

439316

Int. Cl.:	C07D // A61K
-----------	--------------

P A T E N T E

D E

I N V E N C I O N

por "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE SULFONATOS ESTABLES DE LA S-ADENOSIL-L-METIONINA", a favor de la firma italiana ERREKAPPA EUROTERRAPICI S.a.s., residente en MILAN (Italia) Via Marcona 37.

- . -

MEMORIA DESCRIPTIVA

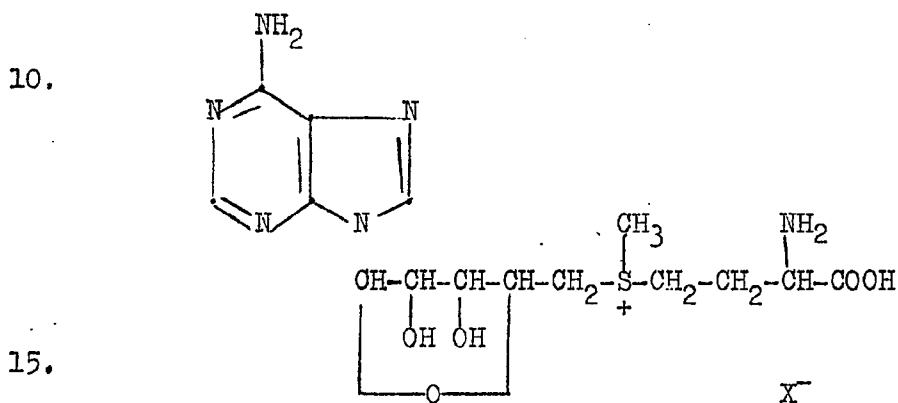
Este invento tiene por objeto nuevas sales de la S-adenosilmetionina y de ácidos sulfónicos orgánicos, así como de sales mixtas entre éstos, el ácido sulfúrico y la S-adenosilmetionina, el procedimiento para su preparación y las composiciones terapéuticas que las contienen. Más precisamente, este invento se refiere a nuevas sales extremadamente estables de la S-adenosil-L-metionina (SAM), a un procedimiento que permite prepararlas de manera sencilla y económica en escala industrial y a nuevas composiciones farmacéuticas que las contienen como principio

5.

10.

activo y que tienen empleo en numerosos campos de la terapéutica humana.

5. Se sabe que la SAM es un producto de origen natural, hallable en todos los organismos vivientes, desde las bacterias hasta las plantas y desde los seres unicelulares hasta los mamíferos superiores, comprendido el hombre, cuya estructura ha sido desde hace tiempo determinada e identificada con la siguiente fórmula



en la que

X es un anión genérico.

20. En los organismos vivos, la SAM se forma con intervención de enzimas (S-adenosilmetioninsintetasas o S-adenosiltransferasas) en el ámbito citoplasmático, a partir de la metionina absorbida con los alimentos y de la ATP existente como reserva energética en toda célula viviente.

25. Se sabe también desde hace tiempo que la SAM es un producto de importancia fundamental en gran número de reacciones biológicas de transmetilación enzimática, por lo cual se la ha considerado siempre un reactivo muy importante en Bioquímica.

Sin embargo, el gran problema con esta sustancia ha sido creado siempre por su extrema labilidad a la temperatura del ambiente o superior a la del ambiente y por métodos de producción laboriosos y no fáciles de realizar en escala industrial.

En estos últimos años, las investigaciones dirigidas hacia estabilizar la SAM en tal grado que se haga posible su empleo en el campo de la investigación biológica se han orientado hacia la preparación de sales estables en condiciones normales de temperatura y de humedad.

Se ha llegado así a la preparación del cloruro y del sulfato de SAM, utilizables únicamente como reactivos en Bioquímica y por tiempos breves, pues aún en estado seco su estabilidad es limitada en el tiempo cuando las temperaturas son bajas. Además, sus procedimientos de preparación resultan útiles para la producción de cantidades pequeñas, pero no ciertamente para actuar en escala industrial.

Nosotros hemos hallado ahora, de manera completamente inesperada, nuevas sales de la SAM estables indefinidamente en el tiempo a temperaturas hasta 45° C y preparables con un nuevo procedimiento fácil de realizar en escala industrial, con grandes rendimientos y de modo económico; estas sales han demostrado sorprendentemente poseer fuerte poder curativo en muchos campos de la terapéutica humana, a menudo desprovistos aparentemente de correlación entre sí.

Las nuevas sales objeto de este invento son sales de la SAM con ácidos sulfónicos las cuales corresponden

den a la fórmula general SAM.  $4\text{RSO}_3\text{H}$ , en la que  $\text{RSO}_3\text{H}$  es uno de los ácidos siguientes :

- metansulfónico,  $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$ ,
- etansulfónico,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{SO}_3\text{H}$ ,
- 5. n-dodecansulfónico,  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_3\text{H}$ ,
- 1-octadecansulfónico,  $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{SO}_3\text{H}$ ,
- 2-cloroetansulfónico,  $\text{ClC}_2\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}$ ,
- 2-bromoetansulfónico,  $\text{BrC}_2\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}$ ,
- 2-hidroxi-etansulfónico,  $\text{HOC}_2\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}$ ,
- 10. 3-hidroxi-propansulfónico,  $\text{HOC}_3\text{H}_6\text{SO}_3\text{H}$ ,
- d,l-10-canfosulfónico,  $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}\text{SO}_3\text{H}$ ,
- d-, l-, d,l-3-bromocanfo-10-sulfónico,  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{BrO}\text{SO}_3\text{H}$ ,
- o cisteico,  $\text{C}_3\text{H}_6\text{NSO}_3\text{H}$ .

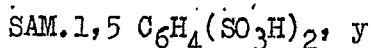
Objeto de este invento son también sales de la SAM con ácidos sulfónicos correspondientes a la fórmula general SAM.  $3\text{RSO}_3\text{H}$  en la que  $\text{RSO}_3\text{H}$  es uno de los ácidos siguientes :

- bencensulfónico,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_3\text{H}$ ,
- p-cloro-bencensulfónico,  $\text{ClC}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}$ ,
- 20. 2-mesitilbencensulfónico,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}_6\text{H}_2\text{SO}_3\text{H}$ ,
- 4-bifenilsulfónico,  $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{SO}_3\text{H}$ ,
- 1-naftalensulfónico,  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{SO}_3\text{H}$ ,
- 2-naftalensulfónico,  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{SO}_3\text{H}$ ,
- 5-sulfosalicílico,  $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_3\text{SO}_3\text{H}$ , o
- 25. p-acetilbencensulfónico,  $\text{C}_8\text{H}_7\text{O}\text{SO}_3\text{H}$ .

Por último, objeto de este invento son sales de la SAM con los ácidos siguientes :

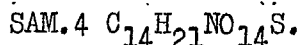
1,2-etandisulfónico, correspondiente a la fórmula  
SAM.2  $\text{C}_2\text{H}_4(\text{SO}_3\text{H})_2$ ,

o-bencendisulfónico, correspondiente a la fórmula



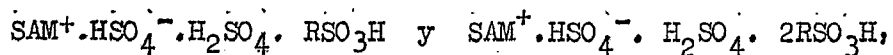
condroitinsulfúrico, correspondiente a la fórmula

5. la



Son además objeto de este invento las sales dobles siguientes entre el ácido sulfúrico y uno cualquiera de los ácidos sulfónico citados, las cuales corresponden

10. a las fórmulas generales :



donde  $\text{RSO}_3\text{H}$  indica uno cualquiera de dichos ácidos sulfónicos o representa el equivalente ácido para los ácidos etandisulfónico, o-bencendisulfónico y condroitinsulfúrico.

15.

El gran progreso técnico realizado con estas nuevas sales consiste en su estabilidad con el tiempo a 45°, en estado seco.

20. Todos los ácidos objeto de este invento mantienen inalterado su contenido de SAM aún después de 360 días a 45° en estado seco. Las dos sales más estables de la SAM que se conocen hasta ahora, el cloruro y el sulfato, muestran después de 30 días a 45° en estado seco un contenido de SAM que es respectivamente del 20% y del 50%; después de 60 días, la primera está completamente descompuesta, mientras que el sulfato contiene únicamente el 5% de la SAM inicial.

25.

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

- a) preparación de una solución rica en SAM, ya sea por extracción de sustancias naturales que la contengan, ya sea por síntesis enzimática de adenosintrifosfato (ATP) y metionina;
- 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; o la acetona, la metiletilcetona, la metilisobutilcetona, el acetato de etilo, el tetrahidrofurano, el 2-metoxietanol, el 2-etoxietanol, el dioxano y la dimetilformamida;
- c) disolución del precipitado filtrado en una solución de uno de los ácidos citados antes en un alcohol como el metanol, el etanol, el 1-propanol, el 2-propanol, el 1-butanol, el 2-butanol, el secubutanol o bien el 2-metoxietanol o el 2-etoxietanol;
- d) adición a la solución de un disolvente orgánico miscible con el alcohol utilizado, como el benceno, el tolueno, el éter dietílico, el éter diisopropílico, la acetona, la metiletilcetona, la metilisobutilcetona, el acetato de etilo o de metilo, el tetrahidrofurano o el cloroformo;
- e) separación del líquido orgánico y redisolución del precipitado en una solución del mismo ácido utilizado en la fase c) en uno de los disolventes alcohólicos de la misma fase c) y tratamiento con carbón decolorante de la solución;

- f) adición a la solución de un disolvente orgánico apto para suscitar la precipitación de la sal de SAM pura, bien cristalina y filtrable, elegido entre uno de los que se han indicado en la fase d).
- 5.

Para obtener las sales dobles con el ácido sulfúrico, el procedimiento es idéntico en las dos primeras fases, mientras que las fases sucesivas pueden realizarse así:

10. c') disolución del precipitado filtrado en una mezcla constituida por volúmenes iguales de un disolvente parcialmente miscible con el agua, como la metiletiletetona, la metilisobutilcetona, el n-butanol o el isobutanol, y de una solución acuosa de igual normalidad de uno de los ácidos sulfónicos citados antes y ácido sulfúrico.
15. d') separación del estrato orgánico y adición a la solución acuosa de un disolvente cetónico o alcohólico completamente soluble en agua.
20. e') redisolución del procedimiento en una solución al 10-20% del mismo ácido utilizado en la fase c') en uno de los disolventes alcohólicos de la fase c) y tratamiento con carbón decolorante de la solución.
25. f') adición de un disolvente orgánico apto para suscitar la precipitación de la sal de SAM pura, bien cristalina y filtrable.

Según una variante para obtener las sales

dobles, se utiliza la sal sencilla, tal como se obtiene al final de la fase d) expuesta antes, y luego se realizan las fases siguientes :

5. e") redisolución del precipitado en una solución acuosa de igual normalidad de ácido sulfúrico y al mismo ácido utilizado en la fase c) anterior y tratamiento con carbón decolorante de la solución.
- f") adición de un disolvente orgánico apto para suscitar la precipitación de la sal de SAM pura, bien cristalina y filtrable.
- 10.

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

15. Según una alternativa, se trata la levadura (Saccharomyces cerevisiae, Torulopsis utilis, Candida utilis, etc.), enriquecida en SAM mediante adición de metionina en condiciones oportunas (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 la solución del 100% prácticamente 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 período de 15 a 45 minutos (preferentemente, de 30 minutos).
- 20.
- 25.

Se añade luego ácido sulfúrico y se prosigue la lisis por un tiempo comprendido entre 1 hora y 2 horas

(de preferencia, 1 1/2 horas).

- Cabe hacer resaltar que la lisis de las células de levadura efectuada con una mezcla de disolvente orgánico y ácido sulfúrico diluido es muchísimo más conveniente que la que normalmente se realiza con ácido perclórico a la temperatura del ambiente o con ácido acético a 60°C y similares, por cuanto no sólo se produce a la temperatura del ambiente, muy favorable para la estabilidad de la SAM, sino que se desarrolla en condiciones tales que la solución resulta fácilmente filtrable de los residuos celulares y no contiene ninguna de las impurezas que aparecen cuando se utilizan los otros medios de lisis y que son difíciles de eliminar con los procedimientos conocidos para la preparación de la SAM pura.
5. Según otra alternativa, la fase a) se realiza preparando la SAM por síntesis enzimática mediante acción de la enzima ATP-metionina-adenosiltransferasa (E.C. 2.4.2.12) sobre una mezcla de incubación que contiene adenosintrifosfato (ATP) y metionina.
10. Lo esencial para los fines de la realización industrial de este método es que la enzima sea pura y se halle en forma fácilmente aislable tanto de la mezcla de incubación de partida como de la SAM producida.
15. El solicitante ha hallado un procedimiento para la purificación de la enzima ATP-metionina-adenosil-transferasa mediante cromatografía por afinidad, así como un método de reacción en columna, que permiten alcanzar dichos objetos.
20. La cromatografía por afinidad de la enzima espe-
- 25.

cífica según este invento se realiza haciendo filtrar una solución que la contiene (por ejemplo, un extracto bruto de levadura o de Escherichia coli) por una columna cargada de un soporte sólido al que está ligado covalentemente un grupo que actúa como inhibidor competitivo de la propia enzima. De manera plenamente insospechada se ha descubierto que un relleno óptimo para tal columna de purificación lo constituye un gel de polisacárido activado al que está ligada covalentemente la L-lisina.

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

10. Sin embargo, 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 disminuida con el tiempo y además la enzima, después de un solo empleo en la síntesis de la SAM, quedaba destruída en las operaciones sucesivas de aislamiento de la propia SAM.

15. El solicitante ha descubierto que, en cambio, se obtienen resultados óptimos haciendo adsorber el eluato que contiene la enzima específica sobre un soporte sólido idóneo y haciendo que se produzca en columna la reacción catalítica entre la metionina y el ATP que lleva a la formación de SAM.

20. Un soporte sólido apto es el constituido por un

25.

polisacárido activado con un reactivo adecuado para ligar proteínas a soportes sólidos, como, por ejemplo, el bromuro de cianógeno.

5. Haciendo filtrar 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 muestra la cromatografía sobre capa tenue según Anal. Biochem. 4, 16-28(1971).

15. El ácido picrolónico tiene precisamente una acción selectiva extremada y sorprendente. En efecto, los otros agentes precipitantes añadidos hasta hoy, como el ácido pícrico, la sal de Reinecke, el ácido bórico, etc., dan lugar a precipitados muy impuros, que exigen siempre una purificación sucesiva de la SAM por cromatografía en columna de cambio iónico, operación bastante costosa y de difícil realización industrial. Además, con dificultad  
20. alcanza el producto la pureza necesaria.

25. La utilización de soluciones acuosas de ácido picrolónico o de soluciones del mismo ácido en los disolventes orgánicos ya citados no presenta problemas particulares y es operación que se desarrolla a la temperatura del ambiente.

La fase c) se realiza preferentemente con soluciones que contienen uno de los ácidos sulfónicos ya mencionados, en concentraciones comprendidas entre 0,25 y 1,5 N (de preferencia, 1 N), y con uno de los disolventes

alcohólicos ya indicados. La descomposición del aducto de la SAM con el ácido picrolónico es completa, como lo demuestra la disolución total del sólido.

5. La fase d) del procedimiento se realiza empleando preferentemente de 4 a 10 volúmenes (respecto al volumen de la solución alcohólica) de un disolvente tomado del grupo que comprende el benceno, el tolueno, el éter dietílico, el éter diisopropílico, la acetona, la metilisobutilcetona, el acetato de etilo o de metilo y el tetrahydro  
10. furano.

La fase e) del procedimiento constituye con la fase sucesiva f) el paso concluyente de la obtención de la deseada sal de SAM, esta sal, procedente de la fase d) anterior, se vuelve a disolver en una solución de normalidad comprendida entre 0,1 y 0,5 N (de preferencia, 0,25  
15. N) del mismo ácido utilizado en la fase c) anterior en un disolvente elegido entre los alcoholes de 1 a 4 átomos de carbono, el 2-metoxietanol y el 2-etoxietanol.

La fase sucesiva f) se realiza empleando preferentemente de 4 a 8 volúmenes (respecto al volumen de la  
20. solución alcohólica) de un disolvente orgánico tomado del grupo constituido por el benceno, el tolueno, el éter dietílico, el éter diisopropílico, la acetona, la metiletiletona, la metilisobutilcetona, el acetato de etilo o de metilo, el tetrahydrofurano y el cloroformo.  
25.

Las sales simples de SAM obtenidas según este invento son, como ya se ha dicho, conservables indefinidamente y prácticamente sin alteración, en estado seco.

El procedimiento hallado por nosotros excluye

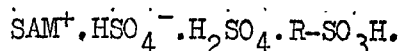
el agua en todas las fases sucesivas a la precipitación con ácido picrolónico, asegurando por ello la ausencia absoluta de vestigios, aún mínimos, de impurezas solubles en agua.

5. Para obtener sales dobles de la SAM con el ácido sulfúrico y una de las sales sulfónicas tomada de las ya citadas en la primera variante, la fase c') del procedimiento se efectúa preferentemente con soluciones acuosas que contienen uno de los ácidos sulfónicos mencionados antes y ácido sulfúrico en concentraciones comprendidas ambas entre 0,05 y 0,2 N (de preferencia, 0,1 N) en un disolvente orgánico parcialmente miscible con el agua, como la metiletiletetona o el n-butanol. La utilización del disolvente orgánico permite reducir mucho las soluciones acuosas ácidas necesarias para la descomposición del precipitado y elimina prácticamente todo el ácido picrolónico.
- 10.
- 15.

20. 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. Se ha descubierto también, sorprendentemente, que si en la fase e') se emplea la cantidad mínima de alcohol necesaria para disolver el precipitado procedente de la fase d'), en la fase sucesiva f') de precipitación se separa la sal doble
25.  $SAM^+ \cdot HSO_4^- \cdot H_2SO_4 \cdot 2R-SO_3H$ .

Si en cambio en la fase e') se emplea un volu-

men de alcohol doble a lo menos del necesario, en la fase sucesiva f') de precipitación se separa la sal doble



5. El empleo de cantidades intermedias del alcohol lleva a la formación de mezclas de las dos sales. Con R-SO<sub>3</sub>H se ha indicado uno cualquiera de los ácidos sulfónicos mencionados antes o el equivalente ácido para el ácido etandisulfónico o para el ácido condroitinsulfónico.

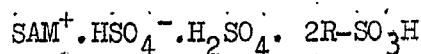
10. La precipitación final de una u otra de las nuevas sales según este invento (fase f') exige el empleo de un disolvente orgánico tomado del grupo que constituyen el benceno, el tolueno, el éter dietílico, el éter diisopropílico, el cloroformo, la acetona, la metiletilcetona, la metilisobutilcetona, el acetato de etilo o de metilo, el alcohol isoamílico y el tetrahidrofurano.

15. Las sales dobles de SAM obtenidas según este invento son, como ya se ha dicho, conservables indefinidamente en estado seco, prácticamente sin alteración.

20. La obtención de las sales dobles de la SAM con el ácido sulfúrico y una de las sales sulfónicas mencionadas antes utilizando la segunda variante consiste en volver a disolver (fase e") la sal obtenida en la fase d) en una solución de normalidad igual, comprendida de ordinario entre 0,05 y 0,2 N (de preferencia, 0,1 N), de ácido sulfúrico y del mismo ácido utilizado en la fase anterior c) en uno de los alcoholes de 1 a 4 átomos de carbono o en 2-metoxietanol o 2-etoxietanol.

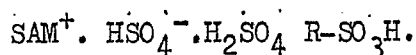
También se ha descubierto sorprendentemente que si en la fase e") se emplea la cantidad mínima de alcohol

necesaria para disolver el precipitado procedente de la fase d) en la fase sucesiva f") de precipitación, se separa la sal doble de fórmula



5. (donde R-SO<sub>3</sub>H indica uno cualquiera de los ácidos sulfónicos o representa el equivalente ácido del ácido etandisulfónico o del ácido condroitinsulfúrico).

10. Si en cambio en la fase e") se emplea un volumen de disolvente ácido doble al menos del mínimo necesario, en la fase sucesiva de precipitación f") se separa la sal doble



El empleo de cantidades intermedias del alcohol lleva a la formación de mezclas de las dos sales.

15. La precipitación final de un tipo u otro de las sales dobles (fase f") exige el empleo de un disolvente orgánico tomado del grupo que constituyen el benceno, el tolueno, el éter dietílico y el diisopropílico, el cloroformo, los alcoholes de 4 y 5 átomos de carbono, el acetato de etilo o de metilo, el tetrahidrofurano, la acetona, la metiletilcetona y la metilisobutilcetona.

20. En los ejemplos que siguen se ilustra el método de preparación de las nuevas sales de este invento. Se da por entendido que estos ejemplos tienen valor meramente ilustrativo y no son limitativos del invento.
- 25.

#### EJEMPLO 1

Se añaden 90 kg de levadura enriquecida en SAM (6,88 g/kg) según Schlenk (Enzymologia, 29, 283 -1965-) a 11 litros de acetato de etilo y 11 litros de agua a la

temperatura del ambiente. Después de 30 minutos de agitación enérgica, se agregan 50 litros de ácido sulfúrico 0,35 N y se prosigue la agitación por 1 1/2 horas más. Filtrando y lavando con agua, se obtienen 140 litros de solución que contiene 4,40 g/litro de SAM, equivalente al 99,5 % de la existente en el material de partida.

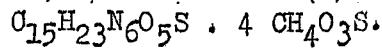
5. Con agitación, se añade a la solución una solución de 2,3 kg de ácido picrolónico en 25 litros de metil etilcetona. Después de una noche de reposo, se separa por centrifugación el precipitado y se le lava con agua.

10. Agitando y a la temperatura del ambiente, se disuelve el precipitado en 6,2 litros de una solución 1 N de ácido metansulfónico en metanol. Después de filtrar para separar vestigios de materia insoluble, se añaden a la solución 50 litros de acetona. Una vez sedimentado por completo el precipitado, se decanta la solución sobrenadante y se lava con un poco de acetona el residuo insoluble.

15. Se disuelve el precipitado en 25 litros de una solución 0,25 N de ácido metansulfónico en metanol, se añade carbón decolorante y se filtra. Se agregan al filtrado 125 litros de metilisobutilcetona, con lo que se precipitan 1089 g de una sal bien cristalina y fácilmente filtrable, soluble en más del 20 % en agua con formación de una solución incolora. Esta sal es poco soluble en los disolventes orgánicos corrientes. En la cromatografía sobre capa tenue según Anal. Biochem. 4, 16-18 (1971), el producto aparece exento de toda impureza.

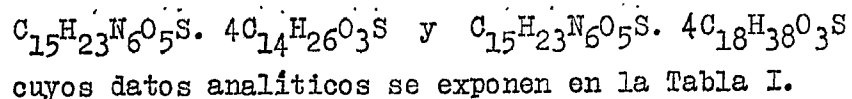
20. Los datos analíticos, expuestos en la Tabla I,

concuerdan con un compuesto de la fórmula :



5. El nuevo compuesto se ha identificado además con el método enzimático basado en la metilación enzimática de nicotinamida y ácido guanidinacético con la SAM (G.L. Cantoni, J. Biol. Chem. 189, 745 -1951-; G. De la Hoba, B.A. Jameison, S.H. Mudd y H.H. Richards, J. Am. Chem. Soc. 81, 3975 -1959-).

10. Repitiendo el procedimiento de modo idéntico pero utilizando los ácidos n-dodecansulfónico y l-n-octadecansulfónico, se obtienen respectivamente sales de la fórmula :



15.

EJEMPLO 2

A 70 litros de una solución procedente de la lisis de las células de levadura obtenidos empleando la misma materia prima y el mismo método que en el Ejemplo 1 se añaden 1,15 kg de ácido pterolónico disueltos en 10 litros de alcohol isobutílico.

20.

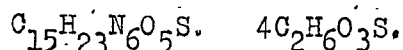
Después de una noche de reposo, se separa por centrifugación el precipitado que se ha formado.

25. A la temperatura del ambiente y con agitación, se disuelve el precipitado en 3,1 litros de una solución 1 N de ácido etansulfónico en etanol. Después de filtrar para separar de una pequeña cantidad de materia insoluble, se añaden a la solución 25 litros de éter dietílico y se la deja en reposo. A continuación se filtra y se lava el sólido con un poco de éter.

Se disuelve el sólido en 12,5 litros de una solución 0,25 N de ácido etansulfónico en etanol, se añade carbón decolorante y se filtra. Al filtrado se agregan 63 litros de benceno.

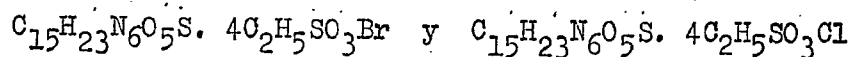
5. Se precipitan 585 g de sal, que es filtrada y secada. El compuesto resulta soluble en agua en más del 20% y es poco soluble en los disolventes orgánicos corrientes. En la cromatografía sobre capa tenue como en el Ejemplo 1, el compuesto aparece exento de toda impureza.

10. Los datos analíticos, expuestos en la Tabla I, deponen por un producto de la fórmula :



El nuevo compuesto se ha identificado además con el método enzimático expuesto en el Ejemplo 1.

15. Repitiendo el procedimiento de manera idéntica pero utilizando los ácidos 2-bromoetansulfónico y 2-cloroetansulfónico, se obtienen respectivamente sales de las fórmulas :



20. cuyos datos analíticos están expuestos en la Tabla I.

### EJEMPLO 3

25. A 70 litros de solución procedente de la lisis de las células de levadura obtenidos con el mismo método de lisis y con 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 reposo por una noche, se separa por centrifugación el precipitado y se le disuelve, a la temperatura del ambiente y con agitación, en 3,1 litros de una solución 1 N de ácido D,L-10-canfosulfúrico

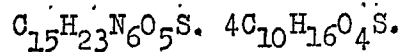
en l-propanol. Se añaden luego 25 litros de benceno. El sólido separado se disuelve en 12,5 litros de una solución 0,25 N de ácido canfosulfúrico en l-propanol y después de añadir carbón y filtrar se agregan al filtrado 63 litros de acetona.

5.

Se obtienen 928 g de sal. El compuesto es soluble en agua en más del 20 % y es poco soluble en los disolventes orgánicos corrientes. En la cromatografía sobre capa tenue el compuesto aparece exento de toda impureza.

10.

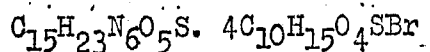
Los datos analíticos, expuestos en la Tabla 1, se exponen por un producto de la fórmula



El nuevo compuesto se ha identificado también con el método enzimático expuesto en el Ejemplo 1.

15.

Repitiendo el procedimiento de manera idéntica pero utilizando el ácido d-3-canfo-10-sulfúrico, se obtiene una sal de la fórmula :



cuyos datos analíticos se exponen en la Tabla 1.

20.

#### EJEMPLO 4

##### Purificación de la enzima específica

50 cc de Sepharose (polisacárido producido por Pharmacia Fine Chemicals AB, de Uppsala, Suecia) empacada y suspendida en agua se tratan con bromuro de cianógeno según los métodos conocidos para ligar substancias provistas de 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 de pH 8,5 y con

25.

- mezcla tampón de pH 4,5. Luego se utiliza este gel 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 0,005 M y  $H_2SO_4$  0,01 M a pH 8,0. Se depositan en la columna 2 cc ds extracto de levadura que contiene la enzima específica, obtenido por sonicación o por homogeneización con hielo seco y eventualmente enriquecido de antemano en la enzima específica. Se eluye a continuación la columna con la misma mezcla
5. tampón usada para la equilibración, mientras se sigue mediante mediciones espectrofotométricas del ultravioleta la distribución de las proteínas en el eluato. Al mismo tiempo se mide la actividad sintetásica en las diversas fracciones según J.A. Stekol, *Methods in Enzymology*, vol. VI, pág. 566 (1963). Las fracciones que manifiestan actividad sintetásica relevante se reúnen y la solución así obtenida muestra una actividad específica superior en veinte veces por lo menos al extracto bruto. En esta solución la enzima puede ser ulteriormente concentrada por precipitación con sales, con disolventes orgánicos o según otros métodos conocidos para concentrar soluciones proteicas.
- 10.
- 15.
- 20.

#### Preparación de la SAM

- Se activan 30 cc de gel Sepharose empacado, por medio de bromuro de cianógeno u otro de los métodos conocidos para ligar proteínas a matrices de gel de polisacáridos. Al gel activado se añaden 4 cc de una solución de la enzima específica purificada tal como se ha indicado antes, que contiene alrededor de 100 mg de proteína. Se agitan a 42° C durante 18 horas la suspensión de gel acti-
- 25.

vado y la solución de enzima y se lava la resina con agua. El líquido de lavado contiene alrededor de 70% de la actividad enzimática total existente al principio en la solución de la enzima específica.

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

10. El Sepharose preparado tal como se ha indicado antes se utiliza para rellenar una columna de 1,5 cm de diámetro y 20 cm de altura. Por la columna se hace pasar una solución que contiene 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 a temperatura de 25-27°.

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

20. Preparación del p-clorobencensulfonato de SAM

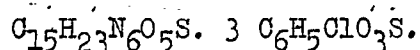
25. Se acidifican hasta pH 3 con ácido sulfúrico 103 cc de eluato que contiene 6 g/litro de SAM y se les añade con agitación una solución de 2 a 3 g de ácido picrolónico en 5 cc de metiletilcetona. Después de una noche de reposo, se filtra el precipitado y se le lava con agua.

Se vuelve a disolver el precipitado en 6,2 cc de una solución 1 N de ácido p-clorobencensulfónico en 2-metoxietanol y se añaden 50 cc de tolueno. El sólido

separado se disuelve en 12,5 cc de una solución 0,25 N de ácido p-clorobencensulfónico en 2-metoxietanol y, después de añadir carbón y filtrar, se agregan al filtrado 60 cc de cloroformo.

5. Se obtienen 1,43 g de sal. El compuesto es soluble en agua en más del 20% y resulta poco soluble en los disolventes orgánicos corrientes. En la cromatografía sobre capa tenue la sal aparece exenta de toda impureza.

10. Los datos analíticos, que se exponen en la Tabla 1, deponen por un compuesto de la fórmula :



El nuevo compuesto se ha identificado además con el método enzimático expuesto en el Ejemplo 1.

15. Repitiendo el procedimiento de modo idéntico pero utilizando los ácidos p-acetilbencensulfónico, o-bencendisulfónico, 4-bifenilsulfónico, 2-mesitilensulfónico y 5-sulfosalicílico se obtienen respectivamente sales de fórmula :

20.  $C_{15}H_{23}N_6O_5S \cdot 3C_8H_8O_4S$  ;  $C_{15}H_{23}N_6O_5S \cdot 1,5 C_6H_6O_6S_2$  ;  
 $C_{15}H_{23}N_6O_5S \cdot 3C_{12}H_{10}O_3S$  ;  $C_{15}H_{23}N_6O_5S \cdot 3C_9H_{12}O_3S$  ;  
 $C_{15}H_{23}N_6O_5S \cdot 3C_7H_6O_6S$

cuyos datos analíticos se exponen en la tabla 1.

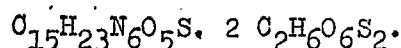
#### EJEMPLO 5

25. Se disuelve a la temperatura del ambiente y con agitación en 3,1 litros de una solución 1 N de ácido 1,2-etandisulfónico en metanol el precipitado obtenido después de añadir ácido picrolónico a 70 litros de solución como la del Ejemplo 1.

5. Se agregan luego 25 litros de acetona. El sólido separado se disuelve en 12,5 litros de una solución 0,25 N de ácido 1,2-etandisulfónico en metanol y, después de añadir carbón y filtrar, se añaden al filtrado 60 litros de metilisobutilcetona.

Se obtienen 546 g de sal. El compuesto es soluble en más del 20% en agua y poco soluble en los disolventes orgánicos corrientes. En la cromatografía sobre capa tenue el compuesto aparece exento de toda impureza.

10. Los datos analíticos, que se exponen en la Tabla 1, deponen por un producto de la fórmula :



El nuevo compuesto se ha identificado además con el método enzimático expuesto en el Ejemplo 1.

15.

#### EJEMPLO 6

A la temperatura del ambiente y con agitación, se disuelve en 3,1 litros de una solución 1 N de ácido 2-hidroxietansulfónico en etanol el precipitado obtenido después de añadir ácido picrolónico a 70 litros de solución como la del Ejemplo 1.

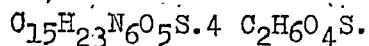
20.

Se agregan luego 25 litros de metilisobutilcetona y el sólido separado se disuelve en 12,5 litros de una solución 0,25 N de ácido 2-hidroxietansulfónico en etanol. Después de añadir carbón y de filtrar, se añaden al filtrado 80 litros de tetrahidrofurano.

25.

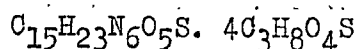
Se obtienen 632 g de sal. El compuesto es soluble en agua en más del 20 % y poco soluble en los disolventes orgánicos corrientes. En la cromatografía sobre capa tenue, el compuesto aparece exento de toda impureza.

Los datos analíticos, expuestos en la Tabla I, deponen por un producto de la fórmula :



5. El nuevo compuesto se ha identificado además con el método enzimático expuesto en el Ejemplo 1.

Repitiendo el procedimiento de manera idéntica pero utilizando el ácido 3-hidroxi-propansulfónico, se obtiene una sal de fórmula



10. cuyos datos analíticos están expuestos en la Tabla I.

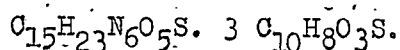
#### EJEMPLO 7

15. A la temperatura del ambiente y con agitación, se disuelve en 3,1 litros de una solución 1 N de ácido 1-naftalensulfónico en metanol el precipitado obtenido después de añadir ácido picrolónico a 70 litros de solución como la del Ejemplo 1.

20. Se agregan luego 25 litros de metiletilcetona y el sólido separado se disuelve en 12,5 litros de una solución 0,25 N de ácido 1-naftalensulfónico en metanol. Después de añadir carbón y filtrar, se agrega el filtrado a 70 litros de metiletilcetona.

25. Se obtienen 717 g de sal. El compuesto es soluble en agua en más del 20 % y resulta poco soluble en los disolventes orgánicos corrientes. En la cromatografía sobre capa tenue, el compuesto aparece exento de toda impureza.

Los datos analíticos que están expuestos en la Tabla I concuerdan con un producto de la fórmula :



El nuevo compuesto se ha identificado además con

el método enzimático expuesto en el Ejemplo 1.

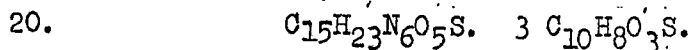
EJEMPLO 8

5. A la temperatura del ambiente y con agitación, se disuelve en 3,1 litros de una solución 1 N de ácido 2-naftalensulfónico en 2-propanol el precipitado obtenido después de añadir ácido picrolónico a 70 litros de solución como la del Ejemplo 1.

10. Se agregan luego 25 litros de éter diisopropílico y el sólido separado se disuelve en 12,5 litros de una solución 0,25 N de ácido 2-naftalensulfónico en metanol. Después de añadir carbón y filtrar, se añaden al filtrado 70 litros de acetato de etilo.

15. Se obtienen 710 g de sal. El compuesto es soluble en agua en más del 20 % y resulta poco soluble en los disolventes orgánicos corrientes. En la cromatografía sobre capa tenue el compuesto aparece exento de toda impureza.

Los datos analíticos, que se exponen en la Tabla 1, deponen por un producto de la fórmula



El nuevo compuesto se ha identificado también con el método enzimático que se ha expuesto en el Ejemplo 1.

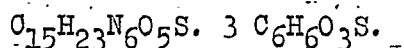
EJEMPLO 9

25. A la temperatura del ambiente y con agitación, se disuelve en 3,1 litros de una solución 1 N de ácido bencensulfónico en 2-butanol el precipitado obtenido después de añadir ácido picrolónico a 70 litros de solución como la del Ejemplo 1.

Se añaden luego 25 litros de éter diisopropílico y el sólido separado se disuelve en 12,5 litros de una solución 0,25 N de ácido bencensulfónico en metanol. Después de añadir carbón y filtrar, se agregan al filtrado 65 litros de acetato de etilo.

Se obtienen 612 g de sal. El compuesto resulta soluble en agua en más del 20% y es poco soluble en los disolventes orgánicos corrientes. En la cromatografía sobre capa tenue, el compuesto aparece exento de toda impureza.

Los datos analíticos, expuestos en la Tabla I deponen, por un producto de la fórmula :



El nuevo compuesto ha sido identificado además con el método enzimático que se ha expuesto en el Ejemplo 1.

#### EJEMPLO 10

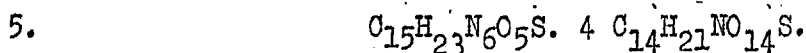
A la temperatura del ambiente y con agitación, se disuelve en 6,2 cc de una solución 1 N de ácido condroitinsulfúrico en metanol el precipitado obtenido después de añadir ácido picrolónico a 103 cc de solución como la del Ejemplo 4.

Se agregan luego 50 cc de acetona y el sólido separado se disuelve en 25 cc de una solución 0,25 N de ácido condroitinsulfúrico en metanol. Después de añadir carbón y filtrar, se añaden al filtrado 125 cc de metil-isobutilcetona.

Se obtienen 3,27 g de sal. El compuesto es soluble en agua en más del 20% y resulta poco soluble en los disolventes orgánicos corrientes. En la cromatografía

sobre capa tenue, el compuesto aparece exento de toda impureza.

Los datos analíticos, expuestos en la Tabla 1, deponen por un producto de fórmula :

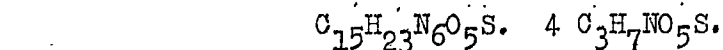


El nuevo compuesto se ha identificado además con el método enzimático expuesto en el Ejemplo 1.

#### EJEMPLO 11

10. A la temperatura del ambiente y con agitación, se disuelve en 6,2 cc de una solución 1 N de ácido cisteico en 2-etoxietanol el precipitado obtenido después de añadir ácido picrolónico a 103 cc de solución como la del Ejemplo 4. Se agregan luego 50 cc de acetato de metilo y el sólido separado se disuelve en 25 cc de una solución
15. 0,25 N de ácido cisteico en 2-etoxietanol. Después de añadir carbón y filtrar, se añaden al filtrado 125 cc de acetato de metilo.

Se obtienen 1,53 g de sal. El compuesto es soluble en agua en más del 20 % y resulta poco soluble en los disolventes orgánicos corrientes. En la cromatografía sobre capa tenue, el compuesto aparece exento de toda impureza. Los datos analíticos, expuestos en la Tabla 1, deponen por un producto de fórmula :

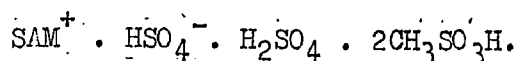


25. El nuevo compuesto ha sido identificado también con el método enzimático expuesto en el Ejemplo 1.

#### EJEMPLO 12

Preparación de las sales dobles de la SAM con ácido sulfúrico y ácido metansulfónico

- Se acidifican hasta pH 3 con  $H_2SO_4$  103 cc de eluato que contiene 6 g/litro de SAM, obtenido como en el Ejemplo 4, y se les añade con agitación una solución de 2,3 g de ácido picrolónico en 25 cc de metiletilcetona (disolvente a). Después de una noche de reposo, se filtra el precipitado y se le lava con agua. Luego se le vuelve a disolver en 18 cc de una solución 0,1 N en  $H_2SO_4$  y en ácido metansulfónico y en 18 cc de metiletilcetona (disolvente a).
- 5.
10. Después de agitación y reposo, se separa la capa orgánica, se agita la capa acuosa con un poco de metiletilcetona para eliminar los últimos vestigios de ácido picrolónico y después de separar la fase acuosa se añade carbón decolorante y se filtra. Resultan 16,5 cc de solución acuosa incolora, que contienen 33,8 g/litro de SAM, equivalentes por tanto al 90 % de la SAM contenida en la solución original. Analizada por cromatografía sobre capa tenue, la solución muestra contener solamente SAM. Se vierten 16,5 cc de solución en 100 cc de acetona (disolvente b) y después de agitación y reposo se separa el líquido por decantación. Se disuelve el sólido en 6,6 g de una solución metanólica (disolvente c) al 15 % de ácido metansulfónico y después de añadir carbón decolorante y filtrar se vierte la solución en 25 cc de éter etílico (disolvente d).
- 15.
- 20.
25. Después de reposo, se filtra. La sal obtenida, bien cristalina, pesa 1,2 g y tiene la composición :

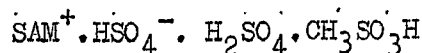


Sus características analíticas están expuestas en la Ta-

bla 2.

5. Repitiendo el procedimiento de manera idéntica pero utilizando ácidos sulfónico y disolventes como los indicados en la Tabla 2, se obtienen sales dobles que se reseñan en la Tabla 2 con sus características analíticas.

10. Repitiendo el procedimiento de modo idéntico pero empleando 3,3 g de solución metanólica al 15 % de ácido metansulfónico, en la fase sucesiva de precipitación con 25 cc de éter etílico (disolvente d) se obtienen 1,05 g de sal cuya composición es :



y cuyas características analíticas se exponen en la Tabla 3.

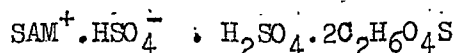
15. Repitiendo el procedimiento de modo idéntico pero utilizando ácido sulfónico y disolventes como los indicados en la Tabla 3, se obtienen sales dobles que se reseñan en la Tabla 3, con sus características analíticas.

#### EJEMPLO 13

Preparación de las sales dobles de la SAM con ácido sul-

20. fúrico y ácido 2-hidroxietansulfónico

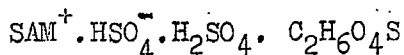
25. Se vuelve a disolver en 20 litros de una solución 0,1 N en ácido sulfúrico y 0,1 N en ácido 2-hidroxietansulfónico en metanol (disolvente a) la sal obtenida de la primera precipitación de la SAM con ácido 2-hidroxietansulfónico, expuesta en el Ejemplo 6. Después de añadir carbón decolorante, se filtra y al filtrado se añaden 100 litros de metilisobutilcetona (disolvente b). Se deja en reposo y se filtra, con lo que se obtienen 587 g de sal de la composición:



cuyas características analíticas están expuestas en la Tabla 4.

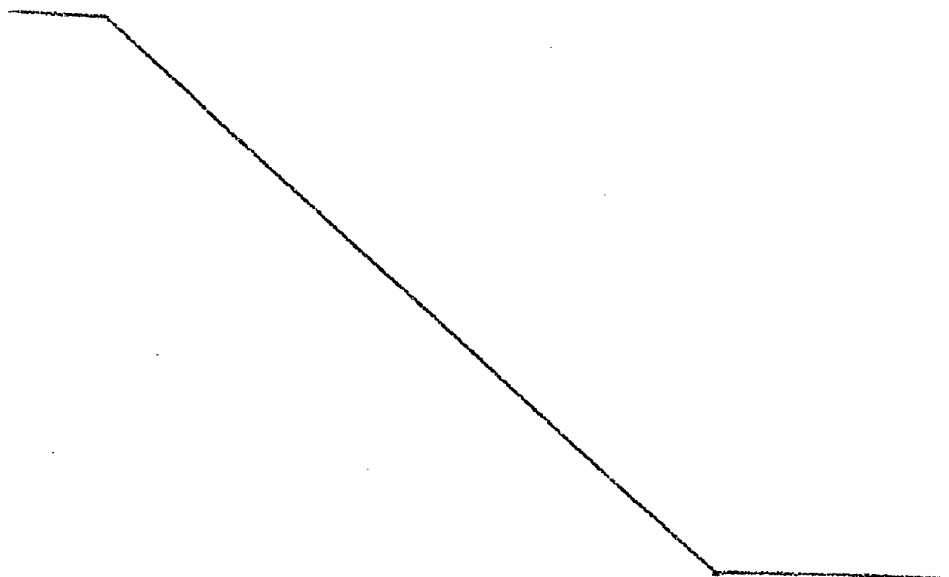
5. Repitiendo el procedimiento de modo idéntico pero utilizando las sales simples de la SAM que contienen los aniones indicados en la Tabla 4 y empleando los disolventes de la Tabla 4, se obtienen las sales dobles reseñadas en la Tabla 4 con sus características analíticas.

10. Repitiendo el procedimiento de modo idéntico pero utilizando 10 litros de solución 0,1 N de ácido sulfúrico y 0,1 N de ácido 2-hidroxietansulfónico en metanol (disolvente a), en la precipitación sucesiva con metilisobutilcetona (disolvente b) se obtienen 505 g de sal de la composición:



15. cuyas características analíticas se exponen en la Tabla 5.

20. Repitiendo el procedimiento de modo idéntico pero utilizando las sales simples de la SAM que contienen los aniones expuestos en la Tabla 5 y empleando los disolventes indicados en la Tabla 5, se obtienen las sales dobles que se reseñan en la Tabla 5 con sus características analíticas.



TABLA

*Handwritten signature*

ANION	FORMULA BRUTA	% de N hallado	% de N calculado	% de S hallado	% de S calculado	% de hallado	SAM calculado	max 260 nm E% (6N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	
5.	Metansulfonato	C <sub>19</sub> H <sub>59</sub> N <sub>6</sub> O <sub>17</sub> S <sub>5</sub>	10,51	10,72	20,30	20,45	50,3	50,96	188
	Dodecansulfonato	C <sub>71</sub> H <sub>127</sub> N <sub>6</sub> O <sub>17</sub> S <sub>5</sub>	5,55	5,61	10,91	10,70	26,37	26,68	98
	1-octadecansulfonato	C <sub>87</sub> H <sub>175</sub> N <sub>6</sub> O <sub>17</sub> S <sub>5</sub>	4,72	4,84	9,05	9,22	22,75	22,99	85
	Etansulfonato	C <sub>23</sub> H <sub>47</sub> N <sub>6</sub> O <sub>17</sub> S <sub>5</sub>	9,82	10,01	18,62	19,08	47,12	47,55	175
	2-bromoetansulfonato	C <sub>23</sub> H <sub>43</sub> N <sub>6</sub> O <sub>17</sub> S <sub>5</sub> Br <sub>4</sub>	7,35	7,28	13,68	13,88	34,67	34,58	127
10.	2-cloroetansulfonato	C <sub>23</sub> H <sub>43</sub> N <sub>6</sub> O <sub>17</sub> S <sub>5</sub> Cl <sub>4</sub>	8,58	8,59	16,31	16,39	40,89	40,84	151
	10-canfosulfonato	C <sub>55</sub> H <sub>87</sub> N <sub>6</sub> O <sub>21</sub> S <sub>5</sub>	5,97	6,33	11,53	12,06	29,52	30,06	111
	d-3-bromocanfo-10-sulfonato	C <sub>55</sub> H <sub>83</sub> N <sub>6</sub> O <sub>21</sub> S <sub>5</sub> Br <sub>4</sub>	5,14	5,11	9,81	9,75	24,02	24,30	89
	2-hidroxi-etansulfonato	C <sub>23</sub> H <sub>47</sub> N <sub>6</sub> O <sub>17</sub> S <sub>5</sub>	8,91	9,30	17,25	17,73	43,82	44,19	163
	p-acetilbencensulfonato	C <sub>39</sub> H <sub>47</sub> N <sub>6</sub> O <sub>21</sub> S <sub>5</sub>	7,75	7,90	12,01	12,05	37,31	37,54	138
15.	o-bencendisulfonato	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>14</sub> S <sub>4</sub>	11,10	11,08	16,76	16,90	52,75	52,64	194
	4-bifenilsulfonato	C <sub>51</sub> H <sub>53</sub> N <sub>6</sub> O <sub>14</sub> S <sub>4</sub>	7,49	7,63	11,52	11,64	36,50	36,25	134
	2-mesitilensulfonato	C <sub>42</sub> H <sub>59</sub> N <sub>6</sub> O <sub>14</sub> S <sub>4</sub>	8,50	8,41	12,67	12,82	40,11	39,94	147
	5-sulfosalicilato	C <sub>36</sub> H <sub>41</sub> N <sub>6</sub> O <sub>23</sub> S <sub>4</sub>	7,99	7,97	12,01	12,17	37,68	37,90	140
20.	1,2-etandisulfonato	C <sub>19</sub> H <sub>35</sub> N <sub>6</sub> O <sub>17</sub> S <sub>5</sub>	10,31	10,78	20,03	20,55	50,68	51,22	189
	3-hidroxi propansulfonato	C <sub>27</sub> H <sub>55</sub> N <sub>6</sub> O <sub>21</sub> S <sub>5</sub>	8,79	8,75	16,55	16,70	41,32	41,61	153
	Cisteato	C <sub>27</sub> H <sub>51</sub> N <sub>10</sub> O <sub>25</sub> S <sub>5</sub>	12,50	13,02	14,68	14,90	36,92	37,12	137
	Condroitinsulfonato	C <sub>71</sub> H <sub>107</sub> N <sub>10</sub> O <sub>61</sub> S <sub>5</sub>	5,83	6,26	6,84	7,17	17,21	17,86	66
	Bencensulfonato	C <sub>33</sub> H <sub>41</sub> N <sub>6</sub> O <sub>14</sub> S <sub>4</sub>	9,34	9,62	14,22	14,67	45,18	45,69	169
	p-clorobencensulfonato	C <sub>33</sub> H <sub>38</sub> N <sub>6</sub> O <sub>14</sub> S <sub>4</sub> Cl <sub>3</sub>	8,10	8,60	12,72	13,12	40,53	40,87	151
25.	1-naftalensulfonato	C <sub>45</sub> H <sub>47</sub> N <sub>6</sub> O <sub>14</sub> S <sub>4</sub>	8,03	8,20	12,03	12,52	38,73	39,00	144
	2-naftalensulfonato	C <sub>45</sub> H <sub>47</sub> N <sub>6</sub> O <sub>14</sub> S <sub>4</sub>	7,83	8,20	11,95	12,52	38,52	39,00	144

TABLA

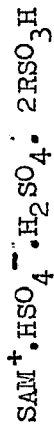
	ANION	FORMULA BRUTA	hallado	% de N calcula
5.	Metansulfonato	$C_{19}H_{39}N_6O_{17}S_5$	10,51	10,72
	Dodecansulfonato	$C_{71}H_{127}N_6O_{17}S_5$	5,55	5,61
	1-Octadecansulfonato	$C_{87}H_{175}N_6O_{17}S_5$	4,72	4,84
	Etansulfonato	$C_{23}H_{47}N_6O_{17}S_5$	9,82	10,01
	2-bromoetansulfonato	$C_{23}H_{43}N_6O_{17}S_5Br_4$	7,35	7,28
10.	2-cloroetansulfonato	$C_{23}H_{43}N_6O_{17}S_5Cl_4$	8,58	8,59
	10-canfosulfonato	$C_{55}H_{87}N_6O_{21}S_5$	5,97	6,33
	d-3-bromocanfo-10-sulfonato	$C_{55}H_{83}N_6O_{21}S_5Br_4$	5,14	5,11
	2-hidroxietansulfonato	$C_{23}H_{47}N_6O_{21}S_5$	8,91	9,30
	p-acetilbencensulfonato	$C_{39}H_{47}N_6O_{21}S_4$	7,75	7,90
15.	o-bencendisulfonato	$C_{24}H_{32}N_6O_{14}S_4$	11,10	11,08
	4-bifenilsulfonato	$C_{51}H_{53}N_6O_{14}S_4$	7,49	7,63
	2-mesitilensulfonato	$C_{42}H_{59}N_6O_{14}S_4$	8,50	8,41
	5-sulfosalicilato	$C_{36}H_{41}N_6O_{23}S_4$	7,99	7,97
	1,2-etandisulfonato	$C_{19}H_{35}N_6O_{17}S_5$	10,31	10,78
20.	3-hidroxi propansulfonato	$C_{27}H_{55}N_6O_{21}S_5$	8,79	8,75
	Cisteato	$C_{27}H_{51}N_{10}O_{25}S_5$	12,50	13,02
	Condroitinsulfonato	$C_{71}H_{107}N_{10}O_{61}S_5$	5,83	6,26
	Bencensulfonato	$C_{33}H_{41}N_6O_{14}S_4$	9,34	9,62
	p-clorobencensulfonato	$C_{33}H_{38}N_6O_{14}S_4Cl_3$	8,10	8,60
25.	1-naftalensulfonato	$C_{45}H_{47}N_6O_{14}S_4$	8,03	8,20
	2-naftalensulfonato	$C_{45}H_{47}N_6O_{14}S_4$	7,83	8,20

J-B

LA

% de N		% de S		SAM		max 260 nm
hallado	calculado	hallado	calculado	hallado	calculado	E <sup>1%</sup> (6N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
10,51	10,72	20,30	20,45	50,3	50,96	188
5,55	5,61	10,91	10,70	26,37	26,68	98
4,72	4,84	9,05	9,22	22,75	22,99	85
9,82	10,01	18,62	19,08	47,12	47,55	175
7,35	7,28	13,68	13,88	34,67	34,58	127
8,58	8,59	16,31	16,39	40,89	40,84	151
5,97	6,33	11,53	12,06	29,52	30,06	111
5,14	5,11	9,81	9,75	24,02	24,30	89
8,91	9,30	17,25	17,73	43,82	44,19	163
7,75	7,90	12,01	12,05	37,31	37,54	138
11,10	11,08	16,76	16,90	52,75	52,64	194
7,49	7,63	11,52	11,64	36,50	36,25	134
8,50	8,41	12,67	12,82	40,11	39,94	147
7,99	7,97	12,01	12,17	37,68	37,90	140
10,31	10,78	20,03	20,55	50,68	51,22	189
8,79	8,75	16,55	16,70	41,32	41,61	153
12,50	13,02	14,68	14,90	36,92	37,12	137
5,83	6,26	6,84	7,17	17,21	17,86	66
9,34	9,62	14,22	14,67	45,18	45,69	169
8,10	8,60	12,72	13,12	40,53	40,87	151
8,03	8,20	12,03	12,52	38,73	39,00	144
7,83	8,20	11,95	12,52	38,52	39,00	144

TABLA 2



ANION	DISOLVENTESS			FORMULA BRUTA	% de N Cal- Halla do	% de S Cal- Halla do	% de SAM Cal- Halla do	E 1% a 260 mm (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 6N)				
	a	b	c									
Metansul- fonato	metiletil- cetona	ace- tona	meta nol	éter etil- lico	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> N <sub>6</sub> O <sub>19</sub> S <sub>5</sub>	10,68	10,81	20,37	20,02	50,77	51,10	187
10-canfo- sulfonato	isobuta- nol	meta nol	n-bu- tanol	benceno	C <sub>35</sub> H <sub>58</sub> N <sub>6</sub> O <sub>21</sub> S <sub>5</sub>	7,96	8,12	15,19	15,01	37,84	37,51	140
2-bromoe- tansulfo- nato	n-buta- nol	eta- nol	iso- buta nol	metile- tilceto- na	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> N <sub>6</sub> O <sub>19</sub> S <sub>5</sub> Br <sub>2</sub>	8,64	8,75	16,48	16,10	41,06	41,30	151
Condroi- tinsulfa- to	metiliso- butilceto- na	ace- tona	meta nol	acetato de etilo	C <sub>43</sub> H <sub>68</sub> N <sub>8</sub> O <sub>41</sub> S <sub>5</sub>	7,40	7,13	10,59	10,72	26,39	25,95	97
p-cloro- bencensul- fato	metiletil- cetona	l-pro- panol	2-me- toxic tanol	éter etil- lico	C <sub>27</sub> H <sub>36</sub> N <sub>6</sub> O <sub>19</sub> S <sub>5</sub> Cl <sub>2</sub>	8,57	8,62	10,36	16,54	40,77	41,01	150
4-bifenil- sulfonato	metiletil- cetona	meta nol	2-eto- xieta nol	éter diil- sopropil- lico	C <sub>39</sub> H <sub>46</sub> N <sub>6</sub> O <sub>19</sub> S <sub>5</sub>	7,91	8,12	15,08	15,20	37,57	37,82	139

TABLA 3

SAM+. HSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> · RSO<sub>3</sub>H

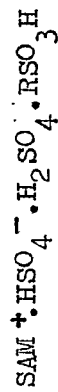
ANION	DISOLVENTES			FORMULA BRUTA	% de Cal- cula do	N Halla do	% de S Cal- cula do	% de SAM Cal- cula do	E1% a 260nm 1 cm (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 6N)			
	a	b	c									
Metansul- fonato	metile- tilceto- na	ace- tona	meta nol	éter lico	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> N <sub>6</sub> O <sub>16</sub> S <sub>4</sub>	12,17	11,95	18,57	18,71	57,83	57,62	213
Dodecan- sulfona- to	metili- sobutil- cetona	meta nol	meta- toxi- eta- nol	éter lico	C <sub>29</sub> H <sub>52</sub> N <sub>6</sub> O <sub>16</sub> S <sub>4</sub>	9,67	9,83	14,76	14,54	35,96	45,99	170
1,2-etan- disulfona to	n-but- eta- nol	meta nol	meta nol	benceno	C <sub>16</sub> H <sub>29</sub> N <sub>6</sub> O <sub>16</sub> S <sub>4</sub>	11,17	11,01	17,04	17,25	53,07	53,22	196
p-acetil- bencensul- fonato	metile- tilceto- na	pro- pa- nol	2-eto- xie- tanol	2-eto- tolueno	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> N <sub>6</sub> O <sub>17</sub> S <sub>4</sub>	10,16	10,28	15,51	15,08	48,31	48,06	178
2-mesitil- ensulfona to	isobuta- nol	meta nol	n-bu- ta- nol	clorofo- ro	C <sub>28</sub> H <sub>38</sub> N <sub>6</sub> O <sub>16</sub> S <sub>4</sub>	9,97	9,65	15,21	15,37	47,39	47,11	175
5-sulfosa- licilato	metili- sobutil- cetona	ace- tona	meta nol	metiliso- butilce- tona	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>19</sub> S <sub>4</sub>	10,34	10,08	15,78	15,45	49,19	49,00	181

TABLA 4

SAM<sup>+</sup>.HSO<sub>4</sub><sup>-</sup> . H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.2RSO<sub>3</sub>H

ANION	DISOLVENTES		FORMULA BRUTA	% de N Cal- culado do	% de S Cal- culado	Halla do	% de SAM Cal- cula do	E1% a 260mm Halla do (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 6N)
	a	b						
2-hidroxi etan- sulfonato	metanol	metil isobutil- cetona	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S <sub>5</sub>	10,02	10,15	19,23	47,62	47,43 176
Etansulfonato	2-meto- xi etanol	acetona	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> N <sub>6</sub> O <sub>19</sub> S <sub>5</sub>	10,31	10,01	19,35	49,02	49,28 181
Cisteato	isopro- panol	tetrahidrofu- rano	C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> N <sub>8</sub> O <sub>8</sub> S <sub>5</sub>	12,01	12,26	17,18	42,82	42,55 158
1-octadecansul- fonato	2-etoxi- etanol	acetato de me- tilo	C <sub>51</sub> H <sub>102</sub> N <sub>6</sub> O <sub>19</sub> S <sub>5</sub>	6,65	6,40	12,49	31,61	31,29 117
2-cloroetansul- fonato	etanol	cloroformo	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> N <sub>6</sub> O <sub>19</sub> S <sub>5</sub> Cl <sub>2</sub>	9,51	9,38	18,14	45,20	45,36 167
2-naftalensul- fonato	metanol	éter etílico	C <sub>35</sub> H <sub>42</sub> N <sub>6</sub> O <sub>19</sub> S <sub>5</sub>	8,30	8,07	15,84	39,47	39,50 146

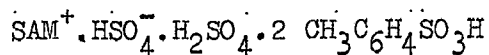
TABLA 5



ANION	DISOLVENTES		FORMULA BRUTA	% de N		% de S		% de SAM		E <sup>1%</sup> a 260 nm 1 cm (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 6N)
	a	b		Cal- cula do	Halla do	Cal- cula do	Halla do	Cal- cula do	Halla do	
2-hidroxi- tansulfona- to	metanol	metilisobu- tilcetona	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>17</sub> S <sub>4</sub>	11,66	11,45	17,79	17,95	55,42	55,15	204
3-hidroxi- propensul- fonato	2-etoxie- tanol	éter etili- co	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> N <sub>6</sub> O <sub>17</sub> S <sub>4</sub>	11,44	11,62	17,45	17,01	54,36	54,30	201
d-3-bromo- canfo-10- sulfonato	n-buta- nol	cloroformo	C <sub>25</sub> H <sub>41</sub> N <sub>6</sub> O <sub>17</sub> S <sub>4</sub> Br	9,28	9,08	14,16	14,20	44,10	43,91	163
1-naftalen- sulfonato	etanol	éter etili- co	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> N <sub>6</sub> O <sub>16</sub> S <sub>4</sub>	10,47	10,59	15,97	16,12	49,75	49,62	183
Bencensulfo- nato	etanol	metilisobu- tilcetona	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>16</sub> S <sub>4</sub>	11,16	11,22	17,03	16,95	53,06	53,15	196
o-bencendi- sulfonato	2-meto- xi etanol	benceno	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> N <sub>6</sub> O <sub>16</sub> S <sub>4</sub>	11,78	11,53	17,97	17,62	55,97	55,65	206

Repitiendo el procedimiento de modo idéntico 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

5.



que tiene idénticas características que las indicadas para el producto del Ejemplo 1.

- - - - -

10. Se sabe ya desde hace algunos años, por las investigaciones bioquímicas, que la SAM es en los organismos vivientes el único donador específico de metilo para las reacciones bioquímicas de transferencia del grupo  $\text{CH}_3$ , reacciones fundamentales en el metabolismo lipídico, proteídico y glucídico.

15.

A título de ejemplo citamos a continuación algunas de las reacciones más importantes de transmetilación SAM-dependientes:

- a) N-transmetilación: adenina, carnitina, carnosina, creatina, 2,6-diaminopurina, adrenalina, guanina, ordenina, N'-nicotinamida, fosfatidilcolina y ricinina;
- b) O-transmetilación: N-acetilserotina, dopamina, epinina, d-adrenalina, 1-adrenalina, ergosterol, 1-noradrenalina, pectina y ubiquinona;
- c) S-transmetilación: 2,3-dimercaptopropanol,  $\text{H}_2\text{S}$ , metionina, metilmercaptano, ácido S-mercaptopropiónico, S-mercaptoetanol, tiopirimidina y tiouracilo;
- d) C-transmetilación: citosina y timina.

25.

Refiriéndose en particular al organismo humano,

esto significa que la SAM se interfiere en los procesos metabólicos siguientes: biosíntesis de la colina; biosíntesis de la fosfatidilcolina; actividad de enzimas que requieren grupos SH; metabolismo de las catecolaminas; metabolismo de las aminos biógenas centroencefálicas; metabolismo de la serotonina; metabolismo de la histamina; metabolismo de la vitamina B 12 y del ácido fólico; metabolismo de la creatina; metabolismo de la miosina; metabolismo de las histonas; metabolismo del RNA; metabolismo del DNA; metabolismo de las sustancias proteicas; metabolismo de algunas hormonas con núcleo ciclopentanperhidrofenantrénico, entre ellas principalmente los estrógenos; metabolismo de los triglicéridos.

Se sabe también desde hace tiempo que la SAM, una vez desmetilada por las enzimas metiltransferásicas, se transforma en S-adenosilhomocisteína (SAO), que es un donador indirecto de grupos sulfhidrúlicos y por tanto tiene importancia determinante en el metabolismo de todos los compuestos que requieren, para desplegar su actividad biológica, grupos SH. Entre éstos son particularmente importantes algunas tioenozimas y los aminoácidos sulfurados.

La SAO, a su vez, es descarboxilada en el organismo y el producto descarboxilado resulta el donador principal del grupo aminopropílico, indispensable (según los hallazgos biológicos más recientes) para la biosíntesis de las poliaminas. El proceso es catalizado por diversas enzimas, entre ellas la aminopropiltransferasa específica.

Resumiendo, puede decirse que es sabido que la SAM está en el organismo humano estrechamente asociada a

todas las reacciones biológicas de:

- A - transmetilación (cesión específica del grupo  $\text{CH}_3$ )
  - B - transsulfuración (cesión específica del grupo  $\text{SH}$ )
  - C - transaminopropilación (cesión específica del grupo aminopropílico).
- 5.

La suma de estos conocimientos podía inducir a pensar que la SAM pudiera tener alguna acción terapéutica en la curación de estados patológicos asociados a condiciones carenciales o en algún modo deficitarias del organismo respecto a algunos de los muchos productos mencionados antes.

10.

Sin embargo, la inestabilidad extremada de la SAM y la ausencia hasta hoy de un método cualquiera capaz de volverla estable por tiempo suficiente en las condiciones de ambiente normales han impedido que se realizase con este producto ninguna prueba farmacológica o clínica y por lo tanto que se determinase de ella alguna utilidad práctica en el campo de la terapéutica humana.

15.

Únicamente después de la preparación de las nuevas sales de la SAM según este invento, sales que son prácticamente estables de modo indefinido a la temperatura del ambiente, ha sido posible efectuar un estudio farmacológico y clínico sistemático, que ha llevado a descubrir para las nuevas sales propiedades terapéuticas completamente sorprendentes en calidad y en intensidad.

20.

25.

De la enorme mole de datos farmacológicos y clínicos recogidos sobre estos nuevos productos se exponen a continuación sólo algunos elementos suficientes para indicar con claridad a los expertos del ramo las característi-

cas esenciales de los nuevos productos y sus principales usos en terapéutica humana.

5. Para simplificar, en lo que sigue se indicarán meramente como "sal de SAM" las nuevas sales según el invento, dada su absoluta identidad de empleo.

10. En los datos farmacológicos y clínicos la sal administrada, cualquiera que sea, se indica genéricamente con "SAM" y la cantidad de sal administrada se expresa en cantidad de SAM contenida en ella, para que resulte claro que los datos se refieren de manera idéntica a una u otra sal conforme al invento.

TOXICIDAD.-

15. Las sales de SAM objeto de este invento han resultado absolutamente desprovistas de toxicidad aguda, de toxicidad crónica, de intolerancia local y de efectos secundarios. En particular, la  $DL_{50}$  en el ratón es superior a 2,5 g/kg/os y a 1,00 g/kg/i.p.

20. Los ensayos de tolerancia y toxicidad crónica se efectuaron en ratas de raza Wistar y Sprague-Dowley, suministrando por 12 meses 4 a 8 mg/kg por día de producto: al final del tratamiento, los diversos órganos y aparatos no han mostrado ninguna alteración patológica.

25. Los ensayos de teratogénesis se efectuaron sobre conejos y sobre ratas: aún con administración de dosis masivas de SAM, alrededor de 10 veces superiores a las máximas dosis terapéuticas, no se han hallado acciones teratogénicas o de otro modo malformativas en los embriones o en los fetos a término.

La adición de dosis hasta 0,05-0,10 mg/cc de

producto a cultivos sobrevivientes de linfocitos humanos o de células hepáticas de ratón no aporta ninguna modificación en el índice de blastización de los elementos celulares.

5. La administración por vía endovenosa de dosis hasta 16 mg/kg no causa en el conejo manifestación pirogénica alguna.

10. La administración por vía venosa en el conejo y en el gato de 16 mg/kg no causa ninguna modificación de la presión carotídea, de la frecuencia cardíaca y respiratoria ni del trazado electrocardiográfico.

15. La tolerancia local de la inyección por vía intramuscular, aún después de la administración repetida por 180 días, y de la inyección endovenosa en la vena marginal del pabellón auricular del conejo, es óptima.

20. En el hombre, en sujetos voluntarios jóvenes y sanos de ambos sexos sometidos a la administración por vía endovenosa rápida o por fleboclisis de dosis de SAM equivalentes a 5-150 mg (peso medio, 70 kg), el examen contemporáneo de los valores de la presión mínima y máxima, de la frecuencia del pulso y de la respiración a 1, 5, 15, 20, 30 y 60 minutos y a 2, 3, 6, 8, 10, 12 y 24 horas del final de la administración no revela variación ninguna respecto a los valores normales.

25. El trazado electrocardiográfico no muestra ninguna variación del intervalo PQ, del trecho ST, ni aparición de extrasístoles u otras alteraciones a 30", 1', 2', 3', 5', 10' y 20' de la administración.

A cargo del aparato hemopoyético y de la fun -

cionalidad hepática y renal no se han observado variaciones estadísticamente significativas respecto a la norma.

FARMACOLOGÍA.-

5. Repetimos aquí que cada vez que, en lo que sigue, se habla de administración de SAM, se entiende que se ha administrado una cualquiera de las sales simples o dobles conformes a este invento y que su actividad es por completo equivalente. Como es obvio, para tener un parámetro único de referencia se alude siempre al contenido en SAM de las diversas sales.
- 10.

- Para determinar en forma indicativa como se distribuye la SAM en los tejidos, se ha preparado S-adenosilmetionina (Metil C<sup>14</sup>). Se ha estudiado luego la distribución del fármaco en ratas suministrando una dosis de 4,2 mg/kg/e.v. equivalente a 10  $\mu$ Ci aproximadamente de producto radioactivo. La actividad específica del producto era de 58 mCi/milimoles. Paralelamente se ha efectuado también un estudio autorradiográfico en el ratón. De los resultados de estas dos experiencias resulta que la SAM se distribuye muy rápidamente a todos los tejidos.
- 15.
- 20.

Exponemos a título de ejemplo una parte de los datos referentes a algunos de los órganos tomados en consideración :

Distribución de la SAM en algunos tejidos de

25. rata

(Los valores están expresados en  $\mu$ gr/gr).

Tejido	15'	1 h	4 h	8 h	24 h
Hígado	1,7	3,0	5,5	5,6	5,7
Glandulas suprarrenales	1,9	3,4	4,8	4,5	4,4
5. Bazo	1,3	1,2	3,5	2,6	2,8
Hipófisis	2,3	2,5	8,0	4,5	4,3
Hipotálamo	0,3	0,65	1,0	1,3	1,3
Corteza	0,25	0,45	0,75	8,5	9,4
Plasma	7,5	2,1	2,3	2,0	1,1

10.

De ello se ha deducido por tanto que las nuevas sales objeto de este invento dan el grupo  $\text{CH}_3$  a todos los tejidos dotados de actividad metiltransferásica.

15.

En otros términos, se ha demostrado la capacidad de los nuevos productos objeto del invento para localizarse electivamente en todos los órganos provistos de sistemas metiltransferásicos.

20.

Esto ha sido confirmado por los ensayos farmacológicos sucesivos. Toda una serie de pruebas realizadas en ratas han demostrado que los nuevos compuestos ejercen notabilísima acción protectora y resolutive en las esteatosis hepáticas por dieta hiperlipídico-hiperproteica según Handler, en la esteatosis por intoxicación

25.

alcohólica aguda y por otros agentes tóxicos (tetracloruro de carbono, bromobenceno, etc.) ya con administraciones de 6 mg/kg/i.p.; tanto desde el punto de vista morfohistoquímico como del bioquímico, la SAM disminuye significativamente el acúmulo de los lípidos a nivel de los hepatocitos, mientras que favorece el restablecimien-

to en los niveles normales de los fosfolípidos disminuidos 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/g)
Solución fisiológica	30,57 ± 1,18
CCl <sub>4</sub>	18,87 ± 1,06
CCl <sub>4</sub> + SAM 15 mg/kg/i.p.	27,20 ± 1,25
10. 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 las medias ± E.S. de 10 valores para cada grupo. Para el estudio de la actividad hepatoprotectora nos hemos servido de un dispositivo experimental que produce en la rata la llamada degeneración colestérica hepática (Ridout y col., Biochem. J. 52, 99, 1952).

15.

Según este método, por medio de una dieta oportuna se obtiene en los animales un aumento conspicuo de las grasas totales hepáticas y del colesterol hepático; las sustancias que intervienen en el metabolismo lipídico reducen o anulan tal aumento. Los animales se habían dividido en 6 grupos: al primero se suministró 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 en las mismas dosis, pero enriquecida con colesterol en 0,2 g/rata/día. El tratamiento duró tres semanas.

20.

25.

A los grupos 4-5-6 se suministró SAM en las dosis siguientes: 0,4-0,8-2 mg/kg/i.p. al día.

Al final de las tres semanas se sacrificaron todos los animales, se extrajeron los hígados y se dosificaron en éstos 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 lotes sometidos a tratamiento con la SAM en las dosis de 0,4-0,8 mg/kg/i.p. han estado escasamente protegidos, mientras que el lote tratado con SAM 2 mg/kg/i.p. ha estado completamente protegido.

10. Grasas totales y colesterol hepáticos al final de la experiencia (medias por lote)

Lote	Peso del hígado fresco en gr.	Grasas totales		Colesterol	
		gr.	%	mgr	%
15. 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
IV	17	3,70	21,6	90	5,2
V	16	3,5	21,9	67	4,1
20. VI	16	2,0	12,5	61	3,8

Otro aspecto farmacológico investigado por nosotros lo han constituido los efectos de tipo antiinflamatorio y de tipo analgésico de la SAM.

25. De los varios tests probados citaremos los más clásicos, como el edema por carragenina y por blanco de huevo como test de inflamación aguda; el granuloma por cotton pellets y la artritis por coadyuvante como test de inflamación crónica. En todos los casos la SAM se ha

5. demostrado activa tanto por vía oral (dosis de 8 a 40 mg/kg) como por vía parenteral (dosis de 4 a 8 mg/kg), comparada con otros fármacos conocidos (Ibuprofen - Indometacina). Como ensayo de analgesia se han efectuado los tests de la placa caliente y del estiramiento por ácido acético, y de Randal y Selitto en la rata: también en estos tests el fármaco se ha demostrado activo en comparación con los fármacos conocidos estudiados.

10. Otro aspecto considerado por nosotros es la acción posible de la SAM sobre el tiempo de sueño por barbitúricos.

15. Con este fin se ha efectuado un experimento en el que grupos de ratones recibían hexobarbital en dosis de 80 mg/kg/i.p. según el método de Holten y Larsen (Acta Pharmacol. Toxicol. 1956, 12, 346); un grupo servía de control y el segundo recibía SAM en dosis de 4 mg/kg/i.p. (Véase la tabla).

Controles	Tiempo de sueño (min.)
20.	24,2 ± 2,7
SAM 4 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 suministro de SAM se entiende indiferentemente el suministro de una cualquiera de las sales a que se refiere el invento.

Seguindo las indicaciones obtenidas de los ensayos farmacológicos, las pruebas clínicas se han orientado hacia afecciones morbosas en las que aparecen alterados, primitiva o secundariamente :

5. 1 - el metabolismo de los lípidos
  - 2 - el metabolismo de los prótidos y los glúcidos
  - 3 - el metabolismo de las catecolaminas y de las aminas biógenas.
10. 1.- De pruebas realizadas en clínicas sobre centenares de sujetos, con dosis de SAM variadas en amplísimo intervalo, se ha determinado que los nuevos compuestos inducen una rápida caída de los lípidos hepáticos en las hepatoesteatosis de patogénesis más diversas, averiguable con el examen bióptico repetido después del final del ciclo de tratamiento, aún a distancia de 60 días del final del tratamiento.

15. La administración del producto induce además una marcada caída de los altos valores de la colesteroemia total y de la hipertrigliceridemia y normaliza las relaciones /<sup>lipoprotéicas</sup> beta/alfa alteradas en los sujetos con hiperdislipidemias en fases descompensada.

20. Tal acción hipocolesterolemizante e hipolipemizante se verifica ya con dosis alrededor de 8-1,5 mg administradas 2 a 3 veces al día y es en todo caso proporcional a la dosis.

25. En la arterioesclerosis declarada con manifestaciones clínicas a cargo de la esfera psicoafectiva, con turbaciones amnésicas y en ciertos casos centro-

encefálicas (deterioro por encefalopatía arteriosclerótica) secundarias a fenómenos de hipoxia cerebral; la administración de la SAM por vía intramuscular y, en los casos más graves, por vía endovenosa o por fleboclisis lenta, en dosis comprendidas entre 8 y 16 mg 3 a 4 veces al día, ha demostrado que modifica muy favorablemente la sintomatología.

En particular, en los estados hipoxidóticos declarados la recuperación de las funciones asociadas a la vida de relación ha resultado pronta y estadísticamente significativa.

En los síndromes postapopletiformes se advierte mayor rapidez en la mejoría del cuadro clínico.

Se han tratado en clínica centenares de sujetos afectados de: hipoprotidemias y disprotidemias secundarias; hepatopatías crónicas persistentes y agresivas; estados precirróticos y cirróticos; síndromes de mala absorción y síndromes prótico-disipantes. La administración de dosis variables de 20 a 80 mg de SAM por día, por vía intramuscular, endovenosa y oral, según la gravedad del caso, ha causado un aumento estadísticamente significativo de la protidemia total, un incremento de la tasa albumínica y una tendencia a la normalización de las relaciones porcentuales alteradas entre las fracciones electroforéticas del suero.

Esta actividad anabolizante proteica ha sido seguida de una mejoría, con frecuencia muy importante, de la sintomatología subjetiva y de las condiciones

generales objetivas y por una normalización de todas las pruebas de funcionalidad hepática.

3. Se han obtenido resultados particularmente sorprendentes en las aplicaciones clínicas de nuevas sales enzimáticas según este invento en que se tenían cuadros morbosos claramente correlacionados con modificaciones en el recambio de las aminas biógenas, por ejemplo :
5. a) cuadros patológicos de dominio neuropsiquiátrico;
10. b) la enfermedad de Parkinson y el parkinsonismo de diversas etiopatogénesis;
- c) la acción antiflogística y analgésica en el tratamiento de las osteoartrosis, y la actividad antálgica en algunas manifestaciones neurológicas;
15. d) las perturbaciones del ritmo sueño-vigilia.
- Por lo que atañe al punto a), una vasta casuística clínica realizada examinando la conducta clínica y los tests de Hamilton y Wittenberg ha puesto claramente de relieve que la administración de dosis variables de 8 a 20 mg de SAM 3 ó 4 veces al día por un período de 5 a 15 días induce, excluyendo cualquier otra forma de terapéutica, una remisión estadísticamente significativa de los principales parámetros considerados para el diagnóstico de las formas depresivas.
20. Por lo que atañe al punto b), respecto a la terapéutica de la enfermedad de Parkinson y de los
- 25.

parkinsonismos se ha podido averiguar que :

- 5. - El aporte de SAM a la dosis de 4 a 16 mg por día, por vía intramuscular, endovenosa u oral (según la gravedad del caso), asociado con la terapéutica habitual con Levodopa, causa una mejora estadísticamente más significativa de la acinesia y de la rigidez que la que se advierte en los pacientes tratados solamente con Levodopa. Se hallan también modificaciones favorables en la entidad del temblor parkinsoniano, no modificable con la Levodopa sola.
- 10. - El aporte de SAM mejora netamente las perturbaciones psíquicas Levodopa-dependientes, y especialmente los estados depresivos y las manifestaciones psíquicas de tipo irritativo.
- 15. - El aporte de SAM, siempre en las dosis mencionadas antes, bloquea significativamente el cortejo de las manifestaciones colaterales por Levodopa a cargo de los diversos órganos y aparatos, particularmente en el aspecto de la náusea, el vómito, la inapetencia,
- 20. la hipotensión, la astenia, la cefalea, la hipersudación y el insomnio.

Por lo que atañe al punto c), la SAM, que por los resultados farmacológicos se ha revelado dotada de intensa actividad antiflogística y analgésica,

- 25. ha demostrado ser activa en todas las formas osteoartrosis tratadas con la dosis de 13 mg dos veces al día, por vía extramuscular o endovenosa, y de 13-20 mg cuatro veces al día, per os.

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 respecto al placebo.

5. En 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.

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

15. La actividad antálgica de la SAM se ha ensayado también en diversos sujetos con cuadros neurológicos diversos; neuritis, polineuritis, artralgiás, ciática, radiculitis, tortícolis. El efecto terapéutico ha sido pronto y eficaz desde el primer día de administración a la dosis de 6 mg dos veces al día, por vía intramuscular, o de 13-20 mg 3 ó 4 veces al día, per os.

20. Resultados semejantes se han obtenido en sujetos con cefalea recurrente y resistente, mediante administración del fármaco por vía oral en comprimidos masticables.

25. Por lo que atañe al punto d), o sea los trastornos del ritmo sueño-vigilia, con particular referencia al insomnio, el nuevo producto objeto de este invento está capacitado, a la dosis de 4-13 mg per os, para mejorar sensiblemente las relaciones alteradas de sueño-vigilia, induciendo un sueño fisiológico

sín recurrir al empleo de barbitúricos u otras sustancias de acción depresiva cortical y centroencefálica.

- De lo que aquí se ha indicado resumidamente resultan claras las numerosas, imprevistas e imprevisibles perspectivas abiertas por el nuevo fármaco en el campo de la terapéutica humana. Resumiendo, puede decirse que los campos de empleo hasta ahora determinados son: el tratamiento de las hepatopatías, de las hiperdialipidemias, de la arteriosclerosis generalizada o local y de manifestaciones psiquiátricas de tipo depresivo y neurológicas; en las artropatías degenerativas, en las manifestaciones álgicas neurológicas y en los trastornos del ritmo sueño-vigilia, mientras quedan todavía por examinar y determinar muchísimos otros campos de empleo.

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

- A continuación se exponen algunas composiciones farmacéuticas :

a) Un comprimido de 400 mg contiene

SAM 28 mg

Excipientes :

Almidón

25. Lactosa

Estearato de magnesio

Talco

Aroma c.s. hasta 400 mg.

b) Una cápsula de 250 mg contiene

SAM 28 mg

Excipientes:

Almidón

Lactosa

5. Estearato de magnesio

$\text{Na}_3\text{PO}_4$  c.s. hasta 250 mg.

c) Una ampolla de liofilizado contiene

SAM 4,6 mg

Una ampolla de disolvente muscular contiene

10. Lidocaína 20 mg

Solución de tampones fosfatos c.s. hasta 3 cc.

d) Una ampolla de liofilizado contiene

SAM 14 mg

Una ampolla de disolvente muscular contiene

15. Lidocaína 20 mg

Solución de tampones fosfatos c.s. hasta 3 cc.

e) Un supositorio de 2 g contiene

SAM 46,6 mg

Masa para supositorios c.s. hasta 2,0 g.

20. Otras formas de administración pueden ser :

a) Ampollitas bebibles

b) Líquidos para instilaciones oculares.

c) Líquidos para instilaciones endonasales.

d) Líquidos para aerosol o spray.

25. e) Líquidos y pomadas para uso tópico en los que el principio activo está diluido en disolventes normales para usos farmacéuticos ("Tecnología Farmacéutica", vol. II, Silvano Casadio, 2ª edición, ed. Cisalpino-Goliardica, Milano 1972).

En conclusión, puede decirse que las dosis terapéuticas de SAM están comprendidas entre los 2 y los 125 mg por día, según el tipo y la gravedad de la afección tratada.

5. Pueden emplearse siempre dosis superiores, si es necesario, dada la absoluta ausencia de toxicidad de las sales de este invento.

#### REIVINDICACIONES

10. Descrito el objeto del presente invento se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones:

1.- Procedimiento para la preparación de sulfonatos estables de la S-adenosil-L-metionina, caracterizado por :

15. a) prepararse una solución concentrada de SAM;  
b) precipitarse, con una solución saturada de ácido picrolónico en agua o en un disolvente orgánico soluble en agua, la SAM presente en la solución acuosa;  
c) disolverse en una solución de un ácido sulfónico tomado del grupo constituido por los ácidos metansulfónico, etansulfónico, 1-n-dodecansulfónico, 1-octadecansulfónico, 1-n-octadecansulfónico, 2-cloroetansulfónico, 2-bromoetansulfónico, 2-hidroxi-etansulfónico, 3-hidroxi-propansulfónico, d-, l- y d,l-10-canfosulfónico, d-, l- y d,l-3-bromo-canfo-10-sulfónico, 25. cisteico y condroitinsulfónico, o en una solución de dichos ácidos sulfónicos y ácido sulfúrico, el picrolonato precipitado;

y

d) precipitarse la sal mediante adición de un disolvente orgánico totalmente miscible con el disolvente usado en la fase anterior.

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

10. 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque en una variante de la fase a) ésta se realiza por síntesis enzimática mediante acción de la enzima específica ATP-metionina-adenosil-transferasa de gran pureza sobre una mezcla de adenosiltrifosfato (ATP) y metionina.

15. 4.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado en que la enzima específica ATP-metionina-adenosiltransferasa se obtiene con gran pureza mediante elución selectiva de una solución que la contiene por una columna de gel de polisacárido activado y tratado con L-lisina.

20. 5.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado en que la síntesis enzimática de la SAM a partir de ATP y metionina se realiza pasando una solución que contiene los dos reactivos por una columna de gel de polisacárido activado al que está ligada la enzima específica de gran pureza.

25. 6.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado en que en la fase b) el disolvente orgánico soluble en agua se toma del grupo constituido por alcoho-

les monovalentes de 1 a 6 átomos de carbono, acetona, metiletilcetona, metilisobutilcetona, acetato de etilo, tetrahidrofurano, 2-metoxietanol, 2-etoxietanol, dioxano y dimetilformamida.

5. 7.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado en que en la fase c) se emplea una solución alcohólica o alcoxialcohólica, de normalidad comprendida entre 0,25 y 1,5 N, de uno de los ácidos sulfónicos que se han indicado.
10. 8.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado en que en la fase c) se usa una solución acuosa de normalidad igual, comprendida entre 0,05 y 0,2 N, de uno de los ácidos sulfónicos ya indicados y de ácido sulfúrico, en mezcla con un volumen igual de un disolvente orgánico miscible con el agua.
15. 9.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 7, caracterizado en que, según la fase d), el sulfonato se precipita por adición de un disolvente orgánico tomado del grupo constituido por el benceno, el tolueno, el éter dietílico, el éter diisopropílico, la acetona, la metiletiletetona, la metilisobutilcetona, el acetato de etilo, el acetato de metilo, el tetrahidrofurano y el cloroformo.
20. 10.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 8, caracterizado en que, según la fase d), la sal doble del ácido sulfónico y el ácido sulfúrico se precipita del estrato acuoso por adición de un disolvente cetónico o alcohólico completamente soluble en agua.
25. 11.- Procedimiento según la reivindicación 1,

- caracterizado en que la sal simple de sulfonato obtenida en la fase d) es transformada en sal doble con el ácido sulfúrico, mediante disolución en una solución acuosa de normalidad igual, comprendida entre 0,05 y 0,2 N, de ácido sulfúrico y del mismo ácido sulfónico existente en el sulfonato tratado, y la sal doble es precipitada por adición de un disolvente cetónico o alcohólico completamente soluble en agua.
- 5.
- 12.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado en que la sal doble sulfónica-sulfúrica precipitada en la fase d) se vuelve a disolver en una solución alcohólica de igual normalidad, comprendida entre 0,05 y 0,2 N, de ácido sulfónico y ácido sulfúrico y luego se reprecipita con un disolvente orgánico totalmente miscible con el alcohol utilizado.
- 10.
- 15.
- 13.- Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado en que si se emplea la cantidad mínima de solución alcohólica necesaria para disolver la sal doble, en la fase sucesiva de precipitación se separa la sal doble  $SAM^+.HSO_4^-.H_2SO_4.2R-SO_3H$ .
- 20.
- 14.- Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado en que si se emplea un volumen de solución alcohólica doble a lo menos del necesario para disolver la sal doble, en la fase sucesiva de precipitación se separa la sal doble  $SAM^+.HSO_4^-.H_2SO_4.RSO_3H$ .
- 25.
- 15.- Procedimiento para la preparación de sulfonatos estables de la S-adenosil-L-metionina.

Según se describe y reivindica en la presente

memoria descriptiva que consta de 57 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 11 JUL. 1975.

p.a.

  
JAIME BERN  
D. P.

Firmado: JOSE L. MORA

MLA.