

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 406 412**

51 Int. Cl.:

C12N 1/18 (2006.01)

C12N 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2005** **E 05425413 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013** **EP 1731596**

54 Título: **Células de *Saccharomyces cerevisiae* secas, liofilizadas y/o microencapsuladas con un alto contenido de (S)-(+)-S-adenosil-metionina**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.06.2013

73 Titular/es:

GNOSIS S.P.A. (100.0%)
Piazza del Carmine 4
20121 Milano , IT

72 Inventor/es:

BENEDETTI, ALBERTO y
SIVIERI, LINO

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 406 412 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Células de *Saccharomyces cerevisiae* secas, liofilizadas y/o microencapsuladas con un alto contenido de (S)-(+)-S-adenosil-L-metionina

Esta invención se relaciona con las células de *Saccharomyces cerevisiae* secas, liofilizadas y/o microencapsuladas con un alto contenido de (S)-(+)-S-adenosil-L-metionina, un proceso para su preparación, y composiciones que contienen dichas células.

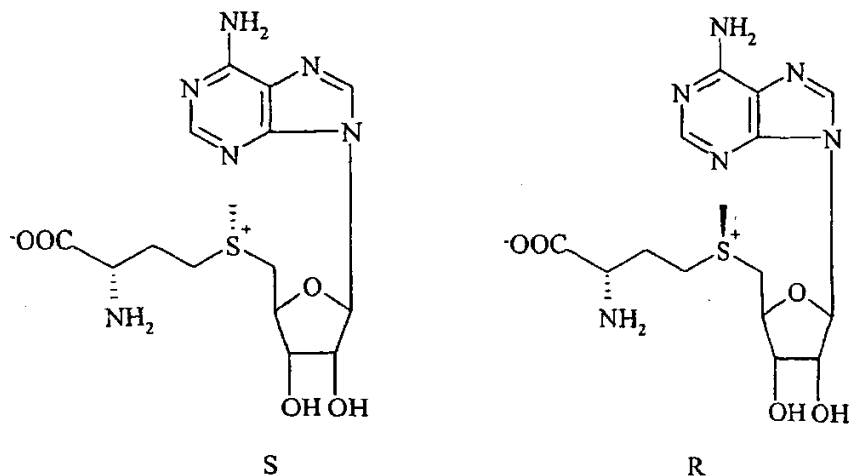
Particularmente, la invención se relaciona con las células de *Saccharomyces cerevisiae* en donde el diastereoisómero, de base libre, (R)-(+)-S-adenosil-L-metionina (de aquí en adelante llamado (R)-(+)-SAME) está en una cantidad inferior que o igual a 10% del diastereoisómero, de base libre, (S)-(+)-S-adenosil-L-metionina (de aquí en adelante llamado (S)-(+)-SAME).

ANTECEDENTES DE LA INVENCÓN

Se conoce que el ión (S)-(+)-SAME es muy inestable y por consiguiente se degrada rápidamente si se extrae de las células productoras. De hecho, muchos años pasaron entre el descubrimiento de SAME (Cantoni y otros "Phosphorous metabolism", Baltimore 1952 2, 129; Cantoni y otros J. Biol. Chem, 1953, 204, 403) y su comercialización. El problema de la estabilidad se resolvió inicialmente por salificación, particularmente en forma de sulfatos. Sin embargo, las sales de sulfato de SAME algunas veces causan efectos secundarios, especialmente en la mucosa gástrica, debido a su acidez inherente.

Se conoce que (R, S) SAME es un dador fisiológico de grupos metilo involucrados en reacciones enzimáticas de transmetilación, la cual está presente en todos los organismos vivos y tiene efectos terapéuticos en trastornos crónicos del hígado, adiposis, lipemia y aterosclerosis.

Se conoce además que (J.W. Cornforth, J.A.C.S., 1977, 99, 7292-7300; Stoloritz y otros, J.A.C.S., 1981, 103, 6015-6019) que los productos que contienen (R, S) SAME consisten de una mezcla de dos diastereoisómeros: (R)-(+)-SAME y (S)-(+)-SAME, que tiene la siguiente estructura molecular:



Se demostró además (De La Haba y otros, J.A.C.S. 1959, 81, 3975-3980) que solamente uno de los dos diastereoisómeros, es decir, (S)-(+)-SAME, es enzimáticamente activo por transmetilación y racemización espontánea, y por lo tanto genera la formación del diastereoisómero inactivo (R)-(+)-SAME que representa aprox. 20% (Wu y otros, Biochemistry 1983, 22, 2828-2832).

Se observó que en todos los productos disponibles en el mercado que contienen SAME, el diastereoisómero inactivo (R)-(+)-SAME está presente en una cantidad de al menos 20%; se observó además que dichos porcentajes aumentan con el tiempo hasta 40% y más debido a la racemización espontánea.

Las células tienen un contenido natural de (S)-(+)-SAME igual a aprox. 100%, pero la metodología de extracción y

purificación industrial produce un producto parcialmente degradado, y por lo tanto una mezcla de $\geq 20\%$ (R)-(+)-SAmE y $\leq 80\%$ (S)-(+)-SAmE

5 Estos factores confirman claramente que la mezcla de diastereoisómeros es inestable con el tiempo, y esto se conocía ya con relación al producto en solución (G.L. Creason y otros, *Phytochemistry*, vol. 24, N. 6, 1151-1155, 1985; H.C. Uzar, *Liebigs Ann. Chem.* 1989, 607-610).

10 Se observó además que (R, S) SAmE, y sus formas salificadas aprobadas para uso farmacéutico, presentan problemas de inestabilidad, adicionalmente a la complejidad de los procesos de preparación y purificación.

15 Los procesos de purificación conocidos involucran el uso de resinas de ácido fuerte (JP 13680/1971), resinas quelantes (JP 20998/1978) o reactivos especiales costosos, tales como ácido pícrico o picolínico (US 3707536 y US 3954726); sin embargo, ellos conducen a la racemización parcial del azufre de SAmE y por lo tanto a la producción de los productos finales que contienen el diastereoisómero inactivo en una cantidad que excede 20%.

20 Sin embargo, los procesos de purificación que involucran el uso de resinas de ácido débil (JP 14299/1981, FR-A-2531714, EP-A-0141914) solamente permiten la separación parcial del diastereoisómero activo a ser obtenido, y por lo tanto un grado de pureza insuficiente para los propósitos farmacéuticos.

25 Aunque el desempeño de alguno de dichos procesos permite obtener una pureza mayor, racemización parcial implica, en cualquier caso, que al menos 20% del diastereoisómero activo esté presente; además, en algunos casos (FR 2531714), se usa bicarbonato potásico para extraer el producto de las células, con la consecuente precipitación del porclorato potásico, que causa dificultad con la separación y posterior eliminación del producto. En EP-A-0141914, la lisis de las células de levadura que contienen SAmE se realiza en presencia de un solvente orgánico (tal como acetato de etilo, acetona, etc.), además usando columnas cromatográficas que requieren el uso de resinas con un tamaño de partícula de 100-200 mesh, que involucran las inversiones pesadas y costes de mantenimiento para la regeneración y lavado.

30 El uso de solventes para extraer el SAmE necesariamente involucra el uso de plantas resistentes al fuego, recuperación de solvente y sistemas de destilación, así como la separación y secado necesario de la biomasa agotada, para prevenir que se elimine junto con el solvente residual. Todos estos factores involucran claramente un aumento en el gasto y coste de las operaciones.

35 Existe por tanto una necesidad de derivados o formas de dosificación de SAmE en donde el porcentaje del diastereoisómero activo (S)-(+)-SAmE es claramente mayor que el isómero inactivo (R)-(+)-SAmE, y en donde dicho porcentaje es estable en el tiempo.

Morana y otros, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, vol. 1573 (2), 105-108, describen el uso de trehalosa como agente estabilizante de SAmE dentro de las células de *S. cerevisiae*.

40 US 4 562 149 y WO 2004/005450 describen la preparación de SAmE por fermentación de cepas de *S. cerevisiae* de alta productividad.

45 US 3 962 034 describe que las células de levadura usadas en la producción de SAmE pueden ser usadas como aditivos de la alimentación.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

50 Se descubrió ahora que la base libre de SAmE es estable dentro de la célula productora. La protección proporcionada por la pared de la célula intacta de la levadura promueve además mayor estabilidad con el tiempo a temperatura ambiente.

Esta invención por lo tanto se relaciona con células de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* GNL 24/497 secas o microencapsuladas, que se depositaron en la colección DBVPG para los propósitos de la patente de acuerdo con el Tratado de Budapest de fecha 27 de abril de 2005, bajo el número de acceso DBVPG 8P, con un contenido de (S) - (+)-5-adenosil-L-metronina de 7%-20% p/peso seco caracterizado además porque (R)- (+)-S-adenosil-L- metionina está en una cantidad inferior que o igual a 10% de (S)-(+)-S-adenosil-L-metionina.

Las células de acuerdo con la invención pueden administrarse como tal en formas farmacéuticas adecuadas, especialmente cápsulas, tabletas, tabletas gastro-resistentes y similares.

ES 2 406 412 T3

La productividad SAME de la cepa GNL24/497, es 2,0%-6,0% p/peso seco, más específicamente 3%-4% p/p seco, al final de la fermentación, y 7%-20% p/p seco, y más específicamente 10%-16% p/p seco, al final de la etapa de enriquecimiento.

5 La levadura *Saccharomyces cerevisiae* GNL24/497 se clasificó como tal por la Universidad de Perugia "DBVPG Colección de Levaduras Industriales" sobre la base de sus características morfofisiológicas y por la técnica de reasociación de ADN-ADN.

10 La levadura se cultiva a nivel industrial de acuerdo con técnicas y condiciones conocidas, y se usada para preparar biomasa de panificación en donde DL metionina en la cantidad de 0,5%-4,0% p/v, más específicamente 1,0%-3,0% p/v, se añade al medio de cultivo ordinario basado en las melazas (F. Schlenk y R.E. De Palma, J. Biol. Chem. 1957 229, 1051; F. Schlenk, J.L. Dainko y S.M. Stanford, Archives of Biochemistry and Biophysics 1959, 83, 28-34).

15 La biomasa se recoge por centrifugación, se lava, se resuspende y se somete a un proceso de activación en un medio (de aquí en adelante llamado "el medio de activación") que contiene fosfato de potasio; sulfato de amonio; citrato sódico; sales de magnesio, manganeso, cinc y calcio; glucosa y L-metionina r DL-metionina (F. Schlenk y R.E. De Palma, J. Biol. Chem, 1957, 229, 1051F. Schlenk y otros, Enzymologia 29, 283, 1965).

20 El proceso de activación puede repetirse 2-5 veces, más específicamente 2-3 veces, bajo condiciones estériles o no estériles; a presión atmosférica o bajo ligera presión; a un pH controlado o pH libre; con aireación de 0,1-1,5 v/v/m, o más específicamente 0,2-1,0 v/v/m; a una temperatura de 25°C-35°C, o más específicamente 28°C-32°C; por 6-24 h, o más específicamente 8-18 h.

25 La concentración de biomasa en el medio de activación puede estar en el intervalo de 2,5% a 18% peso seco/volumen, y más específicamente de 5%-15% peso seco/volumen. Después del enriquecimiento, la biomasa se recoge por centrifugación o microfiltración, se lava varias veces con agua estéril o tampón fosfato pH 5,2 ($\pm 0,2$), y después se seca, microgranula o liofiliza de acuerdo con técnicas convencionales.

De acuerdo con un aspecto preferido, la microgranulación puede realizarse por un proceso que comprende:

- 30 a) centrifugación o microfiltración de células de levadura del caldo de cultivo;
b) lavar con agua las células de levadura y resuspensión en agua estéril;
c) posiblemente, la adición a la suspensión obtenida en b) de bentonita, caolín, sílice, microcelulosa, sodio lecitinado, y/o aceites animal o vegetal natural o hidrogenado;
35 d) secado a baja presión de la mezcla obtenida en c) a una temperatura de entre 20°C y 40°C para un contenido de H₂O de entre 0,5 y 5%;
e) adición de excipiente a la sustancia seca y compresión directa de la mezcla;
f) granulación de las tabletas obtenidas en e);
g) revestimiento de los gránulos obtenido en f) con cera fundida.

40 Este proceso forma el tema de la solicitud de patente europea núm. EP05425084.0 de 18.2.2005, presentada por el solicitante.

45 La biomasa de levadura seca, microgranulada o liofilizada se usa para preparar tabletas con un peso de entre 1,0 y 2,5 g, y más específicamente 1,3-1,8 g, con un contenido del constituyente activo (S)-(+)-SAME de entre 100 y 400 mg, y más específicamente entre 150 y 300 mg. Las tabletas pueden prepararse de acuerdo con técnicas conocidas usando levadura seca con un alto contenido de (S)-(+)-SAME o por adición de los excipientes tales como celulosa microcristalina, sílice, behenato de glicerina, estearato magnésico (o similares). Las tabletas así obtenidas pueden recubrirse además con excipientes como BIOGAPRESS® VEGETAL, Labrafac® CC, EUDRAGIT L30D-55, dióxido de titanio, talco, dióxido de silicio coloidal, citrato de trietilo, FD & C amarillo 5, o similares, para normalizar la resistencia gástrica.

50 La invención se ilustra en mayor detalle en los ejemplos más abajo.

Ejemplo 1

55 La levadura *Saccharomyces cerevisiae* GNL-24/497 (DBVPG 8 P) se cultiva en un medio industrial basado en melazas usadas para levadura de panificación, a la que se añadieron 30 g/l de DL-metionina, por 24 h a 28°C. La biomasa se recoge por centrifugación y se lavó dos veces con agua del grifo: se obtienen cremas con 20% \pm 2 g/peso seco/vol. y un contenido de SAME total de 3% ($\pm 0,5\%$) p/p seco. En un fermentador de 10-litros un medio se prepara conteniendo:

ES 2 406 412 T3

5 glucosa 82 g/l, DL-metionina 12 g/l, Na₂NO₃ 10 g/l, KH₂ PO₄ 3,5 g/l, KOH 0,385 g/l, (NH₄)₂ SO₄ 7,0 g/l, MgSO₄ 0,5 g/l, antiespuma 0,03 g/l. El medio se calienta hasta 28°C, y las cremas se añaden hasta que se obtiene una concentración de 100 g/l peso seco. Condiciones de activación: agitación 200 rpm, aire 0,25 v/v/min. Al final del consumo de glucosa, después de aprox. 12 h, las células se recogen por centrifugación, recuperando 100-102 g/l peso seco de biomasa que contiene 11,5% de SAME total, de los cuales 4,5% es el isómero (R)-(+)-SAME y 95,5% es el isómero (S)-(+)-SAME.

La biomasa se secó a 28°C hasta un contenido de H₂O ≤ 0,5% p/p.

10 El análisis confirmó que el contenido del isómero (R)-(+)-SAME fue inferior que 5%, y que el isómero (S)-(+)-SAME excedió 95%.

Ejemplo 2

15 Como para el ejemplo 1, pero la biomasa se activa dos veces. 14,2% p/p seco del SAME total se obtiene, de los cuales 4,3% p/p es el isómero (R)-(+)-SAME y 95,7% es el isómero (S)-(+)-SAME.

Ejemplo 3

20 **[0036]** Como para los ejemplos 1 y 2, pero la biomasa se somete a un tercer proceso de enriquecimiento, produciendo 15,1% p/p seco del SAME total, de los cuales 4,4% es el isómero (R)-(+)-SAME y 95,6% p/peso seco de (S)-(+)-SAME.

Ejemplo 4

25 Como para los ejemplos 1-3, en donde la biomasa final es liofilizada en vez de secada.

Ejemplo 5

30 Como para los ejemplos 1-4, en donde la biomasa seca o liofilizada es microencapsulada como se describió en la solicitud de patente EP 0542508300 del 18 de febrero de 2005.

Ejemplo 6

35 La levadura *Saccharomyces cerevisiae* GNL-24/497-(DBVPG 8P) se preparó y se secó como se describe en ejemplo 1.

La biomasa seca se sometió a un programa de estabilidad a temperatura ambiente (T= 25±2°C y RH= 60±5%).

Para los propósitos del análisis, las células se lisaron mecánicamente a +4°C.

40 La tabla más abajo muestra los resultados obtenidos:

MUESTRA	Tiempo en días	KF %	% CONTENIDO DE (S)-(+)-SAME	% CONTENIDO DE (R)-(+)-SAME
	0	0,40 (±0,05)	94,50 (±0,1)	5,50 (±0,1)
	15	0,40 (±0,05)	94,10 (±0,1)	5,90 (±0,1)
	45	0,40 (±0,05)	94,10 (±0,1)	5,90 (±0,1)
	75	0,40 (±0,05)	94,00 (±0,1)	6,00 (±0,1)
	100	0,40 (±0,05)	94,10 (±0,1)	5,90 (±0,1)
	120	0,42 (±0,05)	93,80 (±0,1)	6,20 (±0,1)
	150	0,42 (±0,05)	94,00 (±0,1)	6,00 (±0,1)
	180	0,46 (±0,05)	93,90 (±0,1)	6,10 (±0,1)

Ejemplo 7

Las tabletas que tiene la siguiente composición se prepararon con la biomasa seca o liofilizada, como se indica en los ejemplos 1, 2, 3, 4, de acuerdo con técnicas conocidas:

5

CONSTITUYENTES	Función	Cantidad
Células secas o liofilizadas	Constituyente activo \geq 200 mg	1350 mg
	Excipientes: núcleo	
Celulosa microcristalina	Aglutinante	86,00 mg
Dióxido de silicio coloidal	Absorbente	7,00 mg
Behenato de glicerina	Lubricante	20,00 mg
Estearato de magnesio	Agente anti-adherente	7,00 mg
Peso total		1470 mg

Ejemplo 8

Las tabletas que tiene la siguiente composición se prepararon con la biomasa seca o liofilizada, como se indica en los ejemplos 1, 2, 3, 4, de acuerdo con técnicas conocidas:

10

COMPOSICIÓN POR TABLETA

CONSTITUYENTES	FUNCIÓN	CANTIDAD
Células secas o liofilizadas	Constituyente activo \geq 200 mg	1350 mg
	Excipientes: núcleo	
Celulosa microcristalina	Aglutinante	86,00 mg
Dióxido de silicio coloidal	Absorbente	7,00 mg
behenato de glicerina	Lubricante	20,00 mg
Estearato de magnesio	Agente anti-adherente	7,00 mg
	Excipientes (centrifugado)	
Biogapress ® vegetal	Protector	11,20 mg
(glicerilo glicerina palmitost.)	Protector	11,20 mg
Labrafac ® CC *	Agente de revestimiento	43,20 mg
Eudragit L30D-55 **	Opacante	7,20 mg
Dióxido de titanio	Agente anti-adherente	14,25 mg
Talco	Desecante	1,00 mg
Dióxido de silicio coloidal (Aerosol 200)	Plastificante	11,55 mg
Citrato de trietilo tartrazina amarilla	Colorante	0,08 mg
Peso total		1569,68 mg

- * LABRAFAC (cadena triglicéridos)
- ** EUDRAGIT (copolímero de ácido metacrílico)

	Excipientes (centrifugado)	
● *** FD (tartrazina)		

Ejemplo 9

- 5 Las tabletas referidas en el ejemplo 8 se sometieron a la prueba de gastroresistencia de acuerdo con la Pharmacopoeia Europea, usando el aparato desintegrator PHARMATEST PTL-5. Después de 1 hora las tabletas estaban totalmente intactas.

REIVINDICACIONES

1. Composiciones farmacéuticas que contienen:
- 5 a) células de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* secas y/o microencapsuladas depositadas en la colección DBVPG bajo el número DBVPG 8 P que tiene un contenido de (S)-(+)-S-adenosil-L-metionina de 7%-20% p/p seco en donde (R)-(+)-S-adenosil-L-metionina está en una cantidad inferior que o igual a 10% de (S)-(+)-S-adenosil-L-metionina, dicha (S)-(+)-S-adenosil-L-metionina está en forma de una base libre, y,
- 10 b) excipientes adecuados, en forma seca o en forma microencapsulada.
2. Composiciones como las reivindicadas en la reivindicación 1, en forma de tabletas, gastro-resistentes tabletas y cápsulas.
- 15 3. Composiciones como las reivindicadas en la reivindicación 1 o 2, con un contenido del constituyente activo de (S)-(+)-S-adenosil-L-metionina de entre 100 y 400 mg.
- 20 4. Células de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* secas y/o microencapsuladas depositadas en la colección DBVPG bajo el número DBVPG 8 P que tiene un contenido de (S)-(+)-S-adenosil-L-metionina de 7%-20% p/p seco en donde (R)-(+)-S-adenosil-L-metionina está en una cantidad inferior que o igual a 10% de (S)-(+)-S-adenosil-L-metionina, dicha (S)-(+)-S-adenosil-L-metionina está en forma de una base libre como forma de dosificación para la administración oral de (S)-(+)-S-adenosil-L-metionina.