

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 695 505**

51 Int. Cl.:

C07F 9/10

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2015 PCT/IB2015/054346**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015 WO15189766**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2015 E 15732957 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 3154993**

64 Título: **Proceso para la purificación de L- α -glicerofosforilcolina**

30 Prioridad:

10.06.2014 IT MI20141053

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

08.01.2019

73 Titular/es:

**CHEMI SPA (100.0%)
Via Dei Lavoratori, 54
20092 Cinisello Balsamo (MI), IT**

72 Inventor/es:

**DE FERRA, LORENZO;
ANIBALDI, MAURO;
ZENONI, MAURIZIO y
COCCHI, FABRIZIO**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 695 505 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

Proceso para la purificación de L- α -glicerofosforilcolina

El objeto de la presente invención es un proceso para la purificación de L- α -glicerofosforilcolina, en donde la L- α -glicerofosforilcolina se cristaliza de DMSO o de una mezcla de DMSO con al menos otro solvente, preferiblemente seleccionado de agua, alcohol, solventes halogenados, éteres, ésteres y/o amidas. Tal proceso permite obtener L- α -glicerofosforilcolina, que también constituye un objeto de la presente invención, que tiene una pureza mayor de o igual al 99,9%; en particular, permite obtener GPC contaminada en menos del 0,1% por su isómero β -GPC y/o en menos del 0,1% por la especie cíclica cGP.

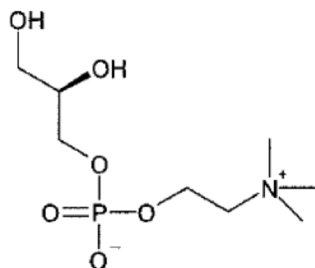
Un objeto adicional de la presente invención está representado por un método para determinar la pureza de L- α -glicerofosforilcolina que comprende la elución de L- α -glicerofosforilcolina a través de una columna de HPLC que tiene una fase estacionaria amino, y la posterior detección de L- α -glicerofosforilcolina misma, y cualquier impureza de la misma, por medio de un tipo de detector de dispersión de luz evaporativa.

Las actuales tendencias económicas y demográficas han llevado a un envejecimiento general de la población, y este fenómeno está particularmente marcado en las regiones más ricas del globo.

La disminución de las capacidades individuales con el envejecimiento, por tanto, se ha convertido en un problema muy importante, y hay una necesidad creciente de identificar métodos que ayuden a ralentizar esta disminución.

En particular, el debilitamiento de las capacidades intelectuales es una de las consecuencias más negativas del envejecimiento, y muchos esfuerzos de investigación se dedican a encontrar terapias eficaces para combatirlo.

En esta área, uno de los productos de mayor interés es L- α -glicerofosforilcolina (GPC), cuya estructura se muestra a continuación.



GPC tiene un uso bien establecido como agente terapéutico en el campo de trastornos cognitivos, y su consumo mundial, basado en una amplia confirmación de eficacia en la práctica médica y en numerosos ensayos clínicos, está bien establecido.

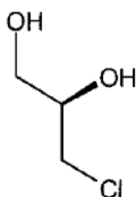
Los métodos de preparación de GPC se pueden dividir en dos tipos principales: los basados en la reacción de desacetilación de fosfatidilcolina de origen natural, y esos en donde GPC se sintetiza a partir de materias primas comercialmente disponibles en el mercado de intermedios químicos.

Los métodos del primer tipo tienen la ventaja de usar como materia prima productos, tal como lecitina de soja, ya ampliamente usados en la industria alimentaria, y caracterizados en que su manejo no genera riesgos de seguridad particulares.

Los procedimientos basados en el enfoque sintético de GPC pueden, en su lugar, dar lugar a problemas en el tratamiento de las sustancias usadas y, en particular, de los precursores sintéticos quirales. Estos son principalmente R-glicidol y R-cloropropanodiol (estructuras I y II esbozadas posteriormente, respectivamente) y, en ambos casos, estas son moléculas alquilantes que tienen considerables características de toxicidad. Por tanto, está claro cómo su uso puede generar problemas de peligrosidad durante el uso y manejo, e incluso peligro en el consumo de la GCP obtenida a partir de estos, en caso de vestigios residuales o si otras especies estuvieran presentes (por ejemplo, intermedios o subproductos) que mantienen sus características de toxicidad.



I



II

Cualquiera que sea el método de preparación de GPC, la parte que se refiere a su purificación y aislamiento tendrá un gran impacto en la calidad del producto, en particular, su pureza química puede influir su toxicidad y perfil terapéutico. Tal pureza se verifica tradicionalmente mediante "cromatografía de capa fina" (TLC). Este tipo de análisis tiene buenas características de versatilidad y permite evaluar la muestra como un todo, ya que todos los componentes, desde el más polar al menos polar, son visibles al mismo tiempo. Sin embargo, esta técnica analítica no es completamente satisfactoria con respecto a la determinación cuantitativa de cualquier impureza y la separación de especies con características estructurales similares, tal como, por ejemplo, isómeros con polaridad comparable.

HPLC es la técnica analítica más frecuentemente adoptada para superar estos defectos de TLC; en el caso de GPC, el uso de HPLC resultó, sin embargo, menos fácil de lo habitual debido a las características de alta polaridad del analito, que limitan la interacción con las fases estacionarias, y la ausencia de cromóforos que hacen posible el uso de un detector de UV, es decir, el detector más prevalente en laboratorios de control de calidad. Los métodos publicados son insatisfactorios por sensibilidad, y por la forma de las señales cromatográficas que tienen picos agrandados o asimétricos; en estas condiciones hay una reducción de poder de separación, y existe el riesgo de tener señales correspondientes a ciertas especies que están ocultas bajo otras señales cromatográficas, lo que produce pérdida de la capacidad para resaltar cualquier impureza presente. Véase, por ejemplo, J.Am.Oil Chem.Soc (2012) 89:1155-1163; Talanta (2012) 94:22-29; Journal of Chromatography A (2012) 1220:108-114.

El documento US 2012/244583 divulga un método para preparar L-[alfa]-glicerofosforilcolina con altos rendimientos y pureza de hasta el 99,8%. Esta situación está mal relacionada con las actuales directrices en el campo farmacéutico, que proporcionan una descripción detallada del perfil de impurezas en la producción de principios activos pretendidos para uso humano.

El desarrollo de nuevas técnicas analíticas para la determinación de la calidad de las diferentes preparaciones de GPC es por tanto de importancia principal y, en el caso de que la presencia de impurezas en la preparación de GPC se resaltara con tales técnicas analíticas, la definición de nuevos estándares de pureza para GPC, y nuevos procedimientos de purificación de modo que permitan la producción de GPC según los actuales estándares de calidad.

Descripción de los dibujos

Figura 1. Cromatograma de HPLC-ELSD de GPC obtenida mediante el procedimiento 1

Figura 2. Cromatograma de HPLC-ELSD de GPC obtenida del ejemplo 2

Figura 3. Cromatograma de HPLC-ELSD de GPC obtenida del ejemplo 1 (comparativo)

Figura 4. Espectro de ^{31}P -RMN de GPC obtenida mediante el procedimiento 2

Figura 5. Espectro de ^{31}P -RMN de GPC obtenida del ejemplo 3

Figura 6. Cromatograma de HPLC-ELSD de GPC obtenida mediante el procedimiento 1

Figura 7. Cromatograma de HPLC-ELSD de GPC obtenida del ejemplo 3

Figura 8. Cromatograma de HPLC-ELSD de GPC obtenida mediante el procedimiento 3

Figura 9. Cromatograma de HPLC-ELSD de GPC obtenida del ejemplo 4

Figura 10. Cromatograma de HPLC-ELSD de GPC obtenida del ejemplo 5 (comparativo)

Figura 11. Cromatograma de HPLC-ELSD de GPC obtenida mediante el procedimiento 4

Figura 12. Cromatograma de HPLC-ELSD de GPC obtenida del ejemplo 6

Figura 13. Cromatograma de HPLC-ELSD de GPC obtenida del ejemplo 7 (comparativo)

Descripción de la invención

Se ha encontrado ahora inesperadamente que en el análisis por HPLC de GPC es posible superar los problemas descritos anteriormente mediante el empleo adecuado de un tipo de columna cromatográfica de HPLC amino, es decir, esas en donde una funcionalidad amino está unida a la superficie de la fase estacionaria. Varias columnas de este tipo están comercialmente disponibles: por ejemplo, Supelcosil™ LC-NH₂, Hypersil Gold™ amino, Zorbax® NH₂, YMC™ Polyamine II, Nucleosil® NH₂, Luna® NH₂. La fase estacionaria puede consistir en partículas de material soporte, tal como, por ejemplo, sílice, con un recubrimiento que consiste en un recubrimiento de polímero que contiene grupos amino, preferiblemente grupos amino secundarios y terciarios. La descripción de una fase estacionaria de este tipo se describe en las páginas 22 y 23 de la publicación "HPLC Columns YMC Classics", por YMC Europe GmbH.

Al mismo tiempo, se tendrá que usar un tipo de detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD).

Tales detectores se describen, por ejemplo, en Anal.Chem (1997) 69:561A-563A y el documento US6229605. Estas son herramientas en las que el eluato se envía a una cámara de evaporación donde el solvente se evapora para dejar una niebla de partículas de muestra minúsculas que dispersan un haz de luz. La respuesta del detector es proporcional a la difusión que depende de la cantidad de muestra presente; este sistema hace posible la detección de especies que carecen de cromóforos, tal como GPC, también mientras se usan métodos de elución no isocráticos.

Con esta combinación de fase estacionaria y detector, se pueden usar varios eluyentes y, en particular, sistemas que consisten adecuadamente en sistema tampón acuosos tal como, por ejemplo, tampón acetato de amonio, posiblemente en combinación con solventes orgánicos tal como, por ejemplo, metanol y/o acetonitrilo. Tales sistemas de eluyentes se pueden usar en modo isocrático, es decir, manteniendo el mismo eluyente durante la duración entera de la carrera cromatográfica, o en modo gradiente, en donde la composición del eluyente varía durante la cromatografía según un programa predeterminado. La optimización del método de análisis se realizará según las enseñanzas de la técnica.

Un objeto de la presente invención es por tanto un método para determinar la pureza de L- α -glicerofosforilcolina que comprende la elución de L- α -glicerofosforilcolina a través de una columna de HPLC que tiene una fase estacionaria amino, y la posterior detección de L- α -glicerofosforilcolina misma, y cualquier impureza de la misma, por medio de un tipo de detector de dispersión de luz evaporativa.

La fase o fases eluyente pueden consistir en una solución acuosa, un solvente orgánico polar, o una mezcla de los mismos; la solución acuosa preferiblemente tiene un pH que varía entre 3 y 6, incluso más preferiblemente entre 4 y 5. El solvente orgánico polar puede ser un alcohol de C₁-C₄, acetonitrilo, o una mezcla de los mismos; el alcohol de C₁-C₄ es preferiblemente metanol.

Esta combinación permite superar el defecto del agrandamiento del pico cromatográfico correspondiente a GPC, y al mismo tiempo permite llevar a cabo la determinación de la concentración de GPC con alta sensibilidad.

Al mismo tiempo, se encontró que es posible detectar la presencia en preparaciones de GPC de otras especies que derivan del proceso de preparación de GPC empezando de lecitina de soja.

Entre estas especies están incluidas L- α -glicerofosfoetanolamina (GPE), azúcares, y análogos de los mismos que derivan de su presencia, o la presencia de uno de sus precursores, en la lecitina de soja usada como materia prima en el proceso de producción de GPC.

Habiendo obtenido este importante resultado, era de interés inmediato verificar de una manera más sensible y selectiva que en el pasado, el perfil de impurezas, si estaban presentes, en muestras de GPC obtenida por métodos de producción más adecuados para el producto farmacéutico para uso humano.

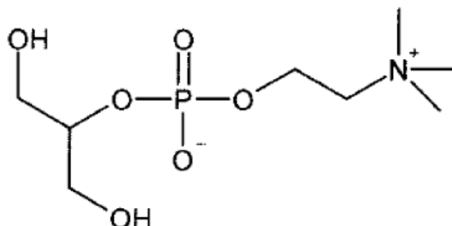
Para este fin, se consideraron principalmente procesos semisintéticos basados en desacetilación de lecitina de soja, juzgándose que el procedimiento completamente sintético era inadecuado para la producción de GPC para uso humano, en vista de la potencial contaminación con materias primas muy tóxicas, tal como glicidol o cloropropanodiol, que se usan en estos procedimientos. Mientras se consideran dichas contraindicaciones relacionadas con la producción de GPC mediante una ruta completamente sintética, una muestra de GPC de origen chino, producida con este enfoque, se sometió al nuevo procedimiento analítico, para una evaluación completa.

Las muestras que derivaban de procedimientos semisintéticos se generaron según los procedimientos descritos en el documento WO9013552 (específicamente el ejemplo 2) y el documento EP575717 (específicamente el ejemplo 1). En estos documentos, se describen procedimientos basados en la purificación de GPC con resinas de intercambio iónico, y no implican la precipitación de GPC como aducto con cloruro de cadmio (GPC·CdCl₂) y cromatografía en sílice; por tanto, estos son métodos que, evitando el uso de sales tóxicas de cadmio y un procedimiento caracterizado por la baja productividad, son realmente aplicables a la producción a gran escala de GPC.

Los resultados del análisis mostraron, en todas las muestras, la presencia de un pico que eluye antes y con un tiempo de retención muy cerca del de GPC, que tiene un TRR (tiempo de retención relativo) igual a aproximadamente 0,94. Esta señal, de intensidad significativa, no corresponde a especies que hubiera sido razonables esperar en vista del proceso de preparación, tal como glicerol, GPE, ácido glicerofosfórico, o sacarosa.

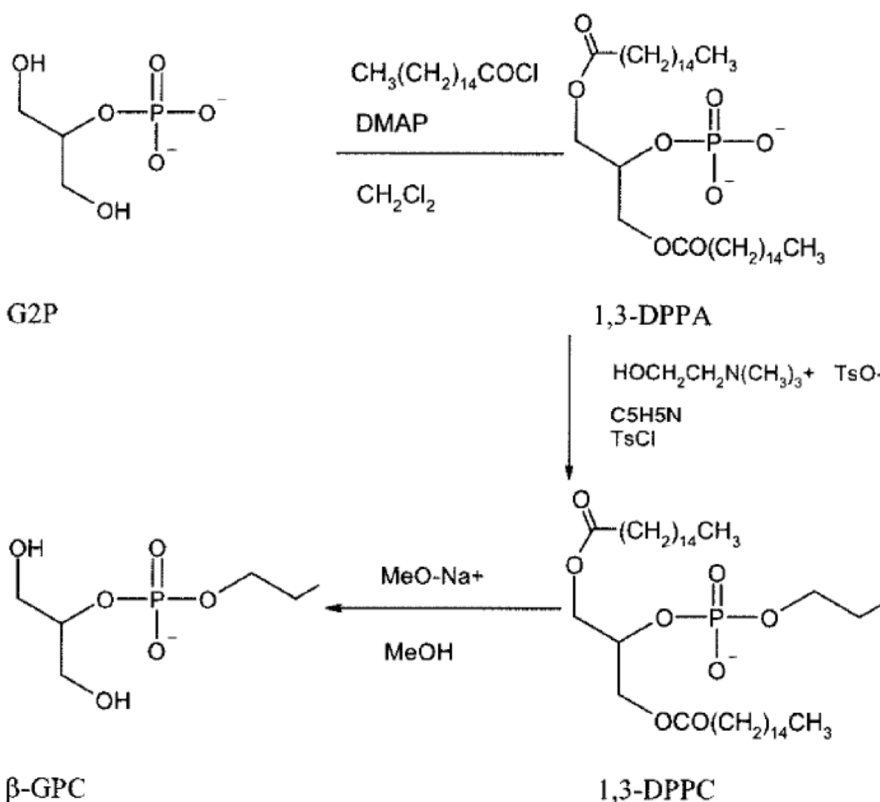
Dado que el comportamiento cromatográfico de la nueva especie detectada era tan similar al de GPC, como para no ser destacada hasta ahora, y que incluso con el nuevo método de HPLC objeto de la presente invención se diferenciaba muy poco del de GPC, hipotetizamos entonces que correspondía a un isómero posicional de la misma.

La estructura del isómero beta de GPC (β -GPC) se describe a continuación.



β -GPC

β -GPC no está comercialmente disponible y, para comprobar si β -GPC pudiera ser la especie detectable con el nuevo método, su síntesis se llevó a cabo según el esquema ilustrado a continuación.

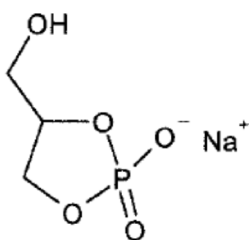


La β -GPC así obtenida se analizó por RMN, para confirmar la estructura, y por HPLC mostrando que no solo su pureza era alta, sino que también su tiempo de retención era compatible con el de la especie desconocida revelada analizando las diferentes muestras de GPC. Por tanto, era posible atribuir a la señal desconocida una correspondencia con la estructura de β -GPC, y esta atribución se confirmó por experimentos de "adición" de HPLC, en donde a una muestra de GPC que muestra la presencia de la especie con un TRR a aproximadamente 0,94 en HPLC, se añadieron cantidades calibradas de β -GPC, observándose el correspondiente aumento de la señal con TRR a aproximadamente 0,94 sin una separación de la misma.

Como confirmación adicional de la atribución de la estructura, se realizaron experimentos de ^{31}P -RMN que permitieron la identificación de una señal a aproximadamente -0,6 ppm en las muestras en donde la presencia de la especie con TRR a aproximadamente 0,94 era mayor. La señal de la β -GPC sintetizada según el esquema descrito anteriormente se reveló en el mismo valor de campo.

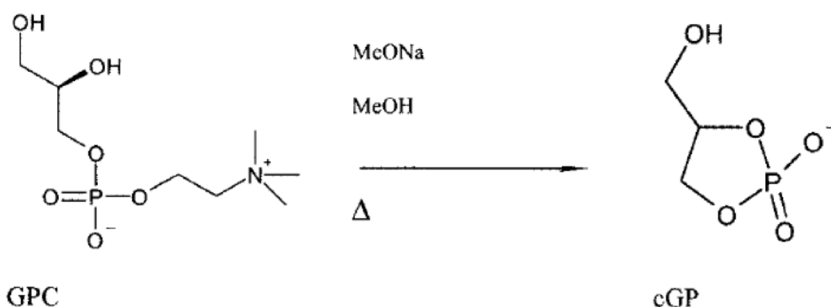
El método de ^{31}P -RMN es por tanto una posible alternativa al procedimiento de HPLC, sin embargo, debido a su menor sensibilidad y la disponibilidad más amplia de instrumentación de HPLC en laboratorios de control de calidad, el método de HPLC objeto de la presente invención permanece preferible para la determinación de la especie que tiene TRR de aproximadamente 0,94 (β -GPC).

Por medio de análisis de ^{31}P -RMN también fue posible identificar en el espectro del producto obtenido según el documento EP575717 una señal adicional a aproximadamente 18,4 ppm. Estos valores son compatibles con los del fosfato cíclico cGP, ilustrado a continuación en la forma de la sal de sodio.



cGP (sal de sodio)

La formación de este fosfato cíclico es concebible en las condiciones de aislamiento de GPC según el procedimiento del documento EP575717. Para apoyar esta hipótesis, se preparó una muestra auténtica de cGP según el esquema ilustrado a continuación.



El análisis por ^{31}P -RMN de este producto confirmó la asignación, mostrando la misma señal a aproximadamente 18,4 ppm y la ausencia de separación de la señal en experimentos de adición apropiados.

A la luz de lo que se encontró con los métodos analíticos innovativos que representan una forma de realización de la invención, se ha verificado experimentalmente si los métodos de purificación de GPC conocidos podrían eliminar de forma adecuada las impurezas resaltadas.

Excluyendo, por las razones ya expresadas, la purificación por formación de complejos con cloruro de cadmio y cromatografía en sílice, hemos identificado la cristalización de etanol como el mejor procedimiento, en términos de aplicabilidad industrial, entre los descritos en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO9013552): La muestra obtenida según el procedimiento del documento WO9013552 se cristalizó de etanol, pero el análisis por HPLC mostró que la purificación solo era parcial, estando una cantidad significativa de isómero beta (0,48%) aún presente en el producto.

La siguiente tabla 1 resume los resultados analíticos de las muestras de GPC obtenidas según los diferentes procedimientos de preparación.

Tabla 1

Muestra	Procedimiento de preparación	β -GPC (% de área por HPLC)	cGP (% de área por ^{31}P -RMN)	Nota
Procedimiento 1	WO9013552	0,8%		
Procedimiento 2	EP575717	0,1%	0,2%	
Ejemplo 1 (comparativo)		0,48%		Cristalización de etanol de la muestra del procedimiento 1
GPC comercial	Síntesis	1,8%		GPC comercial producida en China. Varias otras impurezas presentes en una cantidad total del 3% como % de área por HPLC

Un nuevo sistema para la purificación de GPC se ha identificado ahora, y este descubrimiento también representa una forma de realización de la invención.

5 La nueva purificación se basa en el uso de dimetilsulfóxido (DMSO). Para la realización de la invención, este solvente se puede usar en diferentes condiciones y en diferentes proporciones cuantitativas con respecto a la GPC que se va a purificar.

10 En una forma de realización de la invención, además de DMSO, otros solventes pueden estar presentes, tal como solventes polares, de polaridad media o no polares. Estos solventes adicionales pueden pertenecer a diferentes clases de solventes tal como, pero no limitados a, solventes halogenados, alcoholes, éteres, ésteres y amidas.

15 Los ejemplos de solventes que se pueden emplear para la realización de la invención son, pero sin limitarse a, agua, metanol, etanol, isopropanol, n-butanol, cloruro de metileno, tetrahidrofurano, acetato de etilo y DMF.

20 Según la invención, se usa DMSO en una cantidad que varía entre 2 y 100 partes en volumen por una parte en peso de L- α -glicerofosforilcolina, preferiblemente entre 3 y 70, más preferiblemente proporciones que varían entre 4 y 30, más preferiblemente proporciones que varían entre 5 y 15 partes en volumen.

Según un aspecto adicional de la invención, cualquier solvente o cualesquiera solventes adicionales se usan en una cantidad que varía entre 0,01 y 10 volúmenes por volumen de DMSO, preferiblemente de 0,05 a 5, más preferiblemente proporciones que varían entre 0,1 y 1.

25 Dependiendo de los parámetros del proceso, se puede obtener una cristalización apropiada de GPC, o la purificación de cristales de GPC que contienen impurezas también se puede realizar suspendiéndolos en DMSO, usando combinaciones adecuadas de tiempo y temperatura, y después separando los cristales de la fase líquida; también en este caso otros solventes pueden estar presentes en combinación con DMSO.

30 La purificación se puede realizar a diferentes temperaturas; como es habitual, puede ser conveniente adoptar diferentes temperaturas en las diferentes fases del proceso de purificación, teniendo una temperatura inferior en la fase del aislamiento inicial de GPC.

35 Las temperaturas adecuadas para la conducción de la purificación pueden estar entre 100°C y 0°C, preferiblemente entre 70°C y 5°C, más preferiblemente entre 50°C y 15°C.

40 Al elegir la temperatura, sería preferible considerar la temperatura de congelación del DMSO, que puede variar principalmente dependiendo de la presencia de solventes adicionales, y la concentración de GPC y otras especies presentes.

45 Para el aislamiento de GPC, se puede usar equipo conocido para el experto en la materia, tal como centrifugas o sistemas de filtración, cerrados o abiertos. Los cristales se pueden someter directamente a un procedimiento de lavado usando el mismo solvente, o la misma mezcla de solventes, usado para la purificación; alternatively, para lavar el producto, se pueden usar solventes o mezclas de solventes diferentes de los usados en la etapa de cristalización o suspensión.

50 La proporción de DMSO que se va a usar comparada con la cantidad de GPC usada en el proceso de purificación objeto de la invención puede variar considerablemente, y se puede elegir de forma conveniente según las enseñanzas de la técnica. En la práctica, para no reducir más de lo requerido la productividad del proceso, será conveniente usar cantidades no demasiado altas de DMSO y, por otra parte, estas cantidades no se deben reducir excesivamente para evitar crear dificultades en las operaciones de separación del producto cristalizado. Las proporciones de DMSO y GPC que varían entre 2 y 100 partes en volumen (litros) por partes en peso (kg) se consideran convenientes para esta forma de realización, más preferiblemente proporciones que varían entre 3 y 70, más preferiblemente proporciones que varían entre 4 y 30, más preferiblemente proporciones que varían entre 5 y 15 partes en volumen por parte en peso de GPC.

Un modo particularmente ventajoso de llevar a cabo esta invención es la cristalización de GPC de sus soluciones en agua, u otros solventes, o mezclas de solventes. Al añadir DMSO a tales soluciones, se encontró que se obtienen soluciones que son estables durante un tiempo suficiente para realizar las operaciones de destilación sin precipitación concurrente de GPC. Explotando la mayor temperatura de ebullición del DMSO con respecto a los otros solventes comúnmente usados, es por tanto posible modificar, sin obstáculos causados por la precipitación simultánea del producto, la composición de la mezcla de solventes usada para realizar la cristalización.

Una vez se ha alcanzado la composición de la mezcla de solventes, es posible inducir la cristalización de GPC por adición de una alícuota de GPC cristalizada, que actuará como un desencadenante. Esta opción no parece ser requerida; cuando su aplicación se desea, se puede usar una muestra de cristales de GPC como un desencadenante que no debe tener necesariamente un grado de pureza particularmente alto, ya que no se ha observado una dependencia estrecha entre la calidad del desencadenante usado y la de los cristales de GPC aislados al final de la purificación.

Fue sorprendente observar cómo estos procedimientos de purificación usando DMSO permiten obtener GPC de alta pureza, incluso de preparaciones que comprenden cantidades significativas de otras especies moleculares, incluyendo las previamente descritas.

En particular, la capacidad del sistema de purificación objeto de la presente invención para eliminar el isómero beta de GPC parece significativa e impredecible, ya que tiene características quimicofísicas muy similares a las del producto cuyo aislamiento con alto grado de pureza se desea.

A diferencia de cristalización de etanol, también se encontró que el método de purificación objeto de la invención permite purificar GPC de algunas de las especies más frecuentemente encontradas en las preparaciones de GPC obtenidas de lecitinas.

En particular, se encontró en formas de realización de la invención que es posible eliminar de forma eficaz impurezas de GPC tal como sacarosa y GPE.

La tabla 2 a continuación resume los principales resultados logrados en estos experimentos en comparación con los referidos a experimentos comparativos realizados usando etanol como el solvente de cristalización.

Tabla 2

Ejemplo	Solvente de cristalización	Impurezas presentes en GPC usada como muestra de prueba		Contenido residual de impureza en GPC cristalizada (% de área por HPLC)	Nota
		Impureza	Contenido (% de área por HPLC)		
1 (comparativo)	etanol	β -GPC	0,8%	0,48%	Cristalización de GPC obtenida mediante el procedimiento 1
2	DMSO	β -GPC	0,8%	0,16%	Cristalización de GPC obtenida mediante el procedimiento 1
3	DMSO	β -GPC	0,1%	<0,01%	Cristalización de GPC obtenida mediante el procedimiento 2
		cGP	0,2%*	<0,01%*	
4	DMSO	GPE	0,2%	<0,01%	Cristalización de GPC obtenida mediante el procedimiento 3
5 (comparativo)	etanol	GPE	0,2%	0,02%	Cristalización de GPC obtenida mediante el procedimiento 3. Bajo rendimiento
6	DMSO	Sacarosa	2%	<0,01%	Cristalización de GPC obtenida mediante el procedimiento 4
7 (comparativo)	etanol	Sacarosa	2%	0,14%	Cristalización de GPC obtenida mediante el procedimiento 4. Bajo rendimiento

* medida por ^{31}P -RMN

Los resultados mostrados en la tabla 2 resaltan la utilidad de las formas de realización de la invención en la purificación de GPC. A este respecto, es digno de atención el hecho de que, como en el ejemplo 6, la realización de la invención demuestra la posibilidad para cristalizar GPC también en presencia de azúcares, en este caso sacarosa, y la alta eficacia de purificación alcanzable incluso en estos casos. Al contrario, la cristalización de GPC de etanol no permitió la eliminación satisfactoria de sacarosa. Además, GPC, e incluso en mayor medida azúcares tal como sacarosa, se comportan como inhibidores de la cristalización cuando se usa etanol como el solvente de cristalización; en consecuencia, en estos casos los rendimientos de cristalización son tan bajos como para hacer el procedimiento impráctico en procesos para la producción industrial de GPC.

Una forma de realización adicional de la invención consiste en GPC con una pureza mayor de o igual al 99,9%.

Una característica específica está representada por una GPC contaminada en menos del 0,1% por su isómero β -GPC, y una GPC contaminada en menos del 0,1% por la especie cíclica cGP.

Para los fines de la presente invención, las purezas indicadas anteriormente se miden como los porcentajes de áreas con métodos de HPLC y/o ^{31}P -RMN y, preferiblemente, con métodos de HPLC y/o ^{31}P -RMN descritos y ejemplificados en los ejemplos 8 y 9, respectivamente.

Los siguientes ejemplos se pretende que ilustren algunos de los métodos de la invención sin limitarla en modo alguno.

Ejemplos

Procedimiento 1

Preparación de GPC según el ejemplo 2 del documento WO9013552

A 125 g de lecitina de soja, se añaden 500 ml de etanol y se mantiene en agitación hasta la disolución completa. Se añaden 20 ml de metilato de sodio al 30% en metanol. Se sigue agitando a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de la filtración, el residuo se lava con metanol (3 x 10 ml). El filtrado se neutraliza (pH de aproximadamente 6) con ácido acético glacial, después se concentra a un volumen residual de aproximadamente 125 ml, la fase oleaginosa superior se separa. La fase inferior enriquecida se eluye en una columna que contiene 140 ml de resina Amberlyst 15 (en forma ácida) asentada en metanol. La elución progresa con 375 ml de metanol, seguido por 300 ml de agua.

El eluato acuoso se eluye en una secuencia de tres columnas cromatográficas preparadas así: la primera con 30 ml de resina IR 93 en forma OH- asentada en agua, la segunda con 30 ml de resina IR 401 en forma OH- asentada en agua, la tercera con 12 ml de resina IRC 50 en forma ácida asentada en agua.

El eluato final se concentra a un residuo fluido viscoso con un contenido en agua igual al 15%.

El análisis por HPLC-ELSD mostró un contenido de β -GPC igual al 0,8% (porcentaje de área).

Procedimiento 2

Preparación de GPC según el ejemplo 1 del documento EP575717

200 g de la fracción enriquecida en fosfatidilcolina obtenida por extracción de lecitina de soja se disuelven en 600 ml de metanol. La solución obtenida se eluye en una columna cromatográfica que contiene resina Duolite A 147 en forma básica, asentada en metanol. Después de la carga de la solución enriquecida, la elución de GPC se completa con metanol. El eluato se neutraliza con ácido acético, y se concentra a un volumen residual de 300 ml obteniéndose una estratificación aguda de dos fases. La fase inferior enriquecida se separa, se diluye con metanol, y se extrae dos veces con 200 ml de n-heptano.

Se añaden 800 ml de n-butanol a la fase inferior enriquecida, y la solución se concentra hasta un volumen residual de aproximadamente 300 ml, se enfría a $T \sim 5^\circ\text{C}$, y se filtra. Los cristales de GPC se disuelven en 30 ml de agua desmineralizada, y la solución se concentra hasta un líquido viscoso con un contenido residual de agua igual al 15%.

El análisis por HPLC-ELSD mostró un contenido de β -GPC igual al 0,1% (porcentaje de área).

El análisis por ^{31}P -RMN mostró un contenido de cGP igual al 0,2% (porcentaje de área).

Procedimiento 3

Preparación de GPC contaminada con GPE

Se añade GPE en cristales a una solución de GPC en agua, la solución se concentra hasta un líquido viscoso con un contenido residual de agua igual al 15%.

El análisis por HPLC-ELSD mostró un contenido de GPE igual al 0,2% (como porcentaje de área).

Procedimiento 4

Preparación de GPC contaminada con sacarosa

Se añade sacarosa en cristales a una solución de GPC en agua, la solución se concentra hasta un líquido viscoso con un contenido residual de agua igual al 15%.

El análisis por HPLC-ELSD mostró un contenido de sacarosa igual al 2% (como porcentaje de área).

Ejemplo 1 (comparativo)

Purificación de GPC obtenida por el procedimiento 1 usando cristalización de etanol

Se disuelven 2,5 g de GPC en la forma de un fluido viscoso (obtenida por el procedimiento 1) en 5 ml de etanol con agitación a T~50°C. La solución se enfría hasta T~10°C y se desencadena con unos pocos cristales de GPC, en unos pocos minutos se observa la formación de un precipitado. Se enfría hasta T~5°C y se mantiene con agitación entre 0°C y 5°C durante 1,5 horas, los cristales se filtran a través de un embudo Büchner, lavando con etanol. Después de secar al vacío, se obtienen 1,4 g de GPC.

El análisis por HPLC-ELSD mostró un contenido de β -GPC igual al 0,48% (como porcentaje de área).

Ejemplo 2

Purificación de GPC obtenida por el procedimiento 1 usando cristalización de DMSO

A 2,5 g de GPC en la forma de un fluido viscoso (obtenida por el procedimiento 1) se añaden 14 ml de DMSO, la mezcla se calienta a T~50°C con agitación, se enfría a T~25°C y se desencadena con unos pocos cristales de GPC. Se mantiene con agitación entre 20°C y 25°C durante 16 horas; durante este tiempo se observa la formación de un precipitado, los cristales se filtran a través de un embudo Büchner, lavando con etanol. Después de secar al vacío, se obtienen 1,9 g de GPC.

El análisis por HPLC-ELSD mostró un contenido de β -GPC igual al 0,16% (como porcentaje de área).

Ejemplo 3

Purificación de GPC obtenida por el procedimiento 2 usando cristalización de DMSO

A 11,2 g de GPC en la forma de un fluido viscoso (obtenida por el procedimiento 2) se añaden 60 ml de DMSO, la mezcla se calienta a T~50°C con agitación, se enfría a T~25°C y se desencadena con unos pocos cristales de GPC. Se mantiene con agitación entre 20°C y 25°C durante 16 horas; durante este tiempo se observa la formación de un precipitado, los cristales se filtran a través de un embudo Büchner, lavando con etanol. Después de secar al vacío, se obtienen 8,2 g de GPC.

El análisis por HPLC-ELSD mostró la ausencia de β -GPC

El análisis por ^{31}P -RMN mostró la ausencia de cGP

Ejemplo 4

Purificación de GPC (contaminada con GPE) usando cristalización de DMSO

A 10,7 g de GPC en la forma de un fluido viscoso (obtenida por el procedimiento 3) se añaden 20 ml de DMSO, la mezcla se calienta a T~70°C con agitación, se añaden 80 ml de DMSO, se enfría a T~25°C y se desencadena con unos pocos cristales de GPC. Se mantiene con agitación entre 20°C y 25°C durante 16 horas; durante este tiempo se observa la formación de un precipitado, los cristales se filtran a través de un embudo Büchner, lavando con etanol. Después de secar al vacío, se obtienen 8,7 g de GPC.

El análisis por HPLC-ELSD mostró la ausencia de GPE

Ejemplo 5 (comparativo)

Purificación de GPC (contaminada con GPE) usando cristalización de etanol

Se disuelven 11,2 g de GPC en la forma de un fluido viscoso (obtenida por el procedimiento 3) en 20 ml de etanol con agitación a T~45°C. La solución se enfría a T~5°C y se desencadena con unos pocos cristales de GPC. Se mantiene con agitación entre 0°C y 5°C durante 3 horas; durante este tiempo se observa la formación de un precipitado, los cristales se filtran a través de un embudo Büchner, lavando con etanol. Después de secar al vacío, se obtienen 3,4 g de GPC.

El análisis por HPLC-ELSD mostró un contenido de GPE igual al 0,02% (como porcentaje de área)

Ejemplo 6Purificación de GPC (contaminada con sacarosa) usando cristalización de DMSO

A 11 g de GPC en la forma de un fluido viscoso (obtenida por el procedimiento 4) se añaden 20 ml de DMSO, la mezcla se calienta a T~70°C con agitación, se añaden 80 ml de DMSO, se enfría a T~25°C; durante este tiempo se observa la formación de un precipitado. Se mantiene con agitación entre 20°C y 25°C durante 16 horas, los cristales se filtran a través de un embudo Büchner, lavando con etanol. Después de secar al vacío, se obtienen 7,8 g de GPC.

El análisis por HPLC-ELSD mostró la ausencia de sacarosa

Ejemplo 7 (comparativo)Purificación de GPC (contaminada con sacarosa) usando cristalización de etanol

Se disuelven 11,0 g de GPC en la forma de un fluido viscoso (obtenida por el procedimiento 4) en 20 ml de etanol con agitación a T~45°C. La solución se enfría a T~5°C y se desencadena con unos pocos cristales de GPC. Se enfría a T~5°C y mantiene con agitación entre 0°C y 5°C durante 2,5 horas; durante este tiempo se observa la formación de un precipitado. Los cristales se filtran a través de un embudo Büchner, lavando con etanol. Después de secar al vacío, se obtienen 1,1 g de GPC.

El análisis por HPLC-ELSD mostró un contenido de sacarosa igual al 0,14% (como porcentaje de área)

Ejemplo 8

Método de análisis de GPC por HPLC-ELSD.

Parámetros de operación:

Columna de HPLC: YMC™ Polyamine II 250 x 4,6 mm (5 µm)
 Temperatura del horno: 35°C
 Fases eluentes: Fase A: 85% (acetonitrilo al 75%, metanol al 25%) 15% (tampón acetato de amonio 50 mM pH 4,5)
 Fase B: 65% (acetonitrilo al 75%, metanol al 25%) 35% (tampón acetato de amonio 50 mM pH 4,5)

Programa de gradiente:

minutos	% de fase A	% de fase B
0	98	2
5	98	2
27	2	98
32	2	98
33	98	2
45	98	2

Detector ELSD

Parámetros del detector: flujo de nitrógeno = 1,4 ml/min; temperatura = 90°C; ganancia = 1
 Preparación de muestras: dilución de muestras de GPC hasta aproximadamente 20 mg/ml en metanol.
 Volumen de inyección: 20-40 µl

NOTA: las fluctuaciones basales que se observan hasta TR~5 minutos están presentes en el blanco (no son debidas a sustancias presentes en la muestra).

En la siguiente tabla se muestran los valores de referencia para la elución de las especies de interés.

Especie química	TR Tiempo de retención	TRR Tiempo de retención relativo con respecto a GPC
GPC	~16,2 minutos	1
β -GPC	~15,3 minutos	~0,94
GPE	~31,5 minutos	~1,94
sacarosa	~22,0 minutos	~1,36

El límite de detección (LOD) de las impurezas analizadas usando este método es menor del 0,01% con respecto a GPC

5 **Ejemplo 9**

Método de análisis de GPC por ^{31}P -RMN

Instrumento: NMR Varian VXR-200 o instrumentos al menos equivalentes

10 Preparación de la muestra: 0,8 g de GPC que se va a analizar se disuelven en 0,8 ml de D_2O y la solución se carga en el tubo de RMN

Temperatura: Temperatura ambiente

Número de adquisiciones: No menos de 400

15 En la siguiente tabla se muestran los valores de referencia para el desplazamiento químico de las especies de interés

Especie química	Desplazamiento químico por ^{31}P -RMN (ppm)
GPC	-0,1
β -GPC	-0,6
GPE	0,4
cGP	18,4

El límite de detección (LOD) de las impurezas analizadas usando este método es menor del 0,01% con respecto a GPC

20

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la purificación de L- α -glicerofosforilcolina, **caracterizado en que** la L- α -glicerofosforilcolina se cristaliza de DMSO o una mezcla de DMSO con al menos otro solvente y **caracterizado en que** el DMSO se usa en una cantidad comprendida entre 2 y 100 partes en volumen por parte en peso de L- α -glicerofosforilcolina.
2. El proceso según la reivindicación 1, **caracterizado en que** dicho al menos otro solvente se selecciona de agua, alcohol, solventes halogenados, éteres, ésteres y/o amidas.
3. El proceso según la reivindicación 2, **caracterizado en que** dicho alcohol es metanol, etanol, isopropanol y/o n-butanol; dicho solvente halogenado es cloruro de metileno; dicho éter es tetrahidrofurano; dicho éster es acetato de etilo; dicha amida es DMF.
4. El proceso según la reivindicación 1, **caracterizado en que** se usa DMSO en una cantidad comprendida entre 5 y 15 partes en volumen por parte en peso de L- α -glicerofosforilcolina.
5. El proceso según la reivindicación 4, **caracterizado en que** dicho al menos otro solvente se usa en cantidades comprendidas entre 0,01 y 10 volúmenes por volumen de DMSO, preferiblemente entre 0,1 y 1.
6. El proceso según la reivindicación 1, **caracterizado en que** dicha cristalización se lleva a cabo a una temperatura que varía entre 0°C y 100°C, preferiblemente entre 15°C y 50°C.
7. L- α -glicerofosforilcolina que tiene una pureza mayor de o igual al 99,9%.
8. L- α -glicerofosforilcolina que tiene un contenido de su isómero β y/o de cGP menor del 0,1%.
9. Un método para determinar la pureza de L- α -glicerofosforilcolina que comprende la elución de L- α -glicerofosforilcolina a través de una columna de HPLC que tiene una fase estacionaria amino, y la posterior detección de L- α -glicerofosforilcolina misma, y cualquier posible impureza de la misma, por medio de un tipo de detector de dispersión de luz evaporativa.
10. El método según la reivindicación 9, **caracterizado en que** dicha fase estacionaria tiene grupos amino secundarios y terciarios.
11. El método según la reivindicación 9, **caracterizado en que** dicha fase estacionaria consiste en partículas de material soporte, preferiblemente sílice, con un recubrimiento de polímero que contiene grupos amino, preferiblemente secundarios y terciarios.
12. El método según la reivindicación 9, **caracterizado en que** las fases eluyentes consisten en una solución acuosa, un solvente orgánico polar, o una mezcla de los mismos.
13. El método según la reivindicación 12, **caracterizado en que** dicha solución acuosa tiene un pH que varía entre 3 y 6, preferiblemente entre 4 y 5.
14. El método según la reivindicación 12, **caracterizado en que** dicho solvente polar orgánico es un alcohol de C₁-C₄, acetonitrilo, o una mezcla de los mismos.
15. El método según la reivindicación 14, **caracterizado en que** dicho alcohol de C₁-C₄ es metanol.

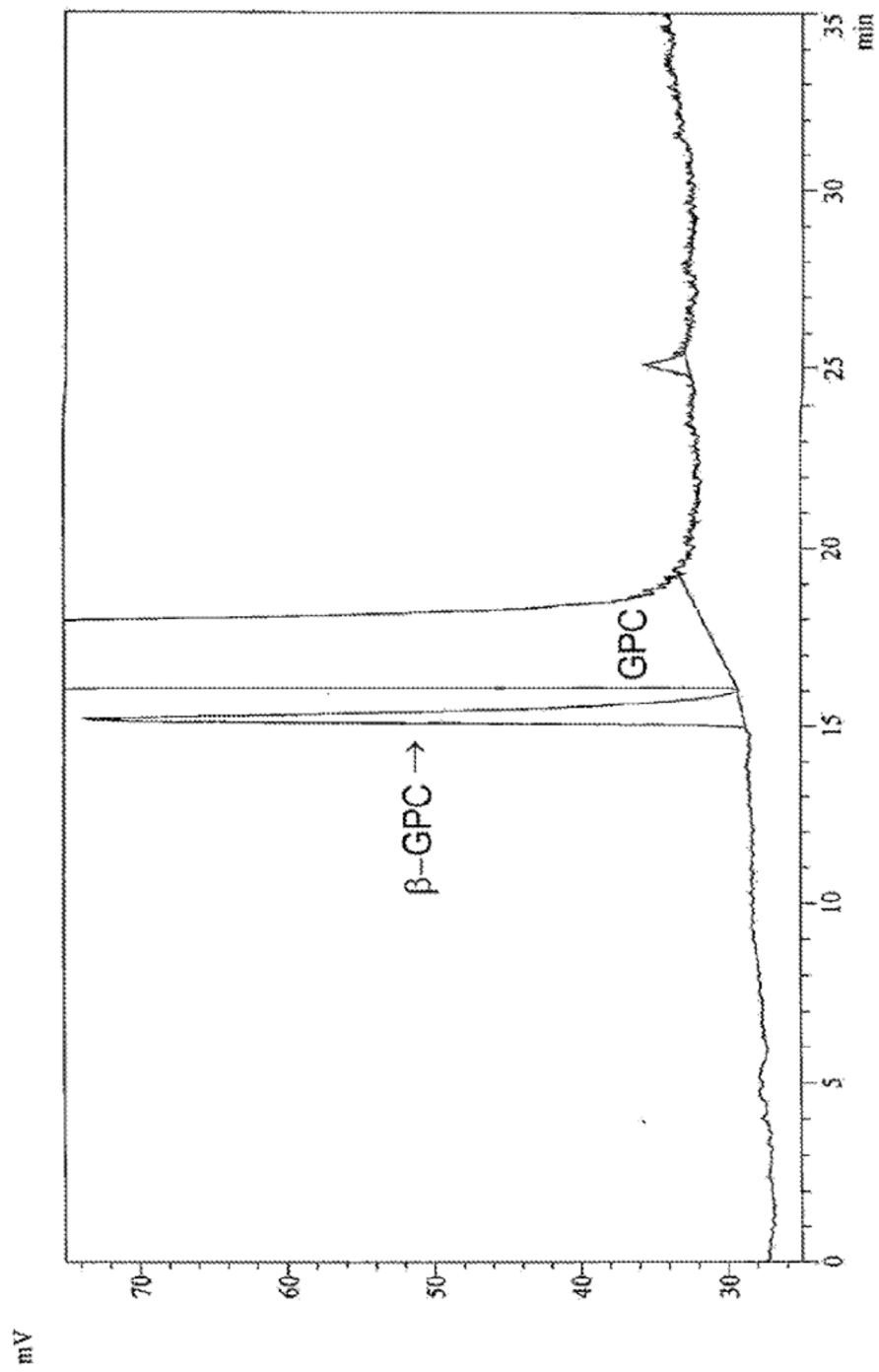


Figura 1

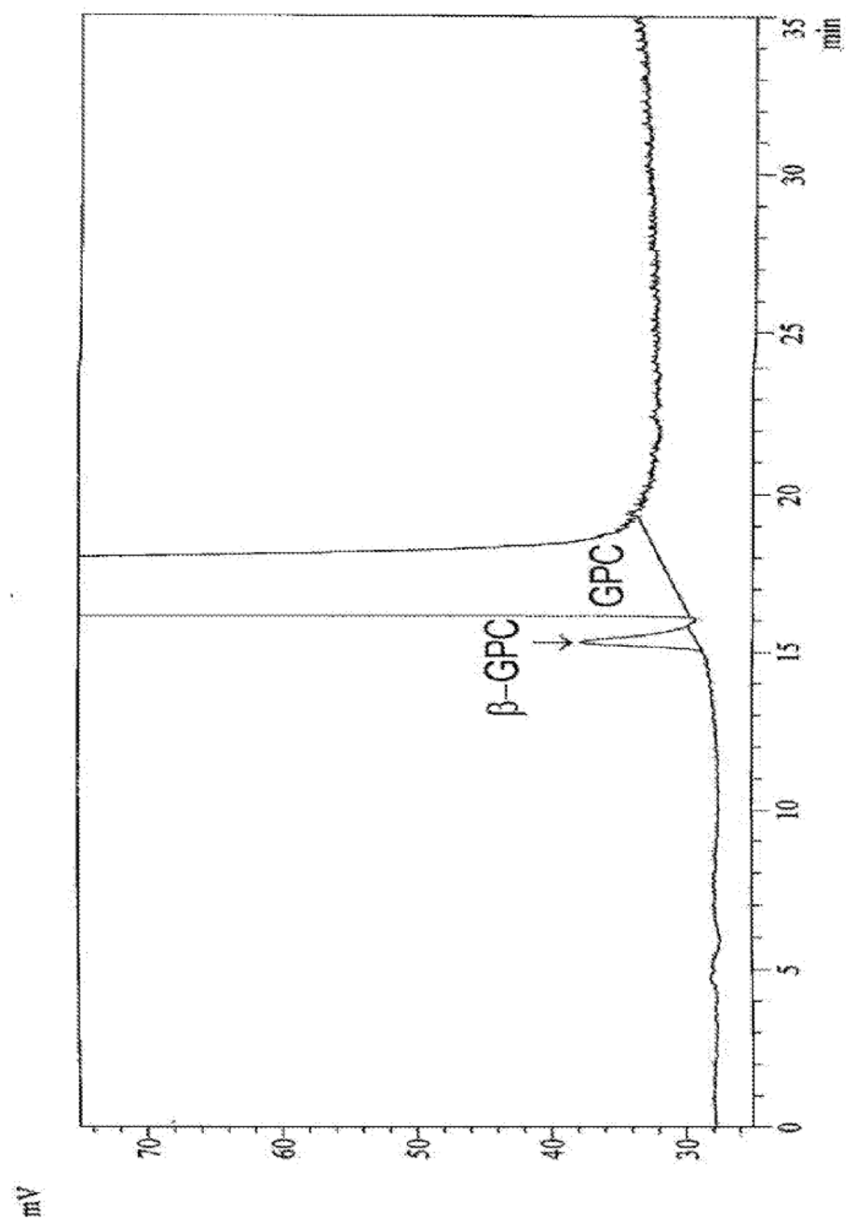


Figura 2

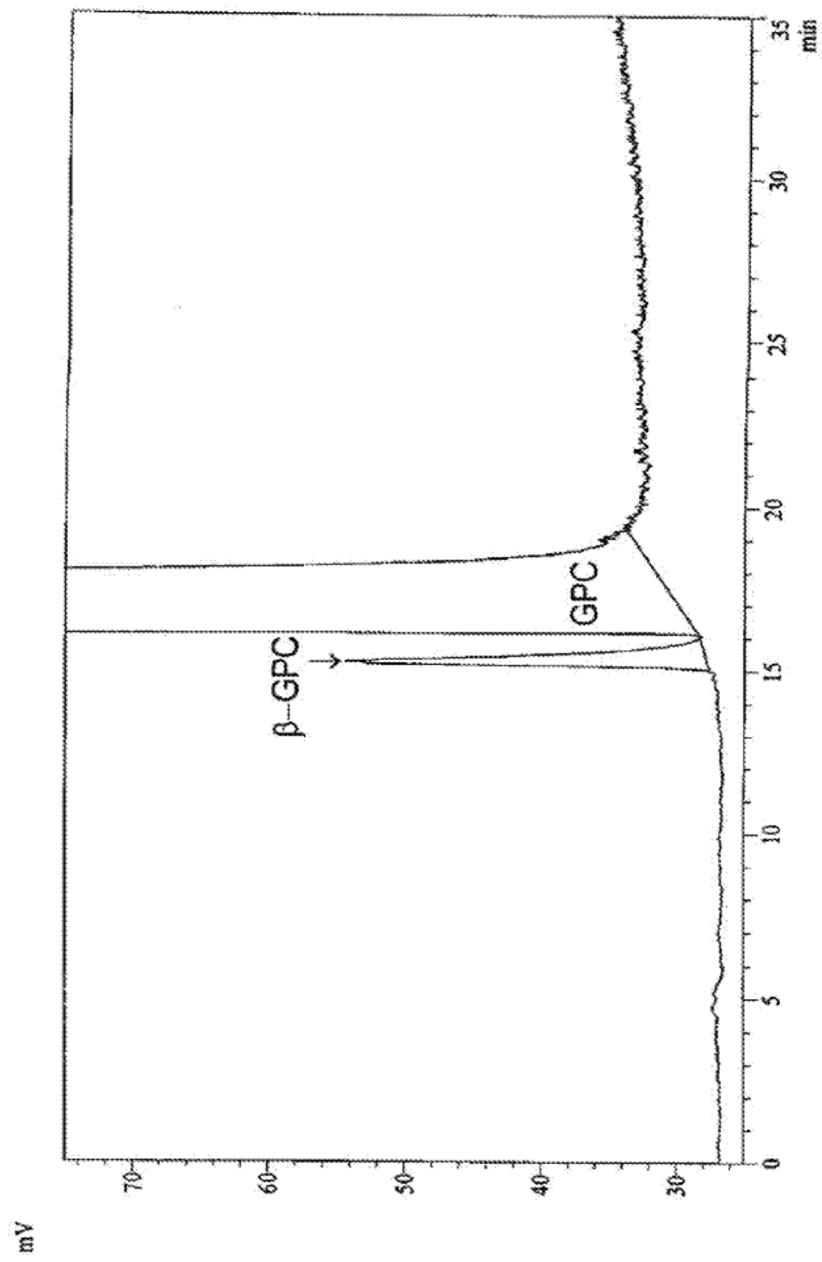


Figure 3

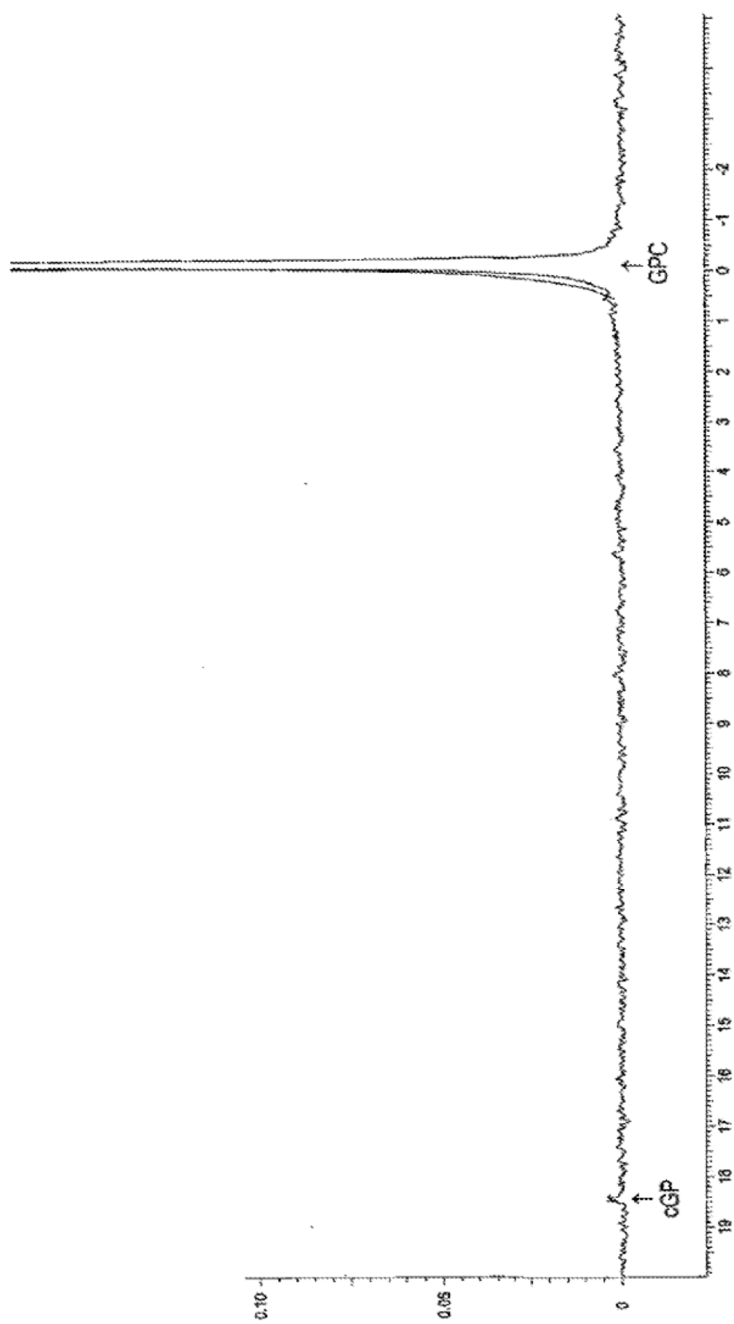


Figura 4

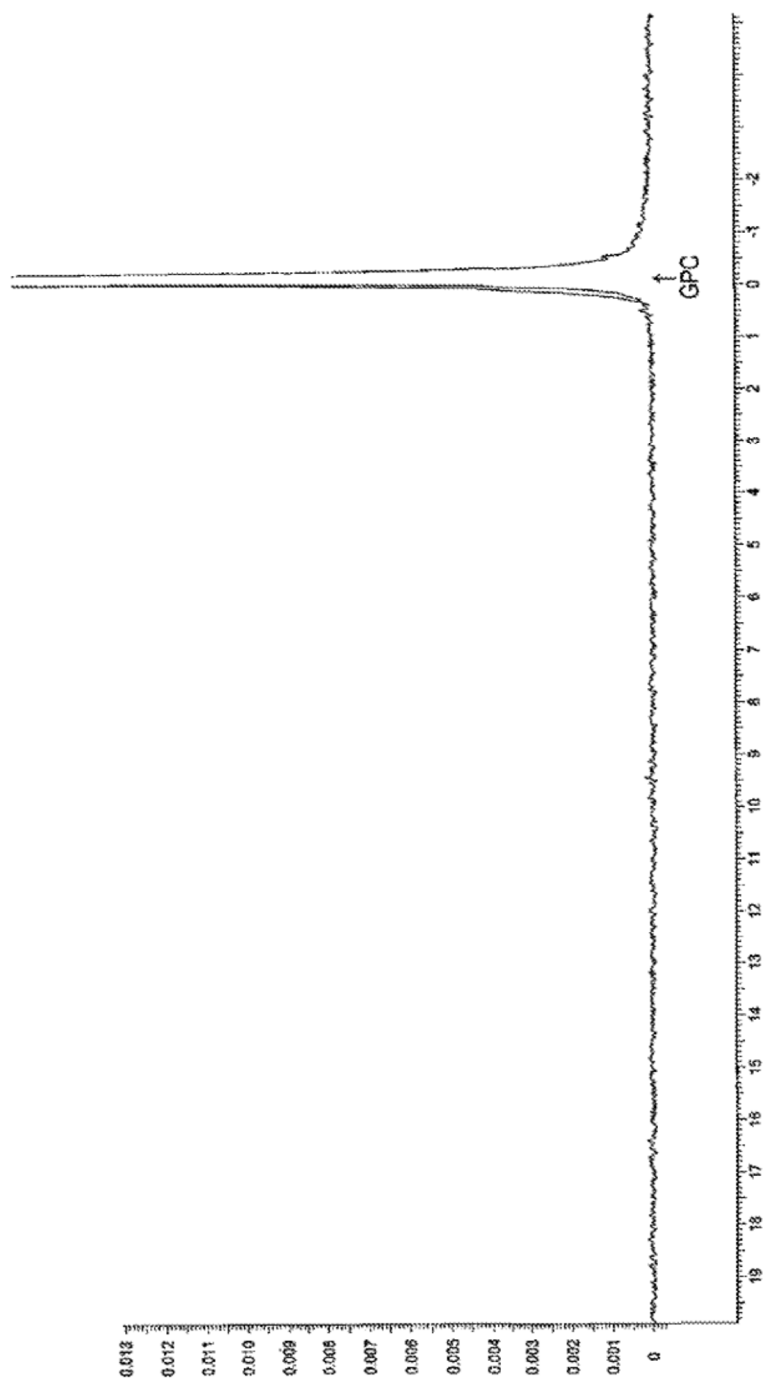


Figure 5

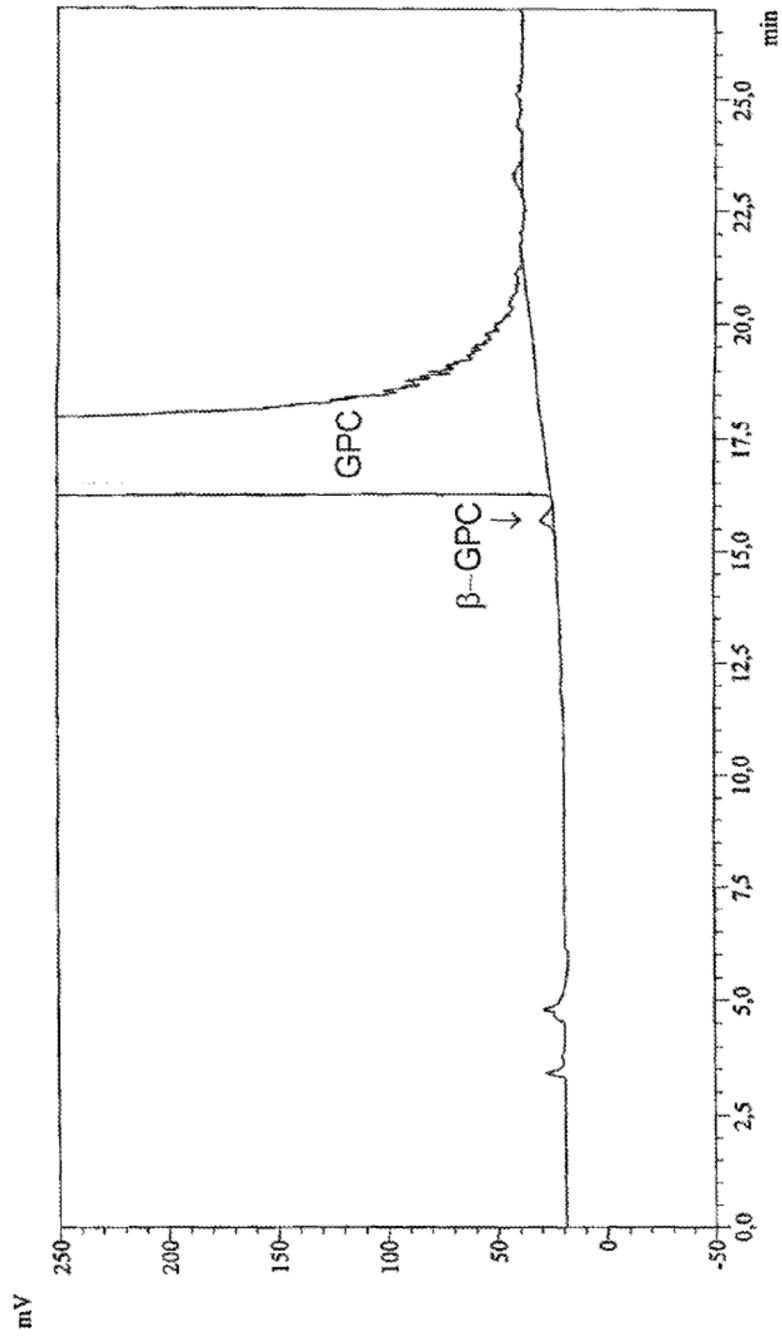


Figura 6

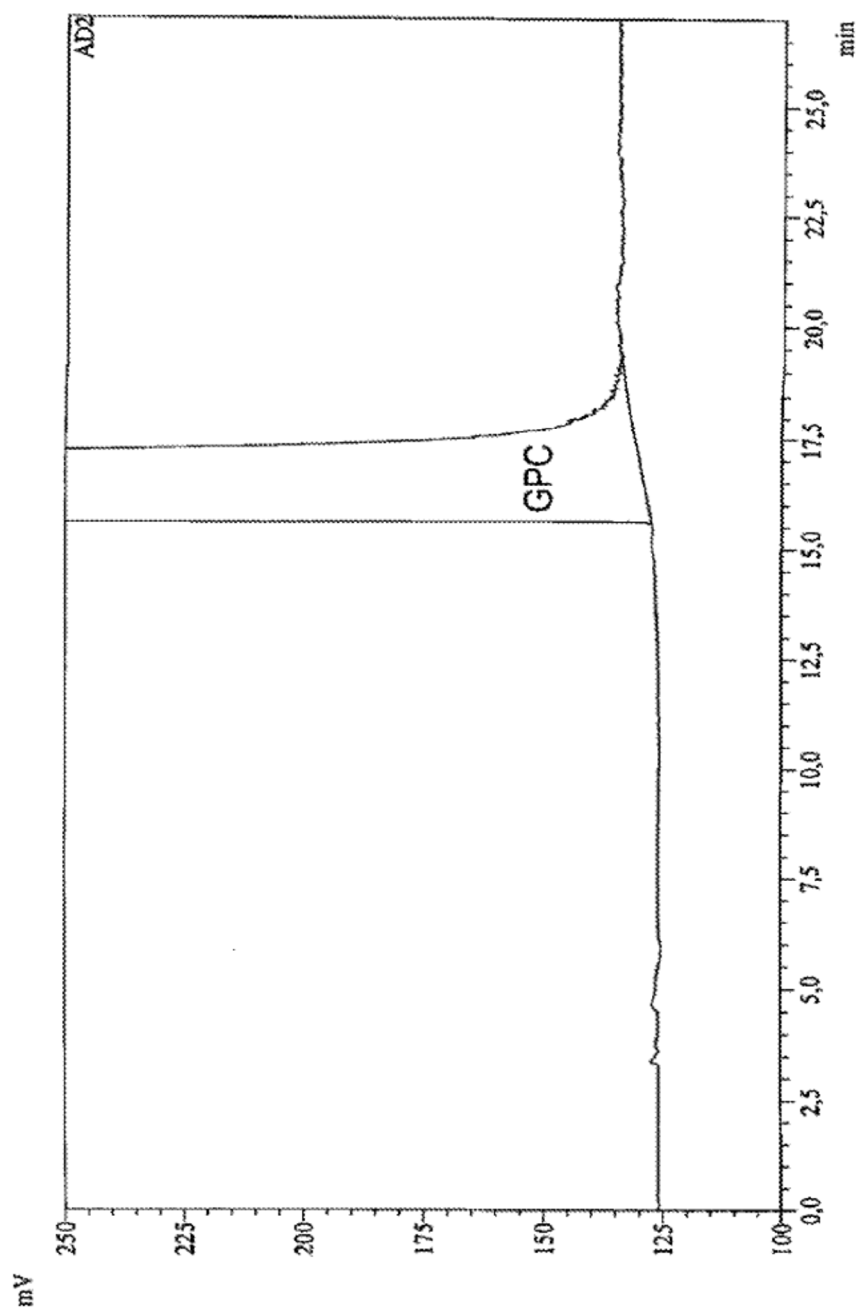


Figura 7

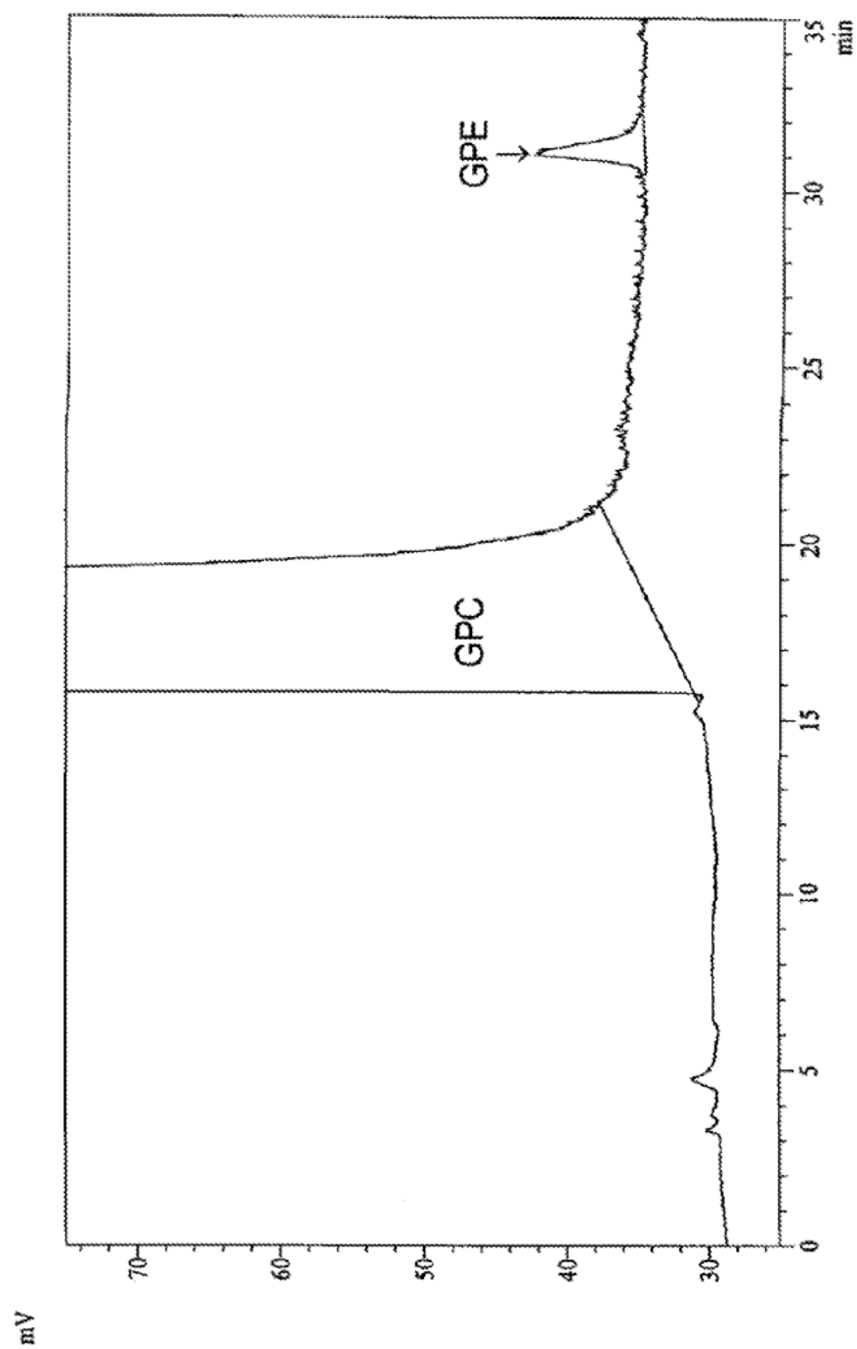


Figura 8

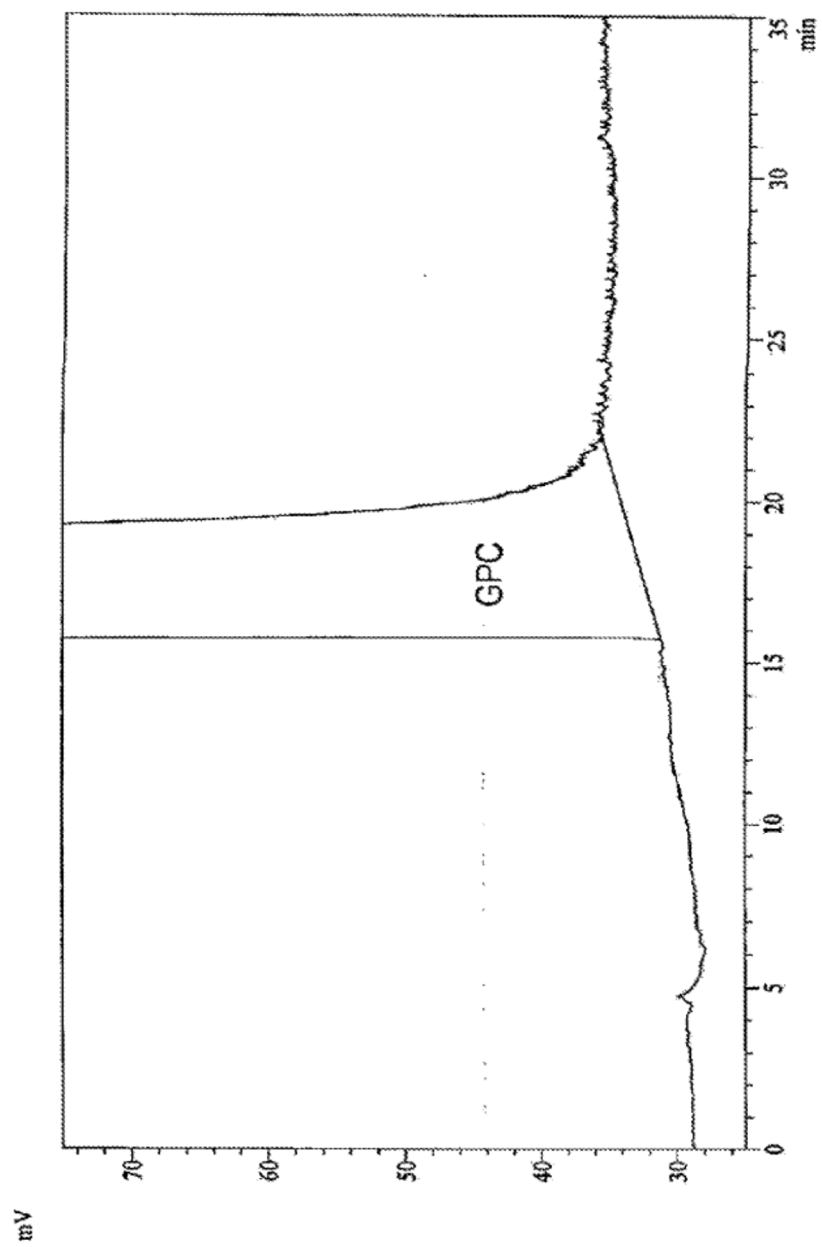


Figura 9

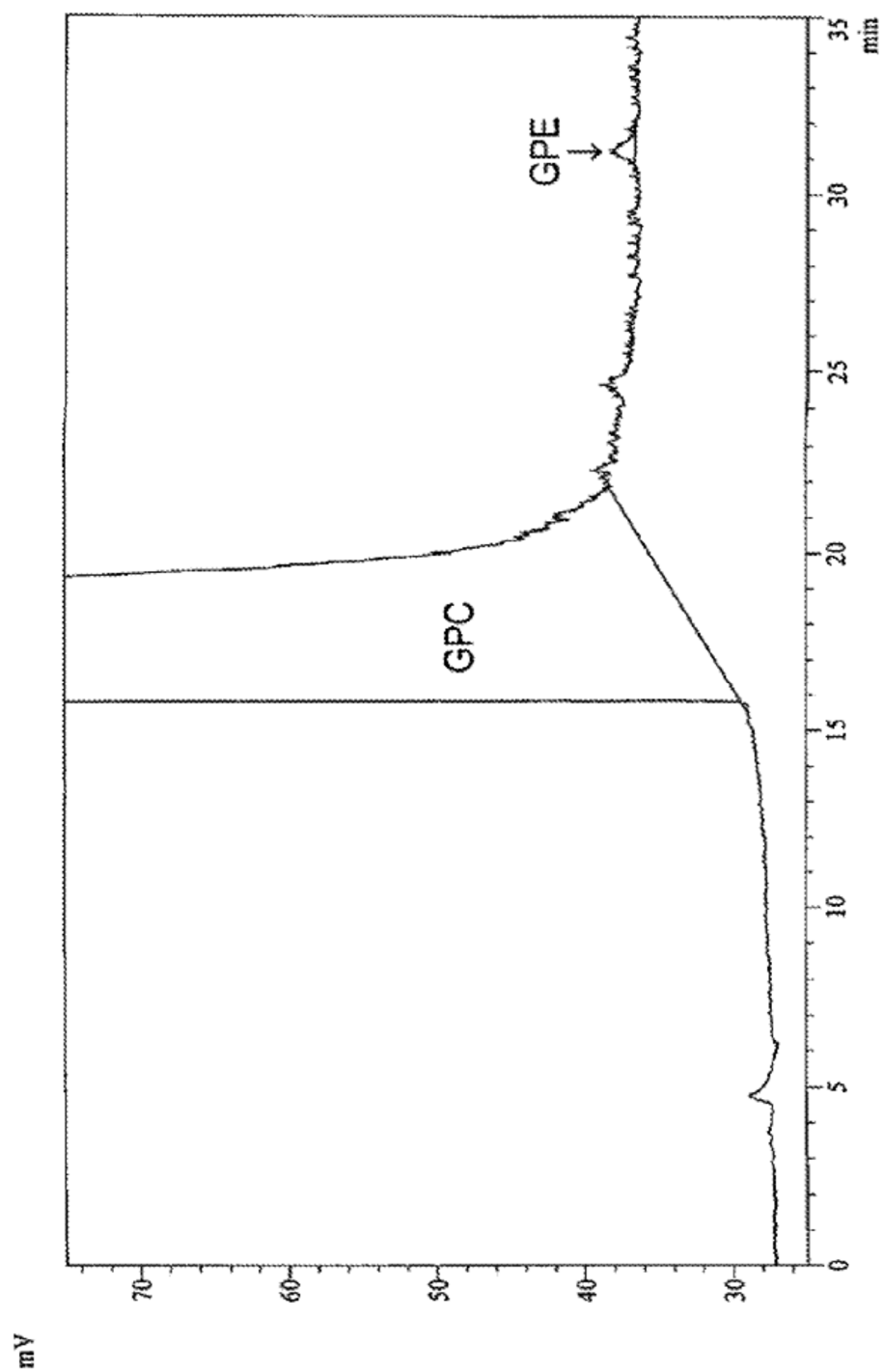


Figure 10

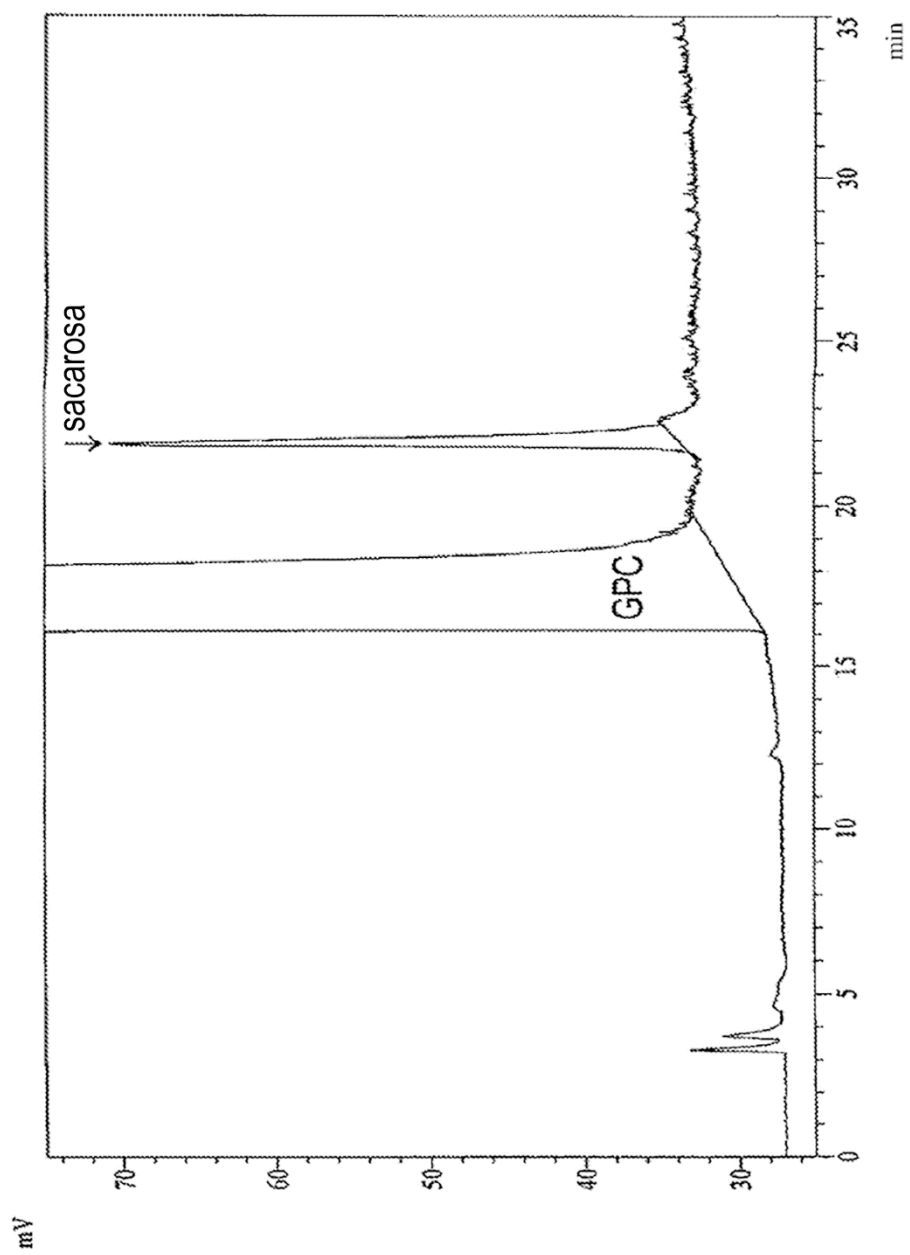


Figura 11

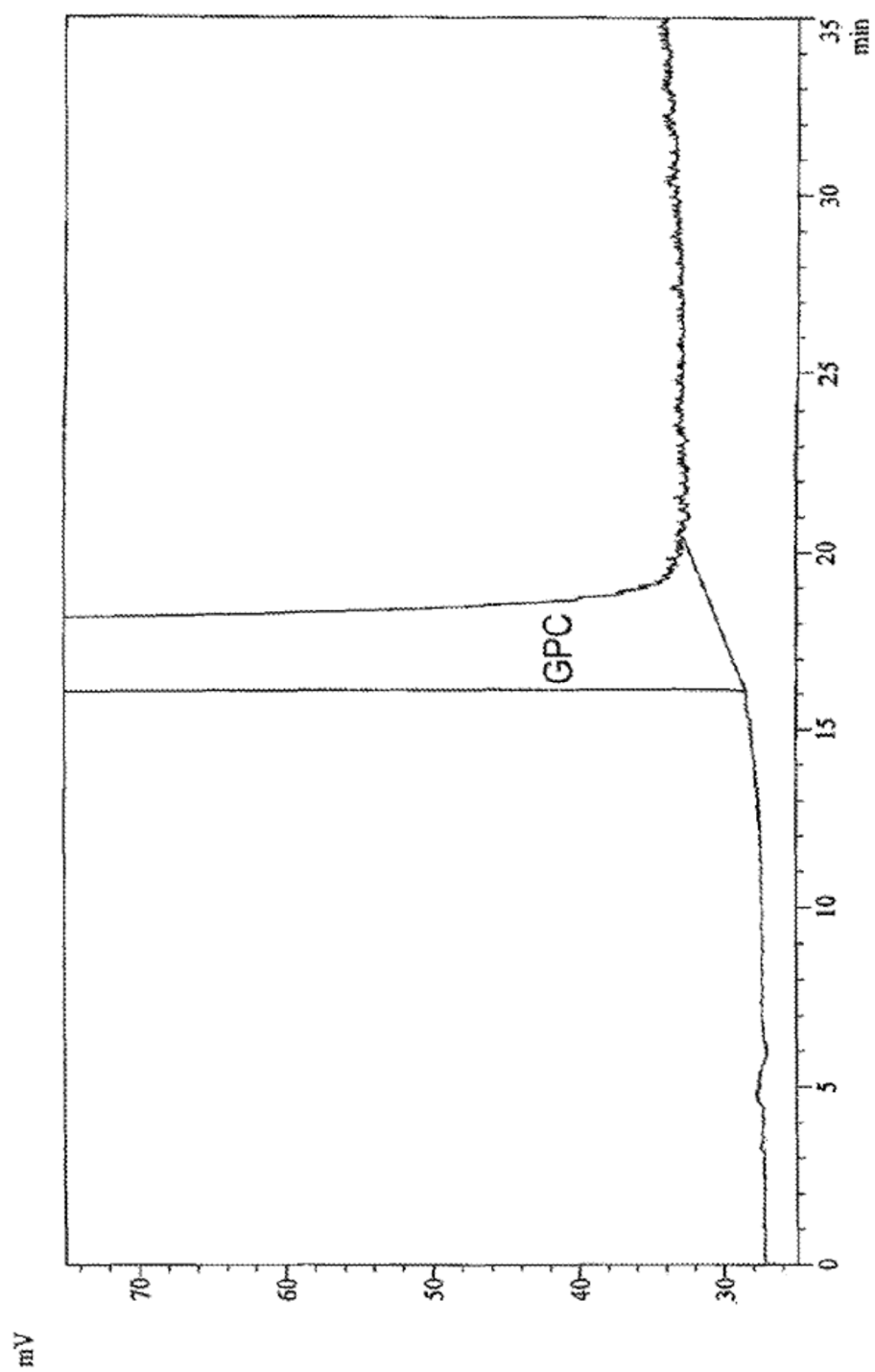


Figura 12

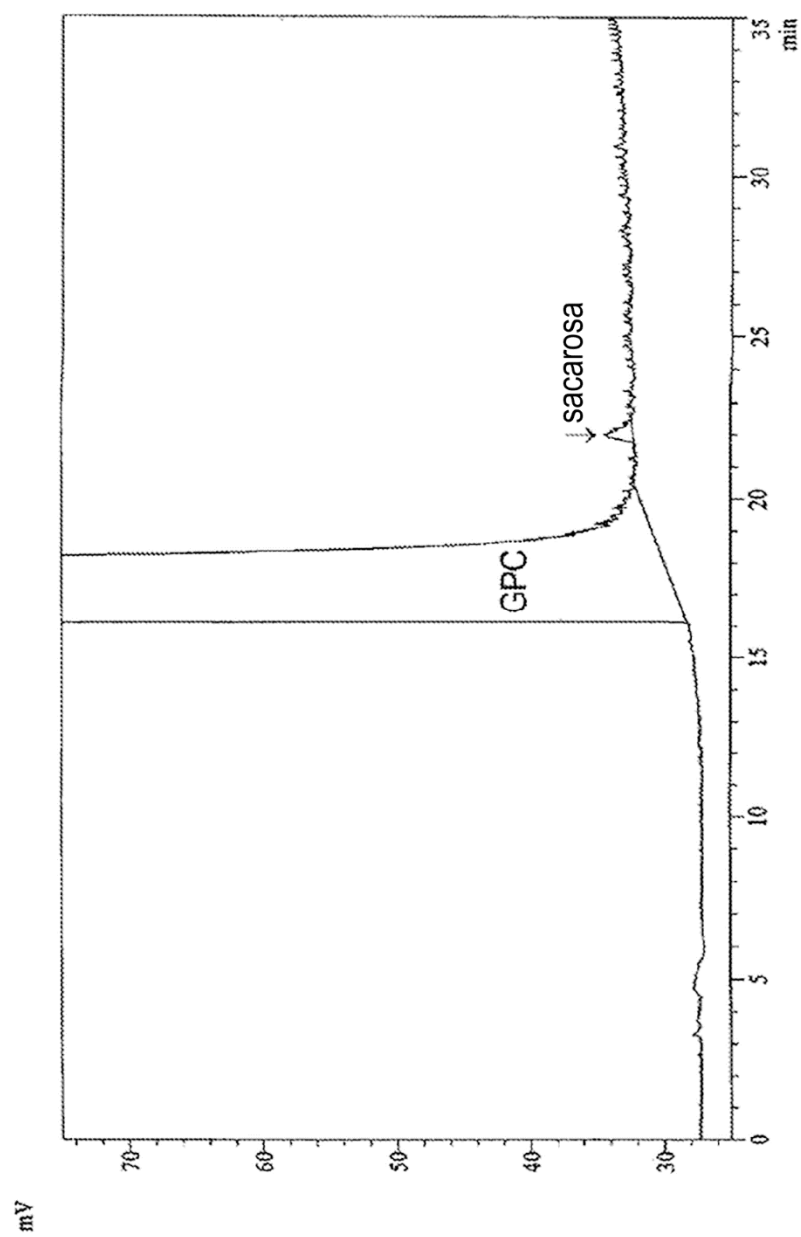


Figura 13