



P A T E N T E  
D E  
I N V E N C I O N

por "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE SALES DOBLES DE LA  
S-ADENOSIL-L-METIONINA", a favor de la firma italiana  
ERREKAPPA EUROTERRAPICI S.a.s., residente en MILANO (Italia)  
Via Marconi 37.

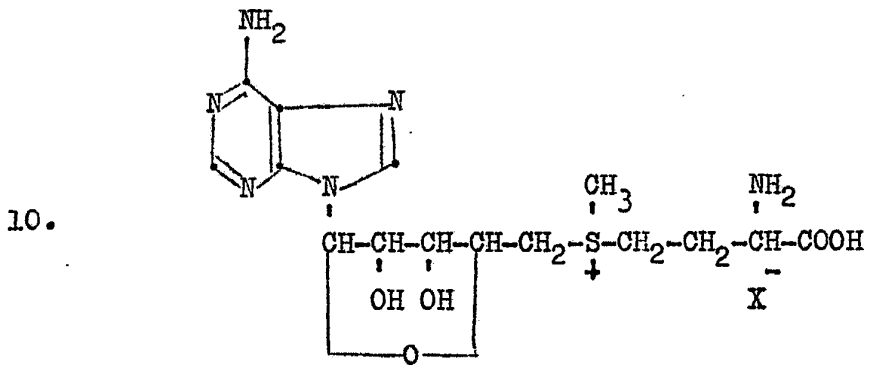
MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento se refiere a nuevas sales enzimáticas,  
al procedimiento para su preparación y a las composiciones  
terapéuticas que las contienen. Más concretamente, este inven-  
to se refiere a nuevas sales extremadamente estables de

5. S-adenosil-L-metionina (SAM), a un procedimiento que hace  
posible su preparación de forma sencilla y económica a esca-  
la industrial y a las composiciones farmacéuticas que las con-  
tienen como principio activo, para utilizarse en numerosos  
campos de la terapéutica humana.
10. El SAM es un producto de origen natural, que se



encuentra en todos los organismos vivientes desde las bacterias a las plantas y desde los organismos monocelulares a los mamíferos superiores incluyendo el hombre, cuya estructura se conoce desde hace algún tiempo y viene identificada por la fórmula siguiente:



en la que

X es un anión genérico.

15. En los organismos vivos el SAM se forma por la intervención de enzimas (S-adenosilmetioninsintetasis o S-adenosiltransferasis) en el ámbito citoplasmático a partir de metionina asociada con los nutrimentos o a partir del ATP presente como reserva de energía en cada célula viviente.

20. Se sabe también, desde hace cierto tiempo que el SAM es un producto de importancia fundamental en un gran número de reacciones biológicas de transmetilación enzimática, por cuyo motivo siempre se ha considerado un reactivo muy importante en bioquímica.

25. Sin embargo, el mayor problema con esta substancia ha surgido siempre por su extrema inestabilidad a la temperatura ambiente o a temperaturas superiores a ésta, y por métodos de producción laboriosos y no fáciles de realizar



en escala industrial.

En los últimos años la investigación dirigida hacia la estabilización del SAM con el fin de hacer posible su utilización en el campo de la investigación biológica se ha proyectado hacia la preparación de sales que resulten estables en condiciones de temperatura y humedad normales.

5. Se ha llegado así a la preparación del cloruro y el sulfato de SAM que se utilizan únicamente como reactivos en bioquímica durante cortos períodos de tiempo debido a que, aún en estado seco, es limitada su estabilidad y sus procedimientos de preparación tan solo pueden utilizarse para la producción en pequeña cantidad, y, ciertamente, no pueden utilizarse para la producción a escala industrial.

10. Ahora se ha descubierto, de forma totalmente inesperada, nuevas sales de SAM que tienen estabilidad indefinida con el transcurso de tiempo y a la temperatura hasta 45°, que puede prepararse de forma industrial con rendimientos elevados y de forma económica y que, sorprendentemente ha demostrado poseer gran poder curativo en muchos campos de la terapéutica humana, frecuentemente sin relación entre sí.

15. Las nuevas sales objeto de este invento son sales dobles de SAM con ácido p-toluensulfónico y ácido sulfúrico, que tienen la fórmula  $SAM^+ \cdot HSO_4^- \cdot H_2SO_4 \cdot 2CH_3C_6H_4SO_3H$ , y respectivamente  $SAM^+ \cdot HSO_4^- \cdot H_2SO_4 \cdot CH_3C_6H_4SO_3H$ .

20. El elevado grado de progreso técnico puede apreciarse en la tabla que sigue, la cual compara la estabilidad con el tiempo, a 45°C, en estado seco, de dos de las sales más estables de SAM hasta ahora conocidas, o sea el cloruro y el sulfato, y el nuevo disulfato-di paratoluensulfonato.



Las cifras hacen referencia al porcentaje de residuo de SAM después del tiempo indicado:

TABLA 1

	Anión	30 d	60 d	120 d	180 d
5.	Cloruro	20	-	-	-
	Sulfato	50	5	-	-
	Di-sulfato- -di-p-to- luensulfo- nato	100,1	99,9	100,2	100,4

10. Los índices de estabilidad obtenidos con el disulfato mono-paratoluensulfonato son equivalentes por completo a los que se indican para el disulfato di-paratoluensulfonato.

15. El procedimiento para la preparación de las nuevas sales según el invento comprende en esencia las fases siguientes:

- a) preparación de una solución rica en SAM, ya sea por extracción de sustancias naturales que la contienen, ya sea por síntesis enzimática a partir de adenosin-trifosfato (ATP) y metionina;
20. b) precipitación de la SAM existente en la solución acuosa filtrada, mediante solución acuosa saturada de ácido picrolónico o mediante soluciones del mismo ácido en disolventes orgánicos solubles en agua (como los alcoholes metílico, etílico, propílico, isopropílico, n-butílico e isobutílico; acetona, metiletilcetona, metilisobutilcetona, acetato de etilo, tetrahidrofurano, 2-metoxihexanol, 2-etoxihexanol, dioxano y dimetilformamida);
- 25.



- 5. c) disolución del precipitado filtrado, en una mezcla constituida por partes iguales (en volumen) de un disolvente parcialmente miscible con el agua (como la metiletilcetona, la metilisobutilcetona, el n-butanol o el isobutanol) y de una solución, de la misma normalidad, de ácido p-toluensulfónico y ácido sulfúrico;
- 10. d) separación del estrato orgánico y adición a la solución acuosa de un disolvente orgánico cetónico o alcohólico completamente soluble en agua;
- e) redisolución del precipitado en una solución al 10-20 % de ácido p-toluensulfónico en metanol, de preferencia al 15 %, y tratamiento con carbón decolorante de la solución.
- 15. f) adición al concentrado de un disolvente orgánico apto para causar la precipitación de la sal de SAM pura, bien cristalina y fácilmente filtrable.

20. Como ya se ha dicho, la fase a) del procedimiento puede realizarse de modos diferentes, pero igualmente eficaces para los fines de obtener una solución concentrada de SAM.

25. Según una alternativa, se trata la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis utilis*, etc.) enriquecida en SAM mediante la adición de metionina en condiciones apropiadas (Schlenk, *Enzymologia*, 29, 283 -1965-), con acetato de etilo y luego con ácido sulfúrico de normalidad comprendida entre 0,1 y 0,5 (de preferencia, 0,35 N), a la temperatura del ambiente, para causar la lisis de las células y el paso a solución prácticamente del 100 % de la SAM presente.



De preferencia se emplean volúmenes de agua y de acetato comprendidos entre  $1/20$  y  $1/5$  del peso de las células húmedas y se prolonga el tratamiento por un tiempo entre 15 y 45 minutos (de preferencia, por 30 minutos).

5. Se añade luego ácido sulfúrico y se prosigue la lisis por un tiempo comprendido entre una hora y dos horas (de preferencia, una hora y media).

10. Cabe señalar que la lisis de las células de levadura realizada con una mezcla de disolvente orgánico y ácido sulfúrico diluido es muchísimo más conveniente que la realizada normalmente con ácido perclórico a la temperatura del ambiente o con ácido fórmico o ácido acético a  $60^{\circ}\text{C}$  y similares, por cuanto no sólo se desarrolla a la temperatura del ambiente (muy favorable para la estabilidad de la SAM), sino que se produce en condiciones tales que la solución resulta fácilmente filtrable para apartar los residuos celulares y no contenga ninguna de las impurezas que se hallan presentes cuando se utilizan los otros medios de lisis, difícilmente eliminables además con los procedimientos conocidos para la preparación de SAM pura.

15. Según otra alternativa, la fase a) se realiza preparando la SAM por síntesis enzimática mediante acción de la enzima ATP-metionina-adenosiltransferasis (E.C. 2.4.2.12) sobre una mezcla de incubación que contiene adenosin-trifosfato (ATP) y metionina.

20. Lo esencial para los fines de la realización industrial de este método es que la enzima sea pura y se halle en forma fácil de aislar tanto de la mezcla inicial de incubación como de la SAM producida.



El solicitante ha descubierto un procedimiento para la purificación de la enzima ATP-metionina-adenosiltransferasa mediante cromatografía por afinidad, así como un método de reacción en columna que permite alcanzar los objetos antes expuestos.

5.

La cromatografía por afinidad de la enzima específica según este invento se realiza haciendo percolar una solución que la contiene (por ejemplo, un extracto bruto de levadura o de "Escherichia coli") por una columna llena de un soporte sólido al que está ligado covalentemente un grupo que actúa de inhibidor competitivo de la enzima en cuestión.

10.

Muy inesperadamente se ha hallado que un relleno óptimo para una columna tal de purificación lo constituye un gel de polisacáridos activado al que está ligada covalentemente la L-lisina.

15.

La afinidad de la enzima específica para el radical lisínico ligado a la matriz sólida causa el retardo de la elución de la enzima en la columna y es así posible obtener su separación, en forma muy pura, de las otras proteínas.

20.

No obstante, la separación de la enzima aparte del eluato que la contiene, para emplearla en la fase sucesiva de síntesis enzimática, ha dado resultados completamente insatisfactorios, ya que una vez separada su estabilidad disminuía con el tiempo y además, después de un solo empleo en la síntesis de la SAM, se destruía en las operaciones sucesivas de aislamiento de dicha SAM.

25.

El solicitante ha hallado que se obtienen en cambio resultados óptimos haciendo adsorber el eluato portador de la enzima específica sobre un soporte adecuado, sólido, y ha-



ciendo que se produzca en columna la reacción catalítica entre la metionina y el ATP que lleva a la formación de SAM.

5. Un soporte sólido apropiado lo constituye un polisacárido activado con un reactivo capaz de ligar proteínas a soportes sólidos, como, por ejemplo, el bromuro de cianógeno.

Al hacer percolar por la columna una solución de ATP y metionina en solución tampón apropiada, se obtiene en la base de la columna un eluato que contiene la SAM.

10. La fase b) del procedimiento permite la separación de la SAM en estado de gran pureza; en efecto, en ambiente ácido el único compuesto precipitado por el ácido picrolónico es la propia SAM, como demuestra la cromatografía sobre capa delgada, según Anal. Biochem. 4, 16-18 (1971). El ácido picrolónico tiene pues una acción extremadamente y sorprendentemente selectiva. En efecto, los otros agentes precipitantes
15. que hasta ahora se añadían, como el ácido pícrico, la sal de Reinecke y el ácido bórico, ocasionan precipitados muy impuros, que exigen siempre purificación consecutiva de la SAM por cromatografía en columna de cambio iónico, operación
20. bastante cara y de realización industrial difícil. Además, con dificultad alcanza el producto la pureza necesaria. La utilización de soluciones acuosas de ácido picrolónico o de soluciones de este ácido en los disolventes orgánicos ya citados no presenta problemas particulares y es operación que
25. se desarrolla a la temperatura del ambiente. La fase c) se realiza preferentemente con soluciones que contienen ácido p-toluensulfónico y ácido sulfúrico, en concentraciones comprendidas ambas entre 0,05 y 0,2 N (de preferencia, 0,1 N), y con un disolvente orgánico parcialmente miscible con el



agua, como la metiletiloetona o el n-butanol. La utilización del disolvente orgánico permite reducir mucho las soluciones acuosas ácidas y elimina prácticamente todo el ácido picrolónico.

5. La fase d) del procedimiento se realiza empleando preferentemente de 4 a 8 volúmenes (respecto al volumen de la solución acuosa) de un disolvente elegido en el grupo que comprende la acetona, el alcohol metílico, el alcohol etílico y el alcohol propílico.
10. Se ha descubierto también, sorprendentemente que si en la fase e) se emplea la cantidad mínima de metanol necesaria para disolver el precipitado procedente de la fase d), en la sucesiva fase f) de precipitación se separa la sal doble  $\text{SAM}^+ \cdot \text{HSO}_4^- \cdot \text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}$ .
15. Viceversa, si se emplea en la fase e) un volumen de metanol doble a lo menos del necesario, en la sucesiva fase f) de precipitación se separa la sal doble  $\text{SAM}^+ \cdot \text{HSO}_4^- \cdot \text{H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}$ .
- El empleo de cantidades intermedias de metanol lleva a la formación de mezclas de las dos sales.
20. La precipitación final de una u otra de las nuevas sales conformes a este invento (fase f) exige el empleo de un disolvente orgánico elegido en el grupo constituido por el metanol, el éter, el cloroformo, el n-propanol, el isopropanol, el n-butanol, el isobutanol, el alcohol butílico secundario, el alcohol isoamílico y el tetrahidrofurano.
25. Las sales dobles de SAM obtenidas según este invento son, como ya se ha dicho, conservables indefinidamente en estado seco y se mantienen prácticamente inalteradas.



En los ejemplos que siguen se ilustra el método para preparar las nuevas sales según el invento, entendiéndose que estos ejemplos son únicamente ilustrativos y no implican limitación del invento.

5. El procedimiento hallado por nosotros no exige en ninguna de las fases temperaturas superiores a la del ambiente y actúa en medio ácido; esto es muy importante para evitar la descomposición de la SAM. Además, no necesita operaciones complicadas y laboriosas, como las cromatografías en columnas de resina de cambio iónico o de carbón, que lo volverían de difícil realización industrial.

Ejemplo 1

- Se añaden 11 litros de acetato de etilo y 11 litros de agua, a la temperatura del ambiente, a 90 kg de levadura enriquecida con SAM (6,88 g/kg) según Schlenk (Enzymologia, 29, 283 -1965-). Después de 30 minutos de agitación enérgica, se añaden 50 litros de ácido sulfúrico 0,35 N y se prosigue la agitación por una hora y media. Luego se filtra y se lava con agua, de lo que se obtienen 140 litros de solución que contiene 4,40 g/l de SAM, equivalente al 99,5 % de la existente en el material de partida.

- Agitando, se añade a esta solución una solución de 2,3 kg de ácido picrolónico en 25 litros de metiletilcetona. Después de una noche de reposo, se separa por centrifugación el precipitado y se le lava con agua.

El sólido así obtenido se agrega, con agitación, a una mezcla de 18 litros de una solución 0,1 N de ácido sulfúrico y ácido p-toluensulfónico y 18 litros de metiletilcetona. Después de reposo, se separa la fase orgánica, que se



remite a la recuperación del ácido picrolónico, mientras la fase acuosa se bate con un poco de metiletilcetona para eliminar los vestigios de ácido picrolónico residual, se le añade carbón decolorante y se filtra. Esta solución (16,5 litros)

- 5. contiene 33,8 g/l de SAM, equivalente al 90 % del compuesto existente en la levadura; analizada por cromatografía sobre capa delgada, según Anal. Biochem. 4, 16-18 (1971), muestra contener solamente SAM, sin vestigios de sus productos de descomposición o de otras bases orgánicas. Se vierte dicha solución, agitando, en 100 litros de acetona, y después de reposo se decanta del disolvente y se disuelve el sólido en 3,3 kg de una solución metanólica al 15 % de ácido p-toluensulfónico. Después de añadir carbón decolorante, se filtra la mezcla y se la agrega a 25 litros de éter etílico.

- 15. Se precipitan 1184 g de una sal bien cristalina y fácilmente filtrable, poco higroscópica, solubilísima en agua (más del 20 %) con formación de una solución incolora; esta sal es poco soluble en metanol y etanol e insoluble en acetona, metiletilcetona, cloroformo, alcoholes superiores y benceno. Por cromatografía de capa delgada, según Anal. Biochem. 4, 16-28 (1971), el producto está exento de toda impureza.

En el análisis centesimal la sal ha dado los resultados siguientes:

- 25. C = 36.39%; H 4.6%; N = 8.8%; S = 16.7%
- Para  $C_{29}H_{42}N_6O_{19}S_5$  (P.M. 938.98) calculado:  
 C = 37.09%; H = 4.51%; N = 8.95%; S = 17.07%
- Además:  $H_2SO_4$  = 20.5%  
 Acido p-toluensulfónico = 36.0%





trifugación el precipitado que se ha formado.

- El sólido separado se agita con 9 litros de una solución 0,1 N de ácido sulfúrico y ácido p-toluensulfónico y con 9 litros de metilisobutiloetona. Después del reposo, se separa la fase orgánica, mientras la fase acuosa se descarga de los vestigios de ácido picrolónico por lavado con un poco de metilisobutiloetona. Se añade luego carbón decolorante y se filtra, y el filtrado se vierte en 70 litros de alcohol metílico. Después de reposo, se decanta del disolvente el sólido formado y se le disuelve en una solución metanólica al 15 % de ácido p-toluensulfónico (1,65 kg).
- 5.
- 10.

- Después de decolorar con carbón, se añade el filtrado a 10 litros de cloroformo, con lo cual se obtiene un precipitado cristalino, bien filtrable, de disulfato di-p-toluensulfonato de SAM.
- 15.

El producto obtenido (1110 g) ha dado en el análisis resultados idénticos a los del producto del Ejemplo 1.

### Ejemplo 3

- A 70 litros de solución procedente de la lisis de las células de levadura, obtenidos con el mismo método de lisis y la misma materia prima que en el Ejemplo 1, se añaden 1,15 kg de ácido picrolónico disueltos en 12 litros de n-butanol. Después de una noche de reposo, se separa por centrifugación el precipitado.
- 20.

- El sólido obtenido se distribuye entre 9 litros de una solución 0,1 N de ácido sulfúrico y ácido p-toluensulfónico y 12 litros de n-butanol. Después de reposo, se separa la fase orgánica, mientras se descarga la fase acuosa de los vestigios de ácido picrolónico por lavado con un poco de
- 25.



n-butanol. Se añade luego carbón decolorante, se filtra y se vierte el filtrado en 65 litros de alcohol n-propílico. Después de reposo, se decanta del disolvente el sólido precipitado y se le disuelve en una solución metanólica al 15 % de ácido p-toluensulfónico (1,65 kg). Después de decolorar con carbón, se vierte el filtrado en 14 litros de n-butanol, lo que da un precipitado cristalino y bien filtrable de disulfato di-p-toluensulfonato de SAM.

El producto final (1155 g) ha dado en el análisis los mismos índices que el producto del Ejemplo 1.

#### Ejemplo 4

##### Purificación de la enzima específica

50 cc de Sepharose (polisacárido producido por Pharmacia Fine Chemicals AB, de Upsala, Suecia) empackado y suspendido en agua se tratan con bromuro de cianógeno, según los métodos conocidos para ligar substancias que contengan grupos amínicos a matrices constituidas por gel de polisacáridos. Al gel así preparado se añade un exceso de L-lisina. Después de la reacción, se lava repetidamente con agua destilada, con mezcla tampón a pH 8,5 y con mezcla tampón a pH 4,5. El gel se utiliza luego para llenar una columna de 1,5 cm de diámetro y 30 cm de altura. Por la columna se hace pasar, hasta equilibrio completo, una mezcla tampón de trietanolamina 0,05 M y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 M a pH 8,0. Se depositan en la columna 2 cc de extracto de levadura que contiene la enzima específica, obtenido por sonicación o por homogeneización con hielo seco y eventualmente enriquecido antes en la enzima específica. Se eluye la columna con la misma mezcla tampón utilizada para la equilibración, mientras se sigue por medición espec-



- trofotométrica del ultravioleta la distribución de las proteínas en el eluato. Al mismo tiempo se mide la actividad sintética de las diversas fracciones según J.A. Stekol, Methods in Enzymology, vol. VI, pág. 566 (1963). Las fracciones que
5. muestran actividad sintética relevante se reúnen y la solución así obtenida presenta una actividad específica veinte veces superior, a lo menos, a la del extracto bruto. En esta solución la enzima puede ser ulteriormente concentrada por precipitación con sales, con disolventes orgánicos o por otros
10. métodos conocidos para la concentración de soluciones proteicas.

#### Preparación de la SAM

- Se activan, con bromuro de cianógeno o según otro de los métodos conocidos para ligar proteínas a matrices de gel de polisacáridos, 30 cc de gel de Sepharose empacado.
15. Al gel activado se añaden 4 cc de una solución de enzima específica, purificada tal como se ha expuesto antes, que contienen alrededor de 100 cc de proteína. Se agitan a 4° C durante 18 horas la suspensión de gel activado y la solución de enzima
20. y se lava la resina con agua, El líquido de lavado contiene alrededor del 70 % de la actividad enzimática total que existía al principio en la solución de la enzima específica.

- Incubando el Sepharose, preparado tal como antes, con el método ya citado para la determinación de la actividad sintética se observa que alrededor del 20 % de la actividad total está ligada al polisacárido.
- 25.

El sepharose preparado de la manera anterior se utiliza para llenar una columna de 1,5 cm de diámetro y 20 cm de altura. Por la columna se hace pasar una solución que contiene



28

trietanolamina 0,675 M, sulfato de magnesio 0,150 M ATP 0,05 M, M-metionina 0,05 M y KCl 0,01 M, a velocidad de 5 cc por hora y con temperatura de 25 a 27°.

5. El eluato de la columna, analizado para el contenido de SAM, muestra que el rendimiento de conversión es del 30 %.

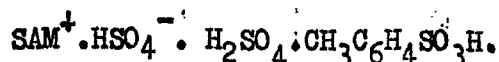
Preparación de las sales dobles de la SAM con ácido sulfúrico y ácido p-toluensulfónico

10. Se acidifican hasta pH 3 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 103 cc de eluato que contiene 6 g/l de SAM y, con agitación, se añade una solución de 2,3 g de ácido picrolónico en 25 cc de metiletilcetona. Después de una noche de reposo, se filtra el precipitado y se le lava con agua. Luego se le redisuelve en 18 cc de una solución 0,1 N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y ácido p-toluensulfónico y en 18 cc de metiletilcetona.

15. Después de agitación y de reposo, se separa la fase orgánica, mientras se bate con un poco de metiletilcetona la fase acuosa para eliminar los últimos vestigios de ácido picrolónico. Después de separar la capa acuosa, se añade carbón decolorante y se filtra. Resultan 16,5 cc de solución acuosa incolora, que contienen 33,8 g/l de SAM, equivalentes por tanto al 90 % de la SAM contenida en la solución original. Analizada por cromatografía de capa delgada, la solución muestra contener únicamente SAM. Se vierten 16,5 cc de la solución en 100 cc de acetona y después de agitación y reposo se separa el líquido por decantación. Se disuelve el sólido en 6,6 g de una solución metanólica al 15 % de ácido p-toluensulfónico y después de añadir carbón decolorante y de filtrar, se vierte la solución en 25 cc de éter etílico. Después de reposo, se



filtra; la sal obtenida, bien cristalina, pesa 0,967 g y tiene la composición



En el análisis: calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_{16}\text{N}_6\text{S}_4$

5. C 34,46% H 4,47 % N 10,96% S 16,72%  
hallado:  
C 33,68% H 4,65 % N 10,8 % S 16,5 %  
SAM<sup>+</sup>% 50,5; H<sub>2</sub>O% 2,1; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>% 25,3;  
ácido toluensulfónico % 21,7.

10. El espectro ultravioleta muestra un máximo en 260 nm,  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 179$ .

Repetiendo el procedimiento de manera idéntica, pero empleando 3,3 g de solución metanólica al 15 % de ácido p-toluensulfónico, en la fase sucesiva de precipitación con 25 cc de éter etílico se obtienen 1,18 g de sal  $\text{SAM}^+ \cdot \text{HSO}_4^- \cdot \text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 2 \text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}$  que tiene características idénticas a las indicadas para el producto del Ejemplo 1.

20. Por la investigación bioquímica se sabe, desde hace años, que el SAM es el único donador específico de metilos en los organismos vivos para las reacciones bioquímicas de transferencia del grupo  $\text{CH}_3$ , que son reacciones fundamentales en el metabolismo lipídico, proteídico y glucídico.

25. A continuación se exponen; a título de ejemplo, algunas de las reacciones mas importantes de transmetilación dependientes de SAM.

a) N-transmitilación: adenina, carnitina, carnosina, creatina, 2,6-diaminopurina, adrenalina, guanina, hordenina, N'-nicotinamida, nicotina, fosfatidilcolina, ricinina;



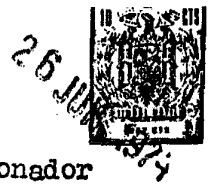
- b) O-transmetilación: N-acetilserotonina, dopamina, epinina, d-adrenalina, l-adrenalina, ergosterol, l-noradrenalina, pectina, ubiquinona;
- c) S-transmitilación: 2,3-dimercaptopropanol, H<sub>2</sub>S, metionina, metilmercaptan, ácido S-mercaptopropiónico, S-mercaptoetanol, tiopirimidina, tiouracilo;
- d) C-transmitilación: citosina, timina.

5.  
10. Esto significa, con referencia particular al organismo humano, que el SAM actúa en los procesos metabólicos siguientes:

15. biosíntesis de colina, biosíntesis de fosfatidilcolina, actividad de enzimas que requieren grupos SH, metabolismo de catecolaminas; metabolismo de aminas centroencefálicas de biógeno; metabolismo de serotonina, metabolismo de histamina, metabolismo de vitamina B12 y de ácido fólico; metabolismo de creatina; metabolismo de miosina; metabolismo de histonas; metabolismo de RNA; metabolismo de DNA, metabolismo de sustancias protéicas; metabolismo de ciertas hormonas de núcleo perhidrofenantrénico de ciclopentano, siendo las principales los estrógenos, metabolismo de los triglicéridos.

20. Asimismo se sabe, desde hace algún tiempo, que el SAM, una vez desmetilado por las enzimas metiltransferásicas, se transforma en la S-adenosilhomocisteína (SAO) que es un donador indirecto de grupos hidrosulfídicos y, por tanto, tiene una importancia determinante en el metabolismo de los compuestos que requieren grupos SH para llevar a cabo su actividad biológica. Entre éstos revisten particularmente importancia ciertas biocenzimas y los ácidos amino sulfurados.

25. A su vez, la SAO se descarboxila en el organismo y



el producto descarboxilado constituye el principal donador del grupo aminopropílico, indispensable (según los más recientes conocimientos bioquímicos) para la biosíntesis de la poliamina.

5. El procedimiento se cataliza por medio de diversas enzimas entre las que una específica es la aminopropil-transferasis.

En resumen puede decirse que se sabe que el SAM en el organismo humano está estrechamente relacionado con todas

10. las reacciones bioquímicas de:

A-- transmetilación (rendimiento específico del grupo  $\text{CH}_3$ )

B - transulfuración (rendimiento específico del grupo SH)

C - transeminopropilación (rendimiento específico del grupo aminopropílico)

15. La recopilación de estos conocimientos puede conducir a suponer que el SAM posee cierta acción terapéutica en el tratamiento de los datos patológicos vinculados con la carencia o, dicho de otro modo condiciones de deficiencia, en el organismo de algunos de los muchos productos antes citados.

20. Sin embargo, la extrema inestabilidad del SAM y el no poder disponer, hasta el presente, de algún método para hacerlo estable durante un tiempo suficiente bajo condiciones de ambiente normal ha impedido que se sometiera este producto a pruebas farmacológicas o clínicas y, por tanto, se ha imposibilitado el encontrarlo algún uso práctico en el campo de
25. la terapéutica humana.

Solo después de la preparación de las nuevas sales de SAM, según el presente invento, (SAM-tri-p-toluensulfona-

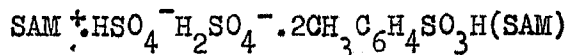


to), sal ésta que en la práctica resulta estable por tiempo indefinido a la temperatura ambiente, ha sido posible llevar a cabo un estudio sistemático farmacológico y clínico, que ha conducido al descubrimiento en las nuevas sales de propiedades terapéuticas completamente sorprendentes por su calidad e intensidad.

De la enorme cantidad de datos farmacológicos y clínicos recogidos para este nuevo producto se dan a continuación solo algunos elementos suficientes para indicar claramente a los expertos en el arte las características esenciales del nuevo producto y sus empleos principales en la terapéutica humana.

Por simplicidad, en lo que sigue indicaremos sencillamente como "sales de SAM" las dos sales dobles según el invento, dada su absoluta identidad de empleo.

En los datos farmacológicos y clínicos la cantidad de sal suministrada se expresa como



aunque quede claro que los datos se refieren idénticamente a una u otra de las sales dobles.

TOXICIDAD.- La sal de SAM objeto de este invento ha resultado absolutamente desprovista de toxicidad aguda de toxicidad crónica, de intolerancia local y de efectos secundarios.

En particular, la  $DL_{50}$  en el ratón es superior a 6 g/kg/os y a 2,5 g/kg/i.p.

Las pruebas de tolerancia y toxicidad crónica se efectuaron con ratas de la raza Wistar y Sprague-Dowley administrándoles, durante 12 meses, 2-20 mg/kg y día de producto; al cabo del tratamiento los diversos órganos y aparatos no presentaron alteración patológica.



- Los ensayos de teratogénesis se llevaron a cabo con conejos y ratas; aún con la administración de dosis masivas de SAM, unas 10 veces superiores a las dosis terapéuticas máximas, no se hallaron acciones teratogénicas o deformación alguna en los embriones o el feto final.
5. La adición de dosis de hasta 0,1-0,2 mg/cc de producto a cultivos sobrevivientes de linfocitos humanos o células hepáticas de ratón no produce alteración alguna del índice de deformación de los elementos celulares.
10. La administración intravenosa con dosis de hasta 40 mg/kg no produce en el conejo ninguna manifestación pirogénica.
- La administración venosa en el conejo y el gato de 40 mg/kg no causa ninguna alteración de la presión carótida la frecuencia cardíaca y respiratoria o la traza electrocardíaca.
15. La tolerancia local de la inyección intramuscular, aún después de administraciones repetidas durante 180 días, y de la inyección intravenosa en la vena marginal del pabellon auricular del conejo, es excelente.
20. En el hombre, en sujetos juvenes, saludables y voluntarios : de ambos sexos sometidos a administración por el método intravenoso rápido o por fleboclisis de dosis de SAM iguales a 10-300 mg/ (peso promedio 70 kg), el examen simultáneo de la presión mínima y máxima, del pulso y de la frecuencia respiratoria en 1,5,15,20,30,60 minutos y en 2,3,6,8,10,12,24 horas después del término de la administración no muestra ninguna variación de los valores normales.
25. La traza electrocardiográfica no muestra ninguna



variación en el intervalo PQ, en la sección ST, ni aparición, alguna de extrasístole u otras alteraciones a los 30", 1', 2', 3', 5', 10' y 2P' después de la administración.

- En el aparato hemopoyético y en la funcionalidad
5. hepática y renal no se produjeron variaciones que fueran estadísticamente destacables de lo normal.

FARMACOLOGIA.

- Repetimos que cada vez que en lo que sigue se habla de administración de SAM, se entiende que se suministran
10.  $SAM^+ \cdot HSO_4^- \cdot H_2SO_4 \cdot 2 CH_3C_6H_4SO_3H$  y/o  $SAM^+ \cdot HSO_4^- \cdot H_2SO_4 \cdot CH_3C_6H_4SO_3H$ .

- Para determinar, en forma indicativa, como se distribuye la SAM en los tejidos, se preparó S-adenosilmetionina (Metil  $C^{14}$ ) y se estudió luego la distribución del fármaco en las ratas suministrando una dosis de 10 mg/kg/e.v., equivalente a 24  $\mu$ ci de producto radiactivo. La actividad específica del producto era de 58 mCi/m moles. En paralelo, se efectuó también un estudio autorradiográfico en el ratón. De los resultados de estos dos experimentos resulta que la
15. DAM se distribuye muy rápidamente por todos los tejidos.
- 20.

Exponemos a título demostrativo una parte de los datos relativos a algunos de los órganos que se tomaron en consideración:

Distribución de la SAM en algunos tejidos

25. de la rata

(los valores se expresan como  $\mu$ gr/gr)

---



Tejido	15'	1 h	4 h	8 h	24 h
Higado	4.02	7.47	13.1	13.4	13.5
Gándulas suprarrenales	4.26	8.46	11.7	10.8	10.9
Bazo	3.15	2.96	8.1	6.2	6.7
Hipófisis	5.6	5.8	19.5	11.3	10.3
Hipotálamo	0.7	1.5	2.4	3.0	3.2
Corteza	0.6	1.1	1.8	2.1	2.3
Plasma	18.6	5.2	5.3	4.5	3.1

De ello se dedujo por tanto que las nuevas sales objeto de este invento coden el grupo  $\text{CH}_3$  a todos los tejidos dotados de actividad metiltransferásica. En otros términos, se ha demostrado la capacidad de los nuevos productos objeto de este invento para localizarse electivamente en todos los órganos provistos de sistemas metiltransferásicos.

Esto se ha confirmado en las pruebas farmacológicas sucesivas. Toda una serie de pruebas realizadas con ratas ha demostrado que los nuevos compuestos ejercen notabilísima acción protectora y resolutive en la esteatosis hepática por dieta hiperlipídico-hiperproteica según Handler, en la esteatosis por intoxicación alcohólica aguda y por otros agentes tóxicos (tetracloruro de carbono, bromobenceno, etc.) ya con administraciones de 15 mg/kg/i.p.; tanto desde el punto de vista morfológico como del bioquímico, la SAM disminuye significativamente la acumulación de los lípidos a nivel de los hepatocitos, mientras que favorece la vuelta a los niveles normales de los fosfolípidos disminu-



dos después de la intoxicación con CCl<sub>4</sub>.

Fosfolípidos hepáticos en las ratas después de intoxicación con CCl<sub>4</sub> y tratamiento con SAM

5.

Tratamiento	Fosfolípidos totales (mg/kg)
Solución fisiológica	30,57 ± 1,18
CCl <sub>4</sub>	18,87 ± 1,06
10. CCl <sub>4</sub> + SAM 15 mg/kg/i.p.	27,20 ± 1,25
CCl <sub>4</sub> + SAM 150 mg/kg/i.p.	20,87 ± 0,42
CCl <sub>4</sub> + Ad+Met 15 mg/kg/i.p.	19,9 ± 0,92

Los valores son los promedios ± E.S. de 10 valores para cada grupo.

15.

Para el estudio de la actividad hepatoprotectora nos hemos servido de un dispositivo experimental que produce en la rata la llamada "degeneración colesterólica hepática" (Ridout y col., Biochem. J., 52, 99, 1952). Según este método, por medio de una dieta oportuna se obtiene en los animales un manifiesto aumento de las grasas totales hepáticas y del colesterol hepático: las substancias que intervienen en el metabolismo lipídico reducen o anulan tal aumento.

20.

Los animales estaban divididos en seis grupos: al primer grupo se administró una dieta variada a voluntad; al segundo, la dieta basal de Ridout (20 g por rata al día); y a los otros grupos, la misma dieta con las mismas dosis, pero enriquecida con colesterol en 0,2/rata/día. El tratamiento duró tres semanas.

25.

A los grupos 4-5-6- se suministró SAM en las dosis



siguientes:

1-2-5 mg/kg/i.p. al día.

Al final de las tres semanas, se sacrificaron todos los animales, se extirparon los hígados y se dosificaron en ellos las grasas totales (Best y col., Biochem. J., 40, 368, 1966) y el colesterol (Sperry y Brand, J. Biol. Chem. 150, 315 1943).

Los resultados han demostrado que los grupos sometidos a tratamiento con la SAM a dosis de 1-2 mg/kg/i.p. han estado escasamente protegidos, mientras el grupo tratado con SAM a 5 mg/kg/i.p. ha estado completamente protegido.

Grasas totales y colesterol hepáticos al final del experimento (promedios por lote)

15.	Lote	Peso del hígado fresco, en g	Grasas totales		Colesterol	
			gr	%	mgr	%
	I	15	1.41	9,4	40	2,6
	II	18	1,93	10,6	68	3,7
	III	16	3,84	24,0	92	5,7
20.	IV	17	3,7 <sup>0</sup>	21,6	90	5,2
	V	16	3,5	21,9	67	4,1
	VI	16	2,0	12,5	61	3,8

Otro aspecto farmacológico investigado por nosotros lo constituyen los efectos de tipo antiinflamatorio y de tipo analgésico de la SAM. De las varias pruebas intentadas, citaremos las más clásicas, como el edema por la carragenina y por blanco de huevo como prueba de la inflamación aguda; el granuloma por pellas de algodón y la artritis por coadyuvante,



como prueba de la inflamación crónica. En todos los casos la SAM ha demostrado ser activa tanto por vía oral (dosis de 20 a 100 mg/kg) como por vía parenteral (dosis de 10 a 20 mg/kg) en parangón con otros fármacos conocidos (ibuprofen -

5. Indometacina). Como pruebas de analgesia se efectuaron los ensayos de la placa caliente y del estiramiento por ácido acético, y de Randal y Selitto en la rata; también en estos ensayos ha demostrado el fármaco ser activo en parangón con los fármacos conocidos estudiados.

10. Otro aspecto que hemos considerado es la posible acción de la SAM en el tiempo de sueño por barbitúricos.

Con este fin se realizó un experimento en el que grupos de ratones recibieron hexobarbital a la dosis de 80 mg/kg/i.p. según el método de Holten y Larsen (Acta Pharmacol. Toxicol, 1956, 12, 346); un grupo servía de testigo mientras el segundo recibía SAM a la dosis de 10 mg/kg/i.p. (véase la tabla).

20.

Controles	Tiempo de sueño (min.)
	24,4 ± 2,7
SAM 10 mg/kg/i.p.	41,2 ± 5,8

25.

Del examen de los datos resulta una acción de la SAM en la prolongación del tiempo de sueño inducido por el hexobarbital.

PRUEBAS CLINICAS

Por administración de SAM se entiende indiferentemente la administración de SAM<sup>+</sup>.HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>.H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.2CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>3</sub>H y/o SAM<sup>+</sup>.HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>.CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>3</sub>H.



Siguiendo las indicaciones obtenidas de las pruebas farmacológicas, las pruebas clínicas se orientaron sobre las afecciones patológicas en donde aparece lo que sigue, primitivamente o secundariamente alterado.

5. 1 - el metabolismo de los lípidos  
2 - el metabolismo de los prótidos y los glúcidos  
3 - el metabolismo de las catecolaminas y las aminas biogénicas.

10. 1 - A partir de pruebas llevadas a cabo clínicamente sobre cientos de sujetos utilizando dosis de SAM variables en un intervalo muy amplio, se encontró que el nuevo compuesto induce una rápida caída de los lípidos hepáticos en la hepatosteatosis de la mas variada patogénesis, identificable mediante un exámen bióptico repetido después de terminar el ciclo de tratamiento y aún después de 60 días después de terminado el tratamiento.

20. La administración del producto induce, asimismo, a una notable caída en los valores elevados de colesterolamia total, de hipertrigliceridemia y normaliza las relaciones lipoproteicas alteradas de beta/alfa y las relaciones pre-beta/beta en los sujetos con hiperdislipidemia en la fase descompensada,

25. Esta actividad hipocolesterolemizante e hipolipemizante se verifica aún con dosis de unos 20 a 30 mg administradas 2 a 3 veces al día y es proporcional a la dosis.

En la arterioesclerosis clara con manifestaciones clínicas de la esfera psicoafectiva, con turbomnósicos y controencefálicos secundarios (deterioración por encefalopatía arteriosclerótica) y fenómenos de hipoxia cerebral, la ad-



ministración de SAM por vía intramuscular o, en los casos más graves, por inyección intravenosa o mediante fleboclisis lenta, con dosis comprendidas entre 20 y 40 mg 3 ó 4 veces al día, ha mostrado una modificación muy favorable de la sintomatología. En particular, en estados hipoxidóticos claros fue muy rápida y estadísticamente importante la recuperación de las funciones relacionadas con la vida de relación.

En los síndromes post-apoplectiformes se encontró una mayor celeridad en la resolución del cuadro clínico.

10. 2 - Se han tratado clínicamente cientos de sujetos afectados de: hipoprotidemias y disprotidemias secundarias, hepatopatías persistentes o agresivas, estados precirróticos o cirróticos, síndromes de malabsorción, síndromes de dispersión protídica. La administración de dosis variables comprendidas entre 50 y 200 mg de SAM por día, por vía intramuscular, intravenosa u oral según la gravedad del caso, produjo un aumento estadísticamente significativo en la protidemia total, un aumento en la cota de albúmina y una tendencia a normalizar las relaciones porcentuales alteradas de las fracciones electroforéticas del suero. Esta actividad proteica anabolizante ha sido seguida de una mejora, con frecuencia muy importante, de la sintomatología subjetiva y de las condiciones objetivas generales y de una normalización de todas las pruebas de funcionabilidad hepática.
- 15.
- 20.
25. 3 - Se han obtenido resultados particularmente sorprendentes en aplicaciones clínicas de las nuevas sales enzimáticas según el invento cuando existen cuadros patológicos claramente relacionados con modificaciones en el intercambio de aminas biogénicas, por ejemplo:



- a) cuadros patológicos de índole neuropsiquiátrica;
- b) enfermedad de Parkinson y parkinsonismo de diversas etiopatogénesis;
- c) acción antiflogística y analgésica en el tratamiento de las osteoartrosis , y actividad antálgica en algunas manifestaciones neurológicas;
- 5. d) Trastornos del ritmo sueño-insomnio.

Con respecto al punto a), una vasta causística clínica llevada a cabo examinando el comportamiento clínico y las pruebas de Hamilton y Wittenberg, ha demostrado claramente que la administración de dosis variables entre 20 y 50 mg de SAM 3 ó 4 veces al día por un período de 5 a 15 días, induce, excluyendo cualquier otra forma de terapia, una remisión significativa de los parámetros principales, considerados patognómicos para la diagnóstico de las formas depresivas.

15. Con respecto al punto b), relativo al tratamiento de la enfermedad de Parkinson y a los parkinsonismos, se ha encontrado que:

- 20. 1) La administración de SAM en 10-40 mg por día, por vía intramuscular, intravenosa u oral (según la gravedad del caso) en asociación con la terapéutica habitual con Levodopa, produce una mejora estadísticamente mas significativa en la acinesia y rigidez con respecto a la que tiene lugar en pacientes tratados únicamente con Levodopa. Se encuentran, asimismo, favorables modificaciones en la extensión del temblor de Parkinson, que no puede modificarse con la Levopoda sola.
- 25. 2) La administración de SAM mejora ostensiblemente los trastornos psíquicos asociados con la Levodopa, con relación particular a los estados depresivos y manifestaciones psíquicas



do tipo irritativo.

- 3) La administración de SAM a las dosis antes indicadas bloquea significativamente la sucesión de efectos secundarios de la Levodopa de los diversos órganos y aparatos, con particular referencia a la náusea, el vómito, la inapetencia, la hipotensión, la astenia, la cefalea, la hipersudoración y el insomnio.
- 5.

- Con respecto al punto c), la SAM, que por los resultados farmacológicos aparece dotada de intensa actividad antiflogística y analgésica, se ha demostrado activa en todas las formas osteoartrosicas tratadas a la dosis en 30 mg dos veces al día por vía intramuscular o endovenosa y de 30-50 mg per os cuatro veces al día.
- 10.

- Ya al cabo de 7 días de tratamiento el espasmo muscular, la limitación del movimiento, el dolor localizado y la rigidez aparecen influidos en medida estadísticamente significativa, en relación al placebo. En los 90 casos tratados no se ha observado ningún caso de pirosis gástrica. La búsqueda de sangre oculta en las heces no ha aparecido nunca modificada durante el tratamiento.
- 15.
- 20.

La SAM, comparada con un fármaco antiflogístico no esteroideo usado corrientemente en un estudio "double blind", ha demostrado tener eficacia terapéutica equiparable a la de la indometacina.

- Se ha ensayado también la actividad antálgica de la SAM, en diversos sujetos con cuadros neurológicos diversos: neuritis, polineuritis, artralgias, ciática, radiculitis y tortícolis.
- 25.

El efecto terapéutico ha resultado pronto y eficaz



desde el primer día de administración a la dosis de 15 mg dos veces al día, por vía intramuscular, o de 30-50 mg 3 ó 4 veces al día, per os, Resultados análogos se han obtenido en sujetos con cefalea recurrente y resistente con la administración del fármaco por vía oral en comprimidos masticables.

Con respecto al punto c), o sea los trastornos del ritmo del sueño-insomnio, con relación particular al insomnio, el nuevo producto según el invento es apto, a la dosis de 10-30 mg per os, para mejorar sensiblemente las relaciones alteradas de sueño-insomnio induciendo un sueño fisiológico sin recurrir al uso de barbitúricos u otras sustancias de acción depresiva cortical y centroencefálica.

De cuanto se ha resumido resultan evidentes las numerosas perspectivas inesperadas o imprevisibles que descubre el nuevo fármaco en el campo de la terapéutica humana. Resumiendo puede decirse que los campos de empleo ya investigados son: tratamiento de hepatopatías, hiperdislipidemias, arterioesclerosis generalizada o local, manifestaciones psiquiátricas de tipo depresivo y de tipo neurológico, artropatías degenerativas, manifestaciones algicas neurológicas y trastornos del ritmo sueño-vigilia, mientras que quedan todavía muchos otros campos de aplicación que se han de examinar e investigar.

Las nuevas sales de SAM se administran preferentemente por inyección intramuscular o endovenosa, en comprimidos per os o sublinguales o en cápsulas.

A continuación se exponen algunas composiciones farmacéuticas:



- a) Un comprimido de 400 mg contiene  
SAM sal 66,66 mg  
Excipientos:  
Almidón  
5. Lactosa  
Estearato de magnesio  
Talco  
Aroma c.s. hasta 400 mg
- b) Una cápsula de 250 mg contiene  
10. SAM sal 66,66 mg  
Excipientos:  
Almidón  
Lactosa  
Estearato de magnesio  
15.  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  c.s. hasta 250 mg.
- c) Un vial de liofilizado contiene  
SAM sal 11,11 mg  
Un vial de disolvente intramuscular contiene  
Lidocaína 20 mg  
20. Solución de tampones  
fosfatos c.s. hasta 3 cc.
- d) Un vial de liofilizado contiene  
SAM sal 33,33 mg  
Un vial de disolvente intramuscular contiene  
Lidocaína 20 mg  
25. Solución de tampones  
fosfatos c.s. hasta 3 cc.
- e) Un supositorio de 2 g contiene  
SAM sal 111,11 mg

427 674



Masa para supositorios

c.s. hasta 2,0 g.

Otras formas de administración pueden ser:

- a) Frasquitos bebibles
5. b) Líquidos para instilaciones oculares.
- c) Líquidos para instilaciones endonasales
- d) Líquidos para aerosol o spray.
- e) Líquidos y pomadas para uso tópico en los que el principio activo está diluido en disolventes normales
10. para uso farmacéutico (Tecnología Farmacéutica, vol. II, Silvano Casadio, segunda edición; ed. Cisalpino-Goliardica, Milano, '1972).

En conclusión, puede decirse que la dosis terapéuticas de SAM están comprendidas entre los 5 y los 300 mg por día, según el tipo y la gravedad de la afección que se trate.

Siempre que sea necesario pueden emplearse dosis superiores, dada la absoluta carencia de toxicidad de las sales de este invento.

20. = . =  
N O T A

Descrito el objeto del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la solicitud de patentes italianas  
25. núms: 25895 A/73 del 27-6-73 y 23148 A/74 del 24-5-74.

1.- Procedimiento para la preparación de las sales dobles de la S-adenosil-L-metionina, (SAM) con ácido sulfúrico y ácido para-toluensulfónico, caracterizado porque en su realización comprende las siguientes fases: a) prepararse una solución concentrada de SAM; b) precipitarse la SAM



- existente en la solución acidificada con solución de ácido picrolónico; c) disolverse el picrolonato de SAM en una mezcla constituida por partes iguales en volumen de una solución acuosa de igual normalidad de ácido para-toluensulfónico y ácido sulfúrico y de un disolvente orgánico parcialmente miscible con el agua; d) precipitarse la sal de SAM de la capa acuosa con un disolvente cetónico o alcohólico totalmente soluble en agua; e) disolverse la sal precipitada en una solución metanólica de ácido para-toluensulfónico, y f) precipitarse con un disolvente orgánico apropiado la sal doble de SAM con ácido sulfúrico o ácido para-toluensulfónico.
- 5.
- 10.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque, en una alternativa del proceso, la fase a) se realiza causando la lisis de las células de levadura por tratamiento con acetato de etilo y ácido sulfúrico a la temperatura del ambiente.

15.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado en que la fase a) se realiza por síntesis encimática mediante acción de la enzima específica ATP-metionina-adenosiltransferasis, de alta pureza, sobre una mezcla de adenosil-trifosfato (ATP) y metionina.

20.

4.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado en que la enzima específica ATP-metionina-adenosiltransferasis se purifica por elución selectiva de una solución que la contiene a través de una columna de gel de polisacárido activado y tratado con L-lisina.

25.

5.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque, en la alternativa de realización la síntesis encimática de la SAM a partir de ATP y metionina se ve



rifica mediante paso de una solución que contiene los dos reactivos por una columna de gel de polisacárido activado al que está ligada la enzima específica de alta pureza.

5. 6.- Procedimiento según la reivindicación 1, carac-  
terizado en que la fase b) se realiza empleando soluciones de ácido picrolónico en agua o en un disolvente orgánico soluble en agua.

10. 7.- Procedimiento según la reivindicación 1, carac-  
terizado en que la fase c) se realiza empleando soluciones acuosas de normalidad igual en ácido sulfúrico o ácido para-  
-toluensulfónico y ambas comprendidas entre 0,05 y 0,2.

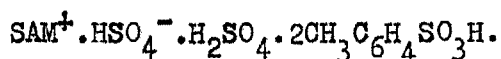
15. 8.- Procedimiento según la reivindicación 1, carac-  
terizado en que la fase d) se realiza empleando de 4 a 8 vo-  
lúmenes (respecto a la solución acuosa) de un disolvente orgánico elegido en el grupo constituido por la acetona, el alcohol metílico, el alcohol etílico y el alcohol propílico.

9.- Procedimiento según la reivindicación 1, carac-  
terizado en que la fase e) se realiza empleando soluciones metanólicas al 10-20% en ácido para-toluensulfónico.

20. 10.- Procedimiento según la reivindicación 9, carac-  
terizado por emplearse la cantidad mínima de metanol necesaria para la disolución de la sal.

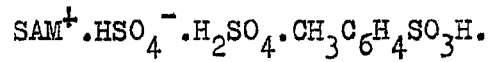
25. 11.- Procedimiento según la reivindicación 9, carac-  
terizado por emplearse, en una variante de la fase e), un gran exceso de metanol.

12.- Procedimiento según la reivindicación 10, ca-  
racterizado en que en el tratamiento con disolvente orgánico según la fase f) se precipita la sal doble





13.- Procedimiento según la reivindicación 11, ca-  
racterizado en que el tratamiento con disolvente orgánico  
según la fase f) se precipita la sal doble



5. 14.- Procedimiento para la preparación de sales  
dobles de la S-adenosil-L-metionina.

Según se describe y reivindica en la presente me-  
moria descriptiva que consta de 36 hojas foliadas y escri-  
tas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 26 de Junio 1974

p.a.

J. L. MORA

P. P.

Firmado: JOSE L. MORA