(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 34 002 T2** 2006.01.12

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 711 559 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 34 002.6**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 402 484.0**
(96) Europäischer Anmeldetag: **07.11.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **15.05.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **09.02.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.01.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***A61K 31/685*** (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
29799894 08.11.1994 JP

(84) Benannte Vertragsstaaten:
CH, DE, ES, FR, GB, IT, LI, NL, SE

(73) Patentinhaber:
Kabushiki Kaisha Yakult Honsha, Tokio/Tokyo, JP

(74) Vertreter:
Samson & Partner, Patentanwälte, 80538 München

(72) Erfinder:
Sakai, Masahi, Tokyo, JP; Yamatoya, Hidejuki, Tokyo, JP; Mizusawa, Naomi, Tokyo, JP; Kudo, Satoshi, Tokyo, JP

(54) Bezeichnung: **Verwendung von Phosphatidylserinen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verbesserung der Gehirntätigkeit**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0001] Es ist ein Gegenstand der Erfindung, eine Verwendung von Phosphatidyl-L-serin oder eines Salzes davon, welches erhalten wird, indem wenigstens ein Rohmaterial-Lecithin, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Sojabohnen-Lecithin und Eigelb-Lecithin, einem Phosphatidylierungsverfahren mit von Actinomyces abgeleiteter Phospholipase D in Gegenwart von L-Serin, gefolgt von einem Reinigungsverfahren, um Verunreinigungen daraus zu entfernen, unterworfen wird, als Wirkstoff für die Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Beeinträchtigungen des Gedächtnisses, wobei:

(i) die Fettsäuren in dem Phosphatidyl-L-serin aus dem Rohmaterial-Sojabohnen-Lecithin hauptsächlich aus Palmitinsäure und Linolsäure gebildet werden und

(ii) die Fettsäuren in dem Phosphatidyl-L-serin aus dem Rohmaterial-Eigelb-Lecithin hauptsächlich aus Palmitinsäure und Ölsäure gebildet werden,

ohne ein Auftreten von jeglichen Problemen aus Sicht der Kosten und der Versorgung bereitzustellen.

[0002] Gemäß den Forschungsarbeiten der Erfinder wird bestätigt, dass Phosphatidylserin, welches hergestellt wird, indem eine enzymatische Transphosphatidylierung von wenigstens einem Rohmaterial-Lecithin, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Sojabohnen-Lecithin und Eigelb-Lecithin, angewendet wird, wie auch Lysophosphatidyl-L-serin, welches durch die Transphosphatidylierung des Rohmaterial-Lecithins des hydrierten Produkts davon mit Phospholipase A_2 in Gegenwart von L-Serin hergestellt wird, herausragende Wirkungen einer Erhöhung der Glucosespiegel im Gehirn und einer Verbesserung von Beeinträchtigungen des Gedächtnisses aufweist.

[0003] Die Verwendung von Phosphatidyl-L-serin oder eines Salzes davon einer Ausführungsform der Erfindung wird erzielt, indem wenigstens ein Rohmaterial-Lecithin, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Sojabohnen-Lecithin und Eigelb-Lecithin, einem Phosphatidylierungsverfahren mit von Actinomyces abgeleiteter Phospholipase D in Gegenwart von L-Serin, gefolgt von einem Reinigungsverfahren, um Verunreinigungen daraus zu entfernen, unterworfen wird, als Wirkstoff für die Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Beeinträchtigungen des Gedächtnisses, wobei:

(i) die Fettsäuren in dem Phosphatidyl-L-serin aus dem Rohmaterial-Sojabohnen-Lecithin hauptsächlich aus Palmitinsäure und Linolsäure gebildet werden und

(ii) die Fettsäuren in dem Phosphatidyl-L-serin aus dem Rohmaterial-Eigelb-Lecithin hauptsächlich aus Palmitinsäure und Ölsäure gebildet werden;

und wobei die Fettsäurekette eine hydrierte gesättigte Fettsäurekette ist.

[0004] Die Verwendung von Lysophosphatidyl-L-serin oder eines Salzes davon einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird bewirkt, indem Phosphatidyl-L-serin einem Phosphatidylierungsverfahren mit Phospholipase A_2 unterworfen wird, als Wirkstoff für die Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Beeinträchtigungen des Gedächtnisses, wobei:
das Lysophosphatidyl-L-serin aus Phosphatidyl-L-serin, bei welchem die Fettsäurekette davon an Position α oder β entfernt ist, gebildet wird;
das Phosphatidyl-L-serin erhalten wird, indem wenigstens ein Rohmaterial-Lecithin, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Sojabohnen-Lecithin und Eigelb-Lecithin, einem Phosphatidylierungsverfahren mit von Actinomyces abgeleiteter Phospholipase D in Gegenwart von L-Serin, gefolgt von einem Reinigungsverfahren, um Verunreinigungen daraus zu entfernen, unterworfen wird;

(i) die Fettsäuren in dem Phosphatidyl-L-serin aus dem Rohmaterial-Sojabohnen-Lecithin hauptsächlich aus Palmitinsäure und Linolsäure gebildet werden und

(ii) die Fettsäuren in dem Phosphatidyl-L-serin aus dem Rohmaterial-Eigelb-Lecithin hauptsächlich aus Palmitinsäure und Ölsäure gebildet werden.

[0005] Die Verwendung von Lysophosphatidyl-L-serin oder eines Salzes davon einer noch weiteren Ausführungsform der Erfindung wird bewirkt, indem Phosphatidyl-L-serin einem Phosphatidylierungsverfahren mit Phospholipase A_2 unterworfen wird, als Wirkstoff für die Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Beeinträchtigungen des Gedächtnisses, wobei:
das Lysophosphatidyl-L-serin aus Phosphatidyl-L-serin, bei welchem die Fettsäurekette davon an Position α oder β entfernt ist, gebildet wird;
das Phosphatidyl-L-serin erhalten wird, indem wenigstens ein Rohmaterial-Lecithin, ausgewählt aus der Grup-

pe bestehend aus Sojabohnen-Lecithin und Eigelb-Lecithin, einem Phosphatidylierungsverfahren mit von Actinomyces abgeleiteter Phospholipase D in Gegenwart von L-Serin, gefolgt von einem Reinigungsverfahren, um Verunreinigungen daraus zu entfernen, unterworfen wird;

(i) die Fettsäuren in dem Phosphatidyl-L-serin aus dem Rohmaterial-Sojabohnen-Lecithin hauptsächlich aus Palmitinsäure und Linolsäure gebildet werden und

(ii) die Fettsäuren in dem Phosphatidyl-L-serin aus dem Rohmaterial-Eigelb-Lecithin hauptsächlich aus Palmitinsäure und Ölsäure gebildet werden,

und wobei die Fettsäurekette eine hydrierte gesättigte Fettsäurekette ist.

[0006] Die Verwendung von Phosphatidyl-L-serin oder die Verwendung von Lysophosphatidyl-L-serin einer noch weiteren Ausführungsform der Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, dass das Phosphatidyl-L-serin oder das Salz davon erhalten wird, indem das Rohmaterial-Lecithin dem Phosphatidylierungsverfahren mit der Phospholipase D in Gegenwart von L-Serin und eines organischen Lösemittels unterworfen wird.

[0007] Gemäß der Erfindung weist die Verwendung von Phosphatidyl-L-serin oder die Verwendung von Lysophosphatidyl-L-serin, welche als Wirkstoffe Phosphatidyl-L-serin, welches eine von Sojabohnen-Lecithin oder Eigelb-Lecithin abgeleitete strukturelle Fettsäurekette aufweist, oder Lysophosphatidyl-L-serin, welches aus Phosphatidyl-L-serin, bei welchem die Fettsäurekette davon an Position α oder β entfernt ist, gebildet wird, enthalten, eine bemerkenswerte Wirkung zur Erhöhung der Hirn-Glucosespiegel auf, wodurch der Erhöher eine Wirkung, die Zerebration eines Patienten, dem der Erhöher verabreicht wird, zu verbessern, aufweist.

[0008] Die Verwendung von Phosphatidyl-L-serin oder die Verwendung von Lysophosphatidyl-L-serin gemäß der Erfindung kann als Wirkstoff das Salz des Phosphatidyl-L-serins oder des Lysophosphatidyl-L-serins, welches aus dem umgelagerten Phosphatidyl-L-serin, bei welchem die Fettsäurekette davon an Position α oder β entfernt ist, gebildet wird, enthalten und ein solches Salz kann in zufriedenstellender Weise verwendet werden, wenn das Salz in Form eines pharmazeutisch annehmbaren Salzes vorliegt. Spezielle derartige Salze umfassen Natriumsalze, Kaliumsalze, Magnesiumsalze, Ammoniumsalze, Hydrochloridsalze, Sulfatsalze und dergleichen, und unter diesen Salzen wird der Vorzug Natriumsalzen und Kaliumsalzen gegeben.

[0009] Die Verwendung von Phosphatidyl-L-serin oder die Verwendung von Lysophosphatidyl-L-serin der Erfindung kann wirksam über eine intravenöse Verabreichung und orale Verabreichung verabreicht werden. Der Erhöher kann mit anderen Trägersubstanzen, wie zusätzlichen Phospholipiden, Zucker und Protein zur Herstellung von Kapseln und Granulaten mit verbesserter Handhabung und Haltbarkeitsdauer gemischt werden. Aufgrund des Fehlens eines jeglichen Sicherheitsproblems kann der Erhöher in die täglichen Nahrungsmittel und Getränke für eine Verwendung bei der Verbesserung und Verhütung von Zerebrationserkrankungen eingemischt werden.

[0010] Das vorerwähnte Phosphatidyl-L-serin und Lysophosphatidyl-L-serin als Wirkstoffe gemäß der Erfindung werden beide hergestellt durch die Transphosphatidylierung mit Phospholipase D unter Verwendung von Sojabohnen-Lecithin oder Eigelb-Lecithin als Substrat.

[0011] Das Verfahren wird jetzt veranschaulicht werden. Ein Rohmaterial-Lecithin (nämlich Phosphatidylcholin), welches aus Sojabohnen-Lecithin und Eigelb-Lecithin ausgewählt wird, wird dem Transphosphatidylierungsverfahren mit Phospholipase D in Gegenwart von L-Serin unterworfen, wodurch die Cholingruppe durch die Seringruppe ersetzt wird, um das umgelagerte Phosphatidyl-L-serin herzustellen.

[0012] Wenn die strukturelle Fettsäurekette aus dem Rohmaterial-Lecithin, welches aus Sojabohnen-Lecithin und Eigelb-Lecithin ausgewählt wird, eine ungesättigte Fettsäure ist, wird die ungesättigte Fettsäure vorzugsweise in eine gesättigte Fettsäure über ein Hydrierungsverfahren umgewandelt. Das Hydrierungsverfahren kann auf das Rohmaterial-Lecithin vor der Transphosphatidylierung angewendet werden; ansonsten kann das Hydrierungsverfahren auf das durch die Transphosphatidylierung hergestellte Phosphatidyl-L-serin angewendet werden.

[0013] Lysophosphatidyl-L-serin kann durch Entfernung der Fettsäurekette an entweder Position α oder β des so hergestellten Phosphatidyl-L-serins oder des hydrierten Phosphatidyl-L-serins hergestellt werden. Bei einer Verwendung eines Rohmaterial-Lysolecithins, welches durch Entfernung des an die Position α oder β des Glycerols des Rohmaterial-Lecithins, welches aus Sojabohnen-Lecithin, Rübsamen-Lecithin und Eigelb-Lecithin ausgewählt wird, gebundenen Fettsäuremoleküls hergestellt wird, wird das oben beschriebene Transphosphatidylierungsverfahren zur Herstellung von Lysophosphatidyl-L-serin gefördert. Dann sind die Kosten für eine

solche Entfernung gering mit keinerlei Auftreten eines irgendwie gelagerten Problems aus Sicht der Versorgung im Rahmen der Maßstabsvergrößerung.

[0014] Es kann ein jegliches kommerziell erhältliches Sojabohnen-Lecithin oder Eigelb-Lecithin ohne jegliche Einschränkung als Rohmaterial verwendet werden. Als Phospholipase D für eine Verwendung in dem Transphosphatidylierungsverfahren kann man beispielsweise jene aus Actinomyces verwenden, wenn sie eine Aktivität gegenüber Lecithin oder hydriertem Lecithin oder Lysolecithin in Gegenwart von L-Serin für die Herstellung von Phosphatidyl-L-serin aufweisen.

[0015] Das spezielle Transphosphatidylierungsverfahren ist bekannt und wird beispielsweise in der Japanischen Patentoffenlegungsschrift Nr. 63-245685 beschrieben; aus diesem Grunde wird hier keine detaillierte Erläuterung beschrieben. Die Transphosphatidylierung in Gegenwart eines organischen Lösemittels, wie Ethylacetat, wird als das Verfahren zur Herstellung des Zerebrationsverbesseres der Erfindung aufgrund einer höheren Umwandlungsausbeute und einfacher Nachbehandlung empfohlen.

[0016] Das durch das Transphosphatidylierungsverfahren hergestellte Phosphatidyl-L-serin sollte vorzugsweise einem geeigneten Reinigungsverfahren unterworfen werden, um Verunreinigungen zu entfernen. Solange kein Nachteil auftritt, wie die abträgliche Wirkung aus der Verabreichung und die Hemmung der die Zerebration verbessernden Wirkung, ist die Anwesenheit von Verunreinigungen, welche aus dem Rohmaterial stammen, oder von Verunreinigungen, die als Verunreinigungen während des Verfahrens eingebracht werden, möglicherweise überhaupt nicht problematisch, wenn der Gehalt an solchen Verunreinigungen innerhalb des annehmbaren Bereichs liegt.

BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

Beispiel 1-1

[0017] Unter Verwendung von Sojabohnen-Lecithin als Rohmaterial wurde Phosphatidyl-L-serin durch das folgende Verfahren hergestellt.

[0018] Sojabohnen-Lecithin (50 g; PC 80, BOLEC als Produktbezeichnung; Croklaan B. V., Niederlande) und Sojabohnen-Öl (10 g) wurden in ein 300 ml-Gefäß gegeben, gefolgt von der Zugabe von Ethylacetat (50 ml) für die Solubilisierung. Zugabe einer Lösung (20 ml) von 0,30 g/ml L-Serin, gelöst in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, zu der resultierenden Lösung für sorgfältiges Mischen. Es wurde eine Lösung von 500 U/ml Phospholipase D aus Actinomyces (15 ml; hergestellt von Yakult Honsha Co., Ltd) zu der gemischten Lösung für eine Umsetzung bei 50°C für 5 h unter Rühren mit einem Rührer hinzugesetzt.

[0019] Um das Enzym in der Reaktionslösung zu inaktivieren, wurde das die Reaktionslösung enthaltende Gefäß in heißes Wasser eingetaucht. Nachfolgend wurde die Reaktionslösung in Eis abgekühlt, um die Lösung in zwei Phase aufzutrennen, die man dann 30 min stehen ließ. Nachfolgend wurde die obere Phase verworfen. Die übrig bleibende untere Phase wurde mit Chloroform extrahiert, welche dann unter verringertem Druck getrocknet wurde. Zu dem resultierenden Produkt (5 g) wurde Chloroform (15 ml) für eine Auflösung hinzugesetzt. Die resultierende Lösung wurde dann auf eine Säule (mit 32 mm Durchmesser × 300 ml Länge), welche mit Kieselgel (Silica Gel 60 als Produktbezeichnung; hergestellt von Merck Japan Ltd.) gepackt war, aufgetragen, um eine Phosphatidyl-L-serin enthaltende Fraktion unter Verwendung von Chloroform-Methanol (4:1) mit einer Flussrate von 100 ml/h bei Raumtemperatur abzutrennen.

Beispiel 1-2

[0020] Unter Verwendung von Eigelb-Lecithin (PL-100LE als Produktbezeichnung; hergestellt von Q. P. Corp. Japan) als Substrat wurde umgelagertes Phosphatidyl-L-serin durch das gleiche Verfahren wie in Beispiel 1-1 hergestellt.

Beispiel 1-3

[0021] Unter Verwendung von Rübsamen-Lecithin als Rohmaterial wurde Phosphatidyl-L-serin durch das folgende Verfahren hergestellt.

[0022] 85% Ethanol (4,8 kg) wurde zu Rübsamen-Lecithin (1,2 kg; hergestellt von Rinoru Oil Mills Co., Ltd. Japan) hinzugesetzt und es wurde mit einem Homogenisator ausreichend homogenisiert. Nachfolgend ließ

man das resultierende Homogenisat bei Raumtemperatur 2 h stehen, um den Überstand abzutrennen, der dann unter verringertem Druck getrocknet wurde, um eine in Ethanol lösliche Fraktion (ungefähr 300 g) zu gewinnen. Zu einem Teil (120 g) der Fraktion wurde Ethylacetat (600 g) hinzugesetzt für Rühren und Mischen, welcher dann über Nacht bei 5°C stehen gelassen wurde. Die in Ethylacetat unlösliche Fraktion, die durch das Verfahren ausgefällt worden war, wurde dann unter verringertem Druck getrocknet, um Rübsamen-Lecithin mit einem höheren Phosphatidylcholingehalt zu gewinnen (die Fraktion von Rübsamen-Lecithin von ungefähr 70 g).

[0023] Unter Verwendung der Fraktion von Rübsamen-Lecithin als Substrat wurde umgelagertes Phosphatidyl-L-serin durch das gleiche Verfahren wie in Beispiel 1-1 hergestellt.

Beispiel 2-1

[0024] Sojabohnen-Lecithin (LECINOL S-10EX als Produktbezeichnung; Nikko Chemicals Co., Ltd.) wurde via Hydrierung verarbeitet. Unter Verwendung des hydrierten Sojabohnen-Lecithins als Substrat wurde Phosphatidyl-L-serin durch das gleiche Verfahren wie in Beispiel 1-1 hergestellt.

Beispiel 2-2

[0025] Das von Sojabohnen-Lecithin abgeleitete Phosphatidyl-L-serin (1 g), das in Beispiel 1-1 hergestellt worden ist, wurde in einer gemischten Lösung von n-Hexan (15 g) und Ethanol (3 g) solubilisiert. Nach Zugabe von 10%-igem Palladium-Kohlenstoff (0,15 g) zu der Lösung wurde die resultierende Lösung via Hydrierung für ungefähr 5 h unter Rühren unter den Bedingungen von Raumtemperatur und Umgebungsdruck verarbeitet.

Beispiel 3-1

[0026] Aus den in den Beispielen 1-1 bis 2-2 hergestellten individuellen Typen von Phosphatidyl-L-serin wurde Lysophosphatidyl-L-serin hergestellt, wie nachfolgend beschrieben.

[0027] Genauer wurde jeder Typ von Phosphatidyl-L-serin (300 mg) in ein 6 ml-Gefäß gegeben, gefolgt von einer Zugabe von Ethylacetat (1,2 ml), 0,25 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,4 (0,20 ml), destilliertem Wasser (1,2 ml) und 11200 U/ml Phospholipase A_2 aus Schweine-Pankreas (0,02 ml; "LECITASE 10L" als Produktbezeichnung; hergestellt von Novo-Nordex Co., Ltd) für ein ausreichendes Mischen vor der Umsetzung bei 50°C für 16 h. Das die Reaktionslösung enthaltende Gefäß wurde dann 20 min in heißes Wasser eingetaucht, um das Enzym in der Reaktionslösung zu inaktivieren. Nachfolgend wurde die Lösung mit Aceton (3,0 ml × 3) gewaschen. Dann wurde das Präzipitat gewonnen und an der Luft getrocknet, wodurch Lysophosphatidyl-L-serin erhalten wurde.

Beispiel 4

[0028] Es wurden die Zusammensetzungen der Fettsäureketten der individuellen Typen von Phosphatidyl-L-serin und Lysophosphatidyl-L-serin, die in den Beispielen 1-1 bis 3-1 erhalten worden sind, analysiert. Gemäß der Routinemethode wurde die Analyse einer methylveresterten Probe durch Gas-Flüssigkeits-Chromatographie (GLC) mit einer Kapillarsäule ausgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 unten gezeigt. In der hiesigen Tabelle 1 bedeutet "PS" Phosphatidyl-L-serin; "LPS" Lysophosphatidyl-L-serin, "16:0" Palmitinsäure; "18.0" bedeutet Stearinsäure, "18:1" Ölsäure, "18:2" Linolsäure; und "18:3" Linolensäure.

Tabelle 1

	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	Andere
BB-PS	0,9	38,7	31,8	-	-	16,5
BB-LPS (α)	1,8	81,4	8,5	-	-	8,3
RSB-PS	13,8	3,9	10,2	63,2	5,9	3,0
RSB-LPS (α)	35,9	8,8	7,5	40,0	3,1	4,7
HRSB-PS	13,5	85,1	0,5	-	-	0,9
REY-PS	31,8	12,3	24,1	17,0	0,1	14,7

BB-PS: PS aus Rinderhirn
BB-LPS: LPS aus Rinderhirn
RSB-PS: Umgelagertes Sojabohnen-PS
RSB-LPS: Umgelagertes Sojabohnen-LPS
HRSB-PS: Hydriertes umgelagertes Sojabohnen-PS
REY-PS: Umgelagertes Eigelb-PS
(α): Position α

[0029] Wie in Tabelle 1 gezeigt, bestanden die Fettsäuren in dem aus Rinderhirn extrahierten Phosphatidyl-L-serin hauptsächlich aus Stearinsäure und Ölsäure. Im Gegensatz dazu bestanden die Fettsäuren in dem umgelagerten Phosphatidyl-L-serin aus dem Rohmaterial-Eigelb-Lecithin hauptsächlich aus Palmitinsäure und Ölsäure, während die Fettsäuren in dem umgelagerten Phosphatidyl-L-serin aus dem Rohmaterial-Sojabohnen-Lecithin hauptsächlich aus Palmitinsäure und Linolsäure bestanden. Dementsprechend wird gezeigt, dass diese Typen von umgelagertem Phosphatidyl-L-serin Fettsäurezusammensetzungen aufweisen, die sich deutlich von jenen des Phosphatidyl-L-serins aus Rinderhirn unterscheiden.

Beispiel 5

[0030] Wie nachfolgend beschrieben wird, wurde die Wirkung der Erhöhung der Hirn-Glucosespiegel über eine orale Verabreichung bei einem Test bestätigt.

1. Herstellung einer Probe zur Verabreichung

[0031] Zu dem über das Transphosphatidylierungsverfahren ausgehend von einem Sojabohnen-Lecithin-Substrat hergestellten Phosphatidyl-L-serin (20 mg) wurde 250 mM Phosphatpuffer, pH 7,9, (1 ml) hinzugesetzt, was dann mit einem Homogenisator vom Potter-Typ homogenisiert wurde, gefolgt von einer Ultraschallbehandlung (bei 0°C für 8 min), um eine Testprobe herzustellen. Es wurde eine Kontrollprobe hergestellt, indem 250 mM Phosphatpuffer, pH 7,9, (1 ml) zu Sojabohnen-Lecithin (20 mg) hinzugesetzt wurde, gefolgt von dem Emulgierungs- und Ultraschallbehandlungsverfahren.

2. Probenverabreichung

[0032] Innerhalb von 2 h nach der Herstellung wurden die Proben in Emulsion oral an eine Mehrzahl von Gruppen von männlichen ICR-Mäusen (mit einem Körpergewicht von ungefähr 35 g) in einer Menge von 1,0 ml/40 g (PS: 500 mg/kg) pro Maus unter Verwendung einer Magensonde verabreicht.

3. Schnelles Einfrieren des Gehirns

[0033] Als eine gegebene Zeitspanne (30 min bis 4 h) nach der Verabreichung verstrichen war, wurde jede Gruppe der Mäuse dekapitiert und getötet. Ihre Köpfe wurden in flüssigen Stickstoff für ein schnelles Einfrieren getaucht.

4. Gewinnung der gefrorenen Gehirne

[0034] Der gefrorene Mäusekopf wurde entlang der Medianlinie mit einem Autopsiemeißel halbiert. Dann

wurde durch Entfernen der Gewebe mit dem Autopsiemeißel mit Ausnahme der anterioren und posterioren Gehirnteile und der oberen und unteren Gehirnteile das Gehirn präpariert.

5. Extraktion aus gefrorenem Gehirn

[0035] Das Gesamtgewicht des gefrorenen Gehirns von jeder Maus wurde gewogen (300 bis 400 mg) und in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser pulverisiert. Zu dem Pulver (100 mg) in dem Mörser wurde 0,3 N Perchlorsäure (0,5 ml) für ein Verreiben in Flüssigkeit mit einem Pistill hinzugesetzt. Der Rückstand wurde abzentrifugiert und verworfen, um den Überstand zu gewinnen. Der Überstand wurde mit 1 N Kaliumhydroxid neutralisiert und das resultierende Kaliumperchlorat-Präzipitat wurde abzentrifugiert und verworfen, um den Überstand der extrahierten Lösung für eine Aufbewahrung in eingefrorenem Zustand zu gewinnen.

6. Bestimmung der Hirn-Glucose

[0036] Unter Verwendung eines Assaykits wurde durch die Hexokinase-Methode der Glucosespiegel in der in eingefrorenem Zustand aufbewahrten extrahierten Lösung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 unten gezeigt. In Tabelle 2 bedeutet hier "PS" Phosphatidyl-L-serin.

Tabelle 2

a gegenüber b: $p < 0,05$ (Tschukys Mehrfachvergleich)	
Versuchsgruppen	Hirn-Glucosespiegel (10^{-6} mol/g)
keine Verabreichung	$0,7 \pm 0,2^{a}$
RSB-PS (30 min nach Verabreichung)	$2,7 \pm 1,8^{b}$
RSB-PS (1 h nach Verabreichung)	$1,4 \pm 0,4^{ab}$
RSB-PS (2 h nach Verabreichung)	$1,3 \pm 0,4^{ab}$
RSB-PS (4 h nach Verabreichung)	$0,9 \pm 0,2^{a}$
SBL (2 h nach Verabreichung)	$0,7 \pm 0,2^{a}$

SBL: Sojabohnen-Lecithin

[0037] Wie in Tabelle 2 gezeigt, erhöhte das umgelagerte, von Sojabohne abgeleitete Phosphatidyl-L-serin, wenn es oral verabreicht wurde, den Hirn-Glucosespiegel 30 min nach der Verabreichung um das ungefähr 4-fache verglichen mit dem Spiegel im Falle keiner Verabreichung ($P < 0,05$, Tschukys Mehrfachvergleich). Nachfolgend fiel der Glucosespiegel mit dem Verstreichen der Zeit ab.

[0038] Vier Stunden nach der Verabreichung erreichte der Spiegel (war abgefallen auf) den Spiegel im Falle von keiner Verabreichung.

Beispiel 6

[0039] Wie nachfolgend beschrieben wird, wurde die Wirkung einer Erhöhung des Hirn-Glucosespiegels über eine Schwanzvenen-Injektion im Rahmen eines Tests bestätigt.

1. Herstellung von verschiedenen Arten von Lysophosphatidyl-L-serin

[0040] Ausgehend von den in den Beispielen 1-1 bis 2-2 hergestellten Typen von Phosphatidyl-L-serin wurden auf die folgende Weise verschiedene Arten von Lysophosphatidyl-L-serin hergestellt.

[0041] Spezieller wurde jeder der Phosphatidyl-L-serin-Typen (300 mg) in ein 6 ml-Gefäß gegeben, gefolgt von der Zugabe von Ethylacetat (1,20 ml), 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,4 (1,20 ml) und 11200 U/ml Phospholipase A_2 (0,02 ml; "LECITASE 10L" als Produktbezeichnung; hergestellt von Novo-Nordex Co Ltd.) für ein aus-

reichendes Mischen vor der Umsetzung bei 50°C für 14 h. Nachfolgend wurden die freigesetzten Fettsäuren mit Aceton weggewaschen, um Lysophosphatidyl-L-serin zu gewinnen.

2. Herstellung einer Probe für eine Verabreichung

[0042] Zu den verschiedenen Arten von Lysophosphatidyl-L-serin (2,0 mg oder 6, 0 mg) wurde 250 mM Phosphatpuffer, pH 7,9, (1 ml) hinzugesetzt, gefolgt von einer Emulgierung mit einem Homogenisator vom Potter-Typ und nachfolgender Ultraschallbehandlung (bei 0°C für 8 min), um Proben herzustellen.

3. Probenverabreichung

[0043] Innerhalb von 2 h nach der Herstellung wurden die individuellen Proben in Emulsion über die Schwanzvene einer Mehrzahl von Gruppen von männlichen ICR-Mäusen (mit einem Körpergewicht von ungefähr 35 g) in einer Menge von 1,0 ml/40 g (PS: 30 mg/kg) pro Maus injiziert.

4. Schnelles Einfrieren des Gehirns

[0044] Als eine gegebene Zeitspanne (30 min) nach der Verabreichung verstrichen war, wurde jede Gruppe der Mäuse dekapitiert und getötet. Ihre Köpfe wurden in flüssigen Stickstoff für ein schnelles Einfrieren getaucht.

5. Gewinnung der gefrorenen Gehirne

[0045] Für die Entnahme aus den gefrorenen Köpfen und die Bestimmung der Hirn-Glucose wurden die gleichen Prozeduren wie in Beispiel 5 ausgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 unten gezeigt. In Tabelle 3 bedeutet hier "LPS" Lysophosphatidyl-L-serin.

Tabelle 3

A gegenüber B gegenüber C: $p < 0,01$ (Tschukys Mehrfachvergleich)	
Versuchsgruppen	Hirn-Glucosespiegel (10^{-6} mol/g)
keine Verabreichung	$0,8 \pm 0,2^{A}$
RSB-LPS (10 mg/kg)	$1,8 \pm 0,8^{BC}$
RSB-LPS (30 mg/kg)	$2,5 \pm 0,2^{B}$
HRSB-LPS	$3,0 \pm 0,4^{BC}$
REY-LPS	$2,7 \pm 0,5^{BC}$
BB-LPS (10 mg/kg)	$3,2 \pm 0,9^{C}$

HRSB-LPS: Hydriertes umgelagertes Sojabohnen-LPS

REY-LPS: Umgelagertes Eigelb-LPS

BB-LPS: LPS aus Rinderhirn

[0046] Wie in Tabelle 3 gezeigt, erhöhte Lysophosphatidyl-L-serin der Arten aus Sojabohne und Eigelb die Mäusehirn-Glucose signifikant wie in dem Falle von Lysophosphatidyl-L-serin aus Rinderhirn.

Beispiel 7

[0047] Auf die folgende Weise wurde die Wirkung der Verbesserung der durch Scopolamin (SC) induzierten Beeinträchtigung des Gedächtnisses bestätigt.

[0048] Jeder Gruppe von 10 männlichen SD-Ratten mit einem Gewicht von ungefähr 300 g wurde intraperitoneal eine Scopolamin-Lösung (3,0 mg/ml Puffer) oder eine Lösung von jeder der verschiedenen Typen von Phosphatidyl-L-serin (60 mg/ml Puffer), jeweils in einer Dosis von 1,0 ml/kg, verabreicht. Zwanzig Minuten

nach der Verabreichung wurden die Ratten in den hellen Raum eines Durchlauf-Käfigs (hergestellt von Muromachi Machinery Co., Ltd.) gesetzt. Ungefähr 10 s später wurde die Tür, welche den hellen Raum von dem dunklen Raum trennt, geöffnet und, unmittelbar nachdem die Ratten den dunklen Raum betreten hatten, erhielten die Ratten einen Stromschlag von 2 s (4 mA, 100 V, Gleichstrom). Dann wurden 24 h nach der Verabreichung die Ratten erneut in den hellen Raum gesetzt, um die Reaktionslatenzzeit bis zu dem Maximalwert von 5 min zu zählen, bis sich die vier Gliedmaßen allesamt in dem dunklen Raum befanden. Es wird festgestellt, dass eine längere Reaktionslatenzzeit eine bessere Erinnerung an die Erfahrung des Stromschlags anzeigt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 gezeigt. In Tabelle 4 bedeutet hier "PS" Phosphatidyl-L-serin; "LPS" Lysophosphatidyl-L-serin; und "SC" bedeutet Scopolamin.

Tabelle 4

a gegenüber b: $p < 0,01$ (Mann-Whitneys U-Test)

A gegenüber B: $p < 0,01$ (Nicht-parametrischer Mehrfachvergleich)

Versuchsgruppen	SIR*1	RLT*2 (s)
Kontrolle*3	$0/10^{aA}$	300 oder mehr
SC allein	$9/10^{bB}$	128
SC + BB-PS	$0/10^{A}$	300 oder mehr
SC + RSB-PS	$0/10^{A}$	300 oder mehr
SC + HRSB-PS	$0/10^{A}$	300 oder mehr
SC + RR-PS	$0/10^{A}$	300 oder mehr
SC + REY-PS	$0/10^{A}$	300 oder mehr
SC + BB-LPS	$0/10^{A}$	300 oder mehr
SC + RBS-LPS	$0/10^{A}$	300 oder mehr

*1: Eintrittsverhältnis: Verhältnis der Anzahl von Ratten, die innerhalb von 5 min in den dunklen Raum eintreten, zu der Gesamtanzahl von Ratten

*2: Reaktionslatenzzeit hinsichtlich des dunklen Raums (Medianwert)

*3: Verabreicht mit Pufferlösung

RR-PS: Umgelagertes Rübsamen-PS

[0049] Wie in Tabelle 4 gezeigt, weist Phosphatidyl-L-serin der aus Sojabohne, Rübsamen und Eigelb abgeleiteten Typen die Wirkung auf, die durch Scopolamin induzierte Beeinträchtigung des Gedächtnisses in ungefähr dem gleichen Ausmaß wie in dem Falle von Phosphatidyl-L-serin aus Rinderhirn zu verbessern.

[0050] Wie oben beschrieben worden ist, kann der Phosphatidyl-L-serin aus Sojabohne, Rübsamen oder Eigelb als Wirkstoff gemäß der Erfindung enthaltende Zerebrationsverbesserer kontinuierlich leicht, ohne Schmerzen verabreicht werden, da Phosphatidyl-L-serin, welches hinsichtlich der Verbesserung der Zerebration wirksam ist, aus dem Verbesserer oral eingenommen werden kann. Darüber hinaus kann das hinsichtlich der Verbesserung der Zerebration wirksame Phosphatidyl-L-serin mit geringeren Kosten und zusätzlich in einem großen Maßstab hergestellt werden, indem eine Transphosphatidylierung über ein Phospholipid-Abbauenzym (Phospholipase D) eingesetzt wird.

Patentansprüche

1. Verwendung von Phosphatidyl-L-serin oder eines Salzes davon, welches erhalten wird, indem wenigstens ein Rohmaterial-Lecithin, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Sojabohnen-Lecithin und Eigelb-Lecithin, einem Phosphatidylierungsverfahren mit von Actinomyces abgeleiteter Phospholipase D in Gegenwart von L-Serin, gefolgt von einem Reinigungsverfahren, um Verunreinigungen daraus zu entfernen, unterworfen wird, als Wirkstoff für die Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Beeinträchtigungen des Gedächtnisses, wobei:

(i) die Fettsäuren in dem Phosphatidyl-L-serin aus dem Rohmaterial-Sojabohnen-Lecithin hauptsächlich aus Palmitinsäure und Linolsäure gebildet werden und
(ii) die Fettsäuren in dem Phosphatidyl-L-serin aus dem Rohmaterial-Eigelb-Lecithin hauptsächlich aus Palmitinsäure und Ölsäure gebildet werden.

2. Verwendung von Phosphatidyl-L-serin oder eines Salzes davon, welches erhalten wird, indem wenigstens ein Rohmaterial-Lecithin, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Sojabohnen-Lecithin und Eigelb-Lecithin, einem Phosphatidylierungsverfahren mit von Actinomyces abgeleiteter Phospholipase D in Gegenwart von L-Serin, gefolgt von einem Reinigungsverfahren, um Verunreinigungen daraus zu entfernen, unterworfen wird, als Wirkstoff für die Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Beeinträchtigungen des Gedächtnisses, wobei:
(i) die Fettsäuren in dem Phosphatidyl-L-serin aus dem Rohmaterial-Sojabohnen-Lecithin hauptsächlich aus Palmitinsäure und Linolsäure gebildet werden und
(ii) die Fettsäuren in dem Phosphatidyl-L-serin aus dem Rohmaterial-Eigelb-Lecithin hauptsächlich aus Palmitinsäure und Ölsäure gebildet werden,
und wobei die Fettsäurekette eine hydrierte gesättigte Fettsäurekette ist.

3. Verwendung von Lysophosphatidyl-L-serin oder eines Salzes davon, welches hergestellt wird, indem Phosphatidyl-L-serin einem Phosphatidylierungsverfahren mit Phospholipase A_2 unterworfen wird, als Wirkstoff für die Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Beeinträchtigungen des Gedächtnisses, wobei:
das Lysophosphatidyl-L-serin aus Phosphatidyl-L-serin, bei welchem die Fettsäurekette davon an Position α oder β entfernt ist, gebildet wird;
das Phosphatidyl-L-serin erhalten wird, indem wenigstens ein Rohmaterial-Lecithin, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Sojabohnen-Lecithin und Eigelb-Lecithin, einem Phosphatidylierungsverfahren mit von Actinomyces abgeleiteter Phospholipase D in Gegenwart von L-Serin, gefolgt von einem Reinigungsverfahren, um Verunreinigungen daraus zu entfernen, unterworfen wird;
(i) die Fettsäuren in dem Phosphatidyl-L-serin aus dem Rohmaterial-Sojabohnen-Lecithin hauptsächlich aus Palmitinsäure und Linolsäure gebildet werden und
(ii) die Fettsäuren in dem Phosphatidyl-L-serin aus dem Rohmaterial-Eigelb-Lecithin hauptsächlich aus Palmitinsäure und Ölsäure gebildet werden.

4. Verwendung von Lysophosphatidyl-L-serin oder eines Salzes davon, welches hergestellt wird, indem Phosphatidyl-L-serin einem Phosphatidylierungsverfahren mit Phospholipase A_2 unterworfen wird, als Wirkstoff für die Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Beeinträchtigungen des Gedächtnisses, wobei:
das Lysophosphatidyl-L-serin aus Phosphatidyl-L-serin, bei welchem die Fettsäurekette davon an Position α oder β entfernt ist, gebildet wird;
das Phosphatidyl-L-serin erhalten wird, indem wenigstens ein Rohmaterial-Lecithin, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Sojabohnen-Lecithin und Eigelb-Lecithin, einem Phosphatidylierungsverfahren mit von Actinomyces abgeleiteter Phospholipase D in Gegenwart von L-Serin, gefolgt von einem Reinigungsverfahren, um Verunreinigungen daraus zu entfernen, unterworfen wird;
(i) die Fettsäuren in dem Phosphatidyl-L-serin aus dem Rohmaterial-Sojabohnen-Lecithin hauptsächlich aus Palmitinsäure und Linolsäure gebildet werden und
(ii) die Fettsäuren in dem Phosphatidyl-L-serin aus dem Rohmaterial-Eigelb-Lecithin hauptsächlich aus Palmitinsäure und Ölsäure gebildet werden,
und wobei die Fettsäurekette eine hydrierte gesättigte Fettsäurekette ist.

5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Phosphatidyl-L-serin oder das Salz davon erhalten wird, indem das Rohmaterial-Lecithin dem Phosphatidylierungsverfahren mit der Phospholipase D in Gegenwart von L-Serin und eines organischen Lösemittels unterworfen wird.

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Phosphatidyl-L-serin oder das Salz davon erhalten wird, indem das Rohmaterial-Lecithin dem Phosphatidylierungsverfahren mit der Phospholipase D in Gegenwart von L-Serin und eines organischen Lösemittels unterworfen wird.

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1, 2 und 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Phosphatidyl-L-serin oder das Salz davon auch einen pharmazeutischen Träger umfasst.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 3, 4 und 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Lysophosphati-

dyl-L-serin oder das Salz davon auch einen pharmazeutischen Träger umfasst.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen