MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETA' INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	**101999900790731**
Data Deposito	**05/10/1999**
Data Pubblicazione	**05/04/2001**

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	B		

Titolo

PROCESSO PER LA PURIFICAZIONE DI S-ADENOSIL-L-METIONINA E PER LA PREPARAZIONE DEI SUOI SALI FARMACEUTICAMENTE ACCETTABILI.

UFFICIO BREVETTI
BERGAMO
MILANO
REGGIO EMILIA
ING. A. GIAMBROCONO

Descrizione di un'invenzione industriale a nome:

CHEMENTECNO s.r.l., Monza (MI) e GNOSIS s.r.l., Cairate (VA)

MI99 A 002070 A26850
VM/gf

****

L'invenzione concerne un processo per la purificazione di S-adenosil-L-metionina (di seguito indicata come SAMe) e per la preparazione dei suoi sali farmaceuticamente accettabili. In particolare, l'invenzione si riferisce ad un processo per la purificazione di SAMe e per la preparazione dei suoi sali farmaceuticamente accettabili partendo da lieviti arricchiti con SAMe.

La SAMe, come è noto, è un metil donatore fisiologico coinvolto nelle reazioni di transmetilazione enzimatica, presente in tutti gli organismi viventi, e avente effetti terapeutici in relazione alle patologie epatiche croniche, all'adiposi, alla lipemia, all'arteriosclerosi, ed è pertanto desiderabile produrne grandi quantità.

E' stato tuttavia rilevato un ostacolo all'utilizzazione su scala industriale della molecola in questione a causa della sua instabilità termica, anche a temperatura ambiente, e della complessità dei processi di preparazione e purificazione.

Sono noti diversi processi per la purificazione di SAMe e per la produzione dei suoi sali farmaceuticamente accettabili.

UFICA BREVETTI
05 OTT. 1999
MILANO

UFFICIO BREVETTI ING. A. GIAMBROCONO
BERGAMO
MILANO
REGGIO EMILIA

Tuttavia i processi di purificazione noti comprendono l'uso di resine acide forti (JP 13680/1971) o di tipo chelato (JP 20998/1978) o impiegano particolari reattivi costosi quali l'acido picrico e picrolinico (US 3707536 e US 3954726).

Sono anche noti processi di purificazione che utilizzano resine acide deboli (JP 14299/1981, FR-A-2531714, EP-A-0141914), che permettono tuttavia una separazione solo parziale del SAMe e pertanto una purezza insufficiente che non ne permette l'impiego farmaceutico.

Anche se l'attuazione di alcuni dei processi sopra citati riesce ad ottenere una maggiore purezza, tuttavia, in alcuni casi (FR-2531714), per estrarre il prodotto dalle cellule, si contempla l'uso di bicarbonato di potassio, con conseguente precipitazione di perclorato di potassio, che comporta dapprima problemi di separazione e poi di smaltimento. Nel caso dell'EP-A-0141914, per ottenere un buon livello di purezza, si prevede invece l'impiego di colonne cromatografiche a base di resine da 100-200 mesh, con elevati costi sia di investimento che di manutenzione.

Per quanto concerne i sali farmaceuticamente accettabili di SAMe, i processi noti (US 3893999, US 3954726, US 4057686, EP-A-0073376) si riferiscono principalmente all'ottenimento di sali specifici e risultano comunque inadatti, su scala industriale, anche a

UFFICIO BREVETTI ING. A. CIAMBROCONO BERGAMO MILANO REGGIO EMILIA

causa dell'impiego di reattivi costosi e degli ingenti volumi di reazione necessari.

Anche l'EP-A-0141914, nonostante descriva un processo che permette una produzione di sali stabili di SAMe, applicabile su larga scala e con rese migliori rispetto a quanto ottenibile mediante i processi sopra vagliati, contempla l'arricchimento del lievito che contiene SAMe e la successiva lisi delle cellule in presenza di un solvente organico (ad esempio, acetato di etile, acetone, ecc.) utilizzando, inoltre, come già detto, ingenti quantitativi di resina avente granulometria pari a 100-200 mesh. L'impiego di solventi per l'estrazione del SAMe implica obbligatoriamente l'adozione di impianti antideflagranti, di un sistema di recupero, di distillazione e di recupero del solvente, oltre alla necessaria essiccazione del micelio esausto, al fine di evitare di scaricare lo stesso con del solvente residuo che comporta, evidentemente, investimenti e costi operativi aggiuntivi.

Secondo un primo aspetto la presente invenzione concerne un processo per la purificazione di SAMe da lievito arricchito, che ne contenga almeno 10 g/l, che comprende:

(a) - la regolazione del pH ad un valore pari a 1,8÷2,2;

(b) - la preparazione di un lisato acquoso di SAMe dal lievito arricchito, ad una temperatura pari a 70-92°C,

UFFICIO BREVETTI • ING. A. GIAMBROCONO • BERGAMO MILANO REGGIO EMILIA

facendo passare il lievito attraverso uno scambiatore a piastre, in controcorrente, per un tempo di contatto pari a 5-45 secondi;

(c) - il raffreddamento del lisato ad una temperatura pari a 2-30°C;

(d) - l'ultrafiltrazione del lisato e la successiva regolazione del pH ad un valore pari a 3,0-6,8;

(e) - l'assorbimento di almeno 90 g/l dell'ultrafiltrato su una resina acida debole, dove le dimensioni delle particelle sono pari a 30-50 mesh, eluendo con una soluzione di un acido inorganico 0,1-2N;

(f) - la regolazione del pH ad un valore a 2,0-2,5;

(g) - la decolorazione dell'eluato;

(h) - la concentrazione dell'eluato;

(i) - la liofilizzazione dell'eluato.

Secondo un aspetto preferito, la temperatura nella fase (c) è pari a 6-8°C, mentre il pH della fase (d) viene regolato a 4,8-5,2.

L'ultrafiltrato derivante dalla fase (d) viene preferibilmente assorbito sulla resina fino alla sua saturazione.

Il processo dell'invenzione permette di escludere l'impiego di solventi organici nella preparazione del lisato con evidenti vantaggi in relazione alle fasi di purificazione del SAMe e/o dei suoi sali farmaceuticamente

UFFICIO BREVETTI ING. A. GIAMBROCONO
BERGAMO
MILANO
REGGIO EMILIA

accettabili, e di natura ecologica e ambientale.

La presente invenzione consente inoltre l'impiego di quantità ridotte di resine, aventi inoltre granulometrie ordinarie, pari a 30-50 mesh, e risulta pertanto economicamente vantaggiosa.

E' inoltre possibile ottenere resa e purezza dei sali farmaceuticamente accettabili di SAMe maggiori rispetto a quelle ottenibili mediante i processi noti; si ottengono infatti una qualità pari ad almeno il 98% in SAMe e una resa pari ad almeno il 90% sul fermentato.

Il processo dell'invenzione, grazie alle sue condizioni peculiari, permette di evitare la degradazione della SAMe nel corso della preparazione del lisato e riesce ad ottenere una lisi con rendimento superiore al 98% e con un contenuto di sottoprodotti, di cui il principale è la 5-deacil-5-metiltioadenosina, inferiore all'1%.

E' stato inoltre osservato, contrariamente a quanto descritto nei documenti citati (EP-0141914), che l'assorbimento di quantitativi ingenti, pari ad almeno 90 g/l, e preferibilmente fino a saturazione della resina, invece degli usuali 5-30 g/l, di SAMe, dove la resina presenta una granulometria pari a 30-50 mesh invece di 100-200 mesh, comporta un notevole contenimento dei costi e la riduzione delle perdite di carico a livello industriale.

Tali sorprendenti condizioni di carico della resina

UFFICIO BREVETTI ING. A. GIAMBROCONO BERGAMO MILANO REGGIO EMILIA

comportano, come detto, una purificazione del prodotto praticamente totale e al tempo stesso permettono di ridurre drasticamente le quantità di resina necessarie.

E' risultato anche evidente il rilascio delle impurezze direttamente durante l'assorbimento sulla resina di almeno 90 g/l e, conseguentemente, l'inutilità di effettuare trattamenti di eluizione addizionali, contrariamente a quanto previsto nei documenti sopra citati, al fine di ottenere direttamente un'elevata quantità del prodotto finale.

Il SAMe può essere prodotto ad esempio per fermentazione di un microrganismo idoneo quale il *Saccharomyces pastorianus* (ex *Saccharomyces carlsbergensis* CBS 1513), il *Saccharomyces cerevisiae* (IFO 2044), il *Torulopsis utilis* e la *Candida utilis*.

Il lievito contenente SAMe può essere arricchito mediante i procedimenti noti nel settore quale, ad esempio, il metodo Schlenk descritto in "Journal of Biological Chemistry", vol. 29, pag. 1037, (1987).

Il lievito arricchito in SAMe, che, al fine di poter essere vantaggiosamente utilizzato nell'attuazione della presente invenzione, contiene indicativamente almeno 10 g/l di SAMe, previa regolazione del pH ad un valore pari a 1,8-2,2, viene sottoposto a un procedimento di lisi cellulare, facendo passare il lievito attraverso uno scambiatore a

UFFICIO BREVETTI ING. A. GIAMBROCONO
BERGAMO
MILANO
REGGIO EMILIA

pressione di tipo doppio, ad una temperatura pari a 70-92°C e per un tempo di contatto pari a 5-45 secondi.

Il lisato risultante, dopo essere stato raffreddato ad una temperatura pari a 2-30°C, viene sottoposto a ultrafiltrazione regolando in seguito il pH a 3,0-6,8.

L'ultrafiltrato viene poi assorbito su una resina acida debole, preferibilmente di tipo cationico, carbossilica, quale la Rohm and Haas® IRC86, avente una granulometria pari a 30-50 mesh, fino ad almeno 90 g/l, preferibilmente fino a saturazione, eluendo infine con una soluzione di un acido inorganico quale, ad esempio, acido solforico, cloridrico, nitrico, ecc., 0,1-2N.

Dopo aver portato il pH ad un valore pari a 2,0÷2,5, si procede ad effettuare la decolorazione dell'eluato, ad esempio mediante una resina copolimerica con unità stirene-divinilbenzene, quale la Resindion® 8255P, o l'impiego di setacci molecolari, effettuando successivamente la concentrazione ed infine la liofilizzazione della soluzione risultante.

Il SAMe così ottenuto presenta un titolo in media superiore al 98%.

Secondo un altro aspetto la presente invenzione descrive un processo, per la preparazione dei sali di SAMe farmaceuticamente accettabili, che comprende la purificazione del SAMe secondo quanto già descritto e in

UFFICIO BREVETTI ING. A. GIAMBROCONO
BERGAMO
MILANO
REGGIO EMILIA

cui, dopo aver decolorato l'eluato nella fase (g), si addizionano ad esso quantità stechiometriche di acidi farmaceuticamente accettabili, anche in miscela fra loro, preferibilmente l'acido solforico e l'acido paratoluensolfonico in modo da ottenere i sali di SAMe farmaceuticamente accettabili corrispondenti.

I seguenti esempi illustrano l'invenzione senza limitarla.

ESEMPIO 1

1000 l di lievito ottenuti per fermentazione di *Saccharomyces carlsbergensis*, arricchito in SAMe secondo il metodo Schlenk (titolo medio 10 g/l), corretti a pH 2 con H_2SO_4, vengono fatti passare mediante una pompa dosatrice (prodotta dalla CODIP) alla temperatura di 76°C-78°C attraverso due scambiatori (prodotti dalla ALFA-LAVAL) a piastre (0,5 m^2 + 3 m^2) con una soluzione di acqua calda a 88°C. Il tempo di riscaldamento, dalla temperatura ambiente a 76°C-78°C, è di circa 8 secondi, e si lascia a tale temperatura per 20-45 secondi. Quindi si raffredda la soluzione mediante l'uso prima di acqua fredda e poi di salamoia, fino a portare la soluzione alla temperatura di circa 6°C.

Si passa la soluzione attraverso una membrana HYDRO AIR di ultrafiltrazione per eliminare il solido costituito da residui di micelio.

UFFICIO BREVETTI ING. A. GIAMBROCONO BERGAMO MILANO REGGIO EMILIA

Al termine, si porta il pH della soluzione a 4,8-5,2 mediante l'aggiunta di NH_4OH al 28%.

L'assorbimento in colonna su resina IRC 86 (Rohm and Haas® - 30-50 mesh) avviene ad un flusso di 0,8-2 BV/ora (quantità di liquido che attraversa la resina/ora) su 1000 l di resina.

L'assorbimento deve essere condotto fino a caricare sulla colonna almeno 90 g/l. A partire da 60 g/l in poi, data la selettività del tipo di resina, le impurezze presenti nelle soluzioni di assorbimento, e in particolare l'adenosina, vengono eliminate direttamente in fase di assorbimento.

Si eluisce con H_2SO_4 0,5 N, scartando le prime frazioni contenenti alcune impurezze.

L'eluato raccolto viene regolato a pH 2-2,5 mediante NH_4OH quindi si passa attraverso un setaccio molecolare per la decolorazione (e l'eluizione delle tracce eventuali di metiltioadenosina). A questo punto si hanno 93 KA (chiloattività) di SAMe ai quali vengono aggiunti i corrispondenti quantitativi di acido solforico e acido paratoluensolfonico.

La soluzione viene quindi inviata alla liofilizzazione; si ottengono mediamente 170-175 kg di SAMe solfato paratoluensolfonato con titolo ≥98%.

ESEMPIO 2

UFFICIO BREVETTI ING. A. GIAMBROCONO
BERGAMO
MILANO
REGGIO EMILIA

500 l di lievito ottenuti per fermentazione di *Saccharomyces carlsbergensis* arricchito di SAMe secondo la metodologia indicata nell'esempio 1, con un'attività pari a 12 g/l, vengono corretti alla temperatura di circa 5°C a pH ≈2 mediante aggiunta di acido solforico ed in seguito fatti passare attraverso due scambiatori della ALFA-LAVAL (da 0,25 m^2 e 1,5 m^2) a piastre e mantenuti alla temperatura di 78°C per 25 secondi.

All'uscita dello scambiatore la soluzione viene raffreddata con acqua fredda fino alla temperatura di 6-8°C.

Passata la soluzione attraverso una membrana HYDRO AIR di ultrafiltrazione, al fine di allontanare i solidi sospesi, la soluzione viene filtrata, sempre mantenendo la temperatura a circa 6-8°C, e regolando il pH portato a 4,8-5,2 mediante aggiunta di NH_4OH al 28%.

A questo punto, la composizione delle impurezze è di ≈0,6% di adenosina e di ≈0,5% di metiltioadenosina.

Si procede quindi all'assorbimento su una colonna contenente 700 l di resina IRC 86 Rohm and Haas® (30-50 mesh).

L'assorbimento viene condotto fino a caricare tutta la soluzione: man mano che la resina si satura col SAMe rilascia l'adenosina preventivamente trattenuta che viene allontanata nella stessa fase di assorbimento.

UFFICIO BREVETTI ING. A. GIAMBROCONO
BERGAMO
MILANO
REGGIO EMILIA

L'eluato (l'eluizione è condotta con H_2SO_4 all'1%) viene direttamente fatto passare su resina Resindion® 825 P per decolorarlo e quindi inviato, dopo concentrazione mediante nanofiltrazione, correzione del contenuto di H_2SO_4 ed aggiunta di acido paratoluensolfonico, alla liofilizzazione.

Si ottengono 100-105 kg di SAMe disolfato paratoluensolfonato con titolo ≥98%.

UFFICIO BREVETTI ING. A. GIAMBROCONO
BERGAMO
MILANO
REGGIO EMILIA

RIVENDICAZIONI

1. Un processo per la purificazione di S-adenosil-L-metionina da lievito arricchito, che ne contenga almeno 10 g/l, che comprende:

(a) - la regolazione del pH ad un valore pari a 1,8÷2;

(b) - la preparazione di un lisato acquoso di S-adenosil-L-metionina dal lievito arricchito, ad una temperatura pari a 70-92°C, facendo passare il lievito attraverso uno scambiatore a piastre, in controcorrente, per un tempo di contatto pari a 5-45 secondi;

(c) - il raffreddamento del lisato ad una temperatura pari a 2-30°C;

(d) - l'ultrafiltrazione del lisato e la successiva regolazione del pH ad un valore pari a 3,0-6,8;

(e) - l'assorbimento di almeno 90 g/l dell'ultrafiltrato su una resina acida debole, dove le dimensioni delle particelle sono pari a 30-50 mesh, eluendo con una soluzione di un acido inorganico 0,1-2N;

(f) - la regolazione del pH ad un valore a 2,0÷2,5;

(g) - la decolorazione dell'eluato;

(h) - la concentrazione dell'eluato;

(i) - la liofilizzazione dell'eluato.

2. Processo secondo la rivendicazione 1, in cui la temperatura nella fase (c) è pari a 6-8°C.

3. Processo secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui il

UFFICIO BREVETTI ING. A. GIAMBROCONO
BERGAMO
MILANO
REGGIO EMILIA

valore del pH nella fase (d) è pari a 4,8-5,2.

4. Processo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui l'ultrafiltrato nella fase (e) viene assorbito sulla resina fino a saturazione.

5. Un processo per la preparazione di sali di S-adenosil-L-metionina farmaceuticamente accettabili che comprende un processo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 1 alla 4, in cui dopo aver decolorato l'eluato nella fase (g) si addizionano ad esso quantità stechiometriche di acidi farmaceuticamente accettabili, anche in miscela fra loro, in modo da ottenere i sali di S-adenosil-L-metionina farmaceuticamente accettabili corrispondenti.

6. Processo secondo la rivendicazione 5, in cui l'acido farmaceuticamente accettabile è selezionato fra l'acido solforico e l'acido paratoluensolfonico.

Dr. Vincenzo Mancini (n. 555)
Vincenzo Mancini

Min. Ind. Comm. e Art. * U.p.i.c.a. Milano * Serv. Brevetti *