



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

# UTBM

<b>DOMANDA NUMERO</b>	<b>101983900000455</b>
<b>Data Deposito</b>	<b>12/08/1983</b>
<b>Data Pubblicazione</b>	<b>12/02/1985</b>

<b>Priorità</b>	139.948/82
<b>Nazione Priorità</b>	JP
<b>Data Deposito Priorità</b>	13-AUG-82

Titolo

Procedimento per la depurazione della S-adenosil-L- metionina

**DOCUMENTAZIONE**  
**RILEGATA**

UFFICIO BREVETTI  
GOVERNO GIAPPONESE

°°°

La presente sta a certificare che la copia  
allegata è una copia fedele della domanda che segue  
come depositata con questo Ufficio.

Data della domanda: 13 Agosto 1982

Numero della domanda: Domanda di Brevetto No. 139.948/82

Richiedente: Nippon Zeon Co., Ltd. 

5 Settembre 1983

Kazuo Wakasugi

Direttore Generale

Dell'Ufficio Brevetti

DOMANDA DI BREVETTO

13 Agosto 1982

Al: Sig. Kazuo Wakasugi

Direttore Generale dell'Ufficio Brevetti

1. Titolo della invenzione:

"Procedimento per purificare la S-adenosil-L-metionina"

2. Inventori:

Nome: Shozo Shiozaki

Indirizzo: 3, Kitashirakawa Higashihirai-cho,  
Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto-fu

(ed altri 3)

3. Richiedente:

Nome: Nippon Zeon Co., Ltd.

Indirizzo: 6-1, 2-chome, Marunouchi,  
Chiyoda-ku, Tokyo

(Tel: 216-1771)

Rappresentante: Saburo Ohnishi

4. Elenco dei documenti allegati:

(1) Descrizione una copia

(2) Duplicato della copia di Domanda una copia

5. Inventori oltre al suddetto:

Nome: Hideaki Yamada

Indirizzo: 19-1, Matsugasaki Kinomoto-cho,  
Kyoto-shi, Kyoto-fu

Nome: Yoshiki Tani

Indirizzo: 60 ban gatsuchi-1, 56, Kamigano-shohuen-cho,  
Kita-Ku, Kyoto-fu

Nome: Sakayu Shimizu

Indirizzo 14, Nishinokyo Hakuraku-cho  
Nakagyo; Kyoto-Shi, Kyoto-fu

---

DESCRIZIONE

1. Titolo della invenzione:

"Procedimento per purificare la S-adenosil-L-  
metionina"

2. Rivendicazione:

Procedimento per purificare la S-adenosil-L-  
metionina che consiste nel sottoporre un liquido  
contenente S-adenosil-L-metionina grezza ad un  
processo di purificazione, detto processo essendo ca-  
ratterizzato nel fatto che detto processo di purifi-  
cazione consiste, in una sequenza desiderata, di  
(A) almeno una fase di trattamento di detto liquido  
con una resina scambiatrice di cationi debolmente  
acido tipo-H<sup>+</sup> e (B) almeno una fase di trattamento  
con un adsorbente costituito da una resina sintetica  
porosa.

---

### 3. Descrizione dettagliata della Invenzione

La presente invenzione riguarda un procedimento per purificare la S-adenosil-L-metionina (che qui di seguito verrà abbreviata in SAM), e, più in particolare, riguarda un procedimento per isolare e purificare in modo efficace SAM avente un elevato grado di purezza da un liquido contenente SAM grezzo avente impurezze.

SAM è una sostanza importante che partecipa al metabolismo di grassi, proteine, e carboidrati in vivo. Recentemente, si è trovato che SAM ha un effetto terapeutico su jecur adiposum, su lipemia, arteriosclerosi, algestesi neuropatia di artrosi degenerativa, psicogenesi neuropatica, depressione ed insonnia.

Fino ad ora sono noti molti procedimenti per la purificazione di SAM. Tra gli esempi specifici noti sono compresi (1) un procedimento che comprende una fase di trattamento con una resina scambiatrice di cationi fortemente acida e una fase di trattamento con carbone attivato (pubblicazione di brevetto giapponese No. 13680/1971), (2) un procedimento che consiste nel trattare con una resina scambiatrice di cationi debolmente acida (Enzymologia, Vol. 29, pag. 283), (3) un procedimento che comprende una fase di trattamento con una resina scambiatrice di cationi

debolmente acida tipo  $H^+$  e una fase di trattamento con carbone attivato (pubblicazione di brevetto giapponese No. 145299/1981), (4) un procedimento che consiste nel trattare con una resina chelato (pubblicazione di brevetto giapponese No. 20998/1978) e (5) un procedimento che passa attraverso a un sale del SAM con acido picrico oppure con acido picrolonico (brevetto U.S. 3.707.536 e brevetto U.S. 3.954.726).

Di questi, il procedimento (2) è più semplice ed è più economico rispetto al procedimento (1), (4) oppure (5). Però ha l'inconveniente costituito dal fatto che la separazione del SAM da impurezze è incompleta e non si può ottenere SAM avente un elevato grado di purezza come quello che può venire usato in qualità di sostanza medicinale. Il procedimento (3) che è un perfezionamento rispetto al procedimento (1), possiede un difetto, che, sebbene il grado di purezza aumenta, poichè l'adsorbimento di SAM su carbone attivato è notevole, la resa di ricupero di SAM è ridotta, e quando si fa aumentare la quantità di un solvente organico in un eluente allo scopo di fare aumentare la resa di ricupero si ha come risultato l'inconveniente costituito da una insufficiente separazione di SAM dalle impurezze.

La Richiedente ha effettuato estese ricerche

allo scopo di eliminare questi difetti nella tecnica tradizionale e ha trovato che si può isolare SAM e si può purificarlo da un liquido che contiene SAM grezzo, in modo efficace, mediante una combinazione di un trattamento con una resina scambiatrice di cationi debolmente acida tipo  $H^+$  e un trattamento con un adsorbente costituito da una resina sintetica porosa.

Cioè, uno scopo della presente invenzione è quello di realizzare un procedimento per isolare e purificare SAM con elevato grado di purezza con buona efficienza. Tale scopo della presente invenzione viene ottenuto sottoponendo un liquido che contiene SAM grezzo ad un processo di purificazione il quale è costituito, secondo qualsiasi sequenza desiderata, da (A) almeno una fase di trattamento del liquido contenente SAM grezzo con una resina scambiatrice di cationi debolmente acida tipo  $H^+$  e (B) almeno una fase di trattamento con un adsorbente costituito da una resina sintetica porosa.

Il procedimento per produrre il liquido che contiene SAM grezzo adottato nella presente invenzione non è particolarmente limitato. Esempio sono un procedimento che comprende il sottoporre a coltura un microorganismo appartenente al genere Saccharomyces, Candida oppure Mucor capace di produrre SAM, in

un mezzo di coltura contenente metionina, produrre e accumulare SAM all'interno delle cellule microbiche e/o senza le cellule microbiche e estraendo il brodo di coltura con una sostanza estraente per esempio acido perclorico, acido cloridrico, acido solforico oppure acido formico; acido fosforico, ecc. oppure sottoponendo ad una reazione enzimatica adenosina trifosfato e metionina in presenza di metionina-adenosiltransferasi.

Nella presente invenzione è essenziale condurre (A) almeno una fase di trattamento del liquido che contiene SAM grezzo con una resina scambiatrice di cationi debolmente acida tipo  $H^+$  e (B) almeno una fase di trattamento con un adsorbente costituito da una resina sintetica porosa, quando si tratta tale liquido contenente SAM grezzo.

Si effettua il trattamento (A) nel modo che segue.

Cioè, si regola il pH del liquido che contiene SAM grezzo usualmente a 2,5-6,5 preferibilmente a 4-6,5. In quel caso, quando il pH del liquido che contiene SAM grezzo è troppo basso, è difficile che il SAM venga adsorbito sulla resina scambiatrice di ioni. Se il pH del liquido è troppo elevato, SAM diventa difficile a decomporsi. Il metodo di regolazione del pH non è particolarmente limitato. E' prefe-

ribile un procedimento in cui si usa una combinazione di un acido e di un alcali capace di formare un precipitato difficilmente solubile oppure insolubile in acqua, oppure si usa una resina scambiatrice di naioni (tipo  $\text{OH}^-$ ).

Successivamente si pone a contatto il liquido che contiene SAM grezzo con la resina scambiatrice di cationi debolmente acida tipo  $\text{H}^+$ , per adsorbire selettivamente il SAM avente una carica positiva e togliere le impurezze che hanno cariche neutre e cariche negative.

La resina scambiatrice di cationi debolmente acida usata può essere qualsiasi avente gruppo carbossilico come un gruppo scambiatore di ioni. Esempi specifici sono Amberlite IRC-50 e IRC-80 (prodotti della ditta Rohm & Haas Co.) e Diaion WK20 (un prodotto della Mitsubishi-Chemical Co., Ltd.). Inoltre, si può effettuare il contatto adottando un metodo discontinuo oppure adottando un metodo nel quale si usa una colonna. Il metodo nel quale si usa una colonna è preferito per la possibilità di realizzazione, la facilità di allontanamento delle impurezze.

Il SAM adsorbito sulla resina scambiatrice di ioni viene separato effettuando una eluizione frazionata della resina con una soluzione acquosa di

un acido inorganico oppure organico avente un pH usualmente non superiore a 3,0 preferibilmente compreso tra 0,2 e 2,0. L'acido usato non è particolarmente limitato. Esempi includono acido cloridrico, acido solforico, acido fosforico, acido acetico e acido p-toluensolfonico. Se necessario, prima dell'eluizione frazionata di SAM, si possono allontanare tracce di impurezze presenti lavando con acqua oppure con una soluzione acquosa diluita di un acido (per esempio a un pH di 3,5 o superiore) se richiesto.

Nel frattempo, la fase di trattamento (B) viene effettuata nel modo seguente.

Primo, il liquido contenente SAM grezzo viene regolato a pH 6,5 o ad un valore inferiore e viene quindi posto a contatto con l'adsorbente costituito da una resina sintetica porosa. In questo caso, la regolazione del pH e il contatto con l'adsorbente possono venire effettuati in modo uguale a quello descritto nella fase di trattamento (A). Il contatto con l'adsorbente dà come risultato un adsorbimento selettivo di ammine, metiltioadenosina (il prodotto di decomposizione di SAM) e sostanze coloranti. Scegliendo condizioni come quelle descritte qui di seguito, si può far passare o fare adsorbire il SAM. Nel caso dell'adsorbimento, il SAM può venire fatto separare selettivamente effettuando una eluizione fra-

zionata dell'adsorbente con una soluzione acquosa di un acido inorganico oppure organico avente un pH non superiore a 3,5 preferibilmente compreso tra 0,2 e 2,0.

Gli acidi inorganici e gli acidi organici che possono venire usati possono essere uno qualsiasi di quelli che rientrano nella medesima categoria illustrata nella fase di trattamento (A), e si possono usare congiuntamente con un solvente organico come metanolo, etanolo, n-propanolo, isopropanolo, acetone, metiletilchetone, metilformiato, etilacetato, diossano, toluene ecc., purchè esso sia in una quantità tale che possa dare una soluzione omogenea. Se si desidera, inoltre nel medesimo modo descritto nella fase di trattamento (A) si possono allontanare tracce di impurezze mediante lavaggio con acqua oppure con una soluzione acquosa diluita di un acido prima dell'eluzione frazionata.

L'adsorbente costituito da una resina sintetica porosa usato nella presente invenzione è insolubile in acqua ed ha una struttura macro-reticolata. Tra gli esempi specifici sono compresi adsorbenti non polari basati su un copolimero stirene-divinilbenzene, come per esempio Amberlite XAD-2 e XAD-4 (prodotti della ditta Rohm & Haac Co.) e Diaion HP-10, HP-20, HP-30, HP-40 e HP-50 (prodotti della ditta Mitsubishi

Chemical Co., Ltd.), e adsorbenti moderatamente polari basati su un polimero di un acrilato e/o di un metacrilato oppure un copolimero di tali monomeri con un monomero non-polare per esempio stirene e divinilstirene, ecc. come per esempio Amberlite XAD-7 e XAD-8 (prodotti della Rohm & Haas Co.) e Diaion HP-ZMG (un prodotto della ditta Mitsubishi Chemical Co., Ltd.); ecc. Se si desidera, si possono usare questi adsorbenti in combinazione.

Questi adsorbenti sono comuni in quanto essi adsorbono selettivamente sostanze estranee nel liquido contenente SAM grezzo, per esempio ammine, sostanze coloranti ecc. Adsorbimento per SAM è selettivo a secondo la zona di ptb. Adsorbimento ha luogo in condizioni di acidità relativamente debole, ma non in condizioni di acidità relativamente forte.

Nella presente invenzione, il trattamento della fase (A) e il trattamento della fase (B) vengono effettuati, almeno una volta. La sequenza del trattamento può essere disposta in modo appropriato. Esempi preferiti della sequenza sono (1) (A) e quindi (B), (2) (B) e quindi (A); (3) (A), (B) e quindi (A); e (4) (B), (A) e quindi (B). Se necessario, inoltre la fase di trattamento (A) e/o la fase di trattamento (B) possono essere aggiunte. Però, poichè con

l'aumento del numero delle fasi di trattamento, le fasi diventano complicate e viene ridotta la economicità, detti quattro tipi di combinazione vengono di solito scelti.

Quando si deve effettuare la fase di trattamento (B) prima della fase di trattamento (A), è vantaggioso, dal punto di vista operativo, realizzare condizioni tali che le impurezze vengano adsorbite selettivamente sull'adsorbente di resina sintetica.

Esempi specifici sono, ad esempio un procedimento che usa adsorbenti non polari, oppure un procedimento in cui si effettua contatto in condizioni di acidità ad un pH non superiore a 3,5 preferibilmente compreso tra 0,2 e 3,0, usando un adsorbente moderatamente polare.

Quando la fase finale del processo di purificazione è il trattamento (B), è possibile separare SAM, una volta fatto adsorbire adsorbenti di resina sintetica o far passare SAM senza adsorbimento.

In questa invenzione la frazione di SAM eluita da tale fase di purificazione viene concentrata a pressione ridotta, se si desidera, e successivamente, essa viene posta a contatto con un solvente organico come metanolo, etanolo, n-propanolo, isopropanolo, n-butanolo, isobutanolo, metossi etanolo, acetone, metiletilchetone, metilformiato, etilformiato, metilacetato, etilacetato, butilacetato, diossano, ecc.,

per ottenere così un precipitato di un sale formato tra SAM e un acido inorganico oppure organico.

Si può ottenere una polvere di un sale tra SAM e un acido inorganico oppure organico allontanando l'acido in eccesso dal liquido di eluizione di SAM usando una resina scambiatrice di anioni (tipo  $\text{OH}^-$ ) oppure un alcali in grado di formare un sale insolubile in acido e in acqua, senza aiuto di un solvente organico, nella eluizione frazionata di SAM e, successivamente, evaporando il solvente a pressione ridotta fino a secco.

Poichè la resina scambiatrice di ioni debolmente acida tipo  $\text{H}^+$  usata in questa invenzione viene rigenerata in corrispondenza di uno stadio nel quale SAM è stato eluito, ad un tipo  $\text{H}^+$ , essa può essere usata ripetutamente soltanto con lavaggio con acqua e non è sempre necessario, pertanto, sottoporla a uno speciale trattamento di rigenerazione. Inoltre, l'adsorbente resina sintetica può venire rigenerato facilmente per esempio mediante lavaggio con una soluzione acquosa al 50% di metanolo e, quindi, mediante lavaggio con acqua.

Così, secondo la presente invenzione, si può ottenere con efficacia SAM avente un grado di purezza molto elevato effettuando operazioni semplici nelle

quali si usano sostanze che sono facili da rigenerare.

Gli esempi che seguono illustrano più in particolare la presente invenzione.

Esempio 1

Si è sottoposto a coltura Saccharomyces cerevisiae (IFO 2044) nel mezzo di coltura di F. Schlenk, et al. [(Journal of Biological Chemistry, Vol.229, pag.1037 (1957)] ottenendo così cellule microbiche aventi in esse accumulato il SAM. Si sono posti in sospensione 210 g delle cellule così ottenute in 1000 ml di acido perclorico 1,5N e si è estratto con sbattimento a temperatura ambiente per un'ora. Successivamente, i residui di cellule sono stati rimossi mediante separazione centrifuga. Si è aggiunto bicarbonato di potassio all'estratto per regolarne il pH a 5,0. Il precipitato così ottenuto di perclorato di potassio è stato separato filtrando mediante aspirazione e si sono ottenuti così 1080 ml di un estratto contenente 1,15 g di SAM.

Si è fatto passare l'estratto attraverso ad una colonna riempita con 200 ml di una resina scambiatrici-  
ce di cationi debolmente acida, Amberlite IRC-50 (tipo H<sup>+</sup>) (un Marchio di Fabbrica per un prodotto della ditta Rohm & Haas Co.) per adsorbire il SAM. Si è lavata la colonna con 400 ml di acido acetico 0,0001N e si è effettuata una eluizione frazionata con acido solforico 0,1N ottenendo così 630 ml di una soluzione



La resa di isolamento di SAM e il suo grado di purezza sono indicati nella tabella 1.

Esempio 2

100 ml di un estratto contenente 1,06 g di SAM si sono ottenuti in modo uguale a quello descritto nell'esempio 1. Questo estratto è stato fatto passare attraverso ad una colonna riempita con 200 ml di Amberlite IRC-84 (tipo H<sup>+</sup>) (un Marchio di fabbrica per una resina scambiatrice di cationi debolmente acida prodotta dalla Rohm & Haas Co.) allo scopo di adsorbire SAM. Si è lavata la colonna con 400 ml di acido cloridrico 0,0001N e, quindi, si è effettuata una eluizione frazionata con acido cloridrico ottenendo così 640 ml di una soluzione di SAM.

Si è regolata la frazione eluita di SAM a pH 4,8 con Amberlite IRA-45 (tipo OH<sup>-</sup>), una resina scambiatrice di anioni debolmente basica e, quindi, si è fatto passare attraverso a una colonna riempita con 1,5 litri di Amberlite XAD-7 (un Marchio di Fabbrica per un adsorbente di resina sintetica prodotto dalla ditta Tohm & Haas Co.) per adsorbire SAM. Si è lavata la colonna con 2 litri di acido acetico 0,0001N e, quindi, si è effettuata una eluizione frazionata facendo passare un solvente misto costituito da acido cloridrico 0,1N e da acetone (in un rapporto in volu-

me di 1:0,1) in modo da ottenere 1120 ml di soluzione di SAM.

Si è concentrata la frazione eluita di SAM a pressione ridotta fino a che il suo volume totale è diventato 200 ml e, quindi, si è aggiunta Amberlite IRA-45 (tipo  $\text{OH}^-$ ), una resina scambiatrice di anioni debolmente basica, per regolare il pH della soluzione ad 1,0. Si è separata la resina filtrando mediante aspirazione e si è concentrato il filtrato a pressione ridotta. Si è liofilizzato il concentrato ottenendo così 1,19 g di cloridrato di SAM sotto forma di una polvere bianca, che risultava uniforme nella cromatografia su ~~carta~~ carta e nella cromatografia in strato sottile su gel di silice.

La resa di ricupero di SAM e il suo grado di purezza sono indicati nella tabella 1.

### Esempio 3

si sono ottenuti 950 ml di un estratto contenente 0,98 g di SAM, ottenuto in modo uguale a quello descritto. Questo estratto è stato fatto passare nell'esempio 1, attraverso ad una colonna riempita con 200 ml di Amberlite XAD-2 (un Marchio di Fabbrica per un adsorbente tipo stirene-divinilbenzene prodotto dalla ditta Rohm & Haas Co.) senza adsorbire SAM. Si sono raccolte le frazioni contenenti SAM e si è aggiunto bicarbonato di potassio allo scopo ~~di~~

di regolare il pH a 5,0. Si è separato il precipitato così ottenuto di perclorato di potassio filtrandolo mediante aspirazione, per ottenere una soluzione di SAM.

Quindi, si è fatta passare la soluzione di SAM attraverso ad una colonna riempita con 200 ml di Amberlite RC-50 (tipo  $H^+$ ) una resina scambiatrice di cationi debolmente acida, per adsorbire SAM. Si è lavata la colonna con 400 ml di acido acetico 0,0001N e si è effettuata una eluizione frazionata con acido solforico 0,1N ottenendo così 630 ml di una frazione eluita di SAM.

Si è concentrata la frazione eluita di SAM così ottenuta a pressione ridotta fino a che il suo volume totale è diventato 200 ml e, quindi, si sono aggiunti 800 ml di acetone ottenendo così un precipitato di solfato di SAM. Si è raccolto il precipitato separandolo mediante centrifugazione, lo si è sciolto in una piccola quantità di acqua e lo si è liofilizzato ottenendo così 1,50 g di solfato di SAM sotto forma di una polvere bianca, che era uniforme ~~\_\_\_\_\_~~ ~~\_\_\_\_\_~~ nella cromatografia su carta e nella cromatografia in strato sottile su gel di silice.

La resina di ricupero di SAM e il suo grado di purezza sono indicati nella tabella 1.

Esempio 4

Si sono prodotte cellule microbiche aventi SAM accumulato adottando un metodo uguale a quello descritto nell'esempio 1. Si sono posti in sospensione 200 g delle cellule microbiche in 1000 ml di acido formico 0,1N. Si è riscaldata la sospensione a 60°C per 10 minuti e quindi la si è immediatamente raffreddata. Si sono separate le cellule mediante separazione centrifuga ottenendo così 1020 ml di un estratto contenenti 0,91 g di SAM.

Si è fatto passare l'estratto attraverso ad una colonna riempita con 200 ml di Amberlite XAD-8 (un Marchio di Fabbrica per un adsorbente costituito da un acrilato prodotto dalla Rohm & Haas Co.) senza adsorbire SAM.

Le frazioni contenenti SAM sono state raccolte

---

e regolate a pH 5,0 con Amberlite IRA-45 (tipo OH<sup>-</sup>), una resina scambiatrice di anioni debolmente basica, e, quindi, sono state fatte passa<sup>-re</sup> attraverso ad una colonna riempita con 200 ml di Amberlite IRC-84 (tipo H<sup>+</sup>), una resina scambiatrice di cationi debolmente acida, per adsorbire SAM. Si è lavata la colonna con 400 ml di acido cloridrico 0,0001N e, quindi, si è effettuata una eluizione frazionata con acido clori-

drico 0,2N ottenendo così 710 ml di una frazione eluita di 'SAM.'

Si è aggiunta amberlite IRA-45 (tipo OH<sup>-</sup>), una resina scambiatrice di anioni debolmente basica, alla frazione eluita di SAM per regolare il pH ad 1,0. Si è separata la resina filtrando mediante aspirazione, si è concentrato il filtrato a pressione ridotta e si è liofilizzato ottenendo così 1,01 g di cloridrato di SAM sotto forma di una polvere bianca. Questo prodotto ha presentato una singola macchia nella cromatografia su carta e nella cromatografia in strato sottile su gel di silice.

La resa di isolamento di SAM e il suo grado di purezza sono indicati nella tabella 1.

#### Esempio 5

630 ml di una soluzione di SAM, che è stata ottenuta mediante trattamento con un adsorbente stirene/divinilbenzene e con la resina scambiatrice di cationi debolmente acida tipo H<sup>+</sup> in modo uguale a quello descritto nell'esempio 3, sono stati fatti passare attraverso ad una colonna riempita con 200 ml di di resina sintetica un adsorbente/tipo acrilato Amberlite XAD-7 per adsorbire sostanze estranee.

Le frazioni contenenti SAM sono state raccolte e

concentrate a pressione ridotta fino a che il loro volume totale è diventato 200 ml. Quindi, si sono aggiunti 800 ml di acetone ottenendo così un precipitato di solfato di SAM. Si è raccolto il precipitato mediante separazione centrifuga, lo si è sciolto in una piccola quantità di acqua e lo si è liofilizzato ottenendo così 1,46 g di solfato di SAM sotto forma di una polvere bianca. Questo prodotto ha presentato una singola macchia nella cromatografia su carta e nella cromatografia in strato sottile su gel di silice.

La resa di recupero di SAM e il suo grado di purezza sono indicati nella tabella 1.

#### Esempio di confronto 1

950 g di un estratto contenenti 0,98 g di SAM, ottenuto in modo uguale a quello descritto nell'esempio 1, sono stati regolati a pH 5,0 con bicarbonato di potassio. Il precipitato ottenuto di perclorato di potassio/è stato separato filtrando mediante aspirazione e si è ottenuto così un liquido contenente SAM.

Si è fatto passare il liquido contenente SAM attraverso ad una colonna riempita con 200 ml di Amberlite IRC-50 (tipo H<sup>+</sup>), una resina scambiatrice di cationi debolmente acida per adsorbire SAM. Si è

lavata la colonna con 400 ml di acido acetico 0,0001N e, quindi, si è effettuata una eluizione frazionata con solfato 0,1N ottenendo così 610 ml di una frazione eluita di SAM.

Si è fatta passare la frazione eluita di SAM attraverso ad una colonna riempita con 200 ml di carbone attivato per uso cromatografico. Si è lavata la colonna con 600 ml di acido solforico 0,2N e, quindi, si è effettuata una eluizione frazionata con un solvente misto costituito da acido solforico 1,0N e metanolo (1:1 in volume) ottenendo così una soluzione di SAM.

Si è concentrata la frazione eluita di SAM a pressione ridotta fino a che il suo volume totale è diventato 200 ml . Si è aggiunto acetone (800 ml) ottenendo così un precipitato di solfato di SAM. Si è raccolto il precipitato mediante separazione centrifuga, lo si è sciolto in una piccola quantità di acqua e lo si è liofilizzato ottenendo così 1,28 g di solfato di SAM sotto forma di una polvere bianca , che era uniforme nella cromatografia ~~su carta e nella cromatografia in strato sottile su gel di silice.~~

La resa di ricupero di SAM e il suo grado di purezza sono indicati nella tabella 1.

Esempio di confronto 2

si è ripetuto l'esempio 1 tranne che si è effettuato soltanto il trattamento con Amberlite IRC-50 (tipo N<sup>+</sup>) una resina scambiatrice di cationi debolmente acida.

I risultati sono indicati nella tabella 1.

Tabella 1

	Grado di purezza di SAM (%) (*1)	Reazione della nindrina con sostanze diverse da SAM (*2)	Quantità di metiltioadenosina (%) (*3)	Resa di ricupero di SAM (%)
Es.1	98,1	-	0,08	89
Es.2	98,0	-	0,1	90
Es.3	98,0	-	0,1	90
Es.4	98,1	-	0,08	90
Es.5	98,5	-	inferiore a 0,05	88
CEs.1	97,6	-	0,4	77
CEs.2	56,7	++	1,8	90

(\*1) : Si è sviluppato un campione mediante cromatografia su carta bidimensionale, si è rivelata macchia di SAM, si è eseguita estrazione con acido cloridrico, 0,1 N, e si è effettuato calcolo dal coefficiente di assorbimento di molecolare SAM a 260 nm di 15400.

(\*2): Si è determinata la reazione della nindrina con sostanze diverse da SAM nel modo seguente:

Si è sviluppato un campione mediante cromatografia in strato sottile su cellulosa bidimensionale e si è rilevata la presenza di macchie diverse da una macchina di SAM mediante formazione di colore con ninidrina.

(\*3): si è effettuato il calcolo come in (+1), tranne che si è rivelata una macchina di metiltioadenosina e si è usato un coefficiente di assorbimento di molecola di metiltioadenosina a 260 nm di 15.400.

I risultati di cui sopra indicano chiaramente che, mediante il procedimento della presente invenzione, si può ottenere SAM avente un grado di purezza più elevato, con una resa di ricupero più elevata rispetto ai metodi noti.

Richiedente del Brevetto:

Nippon Zeon Co., Ltd.

\*\*\*\*\*

per traduzione conforme

I MANDATARI

(firma)

  
(per sé o per gli altri)

Doc.126110/S./pn.

~~STAMPAT~~

## DESCRIZIONE

dell'invenzione industriale dal titolo:

"Procedimento per purificare la S-adenosil-L-metionina"

della Società NIPPON ZEON CO., LTD.

di nazionalità giapponese

con sede in TOKYO (GIAPPONE)

inventori designati: 1) Shozo SHIOZAKI 2) Hideaki YAMADA

3) Yoshiki TANI 4) Sakayu SHIMIZU

depositata il: 12 AGO. 1983

N°.: 2 2555A/83

## RIASSUNTO

Si purifica la S-adenosil-L-metionina introducendo un liquido che contiene S-adenosil-L-metionina grezza in un processo di purificazione. Il processo di purificazione consiste, adottando qualsiasi sequenza desiderata, di (A) almeno una fase di trattamento del liquido con una resina scambiatrice di cationi debolmente acida tipo  $H^+$  e (B) almeno una fase che consiste nel trattare il liquido con un adsorbente costituito da una resina sintetica porosa.

## DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda un procedimento per purificare la S-adenosil-L-metionina (che qui di seguito verrà abbreviata in SAM), e, più in particolare, riguarda un procedimento per isolare in

modo efficace SAM avente un elevato grado di purezza da un liquido contenente SAM grezzo.

SAM è una sostanza importante che partecipa al metabolismo di grassi, proteine e carboidrati in vivo. Recentemente, si è trovato che SAM ha un effetto terapeutico<sup>su</sup> jecur adiposum, su lipemia, arteriosclerosi, depressione ed insonnia e si desidera produrre il SAM in quantità notevoli.

Fino ad ora sono noti molti procedimenti per la purificazione di SAM. Tra gli esempi specifici sono compresi (1) un procedimento che comprende una combinazione di una fase che consiste nel trattare un liquido che contiene SAM con una resina scambiatrice di cationi fortemente acida e una fase che consiste nel trattarlo con carbone attivato (pubblicazione di brevetto giapponese N° .13680/1971), (2) un procedimento che consiste nel trattare un liquido contenente SAM grezzo con una resina scambiatrice di cationi debolmente acida (Enzymologia, Vol.29, pag.283), (3) un procedimento che comprende una combinazione di una fase che consiste nel trattare un liquido che contiene SAM grezzo con una resina scambiatrice di cationi debolmente acida tipo  $H^+$  e una fase di trattamento con carbone attivato (pubblicazione di brevetto giapponese N° .145299/1981), (4) un procedimento che

consiste nel trattare un liquido che contiene SAM grezzo con una resina chelato (pubblicazione di brevetto giapponese N° .20998/1978) e (5) un procedimento che passa attraverso a un sale del SAM con acido picrico oppure con acido picrolonico (brevetto U.S. 3.707.536 e brevetto U.S. 3.954.726).

Il procedimento (2) è più semplice per ciò che riguarda le fasi del processo ed è più economico rispetto al procedimento (1), (4) oppure (5), ma ha l'inconveniente costituito dal fatto che la separazione del SAM da impurezze e da sostanze estranee è incompleta e non si può ottenere SAM avente un elevato grado di purezza come quello che può venire usato in qualità di sostanza medicinale. Secondo il procedimento (3) che è un perfezionamento rispetto al procedimento (1), il grado di purezza di SAM aumenta, ma poiché l'adsorbimento di SAM su carbone attivato è notevole, la resa di recupero di SAM è ridotta. Un tentativo effettuato allo scopo di fare aumentare la resa di recupero facendo aumentare la quantità di un solvente organico in un eluente dà come risultato l'inconveniente costituito da una insufficiente separazione di SAM dalle impurezze e da sostanze estranee.

Uno scopo della presente invenzione, pertanto, è

realizzare un procedimento mediante il quale si possa isolare SAM avente un elevato grado di purezza, in modo efficace.

La Richiedente ha effettuato estese ricerche allo scopo di realizzare questo scopo e ha trovato che si può isolare SAM e si può purificarlo da un liquido che contiene SAM grezzo, in modo efficace, mediante una combinazione di una fase di trattamento con una resina scambiatrice di cationi debolmente acida tipo  $H^+$  e una fase di trattamento con un adsorbente costituito da una resina sintetica porosa.

Così, secondo la presente invenzione si realizza un procedimento per purificare SAM che consiste nell'introdurre un liquido che contiene SAM grezzo in un processo di purificazione in serie il quale è costituito, secondo qualsiasi sequenza desiderata, da (A) almeno una fase di trattamento del liquido contenente SAM grezzo con una resina scambiatrice di cationi debolmente acida tipo  $H^+$  e (B) almeno una fase di trattamento con un adsorbente costituito da una resina sintetica porosa.

Il procedimento per produrre il liquido che contiene SAM grezzo adottato nella presente invenzione non è particolarmente limitato. Per esempio, si produce SAM sottoponendo a coltura un microorgani-

smo. appartenente al genere Saccharomyces, Candida oppure Mucor capace di produrre SAM, in un mezzo di coltura contenente metionina per produrre e accumulare SAM all'interno delle cellule microbiche e/o senza le cellule microbiche e estraendo il brodo di coltura con una sostanza estraente per esempio acido perclorico, acido cloridrico, acido solforico oppure acido formico; oppure sottoponendo ad una reazione enzimatica adenosina trifosfato e metionina in presenza di metionina-adenosiltransferasi.

Nel procedimento della presente invenzione è essenziale che tale liquido contenente SAM grezzo venga purificato introducendolo in un processo di purificazione in serie che consiste, adottando qualsiasi sequenza desiderata, di (A) almeno una fase di trattamento del liquido che contiene SAM grezzo con una resina scambiatrice di cationi debolmente acida tipo  $H^+$  e (B) almeno una fase di trattamento con un adsorbente costituito da una resina sintetica porosa.

Si effettua la fase di trattamento (A) nel modo che segue.

Primo, si regola il pH del liquido che contiene SAM grezzo usualmente a 3,5-6,5 preferibilmente a 4-6,5. Quando il pH del liquido che contiene SAM grezzo è

troppo basso, è difficile che il SAM venga adsorbito sulla resina scambiatrice di ioni. Se il pH del liquido è troppo elevato, SAM diventa suscettibile nei confronti di una decomposizione. Il metodo di regolazione del pH non è particolarmente limitato. Preferibilmente, si effettua la regolazione del pH usando una combinazione di un acido e di un alcali capace di formare un precipitato difficilmente solubile oppure insolubile in acqua, oppure usando una resina scambiatrice di anioni (tipo  $\text{OH}^-$ ).

Ponendo a contatto il liquido che contiene SAM grezzo avente il pH regolato nel modo indicato sopra con la resina scambiatrice di cationi debolmente acida tipo  $\text{H}^+$ , il SAM avente una carica positiva viene adsorbito selettivamente sulla resina scambiatrice di cationi. Le impurezze che hanno cariche neutre e cariche negative nel liquido non vengono adsorbite sulla resina.

La resina scambiatrice di cationi debolmente acida usata può essere qualsiasi resina scambiatrice di cationi avente gruppi di acidi carbossilici come gruppi scambiatori di ioni. Esempi specifici sono Amberlite IRC-50 e IRC-80 (prodotti della ditta Rohm & Haas Co.) e Diaion WK20 (un prodotto della Mitsubishi-Chemical Co., Ltd.). Si può effettuare

il contatto adottando un metodo discontinuo oppure adottando un metodo nel quale si usa una colonna. Il metodo nel quale si usa una colonna è preferito a causa della sua buona possibilità di realizzazione e a causa della facilità di allontanamento delle impurezze.

Il SAM adsorbito sulla resina scambiatrice di ioni viene quindi separato effettuando una eluizione frazionata della resina con una soluzione acquosa di un acido inorganico oppure organico avente un pH usualmente non superiore a 3,0 preferibilmente compreso tra 0,2 e 2,0. L'acido usato non è particolarmente limitato e, per esempio, si possono usare acido cloridrico, acido solforico, acido acetico e acido p-toluensolfonico. Se necessario, prima dell'eluizione frazionata di SAM, la resina scambiatrice di ioni può venire lavata con acqua oppure con una soluzione acquosa diluita di un acido (per esempio a un pH di 3,5 o superiore) per allontanare tracce di impurezze presenti.

La fase di trattamento (B) viene effettuata nel modo che segue.

Primo, il liquido contenente SAM grezzo viene regolato a pH 6,5 o ad un valore inferiore e viene quindi posto a contatto con l'adsorbente costituito

da una resina sintetica porosa. La regolazione del pH e il contatto possono venire effettuati in modo uguale a quello descritto nella fase di trattamento (A). Il contatto con l'adsorbente dà come risultato un adsorbimento selettivo di ammine, metiltioadenosina (il prodotto di decomposizione di SAM) e sostanze coloranti che sono sostanze estranee nel liquido. Scegliendo condizioni come quelle descritte qui di seguito, si possono fare adsorbire il SAM e le sostanze estranee insieme sull'adsorbente. In questo caso, il SAM può venire fatto separare selettivamente effettuando una eluizione frazionata dell'adsorbente con una soluzione acquosa di un acido inorganico oppure organico avente un pH non superiore a 3,5 preferibilmente compreso tra 0,2 e 2,0.

Gli acidi inorganici e gli acidi organici che possono venire usati possono essere uno qualsiasi di quelli che rientrano nella medesima categoria illustrata nella fase di trattamento (A). Si può usare un solvente organico insieme con l'acido inorganico oppure con l'acido organico purchè esso sia in una tale che quantità / possa dare una soluzione omogenea. Esempi di solventi organici sono metanolo, etanolo, n-propanolo, isopropanolo, acetone, metiletilchetone, metilformiato, etilacetato, diossano e toluene. Se si

desidera, nel medesimo modo descritto nella fase di trattamento (A), l'adsorbente può venire lavato con acqua oppure con una soluzione acquosa diluita di un acido prima dell'eluizione frazionata allo scopo di allontanare tracce di impurezze presenti.

L'adsorbente costituito da una resina sintetica porosa usato nella presente invenzione è insolubile in acqua ed ha una struttura macro-reticolata. Tra gli esempi specifici sono compresi adsorbenti non polari basati su un copolimero stirene/divinilbenzene come matrice per esempio Amberlite XAD-2 e XAD-4 (prodotti della ditta Rohm & Haas Co.) e Diaion HP-10, HP-20, HP-30, HP-40 e HP-50 (prodotti della ditta Mitsubishi Chemical Co., Ltd.), e adsorbenti moderatamente polari basati su un polimero di un estere dell'acido acrilico e/o di un estere dell'acido metacrilico oppure un copolimero di un tale monomero con un monomero non-polare per esempio stirene e divinilbenzene come matrice, per esempio Amberlite XAD-7 e XAD-8 (prodotti della Rohm & Haas Co.) e Diaion HP-ZMG (un prodotto della ditta Mitsubishi Chemical Co., Ltd.). Se si desidera, si possono usare questi adsorbenti in combinazione.

Questi adsorbenti sono comuni in quanto essi adsorbono selettivamente sostanze estranee nel liquido

contenente SAM grezzo, per esempio ammine e sostanze coloranti. Tuttavia, essi hanno una possibilità di adsorbimento selettivo per SAM a seconda dei loro tipi. Specificamente, adsorbenti non-polari adsorbono sostanze estranee, ma non adsorbono SAM, e adsorbenti moderatamente polari adsorbono SAM insieme con le sostanze estranee in condizioni di acidità relativamente debole, ma adsorbono soltanto le sostanze estranee e non adsorbono SAM in condizioni di acidità relativamente forte.

Nel procedimento della presente invenzione, il trattamento della fase (A) e il trattamento della fase (B) vengono effettuati, ciascuno, almeno una volta. La sequenza delle fasi di trattamento è facoltativa. Esempi preferiti della sequenza sono (1) (A) e quindi (B), (2) (B) e quindi (A); (3) (A), (B) e quindi (A); e (4) (B), (A) e quindi (B). Se necessario, la fase di trattamento (A) e/o la fase di trattamento (B) possono essere collegate inoltre a questi esempi. All'aumentare del numero delle fasi di trattamento, la economicità del processo di purificazione, naturalmente, viene lievemente diminuita.

Quando si deve effettuare la fase di trattamento (B) prima della fase di trattamento (A), è vantaggioso, dal punto di vista operativo, realizzare condizioni

tali che soltanto le impurezze vengano adsorbite selettivamente sull'adsorbente di resina sintetica senza un adsorbimento di SAM. Una tecnica specifica di stabilire dette condizioni consiste per esempio nell'usare un adsorbente non polare oppure nell'usare un adsorbente moderatamente polare e metterlo a contatto in condizioni di acidità ad un pH non superiore a 3,5 preferibilmente compreso tra 0,2 e 3,0.

Quando la fase finale del processo di purificazione in serie è la fase (B), è possibile adottare un metodo che consiste nell'adsorbire dapprima SAM sull'adsorbente di resina sintetica e, quindi, separarlo oppure un metodo che consiste nel far passare SAM attraverso all'adsorbente di resina sintetica senza adsorbimento.

La soluzione di SAM eluita dalla fase di purificazione in serie descritta sopra viene concentrata a pressione ridotta, se si desidera. Successivamente, essa viene posta a contatto con un solvente organico come metanolo, etanolo, n-propanolo, isopropanolo, n-butanolo, isobutanolo, metossi etanolo, acetone, metiletilchetone, metilformiato, etilformiato, metilacetato, etilacetato, butilacetato e diossano. Come risultato, si può ottenere un precipitato di un sale formato tra SAM e un acido inorganico oppure organico.

Come alternativa, senza porre a contatto la soluzione di SAM con un solvente organico, si può ottenere una polvere di un sale tra SAM e un acido inorganico oppure organico allontanando l'acido in eccesso dalla soluzione di SAM usando una resina scambiatrice di anioni (tipo  $\text{OH}^-$ ) oppure un alcali in grado di formare un sale insolubile in acqua mediante reazione con l'acido usato nella eluizione frazionata di SAM e, successivamente, evaporando il solvente a pressione ridotta dalla soluzione fino a secco.

La resina scambiatrice di ioni debolmente acida tipo  $\text{H}^+$  viene rigenerata in corrispondenza di uno stadio nel quale SAM è stato eluito da essa. Non è sempre necessario, pertanto, sottoporla a uno speciale trattamento di rigenerazione. Essa può venire usata ripetutamente soltanto dopo lavaggio con acqua. D'altro canto, l'adsorbente resina sintetica può venire rigenerato facilmente per esempio mediante lavaggio con una soluzione acquosa al 50% di metanolo e, quindi, mediante lavaggio con acqua.

Così, secondo la presente invenzione, si può ottenere con efficacia SAM avente un grado di purezza molto elevato effettuando operazioni semplici nelle quali si usano sostanze che sono facili da rigenerare.

Gli esempi che seguono illustrano più in partico-

lare la presente invenzione.

Esempio 1

Si è sottoposto a coltura Saccharomyces cerevisiae (IFO 2044) nel mezzo di coltura di F. Schlenk, et al. [(Journal of Biological Chemistry, Vol.229, pag.1037 (1957)] ottenendo così cellule microbiche aventi in esse accumulato il SAM. Si sono posti in sospensione 210 g delle cellule così ottenute in 1000 ml di acido perclorico 1,5N e si è estratto con sbattimento a temperatura ambiente per un'ora. Successivamente, i residui di cellule sono stati rimossi mediante separazione centrifuga. Si è aggiunto bicarbonato di potassio all'estratto per regolarne il pH a 5,0. Il precipitato così ottenuto di perclorato di potassio è stato separato filtrando mediante aspirazione e si sono ottenuti così 1080 ml di un estratto contenente 1,15 g di SAM.

Si è fatto passare l'estratto attraverso ad una colonna riempita con 200 ml di una resina scambiatrici-  
ce di cationi debolmente acida, Amberlite IRC-50 (tipo  $H^+$ ) (un Marchio di Fabbrica per un prodotto della ditta Rohm & Haas Co.) per adsorbire il SAM. Si è lavata la colonna con 400 ml di acido acetico 0,0001N e si è effettuata una eluizione frazionata con acido solforico 0,1N ottenendo così 630 ml di una soluzione

di SAM.

Si è regolata la soluzione di SAM così ottenuta a pH 4,5 con una resina scambiatrice di anioni debolmente basica, Amberlite IRA-45 (tipo  $\text{OH}^-$ ) (un Marchio di Fabbrica per un prodotto della ditta Rohm & Haas Co.) e quindi si è fatto passare attraverso ad una colonna riempita con 1,5 litri di Amberlite XAD-7 (un Marchio di Fabbrica per un adsorbente costituito da una resina sintetica tipo acrilato fabbricato dalla ditta Rohm & Haas Co.) allo scopo di adsorbire il SAM. Si è lavata la colonna con 2 litri di acido acetico 0,0001N e, quindi, si è eluito frazionatamente con acido solforico 0,1N ottenendo così 1440 ml di una soluzione di SAM.

Si è concentrata la soluzione di SAM a pressione ridotta fino a che il suo volume totale è diventato 200 ml. Successivamente, si sono aggiunti 800 ml di acetone ottenendo così un precipitato di solfato di SAM. Si è raccolto il precipitato mediante separazione centrifuga, lo si è sciolto in una piccola quantità di acqua e, quindi lo si è liofilizzato ottenendo così 1,74 g di solfato di SAM sotto forma di una polvere bianca. Questo prodotto ha mostrato una singola macchia nella cromatografia su carta e nella cromatografia in strato sottile su gel di silice.

La resa di isolamento di SAM e il suo grado di purezza sono indicati nella tabella 1.

### Esempio 2

Un estratto contenente 1,06 g di SAM, ottenuto in modo uguale a quello descritto nell'esempio 1, è stato fatto passare attraverso ad una colonna riempita con 200 ml di Amberlite IRC-84 (tipo H<sup>+</sup>) (un Marchio di fabbrica per una resina scambiatrice di cationi debolmente acida prodotta dalla Rohm & Haas Co.) allo scopo di adsorbire SAM. Si è lavata la colonna con 400 ml di acido cloridrico 0,0001N e, quindi, si è effettuata una eluizione frazionata con acido cloridrico ottenendo così 640 ml di una soluzione di SAM.

Si è regolata la soluzione di SAM a pH 4,8 con Amberlite IRA-45 (tipo OH<sup>-</sup>), una resina scambiatrice di anioni debolmente basica e, quindi, si è fatto passare attraverso a una colonna riempita con 1,5 litri di Amberlite XAD-7 (un Marchio di Fabbrica per un adsorbente di resina sintetica prodotto dalla ditta Tohm & Haas Co.) per adsorbire SAM. Si è lavata la colonna con 2 litri di acido acetico 0,0001N e, quindi, si è effettuata una eluizione frazionata facendo passare un solvente misto costituito da acido cloridrico 0,1N e da acetone (in un rapporto in volu-

me di 1:0,1) in modo da ottenere 1120 ml di soluzione di SAM.

Si è concentrata la soluzione di SAM a pressione ridotta fino a che il suo volume totale è diventato 200 ml e, quindi, si è aggiunta Amberlite IRA-45 (tipo  $\text{OH}^-$ ), una resina scambiatrice di anioni debolmente basica, per regolare il pH della soluzione ad 1,0. Si è separata la resina filtrando mediante aspirazione e si è concentrato il filtrato a pressione ridotta. Si è liofilizzato il concentrato ottenendo così 1,19 g di cloridrato di SAM sotto forma di una polvere bianca. Questa sostanza presentava una singola macchia nella cromatografia su carta e nella cromatografia in strato sottile su gel di silice.

La resa di ricupero di SAM e il suo grado di purezza sono indicati nella tabella 1.

### Esempio 3

Si è fatto passare un estratto contenente 0,98 g di SAM, ottenuto in modo uguale a quello descritto nell'esempio 1, attraverso ad una colonna riempita con 200 ml di Amberlite XAD-2 (un Marchio di Fabbrica per un adsorbente tipo stirene-divinilbenzene prodotto dalla ditta Rohm & Haas Co.) per adsorbire sostanze estranee. Si è aggiunto bicarbonato di potassio alla soluzione di SAM dalla quale erano state allontanate

le sostanze estranee come indicato sopra, allo scopo di regolare il pH a 5,0. Si è separato il precipitato così ottenuto di perclorato di potassio filtrandolo mediante aspirazione.

Quindi, si è fatta passare la soluzione di SAM attraverso ad una colonna riempita con 200 ml di Amberlite RC-50 (tipo H<sup>+</sup>) una resina scambiatrice di cationi debolmente acida, per adsorbire SAM. Si è lavata la colonna con 400 ml di acido acetico 0,0001N e si è effettuata una eluizione frazionata con acido solforico 0,1N ottenendo così 630 ml di una soluzione di SAM.

Si è concentrata la soluzione di SAM così ottenuta a pressione ridotta fino a che il suo volume totale è diventato 200 ml e, quindi, si sono aggiunti 800 ml di acetone ottenendo così un precipitato di solfato di SAM. Si è raccolto il precipitato separandolo mediante centrifugazione, lo si è sciolto in una piccola quantità di acqua e lo si è liofilizzato ottenendo così 1,50 g di solfato di SAM sotto forma di una polvere bianca. Questo prodotto presentava una singola macchia nella cromatografia su carta e nella cromatografia in strato sottile su gel di silice.

La resina di ricupero di SAM e il suo grado di purezza sono indicati nella tabella 1.

Esempio 4

Si sono prodotte cellule microbiche aventi SAM accumulato adottando un metodo uguale a quello descritto nell'esempio 1. Si sono posti in sospensione 200 g delle cellule microbiche in 1000 ml di acido formico 0,1N. Si è riscaldata la sospensione a 60°C per 10 minuti e quindi la si è immediatamente raffreddata. Si sono separate le cellule mediante separazione centrifuga ottenendo così 1020 ml di un estratto contenenti 0,91 g di SAM.

Si è fatto passare l'estratto attraverso ad una colonna riempita con 200 ml di Amberlite XAD-8 (un Marchio di Fabbrica per un adsorbente costituito da un acrilato prodotto dalla Rohm & Haas Co.) per adsorbire sostanze estranee.

La soluzione di SAM dalla quale le sostanze estranee erano state allontanate come indicato sopra è stata regolata a pH 5,0 con Amberlite IRA-45 (tipo OH<sup>-</sup>), una resina scambiatrice di anioni debolmente basica, e, quindi, è stata fatta passare attraverso ad una colonna riempita con 200 ml di Amberlite IRC-84 (tipo H<sup>+</sup>), una resina scambiatrice di cationi debolmente acida, per adsorbire SAM. Si è lavata la colonna con 400 ml di acido cloridrico 0,0001N e, quindi, si è effettuata una eluizione frazionata con acido clori-

drico 0,2N ottenendo così 710 ml di una soluzione di SAM.

Si è aggiunta amberlite IRA-45 (tipo  $\text{OH}^-$ ), una resina scambiatrice di anioni debolmente basica, alla soluzione di SAM per regolare il pH ad 1,0. Si è separata la resina filtrando mediante aspirazione, si è concentrato il filtrato a pressione ridotta e si è liofilizzato ottenendo così 1,01 g di cloridrato di SAM sotto forma di una polvere bianca. Questo prodotto ha presentato una singola macchia nella cromatografia su carta e nella cromatografia in strato sottile su gel di silice.

La resa di isolamento di SAM e il suo grado di purezza sono indicati nella tabella 1.

#### Esempio 5

630 ml di una soluzione di SAM, che è stata ottenuta mediante trattamento con un adsorbente stirene/divinilbenzene e con la resina scambiatrice di cationi debolmente acida tipo  $\text{H}^+$  in modo uguale a quello descritto nell'esempio 3, sono stati fatti passare attraverso ad una colonna riempita con 200 ml di un adsorbente tipo acrilato Amberlite XAD-7 per adsorbire sostanze estranee.

La soluzione di SAM dalla quale le sostanze estranee erano state allontanate come indicato sopra

è stata concentrata a pressione ridotta fino a che il suo volume totale è diventato 200 ml. Quindi, si sono aggiunti 800 ml di acetone ottenendo così un precipitato di solfato di SAM. Si è raccolto il precipitato mediante separazione centrifuga, lo si è sciolto in una piccola quantità di acqua e lo si è liofilizzato ottenendo così 1,46 g di solfato di SAM sotto forma di una polvere bianca. Questo prodotto ha presentato una singola macchia nella cromatografia su carta e nella cromatografia in strato sottile su gel di silice.

La resa di ricupero di SAM e il suo grado di purezza sono indicati nella tabella 1.

#### Esempio di confronto 1

950 g di un estratto contenenti 0,98 g di SAM, ottenuto in modo uguale a quello descritto nell'esempio 1, sono stati regolati a pH 5,0 con bicarbonato di potassio. Il precipitato ottenuto è stato perclorato di potassio/separato filtrando mediante aspirazione e si è ottenuto così un liquido contenente SAM.

Si è fatto passare il liquido contenente SAM attraverso ad una colonna riempita con 200 ml di Amberlite IRC-50 (tipo  $H^+$ ), una resina scambiatrice di cationi debolmente acida per adsorbire SAM. Si è

lavata la colonna con 400 ml di acido acetico 0,0001N e, quindi, si è effettuata una eluizione frazionata con solfato 0,1N ottenendo così 610 ml di una soluzione di SAM.

Si è fatta passare la soluzione di SAM attraverso ad una colonna riempita con 200 ml di carbone attivato per uso cromatografico. Si è lavata la colonna con 600 ml di acido solforico 0,2N e, quindi, si è effettuata una eluizione frazionata con un solvente misto costituito da acido solforico 1,0N e metanolo (1:1 in volume) ottenendo così una soluzione di SAM.

Si è concentrata la soluzione di SAM a pressione ridotta fino a che il suo volume totale è diventato 200 ml. Si è aggiunto acetone (800 ml) ottenendo così un precipitato di solfato di SAM. Si è raccolto il precipitato mediante separazione centrifuga, lo si è sciolto in una piccola quantità di acqua e lo si è liofilizzato ottenendo così 1,28 g di solfato di SAM sotto forma di una polvere bianca. Questo prodotto presentava una singola macchia nella cromatografia su carta e nella cromatografia in strato sottile su gel di silice.

La resa di ricupero di SAM e il suo grado di purezza sono indicati nella tabella 1.

Esempio di confronto 2

Si è ripetuto l'esempio 1 tranne che si è effettuato soltanto il trattamento con Amberlite IRC-50 (tipo H<sup>+</sup>) come trattamento di purificazione.

I risultati sono indicati nella tabella 1.

Tabella 1

	Grado di purezza di SAM (%) (*1)	Reazione della nindrina con sostanze diverse da SAM (*2)	Quantità di metiltioadenosina (%) (*3)	Resa di ricupero di SAM (%)
Es.1	98.1	- /	0.08	89
Es.2	98.0	-	0.1	90
Es.3	98.0	-	0.1	90
Es.4	98.1	-	0.08	90
Es.5	98.5	-	inferiore a 0,05	88
CEs.1	97.6	-	0.4	77
CEs.2	56.7	++	1.8	90

Es. indica esempio e CEs. indica esempio di confronto.

(\*1): Si è misurato il grado di purezza di SAM mediante cromatografia su carta bidimensionale.

(\*2): Si è determinata la reazione della nindrina con sostanze diverse da SAM nel modo seguente:

Si è sviluppato un campione mediante cromatografia in strato sottile su cellulosa bidimensionale e si è misurata e stabilita la presenza di macchie diverse da una macchia di SAM che erano state rive-

late mediante formazione di colore con ninidrina secondo il seguente metodo a tre graduazioni:

-: Nessuna

+: Lievemente presente

++: Notevolmente presente

(\*3): Si è misurata la quantità di metiltioadenosina mediante cromatografia su carta bidimensionale.

I risultati di cui sopra indicano chiaramente che, mediante il procedimento della presente invenzione, si può ottenere SAM avente un grado di purezza più elevato, con una resa di ricupero più elevata rispetto ai metodi noti.

#### RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per purificare la S-adenosil-L-metionina che consiste nell'introdurre un liquido contenente S-adenosil-L-metionina grezza in un processo di purificazione, detto processo di purificazione essendo un processo di purificazione in serie che consiste, in una qualsiasi sequenza desiderata, di (A) almeno una fase di trattamento di detto liquido con una resina scambiatrice di cationi debolmente acida tipo- $H^+$  e (B) almeno una fase di trattamento di detto liquido con un adsorbente costituito da una resina sintetica porosa.

2. Procedimento come rivendicato nella rivendica-

zione 1 in cui la fase (A) consiste nel porre a contatto il liquido contenente S-adenosil-L-metionina grezza e avente un pH di 3,5-6,5 con detta resina scambiatrice di cationi per adsorbire la S-adenosil-L-metionina nel liquido sulla resina e, successivamente, eluire frazionatamente la S-adenosil-L-metionina da detta resina scambiatrice di cationi usando una soluzione acquosa di un acido avente un pH non superiore a 3,0.

3. Procedimento di cui alla rivendicazione 1 nel quale la fase (B) consiste nel porre a contatto il liquido contenente S-adenosil-L-metionina grezza e avente un pH non superiore a 6,5 con detto adsorbente di resina sintetica facendo così adsorbire sostanze estranee nel liquido sull'adsorbente.

4. Procedimento di cui alla rivendicazione 1 nel quale la fase (B) consiste nel porre a contatto il liquido contenente S-adenosil-L-metionina grezza e avente un pH non superiore a 6,5 con l'adsorbente costituito da una resina sintetica in modo da adsorbire sia la S-adenosil-L-metionina che le sostanze estranee nel liquido sull'adsorbente e, successivamente, eluire frazionatamente la S-adenosil-L-metionina dall'adsorbente costituito da una resina sintetica usando una soluzione acquosa di un acido avente un pH non supe-

riore a 3,5.

5. Procedimento di cui alla rivendicazione 1 nel quale il processo di purificazione consiste nella fase (A) e nella fase (B) in questa sequenza.

6. Procedimento di cui alla rivendicazione 1 nel quale il processo di purificazione è costituito dalla fase (A), dalla fase (B) e dalla fase (A) in questa sequenza.

7. Procedimento di cui alla rivendicazione 1 in cui il processo di purificazione è costituito dalla fase (B) e dalla fase (A) in questa sequenza.

8. Procedimento di cui alla rivendicazione 1 nel quale il processo di purificazione è costituito dalla fase (B), dalla fase (A) e dalla fase (B) in questa sequenza.

9. Procedimento come rivendicato nella rivendicazione 7 nel quale la fase (B) consiste nel porre a contatto il liquido contenente S-adenosil-L-metionina grezza e avente un pH non superiore a 6,5 con lo adsorbente di resina sintetica adsorbendo così soltanto sostanze estranee nel liquido sull'adsorbente.

10. Procedimento di cui alla rivendicazione 8 nel quale la prima fase (B) consiste nel porre a contatto il liquido contenente S-adenosil-L-metionina grezza e avente un pH non superiore a 6,5 con l'adsorbente

costituito da una resina sintetica in modo da adsorbire così soltanto sostanze estranee presenti nel liquido sull'adsorbente.

3 MANDATARI:

(firma)

*[Handwritten signature]*  
(per sé e per gli altri)

