

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4777588号
(P4777588)

(45) 発行日 平成23年9月21日(2011.9.21)

(24) 登録日 平成23年7月8日(2011.7.8)

(51) Int.Cl.

F 1

C07H 19/16	(2006.01)	C07H 19/16
C12P 19/40	(2006.01)	C12P 19/40
C07H 1/08	(2006.01)	C07H 1/08

請求項の数 7 (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願2001-586317 (P2001-586317)
 (86) (22) 出願日 平成13年3月30日 (2001.3.30)
 (65) 公表番号 特表2003-534349 (P2003-534349A)
 (43) 公表日 平成15年11月18日 (2003.11.18)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2001/003633
 (87) 國際公開番号 WO2001/090130
 (87) 國際公開日 平成13年11月29日 (2001.11.29)
 審査請求日 平成20年3月17日 (2008.3.17)
 (31) 優先権主張番号 M12000A001158
 (32) 優先日 平成12年5月25日 (2000.5.25)
 (33) 優先権主張国 イタリア (IT)

(73) 特許権者 502423794
 ケメンテクノ・エツセ・エルレ・エルレ
 イタリー国、イ-20052・モンザ、ビ
 ア・カタラーニ、5
 (74) 代理人 100062007
 弁理士 川口 義雄
 (74) 代理人 100105131
 弁理士 井上 滉
 (74) 代理人 100113332
 弁理士 一入 章夫
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74) 代理人 100103920
 弁理士 大崎 勝真

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 (S S, R S) - S - アデノシル - L - メチオニンの薬剤として許容される塩の調製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

塩化した (R S) - (+) - SAMe ジアステレオ異性体が、塩化した (S S) - (+) - SAMe ジアステレオ異性体に対して 3 % 以下の量で存在する (S S, R S) - SAMe の薬剤として許容される塩の調製方法であって、0 ~ 12 の温度において、

- 富化酵母由来の (S S, R S) - S - アデノシル - L - メチオニンを精製し、少なくとも 6 g / l を含有させること、ここで上記精製は、

(a) - pH 値の 1.2 ~ 3.5 への調整、

(b) - 富化酵母由来の (S S, R S) - SAMe の水性溶解物の調製、

(c) - 得られた溶解物の精密濾過、

(d) - 0.1 ~ 2 N 無機酸溶液で溶出することによる弱酸樹脂上への得られた精密濾液の吸着、

(e) - 得られる溶出液の脱色を含む、

- 逆浸透により脱色溶出液を 30 から 70 体積 % まで濃縮すること、

- 化学量論的量の少なくとも 1 種類の薬剤として許容される酸を濃縮溶出液に添加し、対応する (S S, R S) - SAMe の薬剤として許容される塩を得ること、を含む方法。

【請求項 2】

(S S, R S) - SAMe の薬剤として許容される塩を凍結乾燥に供する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

10

20

ステップ(a)における pH 値が 1 ~ 2 である請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

ステップ(b)における溶解物の調製を、酵母を細胞破壊装置に通過させることによって行う前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

温度が 2 ~ 5 °C である請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

富化酵母が少なくとも 8 ~ 10 g / l の (SS, RS) - S - アデノシル - L - メチオニンを含有する請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

薬剤として許容される酸が硫酸およびパラトルエンスルホン酸から選択される請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、(SS, RS) - S - アデノシル - L - メチオニン(以下 (SS, RS) - SAMe という)の薬剤として許容される塩の調製方法に関する。

【0002】

特に、本発明は、塩化した(salified)(SS) - (+) - S - アデノシル - L - メチオニニアステレオ異性体(以下 (SS) - (+) - SAMe という)に対して 3 % 以下の量で塩化した(RS) - (+) - S - アデノシル - L - メチオニニアステレオ異性体(以下 (RS) - (+) - SAMe という)が生成される、(SS, RS) - SAMe の薬剤として許容される塩の調製方法に関する。

20

【0003】

知られているように、(SS, RS) - SAMe は、酵素的メチル基転移反応に関与している生理学的メチル供与体であり、すべての生物に存在し慢性肝疾患、脂肪症、脂肪血、アテローム性動脈硬化症に対する治療効果を有していることから、これを大量に製造することが望まれる。

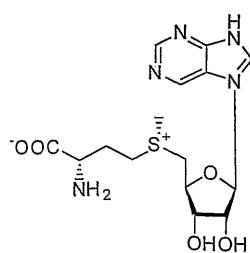
【0004】

(SS, RS) - SAMe を含有する製品は、以下の構造式を有する 2 種類のジアステレオ異性体、(RS) - (+) - SAMe および(SS) - (+) - SAMe の混合物からなることも知られている(J. W. Cornforth, J. A. C. S., 99 卷、7292 ~ 7300 ページ、1977 年; Stollowitz 他、J. A. C. S., 103 卷、6015 ~ 6019 ページ、1981 年)。

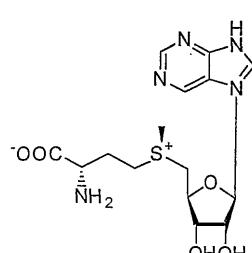
30

【0005】

【化 1】



SS



RS

40

【0006】

さらに、2 種類のジアステレオ異性体のうち 1 種類、すなわち (SS) - (+) - SAMe のみがメチル基転移に対して酵素的に活性であり、自然にラセミ化することにより約 20 % に等しい比率で不活性なジアステレオ異性体 (RS) - (+) - SAMe の生成が起きることが明らかにされた(De La Haba 他、J. A. C. S., 81 卷、39

50

75~3980ページ、1959年) (Wu他、*Biochemistry*、22巻、2828~2832ページ、1983年)。

【0007】

実際に、出願人は、(SS, RS)-SAMeをベースとする市販製品すべてに不活性なジアステレオ異性体(RS)-(+)-SAMeが少なくとも20%に等しい比率で存在することに着目し、前記比率が経時的に40%以上まで増加することにも着目した。

【0008】

この所見は、ジアステレオ異性体混合物が経時的に不安定であることをはっきりと支持しており、一方、このことは溶液中の製品に関してすでに言及されている(G. L. Creason他、*Phytochemistry*、24巻、6号、1151~1155ページ、1985年; H. C. Uzar、*Liebigs Ann. Chem.* 607~610ページ、1989年)。

10

【0009】

活性な(SS)-(+)-SAMeジアステレオ異性体の比率が不活性な(RS)-(+)-SAMe異性体に対してはっきりと高く、前記比率が経時的に安定となる(SS, RS)-SAMe誘導体に対する需要が本分野では特に感じられる。

【0010】

(SS, RS)-SAMeおよび薬剤として許容されるその塩を産業レベルで使用するには、室温でさえ認められる熱的不安定性、およびその調製および精製方法の複雑さゆえの障害があることも分かっていた。

20

【0011】

(SS, RS)-SAMeの精製および薬剤として許容されるその塩の製造方法はいくつか知られている。

【0012】

しかしながら、知られている精製方法は、強酸樹脂(JP13680/1971)もしくはキレート型樹脂(JP20998/1978)またはピクリン酸またはピコリン酸などの特殊で高価な反応剤(US3707536およびUS3954726)の使用を条件とする上に、いずれも(SS, RS)-SAMeのイオウ不斉中心の部分的ラセミ化を引き起こし、それによって20%以上の量で不活性なジアステレオ異性体を含む最終生成物をもたらす。

30

【0013】

弱酸樹脂を用いる精製方法も知られているが(JP14299/1981、FR-A-2531714、EP-A-0141914)、(SS, RS)-SAMeの部分的分離であるために医薬品目的には不十分な純度が得られるに過ぎない。

【0014】

上記の方法のいくつかを実現して高純度を得ることが可能になっても、部分的ラセミ化はいずれにせよ少なくとも20%の不活性ジアステレオ異性体が存在することを意味する。さらに一部の例(FR-2531714)では、細胞から生成物を抽出するために重炭酸カリウムと、続く過塩素酸カリウムの沈殿の使用が条件となり、まずは分離と、次いで生成物の処理に問題点を生じる。EP-A-0141914では、(SS, RS)-SAMeを含有する酵母の細胞溶解が、有機溶媒(例えば、酢酸エチル、アセトンなど)の存在下、さらに100~200メッシュの樹脂をベースとするクロマトグラフカラムを用い、高い投資および維持コストをかけて行われている。(SS, RS)-SAMeの抽出に溶媒を用いることは、急激燃焼防止(antideflagrant)設備ならびに回収、蒸留および溶媒回収システムの使用を必然的に暗示し、残留溶媒と共に排出することを避けるための使用済みの菌糸体に必要な乾燥も加え、これらすべての要素が追加の投資および作業コストを発生することになる。

40

【0015】

第一の態様によれば、本発明は、塩化した(RS)-(+)-SAMeジアステレオ異性体が塩化した(SS)-(+)-SAMeジアステレオ異性体に対して3%以下の量で存

50

在する (SS, RS) - SAMe の薬剤として許容される塩の調製方法であって、0 ~ 12 以上の温度において、

- 少なくとも 6 g / l を含有しなければならない富化酵母由来の (SS, RS) - S - アデノシル - L - メチオニンを精製すること、上記精製は、

(a) - pH 値の 1.2 ~ 3.5 への調整、

(b) - 富化酵母由来の (SS, RS) - SAMe の水性溶解物の調製、

(c) - 得られる溶解物の精密濾過、

(d) - 0.1 ~ 2 N 無機酸溶液で溶出することによる弱酸樹脂上への得られた精密濾液の吸着、

(e) - 得られる溶出液の脱色を含み、

- 逆浸透による脱色溶出液の 30 から 70 体積 % まで濃縮すること、

- 化学量論的量の少なくとも 1 種類の薬剤として許容される酸塩を濃縮溶出液に添加し、対応する (SS, RS) - SAMe の薬剤として許容される塩を得ることを含む方法に関する。

【0016】

好みの態様によれば、このようにして得られる (SS, RS) - SAMe の薬剤として許容される塩を凍結乾燥に供することができる。

【0017】

別の好みの態様によれば、本発明の方法は 2 ~ 5 の温度で行われる。

【0018】

さらに好みの態様によれば、ステップ (a) における pH 値は 1 ~ 2 であり、一方、ステップ (b) における溶解物の調製は、酵素を細胞破壊装置に通過させ、次いでこのようにして得られた酵母の精密濾過を、例えばセラミック膜上で進めることによって行うことができる。

【0019】

(SS, RS) - SAMe が精製される富化酵母は、少なくとも 8 ~ 10 g / l の (SS, RS) - SAMe を含有することが好み。薬剤として許容される酸は、硫酸およびパラトルエンスルホン酸から選択されることが好み。

【0020】

本発明の方法により、吸着生成物 1 kg 当たり、例えば樹脂 10 ~ 20 リットルに等しい樹脂 / 生成物比を用いるのが可能になることが注目され、このことは、JP 20998 / 1978 で開示された事柄に関して有利である。

【0021】

本発明の方法により、室温でさえ、少なくとも 97 に等しい比率の (SS) - (+) - SAMe ジアステレオ異性体を検出することが可能であり、したがって (RS) - (+) - SAMe ジアステレオ異性体に関しては 3 以下の比率で存在する (SS, RS) - SAMe の塩を製造することができる。

【0022】

さらに、本発明の方法により、溶解物の調製における有機溶媒の使用を排除でき、(SS, RS) - SAMe の薬剤として許容される塩の精製ステップに関する顕著な利点、ならびに生態学的および環境的利点を備えている。

【0023】

さらに、知られている方法によって得られる塩に関して高い収率および純度の (SS, RS) - SAMe の薬剤として許容される塩を得ることが可能である。実際、発酵生成物に関して (SS, RS) - SAMe で少なくとも 98 % に等しい純度および少なくとも 90 に等しい収率が得られる。

【0024】

この条件により、本発明の方法によって、溶解物を調製する間の (SS, RS) - SAMe の分解を回避し、98 % を超える収率および主な生成物が 5 - デアシル - 5 - メチルチオアデノシンである副生成物の含有量 1 % 未満で溶解を得ることができる。

10

20

30

40

50

【0025】

上述のように適当に塩化したされた (SS, RS) - SAMe は、例えばサッカロミセス パストリアヌス (*Saccharomyces pastorianus*) (例えばサッカロミセスカールスバージェンシス (*Saccharomyces carlsbergensis*) CBS 1513)、サッカロミセスセレビシェ (*Saccharomyces cerevisiae*) (IFO 2044)、トルロプシス (*Torulopsis*) およびカンジダウチリス (*Candida utilis*) などの適当な微生物を発酵させることによって製造することができる。

【0026】

(SS, RS) - SAMe を含有する酵母は、この分野で知られている方法、例えば「*Journal of Biological Chemistry*」、29巻、1037ページ、1987年に記載されている Schlenk 法により、DLメチオニンの使用法を最適化することだけを改良し、27.5 の最高温度で約20時間行うことによって富化することができる。 10

【0027】

(SS, RS) - SAMe 富化酵母は、本発明の実現に有利に用いるため少なくとも 6 g / l の (SS, RS) - SAMe を含有しており、酵母を細胞破壊装置に通過させることにより、1.2 ~ 3.5 の pH 値に調整すると細胞溶解工程を受ける。

【0028】

得られた溶解物は、例えば Kerasep (登録商標) K09A などのセラミック膜による精密濾過に供した後、弱酸カルボキシル樹脂、好ましくはカチオン型の Rohm and Haas (登録商標) IRC 86 などに好ましくは飽和するまで (約 150 g / l) 吸着させ、例えば 0.1 ~ 2 N 硫酸、塩酸などの無機酸の溶液で溶出する。 20

【0029】

次いで、得られた溶出液の脱色を、例えば Resindion (登録商標) 825L などのスチレン - ジビニルベンゼン単位の共重合体樹脂を使って行う。

【0030】

(SS, RS) - SAMe を含有する得られる溶出液を逆浸透により、容積で 30 から 70 %、好ましくは 40 から 50 %まで濃縮する。このようにして得られた濃縮物を、化学量論的に当量の上記に示したような酸または薬剤として許容される酸の混合物と共に加える。このようにして得られた製品を溶液中の可能な調製物として用いるか、固体で使用したい場合には凍結乾燥に供することができる。 30

【0031】

以下の実施例は本発明を例示しているが、本発明を限定するものではない。

【0032】

実施例 1

サッカロミセスカールスバージェンシスの発酵によって得られる酵母 1000 kg を、以下のように改良した Schlenk 法に従って (SS, RS) - SAMe で富化させた。この酵母に酵母クリーム (脱イオン水 100 l で希釈すると 2.2 g / l の力価を有する)、DLメチオニン 2 kg、水和グルコース 12 kg およびクエン酸 1.5 kg を加え、攪拌下 27 ± 0.5 で 22 時間保ち、0.6 l / l / m の流れで無菌濾過空気の放出によって通気し、それによって (SS, RS) - SAMe 9 g / l を得る。H₂SO₄ を用いて pH を 1.2 に調整した後、Constant System Ltd. で製造された「Constant Cell Disruption System」、冷却システム付きの圧力式細胞破壊装置により 12 の温度で溶解を行った。次いで、まずは冷水、次いで食塩水を用いて溶液を冷却し、溶液を約 2 の温度にした。 40

【0033】

次いで、得られた混合物を Verind A-10 HFM 180 SM 型のカートリッジを備えた精密濾過設備まで運搬し、富化液から使用済みの固体を分離した。パネルは、2 で脱塩水 2000 l により洗浄した。濾過収率は 98 % であった。 50

【0034】

富化溶液をカルボキシル樹脂である I R C 8 6 樹脂 (Rohm and Haas (登録商標)) に通過させ、1N硫酸で溶出し約2℃に温度を保った。

【0035】

集めた溶出液を Resindion (登録商標) 825L樹脂を用いて脱色した。富化溶液を、40%濃度の (SS, RS)-SAMEが得られるまで逆浸透により濃縮した。次いで、対応する化学量論的量の硫酸およびパラトルエンスルホン酸を加えると、(SS, RS)-SAMEの二硫酸塩パラトルエンスルホン酸塩が得られた。(SS, RS)-SAME二硫酸塩パラトルエンスルホン酸塩の最終的な収率は90%であった。

【0036】

(SS, RS)-SAME二硫酸塩パラトルエンスルホン酸塩のジアステレオ異性体混合物中の (RS)-(+)-SAME二硫酸塩パラトルエンスルホン酸塩の含有量をHPLCにより分析すると1%になっていた。関連するデータは、以下のように試料番号4に関する表に報告されている。

【0037】

実施例2

実施例1に記載の方法に従い、(SS, RS)-SAMEを8.2g/kgに等しい活性に富化が行われたサッカロミセスカールスバージェンシスの発酵によって得られる酵母1000kgを、12℃の温度および2のpHで細胞破壊システムにより溶解した。得られた溶液に水500lを加えた後、実施例1に記載の方法と同じように精密濾過と続くステップを行い、冷脱塩水(約5℃)2000lで洗浄した。(SS, RS)-SAME7.5kAが得られ、これを逆浸透により濃縮した後、塩化したすると91.4%の収率で(SS, RS)-SAME二硫酸塩パラトルエンスルホン酸塩が得られた(溶解収率:99%;精製収率:98%)。発酵終了から逆浸透による濃縮までの経過時間は32時間であった。関連するデータは、以下のように試料番号5に関する表に報告されている。

【0038】

実施例3

実施例1の方法によって得られた溶液は、I R C 8 6 (Rohm and Haas (登録商標))樹脂に吸着させた後、1N硫酸で溶出した。

【0039】

得られた溶液を20%まで濃縮し、次いで化学量論的量の硫酸およびパラトルエンスルホン酸を加え、その後さらに40%溶液が得られるまで濃縮した。(SS, RS)-SAME二硫酸塩パラトルエンスルホン酸塩14.09kgが得られ、変換収率は97.8%であった。関連するデータは、以下のように試料番号6に関する表に報告されている。

【0040】

実施例4(比較)

Knoll Farmaceutici S.p.A.で製造されたSAMIR (登録商標) (SS, RS)-SAMEの3試料をHPLCで分析した。各試料の測定値は以下の通りである。

【0041】

試料1-SAMIR (登録商標)(バイアル)100mgバッチ045-021;使用期限06/2000。

【0042】

【表1】

10

20

30

40

ピーク番号	保持時間	ピーク面積	ピーク高さ	面積(%)	高さ(%)
1	3.661	0.26322	0.00171	0.286	0.410
2	4.246	0.33608	0.00210	0.365	0.503
3	4.591	1.82467	0.00906	1.984	2.166
4	5.429	1.00324	0.00573	1.090	1.370
5	5.888	51.25485	0.25301	55.715	60.500
6	6.206	37.31255	0.14658	40.560	35.051

10

(SS) - (+) - SAMe に対応するピーク番号 5 は 58 % の比率を示し、(RS) - (+) - SAMe に対応するピーク番号 6 は 42 % の比率を示す。

【0043】

試料2 - SAMIR (登録商標) (錠剤) 200mg ; バッチ 121 ; 使用期限 05/2002。

【0044】

【表2】

ピーク番号	保持時間	ピーク面積	ピーク高さ	面積(%)	高さ(%)
1	3.655	0.35979	0.00221	0.194	0.269
2	4.238	0.40764	0.00265	0.220	0.322
3	4.538	3.58281	0.01624	1.932	1.973
4	5.411	1.60136	0.00919	0.863	1.116
5	5.828	108.11943	0.52553	58.299	63.833
6	6.144	71.38583	0.26746	38.492	32.487

20

(SS) - (+) - SAMe に対応するピーク番号 5 は 60 % の比率を示し、(RS) - (+) - SAMe に対応するピーク番号 6 は 40 % の比率を示す。

【0045】

30

試料3 - SAMIR (登録商標) (錠剤) 400mg ; バッチ 040 ; 使用期限 10/2002。

【0046】

【表3】

ピーク番号	保持時間	ピーク面積	ピーク高さ	面積(%)	高さ(%)
1	3.386	0.03675	0.00041	0.010	0.027
2	5.419	1.40489	0.00853	0.387	0.559
3	5.785	214.15843	0.99534	58.973	65.233
4	6.092	147.47305	0.52125	40.610	34.162
5	13.468	0.07286	0.00029	0.020	0.019

40

(SS) - (+) - SAMe に対応するピーク番号 3 は 59 % の比率を示し、(RS) - (+) - SAMe に対応するピーク番号 4 は 41 % の比率を示す。

【0047】

実施例5

実施例1～3において本発明の方法に従って得られた生成物、それぞれ試料4～6は、実施例4に記載された方法と同じように、製造日から4ヶ月後に分析した。

【0048】

50

各試料の測定値は以下の通りである。

【0049】

試料4(実施例1)；バッヂ003/R。

【0050】

【表4】

ピーク番号	保持時間	ピーク面積	ピーク高さ	面積(%)	高さ(%)
1	2.595	10.89547	0.06085	4.340	4.566
2	2.735	7.93823	0.07825	3.163	5.873
3	2.834	8.13165	0.08741	3.239	6.561
4	2.946	20.91077	0.12978	8.331	9.740
5	3.355	5.91998	0.02933	2.358	2.201
6	3.651	1.91541	0.00909	0.763	0.683
7	4.136	192.60315	0.92893	76.728	69.716
8	4.958	1.81995	0.00603	0.725	0.453
9	6.423	0.88589	0.00276	0.353	0.207

(SS) - (+) - SAMeに対応するピーク番号7は99%の比率を示し、(RS) - (+) - SAMeに対応するピーク番号8は1%の比率を示す。

【0051】

試料5(実施例2)；KF = 2.3%；力価 = 102.6%；バッヂ001/R。

【0052】

【表5】

ピーク番号	保持時間	ピーク面積	ピーク高さ	面積(%)	高さ(%)
1	2.588	0.23402	0.00223	0.075	0.155
2	2.817	0.08934	0.00099	0.029	0.068
3	2.908	0.28759	0.00228	0.092	0.158
4	3.082	6.84701	0.04649	2.194	3.227
5	3.388	0.69924	0.00391	0.224	0.272
6	3.697	0.84270	0.00466	0.270	0.323
7	4.224	295.93649	1.35851	94.844	94.306
8	5.153	5.50257	0.01712	1.763	1.188
9	6.696	1.58749	0.00436	0.509	0.303

(SS) - (+) - SAMeに対応するピーク番号7は98%の比率を示し、(RS) - (+) - SAMeに対応するピーク番号8は2%の比率を示す。

【0053】

試料6(実施例3)；KF = 1.39%；力価 = 102.7；バッヂ004/R。

【0054】

【表6】

10

20

30

40

ピーク番号	保持時間	ピーク面積	ピーク高さ	面積(%)	高さ(%)
1	2.584	0.19250	0.00169	0.058	0.109
2	2.825	0.13395	0.00135	0.041	0.088
3	2.894	0.22074	0.00196	0.067	0.127
4	3.060	6.91884	0.04741	2.094	3.072
5	3.355	0.82868	0.00484	0.251	0.314
6	3.661	1.53681	0.00907	0.465	0.588
7	4.162	313.00031	1.45354	94.736	94.209
8	5.026	5.89462	0.01854	1.784	1.201
9	6.528	1.66553	0.00450	0.504	0.292

(S S) - (+) - S A M e に対応するピーク番号 7 は 9 8 % の比率を示し、(R S) - (+) - S A M e に対応するピーク番号 6 は 2 % の比率を示す。

フロントページの続き

(72)発明者 ベルナ , マルコ
イタリー国、イ - 2 0 0 5 2 ・モンザ、ビア・カタラーニ、5
(72)発明者 シピーリ , リノ
イタリー国、イ - 2 0 0 5 2 ・モンザ、ビア・カタラーニ、5
(72)発明者 サンタムブロージオ , ジヤンニ
イタリー国、イ - 2 0 0 5 2 ・モンザ、ビア・カタラーニ、5
(72)発明者 バロティ , エリマンノ
イタリー国、イ - 2 0 0 5 2 ・モンザ、ビア・カタラーニ、5

審査官 福井 悟

(56)参考文献 特開昭 5 6 - 1 4 5 2 9 9 (J P , A)
特開昭 6 0 - 2 5 6 3 9 4 (J P , A)
特開昭 5 9 - 2 9 7 0 0 (J P , A)
J. L. HOFFMAN, BIOCHEMISTRY, 1986年, V25, P4444-4449

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C07H 1/00-23/00

CA/REGISTRY(STN)