

R U 2 5 7 9 9 7 2 C 2



(19) RU⁽¹¹⁾ 2 579 972⁽¹³⁾ C2

(51) МПК
C12N 1/16 (2006.01)
C12P 19/40 (2006.01)
A61K 36/06 (2006.01)
A23L 1/28 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012142647/10, 05.04.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
05.04.2011

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
07.04.2010 JP 2010-088726

(43) Дата публикации заявки: 20.05.2014 Бюл. № 14

(45) Опубликовано: 10.04.2016 Бюл. № 10

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 20100075403 A1, 25.03.10. WO 2009081833 A1, 02.07.2009. WO 2008090905 A1, 31.07.2008. EP 1731596 A1, 13.12.2006. US 20090186400 A1, 23.07.2009. US 20090181001 A1, 16.07.2009. US 2006188612 A1, 24.08.2006. WO 2009024605 A1, 26.02.2009. SU 1433416 A3, 23.10.1988.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 07.11.2012

(86) Заявка РСТ:
JP 2011/058652 (05.04.2011)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2011/126030 (13.10.2011)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ТАКАНО Кентароу (JP),
ГАЯМА Сине (JP)

(73) Патентообладатель(и):

МИЦУБИСИ ГЭС КЕМИКАЛ
КОМПАНИ, ИНК. (JP)

(54) СТАБИЛЬНАЯ ПРИ ХРАНЕНИИ СОДЕРЖАЩАЯ S-АДЕНОЗИЛ-L-МЕТИОНИН КОМПОЗИЦИЯ ВЫСУШЕННЫХ ДРОЖЖЕЙ И СПОСОБ ЕЕ ПРОИЗВОДСТВА

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к биотехнологии. Предложены композиция для использования в качестве физиологически активного соединения, содержащая высушенные дрожжи *Saccharomyces*, включающие S-аденозил-L-метионин, и загуститель, и способ ее получения. Загуститель выбран из группы, состоящей из ксантановой камеди, геллановой камеди и гуаровой камеди. Из культурального раствора

клеток дрожжей *Saccharomyces*, продуцирующих S-аденозил-L-метионин, получают концентрат. Загуститель в концентрации от 4,5 до 32% по массе добавляют к концентрату и высушивают полученную смесь. Изобретения позволяют получать стабильные при хранении композиции с высоким содержанием S-аденозил-L-метионина, где остаточная доля S-аденозил-L-метионина после 60 дней хранения составляет 99,5%. 2 н. и

R U 2 5 7 9 9 7 2 C 2

2 з.п. ф-лы, 3 табл., 22 пр.

R U 2 5 7 9 9 7 2 C 2

R U 2 5 7 9 9 7 2 C 2

R U
2 5 7 9 9 7 2
C 2

RUSSIAN FEDERATION



(19) RU⁽¹¹⁾ 2 579 972⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.
C12N 1/16 (2006.01)
C12P 19/40 (2006.01)
A61K 36/06 (2006.01)
A23L 1/28 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2012142647/10, 05.04.2011

(24) Effective date for property rights:
05.04.2011

Priority:

(30) Convention priority:
07.04.2010 JP 2010-088726

(43) Application published: 20.05.2014 Bull. № 14

(45) Date of publication: 10.04.2016 Bull. № 10

(85) Commencement of national phase: 07.11.2012

(86) PCT application:
JP 2011/058652 (05.04.2011)

(87) PCT publication:
WO 2011/126030 (13.10.2011)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,
OOO "JUridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

TAKANO Kentarou (JP),
GAJAMA Sine (JP)

(73) Proprietor(s):

MITSUBISI GES KEMIKAL KOMPANI, INK.
(JP)

R U
2 5 7 9 9 7 2
C 2

(54) STABLE IN STORAGE S-ADENOZYL-L-METHIONINE-CONTAINING COMPOSITION OF DRIED YEASTS AND METHOD OF PRODUCTION THEREOF

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: group of inventions relates to biotechnology. Composition for application as physiologically active compound, which contains dried yeasts *Saccharomyces*, including S-adenozyl-L-methionine, and thickening agent, and method of thereof application are claimed. Thickening agent is selected from the group, which consists of xanthan gum, gellan gum and guar gum. Concentrate is obtained from cultural solution of *Saccharomyces* yeast cells, which

produce S-adenozyl-L-methionine. Thickening agent in concentration from 4.5 to 32 wt % is added to concentrate and obtained mixture is dried.

EFFECT: inventions makes it possible to obtain stable in storage compositions with high content of S-adenozyl-L-methionine, where residual part of S-adenozyl-L-methionine after 60 days of storage constitutes 99,5%.

4 cl, 3 tbl, 22 ex

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к композиции высушенных дрожжей, содержащей высокую концентрацию S-аденозил-L-метионина (далее обозначаемого как SAMe), используемого в качестве растворимого в воде физиологически активного соединения, прекрасного по стабильности при хранении, и настоящее изобретение относится также к способу производства данной композиции высушенных дрожжей.

Уровень техники

SAMe представляет собой растворимое в воде физиологически активное соединение, широко встречающееся в живых организмах и играющее ключевую роль в качестве донора метильной группы в процессе метилирования трансметилазами широкого спектра в синтезе и метаболизме нуклеиновой кислоты, нейротрансмиттера, фосфолипида, гормона, белка и им подобного. SAMe присутствует практически во всех живых клетках, участвует в качестве кофактора в различных биохимических реакциях и метаболизируется в трех метаболических цепях: трансметилировании, транссульфурации и трансаминопропилировании. К примеру SAMe является необходимым соединением для поддержания тканей хрящей и биосинтеза химических соединений мозга. Последние функциональные исследования показали, что SAMe оказывает терапевтический эффект на жировой метаморфоз печени, гиперлипидемию, артеросклероз, бессонницу, алкогольный гепатит, старческое слабоумие и им подобные.

Как описано выше, SAMe представляет собой важное физиологически активное соединение, и оно широко используется в Америке и странах Европы в качестве лекарственного агента при депрессии, нарушении функции печени, артрите и им подобным, а также в качестве здорового питания.

В силу вышесказанного действительно необходимо, чтобы производство и доставка SAMe были удобными и недорогими. Обычно известные способы производства SAMe включают в себя способ брожения с использованием культуральной среды, содержащей прекурсор L-метионина, способ ферментативного синтеза, позволяющий субстратам аденоzin-5'-трифосфату (АТФ) и L-метионину взаимодействовать с SAMe синтазой (метионин-аденозилтрансферазой), выделенной и очищенной из микроорганизмов,

таких как дрожжи, и способ химического синтеза.

Преимуществом способа ферментативного синтеза, с помощью которого SAMe ферментативно синтезируется при взаимодействии субстратов: аденоzin-5'-трифосфата (АТФ) и L-метионина с SAMe синтазой (метионин-аденозилтрансферазой), выделенной и очищенной из микроорганизмов, таких как дрожжи, является накопление SAMe в больших количествах и отсутствие необходимости выделения SAMe из клеток дрожжей по сравнению с брожением в качестве способа производства. Однако этот способ несет в себе различные трудности, такие как трудоемкое приготовление ферментов, низкая активность полученных ферментов, необходимость удаления противодействующих веществ, таких как АТФаза, и очень высокая цена АТФ как субстрата, и таким образом неизбежно может являться практичным способом. В дополнение к этому современный прогресс генной инженерии привел к тому, что данные ферменты могут быть получены более удобным способом с помощью клонированных генов SAMe синтазы, и таким образом решается проблема приготовления ферментов.

Дорогостоящий АТФ все-таки остается необходимым субстратом, и другие практические проблемы тоже остаются нерешенными.

Кроме этого SAMe является термолабильным соединением и разлагается даже при нормальной температуре, что создает основное препятствие его применению в качестве лекарственного средства или здорового питания. Для решения этой проблемы было

предпринято множество попыток улучшить его стабильность при хранении. К примеру обычно используется способ, в котором полученная описаным выше способом композиция SAMe очищается с помощью хроматографии или подобных ей способов, а потом переводится в соль серной, р-толуолсульфоновой или бутандисульфоновой 5 кислоты для стабилизации SAMe (см. Патентный документ 1), или в котором очищенный SAMe смешивается с добавкой для образования стабильной композиции SAMe (к примеру см. Патентный документ 1). Эти способы требуют много времени и затрат и поэтому с большим трудом могут производить и предлагать недорогой SAMe в качестве лекарственного средства или здорового питания. В последнее время проводились 10 исследования высущенных микроорганизмов, содержащих SAMe, доступных к пероральному употреблению, способных производить SAMe более удобным и недорогим способом с меньшим количеством этапов очистки (к примеру см. Патентный документ 2 и непатентный документ 2). Однако в настоящее время недостатком высущенных 15 микроорганизмов, содержащих SAMe, остается более низкая стабильность при хранении по сравнению с очищенным SAMe или композициями, содержащими SAMe.

Предшествующий уровень техники

Патентные документы

Патентный документ 1: JP 59-51213A

Патентный документ 2: WO 2008/090905

Непатентные документы

Непатентный документ 1: Biochimica et Biophysica Acta, 1573, 105-108, (2002)

Непатентный документ 2: J of Chromatography B, 863, 94-100 (2008)

Описание изобретения

Объект настоящего изобретения относится к удобному и недорогому способу 25 производства композиции высущенных дрожжей, содержащих высокую концентрацию SAMe, с прекрасной стабильностью при хранении.

Для решения описанных выше проблем изобретатели приложили много усилий для изучения способа экономичного производства композиции, содержащей высокую концентрацию SAMe и прекрасно проявляющей себя при длительном хранении в 30 постоянных условиях. Далее изобретатели обнаружили, что композиция высущенных дрожжей, содержащая высокую концентрацию целевого SAMe, с прекрасной стабильностью при хранении может удобно производиться с хорошим выходом с помощью получения и накапливания высокой концентрации SAMe в клетках дрожжей с использованием доступных к пероральному употреблению дрожжей, производящих 35 SAMe; выделения клеток дрожжей из культурального раствора такими способами разделения как центрифugирование; добавления загустителя к полученному концентрату клеток дрожжей и последующего высушивания полученной смеси. В результате этого наблюдения изобретатели пришли к настоящему изобретению. Изобретатели настоящего изобретения также установили, что относящаяся к настоящему изобретению композиция 40 высущенных дрожжей, содержащих SAMe, имеет прекрасную всасываемость в дополнение к стабильности при хранении. В результате этого наблюдения изобретатели пришли к настоящему изобретению.

Настоящее изобретение относится к:

(1) содержащей S-аденозил-L-метионин композиции высущенных дрожжей, состоящей 45 из S-аденозил-L-метионина и загустителя, и
 (2) способу производства содержащей S-аденозил-L-метионин композиции высущенных дрожжей, данному способу, состоящему из использования производящих S-аденозил-L-метионин дрожжей, добавления загустителя к концентрату клеток

дрожжей, полученных из культурального раствора клеток дрожжей, и высушивания полученной смеси.

Эффекты изобретения

Содержащая S-аденозил-L-метионин композиция высушенных дрожжей, относящаяся

- 5 к настоящему изобретению, имеет прекрасную стабильность при хранении и прекрасную всасываемость.

Вследствие этого данная композиция высушенных дрожжей может применяться как лекарственное средство или здоровое питание с помощью растирания композиции высушенных дрожжей в порошок; с помощью добавления при необходимости другого 10 физиологического компонента или другой добавки, такой как экстипиент, к порошку композиции высушенных дрожжей и последующим уплотнением и таблетированием полученной смеси; с помощью гранулирования порошка композиции высушенных дрожжей в гранулы; с помощью инкапсулирования гранулированного порошка 15 композиции высушенных дрожжей или с помощью подобного. Таким образом, настоящее изобретение относится к полезной композиции в качестве растворимого в воде физиологически активного соединения для лекарственного средства или здорового питания.

Более того, настоящее изобретение относится к удобному и недорогому способу 20 производства содержащей высокую концентрацию S-аденозил-L-метионина композиции с прекрасной стабильностью при хранении и, кроме этого, к удобному и недорогому способу производства содержащей SAMe композиции высушенных дрожжей с прекрасной всасываемостью.

Способы воплощения настоящего изобретения

Тип используемых дрожжей в настоящем изобретении не ограничивается условием 25 доступности к пероральному употреблению и способности производить SAMe и включает, к примеру дрожжи, относящиеся к роду *Saccharomyces*, предпочтительно *Saccharomyces cerevisiae*. Высушенные дрожжи широко используются в здоровом питании и подобном, так как высушенные дрожжи содержат большое количество полезных 30 компонентов, таких как 5'-нуклеотиды, свободную аминокислоту, глутатион с антиоксидативным действием, необходимым для улучшения функции печени, и бета-глюкан и клетчатку, улучшающую работу иммунной системы и регулирующую работу кишечника.

Источник углерода для культивирования вышеописанных дрожжей не ограничен 35 при условии анаболизирования дрожжами. Примеры источника углерода включают глюкозу, сахарозу, крахмал, углевод, такой как сырая меласса, спирт, такой как этанол, и органическую кислоту, такую как уксусная кислота. Источник азота также не ограничен при условии анаболизирования используемыми дрожжами. Примеры источника азота включают неорганическое азотсодержащее соединение, такое как аммоний, азотная кислота, мочевина и субстанция с органическим азотсодержащим 40 соединением, такая как экстракт дрожжей и экстракт солода. В качестве неорганической соли используется соль фосфорной кислоты или соль калия, натрия, магния, кальция, железа, цинка, марганца, кобальта, меди или молибдена. Кроме этого в культуру могут быть добавлены метионин, аденин и аденоцилрибонуклеозид, образующие каркас SAMe.

45 В качестве среды использовалась среда с L-метионином (Shiozaki S. Et al., J. Biotechnology, 4, 345-354 (1986)).

Дрожжи инокулируются в среду, содержащую компоненты среды, такие как сахароза, экстракт дрожжей, L-метионин, мочевину, глицин, дигидрофосфат калия, гептагидрат

сульфата магния, биотин, дигидрат хлорида кальция и небольшое количество соли металла. Инокулированные дрожжи культивируются в аэробных условиях с добавлением источников углерода, таких как сахароза и/или этанол, к инокулированной среде до получения содержащих SAMe клеток дрожжей.

5 Температура культивирования может быть в пределах от 20 до 35°C, и pH культурального раствора может быть в пределах от pH 4 до 7 в зависимости от используемого типа дрожжей.

Для увеличения содержания SAMe в клетках дрожжей предпочтительно культивировать дрожжи в аэробных условиях. Тип контейнера для культивирования 10 не ограничен при условии возможности вентилирования и перемешивания по мере необходимости, и к примеру могут использоваться контейнер с механическим перемешиванием, контейнер с воздухоструйным перемешиванием, контейнер с барботажной колонкой и им подобные.

Компоненты среды, такие как источник углерода, источник азота, различные 15 неорганические соли, различные добавки и им подобные, добавляются постоянно или периодически, вместе или по отдельности. К примеру, такие субстраты как сахароза и этанол могут добавляться в реактор в смеси с другими компонентами среды или же могут добавляться в реактор независимо от других компонентов среды. Значение pH в культуральном растворе контролируется кислотным или щелочным раствором. 20 Примеры щелочи включают аммоний и мочевину, которые также могут быть использованы в качестве источника азота, и неазотные основания, такие как гидрооксид натрия и гидрооксид калия. Примеры кислоты включают неорганическую кислоту, такую как фосфорная кислота, серная кислота и азотная кислота, и органическую кислоту. Значение pH в культуральном растворе может контролироваться с помощью 25 неорганической соли, такой как соль фосфорной кислоты, соль калия, соль натрия и соль азотной кислоты.

Введение культуры проводится при описанных выше условиях. Культуральный раствор сливается из культурального контейнера, когда достигнуто необходимое количество SAMe в клетках дрожжей, и после этого проводят отделение клеток дрожжей. 30 Способ отделения клеток не ограничен при условии, что клетки дрожжей могут быть эффективно отделены и очищены с помощью разделителя с противотоком или системы ультрафильтрации предпочтительно с использованием разделительной мембранны.

После этого к отделенному концентрату клеток дрожжей добавляется загуститель. Это увеличивает стабильность при хранении и всасываемость SAMe в высушенных 35 дрожжах, улучшает выход в процессе сушки дрожжей и скрывает характерный для высушенных дрожжей запах. Количество добавляемого загустителя относительно содержания композиции высушенных дрожжей с S-аденозил-L-метионином составляет предпочтительно от 0,1 до 70% по массе, более предпочтительно от 0,4 до 70% по массе, также более предпочтительно от 0,7 до 70% по массе и особенно предпочтительно от 40 4,5 до 70% по массе. Содержание менее чем 0,1% по массе дает недостаточную стабильность SAMe в высушенных дрожжах при хранении. Содержание более чем 70% по массе не дает дополнительного эффекта, и стабильность SAMe скорее уменьшается в зависимости от используемого количества.

Загуститель, описанный в настоящем изобретении, включает различные загустители, 45 такие как желирующие агенты, которые увеличивают вязкость и могут быть добавлены в пищу. Примеры используемого в настоящем изобретении загустителя включают:

(1) загуститель, полученный из микробиологических источников, такой как ксантановая камедь, геллановая камедь, курдлан, альгин-ксантановая камедь, пуллулан

и натто;

(2) загуститель, полученный из семян, такой как гуаровая камедь, камедь тары, камедь бобов рожкового дерева, камедь тамаринда и камедь подорожника;

(3) загуститель, полученный из растений, такой как целлюлоза, метилцеллюлоза,

5 гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, крахмал и карбоксиметилат натрия;

(4) загуститель, полученный из морских водорослей, такой как каррагенан, альгинат натрия, альгиновая кислота и пропиленгликоловый эфир альгиновой кислоты;

(5) загуститель, полученный из смолы, такой как аравийская камедь, трагакантовая

10 камедь, шеллак и арабиногалактан;

(6) загуститель, полученный из ракообразных, такой как хитозан и хитин; и

(7) загуститель, такой как пектин, маннан, гиалуроновая кислота, хондроитин, агар-агар, коллаген, альбумин, зеин, казеин и казеинат натрия.

Используется не менее одного из вышеперечисленных загустителей.

15 Более предпочтительны:

(1) загуститель, полученный из микробиологических источников, такой как ксантановая камедь, геллановая камедь, курдлан, альгин-ксантановая камедь, пуллулан и натто;

(2) загуститель, полученный из семян, такой как гуаровая камедь, камедь тары,

20 камедь бобов рожкового дерева, камедь тамаринда и камедь подорожника;

(3) загуститель, полученный из смолы, такой как аравийская камедь, трагакантовая камедь, шеллак и арабиногалактан;

(4) загуститель, полученный из ракообразных, такой как хитозан и хитин; и

(5) загуститель, такой как пектин, маннан, гиалуроновая кислота, хондроитин, агар-25 агар, коллаген, альбумин, зеин, казеин и казеинат натрия.

Особенно предпочтительны:

(1) загуститель, полученный из микробиологических источников, такой как ксантановая камедь, геллановая камедь, курдлан, альгин-ксантановая камедь, пуллулан и натто;

30 (2) загуститель, полученный из семян, такой как гуаровая камедь, камедь тары, камедь бобов рожкового дерева, камедь тамаринда и камедь подорожника.

Используемый в настоящем изобретении загуститель широко применяется в продуктах питания, косметике и лекарственных препаратах, и поэтому его использование безопасно.

35 После добавления загустителя описанным выше способом вода из концентрата клеток дрожжей выпаривается путем сушки распылителем при помощи распылительной сушки, путем лиофильной сушки или им подобным для получения содержащей SAMe композиции высушенных дрожжей. Распылительная сушка предпочтительно проводится при температуре впуска 210°C или менее и при температуре выпуска 110°C и менее.

40 Лиофильная сушка предпочтительно проводится при финальной отметке температуры 30°C или менее. Содержащая SAMe композиция настоящего изобретения имеет предпочтительно долю воды 5% и менее (по массе) с точки зрения стабильности при хранении.

Композиция высушенных дрожжей может растираться в порошок. После добавления следующего физиологического компонента или следующей добавки, такой как

45 эксципиент, к порошку высушенных дрожжей при необходимости полученная смесь высушенных дрожжей может уплотняться и таблетироваться в композицию в форме таблетки. Кроме этого, поверхность композиции в форме таблетки может быть покрыта

оболочкой.

Или же порошок композиции высушенных дрожжей может быть гранулирован, или порошковая или гранулированная композиция высушенных дрожжей может быть инкапсулирована.

Примеры

Настоящее изобретение будет раскрыто ниже более детально в примерах и сравнительных примерах. Однако стоит отметить, что рамки настоящего изобретения ими не ограничиваются.

Примеры 1-4

(a) Культура клеток дрожжей

Согласно описанному выше общезвестному способу культивирования *Saccharomyces cerevisiae* IFO2346, относящиеся к роду *Saccharomyces*, были инокулированы в среду, содержащую L-метионин (Shiozaki S. Et al., J. Biotechnology, 4, 345-354 (1986)).

Инокулированные дрожжи культивировались в аэробных условиях в течение шести дней при температуре культуры от 27 до 29°C с перемешиванием и с доступом воздуха до получения 18 литров культурального раствора дрожжей с концентрацией клеток дрожжей 3,5% (по массе) и содержанием SAMe 205 мг/г высушенных дрожжей.

(b) Отделение клеток дрожжей

Полученные 18 литров культурального раствора дрожжей центрифугировались в

центрифуге постоянного ротационного типа (*Hitachi Hitac Centrifuge CR10B2*) до получения 3,4 кг жидкого концентрата клеток дрожжей с концентрацией дрожжей 18% по массе сухого продукта.

(c) Добавление загустителя к концентратору клеток дрожжей

К полученным 3,4 кг концентратора клеток дрожжей была добавлена ксантановая

камедь в 0,02-, 0,2-, 2,2- или 11,1-кратном количестве от массы SAMe в концентрате дрожжей. Смесь перемешивалась при комнатной температуре в течение 30 минут до получения концентрата клеток дрожжей с добавлением ксантановой камеди.

(d) Производство высушенных дрожжей

Концентрат клеток дрожжей с добавлением ксантановой камеди выливался на

нержавеющий поддон аппарата для лиофильной сушки (производства фирмы *ULVAC Inc.*), замораживался до -50°C, а затем лиофилизировался в течение 36 часов до финальной отметки температуры 25°C. Полученные лиофилизованные дрожжи растирались в порошок высушенных дрожжей. Полученный таким образом порошок высушенных дрожжей помещался в стеклянный контейнер, который затем

закупоривался. После этого проводилось тестирование стабильности при хранении в условиях ускоренного хранения при 40°C и относительной влажности 75%. Результат тестирования стабильности при хранении в условиях ускоренного хранения при 40°C и относительной влажности 75% приведен в Таблице 1. Остаточная доля SAMe измерялась относительным определением с помощью жидкостной хроматографии

SAMe, выделенного из содержащих SAMe высушенных дрожжей, с использованием общезвестного способа с хлорной кислотой. Присутствие запаха после хранения определялось органолептически пятью членами группы. Если все пять членов группы не чувствовали запаха, результат оценивался как «A», если один или двое из пяти членов группы чувствовали запах, то результат оценивался как «B», если три и более из пяти членов группы чувствовали запах, то результат оценивался как «C».

Измерение SAMe с помощью жидкостной хроматографии в настоящем изобретении проводилось в следующих условиях.

Использованные условия анализа

Колонка: *Cosmosil 4,6 Ø × 100* мм производства фирмы *Nacalai Tesque Inc.*
 Элюант: 0,2 М водный раствор дигидрофосфата калия KH_2PO_4 /метанола в
 соотношении 95/5

Скорость нанесения: 0,7 мл/мин

⁵ Детектор: УФ (260 нм)

Время удерживания SAMe: приблизительно 150 сек

Примеры 5-8

Порошок высушенных дрожжей был получен по принципу, описанному в Примере 1, за исключением добавления курдлана к концентрату клеток дрожжей. Содержание SAMe в порошке высушенных дрожжей, масса добавки, результат тестирования стабильности при хранении порошка высушенных дрожжей, упакованного в закупоренном стеклянном контейнере, в условиях ускоренного хранения при 40°C и относительной влажности 75% и результат органолептического тестирования приведены в Таблице 1.

Пример 9

Порошок высушенных дрожжей был получен по принципу, описанному в Примере 1, за исключением добавления гуаровой камеди к концентрату клеток дрожжей в 0,2-кратном количестве от массы SAMe в концентрате клеток дрожжей. Содержание SAMe в порошке высушенных дрожжей, масса добавки, результат тестирования стабильности при хранении порошка высушенных дрожжей, упакованного в закупоренном стеклянном контейнере, в условиях ускоренного хранения при 40°C и относительной влажности 75% и результат органолептического тестирования приведены в Таблице 1.

Пример 10

Порошок высушенных дрожжей был получен по принципу, описанному в Примере 1, за исключением добавления камеди тамаринда к концентрату клеток дрожжей в 0,2-кратном количестве от массы SAMe в концентрате клеток дрожжей. Содержание SAMe в порошке высушенных дрожжей, масса добавки, результат тестирования стабильности при хранении порошка высушенных дрожжей, упакованного в закупоренном стеклянном контейнере, в условиях ускоренного хранения при 40°C и относительной влажности 75% и результат органолептического тестирования приведены в Таблице 1.

Пример 11

Порошок высушенных дрожжей был получен по принципу, описанному в Примере 1, за исключением добавления геллановой камеди к концентрату клеток дрожжей в 0,2-кратном количестве от массы SAMe в концентрате клеток дрожжей. Содержание SAMe в порошке высушенных дрожжей, масса добавки, результат тестирования стабильности при хранении порошка высушенных дрожжей, упакованного в закупоренном стеклянном контейнере, в условиях ускоренного хранения при 40°C и относительной влажности 75% и результат органолептического тестирования приведены в Таблице 1.

Сравнительный пример 1

Порошок высушенных дрожжей был получен по принципу, описанному в Примере 1, за исключением пропуска добавления ксантановой камеди к концентрату клеток дрожжей. Содержание SAMe в порошке высушенных дрожжей, масса добавки, результат тестирования стабильности при хранении порошка высушенных дрожжей, упакованного в закупоренном стеклянном контейнере, в условиях ускоренного хранения при 40°C и относительной влажности 75% и результат органолептического тестирования приведены в Таблице 1.

Сравнительный пример 2

Порошок высушенных дрожжей был получен по принципу, описанному в Примере

1, за исключением добавления трегалозы к концентрату клеток дрожжей в 2,2-кратном количестве от массы SAMe в концентрате клеток дрожжей. Содержание SAMe в порошке высушенных дрожжей, масса добавки, результат тестирования стабильности при хранении порошка высушенных дрожжей, упакованного в закупоренном стеклянном контейнере, в условиях ускоренного хранения при 40°C и относительной влажности 75% и результат органолептического тестирования приведены в Таблице 1.

Таблица 1

Пример	Добавка	Масса добавки в композиции высушенных дрожжей (%)	Количество добавки в растворе перед высушиванием (% по массе)	Содержание SAMe в высушенных дрожжах перед началом тестирования (% по массе)
Сравнительный пример 1	нет	0,0	0,0	14,5%
Пример 1	ксантановая камедь	0,48	0,1	16,1%
Пример 2	ксантановая камедь	4,6	1,0	12,3%
Пример 3	ксантановая камедь	32,0	10,0	11,9%
Пример 4	ксантановая камедь	68,6	50,0	5,2%
Пример 5	курдлан	0,48	0,1	15,9%
Пример 6	курдлан	4,6	1,0	13,3%
Пример 7	курдлан	32,0	10,0	11,6%
Пример 8	курдлан	68,8	50,0	5,1%
Пример 9	гуаровая камедь	4,6	1,0	9,1%
Пример 10	камедь тамаринда	4,6	1,0	14,6%
Пример 11	геллановая камедь	4,6	1,0	12,2%
Сравнительный пример 2	трегалоза	32,0	10,0	12,5%

Таблица 1 (продолжение)

Пример	Тестирование стабильности при хранении			Наличие запаха через 60 дней*	
	Остаточная доля SAMe (%)				
	Через 30 дней	Через 45 дней	Через 60 дней		
Сравнительный пример 1	5,8%	0,0%	0,0%	C	
Пример 1	60,1%	46,4%	28,1%	B	
Пример 2	99,6%	99,6%	99,5%	A	
Пример 3	99,7%	99,7%	99,7%	A	
Пример 4	99,8%	99,8%	99,7%	A	
Пример 5	58,8%	44,5%	25,1%	B	
Пример 6	94,9%	94,7%	94,4%	A	
Пример 7	99,8%	99,8%	99,7%	A	
Пример 8	99,8%	99,8%	99,8%	A	
Пример 9	99,7%	99,7%	99,6%	A	
Пример 10	92,8%	92,5%	92,3%	A	
Пример 11	99,7%	99,6%	99,5%	A	
Сравнительный пример 2	10,4%	0,0%	0,0%	C	

*Органолептическое тестирование: C: сильный неприятный запах, B: слабый неприятный запах и A: нет запаха

Примеры 12-18

Содержащий SAMe концентрат дрожжей с концентрацией твердого вещества 18,2% по массе (содержание SAMe: 3,7% по массе) был получен с использованием 200-литрового культурального контейнера. К полученному концентрату каждая из добавок: к-каррагенан (Пример 12), ксантановая камедь (Пример 13), гуаровая камедь (Пример 14), камедь тамаринда (Пример 15), курдлан (Пример 16), геллановая камедь (Пример 17), альгиновая кислота (Пример 18) и Ceolus ST-02 (кристаллическая целлюлоза) (Пример 19) были добавлены в количестве 1% по массе. После этого определяли выход и содержание SAMe (% по массе) после лиофилизации, а также остаточную долю SAMe через 30 и 60 дней хранения при 40°C.

Использованные в Примерах 12-19 условия описаны ниже.

(а) Культура клеток дрожжей

Введение культуры проводилось в тех же условиях, что и в Примере 1, до получения 120 литров культурального раствора дрожжей с концентрацией клеток дрожжей 3,5% по массе и содержанием SAMe 201,5 мг/г высущенных дрожжей.

(б) Отделение клеток дрожжей

Полученные 120 литров культурального раствора центрифугировались в центрифуге постоянного ротационного типа (*Hitachi Hitac Centrifuge CR10B2*) до получения 23,4 кг жидкого концентрата клеток дрожжей с концентрацией дрожжей 18% по массе сухого продукта.

(с) Добавление загустителя к концентратору клеток дрожжей

К полученным 23,4 кг концентрата клеток дрожжей был добавлен соответствующий Примерам 12-19 загуститель в 1,0-кратном количестве от массы SAMe в концентраторе дрожжей. Смесь перемешивалась при комнатной температуре в течение 30 минут до получения концентрата клеток дрожжей с добавлением соответствующего загустителя из Примеров 12-19.

(д) Производство высущенных дрожжей

Каждый концентрат клеток дрожжей с добавлением соответствующего загустителя из Примеров 12-19 выливался на нержавеющий поддон аппарата для лиофильной сушки

(производства фирмы *ULVAC Inc.*), замораживался до -50°C, а затем лиофилизировался в течение 36 часов до финальной отметки температуры 25°C. Полученные лиофилизированные дрожжи растирались в порошок высущенных дрожжей.

Полученный таким образом порошок высущенных дрожжей помещался в стеклянный контейнер, который затем закупоривался. После этого проводилось тестирование стабильности при хранении в условиях ускоренного хранения при 40°C и относительной влажности 75%. Результат тестирования стабильности при хранении в условиях ускоренного хранения при 40°C и относительной влажности 75% приведен в Таблице 2. Остаточная доля SAMe определялась с помощью способа, описанного выше. Степень перемешивания добавки с SAMe оценивалась визуально по степени дисперсности.

Степень перемешивания добавки, выход и форма клеток дрожжей и содержание SAMe (% по массе) после лиофилизации, а также остаточная доля SAMe через 30 и 60 дней хранения при 40°C показаны в Таблице 2.

Таблица 2

	Добавка	Количество добавки в концентраторе перед высушиванием (% по массе)	Степень перемешивания*	Выход после высушивания
Сравнительный пример 1	нет	0%	-	97%
Пример 12	к-каррагenan	1%	A	97%
Пример 13	ксантановая камедь	1%	B	98%
Пример 14	гуаровая камедь	1%	A	98%
Пример 15	камедь тамаринда	1%	A	97%
Пример 16	курдлан	1%	B	96%
Пример 17	геллановая камедь	1%	B	96%
Пример 18	альгиновая кислота	1%	B	98%
Пример 19	<i>Cellos ST-02</i> (кристаллическая целлюлоза)	1%	A	98%

Таблица 2 (продолжение)

Пример	Форма после высушивания	Содержание SAMe после высушивания (% по массе)	Тестирование стабильности при хранении	
			Остаточная доля (%)	

			Через 30 дней	Через 60 дней
Сравнительный пример 1	порошок	14,4%	6,0%	0,0%
Пример 12	порошок	14,0%	70,1%	58,5%
Пример 13	порошок	12,3%	99,5%	99,3%
Пример 14	порошок	9,1%	99,6%	99,5%
Пример 15	порошок	14,6%	93,1%	92,2%
Пример 16	камедь	13,3%	95,0%	94,1%
Пример 17	камедь	12,2%	99,6%	99,4%
Пример 18	порошок	16,1%	69,5%	54,0%
Пример 19	порошок	16,8%	76,8%	64,0%

*Органолептический тест: А: равномерно перемешано, В: почти равномерно перемешано

Сравнительный пример 3

Порошок высушенных дрожжей был получен по принципу, описанному в Примере 1, за исключением введения культуры в среде, не содержащей L-метионин. В полученным порошке высушенных дрожжей SAMe не содержался. Нижеописанный эксперимент проводился с использованием полученного порошка высушенных дрожжей.

Экспериментальные тесты 1-5 и Сравнительные экспериментальные оценки 1 и 2

Высушенные дрожжи, полученные в Примерах 2, 6, 9, 10 и 11 и Сравнительных примерах 1 и 3, прошли тестирование на всасываемость в Примерах экспериментальных тестов 1-5 и сравнительных экспериментальных оценках 1 и 2 на крысах линии *Sprague Dawley (SD)* (мужские особи восьми недель, количество n=3 для каждой группы) в условиях, описанных в Непатентном Документе 2.

Тестирование всасываемости проводились в соответствии со способом, описанным в непатентном документе 2 (*J of Chromatography B*, 863, 94-100 (2008)). Высушенные

дрожжи растворяли в дистиллированной воде и перорально вводили крысам в дозировке 300 мг/кг массы тела крысы в пересчете на SAMe. У крыс забирали кровь через 0,5, 2, 3 и 5 часов после орального введения и затем сразу центрифугировали для отделения плазменных компонентов. После этого экстракт компонента SAMe, полученный с использованием хлорной кислоты, был проанализирован способом жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (*LC-MC-MC*) с применением жидкостной хроматографии высокого разрешения при описанных далее условиях. Наиболее высокая концентрация SAMe в плазме наблюдалась через 2 часа после орального введения каждого из высушенных дрожжей. Результат тестирования всасываемости через 2 часа после орального введения каждого из высушенных дрожжей показан в Таблице 3.

Результат, приведенный в Таблице 3, показывает, что всасываемость в каждом Примере Теста, в которых использовались высушенные дрожжи с добавлением загустителя, была лучше, чем в Оценке 1, где загуститель не был добавлен к высушенным дрожжам из Сравнительного Примера 1.

Система для анализа и условия тестирования всасываемости соответствовали описанным далее.

Способ LC-MC-MC

Система *LC-MC-MC*: жидкостной хроматограф *Accella*, орбитрап *LTQ Discovery* фирмы *Thermo Fisher Scientific Inc*.

Условия жидкостной хроматографии высокого разрешения

Колонка: *Intersil ODS-3* (4,6 мм × 150 мм) фирмы *GL Sciences Inc*

Скорость нанесения: 0,5 мл/мин

Колоночный термостат: 40°C

Детектор: УФ (260 нм)

Время удерживания SAMe: приблизительно 145 сек

Объем для нанесения: 10 мкл

Элюант: 2 ммоль/л водный раствор гептафторбутировой кислоты:ацетонитрила в соотношении 30:70

5 Условия масс-спектрометрии

Получение ионов: электроспрей-ионизация (*ESI*)

Полярность ионов: положительная

Тип сканирования: преобразование Фурье, режим полного сканирования

Разрешение: 30000

10 Диапазон масс: 360-410 (масса к заряду)

Таблица 3

	Высущеные дрожжи	Добавка	Количество добавки в композиции высущенных дрожжей перед высушиванием (% по массе)
<i>15</i>	Оценка 1	Сравнительный Пример 1	нет
	Оценка 2	Сравнительный пример 3	нет
	Пример Теста 1	Пример 2	ксантановая камедь
	Пример Теста 2	Пример 6	курдлан
	Пример Теста 3	Пример 9	гуаровая камедь
<i>20</i>	Пример Теста 4	Пример 10	камедь тамаринда
	Пример Теста 5	Пример 11	геллановая камедь

Таблица 3 (продолжение)

	Количество добавки в растворе перед высушиванием (% по массе)	Содержание SAMe в высущенных дрожжах перед началом тестирования (% по массе)	Концентрация SAMe в плазме через 2 часа после орального введения (мкг/мл)
<i>25</i>	Оценка 1	0,0	14,5%
	Оценка 2	0,0	0,0%
	Пример Теста 1	1,0	12,3%
	Пример Теста 2	1,0	13,3%
	Пример Теста 3	1,0	9,1%
<i>30</i>	Пример Теста 4	1,0	14,6%
	Пример Теста 5	1,0	12,2%

Промышленное применение

35 Содержащая S-аденозил-L-метионин композиция с прекрасной стабильностью при хранении и данная композиция с прекрасной всасываемостью эффективно используется как физиологически активное соединение в лекарственных средствах и здоровом питании.

40 Способ производства настоящего изобретения может применяться в качестве удобного и недорогого способа производства композиции, содержащей высокую концентрацию S-аденозил-L-метионина, с прекрасной стабильностью при хранении.

Формула изобретения

45 1. Композиция для использования в качестве физиологически активного соединения, содержащая высущенные дрожжи *Saccharomyces*, содержащие S-аденозил-L-метионин, и загуститель, где загуститель содержится в количестве от 4,5 до 32% по массе композиции, где загуститель представляет собой по меньшей мере один загуститель, выбранный из группы, состоящей из ксантановой камеди, геллановой камеди и гуаровой камеди.

2. Композиция по п.1, где композиция, содержащая высушенные дрожжи *Saccharomyces*, содержащие S-аденозил-L-метионин, содержит 4,5-4,6% загустителя по массе композиции, содержащей высушенные дрожжи *Saccharomyces*, содержащие S-аденозил-L-метионин.

5 3. Композиция по п.1 или 2, в которой дрожжи, принадлежащие к роду *Saccharomyces*, являются *Saccharomyces cerevisiae*.

4. Способ производства композиции по п.1 или 2, содержащий:

добавление загустителя, выбранного из группы, состоящей из ксантановой камеди, геллановой камеди и гуаровой камеди, в количестве от 4,5 до 32% по массе композиции

10 к концентрату клеток дрожжей *Saccharomyces*, производящих S-аденозил-L-метионин, где концентрат получен из культурального раствора указанных клеток дрожжей, и высушивание полученной смеси.

15

20

25

30

35

40

45