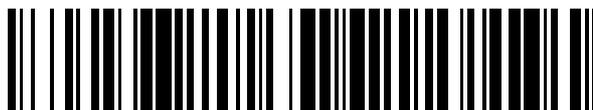


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 776**

51 Int. Cl.:

**C07C 51/367** (2006.01)

**C07C 59/42** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2014 PCT/IB2014/003086**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015 WO15063617**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2014 E 14843235 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 3063118**

54 Título: **Métodos de fabricación de derivados de ácido 15-hidroxi graso**

30 Prioridad:

**29.10.2013 US 201361896901 P**

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

**01.06.2018**

73 Titular/es:

**DIGNITY SCIENCES LIMITED (25.0%)  
Trintech Building 3rd Floor South County  
Business Park Leopardstown  
Dublin 18, IE;  
MANKU, MEHAR (25.0%);  
COUGHLAN, DAVID (25.0%) y  
DOWNES, BILL (25.0%)**

72 Inventor/es:

**MANKU, MEHAR;  
COUGHLAN, DAVID y  
DOWNES, BILL**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 670 776 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

Métodos de fabricación de derivados de ácido 15-hidroxi graso

5 **Sumario**

La presente divulgación proporciona un proceso de dos etapas para la producción de derivados de ácido 15-hidroxi graso, tales como ácido 15-(S)-hidroxieicosatrienoico (HETrE o 15-(S)-HETrE) o ácido 15(S)-hidroxieicosapentaenoico (HEPE o 15(S)-HEPE) a partir del ácido graso correspondiente (por ejemplo, ácido 10 dihomo- $\gamma$ -linolenico (DGLA) o ácido eicosapentaenoico (EPA), respectivamente). La primera etapa implica la oxidación enzimática del ácido graso a un intermediario de 15(S)-hidroperóxido de ácido graso (por ejemplo, usando una formulación de enzima líquida), seguida por la reducción del derivado de ácido 15(S)-hidroxi graso usando cisteína como agente reductor. La oxidación está a una atmósfera de oxígeno presurizado de al menos 200 kPa (2 bar). En algunas realizaciones, la etapa de oxidación enzimática incluye poner en contacto el ácido graso con 15 enzima depoxigenasa, obtenida opcionalmente a partir de harina de soja. La etapa de reducción del intermediario de ácido 15(S)-hidroperóxi graso comprende una reducción *in situ* con cisteína. En algunas realizaciones, al menos una parte del proceso se lleva a cabo en la exclusión (por ejemplo, exclusión parcial) de aire. En algunas realizaciones, el proceso comprende adicionalmente el aislamiento y/o la purificación del derivado de ácido 15(S)-hidroxi graso para formar un producto con grado de ingrediente farmacéutico activo (IFA) crudo. En algunas realizaciones, la 20 etapa de aislamiento y/o purificación comprende purificación por cromatografía y/o cristalización. En algunas realizaciones, el proceso se escala para producir cantidad de multikilogramo del IFA, ajustándose opcionalmente a cGMP.

En algunas realizaciones, el ácido graso es DGLA, el intermediario de ácido 15(S)-hidroperóxi graso es 15(S)-HPETrE y el derivado de ácido 15(S)-hidroxi graso es 15(S)-HETrE.

En otras realizaciones, el ácido graso es EPA, el intermediario de ácido 15(S)-hidroperóxi graso es 15(S)-HPEPE y el derivado de ácido 15(S)-hidroxi graso es 15(S)-HEPE.

30 Se muestran detalles adicionales de la invención en las reivindicaciones adjuntas.

**Breve descripción de los dibujos**

35 La Figura 1 muestra la disminución en absorbancia de solución de azul de metileno (680 nm) durante el tiempo como una función de aumento de la concentración de enzima lipoxigenasa de acuerdo con una realización de la presente divulgación.

La Figura 2 muestra la reducción de los costes de contribución de la enzima debido a las cargas de enzima reducidas y a la fuente de enzimas más económica de acuerdo con una realización de la presente divulgación.

40 La Figura 3 muestra la comparación del coste de material de enzima liofilizado comercial y extracto de harina de soja.

La Figura 4 ilustra el tiempo que lleva blanquear la solución de azul de metileno usando extracto de harina de soja (0,1 M de acetato sódico, pH 4,5) en comparación con enzima comercial (2,06 mg/ml, 0,2 M unidades/ml) de acuerdo con una realización de la presente divulgación.

45 La Figura 5 es una superposición del espectro de RMN  $^1\text{H}$  para 1891-029 (amarillo: después de 1 hora con  $\text{O}_2$ , morado: después de 2 horas a  $\text{O}_2$ , verde: después de 3 horas con  $\text{O}_2$ , + 0,5 eq adicionales de cisteína), rojo: agitado en condiciones atmosféricas durante el fin de semana, con 0,5 eq adicionales de cisteína, azul: crudo aislado HETrE)

La Figura 6 es una traza de HPLC y tabla de máximos para 1822-155-4D1.

La Figura 7 es una traza de HPLC y tabla de máximos para 1891-051-7A.

50 La Figura 8 es una superposición del espectro RMN  $^1\text{H}$  del lote 1822-155-4D1 (rojo, método original) y el lote 1891-051-7A (azul, método de acuerdo con la presente divulgación).

La Figura 9 muestra los datos de velocidad de calentamiento para la reacción de HETrE de acuerdo con una realización de la presente divulgación.

55 La Figura 10 es un gráfico de presión frente a temperatura para una reacción de HETrE de acuerdo con una realización de la presente divulgación.

La Figura 11 muestra los datos de velocidad de calentamiento para una reacción HPETrE de acuerdo con una realización de la presente divulgación.

La Figura 12 es un gráfico de presión frente a temperatura para una reacción de HPETrE de acuerdo con una realización de la presente divulgación.

60 La Figura 13 muestra un análisis LC-MS de material sobreoxidado 1822-063-3 producido en una realización de la presente divulgación.

La Figura 14 es una superposición del espectro de RMN  $^1\text{H}$  que compara muestra sobreoxidadas ((1822-163-3, azul, 1822193-3, rojo) en reacciones de acuerdo con una realización de la presente divulgación (1891-003-3, verde, 1891-029-4, morado y lote de ampliación 1891-05, amarillo) ejecutado durante largos períodos en presencia de  $\text{O}_2$ /aire.

65 La Figura 15 muestra los datos de pureza de UPLC para HETrE durante 4,5 días de reflujo en una mezcla de

MtBE:ciclohexano del 40 % (75 °C de temperatura externa).

La Figura 16 es un espectro representativo que muestra una superposición entre las señales de protón de DGLA y HETrE mediante RMN  $^1\text{H}$ .

La Figura 17 es un cromatograma UV anotado de fracciones frontales (1891-051-6D) a partir de la purificación de 15-(S)-HETrE según una realización de la presente divulgación.

La Figura 18 es un cromatograma UV anotado de 15-(S)-HETrE purificado (1891-051-7A) producido según una realización de la presente divulgación.

La Figura 19 es un cromatograma UV anotado de fracciones de cola (1891-051-6E) a partir de la purificación de 15(S)-HETrE según una realización de la presente divulgación.

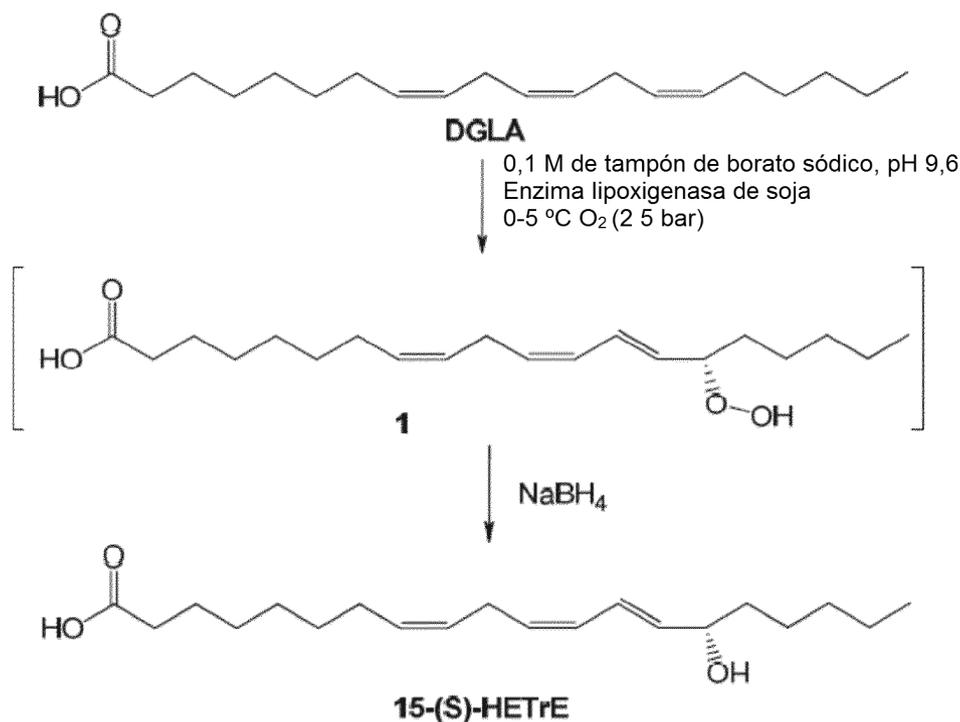
La Figura 20 muestra estructura químicas y otros datos característicos para DGLA e impurezas importantes.

La Figura 21 muestra datos de espectro de masas a partir del análisis de fragmentación de una impureza dimérica en HETrE72 purificado.

La Figura 22 propone una vía posible para la producción de fragmentos éster que se observa mediante MS.

## 15 Descripción detallada

En Journal of Medicinal Chemistry, 242, 1967,5329-5335 se desvela un proceso similar que usa borohidruro de sodio en lugar de cisteína como agente reductor. En European Journal of Lipid Science and Technology 100,1998,246-251 se usa cisteína para preparar derivados de ácido 13-hidroxi en lugar de 15-hidroxi-graso. La presente divulgación proporciona métodos de fabricación de 15-(S)-hidroxieicosatrienoico (15-(S)-HETrE) a partir de ácido dihomo- $\gamma$ -linolenico (DGLA). En una etapa, el DGLA se biooxida en la posición  $\omega_6$ , seguido por la reducción del hidroperóxido resultante usando un agente reductor (cisteína en lugar de  $\text{NaBH}_4$  que se menciona en el dibujo). Se muestra un proceso representativo en el Esquema 1. En algunas realizaciones, el 15(S)-HETrE se forma en una única etapa (por ejemplo, sin aislar o purificar el intermediario de 15(S)-HPETrE).



**Esquema 1**

Es necesario un proceso enzimático económico para el suministro de un kilogramo y cantidades superiores de GMP 15-(S)-HETrE y 15(S)-HEPE (por ejemplo, para su uso en programas de estudio clínico). En una realización, se llevó a cabo la producción de 100, 250 y 500 kg lotes de GMP 15(S)-HETrE. El resultado de este programa de trabajo fue la preparación de 15(S)-HETrE a partir de DGLA, a través de la biooxidación con enzima P1 de lipoxigenasa de soja para proporcionar 15(S)-HPETrE, seguido por la reducción con 1,1 equivalentes de borohidruro de sodio. Después de un trabajo de acidificación y extractivo, el 15-(S)-HETrE crudo aislado se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice proporcionando un rendimiento del 50 % con una pureza >95% mediante HPLC de porcentaje de área (235 nm).

Se mostró que la reacción de biooxidación también podría realizarse usando harina de soja como fuente más barata de la enzima; sin embargo, el procesado aguas abajo no fue conveniente.

En otra realización, se preparó un lote de 500+ g de demostración sin GMP 15(S)-HETrE (por ejemplo, para estudios toxicológicos). En esta realización, se prepararon 500+ g de 15(S)-HETrE (>95% de pureza mediante HPLC % de área, 235 nm). Los análisis LC-MS y MS-MS de las impurezas aisladas sugirieron que fueron compuestos di- y tri-oxigenados entre el ~5% de impurezas presentes en el producto final.

5 En algunas realizaciones, el método comprende oxidar DGLA con un oxidante para formar 15(S)-HPETrE. En algunas realizaciones, el oxidante es un oxidante enzimático, tal como lipoxigenasa. En algunas realizaciones, el oxidante es enzima de lipoxigenasa de soja (por ejemplo, enzima P1 de lipoxigenasa). En algunas realizaciones, la enzima de lipoxigenasa de soja se purifica. En otras realizaciones, la enzima de lipoxigenasa de soja se usa como  
10 componente de una mezcla, por ejemplo, harina de soja.

La etapa de oxidación puede producirse en un medio acuoso, y a un pH adecuado para permitir la actividad enzimática. Por ejemplo, cuando el oxidante es enzima de lipoxigenasa de soja, la etapa de oxidación puede producirse en un disolvente acuoso tamponado a un pH básico (por ejemplo, pH de 9 o 9,6). El oxidante y/o enzima  
15 puede estar presente en un exceso estequiométrico en comparación con la cantidad de DGLA. Por ejemplo, el oxidante y/o enzima puede estar presente en 1 equivalente, 1,1 equivalentes, 1,2 equivalentes, 1,3 equivalentes, 1,4 equivalentes, 1,5 equivalentes, 1,6 equivalentes, 1,7 equivalentes, 1,8 equivalentes, 1,9 equivalentes, 2 equivalentes, 2,1 equivalentes, 2,2 equivalentes, 2,3 equivalentes, 2,4 equivalentes, 2,5 equivalentes, 2,6 equivalentes, 2,7 equivalentes, 2,8 equivalentes, 2,9 equivalentes, 3 equivalentes, 3,1 equivalentes, 3,2  
20 equivalentes, 3,3 equivalentes, 3,4 equivalentes, 3,5 equivalentes, 3,6 equivalentes, 3,7 equivalentes, 3,8 equivalentes, 3,9 equivalentes, 4 equivalentes o mayor que 4 equivalentes.

La etapa de oxidación requiere la adición de una fuente de oxígeno. En dichas realizaciones, la etapa de oxidación puede producirse en presencia de una fuente de oxígeno, tal como oxígeno atmosférico o oxígeno gaseoso purificado (por ejemplo, al menos parcialmente purificado). La etapa de oxidación se produce con una atmósfera de oxígeno presurizado de al menos 200 kPa (2 bar), por ejemplo a 200 kPa (2 bar), 210 kPa (2,1 bar), 220 kPa (2,2 bar), 230 kPa (2,3 bar), 240 kPa (2,4 bar), 250 kPa (2,5 bar), 260 kPa (2,6 bar), 270 kPa (2,7 bar), 280 kPa (2,8 bar), 290 kPa (2,9 bar), 300 kPa (3 bar), 310 kPa (3,1 bar), 320 kPa (3,2 bar), 330 kPa (3,3 bar), 340 kPa (3,4 bar), 350 kPa (3,5), 360 kPa (3,6 bar), 370 kPa (3,7 bar), 380 kPa (3,8 bar), 390 kPa (3,9 bar), 400 kPa (4 bar), superior a 400  
25 kPa (4 bar).

La temperatura de la etapa de oxidación puede controlarse para evitar el exceso de generación de calor. En algunas realizaciones, por ejemplo, la etapa de oxidación puede producirse a 0-5 °C.

35 En algunas realizaciones, la etapa de oxidación comprende poner en contacto el DGLA con 2 equivalentes de enzima P1 de lipoxidasa de soja en presencia de tampón acuoso (por ejemplo, 0,1M de tampón de borato de sodio) a un pH de 9,6 con atmósfera de oxígeno a 250 kPa (2 bar) a 0-5 °C.

En otra realización, la etapa de oxidación comprende poner en contacto el DGLA con 2 equivalentes de enzima de lipoxidasa de soja como un extracto de harina de soja crudo en presencia de tampón acuoso (por ejemplo, 0,1M de tampón de borato de sodio) a un pH de 9,6 en una atmósfera de oxígeno presurizado a 0-5 °C.  
40

En algunas realizaciones, la etapa de reducción del intermediario de 15(S)-HPETrE para formar 15(S)-HETrE comprende poner en contacto el intermediario de 15(S)-HETrE con un agente reductor para formar el 15(S)-HETrE. El agente reductor es cisteína que reemplaza el borohidruro. Cisteína, como un agente reductor más suave, ofrece ventajas adicionales sobre los agentes reductores del tipo de borohidruro. Por ejemplo, la cisteína no forma gas de hidrógeno como un subproducto, permitiendo, de este modo, oportunidades de escalado más seguras. Asimismo, la cisteína es un reactivo estable y no requiere la manipulación especial o técnicas de almacenamiento que se requieren para los reactivos del tipo de borohidruro. Asimismo, la forma oxidada de cisteína (cistina) es un dipéptido estable que es solo parcialmente soluble en agua, lo que ofrece oportunidades de purificación convenientes sobre algunos otros agentes reductores.  
45  
50

En algunas realizaciones, la etapa de oxidación del DGLA y la etapa de reducción del intermediario de 15(S)-HPETrE para formar 15(S)-HETrE se produce en un vaso de reacción único sin la etapa de aislamiento o purificación del intermediario de 15(S)-HPETrE. En dichas realizaciones, el método comprende poner en contacto el DGLA con un oxidante y/o una enzima, como se describió anteriormente, en presencia de un agente reductor. El agente reductor puede estar presente en una cantidad de exceso estequiométrico, por ejemplo, 2 equivalentes en comparación con la cantidad de DGLA.  
55

60 En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto el DGLA con un oxidante y/o una enzima, como se describió anteriormente, en presencia de un agente reductor. El agente reductor puede estar inicialmente presente en una cantidad de exceso estequiométrico, por ejemplo, 2 equivalentes en comparación con la cantidad de DGLA. El método puede comprender adicionalmente la adición de una cantidad adicional del agente reductor, por ejemplo otro 1 equivalente, al vaso de reacción después de un período de tiempo. En algunas realizaciones, el agente reductor es cisteína.  
65

5 En algunas realizaciones, el método comprende oxidar EPA con un oxidante para formar 15(S)-HPEPE. En algunas realizaciones, el oxidante es un oxidante enzimático, tal como lipoxigenasa. En algunas realizaciones, el oxidante es enzima de lipoxigenasa de soja (por ejemplo, enzima P1 de lipoxigenasa). En algunas realizaciones, la enzima de lipoxigenasa de soja se purifica. En otras realizaciones, la enzima de lipoxigenasa de soja se usa como componente de una mezcla, por ejemplo, harina de soja.

10 En algunas realizaciones, la etapa de oxidación del EPA y la etapa de reducción del intermediario de 15(S)-HPEPE para formar 15(S)-HEPE se produce en un vaso de reacción único sin la etapa de aislamiento o purificación del intermediario de 15(S)-HPEPE. En dichas realizaciones, el método comprende poner en contacto el EPA con un oxidante y/o una enzima, como se describió anteriormente, en presencia de un agente reductor. El agente reductor puede estar presente en una cantidad de exceso estequiométrico, por ejemplo, 2 equivalentes en comparación con la cantidad de EPA. En algunas realizaciones, el agente reductor es cisteína.

15 En algunas realizaciones, la etapa de reducción del intermediario de 15(S)-HPEPE para formar 15(S)-HEPE comprende poner en contacto el intermediario de 15(S)-HPEPE con un agente reductor para formar el 15(S)-HEPE. El agente reductor es cisteína. Cisteína, como un agente reductor más suave, ofrece ventajas adicionales sobre los agentes reductores del tipo de borohidruro. Por ejemplo, la cisteína no forma gas de hidrógeno como un subproducto, permitiendo, de este modo, oportunidades de escalado más seguras. Asimismo, la cisteína es un reactivo estable y no requiere la manipulación especial o técnicas de almacenamiento que se requieren para los reactivos del tipo de borohidruro. Asimismo, la forma oxidada de cisteína (cistina) es un dipéptido estable que es solo parcialmente soluble en agua, lo que ofrece oportunidades de purificación convenientes sobre algunos otros agentes reductores.

25 En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto el EPA con un oxidante y/o una enzima, como se describió anteriormente, en presencia de un agente reductor. El agente reductor puede estar inicialmente presente en una cantidad de exceso estequiométrico, por ejemplo, 2 equivalentes en comparación con la cantidad de EPA. El método puede comprender adicionalmente la adición de una cantidad adicional del agente reductor, por ejemplo otro 1 equivalente, al vaso de reacción después de un período de tiempo. En algunas realizaciones, el 15(S)-HEPE se convierte a un éster (por ejemplo, éster de etilo) mediante tratamiento del 15(S)-HEPE con bromuro de alquilo (por ejemplo, bromuro de etilo) y carbonato potásico en acetona seca. El éster crudo formados en tales realizaciones puede purificarse de forma conveniente mediante tratamiento con carbón y gel de sílice para formar un 15(S)-HEPE de alta pureza.

35 En algunas realizaciones, el método proporciona composiciones que comprenden un derivado de ácido 15-hidroxi graso y una o más impurezas. En algunas realizaciones, la una o más impurezas consiste en, consiste esencialmente en o comprende un producto de sobreoxidación, un producto sobrereducido, un dímero y/o un isómero posicional del derivado de ácido 15(S)-hidroxi graso. En algunas realizaciones, el producto de sobreoxidación es un compuesto di-hidroxilado, teniendo el compuesto una o más enlaces doble C=C extra, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el producto sobrereducido es un compuesto que tiene una o más enlaces dobles C=C inferiores al derivado de ácido 15(S)-hidroxi graso. En algunas realizaciones, el dímero es un éster dímero formado entre un resto de ácido carboxílico de una primera molécula y un resto hidroxilado de una segunda molécula.

45 En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona composiciones que comprenden un derivado de ácido 15(S)-hidroxi graso. En algunas realizaciones, la composición comprende además una o más impurezas. En algunas tales realizaciones, el derivado de ácido 15(S)-hidroxi graso está presente en una cantidad de al menos el 90%, en peso de todos los ácidos grasos presentes en la composición, por ejemplo, al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos el 99%, en peso de todos los ácidos grasos presentes en la composición. En algunas realizaciones, el derivado de ácido 15(S)-hidroxi graso se encuentra en la forma de un éster, tal como un éster de etilo. En algunas realizaciones, la composición comprende además una impureza, en la que la impureza está presente en una cantidad no superior al 10%, en peso de todos los ácidos grasos presentes, por ejemplo no más del 10%, no más del 9%, no más del 8%, no más del 7%, no más del 6%, no más del 5%, no más del 4%, no más del 3%, no más del 2%, no más del 1%, de todos los ácidos grasos presentes en la composición.

55 En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona composiciones que comprenden 15(S)-HETrE. En algunas realizaciones, la composición comprende además una o más impurezas. En algunas tales realizaciones, el 15(S)-HETrE está presente en una cantidad de al menos el 90 %, en peso de todos los ácidos grasos presentes en la composición, por ejemplo, al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos el 98%, o al menos el 99%, en peso de todos los ácidos grasos presentes en la composición. En algunas realizaciones, el 15(S)-HETrE se encuentra en la forma de un éster, tal como un éster de etilo. En algunas realizaciones, la composición comprende además una impureza, en la que la impureza está presente en una cantidad no superior al 10%, en peso de todos los ácidos grasos presentes, por ejemplo no más del 10%, no más del 9%, no más del 8%, no más del 7%, no más del 6%, no más del 5%, no más del 4%, no más del 3%, no más del 2%, no más del 1%, de todos los ácidos grasos presentes en la composición.

En algunas realizaciones, a presente divulgación proporciona composiciones que comprenden 15(S)-HEPE. En algunas realizaciones, la composición comprende además una o más impurezas. En algunas tales realizaciones, el 15(S)-HEPE está presente en una cantidad de al menos el 90 %, en peso de todos los ácidos grasos presentes en la composición, por ejemplo, al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos el 98%, o al menos el 99%, en peso de todos los ácidos grasos presentes en la composición. En algunas realizaciones, el 15(S)-HEPE se encuentra en la forma de un éster, tal como un éster de etilo. En algunas realizaciones, la composición comprende además una impureza, en la que la impureza está presente en una cantidad no superior al 10%, en peso de todos los ácidos grasos presentes, por ejemplo no más del 10%, no más del 9%, no más del 8%, no más del 7%, no más del 6%, no más del 5%, no más del 4%, no más del 3%, no más del 2%, no más del 1%, de todos los ácidos grasos presentes en la composición.

## Ejemplos

### 15 Ejemplo 1: Ensayo colorimétrico para evaluar la actividad de la lipoxigenasa de homogenados vegetales crudos

El hidroperóxido linoleico, la 3-metil-2-benzotiazolina (MBTH), y ácido 3-(dimetilamino)benzoico (DMAB) son conocidos porque reaccionan en presencia de hemoglobina para proporcionar un tinte de indamina morado, que absorbe en 590 nm. La absorbancia en esta longitud de onda es lineal con la concentración de hidroperóxido linoleico hasta 35  $\mu\text{M}$ .

se extrajo 1 g de harina de soja en 10 ml de tampón o agua ajustado a un pH apropiado (1:10 p/v) durante un período de hasta 24 horas, a 4 °C o a temperatura ambiente. Las reacciones se llevaron a cabo en un tubo de ensayo con agitación magnética (~500 rpm). Para los puntos de tiempo de 1 y 2 horas, las soluciones de extracción se dejaron reposar durante ~10 minutos antes de que 10  $\mu\text{l}$  de la solución enzimática se retirara y añadiera a la solución de ensayo A (que contenía ácido linoleico y DMAB) (1 ml) en una cubeta de 4 ml. Después de la incubación durante ~ 5 minutos a temperatura ambiente, la solución de ensayo B (MBTH y hemoglobina) (1 ml) se añadió e incubó adicionalmente durante ~ 5 minutos antes de registrar la lectura de absorbancia (Tabla 1). Se observó la formación de color azul en todas las muestras, excepto el borato de sodio, muestras de extracto con pH 10,4 y en blanco (todos los reactivos, excepto la enzima). Se observó un ligero color gris en este caso con una absorbancia de ~0,2. Se ejecutó un ensayo en blanco con todos los reactivos y enzima excepto ácido linoleico, proporcionando una absorbancia de 0,2. Se determinó que la solución enzimática estaba interfiriendo con la lectura de absorbancia.

35 **Tabla 1. Lecturas de absorbancia a 590 nm para extractos de harina en condiciones diversas**

| Tampón, pH inicial       | pH de extracto final | Temperatura (°C) | Absorbancia (590 nm) en punto de tiempo (h.) |      |      |      |      |      |       |      |
|--------------------------|----------------------|------------------|--|------|------|------|------|------|-------|------|
|                          |                      |                  | 1 h.   |      | 2 h. |      | 5 h. |      | 24 h. |      |
| Sodio acetato, pH 10     | 6,8                  | 4                | 0,50   | 0,36 | 0,43 | 0,39 | 0,25 | 0,20 | 0,23  | 0,30 |
| Acetato sódico, pH 4,5   | 5,2                  | ambiente         | 0,43   | 0,31 | 0,48 | 0,44 | 0,26 | 0,18 | 0,31  | 0,27 |
| Borato de sodio, pH 10,4 | 10,1                 | 4                | 0,43   | 0,45 | 0,53 | 0,53 | 0,29 | 0,29 | 0,37  | 0,31 |
| Borato de sodio, pH 4,5  | 6,1                  | ambiente         | 0,52   | 0,46 | 0,54 | 0,51 | 0,25 | 0,26 | 0,40  | 0,35 |
| Agua, pH 7               | 6,8                  | 4                | 0,20   | 0,21 | 0,21 | 0,16 | 0,06 | 0,02 | 0,00  | 0,04 |
|                          |                      | ambiente         | 0,20   | 0,20 | 0,23 | 0,20 | 0,0  | 0,0  | 0,05  | 0,22 |
|                          |                      | 4                | 0,52   | 0,49 | 0,62 | 0,54 | 0,37 | 0,24 | 0,33  | 0,31 |
|                          |                      | ambiente         | 0,41   | 0,44 | 0,62 | 0,54 | 0,24 | 0,34 | 0,36  | 0,53 |
|                          |                      | 4                | 0,41   | 0,41 | 0,38 | 0,41 | 0,20 | 0,24 | 0,23  | 0,29 |
|                          |                      | ambiente         | 0,30   | 0,31 | 0,47 | 0,48 | 0,19 | 0,18 | 0,25  | 0,27 |

Los puntos de tiempo restantes (5 y 24 horas) se analizaron de forma distinta. Las soluciones de extracción se dejaron reposar durante ~10 minutos antes de que 10  $\mu\text{l}$  de la solución enzimática se retirara y añadiera a la solución de ensayo A (que contenía ácido linoleico y DMAB) (0,5 ml) en 2 ml de tubo de Eppendorf. Después de la incubación durante ~ 5 minutos a temperatura ambiente, la solución de ensayo B (MBTH y hemoglobina) (0,5 ml) se añadió e incubó adicionalmente durante ~ 5 minutos antes. Se añadió la solución de sulfato de laurilo de sodio (1% p/v) (0,5 ml) para interrumpir la reacción y las soluciones se centrifugaron a 9,8 rcf, 4 °C durante 5 minutos. La solución se decantó a continuación en una cubeta de 4 ml y se analizó como antes. Los resultados no muestran ninguna tendencia particular.

### 45 Ejemplo 2: Condiciones de ensayo colorimétrico alternativas

Para analizar la sensibilidad de ensayo, se esbleció una serie de diluciones que usaban la enzima liofilizada en el valor de carga original (0,42 Unidades (4,11 mg)/ml basándose en el certificado del proveedor de análisis) y diluyendo por la mitad hasta que no se observó más detección colorimétrica. Esto también se analizó con el método de decoloración azul de metilo (Suda y co., J. Agric. Food Chem. 43, 3, 1995, pág. 742, EP no. 2118126 A1) mediante el cual se analizó la disminución en absorbancia de una solución azul de metileno de 100  $\mu\text{M}$  a 680 nm,

durante el transcurso del tiempo cuando se incubó con solución enzimática en presencia de ácido linoleico. El ensayo de decoloración azul de metileno se llevó a cabo usando 2,1 ml de 0,2 M de tampón Tris-HCl, pH 9,0, 0,3 ml 100 µM de solución azul de metileno, 0,3 ml 10 mM de sustrato de lineoleato de sodio y 0,3 ml de extracto de harina de soja (volumen total 3 ml).

5 **Tabla 2.** Lecturas de absorbancia a 680 nm para la serie de dilución enzimática purificada (método de decoloración azul de metileno)

| Carga enzimática (Munidades/ml) | Absorbancia (680 nm) en punto de tiempo t (minutos) |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|---------------------------------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                                 | t=0   | t=1  | t=2  | t=3  | t=4  | t=5  | t=6  | t=7  | t=8  | t=9  | t=10 |
| 0,420                           | 0,34  | 0,00 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| 0,210                           | 0,27  | 0,03 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| 0,105                           | 0,33  | 0,03 | 0,01 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| 0,053                           | 0,31  | 0,25 | 0,08 | 0,00 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| 0,026                           | 0,28  | 0,23 | 0,19 | 0,10 | 0,08 | 0,05 | 0,00 |      |      |      |      |
| 0,013                           | 0,35  | 0,32 | 0,32 | 0,32 | 0,22 | 0,22 | 0,16 | 0,14 | 0,11 | 0,09 | 0,08 |
| Carga enzimática (Munidades/ml) |   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 0,007                           | 0,29  | 0,27 | 0,26 | 0,27 | 0,26 | 0,26 | 0,27 | 0,26 | 0,26 | 0,28 | 0,26 |

10 Para el ensayo DMAB-MBTH, se retiraron 10 µl de la solución enzimática y se añadieron a la solución de ensayo A (que contenía ácido linoleico y DMAB) (0,5 ml) en 2 ml de Eppendorf. Después de la incubación durante ~ 5 minutos a temperatura ambiente, la solución de ensayo B (MBTH y hemoglobina) (0,5 ml) se añadió e incubó adicionalmente durante ~ 5 minutos antes. Se añadió la solución de sulfato de laurilo de sodio (1% p/v) (0,5 ml) para interrumpir la reacción y las soluciones se centrifugaron a 16,1 rcf, 4 °C durante 10 minutos. La solución se decantó a continuación en una cubeta de 4 ml y se analizó como antes. Esto se realizó en duplicado.

15 **Tabla 3.** Lecturas de absorbancia para serie de dilución enzimática purificada a 590 nm (ensayo DMAB-MBTH)

| Carga enzimática (Munidades/ml) | Absorbancia (590 nm) |      |
|---------------------------------|----------------------|------|
|                                 | 1                    | 2    |
| 0,420                           | 0,17                 | 0,19 |
| 0,210                           | 0,21                 | 0,18 |
| 0,105                           | 0,23                 | 0,27 |
| 0,053                           | 0,22                 | 0,22 |
| 0,026                           | 0,26                 | 0,20 |
| 0,013                           | 0,06                 | 0,08 |
| 0,007                           | 0,00                 | 0,03 |

20 A partir de los resultados en la Tabla 3, pareció que las lecturas de absorbancia obtenidas usando este método, no se correspondían de modo similar con la concentración de la enzima en la solución. El método original se usó para en ensayo de lipoxigenasas vegetales crudas a un pH 6. Se informa que la hemoglobina muestra una actividad cuasi-lipoxigenasa a un pH óptimo de 8,5 y concentración de ácido linoleico de 0,5 mM. El ensayo se estuvo realizando a un pH 9, esto pudo tener alguna relación con los resultados obtenidos. Se notó, sin embargo, que no se observó formación de color en un ensayo en blanco que contenía todos los reactivos excepto la enzima. Sin embargo, sobre la base de los resultados obtenidos se decidió proceder con el método de decoloración azul de metileno. El método es simple y rápido, aunque no particularmente sensible y es difícil de cuantificar. Los niveles de actividad se determinan por el tiempo que tarda el color en desaparecer (es decir, absorbancia a 680 nm en alcanzar 0). Para distinguir entre cargas enzimáticas superiores, la serie de dilución con enzima purificada se repitió usando una concentración inferior de la solución enzimática. Se añadieron solo 30µl de solución enzimática a la solución de decoloración azul de metileno y el volumen se compensó a 3 ml con 270 µl de agua destilada. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

30 **Tabla 4.** Lecturas de absorbancia a 680 nm para la serie de dilución enzimática purificada usando una concentración enzimática inferior (método de decoloración azul de metileno)

| Carga enzimática (Munidades/ml) | Absorbancia en Tiempo t (minutos) |       |      |       |       |       |       |       |       |  |
|---------------------------------|-----------------------------------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
|                                 | t=0                               | t=0,5 | t=1  | t=1,5 | t=2,0 | t=2,5 | t=3,0 | t=3,5 | t=4,0 |  |
| 0,420                           | 0,35                              | 0,22  | 0,01 | -0,01 | -     | -     | -     | -     | -     |  |
| 0,210                           | 0,35                              | 0,35  | 0,27 | 0,16  | 0,08  | 0,03  | 0,01  | 0,00  | -     |  |
| 0,105                           | 0,31                              | 0,30  | 0,30 | 0,26  | 0,24  | 0,17  | 0,13  | 0,10  | 0,08  |  |
| 0,053                           | 0,32                              | -     | 0,31 | -     | 0,31  | -     | 0,25  | -     | 0,18  |  |
| 0,420                           | -                                 | -     | -    | -     | -     | -     | -     | -     | -     |  |
| 0,210                           | -                                 | -     | -    | -     | -     | -     | -     | -     | -     |  |
| 0,105                           | 0,06                              | 0,06  | 0,04 | 0,00  | -     | -     | -     | -     | -     |  |
| 0,053                           | -                                 | 0,16  | -    | 0,06  | -     | 0,05  | 0,02  | 0,00  | -0,01 |  |

Una representación gráfica de la serie de dilución se muestra en la Figura 1. Un tiempo de inducción, (0,5 - 2 min.) para que empiece la absorbancia a disminuir, se observa para las muestras con una concentración enzimática inferior.

- 5 Se determinó que la actividad de un extracto de harina de soja podría someterse a ensayo colorimétricamente usando este método frente a una solución de la enzima comercial, proporcionan una indicación de actividad suficiente para llevar a cabo la reacción de oxidación requerida.

10 **Ejemplo 3: Cisteína como agente reductor**

10 Se obtuvo un suministro alternativo de enzima liofilizada. Las pruebas iniciales mostraron que la carga enzimática podría reducirse hasta la mitad. En combinación con el agente reductor alternativo (cisteína), las cargas enzimáticas se redujeron desde las iniciales 13,7 Unidades por gramo de sustrato de DGLA (preparación enzimática líquida) a 1,8 Unidades por gramo (enzima liofilizada). Se realizó una reducción en costes, para la enzima lipoxigenasa, de 11,37 £ por gramo de DGLA a 0,75 £ por gramo de DGLA (~15 veces de reducción, Figura 2). Esto se debió a dos factores: la carga enzimática disminuida y el suministro más económico (0,42 £/Unidad para la enzima liofilizada frente a 0,83 £ /Unidad para la preparación enzimática líquida).

20 También se observó que la enzima liofilizada suministrada tenía buena estabilidad. Aunque se recomendaba que fuera almacenada a -20 °C y desecada tras su uso, el lote se almacenó a temperatura ambiente, condiciones atmosféricas durante dos semanas antes de ser utilizada en una reacción que utilizaba las cargas enzimáticas optimizadas (1,8 Unidades/ g de DGLA). No se observó un deterioro en el rendimiento. La reacción se llevó a cabo en una solución tampón para mantener el pH y solubilizar los componentes de reacción. Se usó cisteína, un agente reductor más suave, en lugar de borohidruro de sodio. El uso de cisteína permitió llevar a cabo en una etapa la reacción de oxidación/reducción. Además no se generó hidrógeno inflamable durante la reacción/interrupción. Además, se produjeron menos productos de sobreoxidación, probablemente debido a las propiedades antioxidantes de la cisteína. También se cree que la adición del agente reductor al inicio del proceso ayuda a disminuir la inactivación enzimática irreversible mediante elevadas concentraciones de hidróperóxido, llevando, de este modo, a una necesidad inferior de enzimas (por ejemplo, ahorro económico) y menor potencial para la sobreoxidación.

30 **Ejemplo 4: Carga enzimática**

35 Se llevaron a cabo reacciones de biooxidación previas usando una preparación enzimática líquida con una carga enzimática de -13,7 Unidades de actividad por gramo de sustrato de DGLA (1 unidad definida como la enzima que causa un aumento de 0,001 UA por minuto a 234 nm cuando se incuba con 0,02% de lineolato a 25 °C en 0,1 M de tampón de borato, pH 9,0, en un volumen total de 1,0 ml). También se sometió a ensayo un suministro alternativo de lipoxigenasa como polvo liofilizado. La reacción de biooxidación se repitió con la enzima liofilizada usando -13,7 Unidades de actividad por gramo de sustrato DGLA y se obtuvo un perfil de finalización de reacción mediante espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H. Esta reacción se repitió otras 3 veces, disminuyendo la carga enzimática a la mitad cada vez. Los resultados se resumen en la Tabla 5.

**Tabla 5. Resultados de estudio de carga enzimática inicial usando enzima pura liofilizada**

| Experimento n.º | Munidades de carga enzimática/g de sustrato de DGLA | Finalización de reacción determinada por RMN <sup>1</sup> H                        |
|-----------------|---|--|
| 1822-159        | ~13,7   | Finalizada   |
| 1822-161        | ~6,87   | Finalizada   |
| 1822-175        | ~3,4  | No concluyente debido a señales que se solapan. Resto de DGLA. Confirmada por TLC. |
| 1822-177        | ~5,2  | No concluyente debido a señales que se solapan. Resto de DGLA. Confirmada por TLC. |

45 Los resultados de estas pruebas muestran que la carga enzimática podría reducirse por al menos a la mitad con 1 finalización de reacción aún siendo obtenido dentro de 1 hora. Aunque los espectros RMN H obtenidos para las muestras de carga inferior fueron no concluyentes, aún era visible DGLA mediante RMN y su presencia se confirmó mediante TLC.

50 **Ejemplo 5: Fuente enzimática**

Las reacciones previas se realizaron usando una preparación líquida de lipoxigenasa, proporcionando la finalización de reacción a una carga de 13,7 Unidad por gramo de DGLA. Se obtuvo un suministro alternativo de enzima pura liofilizada usando una carga enzimática de solo 6,87 Unidades por gramo de DGLA.

55 **Ejemplo 6: Medio de reacción**

Se llevó a cabo un experimento usando agua pura en lugar de tampón. Se añadió DGLA al agua proporcionando dos

capas inmiscibles. El pH se ajustó a 9,8 con 2M de hidróxido sódico y se agitó para proporcionar una emulsión. Se añadió la enzima liofilizada (6,87 Unidades por gramo de DGLA) y la reacción se llevó a cabo como antes. Después de 1 hora la mezcla de reacción era aún una emulsión turbia, indicativo de una conversión incompleta. La espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H mostró un 45% de DGLA no reaccionado y algo de impureza sobreoxidada. Esto sugiere que se requiere el tampón para mantener el requisito de pH (~9) y ayudar a solubilizar el sustrato. Se cree que el 15-(S)-HPETrE también ayuda a solubilizar el sustrato de DGLA.

**Ejemplo 7: Agente reductor**

El hidroperóxido intermediario se redujo limpiamente de forma previa, en una secuencia de un solo recipiente, usando 1,1 equivalentes de borohidruro de sodio. Sin embargo, esto lleva a la producción de gas de hidrógeno, especialmente durante el tratamiento y requiere una gran cantidad de volumen de 10% de solución de ácido cítrico para el ajuste de pH. En el escalado, el borohidruro de sodio se ve desfavorecido debido al problema del hidrógeno, modo de carga y tiempo largo de interrupción proyectado (~17 h.) sobre la planta.

Se llevó a cabo experimentos en los que se usó cisteína como agente reductor en lugar de borohidruro de sodio. Se realizó una cantidad de reacciones usando diversas cargas enzimáticas. Las diversas permutaciones se detallan en la Tabla 6. Las reacciones se llevaron a cabo en un reactor parr, con presión de oxígeno (250 kPa (2,5 bar)).

Parece que se requieren inicialmente dos equivalentes de cisteína. La adición de 3 equivalentes hizo que la reacción se bloqueara o al menos el progresara muy lentamente, probablemente debido a la rápida retirada del hidroperóxido activador de enzimas. Sin embargo, si se usan dos equivalentes de cisteína inicialmente, se requiere que se añada un equivalente adicional de cisteína para reducir el resto de hidroperóxido después de una hora de tiempo de reacción. Esto probablemente debido a la oxidación de cisteína en la mezcla de reacción por oxígeno, en lugar del hidroperóxido. También se encontró que la reducción de la carga enzimática a tan baja como 1,8 Unidades de actividad por gramo de DGLA se podía conseguir con las mismas condiciones, proporcionando casi el consumo total de DGLA dentro de unas pocas horas y reducir la formación de impurezas (por ejemplo, productos sobreoxidados).

**Tabla 6. Resultados de reacciones usando agente reductor de cisteína y carga enzimática variada (enzima liofilizada)**

| Número de experimento | Punto de adición de sustrato | Punto de adición de enzima                      | Punto de adición de cisteína                                    | Resultados   |
|-----------------------|------------------------------|---|---|--|
| 1822-193              | Todos añadidos al inicio     | Todos añadidos al inicio (~ 14 Unidades/g DGLA) | Añadido después de 60 min. (2 eq.).                             | Después de 1 hora agitando con cisteína con O <sub>2</sub> , mezcla de HPETrE, HETrE e impurezas sobreoxidadas.  |
| 1822-195              | Todos añadidos al inicio     | Todos añadidos al inicio (~ 14 Unidades/g DGLA) | Todos añadidos al inicio (2 eq.)                                | Después de 30 min. con O <sub>2</sub> , mezcla de HPETrE y HETrE mediante RMN <sup>1</sup> H. Una agitación adicional a temperatura atmosférica no mostró una conversión adicional. Después de dejar reposar durante la noche (4 °C), RMN mostró un pequeño cambio adicional.  |
| 1822-197              | Todos añadidos al inicio     | Todos añadidos al inicio (~ 14 Unidades/g DGLA) | Todos añadidos al inicio (3 eq.)                                | Después de 30 min. con O <sub>2</sub> más 15 min de reposo, la mezcla de HETrE y DGLA, sin HPETrE mediante RMN <sup>1</sup> H. Después de dejar reposar durante la noche (4 °C) a temperatura atmosférica, se observó una conversión adicional de DGLA   |
| 1822-199              | Todos añadidos al inicio     | Todos añadidos al inicio (~ 7 Unidades/g DGLA)  | 2 eq. añadidos al inicio más 1 eq. adicional después de 60 min. | Después de 60 min. con O <sub>2</sub> , mezcla de HETrE y una pequeña cantidad de HPETrE mediante RMN <sup>1</sup> H. Se añadió 1 equivalente adicional de cisteína y se agitó durante 60 min a temperatura atmosférica. Sin HPETrE, algún resto de DGLA mediante RMN <sup>1</sup> H. Pureza HPLC de % de área (235 nm) 96,8%. 77 % de HETrE crudo recuperado y purificado mediante cromatografía en columna para proporcionar un 45% de rendimiento de aceite claro, de color amarillo pálido (96,7% de área mediante PHLC). La recuperación total a partir de la columna incluyendo fracciones crudas 71%. |

| Número de experimento | Punto de adición de sustrato | Punto de adición de enzima                        | Punto de adición de cisteína                                    | Resultados   |
|-----------------------|------------------------------|---|---|--|
| 1891-001              | Todos añadidos al inicio     | Todos añadidos al inicio (~ 3,5 Unidades/g DGLA)  | 2 eq. añadidos al inicio más 1 eq. adicional después de 60 min. | Después de 60 min. con O <sub>2</sub> , mezcla de HETrE y una pequeña cantidad de HPETrE y DGLA mediante RMN 1H. Se añadió 1 equivalente adicional de cisteína y se agitó durante 60 min. a temperatura atmosférica. Sin HPETrE, algún resto de DGLA mediante RMN 1H. Se filtró a través de Celite para retirar la cistina precipitada y se ajustó el pH a 3 con ácido cítrico sólido. Se almacenó a 4 °C duante la noche. Se extrajo con MTBE para producir un 76% de HETrE crudo. Pureza HPLC de % de área (252 nm) 93,55%.  |
| 1891-003              | Todos añadidos al inicio     | Todos añadidos al inicio (~ 1,8 Unidades/g DGLA)  | 2 eq. añadidos al inicio más 1 eq. adicional después de 60 min. | Después de 60 min. con O <sub>2</sub> , mezcla de HETrE y una pequeña cantidad de HPETrE y DGLA ~ 10 % en peso) mediante RMN 1H. Se añadió 1 equivalente adicional de cisteína y se agitó durante 60 min. a O <sub>2</sub> presión atmosférica. Sin HPETrE, DGLA residual (~ 6.5 % en peso) mediante RMN 1H. Después de permanecer a temperatura ambientes, se filtró a través de Celite para retirar la cistina precipitada y se ajustó el pH a 3 con ácido cítrico sólido. Se extrajo con MTBE para producir un 70% de HETrE crudo. Sin HPETrE, DGLA residual (~ 1 % en peso) mediante RMN 1H. Pureza HPLC de % de área (252 nm) 93,19%. |
| 1891-005              | Todos añadidos al inicio     | Todos añadidos al inicio (~ 0,96 Unidades/g DGLA) | 2 eq. añadidos al inicio más 1 eq. adicional después de 60 min. | Después de 60 min. con O <sub>2</sub> , mezcla de HETrE y una pequeña cantidad de HPETrE y DGLA significativa (41 % en peso) mediante RMN 1H. Se añadió 1 equivalente adicional de cisteína y se agitó durante 60 min. a O <sub>2</sub> presión atmosférica. Sin HPETrE, DGLA residual ( 14% en peso) mediante RMN 1H. Se agitó durante la noche a O <sub>2</sub> de presión. Una pequeña cantidad de HPETrE, DGLA residual (3,5% en peso) mediante RMN 1H. Se añadió un 0,25 eq. adicional de cisteína y se agitó con O <sub>2</sub> de presión durante 1 hora. Sin HPETrE, DGLA residual (3,5% en peso) mediante RMN 1H.                 |
| 1891-011              | Todos añadidos al inicio     | Todos añadidos al inicio (~ 1,8 Unidades/g DGLA)  | 2 eq. añadidos al inicio más 1 eq. adicional después de 60 min. | Después de 60 min con aire comprimido, principalmente DGLA mediante RMN 1H. La reacción se continuó durante la noche con aire comprimido. HETrE de RMN 1H, HPETrE, DGLA significativa e impurezas.   |
| 1891-015              | Todos añadidos al inicio     | Todos añadidos al inicio (~ 1,8 Unidades/g DGLA)  | 2 eq. añadidos después de 7 horas                               | Después de 60 min con aire comprimido, principalmente DGLA mediante RMN 1H. La reacción se continuó durante 6 horas con aire comprimido. El RMN 1H mostró ~ 45% de HPETrE, 55% de DGLA. Se añadieron 2 eq. de cisteína y se reajustó el pH, a continuación se agitó durante la noche. El RMN 1H mostró ~ 45% de HETrE, 55% de DGLA. No más conversión.   |

**Ejemplo 8: Reacción de fermentador de alimentación de lote doble**

- 5 Una reacción de volumen final de 1 l se llevó a cabo en un fermentador de 3l, en el que el sustrato (40 g) y la enzima (1,8 Unidades/ g de DGLA) se añadieron a una velocidad constante (1,6 ml/min. y 2 ml/min.) respectivamente a un pH 9,5 0,1M de tampón borato de sodio (850 ml). Se borboteó oxígeno a través de la solución de tampón, que se agitó a 500 rpm. La enzima se añadió como una solución en pH 4,5 0,1M de solución de acetato sódico (150 ml) y el pH de la reacción se mantuvo a ~9,5 mediante la adición de 3M de NaOH (ac.). Después de la adición de DGLA, se produjo un espumado significativo y se expulsó algo de material del vaso (~10%). Se añadió polipropilenglicol 2000
- 10 (20 ml 1:1 v/v con tampón de borato) como un agente antiespumante, pero tuvo poco efecto. Otros 20 ml no redujeron significativamente el espumado. La reducción del flujo de oxígeno a la configuración más baja posible redujo la espuma. Un alícuota se analizó mediante RMN <sup>1</sup>H después de 1,5 horas, que mostró DGLA residual (6,25% en peso). La reacción se continuó durante otras 5 horas. La suspensión se filtró a continuación a través de Celite para retirar cistina y el filtrado claro se acidificó a pH 3 con ácido cítrico sólido. La suspensión resultante se
- 15 almacenó a 4 °C durante el fin de semana. El producto precipitado y restos de cistina adicionales se sedimentaron a partir de la solución acuosa. Estos se recogieron mediante filtración proporcionando una crema blanca. El TLC mostró la ausencia de producto en el filtrado acuoso. La «crema» recogida se suspendió en MTBE y se filtró para

dejar un sólido blanco granular. El filtrado se concentró sobre el evaporador giratorio para dejar 44 g de aceite amarillo. El análisis RMN <sup>1</sup>H no mostró HPETrE y menos del 1 % en peso de DGLA residual. Sin embargo, el producto también contenía PPG2000. El aceite se suspendió en 20% de MTBE: hecano (100 ml) y se aplicó a un lecho corto de sílice (400 g). El lecho corto se eluyó con hexano (1,2 l), 20% de MTBE: hexano (2 l) y 40% de MTBE: hexano (4l). El producto que contenía fracciones se identificó mediante TLC. El producto inicial que contenía fracciones contenía una traza débil de DGLA mediante TLC; estas se combinaron y concentraron de forma separada para proporcionar 13 g de producto como un aceite claro, de color amarillo pálido. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) -0.5% de DGLA, HETrE. El producto restante que contenía fracciones se combinó para proporcionar 14 g de producto. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) - HETrE. Pureza HPLC de % de área (252 nm) - 96,92%. La recuperación total del producto después de la cromatografía en columna fue del 62%. Sin embargo, se produjeron pérdidas significantes debido al problema de espumado en el reactor. Esto ha demostrado que la reacción no requiere llevarse a cabo con presión si se transfiere suficiente oxígeno en la mezcla a través de agitación y un tiempo de reacción extendido no conllevó a un aumento en productos laterales. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que esto se debe a una cantidad de razones - carga enzimática inferior, disponibilidad de oxígeno inferior y cantidad reducida de hidróxido inestable en la mezcla de reacción. Sin embargo, la reacción con una ligera presión de oxígeno ayudaría a controlar el problema del espumado de reacción.

**Ejemplo 9: Harina de soja como fuente enzimática**

Se desarrollaron condiciones para la extracción de suficiente actividad de lipoxigenasa de 10 g de harina de soja para convertir limpiamente 3 g de DGLA a HETrE 1:10 p/v 0,1 M de tampón de acetato sódico, pH 4,5, 3 horas, 180 rpm).

La comparación en costes basándose en los precios actuales de enzima liofilizada y harina de soja muestra un ahorro de 7 veces en los costes de material (Figura 3), sin embargo, la operación de unidad extra (extracción, filtración) se requiere a escala de planta de modo que el ahorro potencial a bajos volúmenes es insignificante.

Las reacciones de biooxidación usando harina de soja como la fuente enzimática, que se llevó a cabo con presión de oxígeno proporcionó conversiones razonables de DGLA a HPETrE (~95%). Las reacciones podrían realizarse añadiendo harin de soja directamente; sin embargo, esto produjo una mezcla de reacción viscosa. La acidificación de la mezcla de reacción causa la precipitación de proteínas, que cuando se extrajeron produjeron emulsiones espesas que fueron complicadas de filtrar. Se encontró que la separación limpia de capas podría lograrse con centrifugación, aunque esto no sería factible a gran escala, debido a los volúmenes implicados. También sería un problema la limpieza del reactor, ya que los restos de harina eran bastante complicados de retirar.

La enzima activa se extrajo, en cambio, a partir de la harina en una solución de tampón a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, la solución turbia resultante se usó para realizar la biooxidación. Esto retira los carbohidratos insolubles de la mezcla de reacción, pero se forman emulsiones durante el procedimiento de tratamiento debido a la presencia de cantidades significantes de proteínas.

Se intentó el aislamiento de enzima semi-purificada de harina de soja, aunque se encontró que era inactivo.

La determinación sistemática de las condiciones óptimas para la extracción de actividad enzimática a partir de harina de soja desengrasada (medio de tampón, pH, tiempo, temperatura).

Se consideró una investigación en la extracción de enzima a partir de harina de soja a pH y tampón de extracción (1:10 p/v carga de harina de soja) (Tabla 7) y se llevó a cabo en paralelo con las investigaciones de ensayo colorimétricas.

Tabla 7. Condiciones de extracción de lipoxigenasa iniciales (tampón, pH, temperatura=

| Tampón, pH inicial       | pH de extracto final | Temperatura (°C) |
|--------------------------|----------------------|------------------|
| Acetato sódico, pH 10    | 6,8                  | 4                |
|                          |                      | ambiente         |
| Acetato sódico, pH 4,5   | 5,2                  | 4                |
|                          |                      | ambiente         |
| Borato de sodio, pH 10,4 | 10,1                 | 4                |
|                          |                      | ambiente         |
| Borato de sodio, pH 4,5  | 6,1                  | 4                |
|                          |                      | ambiente         |
| Agua, pH 7               | 6,8                  | 4                |
|                          |                      | ambiente         |

El pH de estas soluciones de extracto se analizó y se encontró que el tampón de borato de sodio a pH 4,5 tenía un pH de 6,1 con harina de soja añadida. Tampón de acetato sódico, pH 10 tenía un pH de 6,8 con harina de soja añadida y el pH de un extracto de agua pura fue también de 6,8. Esto se corresponde con el intervalo de tampón de

pH de los tampones de borato (8-10) y acetato (3,6-5,6). Tampón de acetato sódico, pH 4,5 se cambió a pH 5,2 con harina de soja añadida.

Las proteínas pueden dañarse por la fricción como la causada por los agitadores magnéticos. El siguiente conjunto de extracción se llevó a cabo en tubos de centrifugado de 50 ml en agitadores orbitales con temperatura controlada. Se configuró una cantidad de reacciones a diversos pH y temperaturas y se analizó en 3 puntos de tiempo; 1, 2 y 14 horas y 3 temperaturas 5, 25 y 40 °C. Los resultados de ensayo (determinados por decoloración azul de metileno en las condiciones menos discriminatorias (300 µl de solución enzimática)) se muestran en la Tabla 8.

10 **Tabla 8.** Lecturas de absorbancia a 680 nm para extractos de harina de soja después de 1 hora

| Tampón, pH inicial                   | Temperatura (°C) | Absorbancia (680 nm) en punto de tiempo t (minutos) |       |      |     |     |     |     |
|--------------------------------------|------------------|---|-------|------|-----|-----|-----|-----|
|                                      |                  | t=0   | t=1   | t=2  | t=3 | t=4 | t=5 | t=6 |
| Acetato sódico, pH 4,5               | 5                | 0,32  | 0,06  | -    | -   | -   | -   | -   |
|                                      | 25               | 0,28  | 0,01  | -    | -   | -   | -   | -   |
|                                      | 40               | 0,30  | 0,02  | -    | -   | -   | -   | -   |
| Borato de sodio, pH 9,0              | 5                | 0,26  | -0,01 | -    | -   | -   | -   | -   |
|                                      | 25               | 0,27  | 0,01  | 0,00 | -   | -   | -   | -   |
|                                      | 40               | 0,28  | 0,04  | 0,01 | -   | -   | -   | -   |
| Fosfato de potasio monobásico pH 6,5 | 5                | 0,34  | 0,06  | -    | -   | -   | -   | -   |
|                                      | 25               | 0,27  | -0,01 | -    | -   | -   | -   | -   |
|                                      | 40               | 0,25  | -0,03 | -    | -   | -   | -   | -   |

**Tabla 9.** Lecturas de absorbancia a 680 nm para extractos de harina de soja después de 2 horas

| Tampón, pH inicial                   | Temperatura (°C) | Absorbancia (680 nm) en punto de tiempo t (minutos) |       |      |      |      |      |      |
|--------------------------------------|------------------|---|-------|------|------|------|------|------|
|                                      |                  | t=0   | t=1   | t=2  | t=3  | t=4  | t=5  | t=6  |
| Acetato sódico, pH 4,5               | 5                | 0,23  | 0,01  | -    | -    | -    | -    | -    |
|                                      | 25               | 0,26  | 0,02  | -    | -    | -    | -    | -    |
|                                      | 40               | 0,21  | -0,02 | -    | -    | -    | -    | -    |
| Borato de sodio, pH 9,0              | 5                | 0,26  | 0,02  | -    | -    | -    | -    | -    |
|                                      | 25               | 0,27  | 0,07  | 0,02 | -    | -    | -    | -    |
|                                      | 40               | 0,23  | 0,19  | 0,10 | 0,06 | 0,04 | 0,03 | 0,02 |
| Fosfato de potasio monobásico pH 6,5 | 5                | 0,34  | -0,01 | -    | -    | -    | -    | -    |
|                                      | 25               | 0,32  | 0,08  | -    | -    | -    | -    | -    |
|                                      | 40               | 0,27  | 0,03  | -    | -    | -    | -    | -    |

**Tabla 10.** Lecturas de absorbancia a 680 nm para extractos de harina de soja después de 14 horas

| Tampón, pH inicial                   | Temperatura (°C) | Absorbancia (680 nm) en punto de tiempo t (minutos) |       |      |      |      |      |     |
|--------------------------------------|------------------|---|-------|------|------|------|------|-----|
|                                      |                  | t=0   | t=1   | t=2  | t=3  | t=4  | t=5  | t=6 |
| Acetato sódico, pH 4,5               | 5                | 0,34  | 0,06  | -    | -    | -    | -    | -   |
|                                      | 25               | 0,33  | 0,04  | -    | -    | -    | -    | -   |
|                                      | 40               | 0,30  | -0,01 | -    | -    | -    | -    | -   |
| Borato de sodio, pH 9,0              | 5                | 0,30  | 0,01  | 0,01 | -    | -    | -    | -   |
|                                      | 25               | 0,33  | 0,22  | 0,11 | 0,06 | 0,03 | -    | -   |
|                                      | 40               | 0,32  | 0,28  | 0,28 | 0,28 | 0,28 | 0,27 | -   |
| Fosfato de potasio monobásico pH 6,5 | 5                | 0,30  | 0,00  | -    | -    | -    | -    | -   |
|                                      | 25               | 0,28  | 0,00  | -    | -    | -    | -    | -   |
|                                      | 40               | 0,27  | -0,02 | -    | -    | -    | -    | -   |

15 Mediante la comparación de estos resultados con los resultados de la serie de dilución de enzima purificada (Tabla 2) se determinó que  $\geq 0,105$  Unidades de actividad enzimática/ml se extrajo a partir de la harina de soja sobre el intervalo de pH estudiado. Esto es  $\frac{1}{4}$  de la actividad enzimática (0,41 Unidades/ml de mezcla de reacción) utilizada en la síntesis de 500 g de lote tox. Parecería que a un pH 9,0, la extracción a 25 y 40 °C reduce la actividad enzimática, volviéndose evidente después de 2 horas de tiempo de extracción. En los valores de pH inferiores de 4,5  
20 y 6,5, la extracción a elevadas temperaturas no tiene un efecto determinable en estas condiciones.

Las muestras de extracción de 14 horas se agitaron durante un fin de semana con las condiciones apropiadas y se analizaron, como antes (Tabla 11).

25

**Tabla 11.** Lecturas de absorbancia a 680 nm para extractos de harina de soja durante fin de semana

| Tampón, pH inicial                   | Temperatura (°C) | Absorbancia (680 nm) en punto de tiempo t (minutos) |       |      |      |      |      |     |
|--------------------------------------|------------------|---|-------|------|------|------|------|-----|
|                                      |                  | t=0   | t=1   | t=2  | t=3  | t=4  | t=5  | t=6 |
| Acetato sódico, pH 4,5               | 5                | 0,36  | 0,00  | -    | -    | -    | -    | -   |
|                                      | 25               | 0,37  | -0,02 | -    | -    | -    | -    | -   |
|                                      | 40               | 0,37  | -0,01 | -    | -    | -    | -    | -   |
| Borato de sodio, pH 9,0              | 5                | 0,36  | 0,21  | 0,10 | 0,04 | 0,01 | 0,00 | -   |
|                                      | 25               | 0,37  | 0,34  | 0,33 | 0,34 | 0,34 | -    | -   |
|                                      | 40               | 0,37  | 0,33  | 0,34 | 0,34 | 0,34 | 0,36 | -   |
| Fosfato de potasio monobásico pH 6,5 | 5                | 0,39  | 0,00  | -    | -    | -    | -    | -   |
|                                      | 25               | 0,37  | -0,01 | -    | -    | -    | -    | -   |
|                                      | 40               | 0,41  | 0,02  | -    | -    | -    | -    | -   |

5 La única noticia evidente fue una reducción en la actividad del extracto de borato de pH 9,0 a 5 °C. También se observó que un extracto filtrado (pH 4,5) se dejó erguido a temperatura ambiente durante el fin de semana no mostró una caída significativa en la actividad según se determinó mediante el método de decoloración azul de metileno.

10 Se realizaron extracciones adicionales a pH 4,5 y 6,5 (carga de 1: 5 p/v harina de soja) y a temperatura de 30 °C (Tabla 12). Las soluciones de extracto se analizaron usando las condiciones más sensibles (30 µl de solución enzimática) (cf. Tabla 4).

Se observó que el sobrenadante de la solución de extracción de pH 4,5 fue menos turbio que los obtenidos en tanto pH 6,5 como 9,0.

**Tabla 12.** Lecturas de absorbancia a 680 nm durante 1 y 2 horas de extracciones de harina de soja (1:5 p/v) (30 °C)

| Tampón, pH inicial                   | Temperatura (°C) | Absorbancia (680 nm) en punto de tiempo t (minutos) |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|--------------------------------------|------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                                      |                  | t=0   | t=0,5 | t=1,0 | t=1,5 | t=2,0 | t=2,5 | t=3,0 | t=3,5 | t=4,0 | t=4,5 | t=5,0 | t=5,5 |
| Acetato sódico, pH 4,5               | 30 (1 h.)        | 0,35  | 0,35  | 0,29  | 0,13  | 0,08  | 0,00  | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
|                                      |                  | 0,37  | 0,35  | 0,30  | 0,13  | 0,02  | 0,03  | 0,01  | 0,00  | -     | -     | -     | -     |
|                                      | 30 (2 h.)        | 0,31  | 0,31  | 0,25  | 0,09  | 0,03  | 0,01  | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
|                                      |                  | 0,31  | 0,30  | 0,23  | 0,11  | 0,03  | 0,02  | 0,00  | -     | -     | -     | -     | -     |
| Fosfato de potasio monobásico pH 6,5 | 30 (1 h.)        | 0,35  | 0,33  | 0,20  | 0,04  | 0,00  | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
|                                      |                  | 0,30  | 0,30  | 0,17  | 0,06  | 0,01  | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
|                                      | 30 (2 h.)        | 0,32  | 0,30  | 0,22  | 0,10  | 0,01  | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
|                                      |                  | 0,31  | 0,30  | 0,22  | 0,11  | 0,01  | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |

- Las soluciones de extracto (1:10 p/v) que se dejaron durante el fin de semana a 25 °C se filtraron después de reposar durante 1 día. La muestra a pH 4,5 tenía un sobrenadante amarillo claro, que se decantó y filtró a través de un lecho corto de Celite. La harina residual también se filtró para proporcionar una torta sólida. Se recuperó 20 ml de extracto a partir de un volumen de tampón inicial de 33 ml. Las muestras a pH 6,5 y 9,0, que tenían sobrenadantes turbios, se trataron como antes. Cuando se decanta el extracto de pH 6,5, el sobrenadante se mezcla con los restos de harina. La suspensión se filtró para proporcionar 14 ml de filtrado amarillo ligeramente turbio. El extracto de pH 9,0 proporcionó 20 ml de un filtrado turbio de color naranja. El extracto de pH 4,5 a 30 °C (1:5 p/v) también se filtró para proporcionar solo 4 ml de filtrado a partir de un volumen de tampón inicial de 13,5 ml.
- 10 La extracción a pH 4,5 y 6,5 proporcionó actividades enzimáticas de entre 0,21 a 0,42 M unidades/ml, basándose en el tiempo que tarda en decolorar la solución azul de metileno. Sin embargo, a un pH 4,5 puede obtenerse un extracto más claro. A un pH 9,0, las actividades de extracto parecen disminuir durante el tiempo y de nuevo los extractos que se obtienen son turbios. A una carga de harina de 1:5 p/v, solo puede recuperarse una pequeña cantidad de extracto y el aumento en actividad sobre los extractos de 1:10 p/v no es significativo. Por lo tanto, una carga de 1:10 p/v de
- 15 harina de soja en pH 4,5 0,1M de tampón de acetato sódico puede extraerse a temperatura ambiente para proporcionar actividades útiles.

#### Ejemplo 10: Extracto de harina de soja como fuente enzimática

- 20 10 g de harina de soja 7B se extrajo con 100 ml 0,1M de tampón de acetato sódico, pH 4,5 durante 3 horas a 32 °C, 180 rpm antes de filtrar a través de Celite para proporcionar 85 ml de un filtrado claro y amarillo (pH 5,2). Una parte de 30 µl se analizó mediante ensayo de decoloración azul de metileno y la actividad fue comparable con 2 mg/ml (0,2 M unidades/ml) de enzima purificada, liofilizada (Figura 4).
- 25 Una carga enzimática comercial de -0,055 M unidades/ml de solución de reacción (1,8 M unidades/g de DGLA) fue suficiente para la finalización de la reacción. 2 equivalentes de cisteína se cargaron a un reactor Parr junto con 35 ml de 0,1 M de tampón de borato de sodio y se enfrió a 0-5 °C en un baño de hielo. El pH se ajustó con 2M de solución de hidróxido sódico, seguido por la adición de DGLA y un ajuste adicional del pH a 9,6. El extracto de harina de soja (53 ml) se añadió proporcionando un
- 30 volumen de 100 ml y un pH de 9,3. La carga de actividad enzimática 0,11 M unidades/ml de solución de reacción. La reacción se llevó a cabo durante 1 hora con presión de O<sub>2</sub> (250 kPa (35psi, 2,5bar)). La espectroscopia RMN <sup>1</sup>H mostró poco DGLA residual y una mezcla de HPETrE y HETrE (Figura 5). La adición de 1 equivalente adicional de cisteína, en 2 porciones, permitió la reducción de HPETrE restante tal como se determinó mediante espectroscopia RMN <sup>1</sup>H. La solución de reacción se almacenó durante el fin de semana a 4 °C. La reacción se trató como antes
- 35 (Figura 5).

#### Ejemplo 11: Aislamiento y purificación de 15(S)-HETrE

- 40 El uso de agente reductor de cisteína permitió la reducción de la carga de actividad enzimática para la reacción mediante un factor de 7,6 (13,7 M unidades a 1,8 M unidades / g de DGLA), sin embargo, proporcionando un perfil de impureza aceptable. La finalización de reacción podría obtenerse dentro de unas pocas horas. En lugar de acidificar con 10% de solución de ácido cítrico, la reacción se acidificó con ácido cítrico sólido, reduciendo, de este modo, el volumen total mediante un ~30%. El producto HETrE precipitado de la mezcla de reacción, junto con restos de cisteína, que podría recogerse mediante filtración. La suspensión del precipitado recogido con MtBE y filtración,
- 45 seguido por la retirada del disolvente, permitió el aislamiento de >100% de peso de HETrE crudo. Por el contrario, el tratamiento previo implicó la extracción con una mezcla hexano/MtBE 50/50 comparativamente cara (x3) para reducir la formación de emulsión. También se recogió una capa de paño que requería la filtración a través de celite para romper la emulsión y lavarse con MtBE para recuperar producto. Se recuperó HETrE crudo (430 g) a partir de ~72 l de disolvente. Sin embargo, mediante este método, 320 g de GETrE crudo se recuperó a partir de solo 9l de
- 50 MtBE.

- La purificación mediante cromatografía en columna (~55 g de salida) usando una relación de HETrE:gel de sílice crudo de 1:10 p/p y eluyendo con (1) 4l de 10% de MTBE:Ciclohexano, (2) 3l de 20% de MTBE:Ciclohexano y (3) 4l de 50% de MTBE:Ciclohexano (volumen de eluyente total: 11l) demostró ser adecuado. Anteriormente, se usó una
- 55 columna de Biotage KP Sil para purificar ~45 g de 15(S)-HETrE usando una relación de HETrE:gel de sílice crudo de 1:10 p/p se eluyó con (1) 2l de Hexano, (2) 2l de 10% de MTBE:Hexano, (3) 2l de 20% de MTBE:Hexano, (4) 2l de 30% de MTBE:Hexano, (5) 4l de 40% de MTBE:Hexano, (6) 50% de MTBE:Hexano y (7) 4l de MTBE (volumen de eluyente total: 19l). Las condiciones de cromatografía mejoradas representan un 40% de reducción en el volumen de disolvente, un tiempo de procesamiento disminuido (por ejemplo, para la retirada de disolvente) y un riesgo
- 60 disminuido de degradación de producto.

- Se observó con el uso de cisteína como agente reductor que un precipitado sólido a partir de la reacción según progresaba, probablemente la forma oxidada de cistina. Inicialmente, el precipitado visible en el extremo de la reacción se recogió mediante filtración a través de Celite para proporcionar un filtrado claro, antes de ajustar el pH a
- 65 3 usando un ácido cítrico sólido. Precipitados de cistina/cisteína adicionales en esta etapa junto con el producto. El precipitado pastoso podría recogerse mediante filtración a través de un embudo sinterizado y secado con aire sobre

el embudo. La «pasta» se suspendió a continuación en MTBE (1x 100 ml, 3x 50 ml) para retirar el producto, que se recogió mediante filtración y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

5 Cuando se usó la enzima purificada, la extracción de la capa acuosa proporcionó una emulsión que se sedimentó rápidamente. Sin embargo, la extracción de reacciones usando extracto de harina proporcionó una emulsión gelatinosa que requería la filtración a través de Celite para romperla. Esto podría llevar a la pérdida de producto o uso de disolvente aumentado para lavar el filtro. Se encontró que la filtración directa del producto/cistina precipitado y la suspensión con MTBE evitaba este problema. Después de realizar este procedimiento, el filtrado acuoso resultante (pH 3) a partir de la reacción de extracto de harina (1891-029) se extrajo con 100 ml de MTBE, proporcionó una emulsión similar a gel que se filtró a través de Celite. El análisis TLC de la capa orgánica mostró solo un punto activo UV muy débil y el RMN <sup>1</sup>H del producto aislado (62 mg) no mostró HETrE presente, indicando de este modo, que la filtración del precipitado es un método adecuado para la recuperación del producto de HETrE.

15 Esta reacción produjo 2,5 g (94%) de HETrE crudo con pureza mediante % de área de UPLC (252 nm) del 92,73%.

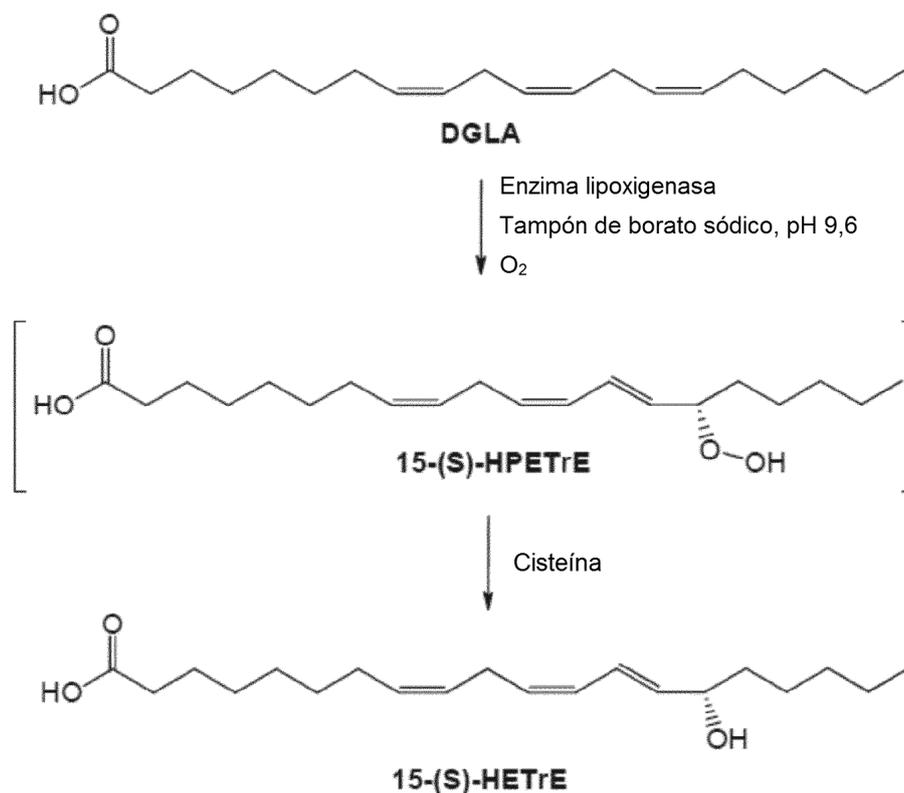
#### Ejemplo 12: reacciones de escalado de 10 l

20 A reacciones de escalado de 10l se realizaron (300 g de DGLA cada una) para proporcionar un total combinado de 469 g (74%) de 15(S)-HETrE con una pureza mediante UPLC de 97,2%, después de purificación cromatográfica en columna, retirada de disolvente y secado de alto vacío. Se encontró que el material tenía un valor de peróxido de 12,5 mEq/kg, en comparación con ~90. mEq/kg para un lote tox comparativo.

25 Una reacción de escalado de 10l adicional se realizó para proporcionar otros 239 g (76%) de 15(S)-HETrE después de purificación cromatográfica en columna, retirada de disolvente y secado de alto vacío.

#### Ejemplo 13: Estudio de estabilidad

30 Se realizaron dos reacciones de escalado de 10l para procesar 600 g de DGLA para un estudio de estabilidad. Estas se realizaron usando las condiciones que se muestran en el Esquema 2.



**Esquema 2.**

35 10 l de 0,1M tampón de borato de sodio (pH 13,4) se cargó a un vaso de hidrogenación, seguido por 2 equivalentes de cisteína. Se cargó DGLA a la solución tampón y se enfrió a 0 - 5 °C. Se añadió polvo de enzima LPX1 a la solución de reacción fría y se presurizó con un mínimo de 200 kPa (2 bar) de oxígeno puro y se agitó durante 1 hora.

El análisis RMN <sup>1</sup>H después de 1 hora mostró ~6% de HPETrE y 8% de DGLA residual. El análisis CAD de la muestra de reacción mostró que el DGLA residual estaba presente en 12,6% p/p. Después de otros 60 minutos a presión de oxígeno, el análisis mostró ~ 5% de HPETrE mediante RMN <sup>1</sup>H y 4% de DGLA. El análisis CAD mostró que el DGLA residual estaba presente en 5,0% p/p. Después de purgar la mezcla de reacción con nitrógeno, se añadió 1 equivalente adicional de cisteína y la reacción se agitó durante 1 horas. El análisis de un alícuota no mostró HPETrE mediante RMN <sup>1</sup>H y 3,5% de DGLA. El análisis CAD mostró que el DGLA residual estaba presente en 3,8% p/p.

La mezcla de reacción se agitó durante la noche, con una capa de nitrógeno, a 1,3°C. El análisis de un alícuota no mostró HPETrE mediante RMN <sup>1</sup>H y 3,5% de DGLA. El análisis CAD mostró que el DGLA residual estaba presente en 5,3 % p/p, lo que se considera un resultado anómalo. Se trató un alícuota con una atmósfera apropiada de nitrógeno y se analizó inmediatamente para el valor de peróxido. Se encontró que era 2 mEq/kg. La solución en masa se descargó a un tambor de 25l y se transfirió a un vaso de vidrio de 10l, con una atmósfera de nitrógeno. El MtBE que contenía 0,02% de BHT se añadió y el pH de la solución acuosa se ajustó mediante adición por partes de ácido cítrico sólido. La mezcla trifásica resultante (precipitado orgánico, acuoso y sólido) se dejó sedimentar. La mezcla se filtró a continuación a través de un embudo sinterizado de 4l, con un flujo de nitrógeno. Durante la filtración, que llevó 1,5 - 2 horas, dos tercios del MtBe añadido se evaporaron. Las capas de filtrado se devolvieron al vaso y se dejaron sedimentar y a continuación se separaron. La capa acuosa se volvió a extraer (x2). Las tres capas de extracto se concentraron de forma separada sobre el evaporador giratorio. Se aisló un total de 274 g aceite crudo (~231 g (73%) mediante ensayo RMN <sup>1</sup>H frente a estándar de tetracloronitrobenzeno). Se obtuvieron 53 g adicionales de aceite crudo (43 g + 10 g) después de suspender la torta de filtro aislada en MtBe (2x 1l), proporcionando una recuperación de crudo total de 327 g (278 g (88%) mediante ensayo RMN H. Se obtuvieron los valores de peróxido de 8,6 mEq/kg y 14,9 mEq/kg para el primer extracto y el material suspendido, respectivamente.

Se produjo un segundo lote del mismo modo, aunque la temperatura inicial de la solución de reacción fue inferior 1,4 °C frente a 4,2 °C. El análisis RMN <sup>1</sup>H después de 1 hora mostró ~3% de HPETrE y 11% de DGLA residual. El análisis CAD de la muestra de reacción mostró que el DGLA residual estaba presente en 15,5% p/p. Después de otros 120 minutos a presión de oxígeno, el análisis mostró - 6% de HPETrE mediante RMN <sup>1</sup>H y 4% de DGLA. Después de purgar la mezcla de reacción con nitrógeno se añadió 1 equivalente adicional de cisteína y la reacción se agitó durante la noche con una capa de nitrógeno. El análisis de un alícuota no mostró HPETrE mediante RMN <sup>1</sup>H y -3 % de DGLA. El análisis CAD mostró que el DGLA residual estaba presente en 4,0 % p/p.

Se trató un alícuota con una atmósfera apropiada de nitrógeno y se analizó inmediatamente para el valor de peróxido, que se encontró que era 5 mEq/kg. La solución en masa se descargó a un tambor de 25l y se transfirió a un vaso de vidrio de 15l, con una atmósfera de nitrógeno. Después de la acidificación con ácido cítrico sólido a pH 3,2, el precipitado sólido resultante se recogió mediante filtración a través de un embudo sinterizado de porosidad de 1,4l, con un flujo de nitrógeno. La torta de filtro se devolvió a continuación al vaso y se suspendió con MtBE (3x 3l) y se filtró cada vez. Las tres capas de filtrado se concentraron de forma separada sobre el evaporador giratorio. Se aisló un total de 325 g aceite crudo (~284 g (90%) mediante ensayo RMN <sup>1</sup>H frente a estándar de tetracloronitrobenzeno). Se obtuvo un valor de peróxido de 10 mEq/kg para la primera fracción de extracto.

Los materiales crudos se combinaron y purificaron mediante cromatografía en columna sobre numerosas columnas de 75l de Biotage KP-Sil. Las fracciones purificadas se combinaron basándose en el análisis TLC y se concentraron sobre el evaporador giratorio a 40 °C (protegidas de la luz), antes de purgarlas con nitrógeno y almacenarlas a 80 °C. Las fracciones de GETrE puras aisladas se disolvieron en MtBE, filtraron a través de un embudo sinterizado limpio y se combinaron antes de concentrarlas sobre el evaporador giratorio a 40 °C (protegidas de la luz). El material purificado se protegió de la luz y se secó sobre una bomba de alto vacío durante tres días a temperatura ambiente, antes de purgarlas con nitrógeno y almacenarlas a -80 °C. Se obtuvo un total de 469 g de aceite amarillo pálido, 97,4 % de área de pureza mediante UPLC (252 nm) y 97,3% de área de pureza usando el método HPLC original (235 nm). El espectro RMN <sup>1</sup>H ajustó a la estructura. El material se analizó mediante espacio de cabeza Gc para el disolvente residual, proporcionando valores de 434 y 9,2 ppm para MtBE y ciclohexano, respectivamente (límite 5000 y 3880 ppm). Se calculó un valor de peróxido de 12,5 mEq/kg para el lote (frente a ~90 mEq/kg para el lote tox previo).

Una comparación del material producido mediante este método se realizó con un lote tox mediante HPLC usando el método OPRD original. Las trazas de HPLC se muestran en la Figura 6 y Figura 7.

Los lotes tienen perfiles e impurezas similares. Una discrepancia importante entre los dos espectros se destaca a los ~35-36 min., pero se debe probablemente debido a la integración de picos amplios mal definidos. La impureza a 48,1 min. está presente a 0,92% en el lote de prueba frente a 0,55% en el lote de tox, que puede deberse a las condiciones de reacción modificadas o más probablemente debido a la composición del material de partida de DGLA (se usó un lote estabilizado de tocoferol para preparar el lote de prueba). Las impurezas entre 63 y 66 minutos se corresponden, con variaciones en % de área. No aparecen nuevas impurezas por encima del 0,1% a partir de una comparación de las trazas.

Una superposición de los espectros de RMN <sup>1</sup>H que mostraban un perfil prácticamente idéntico (Figura 8).

La Tabla 13 proporciona una breve comparación de las condiciones previamente utilizadas para la preparación del lote tox con las condiciones usadas para preparar el lote de prueba.

**Tabla 13. Métodos sintéticos de comparación**

| Parámetro                         | Lote tox          | Lote de prueba |
|-----------------------------------|-------------------|----------------|
| Entrada de DGLA                   | 1100 g            | 600 g          |
| Carga enzimática                  | 13,7 Unidades/g   | 1,8 Unidades/g |
| Salida de HETrE purificada        | 603,5 (53%)       | 469 (74%)      |
| Pureza, % de área UV              | 96-97,5% (235 nm) | >97% (252 nm)  |
| Uso de disolvente de purificación | 19l/columna       | 11 l/columna   |

5 Se observó durante la realización del escalado de lotes de prueba que se dejó ~4 - 5 % de DGLA residual en la mezcla de reacción después de 2,5 - 3 horas con presión de O<sub>2</sub>. Durante las reacciones de ensayo, se añadió el último equivalente de agente reductor de cisteína y se agitó en condiciones atmosféricas, permitiendo que se produjese una conversión adicional del DGLA residual. Sin embargo, en la reacciones de escalado el equivalente final de cisteína se añadió después de que la mezcla de reacción hubiera sido purgada con nitrógeno, de modo que no fue posible reducir más los niveles de DGLA. El razonamiento fue reducir el oxígeno presente en la mezcla de reacción y, por lo tanto, minimizar las probabilidades de formación adicional de peróxido y oxidación de cisteína. Se llevaron a cabo ensayos adicionales en los que se añadió un 20-50% adicional de actividad enzimática. La adición de 20% de actividad enzimática junto con el equivalente final de cisteína se encontró que proporcionaba <1% de DGLA residual según se determinó mediante RMN <sup>1</sup>H.

La ejecución de 10l restante se realizó según la descripción del proceso que se detalla en el presente documento. Se obtuvo un total de 239 g de aceite amarillo pálido con perfil de RMN <sup>1</sup>H como antes.

#### 20 Ejemplo 14: Descripción del proceso

Se generó una descripción del proceso (DP) basándose en los resultados de las reacciones realizadas durante este corpus de trabajo. Se siguió un proyecto de descripción del proceso en el procesamiento de 2x 300 g de DGLA para proporcionar HETrE suficiente para el proyecto de estudio de estabilidad. La DP comprende las siguientes etapas ilustrativas:

1. Preparar tampón de borato de sodio 0,1 M cargando ácido bórico (61,8 g, 1 mol) y NaOH (120,0 g; 3 mol) a 10 l de agua y agitar hasta que se disuelva.
2. Cargar 10,0 l de 0,1 M de tampón de borato de sodio a un vaso de hidrogenación.
- 30 3. Cargar cisteína (237,2 g); 1,958 mol; 2,0 eq) y agitar hasta que se disuelva
4. Cargar DGLA (300,0 g; 9,79 mol; 1,0 eq/en peso/vol) a la solución tampón y enfriar a 0 - 5 °C.
5. Usar una verificación de sondas de pH calibrada cuyo pH es ~9,3 - 9,6.
6. Ajustar el pH con 4M de solución de NaOH, si se requiere.
- 35 7. Cargar polvo de enzima LPX1 (5,30 g, 17,7 mg/ g de DGLA; 1,8 Unidades/g de DGLA, 1,77 % en peso) a la solución de reacción fría.
8. Presurizar el vaso de reacción con un mínimo de 200 kPa (2 bar) de oxígeno puro.
9. Agitar la reacción con 200 kPa (2 bar) de presión de oxígeno, a 0 - 5 °C durante 1 hora.
10. Liberar lentamente la presión de oxígeno para evitar el espumado.
- 40 11. Verificación química: Retirar un alícuota; acidificar el extracto a pH 3, usar un ácido cítrico sólido y extraer con MTBE. Secar sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrar y retirar el solvente sobre el evaporador giratorio y analizar el resto mediante RMN <sup>1</sup>H para confirmar la conversión de DGLA a HPETrE/ HETrE.
12. Añadir más polvo de enzima LPX1 (1,06 g, 3,5 mg/ g de DGLA, 0,36 Unidades/g de DGLA, 0,35 % en peso) y 1 equivalente de cisteína (119,0 g; 0,979 mol) y agitar con oxígeno durante 1,5 h. adicionales.
- 45 13. **Analizar para la finalización de oxidación** - Retirar un alícuota de la mezcla de reacción, interrumpir con un volumen igual de MeOH y analizar mediante detección CAD para mostrar el consumo de material de partida. APROBAR si el DGLA residual < 10 g/kg (mediante HPLC/CAD). Si el IPC no aprueba, la agitación se continúa con presión de oxígeno durante otra hora y se repite el análisis.
14. **Analizar para la finalización de reducción** - Retirar un alícuota; acidificar el extracto a pH 3, usar un ácido cítrico sólido y extraer con MTBE. Secar sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrar y retirar el solvente el disolvente sobre el evaporador giratorio y analizar el resto mediante RMN <sup>1</sup>H y/o UPC/UV para confirmar que no hay HPETrE residual. Durante la fase de ensayo, proteger la muestra del oxígeno y realizar una prueba de peróxido sin demoras. Aprueba si no hay 15-HPETrE detectable mediante RMN y/o UPLC/YV. El valor de peróxido es FIO. Si el IPC no aprueba a continuación se añade cisteína (59,5 g, 0,489 mol, 0,5 eq) y se continua la agitación con una capa de nitrógeno durante otras 4 a 8 horas y se repite el análisis.
- 50 15. Purgar la mezcla de reacción con nitrógeno (x 3).
16. Transferir los contenidos del reactor a un tambor de 25 l con un flujo de nitrógeno.
17. Cargar la mezcla de reacción a un vaso de ~ 15 recubierto con nitrógeno.
- 55 18. Cargar ácido cítrico sólido (según se requiera, tabla de carga (Tabla 16, Apéndice 1) como guía únicamente) en partes a la mezcla de reacción agitada, recubierta con nitrógeno, analizar el pH con un metro de pH calibrado.

Ajustar a pH  $\leq 3,5$ . Esperar a que el pH se estabilizar antes de añadir la siguiente parte. Registrar los tiempos de adición, tendencia de pH y observaciones.

19. Detener la agitación y filtrar el sólido precipitado sobre un embudo sinterizado. Aplicar recubrimiento de nitrógeno externo durante la filtración.

20. Transferir la capa de filtrado acuosa en un tambor de 10l.

21. Transferir la torta húmeda de nuevo al vaso de extracción. Cargar MtBE (3 l) al vaso de extracción.

22. Agitar durante 10 min y dejar sedimentar.

23. Detener la agitación y filtrar el sólido precipitado sobre un embudo sinterizado. Aplicar recubrimiento de nitrógeno externo durante la filtración.

24. Transferir el filtrado orgánico a un tambor de 10 l limpio.

25. Repetir las etapas 21 a 24, dos veces más.

26. Evaporar la solución de producto cruda hasta que la colección de destilados se vuelva lenta a 25 kPa / 40 °C de baño. Purgar el evaporador giratorio con nitrógeno. Antes del fin de la evaporación, transferir la solución en un matraz de 1 l de tara. Proteger del aire lo mejor posible.

27. Determinar el peso crudo y tomar una muestra de RMN para la relación molar de 15-HETrE:MtBE (FIO). Tomar una muestra de FIO para la prueba de peróxido cuando esté fresca y analizar sin demoras. Tomar una muestra de FIO para la pureza cruda mediante UPLC/UV.

28. Almacenar el producto crudo con nitrógeno a -80 °C.

29. Disolver el HETrE crudo en partes de 80g en 1 volumen de ciclohexano y aplicar a un cartucho de sílice de 75l de Biotage, pre-eluido con ciclohexano. Eluir el producto del inicio de columna con 10% de MtBE: ciclohexano hasta 50% de MtBE: ciclohexano.

30. Pre-combinar fracciones de producto basándose en TLC

31. **Analizar pureza de fracción de columna** - Retirar un alícuota de las fracciones de producto pre-combinadas y analizar mediante UPLCS. APROBAR si el % de área de pureza > 95%. Si el IPC no aprueba, se apartar las fracciones para la repurificación.

32. Combinar producto puro adecuado que contiene fracciones.

33. Retirar el disolvente sobre el evaporador giratorio a 40 °C. Purgar con nitrógeno.

34. Secar el material a un peso constante con alto vacío, con agitación.

35. Liberar el vacío con nitrógeno.

36. **Analizar los disolventes residuales** - Retirar un alícuota de producto secado y analizar mediante espacio de cabeza GC. APROBAR si los disolventes residuales se encuentran por debajo de los límites ICH (<5000 ppm de MtBE, 3880 ppm de ciclohexano). Si el IPC no aprueba, devolver el material en masa a una bomba de alto vacío y continuar secando durante 24 horas y repetir el análisis.

37. Transferir a una botella de ámbar de tara con una capa de nitrógeno y almacenar a 80 °C.

### Ejemplo 15: Limpieza del reactor

Los restos de DGÑA y HETrE son fácilmente solubles en alcoholes tales como etanol y metanol o acetona. La cisteína es soluble en (280 g/l @ 25°C) y el etanol (1,5g/100 g de etanol @ 19 °C) y cistina es soluble en 1M de HCl con calentamiento (50 g/l) y soluciones básicas.

550 mg del sólido recogido a partir de un tratamiento de reacción se suspendió en 12 ml de 1M de HCl con calentamiento. El volumen del material se disolvió con calentamiento a 50 °C. Una pequeña cantidad de material insoluble era visible. La adición de 1M de HCl adicional (12 ml) no permitió la disolución del sólido pegajoso. El material residual se recogió mediante filtración (14 mg, número, 2,5%).

550 mg del sólido recogido se suspendió en 10 ml de 4M de NaOH con calentamiento (pistola térmica). El volumen del material se disolvió pero de nuevo una pequeña cantidad de material insoluble era visible. La adición de NaOH adicional (10 ml) no permitió la disolución del sólido pegajoso.

Después de la realización de las reacciones de 10l, el vaso de hidrogenación se limpió con agua y metanol para retirar la cisteína/cistina precipitada, etc. Después del tratamiento de la mezcla de reacción en un vaso de vidrio de 15l, el reactor se limpió con solución cáustica (~0,5M), se calentó a 80 °C y se agitó durante la noche, seguido por un aclarado con acetona para dejar el vaso visualmente limpio.

### Ejemplo 16: Análisis de riesgos térmicos

La Herramienta de análisis de sistema reactivo avanzada (ARSST) es un calorímetro eficaz que puede identificar rápidamente y de forma segura peligros químicos potenciales en la industria de procesos.

La reacción de síntesis (Esquema 2) implica la peroxidación de DGLA usando enzima lipoxigenasa en tampón de borato de sodio. El peróxido resultante (15-(S)-HPETrE) se reduce a continuación, *in situ*, al producto final (15-(S)-HETrE) en presencia de cisteína. La reacción está prevista para que se lleve a cabo como 1 procedimiento de un solo recipiente a 0-5 °C. La principal preocupación es que las temperaturas elevadas podrían traer consigo sucesos térmicos adversos particularmente según se forma peróxido durante el transcurso de la reacción.

Todos los reactivos se cargaron a la celda de ARSST como una solución acuosa que había sido preparada en el laboratorio. La fuerza de la solución era del 5% p/p de los reactivos de partida. Se transfirieron 10 g de la solución al vaso de ARSST en un lote, el paño de presión se aplicó y se inició la ejecución. La ejecución tuvo que detenerse a 250 °C para evitar la ebullición del agua.

5 La temperatura en el vaso era de 21 °C antes de la adición. La velocidad de auto calentamiento fue de 0,9 °C/min. No se observaron emisiones de calor significantes durante el transcurso de la reacción (Figura 9). No se observaron peligros térmicos usando la Herramienta de análisis de sistema reactivo avanzada (ARSST) o Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC).

10 No se observó exotermicidad dentro del intervalo de prueba (hasta 140 °C=). No se observó evolución de gas durante el transcurso de la ejecución. La velocidad de auto calentamiento disminuyó a 100 °C debido a la formación de compuestos volátiles posiblemente a partir de la descomposición de productos, no se observó formación de gas permanente (Figura 10).

15 Se llevó a cabo una ejecución adicional usando una solución de reacción (~10 g) en la que el reducto de cisteína se había omitido y, por lo tanto, contenía de forma predominante el peróxido intermediario, como cualquier peligro térmico posible era más probable de ser observado en este caso (Figura 11).

20 Se detectó una emisión de calor que tenía una temperatura de inicio de 40 °C, el ATR era de 13 °C. La velocidad de calentamiento de fondo era de 0,9 °C/min. A los 116 °C la velocidad de auto calentamiento empezó a disminuir debido a la formación de volátiles, probablemente era la descomposición del producto. Como anteriormente, no hubo evidencia de cualquier emisión de gas en esta reacción (Figura 12).

25 Una emisión de calor con una temperatura de inicio de 40 °C en un ATR de 13 °C se observó en esta reacción. No es probable que sea una preocupación ya que la reacción debe ejecutarse a 0-5 °C. Ya que los niveles de peróxidos son bajos durante la reacción no es probable que la emisión de calor observada aparecerá en las condiciones de reacción estándar. No se observó emisión de gas visible en esta reacción. La reacción es segura para funcionar en el intervalo de temperatura propuesto de 0-5 °C.

30 Las muestras de HETrE puro se analizaron mediante DSC con tasas de calor de 2, 5, 10 y 20 °C/min. durante un intervalo de 20 a 300 °C. No se observaron emisiones de calor significantes aunque se observó una ligera emisión de calor a ~40 °C, que se debió probablemente al disolvente residual (MtBE) que se evaporaba de la muestra.

### 35 Ejemplo 17: Estudios de robustez

Usando el proceso modificado, los tiempos de reacción extendidos con O<sub>2</sub> (hasta 4 horas) no mostraron ningún impacto adverso sobre la calidad del producto.

40 El tiempo extendido (4,5 días) de reflujo en un 40% en MtBE: ciclohexano a una temperatura externa de 75 °C no causó una degradación significativa de HETrE. Anteriormente, HETrE puro calentado a 50 °C (1822-129-4E) al vacío mostró degradación (1 impureza principal se observó que se había identificado hasta entonces como un éster formado consigo mismo).

### 45 Ejemplo 18: Investigación de la estabilidad de 15(S)-HPETrE/HETrE hacia la extensión del tiempo de reacción

Una cantidad de reacciones han proporcionado información útil con respecto a la robustez en varias etapas de la reacción. Estas se resumen en la Tabla 14.

50 **Tabla 14. Detalles de experimentos que muestran la robustez de la reacción**

| Experimento | Carga enzimática            | Condiciones   | Resultados  |
|-------------|-----------------------------|---|---|
| 1822-163    | (~ 13,8 Unidades/g de DGLA) | Condiciones originales con tiempo extendido (4 horas con presión de O <sub>2</sub> )  | Tanto el análisis RMN <sup>1</sup> H como el análisis HPLC mostraron la presencia de impureza de dihidroxi trieno   |
| 1822-193    | (~ 13,7 Unidades/g de DGLA) | Se agitó con presión de O <sub>2</sub> durante 1 hora para generar HPETrE antes de añadir 2 eq. de cisteína como solución en NaOH (aq) y añadir presión de O <sub>2</sub> durante 1 hora, después, 2 horas. | Tanto el análisis RMN <sup>1</sup> H como el análisis HPLC mostraron la presencia de impureza de dihidroxi trieno   |
| 1822-195    | (~ 13,7 Unidades/g de DGLA) | Se añadió 2 eq. de cisteína y se agitó con presión de O <sub>2</sub> durante 0,5 hora. Se dejó la reacción sedimentarse durante la noche a 4 °C.  | El espectro RMN <sup>1</sup> H inicial mostró la mezcla de HPETrE, HETrE y una pequeña cantidad de DGLA residual. El espectro de RMN <sup>1</sup> H después de durante la noche el almacenamiento mostró impurezas. |

| Experimento         | Carga enzimática           | Condiciones   | Resultados  |
|---------------------|----------------------------|---|---|
| 1891-001            | (~ 3,4 Muidades/g de DGLA) | Se añadió 2 eq. de cisteína y se agitó con presión de O <sub>2</sub> durante 1 hora. Se añadió 1 eq. de cisteína y se agitó a presión atmosférica durante 1 hora. Se filtró la mezcla de reacción a través de Celite y se ajustó la capa acuosa a pH 3. Se dejó la reacción sedimentarse durante la noche a 4 °C. | El espectro RMN <sup>1</sup> H inicial mostró la mezcla de HPETrE, HETrE y una pequeña cantidad de DGLA residual. El espectro RMN 1H después de agitar con cisteína adicional no mostró HPETrE. El espectro de RMN <sup>1</sup> H después del almacenamiento durante la noche mostró poco DGLA (<1%). Pureza HPLC de % de área (252 nm) 93,55%. |
| 1891-009            | (~ 1,8 Muidades/g de DGLA) | Reacción de fermentador. Se borboteó a través con oxígeno durante 6,5 horas. Se filtró la mezcla de reacción a través de Celite y se ajustó la capa acuosa a pH 3. Se dejó la reacción sedimentarse a 4 °C durante el fin de semana.  | El espectro RMN 1H después del almacenamiento después del fin de semana mostró poco DGLA (<1%). Pureza HPLC de % de área (235 nm) 96,94%.   |
| 1891(-051 (2 lotes) | (~ 1,8 Muidades/g de DGLA) | Se añadió 2 eq. de cisteína y se agitó con presión de O <sub>2</sub> durante 2,5-3,75 horas. Se añadió 1 eq. de cisteína y se agitó con nitrógeno durante ~ 16 horas. Se ajustó la capa acuosa a pH 3 y se filtró el precipitado. Se retiró   | El espectro RMN 1H mostró la mezcla de HPETrE, HETrE y una pequeña cantidad de DGLA residual. El espectro RMN <sup>1</sup> H después de agitar con cisteína adicional no mostró HPETrE. El espectro de RMN <sup>1</sup> H después del almacenamiento durante la noche mostró ~ 3% de DGLA.  |
|                     |                            | producto que usa MtBE   |   |

Anteriormente, usando las condiciones de procesamiento originales (generación de hidroperóxido seguido por reducción a HETrE usando borohidruro de sodio) se observó que los tiempos extendidos con presión de oxígeno (4 horas) llevaron a la formación de impurezas sobreoxidadas (experimento 1822-063) como se determinó mediante RMN <sup>1</sup>H (Figura 14) y LCMS (Figura 13). El máximo a TA ~7,8 tenía un *m/z* de 337, correspondiendo con di-HETrE y la absorbancia es mayor a 267 nm que se corresponde con la naturaleza trienoica del compuesto.

La reacción inicial (1822-193) se formó cuando el intermediario de peróxido se formó usando la misma carga enzimática que previamente (13,7 Muidades/g de DGLA), antes de añadir 2 equivalentes de agente reductor de cisteína y agitando con O<sub>2</sub>/aire durante 3,5 horas adicionales. El perfil RMN <sup>1</sup>H (Figura 14) fue similar al obtenido por 1822-163. Pareció que la sobreoxidación se producía con el intermediario de hidroperóxido, debido a la elevada carga enzimática o la naturaleza reactiva del hidroperóxido hacia el oxígeno.

En el siguiente experimento (1822-195), 2 equivalentes de agente reductor de cisteína se añadieron al inicio de la reacción, que se agitaron con presión de O<sub>2</sub> durante 30 min. Algo de DGLA residual era visible en el espectro de RMN <sup>1</sup>H, más una mezcla de HETrE y HPETrE y una pequeña cantidad de la impureza sobreoxidada. Después de almacenar en condiciones atmosféricas durante la noche, el perfil de impureza pareció ser ligeramente peor, sin ninguna otra reducción de HPETrE, lo que sugirió que la cisteína se había oxidado tota bien mediante hidroperóxido o bien mediante oxígeno.

En el experimento 1822-197, la adición de 3 equivalentes de cisteína al inicio de la reacción pareció reducir la sobreoxidación pero también ralentizó la conversión de DGLA a HETrE. Se postula que el exceso de cisteína acelera la reducción del HPETrE activador enzimático y esto podría ser el responsable de la falta de sobreoxidación, así como la lenta reacción. Los experimentos 1891-001 a -005 se llevaron a cabo cuando la carga enzimática se redujo a 3,6, 1,8 y 0,9 Muidades de actividad enzimática/gramo de sustrato de DGLA, respectivamente. 2 equivalentes de cisteína se añadieron al inicio de las reacciones que se colocaron bajo presión e O<sub>2</sub> durante 1 hora antes de analizarlas mediante RMN <sup>1</sup>H y a continuación añadiendo 1 equivalente adicionales de cisteína y agitando con aire o presión de O<sub>2</sub> durante 1 hora adicional. Ninguna de las impurezas sobreoxidadas se observó mediante RMN <sup>1</sup>H (Figura 14) aunque bajos niveles eran visibles mediante UPLC a 252 nm. La reacción de fermentador 1891-009, cuando se borboteó oxígeno continuamente a través de la mezcla de reacción durante 6,5 horas, no mostró producto sobreoxidado mediante RMN <sup>1</sup>H. En este caso, la concentración de enzima activa en la solución fue siempre a un nivel bajo.

La reacción 1891-029 se agitó con oxígeno durante 3 horas y se almacenó durante el fin de semana con aire. Una cantidad insignificante de impureza sobreoxidada fue visible mediante RMN <sup>1</sup>H (Figura 14). Los lotes escalados 1891-051 (1,8 Muidades/ g de DGLA) se mantuvieron con presión de O<sub>2</sub> durante 2,5-3,75 horas sin ningún impacto grave sobre la pureza como se determinó mediante análisis RMN <sup>1</sup>H.

#### Ejemplo 19: Estabilidad con condiciones de retirada de disolvente

Un ensayo de estabilidad térmica se llevó a cabo en el que una solución de HETrE (~9.1 g) en 500 ml 40% de MtBE:

ciclohexano se calentó a 75 °C (temperatura de baño de aceite externo) a 4 kPa al vacío (temperatura de refrigerante de condensador -0 °C). Esto estableció un ligero reflujo. La solución se protegió de la luz. Las muestras se retiraron en diversos puntos de tiempo, con una atmósfera de nitrógeno. y se analizaron mediante UPLCS (252 nm) (Figura 15).

Las condiciones se diseñaron para imitar las condiciones favorables que se encontraron en una retirada de disolvente en escala de planta a partir de fracciones de columna agrupadas. Después de 6 horas, no se detectó una disminución significativa en pureza. El reflujo se extendió durante otras 112 horas. No se detectó una disminución significativa en pureza, ni hubo un aumento rápido en la formación de impureza de dímero a TA 12,2 min., aunque hubo un aumento de 0,44 a 0,64%.

**Ejemplo 20: Investigación de método no RMN para finalización de reacción de IPC**

Se usó un método de detección por aerosol químico (CAD) frente a un estándar de DGLA p/p para determinar DGLA residual en una mezcla de reacción. Se evaluaron reacciones previas para la finalización de reacción basándose en la retirada de un alícuota de la mezcla de reacción y un mini tratamiento seguido 1 mediante análisis RMN H. Sin embargo, este método no fue ideal, ya que se produjo alguna superposición entre el DGLA residual y las señales de producto HETrE (Figura 16).

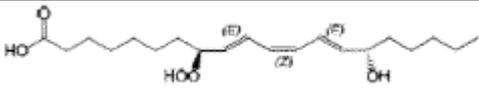
Fue preferible un método alternativo. Un DGLA no absorbe por encima d 210 nm, Se descartó el método UV. La detección por aerosol cargado (CAD) se encontró que era un método adecuado en el que la muestra de IPC podría compararse con un 0,1% p/p de estándar de DGLA. La muestra de IPC se extraería de la reacción y se interrumpiría con un 50% de metanol para desnaturalizar la enzima, antes de que se realice el análisis. Este método permitirá una determinación más precisa de los niveles de DGLA residual en muestras de reacción.

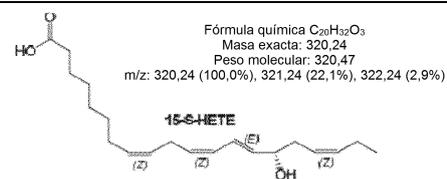
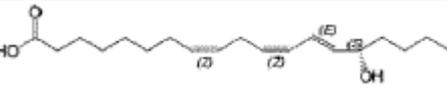
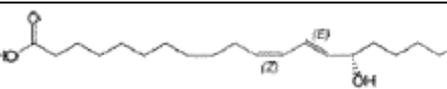
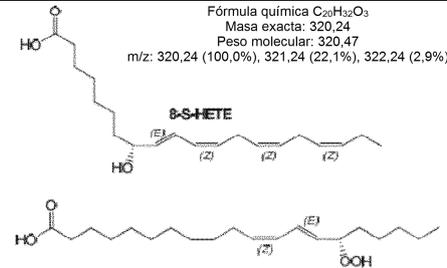
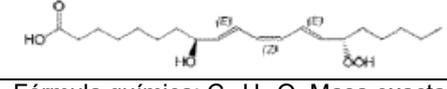
**Ejemplo 21: Investigación LC-MS de impurezas**

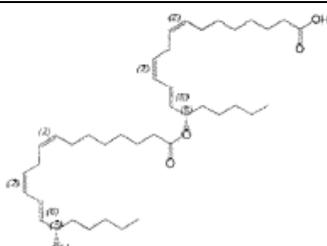
15(S)-HETrE purificado y fracciones frontales y de cola enriquecidas con impurezas preparadas durante el transcurso del desarrollo PRD se analizaron mediante LC-MS y MS-MS. Basándose en las especificaciones suministradas para el DGLA y los datos obtenidos, se sugirieron estructuras provisionales para las impurezas observadas. Basándose en las especificaciones del material de partida de DGLA, las tres impurezas importantes presentes (Figura 20) fueron 20:2ω6 (ácido eicosadienoico (EDA), C<sub>20</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>, RMM 308,48), 20:3ω3 (ácido eicosatrienoico (ETE) C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>, RMM 306,48) y 20:4ω3 (ácido eicosatetraenoico (ETA), C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>, RMM 304,48) con % de área FAME mediante análisis GC de 1,1, 1,6 y 0,4%, respectivamente. 2 purezas adicionales no identificadas cada una al 0,2% de área (FAME) también estuvieron presentes proporcionando un total de impurezas del 3,5 % de ara mediante análisis GC de FAME.

Se incluyen en la Tabla 15 estructuras provisionales para las masas identificadas a partir del producto purificado (1891-051-7A). Las impurezas principales identificadas en el material purificado a m/z323 (TA 7,68 min.) y 319 (TA 6,3 min.) se corresponden con los productos hidroxilados de EDA y ETA (HEDA y HETE, respectivamente). No se pudieron detectar inmediatamente ninguna impureza identificable relacionada con la hidroxilación de ETC (esperado m/z 321) en el material purificado, aunque en las fracciones de cola, un máximo con m/z 321 (TA 7,19 min.) se observó en el máximo de producto de HETrE principal. Una tercera mayor impureza tenía un m/z de 583 (TA 11,41) que está probablemente relacionado con el producto dimérico visible a 12,22 min. con un m/z de 625. Inicialmente, esto se asumió que se había formado debida o bien por el mecanismo de Diels Alder o bien por auto-esterificación. El LC MS-MS (Figura 21) se llevó a cabo sobre una muestra (muestra 229 del estudio de estabilidad 1773A0030E) que se había almacenado a +25 °C, en la cual esta impureza dimérica había aumentado.

**Tabla 15. Estructuras provisionales de impurezas presentes en 15-(S)-HETrE purificado basándose en análisis LC-MS y MS-MS**

| Máximo LC TA (min.) | TTR  | % de área de pureza (252 nm) | m/z correspondiente y fórmula mol. sugerida             | Estructura potencial  |
|---------------------|------|------------------------------|---|---|
| 4,7                 | 0,69 | 0,12                         | 353,2<br>C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub> |  <p>Fórmula química: C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub><br/> Masa exacta: 354,24<br/> Peso molecular: 354 48<br/> m/z: 354,24 (100,0%), 355,24 (21,8%), 356,25 (2,4%), 356,24 (1,0%)</p> |

| Máximo LC TA (min.) | TTR  | % de área de pureza (252 nm) | m/z correspondiente y fórmula mol. sugerida  | Estructura potencial  |
|---------------------|------|------------------------------|--|---|
| 6,3                 | 0,92 | 0,83                         | 319,2<br>C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>  |  <p>Fórmula química C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub><br/>Masa exacta: 320,24<br/>Peso molecular: 320,47<br/>m/z: 320,24 (100,0%), 321,24 (22,1%), 322,24 (2,9%)</p> <p><b>15-S-HETE</b></p>  |
| 6,83                | 1,00 | 96,87                        | 321,2<br>C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>  |  <p><b>15-(S)-HETrE</b><br/>Fórmula química: C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>O<sub>3</sub><br/>Masa exacta: 322,25<br/>Peso molecular: 322,48<br/>m/z 322,25 (100,0%), 323,25 (21,6%); 324,26 (2,9%)</p>  |
| 7,16                | 1,05 | 0,22                         | 325.2 y 409.1  | Se requiere investigación adicional para identificar  |
| 7,32                | 1,07 | 0,25                         | 325.2 y 409.1  | Se requiere investigación adicional para identificar  |
| 7,68                | 1,12 | 0,80                         | 323,2<br>C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>  |  <p><b>15-(S)-HEDA</b><br/>Fórmula química C<sub>20</sub>H<sub>36</sub>O<sub>3</sub><br/>Masa exacta: 324,27<br/>Peso molecular: 324,50<br/>m/z: 324,27 (100,0%), 325,27 (22,2%), 326,27 (2,9%)</p>   |
| 10,25               | 1,50 | 0,14                         | 311,2, 319,2, 325,2, 339,2,<br>(C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub> ) 353.2 (C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub> ) |  <p>Fórmula química C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub><br/>Masa exacta: 320,24<br/>Peso molecular: 320,47<br/>m/z: 320,24 (100,0%), 321,24 (22,1%), 322,24 (2,9%)</p> <p><b>8-S-HETE</b></p> <p><b>15-(S)-HPEDA</b><br/>Fórmula química C<sub>20</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub><br/>Masa exacta: 340,26<br/>Peso molecular: 340,50<br/>m/z: 340,26 (100,0%), 341,26 (21,6%), 342,27 (3,2%)</p> |
|                     |      |                              |  |   |
|                     |      |                              |  | Fórmula química: C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub> Masa exacta: 354,24 Peso molecular: 354,48 m/z: 364,24 (100,0%), 355,24 (21,8%), 366,25 (24%), 356,24 (1,0%)  |
| Máximo LC TA (min.) | TTR  | % de área de pureza (252 nm) | m/z correspondiente y fórmula mol. sugerida  | Estructura potencial  |
| 11,41               | 1,67 | 0,60                         | 583,4 C <sub>38</sub> H <sub>64</sub> O <sub>4</sub>   | Se requiere investigación adicional para identificar  |

| Máximo LC TA (min.) | TTR  | % de área de pureza (252 nm) | m/z correspondiente y fórmula mol. sugerida          | Estructura potencial   |
|---------------------|------|------------------------------|--|--|
| 12,22               | 1,79 | 0,18                         | 625,4 C <sub>40</sub> H <sub>66</sub> O <sub>5</sub> |   |
|                     |      |                              |  | Fórmula química: C <sub>40</sub> H <sub>35</sub> O <sub>5</sub><br>Masa exacta: 626,49<br>Peso molecular: 626,95<br>m/z: 626,49 (100,0%), 627,49 (43,3%), 628,50 (10,6%) 629,50 (1,8%) |

La fórmula de impureza era C<sub>40</sub>H<sub>66</sub>O<sub>5</sub>. El modo de fragmentación soporta la naturaleza éster-dímero de la impureza. La identificación mediante algoritmo MS/MS proporciona iones producto con el mismo perfil que HETrE, que es el patrón esperado a partir de una escisión éster (Figura 22).

5

#### Ejemplo 22: Producción de 15(S)-HEPE a partir de EPA

La reacción se llevó a cabo mediante bórax disuelto (194 g, 0,508 mol) en agua DI (5 l) completamente. L-Cisteína (40 g, 0,33 mol) y se agitó durante 30 minutos a 25 a 30 °C. Se añadió PPG-2000 (agente antiespumante, 2 ml) y se ajustó el pH de masas de la reacción a 9,55-9,65 usando 4M de NaOH. Se añadió EPA (50 g, 0,165 mol) y se agitó durante 30 minutos a 25 a 30 °C. La masa de reacción se enfrió a 0 a 5 °C y se añadió enzima LPX1 (1,25 g, 2,49 %). La mezcla de reacción se purgó con oxígeno (grado comercial 99,5 %) (1 Kg \* 2) y se presurizó el vaso de reacción con gas de oxígeno (2,2 Kg). La mezcla de reacción se agitó con presión de oxígeno (2,2 Kg) a 0-5 °C durante 1 hora. Después de la conversión completa del EPA, la masa de desgasificó con gas de nitrógeno (grado-I, 1 Kg \* 2). Se añadió L-Cisteína (20 g, 0,165 mol) y el vaso de reacción se presurizó con gas de nitrógeno (grado-I, 2,2 Kg). La masa de agitó durante 1 hora a 0 a 5 °C. Después de la conversión completa del intermediario de peróxido, la presión de nitrógeno se liberó; la masa de descargó del reactor y se aclaró con agua DM (150 ml \* 2). El pH del crudo se ajustó a 3,0-4,0 usando un 40 % p/p de solución de ácido cítrico, seguido de la adición de MTBE (1 l). Las capas bifásicas se agitaron durante 30 minutos y se filtraron. El filtrado principal se toma para la separación de capas y el resto se lavó con MTBE (500 ml \* 2). El resto lavado con MTBE se tomó para extraer la capa acuosa separada. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre un sulfato sódico anhídrido (15 g) y se filtraron. El filtrado se concentró al vacío a 30 a 35 °C para conseguir la etapa-I como un líquido amarillo pálido (48 g) con 95,00% de pureza de HPLC. La esterificación del 15(S)-HEPE se llevó a cabo disolviendo la etapa-I (30 g, 0,094 mol) en acetona seca (300 ml). Se añadió carbonato potásico (68,36 g, 0,495 mol) y bromuro de etilo (30,8 g, 0,283 mol) y la masa se agitó durante 48 horas a 25-30 °C. Después de la finalización de la etapa-I, agua DM enfriada (120 ml) y solución de salmuera (30 ml) se añadieron a la masa de reacción a 10 a 20 °C. La masa de reacción se llevó a 25 a 30 °C y a continuación se agitó durante 60 minutos. Las capas bifásicas se separaron y la capa orgánica superior se concentró al vacío a 25-30 °C para destilar el disolvente. Se añadieron hexanos (225 ml) al crudo y la masa se agitó durante 30 minutos a 25-30 °C. Las capas bifásicas se separaron y la capa orgánica superior se lavó con solución de salmuera (15 %, 90 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhídrido (4,5 g) y se filtró. El filtrado se añadió con carbón norit (SX plus, 3 g) y se agitó durante 1 hora. Después de filtrar la solución negra a través de un paño de Celite, el filtrado se añadió con gel de sílice (100-200 de malla, 20%) y a continuación se agitó durante 1 hora. Después de filtrar la masa de suspensión, el filtrado se concentró al vacío a 25 a 30 °C para destilar el disolvente. La masa concentrada se persiguió con MTBE (90 ml \* 2) y alcanzó la etapa-II como un líquido amarillo pálido (21,73 g) con 97,13% de pureza HPLC.

#### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Una bio-oxidación/reducción en un solo recipiente de DGLA proporcionó material de 15(S)-HETrE de pureza similar en un rendimiento significativamente aumentado 76% frente a 53% para métodos de dos etapas) mientras que usaba solo una pequeña fracción de carga enzimática y mucha menos disolventes de extracción y de cromatografía.

El borohidruro de sodio de agente reductor anterior, usado en el modo de un solo recipiente secuencial, se ha sustituido con cisteína usada como agente reductor *in situ*. Esto evita la generación de hidrógeno durante la reacción y el tratamiento, que habría resultado problemática en una escala más grande, implicando tiempo de interrupción largos potencialmente dañinos para la calidad y el rendimiento. La ventaja añadida del uso de cisteína es que el agente reductor puede añadirse al inicio de la reacción, es decir, antes de la etapa de bio-oxidación. Por lo tanto, el intermediario de hidropéroxido generado se reduce *in situ* según se forma, evitando la inactivación enzimática

causada por altos niveles del hidroperóxido, así como también evitando la formación debido a la sobreoxidación y degradación del intermediario de hidroperóxido. Esto ha resultado en que la carga enzimática lipoxigenasa requerida sea reducida mediante un factor de 7,6. Combinado con un suministro alternativo, más económico de enzima liofilizada, esto resultó en una reducción total de los costes de contribución de enzima mediante un factor de 15.

5 Una investigación de fuente enzimática paralela que se esfuerza en reducir el requisito de carga enzimática ha revelado que la lipoxigenasa extraída a partir de harina de soja es ahora una fuente enzimática válida para el proceso de 15-(S)-HETrE. Se ve como una opción a largo plazo en la fabricación a gran escala, con una técnica de  
10 retirada de harina de soja adecuada aún a desarrollar. A corto plazo y para fabricaciones más pequeñas, de multi-kilogramos se recomienda usar enzima aislada liofilizada, puesto que su coste superior es compensado por la no necesidad de operaciones de procesamiento de harina de soja adicionales.

15 El procedimiento de tratamiento se ha simplificado desde una extracción formadora de emulsión usando un hexano costoso y una mezcla de disolvente de MtBE a una suspensión simple del precipitado de reacción con MtBE para aislar el producto crudo. La acidificación de la mezcla de reacción usando ácido cítrico en lugar de un 10% de solución a ayudado a reducir los volúmenes de reacción.

20 Debido al perfil de reacción más limpio, las condiciones de purificación por columna se han modificado para reducir las cantidades de disolvente consumido, mientras que también se reemplaza el hexano tóxico con el ciclohexano más benigno. Esto tiene la ventaja añadida de reducir el tiempo de procesamiento durante la evaporación de disolventes y por lo tanto, reduce los riesgos relacionados con la degradación del producto. Un estudio de la estabilidad térmica de 15(S)-HETrE en una solución y hacia la exposición a superficies calientes ha demostrado que en condiciones de evaporación de disolvente típicas en planta, no debería producirse ninguna degradación  
25 significativa en una escala de tiempo de <2 días. Finalmente, sigue siendo deseable moverse desde la cromatografía en columna a la purificación mediante la cristalización de una sal, co-cristal u otro derivado de interés de reducción de costes de fabricación a gran escala >100 kg.

30 El nuevo método de procesamiento ha incluido la manipulación del material en una atmósfera inerte en todas las etapas adecuadas, en un esfuerzo de reducir la exposición de oxígeno y, por lo tanto, la generación de peróxidos y productos de descomposición posteriores. Los valores de peróxido obtenidos se encuentran ahora en la región de 10-15 en comparación con los valores de 90+ obtenidos anteriormente. Los resultados a partir del ensayo de estabilidad sugieren que la calidad inicial del material tenía un efecto positivo sobre la estabilidad observada (formación de descarte de ésteres).

35 El intento de identificación de las impurezas principales (>0,10 % de área) en el material purificado mediante LC-MS sugiere que se derivan principalmente del DGLA de partida. Un producto auto-esterificado también es observable, la cantidad del cual aumenta durante el tiempo a temperaturas superiores (> -20°C). El estado de la identificación de impureza es suficiente para el ensayo de fase temprana y fabricación relacionada.

40 El proceso tal como se ha diseñado actualmente no muestra ningún riesgo térmico significantes - un ligero aumento de temperatura se observa cuando la mezcla de reacción alcanza 40 °C, pero como la temperatura se mantendrá entre 0 - 5 °C, no será un obstáculo para el escalado de procesamiento seguro.

45 En conclusión, el proceso desarrollado que resulta a partir de este programa de trabajo se adecua ahora a los objetivos de fabricación de escalado de multi-kilogramos de fase temprana seguros y robustos ajustándose a cGMP.

### Ventajas

| Parámetro               | Proceso no optimizado inicial | Proceso optimizado | Comentarios  |
|-------------------------|-------------------------------|--------------------|--|
| Rendimiento de producto | 40±-50%                       | 74%                | Mejora de rendimiento significativa reduce DGLA y requisitos enzimáticos   |
| Agente reductor         | Borohidruro de sodio          | Cisteína           | Ventajas de cisteína <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción de oxidación/reducción de una etapa que lleva a degradantes de hidroperóxido reducidos</li> <li>• No se genera hidrógeno durante la reacción de reducción</li> <li>• tiene propiedades antioxidantes que llevan a degradantes de hidroperóxido reducidos</li> </ul> |
|                         |                               |                    | • Evita el exceso de la formación de hidroperóxido reduciendo la carga enzimática  |

ES 2 670 776 T3

| Parámetro                    | Proceso no optimizado inicial | Proceso optimizado | Comentarios   |
|------------------------------|-------------------------------|--------------------|---|
| Carga enzimática             | 13,7 unidades/g               | 1,8 unidades/g     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Debido a la inactivación enzimática reducida mediante carga enzimática de intermediario de hidroperóxido reducida</li> <li>• Usando enzima liofilizada (0,42€/unidad) en lugar de enzima líquida (0,83€/m/unidad) en combinación con un requisito de carga inferior resultó en la reducción de costes de 11,37€/g de DGLA a 0,75€/g de DGLA</li> </ul> |
| Pureza                       | 96,0 - 97,5%                  | >97%               | Debido a la reducción en la formación de impurezas de oxidación, se puede conseguir una pureza de producto superior   |
| Disolventes de cromatografía | 19l/columna                   | 11l/columna        | Debido a la formación de impurezas inferior, los requisitos de disolventes de purificación se reducen 1,7 veces   |

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un proceso para la producción de derivado 15-hidroxi de ácidos grasos de comprende la oxidación enzimática de ácido graso con una atmósfera de oxígeno presurizado de al menos 200 kPa (2 bar) para formar un intermediario de ácido 15-hidroperoxi graso; y reducir al menos una parte del intermediario de ácido 15-hidroperoxi graso usando cisteína como agente reductor.
- 10 2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de oxidación comprende poner el contacto el ácido graso con menos de 400 Unidades de enzima por gramo del ácido graso.
3. El proceso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el rendimiento del derivado 15-hidroxi del ácido graso es de al menos el 50 %.
- 15 4. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en el que el derivado 15-hidroxi es 15(S)-HETrE.
5. El proceso de cualquier reivindicación anterior en el que el ácido graso comprende DGLA.
- 20 6. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el derivado 15-hidroxi es ácido 15(S)-hidroxieicosapentaenoico.
7. El proceso de cualquier reivindicación anterior que comprende no menos de 100 kg del ácido graso, preferentemente no menos de 250 kg del ácido graso y más preferentemente no menos de 500 kg del ácido graso.
- 25 8. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en el que la etapa de oxidación comprende poner en contacto al ácido graso con un extracto de harina de soja.
9. El proceso de la reivindicación 8 que comprende adicionalmente:
- 30 poner en contacto harina de soja con una solución tampón a pH 4,5 para producir un extracto de harina de soja crudo; y filtrar el extracto de harina de soja crudo para producir el extracto de harina de soja.
10. El proceso de la reivindicación 9, en el que el extracto de harina de soja tiene una actividad comparable a 2 mg/ml de enzima lipoxigenasa liofilizada purificada.
- 35 11. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en el que la presión de oxígeno positiva es de al menos 250 kPa (2,5 bar).

Serie de dilución de ensayo de decoloración azul de metileno

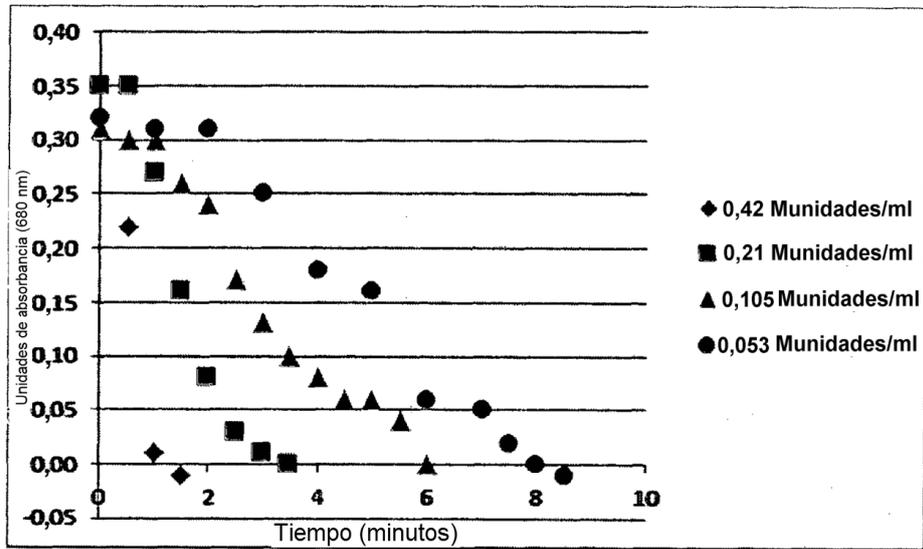


Figura 1.

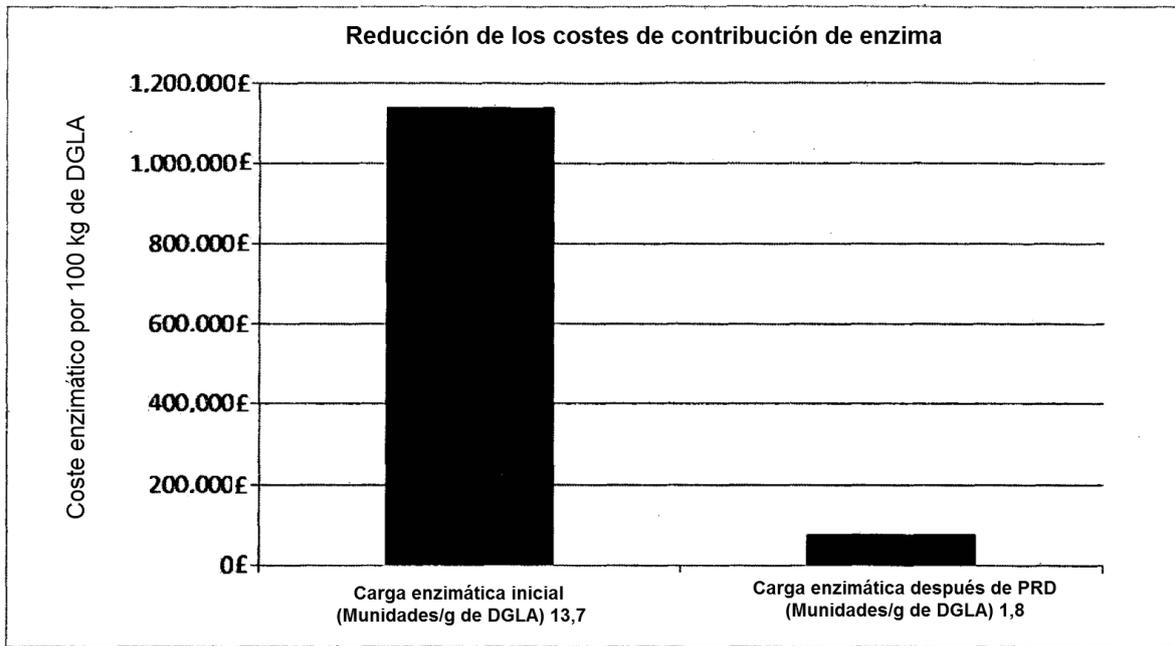


Figura 2.

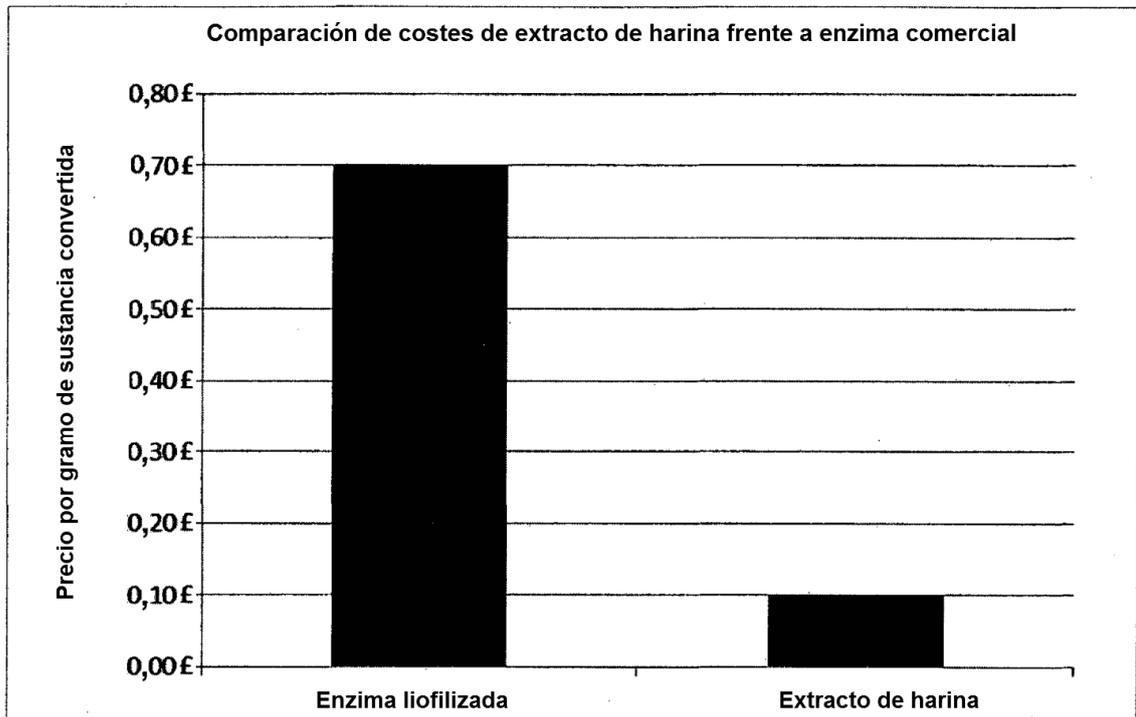


Figura 3.

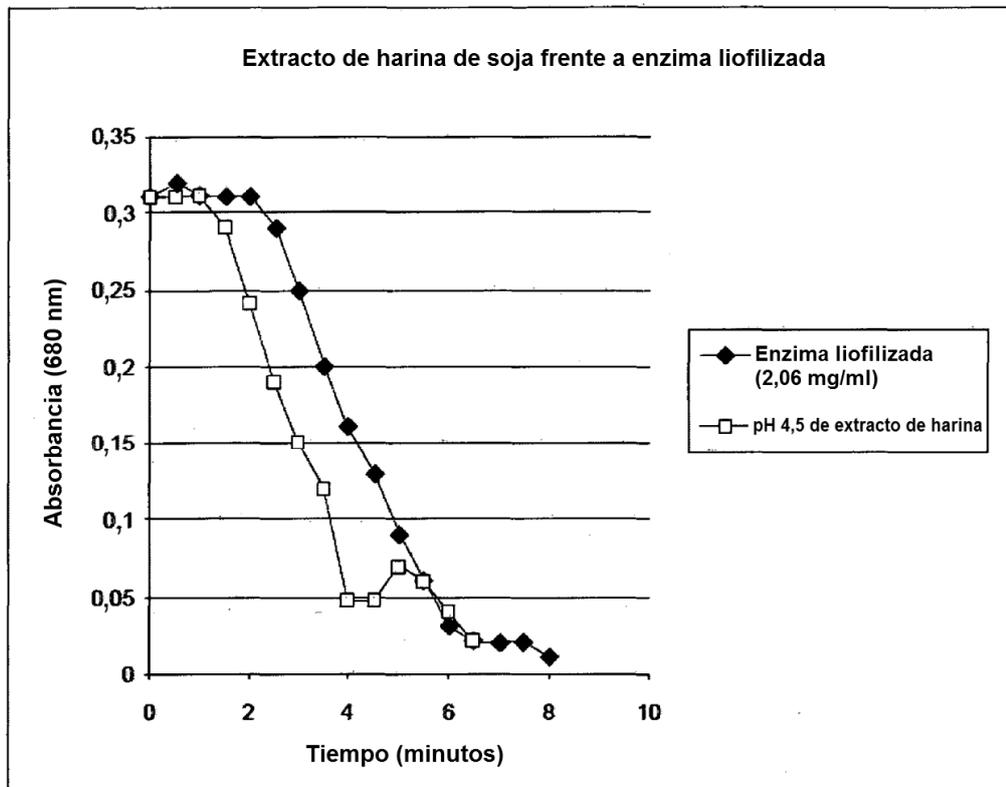


Figura 4.

pH 4,5 de extracto de harina

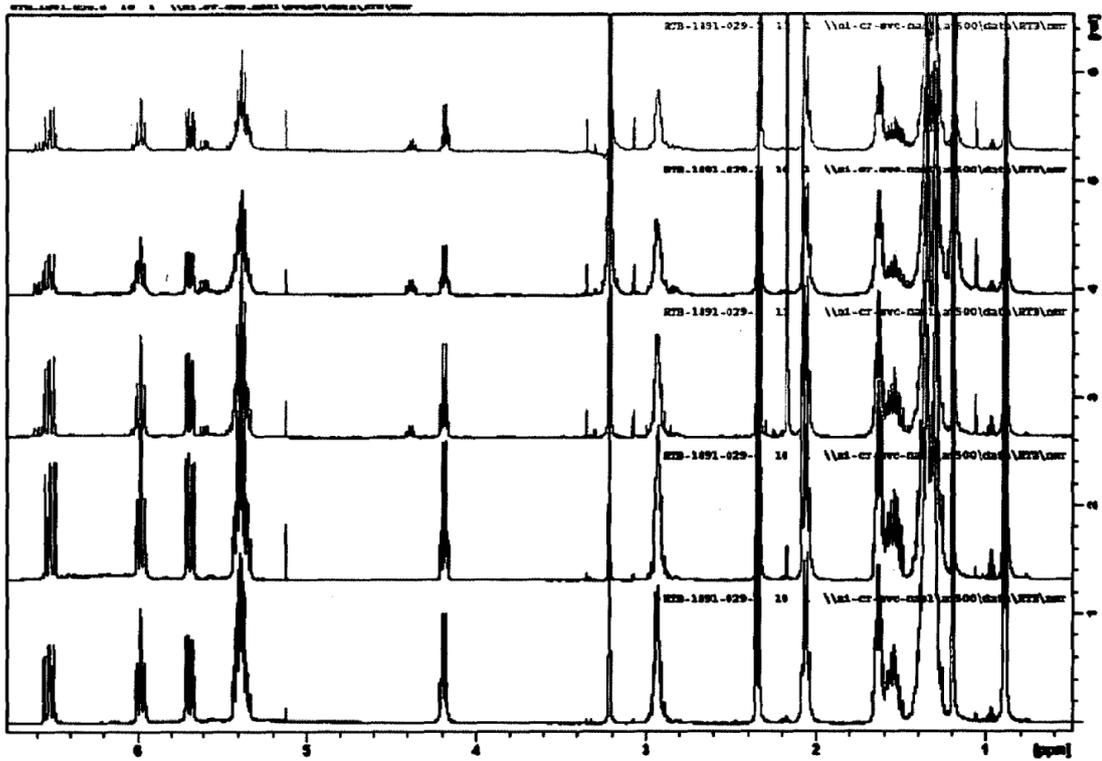
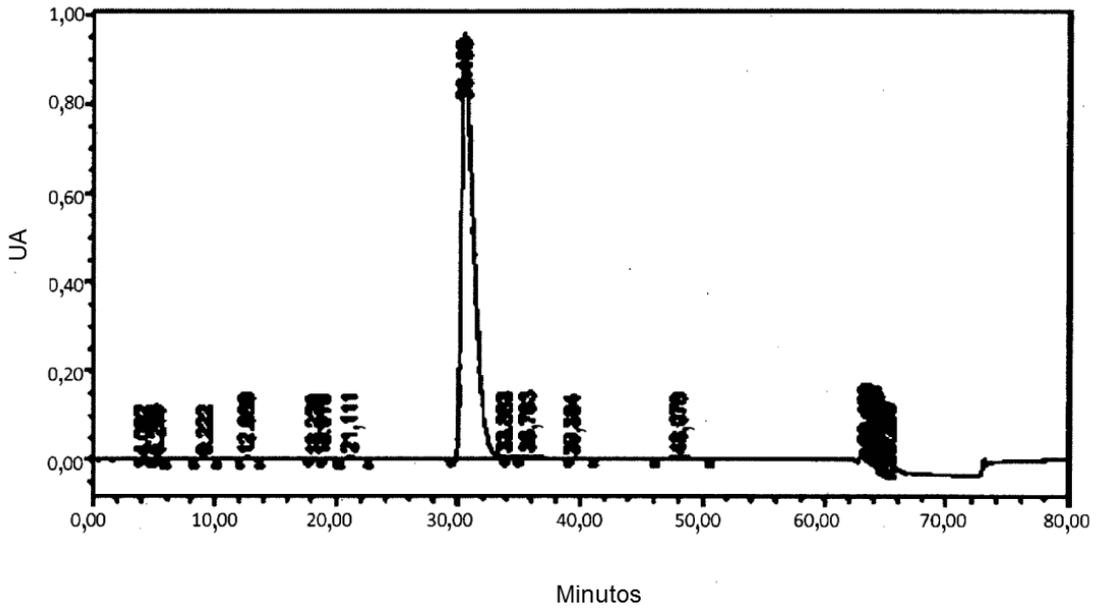
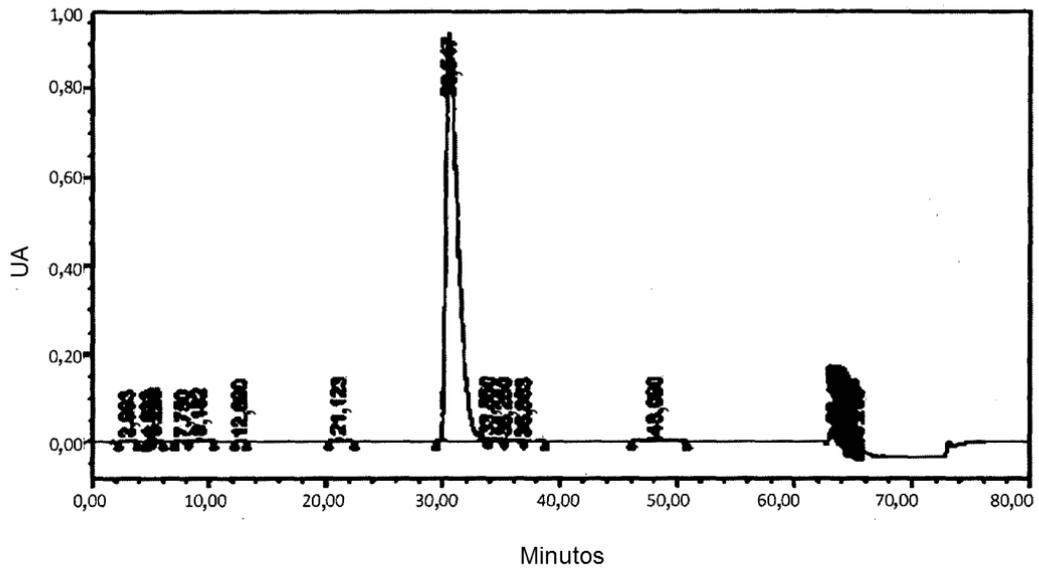


Figura 5.



|    | TA     | Área     | % de área | Altura |
|----|--------|----------|-----------|--------|
| 1  | 4,092  | 14319    | 0,02      | 491    |
| 2  | 5,289  | 53747    | 0,08      | 2621   |
| 3  | 9,222  | 107649   | 0,15      | 2119   |
| 4  | 12,669 | 94624    | 0,14      | 3424   |
| 5  | 18,228 | 23069    | 0,03      | 602    |
| 6  | 18,919 | 12393    | 0,02      | 234    |
| 7  | 21,111 | 249313   | 0,36      | 6240   |
| 8  | 30,493 | 67406888 | 96,41     | 959958 |
| 9  | 33,883 | 354403   | 0,51      | 6300   |
| 10 | 35,783 | 715188   | 1,02      | 7234   |
| 11 | 39,384 | 26625    | 0,04      | 352    |
| 12 | 48,076 | 380127   | 0,54      | 4002   |
| 13 | 63,450 | 39368    | 0,06      | 4560   |
| 14 | 63,494 | 49344    | 0,07      | 6471   |
| 15 | 63,772 | 36364    | 0,05      | 8674   |
| 16 | 63,832 | 57090    | 0,08      | 9174   |
| 17 | 64,061 | 80214    | 0,11      | 14865  |
| 18 | 64,161 | 60291    | 0,09      | 10040  |
| 19 | 64,304 | 60926    | 0,09      | 6320   |
| 20 | 64,867 | 82115    | 0,12      | 11808  |
| 21 | 65,250 | 11170    | 0,02      | 1124   |

Figura 6.



|    | TA     | Área     | % de área | Altura |
|----|--------|----------|-----------|--------|
| 1  | 2,993  | 46635    | 0,07      | 1070   |
| 2  | 4,832  | 11147    | 0,02      | 531    |
| 3  | 5,289  | 97308    | 0,14      | 4943   |
| 4  | 7,750  | 18570    | 0,09      | 515    |
| 5  | 9,182  | 258621   | 0,38      | 5446   |
| 6  | 12,690 | 17486    | 0,03      | 633    |
| 7  | 21,123 | 285590   | 0,42      | 7095   |
| 8  | 30,547 | 65793189 | 96,07     | 926358 |
| 9  | 33,852 | 378341   | 0,55      | 5501   |
| 10 | 35,250 | 233040   | 0,34      | 2799   |
| 11 | 36,883 | 72403    | 0,11      | 1723   |
| 12 | 48,090 | 627126   | 0,92      | 6544   |
| 13 | 63,417 | 68262    | 0,10      | 9218   |
| 14 | 63,476 | 116763   | 0,17      | 10406  |
| 15 | 63,764 | 125990   | 0,18      | 15052  |
| 16 | 64,048 | 77996    | 0,11      | 13171  |
| 17 | 64,150 | 40038    | 0,06      | 6405   |
| 18 | 64,328 | 44133    | 0,06      | 4723   |
| 19 | 64,866 | 156552   | 0,23      | 24257  |
| 20 | 65,283 | 16740    | 0,02      | 1013   |

Figura 7.

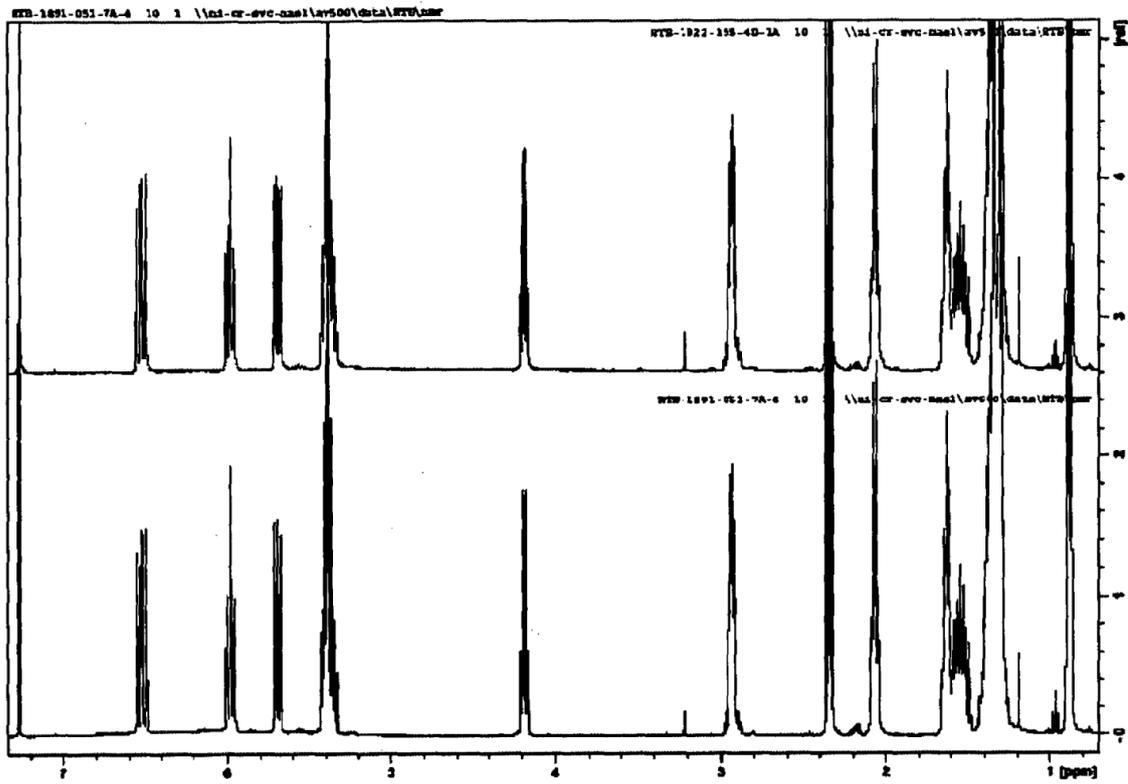


Figura 8.

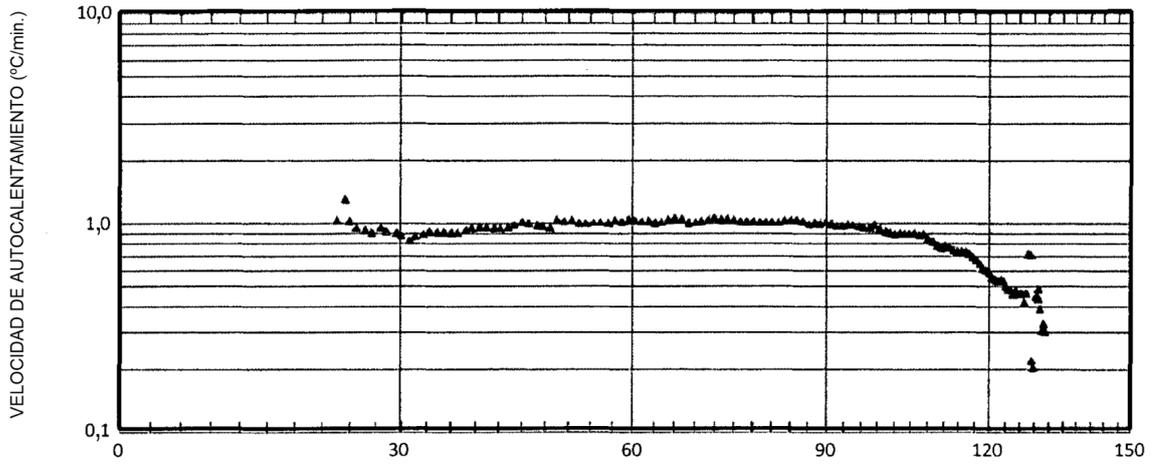


Figura 9.

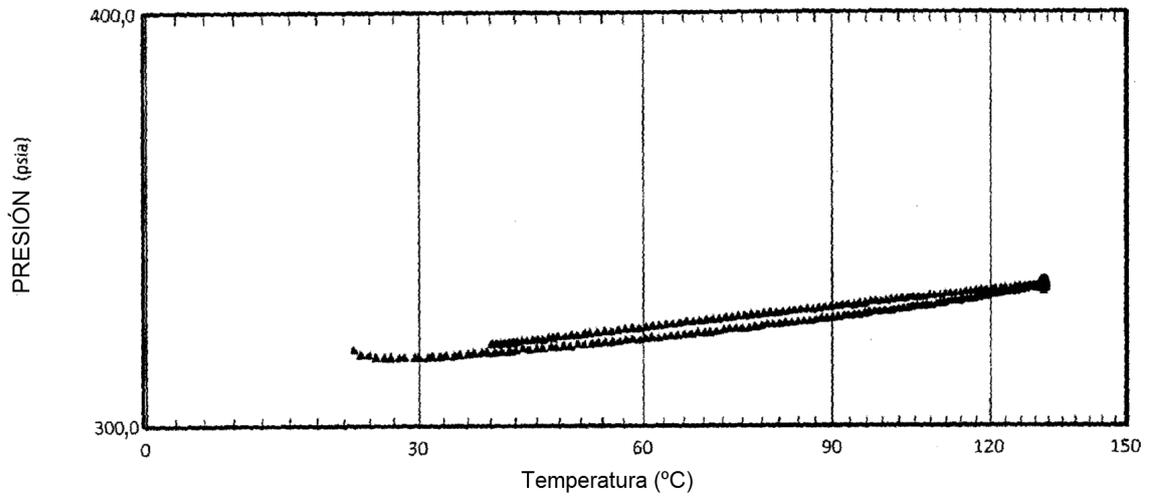


Figura 10.

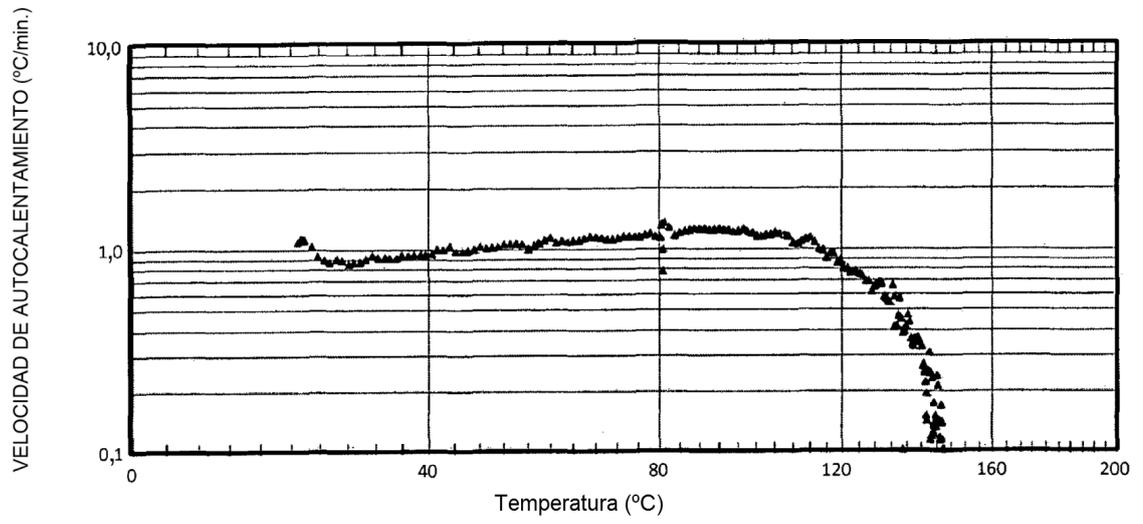


Figura 11.

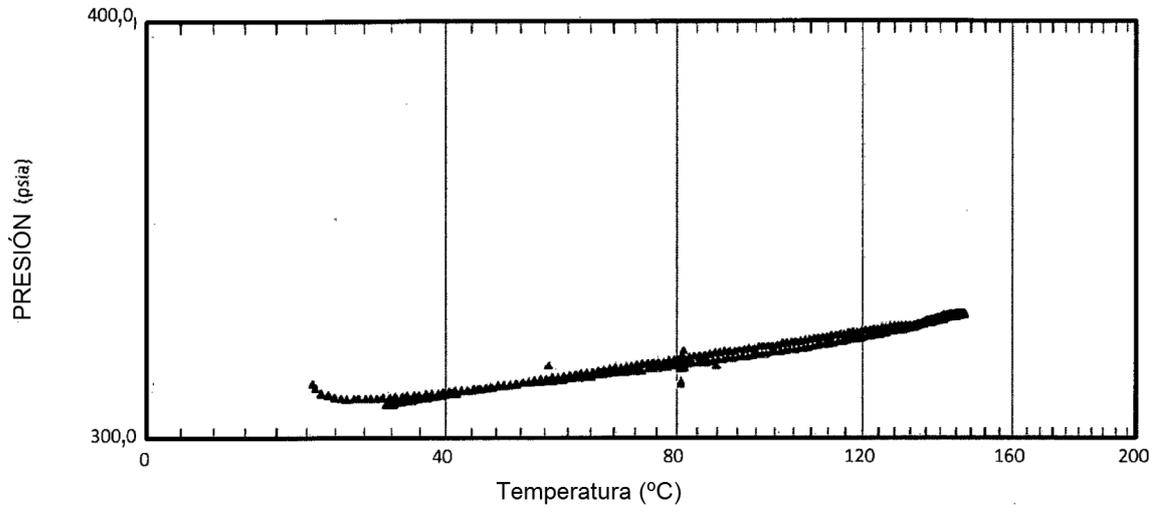


Figura 12.

ES 2 670 776 T3

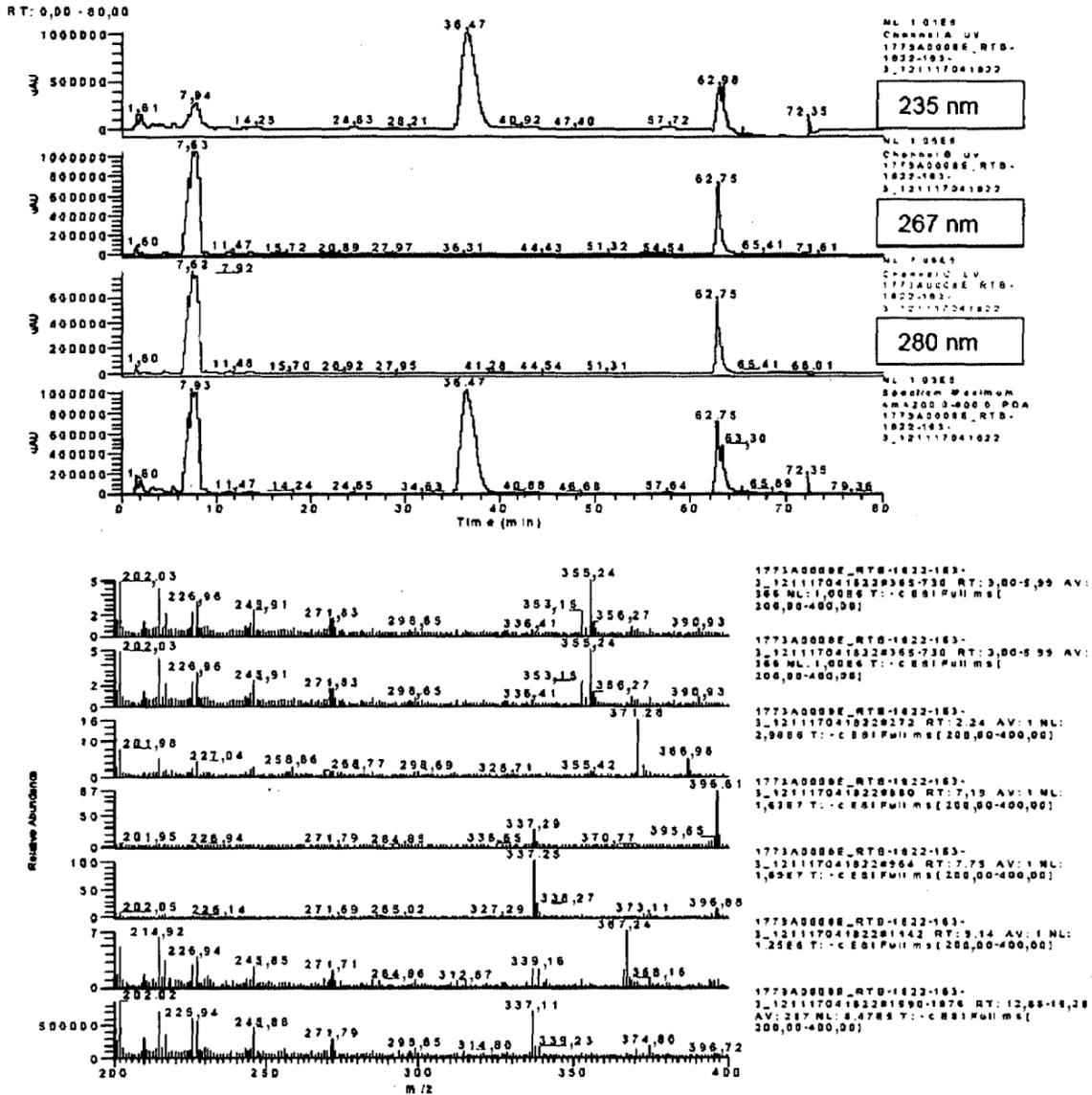


Figura 13.

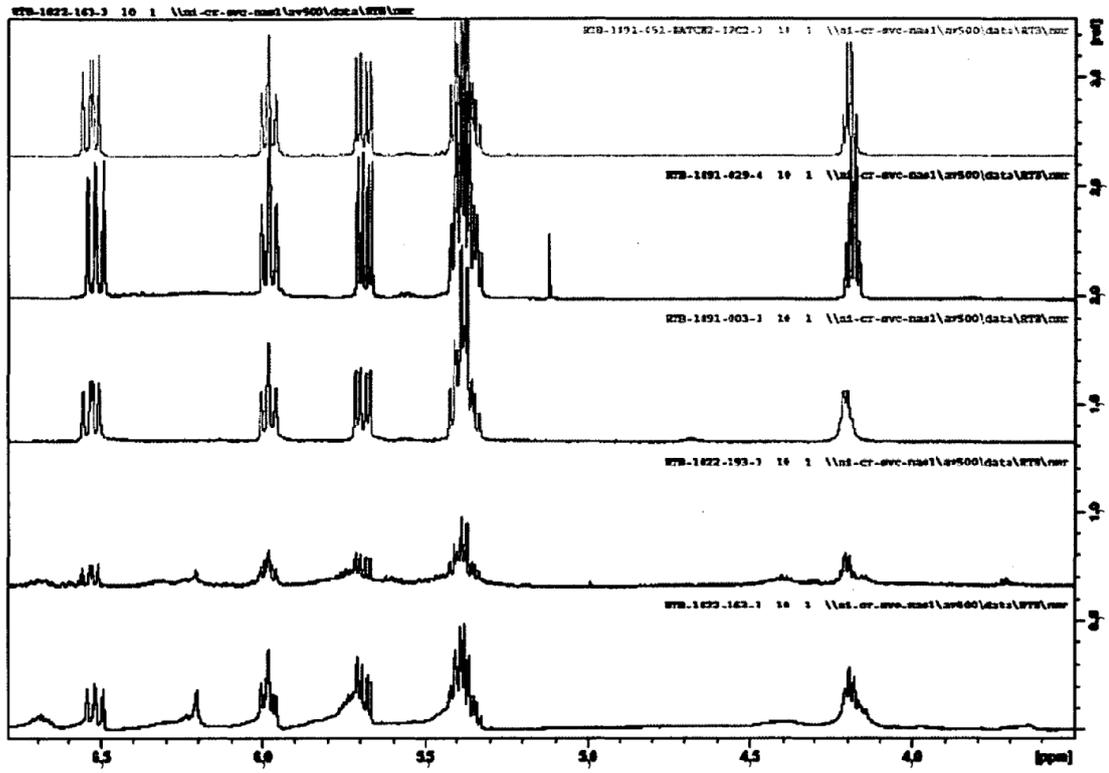


Figura 14.

| <b>Punto de tiempo</b> | <b>% de área de pureza (252 nm)</b> | <b>% de área de dímero Máximo de impureza a TA ~12,2 min.</b> |
|------------------------|-------------------------------------|---|
| <b>T=0</b>             | <b>97,2</b>                         | <b>0,44</b>   |
| <b>T=1 h</b>           | <b>97,2</b>                         | <b>0,44</b>   |
| <b>T=2 h</b>           | <b>97,3</b>                         | <b>0,44</b>   |
| <b>T=3 h</b>           | <b>97,2</b>                         | <b>0,44</b>   |
| <b>T=4 h</b>           | <b>97,2</b>                         | <b>0,44</b>   |
| <b>T=6 h</b>           | <b>97,1</b>                         | <b>0,44</b>   |
| <b>T=24 h</b>          | <b>97,4</b>                         | <b>0,49</b>   |
| <b>T=48 h</b>          | <b>97,5</b>                         | <b>0,49</b>   |
| <b>T= 66 h</b>         | <b>97,4</b>                         | <b>0,52</b>   |
| <b>T=112 h</b>         | <b>97,4</b>                         | <b>0,64</b>   |

Figura 15.

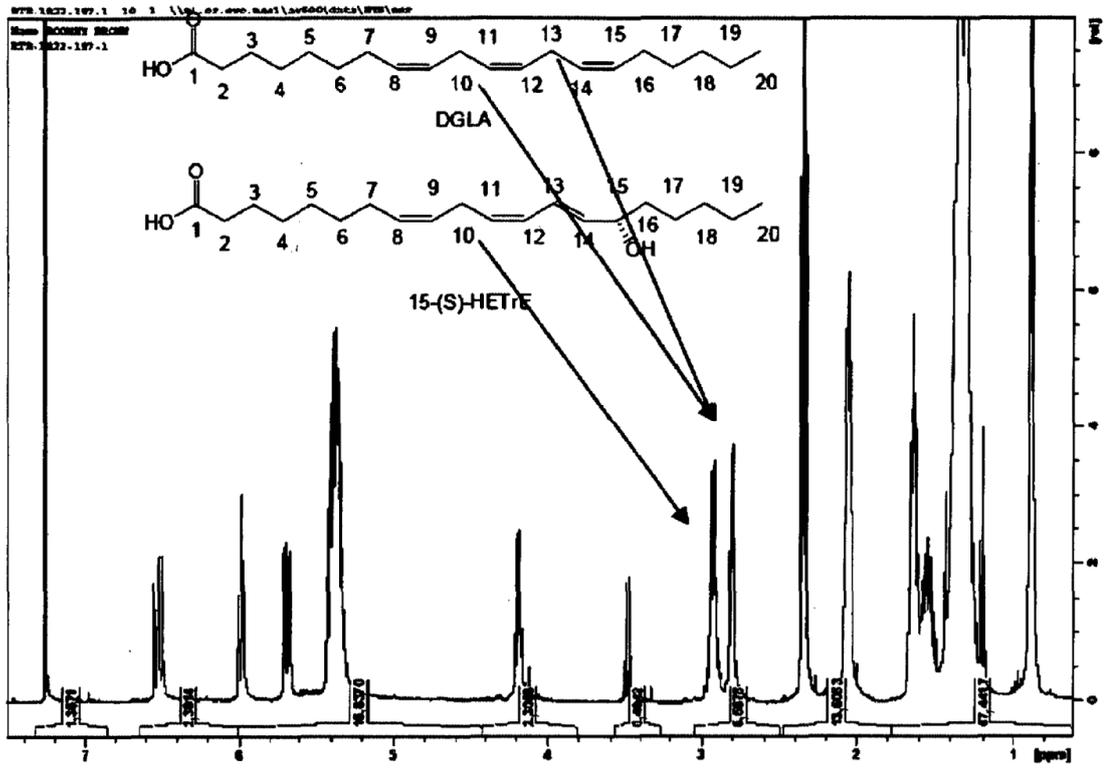
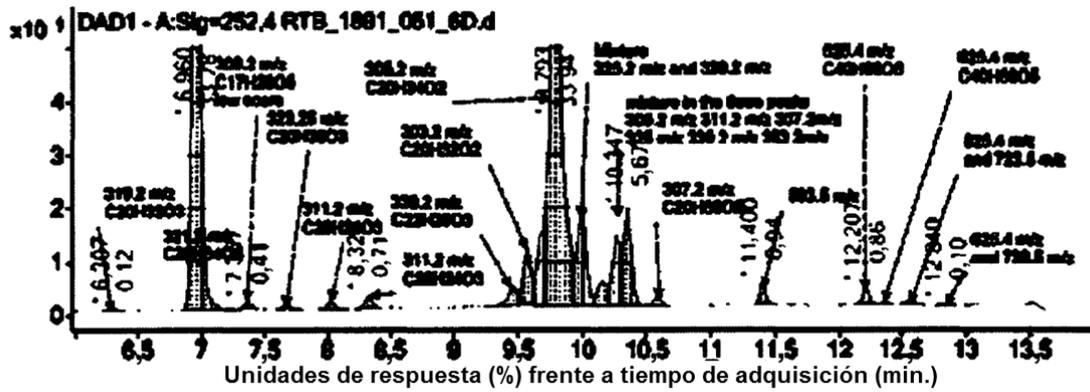
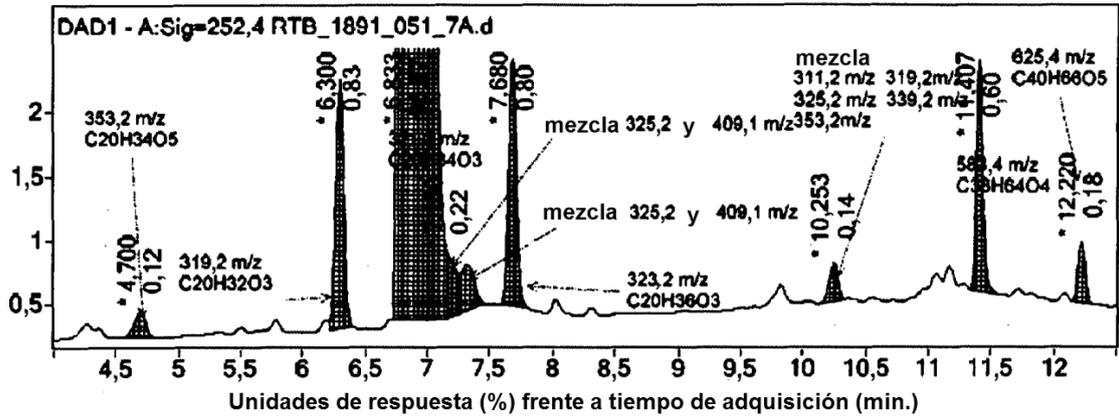


Figura 16.

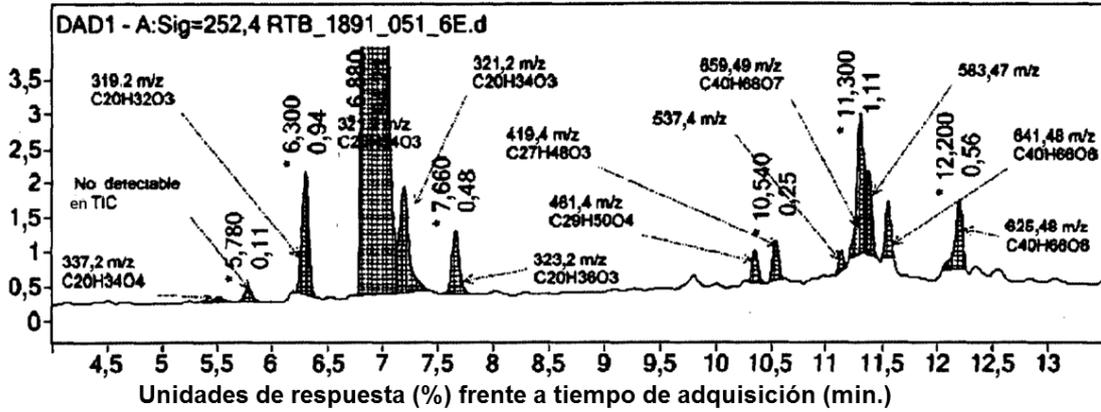




Lista de máximo de integración

| Inicio | TA     | Fin    | Altura | Área     | % de área |
|--------|--------|--------|--------|----------|-----------|
| 4,56   | 4,7    | 4,86   | 4,31   | 27,01    | 0,12      |
| 6,213  | 6,3    | 6,4    | 40,9   | 186,89   | 0,86      |
| 6,72   | 6,833  | 7,16   | 2081,9 | 21775,56 | 100       |
| 7,16   | 7,16   | 7,26   | 10,74  | 49,57    | 0,23      |
| 7,26   | 7,32   | 7,453  | 7,43   | 53,98    | 0,25      |
| 7,58   | 7,68   | 7,793  | 40,47  | 179,99   | 0,83      |
| 10,133 | 10,253 | 10,34  | 6,24   | 30,69    | 0,14      |
| 11,347 | 11,407 | 11,547 | 38,12  | 135,07   | 0,62      |
| 12,147 | 12,22  | 12,313 | 9,86   | 40,41    | 0,19      |

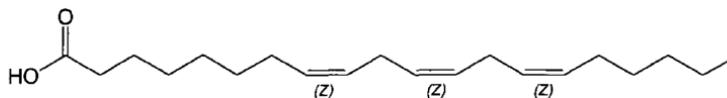
Figura 18.



Lista de máximo de integración

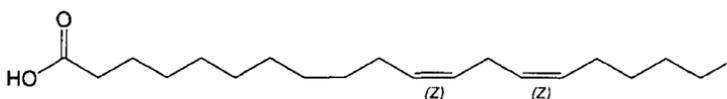
| Inicio | TA     | Fin    | Altura | Área     | % de área |
|--------|--------|--------|--------|----------|-----------|
| 5,373  | 5,513  | 5,62   | 1,08   | 5,14     | 0,04      |
| 5,7    | 5,78   | 5,873  | 3,16   | 13,98    | 0,11      |
| 6,22   | 6,3    | 6,393  | 28,16  | 122,96   | 1         |
| 6,773  | 6,88   | 7,127  | 1577,2 | 12310,66 | 100       |
| 7,127  | 7,193  | 7,413  | 24,49  | 150,72   | 1,22      |
| 7,56   | 7,66   | 7,773  | 14,3   | 62,65    | 0,51      |
| 10,293 | 10,353 | 10,453 | 7,27   | 26,17    | 0,21      |
| 10,487 | 10,54  | 10,613 | 9,04   | 32,05    | 0,26      |
| 11,073 | 11,133 | 11,187 | 4,9    | 14,74    | 0,12      |
| 11,207 | 11,3   | 11,353 | 31,89  | 144,96   | 1,18      |
| 11,353 | 11,353 | 11,46  | 19,22  | 67,5     | 0,55      |
| 11,507 | 11,56  | 11,613 | 12,82  | 43,51    | 0,35      |
| 12,053 | 12,2   | 12,247 | 15,64  | 72,73    | 0,59      |

Figura 19.



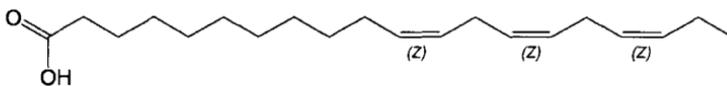
DGLA

Fórmula química:  $C_{20}H_{34}O_2$   
 Masa exacta: 306,26  
 Peso molecular: 306,48  
 m/z: 306,26 (100,0%), 307,26 (22,1%), 308,26 (2,7%)



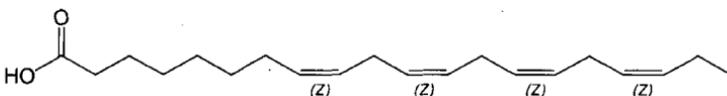
EDA

Fórmula química:  $C_{20}H_{36}O_2$   
 Masa exacta: 308,27  
 Peso molecular: 308,50  
 m/z: 308,27 (100,0%), 309,27 (21,6%), 310,28 (2,7%)



ETE

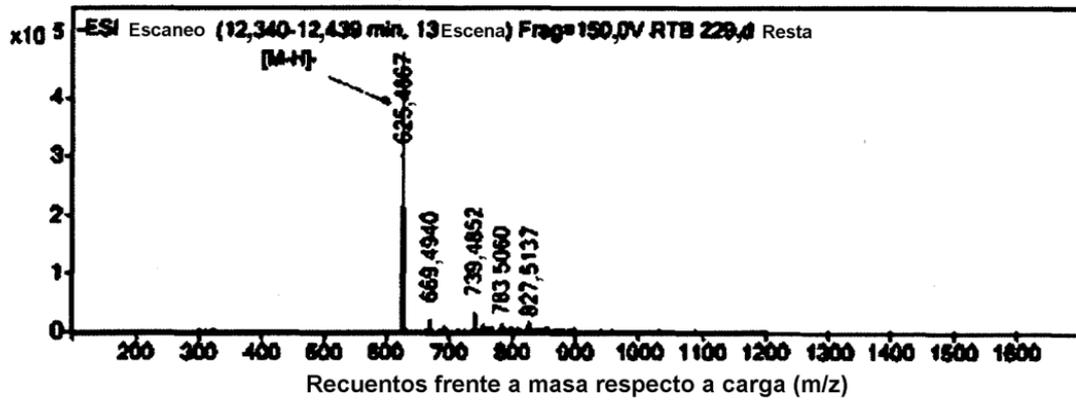
Fórmula química:  $C_{20}H_{34}O_2$   
 Masa exacta: 306,26  
 Peso molecular: 306,48  
 m/z: 306,26 (100,0%), 307,26 (22,6%), 308,26 (2,7%)



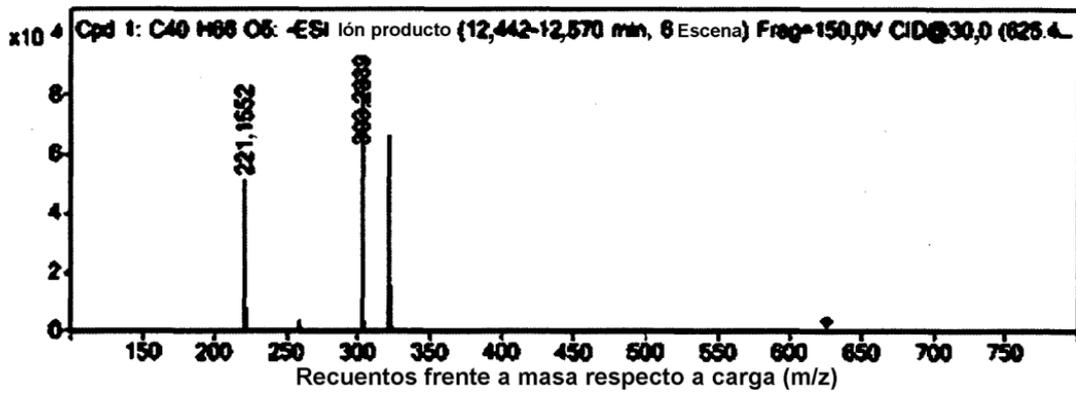
ETA

Fórmula química:  $C_{20}H_{32}O_2$   
 Masa exacta: 304,24  
 Peso molecular: 304,47  
 m/z: 304,24 (100,0%), 305,22 (22,6%), 306,25 (2,7%)

Figura 20.



Espectro MS/MS



Lista de máximo de espectro MS/MS

| m/z      | Calc m/z | Diff (ppm) | z | Abund | Fórmula    |
|----------|----------|------------|---|-------|------------|
| 221,1552 |          |            | 1 | 51347 |            |
| 222,1586 |          |            | 1 | 8394  |            |
| 303,2339 |          |            | 1 | 87005 |            |
| 304,2371 |          |            | 1 | 21094 |            |
| 321,2444 |          |            | 1 | 65635 |            |
| 322,2475 |          |            | 1 | 15864 |            |
| 221,1552 | 221,1547 | -2,39      | 1 | 51347 | C14 H21 O2 |
| 222,1586 |          |            | 1 | 8394  |            |
| 303,2339 | 303,233  | -3,01      | 1 | 87005 | C20 H31 O2 |
| 304,2371 |          |            | 1 | 21094 |            |
| 321,2444 | 321,2435 | -2,75      | 1 | 65635 | C20 H33 O3 |
| 322,2475 |          |            | 1 | 15864 |            |

Figura 21.

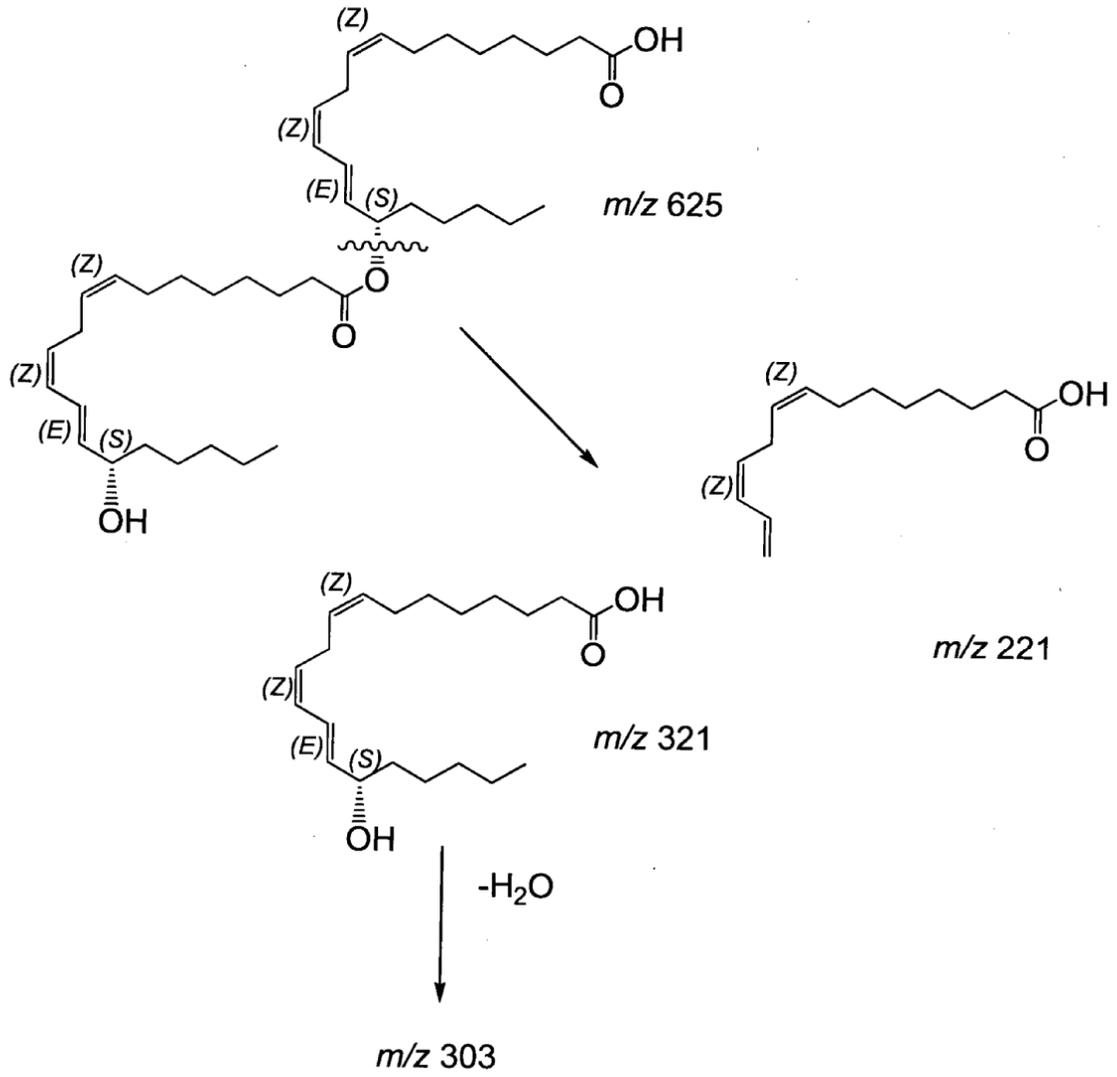


Figura 22.