



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 320 432**

51 Int. Cl.:

C12P 19/36 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 31/7084 (2006.01)

A23L 1/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03026690 .2**

96 Fecha de presentación : **20.11.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1424399**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.06.2004**

54

Título: **Procedimiento para la reducción enzimática de NAD y NADP.**

30

Prioridad: **26.11.2002 DE 102 54 995**

73

Titular/es: **IEP GmbH**
Rheingastrasse 190-196
65203 Wiesbaden, DE

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.05.2009

72

Inventor/es: **Gupta, Antje y**
Zimmer, Anke

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.05.2009

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 320 432 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la reducción enzimática de NAD y NADP.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación enzimática de dinucleótido de nicotinamida-adenina reducido (en lo que sigue NADH) o dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato reducido (en lo que sigue NADPH) por reducción catalizada con formiato-deshidrogenasa de dinucleótido de nicotinamida-adenina (en lo que sigue NAD) o dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato (en lo que sigue NADP) y a una preparación de NADH o NADPH estable.

10 La aplicación de NADH o NADPH se encuentra hasta ahora substancialmente en la analítica enzimática y en el diagnóstico médico, donde se utiliza en el ensayo enzimático de las más distintas oxidorreductasas. Desde entonces se ha encontrado que el NADH presenta un efecto terapéutico positivo en el tratamiento de la fatiga, el "jet lag" y en el reforzamiento del tratamiento de enfermedades como el Alzheimer, el Parkinson y las depresiones, y la utilización del NADH ha encontrado una amplia aplicación como suplemento nutricional (documento US 5,444,053). Esto tiene por consecuencia una necesidad constantemente creciente de NADH.

15 La preparación de NADH se realiza hasta ahora proporcionando NAD por extracción a partir de levadura de cerveza o de panadería y subsiguiente reducción a NADH. Son conocidas una serie de procedimientos enzimáticos para la reducción de NAD a NADH (H. Chenault y col., Applied Biochemistry and Biotechnology, volumen 14, 1987, páginas 147-197). Preferiblemente se utilizan a este respecto la alcohol-deshidrogenasa, la formiato-deshidrogenasa, la glucosa-deshidrogenasa y la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa. La preparación de NADH se lleva a cabo a gran escala fundamentalmente con alcohol-deshidrogenasas y etanol. Para ello se utiliza etanol en gran exceso y el acetaldehído volátil que se forma se evacua continuamente. Son ventajas de este procedimiento el económico etanol y la alcohol-deshidrogenasa de *Saccharomices cerevisiae* disponible en grandes cantidades. Son inconvenientes de este procedimiento la incompleta transformación de NAD en NADH y la formación del acetaldehído tóxico en la síntesis.

20 La preparación de NADPH se realiza por ejemplo enzimáticamente mediante NADH-cinasa a partir de NADH (documento DE 42 01 930 A1).

25 También es conocida la preparación enzimática de NADH con formiato-deshidrogenasa. A este respecto se utiliza por regla general formiato sódico o formiato amónico. En la reducción de NAD con formiato-deshidrogenasa se forma dióxido de carbono, que se desprende de la mezcla de reacción a valor del pH de ácido a neutro. Para la estabilización del NADH que se forma y de la formiato-deshidrogenasa utilizada son sin embargo substancialmente mejores valores del pH de 7,5 a 8,5. El valor del pH se mantiene a este respecto constante por titulación con una base adecuada como amonio, NaOH o KOH. De este modo se forman entonces a partir del formiato sódico o formiato amónico utilizados correspondientes carbonatos sódico o amónico. Estas sales de carbonato tienen ciertamente la gran ventaja de que estabilizan el NADH, pero tienen también el inconveniente de que solo pueden separarse con dificultad del NADH y en grandes cantidades conducen en el secado del NADH a problemas por inclusión de agua y etanol.

30 La cita bibliográfica "NADH production from NAD⁺ using a Formate Dehydrogenase System with Cells of a Methanol-Utilizing Bacterium", Y. Izumi y col., en "Journal of Fermentation Technology", Tokio, Japón, vol. 61, nº. 2, 1983, páginas 135-142, describe el procedimiento para la reducción enzimática de NAD con formiato-deshidrogenasa, un tampón de fosfato potásico y formiato sódico en la mezcla de reacción. La formación de carbonato de metal alcalino no se menciona. El valor del pH de un tampón de carbonato de Na utilizado asciende a 9,2 a 10,7.

35 El artículo "CO₂ Reduction to Formate by NADH Catalysed by Formate Dehydrogenase from *Pseudomonas oxalaticus*", U. Ruschig y col. en "EUR. J. BIOCHEM.", vol. 70, 1976, páginas 325-330 describe una reducción directa de CO₂ a formiato mediante cantidades de producto de NADH. No se utiliza un sistema de regeneración para el reductor. Un sistema que contiene formiato-deshidrogenasa, CO₂, HCO₂⁻, NAD, NADH consigue a este respecto concentraciones de equilibrio como las que se predicen por consideraciones termodinámicas. La reacción puede también invertirse, desplazándose el equilibrio.

40 La invención se propone mejorar los inconvenientes indicados por modificación de las condiciones de procedimiento y los pasos de procedimiento. Este objetivo se consigue conforme a la invención mediante el uso de una reducción enzimática acuosa de NAD o NADP con formiato-deshidrogenasa y al menos un formiato de metal alcalino, eliminándose de la disolución antes del aislamiento del NADH o NADPH el carbonato de metal alcalino formado hasta una cantidad de 0,5 a 5 por ciento en peso.

45 En el procedimiento conforme a la invención una gran parte del dióxido de carbono que se forma precipita por ejemplo mediante iones calcio y una parte de aproximadamente 0,5% a 5% del dióxido de carbono se mantiene en la solución de reacción mediante una sal de metal alcalino utilizada en forma de por ejemplo carbonato sódico. Mediante carbonato sódico se estabiliza óptimamente en todo el procedimiento de preparación el NADH o NADPH formado y al mismo tiempo puede secarse bien. A este respecto, el carbonato sódico no molesta, porque en la utilización como suplemento nutricional también se adiciona como estabilizador.

ES 2 320 432 T3

La invención se refiere por consiguiente a un procedimiento para la reducción enzimática de dinucleótido de nicotinamida-adenina (NAD) o dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato (NADP) que está caracterizado porque se incuba

5 a) NAD o NADP con formiato-deshidrogenasa y agua

b) y al menos un formiato de metal alcalino,

10 c) el carbonato de metal alcalino formado se elimina de la disolución por precipitación con una sal de metal alcalinotérreo hasta una cantidad de 0,5 a 5 por ciento en peso y

d) se aísla el dinucleótido de nicotinamida-adenina reducido (NADH) o dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato reducido (NADPH) formado.

15 Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento para la reducción enzimática de NAD o NADP que está caracterizado porque se incuba

20 a) NAD o NADP, formiato-deshidrogenasa y agua

b) con una mezcla compuesta por al menos un formiato de metal alcalino y al menos un formiato de metal alcalinotérreo y

25 c) se aísla el NADH o NADPH formado.

Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento para la reducción enzimática de NAD o NADP que está caracterizado porque se incuba

30 a) NAD o NADP, formiato-deshidrogenasa y agua

b) con una mezcla de formiato sódico y formiato cálcico y

35 c) se aísla el NADH o NADPH formado.

40 Por el término “formiato de metal alcalino” se entiende sales hidrosolubles del ácido fórmico como formiato de litio, de sodio, de potasio, de rubidio o de cesio. Pero como formiato de metal alcalino también puede utilizarse formiato amónico. Por el término “formiato de metal alcalinotérreo” se entiende sales del ácido fórmico como formiato de berilio, de magnesio, de calcio, de estroncio o de bario.

45 El procedimiento conforme a la invención se lleva a cabo por ejemplo en un recipiente de reacción cerrado de vidrio o metálico. Para ello se llevan individualmente los componentes NAD o NADP, formiato de metal alcalino, formiato de metal alcalinotérreo, formiato-deshidrogenasa y agua al recipiente de reacción y se agita bajo una atmósfera de por ejemplo nitrógeno o aire.

50 El NAD se utiliza en forma sólida o preferiblemente disuelto en agua. El NAD puede obtenerse por extracción a partir de levadura de cerveza o de panadería. La concentración de NAD o NADP en la mezcla de síntesis asciende a 1% a 30%, preferiblemente a 10% a 25%. Estos valores de porcentajes se refieren a la concentración final de NADH o NADPH al final de la síntesis tras la adición completa del NAD o NADP.

55 Para garantizar una transformación completa del NAD en NADH, o del NADP en NADPH, el formiato como formiato de metal alcalino debe estar presente al menos equimolarmente, pero preferiblemente en exceso en relación al NAD o NADP utilizado. El formiato puede utilizarse a este respecto hasta en un exceso molar de veinte veces, preferiblemente en un exceso molar de 2 a 10 veces.

60 La eliminación de la disolución del carbonato de metal alcalino formado hasta una cantidad de 0,5 a 5 por ciento en peso se realiza por precipitación con una sal alcalinotérrea orgánica o inorgánica, por ejemplo cloruro de calcio, oxalato de calcio, acetato de calcio, maleato de calcio, oxalato de magnesio, acetato de magnesio o maleato de magnesio.

65 Pero la eliminación del carbonato de metal alcalino formado puede realizarse también por adición de formiato de metal alcalinotérreo simultáneamente al formiato de metal alcalino o antes del aislamiento del NADH o NADPH.

La relación de formiato de metal alcalinotérreo a NAD o NADP asciende a 0,4 a 0,9 mol de formiato de metal alcalinotérreo a 1 mol de NAD o NADP, preferiblemente a 0,55 mol a 0,75 mol.

Las formiato-deshidrogenasas dependientes de NAD adecuadas proceden por ejemplo de *Pseudomonas sp.* 101, *Candida boidinii* o *Candida methylica* (Gene, volumen 162, 1995, páginas 99-104). Son igualmente conocidas for-

ES 2 320 432 T3

miato-deshidrogenasas dependientes de NADP adecuadas (K. Seelbach y col., A novel efficient regenerating method of NADPH using a new formate dehydrogenase, Tetrahedron Letters [1996] volumen 37, páginas 1377-1380; o Tishkov y col., Pilot-scale production and isolation of recombinant NAD and NADP specific formate dehydrogenase, J. Biotechnol. Bioeng. volumen 64, páginas 187-193).

La cantidad de enzima a utilizar asciende a de aproximadamente 1.000 unidades a 1.000.000 de unidades por kg del NAD o NADP utilizado en la mezcla de reacción, preferiblemente de aproximadamente 10.000 a 100.000 unidades/kg.

La unidad enzimática 1 unidad (U) corresponde a este respecto a la cantidad de enzima que se necesita para hacer reaccionar 1 μ mol de NAD o NADP por minuto (min).

Durante la reacción se mantiene constante el valor del pH de la solución de reacción en un valor de 7 a 9, preferiblemente de 7,5 a 8,5. Esto se realiza por adición de una base o ácido adecuado, preferiblemente por adición de iones amonio.

La temperatura asciende por ejemplo a de aproximadamente 10°C a 70°C, preferiblemente de 20°C a 35°C.

El tiempo de reacción asciende a 10 minutos a 10 horas, preferiblemente a 100 minutos (min) a 200 min, en especial a 120 min a 150 min.

A continuación se procesa la mezcla de reacción. Tras la separación de las fracciones insolubles, como el carbonato cálcico, por centrifugación o filtración se separa la formiato-deshidrogenasa por ultrafiltración. La ultrafiltración puede realizarse también antes de la precipitación del carbonato alcalino. El ultrafiltrado se precipita entonces por ejemplo con etanol. La fracción soluble del carbonato, como carbonato sódico, se precipita aquí como materia sólida junto con el NADH o NADPH obtenido. Debido a la alta concentración del NADH o NADPH en la mezcla de reacción no son precisos pasos de concentración adicionales antes de la precipitación del producto.

La formiato-deshidrogenasa separada puede reutilizarse.

Tras la precipitación con etanol el producto obtenido se lava y se seca a presión reducida.

La invención se refiere además a una preparación que contiene

- a) NADH o NADPH en una cantidad de 80 a 95 por ciento en peso, referida a los componentes no volátiles de las preparaciones, y carbonato de metal alcalino en una cantidad de 0,5 a 5 por ciento en peso, referida a los componentes no volátiles de la preparación.

La invención se refiere también a una preparación que contiene

- a) NADH o NADPH en una cantidad de 80 a 95 por ciento en peso, referida a los componentes no volátiles de las preparaciones,
- b) carbonato de metal alcalino en una cantidad de 0,5 a 5 por ciento en peso, referida a los componentes no volátiles de las preparaciones y
- c) agua en una cantidad de 3 a 7 por ciento en peso, referida a los componentes no volátiles de la preparación.

Por el término "carbonato de metal alcalino" se entiende sales del ácido carbónico como carbonato o hidrogenocarbonato de litio, sodio, potasio, rubidio o cesio.

La preparación puede contener también aún otros componentes volátiles o no volátiles en tanto la cantidad del NADH y el carbonato de metal alcalino, referida a los componentes no volátiles de las preparaciones, no se sobrepase o quede por debajo.

La cantidad de NADH o NADPH está respectivamente referida a los componentes no volátiles de la preparación conforme a la invención y es preferiblemente de 85 por ciento en peso a 95 por ciento en peso, en especial de 89 por ciento en peso a 91 por ciento en peso.

La cantidad de carbonato de metal alcalino está respectivamente referida a los componentes no volátiles de la preparación conforme a la invención y es preferiblemente de 1 por ciento en peso a 3 por ciento en peso, en especial de 1,5 por ciento en peso a 2,5 por ciento en peso.

La cantidad de agua está respectivamente referida a los componentes no volátiles de la preparación conforme a la invención y es preferiblemente de 3 por ciento en peso a 8 por ciento en peso, en especial de 5 a 6 por ciento en peso.

ES 2 320 432 T3

La confección de la preparación conforme a la invención se realiza por ejemplo incubando NAD o NADP, formiato-deshidrogenasa y agua con una mezcla de formiato sódico y formiato cálcico y aislando el NADH o NADPH reducido formado. En el aislamiento del NADH o NADPH se separan las fracciones insolubles, por ejemplo el carbonato cálcico, por centrifugación o filtración, la formiato-deshidrogenasa utilizada se separa por ultrafiltración y el NADH o NADPH se precipita a partir del ultrafiltrado, por ejemplo con etanol. El producto de precipitación obtenido se lava y a continuación se seca.

La preparación conforme a la invención presenta una buena estabilidad al almacenamiento e impide ampliamente la formación de productos de descomposición, por ejemplo ADP-ribosa, ADP, AMP o NAD.

La preparación conforme a la invención que contiene agua en una cantidad de 3 a 7 por ciento en peso, referida a los componentes no volátiles de la preparación, es especialmente bien adecuada para la compresión del material como comprimidos.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1

Síntesis de NADH con formiato de sodio y calcio

La mezcla de reacción contenía:

150 g de NAD (0,225 mol);	disuelto en 300 ml de H ₂ O
17 g de (HCOO) ₂ Ca (0,132 mol)	dispuesto en recipiente agitado
20 g de (HCOO)Na (0,3 mol)	dispuesto en recipiente agitado
5000 U de formiato-deshidrogenasa	dispuesta en recipiente agitado
Volumen final	750 ml

Tras 150 min de agitación a temperatura ambiente con control del pH y correspondiente titulación con NH₃ se procesó la solución de reacción. El rendimiento en NADH ascendió a 120 g de sal disódica del NADH (70% del teórico). Se separó el carbonato cálcico por centrifugación y la separación de la formiato deshidrogenasa se realizó por ultrafiltración. Tras la ultrafiltración se obtuvieron 600 ml de solución de ultrafiltrado que se precipitaron con 6,9 litros de etanol. El residuo obtenido se secó a presión reducida. El producto seco mostró la siguiente especificación de producto:

Componente	Contenido
Formiato/Acetato	1%
Etanol	2,5%
Agua	5%
Na ₂ CO ₃	2%
Pureza	97,5% (2,5% de ADP-ribosa del material de partida)

Contenido de NADH aproximadamente 89 a 91%

El NADH producido de este modo contiene todavía una proporción de 1 a 2% de Na₂CO₃ que actúa de modo estabilizante en todo el transcurso del procedimiento. Esto conduce a un producto que está libre de productos de degradación del NADH, se seca bien y presenta por consiguiente una especificación óptima para la compresión y formulación para la aplicación como suplemento nutricional.

Ejemplo 2

Síntesis de NADH con formiato de sodio y calcio

La mezcla de reacción contenía:

50 g de NAD (0,074 mol);	disuelto en 100 ml de H ₂ O
--------------------------	--

ES 2 320 432 T3

7 g de $(\text{HCOO})_2\text{Ca}$ (0,054 mol) dispuesto en recipiente agitado

7 g de $(\text{HCOO})\text{Na}$ (0,1 mol) dispuesto en recipiente agitado

5 2500 U de formiato-deshidrogenasa dispuesta en recipiente agitado

Volumen final 250 ml

10 Tras 80 min de agitación a temperatura ambiente con control del pH y correspondiente titulación con NaOH se
 procesó la solución de reacción. El rendimiento en NADH ascendió a 40 g de sal disódica del NADH (70% del
 teórico). Se separó el carbonato cálcico por centrifugación y la separación de la formiato deshidrogenasa se realizó
 por ultrafiltración. Tras la ultrafiltración se obtuvieron 200 ml de solución de reacción que se precipitaron con 2,3
 litros de etanol. El residuo obtenido se secó a presión reducida. El producto seco mostró la siguiente especificación de
 15 producto:

Componente	Contenido
------------	-----------

Formiato/Acetato	1,5%
------------------	------

Etanol	2,4%
--------	------

Agua	6%
------	----

Na_2CO_3	0,1%
--------------------------	------

Pureza	97,5% (2,5% de ADP-ribosa del material de partida)
--------	--

Contenido de NADH aproximadamente 89 a 91%

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la reducción enzimática de dinucleótido de nicotinamida-adenina (NAD) o dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato (NADP) que está **caracterizado** porque se incubaba

- a) NAD o NADP con formiato-deshidrogenasa y agua
- b) y al menos un formiato de metal alcalino o formiato amónico,
- c) el carbonato de metal alcalino o carbonato amónico formado se elimina de la disolución por precipitación con una sal de metal alcalinotérreo hasta una cantidad de 0,5 a 5 por ciento en peso y
- d) se aísla el dinucleótido de nicotinamida-adenina reducido (NADH) o dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato reducido (NADPH) formado.

2. Procedimiento conforme a la reivindicación 1, **caracterizado** porque se incubaba

- a) NAD o NADP, formiato-deshidrogenasa y agua
- b) con una mezcla compuesta por al menos un formiato de metal alcalino o formiato amónico y al menos un formiato de metal alcalinotérreo y
- c) se aísla el NADH o NADPH formado.

3. Procedimiento conforme a la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque como formiato de metal alcalino se utiliza formiato de litio, de sodio, de potasio, de rubidio o de cesio.

4. Procedimiento conforme a una o varias de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque como formiato de metal alcalinotérreo se utiliza formiato de berilio, de magnesio, de calcio, de estroncio o de bario.

5. Procedimiento conforme a una o varias de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque se incubaba NAD o NADP, formiato-deshidrogenasa y agua con una mezcla de formiato sódico y formiato cálcico y el NADH o NADPH reducido formado se aísla.

6. Procedimiento conforme a una o varias de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque en la mezcla de síntesis se utiliza NAD o NADP en una concentración de 1 a 30% en peso.

7. Procedimiento conforme a la reivindicación 6, **caracterizado** porque en la mezcla de síntesis se utiliza NAD o NADP en una concentración de 10 a 25% en peso.

8. Procedimiento conforme a una o varias de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque el formiato de metal alcalino se utiliza al menos en cantidad equimolar pero preferiblemente en exceso respecto al NAD o NADP utilizado.

9. Procedimiento conforme a la reivindicación 8, **caracterizado** porque el formiato de metal alcalino se utiliza hasta en un exceso molar de veinte veces respecto al NAD o NADP utilizado.

10. Procedimiento conforme a la reivindicación 9, **caracterizado** porque el formiato de metal alcalino se utiliza en un exceso molar de 2 a 10 veces respecto al NAD o NADP utilizado.

11. Procedimiento conforme a una o varias de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque la eliminación del carbonato de metal alcalino formado se lleva a cabo por precipitación con cloruro de calcio, oxalato de calcio, acetato de calcio, maleato de calcio, oxalato de magnesio, acetato de magnesio o maleato de magnesio.

12. Procedimiento conforme a una o varias de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque la relación de formiato de metal alcalinotérreo a NAD o NADP asciende a 0,4 mol a 0,9 mol de formiato de metal alcalinotérreo a 1 mol de NAD o NADP.

13. Procedimiento conforme a la reivindicación 12, **caracterizado** porque la relación de formiato de metal alcalinotérreo a NAD o NADP asciende a 0,55 mol a 0,75 mol de formiato de metal alcalinotérreo a 1 mol de NAD o NADP.

14. Procedimiento conforme a una o varias de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado** porque la cantidad de enzima utilizada asciende a 1000 unidades a 1000000 unidades por kg del NAD o NADP utilizado en la mezcla de reacción.

15. Procedimiento conforme a la reivindicación 14, **caracterizado** porque la cantidad de enzima utilizada asciende a 10000 unidades a 100000 unidades por kg del NAD o NADP utilizado en la mezcla de reacción.

ES 2 320 432 T3

16. Procedimiento conforme a una o varias de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado** porque el valor del pH de la solución de reacción se mantiene constante en un valor de 7 a 9.

5 17. Procedimiento conforme a la reivindicación 16, **caracterizado** porque el valor del pH de la solución de reacción se mantiene constante en un valor de 7,5 a 8,5.

18. Procedimiento conforme a una o varias de las reivindicaciones 1 a 17, **caracterizado** porque la temperatura asciende a 10°C a 70°C.

10 19. Procedimiento conforme a la reivindicación 18, **caracterizado** porque la temperatura asciende a 20°C a 35°C.

20. Procedimiento conforme a una o varias de las reivindicaciones 1 a 19, **caracterizado** porque el tiempo de reacción asciende a 10 minutos a 10 horas.

15 21. Procedimiento conforme a la reivindicación 20, **caracterizado** porque el tiempo de reacción asciende a 100 minutos (min) a 200 min.

20 22. Procedimiento conforme a la reivindicación 20, **caracterizado** porque el tiempo de reacción asciende a 120 min a 150 min.

23. Preparación que contiene,

25 a) NADH o NADPH en una cantidad de 80 a 95 por ciento en peso, referida a los componentes no volátiles de la preparación y

b) carbonato de metal alcalino en una cantidad de 0,5 a 5 por ciento en peso, referida a los componentes no volátiles de la preparación.

30 24. Preparación conforme a la reivindicación 23, **caracterizada** porque además contiene agua en una cantidad en una cantidad de 3 a 7 por ciento en peso, referida a los componentes no volátiles de la preparación.

35 25. Preparación conforme a las reivindicaciones 23 y 24 que pueda obtenerse por un procedimiento conforme a una o varias de las reivindicaciones 1 a 22 en el que durante el aislamiento del NADH o NADPH se separan las fracciones insolubles por centrifugación o filtración, la formiato-deshidrogenasa se separa por ultrafiltración y el NADH o NADPH se precipita a partir del ultrafiltrado, se lava y se seca.

40 26. Uso de la preparación conforme a las reivindicaciones 23 y 24 como suplemento nutricional en la fatiga, el “jet lag” y en la nutrición de personas que padecen Alzheimer, Parkinson o depresiones.