falta

Componente Retención Esperada (Fichero de Calibración)

Se encontraron todos los componentes.

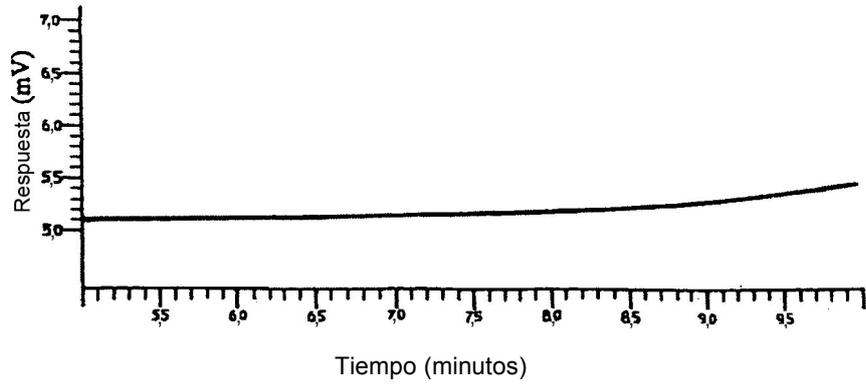


Figura 4