



SUOMI—FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

[B] (11) KUULUTUSJULKAISU UTLÄGGNINGSSKRIFT

72525

C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 08 08 1987

(51) Kv.lk./Int.Cl.⁴ C 07 H 19/16

(21) Patentihakemus — Patentansökning	822944
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	24.08.82
(23) Alkuperäisyys — Giltighetsdag	24.08.82
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig	25.02.83
(44) Nähtäväksiapanon ja kuul.julkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	27.02.87
(86) Kv. hakemus — Int. ansökan	
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	24.08.81

Italia-Italien(IT) 23603 A/81
Toteennäytetty-Styrkt

(71) Bioresearch S.p.A., Liscate, Localita Roggia Pirolo, Italia-Italien(IT)

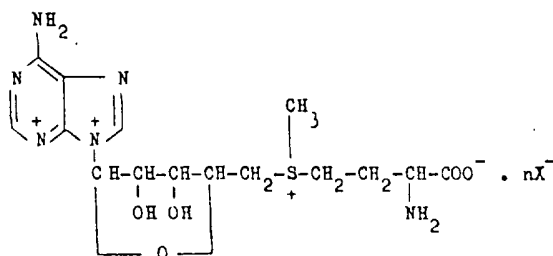
(72) Federico Gennari, Truccazzano, Italia-Italien(IT)

(74) Oy Kolster Ab

(54) Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisten stabiilien S-adenosyyli-
metioniinisuolojen valmistamiseksi - Förfarande för framställning
av terapeutiskt användbara stabila S-adenocylmetioninsalter

(57) Tiivistelmä

Keksintö koskee menetelmää S-adenosyyli-
metioniinisuolojen valmistamiseksi, joiden kaava on



jossa X on vahvan mineraalihapon (jonka pK on alle 2,5)
happoekvivalentti ja n on 4, 5 tai 6.

Uudet suolat ovat erittäin stabiileja korotetuissa-
kin lämpötiloissa ja käytännöllisesti katsoen myr-
kyttömiä. Niitä voidaan käyttää terapeuttisiin tar-
koituksiin.

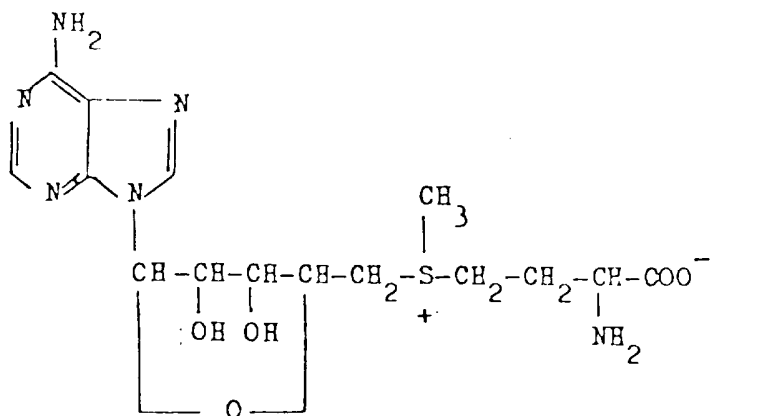
(57) Sammandrag

Uppfinningen hänför sig till ett förfarande för fram-
ställning av S-adenosylmetioninsalt med formeln
vari X är syraekvivalenten av en stark mineralsyra
med ett pK under 2,5, och n är 4, 5 eller 6. De nya
salten är synnerligen stabila även vid förhöjda tem-
peraturer och praktiskt taget giftfria. De kan an-
vändas för terapeutiska ändamål.

Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisten stabiilien S-adenosyyylimetioniinisuolojen valmistamiseksi.

Tämä keksintö koskee uusien S-adenosyyylimetioniinisuolojen (SAM-suolojen) valmistusta, jotka suolat ovat erittäin stabiileja korotetuissa lämpötiloissa ja käytännöllisesti katsoen rajattomia aikoja.

Tiedetään, että S-adenosyyylimetioniini on luonnollista alkuperää oleva, kaikissa elollisissa eliöissä esiintyvä tuote, jota ko. eliöissä tietty entsyymi tehokkaasti syntetisoi, ja joka vastaa seuraavaa rakennekaavaa:



SAM osallistuu suureen määrään ihmiselle olennaisen tärkeistä aineenvaihduntaprosesseista ja siitä johtuen sen puute on monen orgaanisen toimintahäiriön syynä.

Vaikka tämän tuotteen biologinen merkitys on tunnettu joitakin vuosikymmeniä, mahdollisuus tutkia sitä ja siten mahdollisuus käyttää lääkkeenä on ollut olemassa ainoastaan viime vuosina johtuen sen äärimmäisestä epästabiilisuudesta 0°C:n yläpuolisissa lämpötiloissa.

Tässä suhteessa vasta vuonna 1975 tämän hakemuksen tekijän onnistui valmistaa SAM-suola, joka oli kyllin stabiili 25°C:ssa (US-patenttijulkaisu 3 893 999), ja jota seurasi muutama suola, jotka olivat varsin stabiileja 45°C:ssa (US-patenttijulkaisu 3 954 726/1976 ja US-patenttijulkaisu 4 057 686/1977).

Tarkemmin sanoen US-patenttijulkaisu 3 893 999/1975 käsittelee SAM-triparatolueenisulfonaattia, US-patenttijulkaisu 3 954 726/1976 käsittelee SAM-disulfaattidiparatolueenisulfonaattia ja US-patenttijulkaisu 4 057 686/1977
5 käsittelee SAM-suolojen ryhmää, joka voidaan esittää yleisesti kaavalla $\text{SAM.4RSO}_3\text{H}$ tai $\text{SAM.3RSO}_3\text{H}$, joissa RSO_3H tarkoittaa sulfonihappoekvivalenttia, joka voidaan osaksi korvata ekvivalentilla määrällä rikkihappoa.

Mainittu hakija on sanonut, että hän ei pysty selittämään syytä siihen, miksi vain tietyt patenttivaatimusten mukaiset suolat olivat stabiileja, kunaikaisemmin valmistetut SAM-suolat (nimittäin monokloridi ja disulfaatti) olivat korkeintaan saavuttaneet ajallisesti rajoitetun stabiilisuuden pidettäessä niitä 4°C :ssa, eikä siihen, miksi
15 triparatolueenisulfonaatti oli stabiili vain 25°C :seen saakka, kun taas disulfaattidiparatolueenisulfonaatti oli stabiili 45°C :seen saakka.

Nyt on yllättäen havaittu, että stabiileja SAM-suoloja saadaan aina, kun SAM:sta muodostetaan suola 4-6 moolin kanssa vahvaa epäorgaanista happoa, jonka pK on alle 2,5 (suolahappo, rikkihappo tai fosforihappo).
20

Tarkemmin sanoen on yllättäen havaittu, että jos SAM:sta muodostetaan suola hapon kanssa, jonka pK on alle 2,5, suolan suurin stabiilisuus saavutetaansilloin, kun
25 suola sisältää 5moolia happoa. Suolojen, jotka sisältävät 4 tai 6 moolia happoa, stabiilisuus on vielä hyvä, mutta ratkaisevasti alhaisempi.

Suolat, jotka sisältävät 1-3 moolia happoa, ovat ehdottomasti kelvottomia terapeuttiseen käyttöön, koska
30 niissä tapahtuu erittäin suuria hajoamisilmiöitä.

On korostettava, että koska kaikilla uusilla tämän keksinnön mukaisilla suoloilla on käyttöä ihmisten hoidossa, hajoamistuotteen esiintyminen edes prosentuaalisesti pieninä määrinä ei ole hyväksyttävää, ei vain siksi, että se merkitsee vastaavaa vaikutuksen vähenemistä,
35 vaan myös ja erityisesti siksi, että se on osoituksena

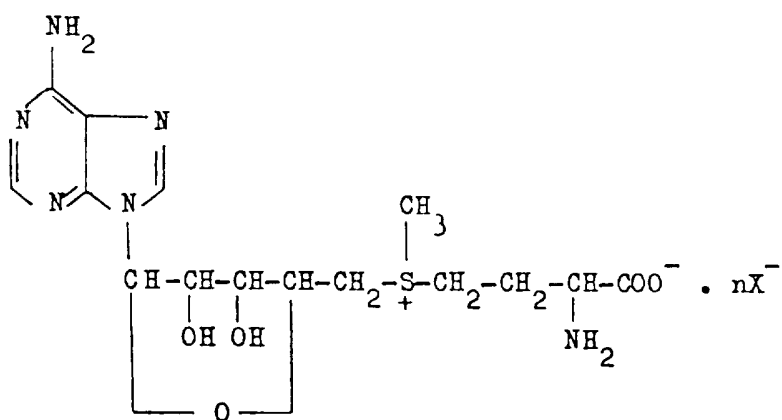
aineenvaihduntatuotteiden muodostumisesta, jotka on havaittu lievästi myrkyllisiksi, ja jotka häiritsevät biologisia prosesseja.

On myös havaittu, että uusien SAM-suolojen stabiili-
suus on suoraan riippuvainen ympäristön polaarisuudesta ja
niin ollen erityisesti läsnä olevan kosteuden määrästä, ja
siksi on keksitty keino vähentää tämä kosteus lähes nollaan.

Tämän keksinnön mukaiset suolat vastaavat yleiskaavaa

10

15



20

jossa x on vahvan mineraalihapon, jonka pk on alle 2,5
(suolahapon, rikkihapon tai fosforihapon) happoekvivalentti
ja n 4, 5 tai 6.

25

Käytännössä on havaittu, että X voi olla vain
HCl-, H₂SO₄- tai H₃PO₄-ekvivalentti, koska HNO₃ ja HClO₄
ovat terapeuttisesti kelvottomia happoja myrkyllisyyten-
sä vuoksi, ja koska HBr:a ja HI:a ei voida käyttää siksi,
että ne panevat alkuun SAM:n demetylaation.

30

Rapoilla, joita voidaan käyttää tämän keksinnön
mukaisten uusien suolojen valmistamiseen, on seuraavat
pK-arvot:

HCl: pK < 0,5

H₂SO₄: pK < 0,5 (1. vaihe); pK = 1,92 (2.vaihe)

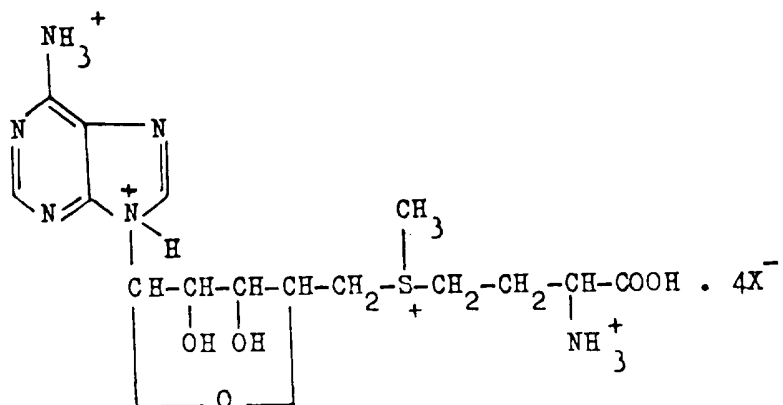
H₃PO₄: pK = 2,12 (1. vaihe).

35

Tarkemmin sanoen tämän keksinnön mukaiset uudet
suolat muodostavat seuraavat tuoteluokat:

1)

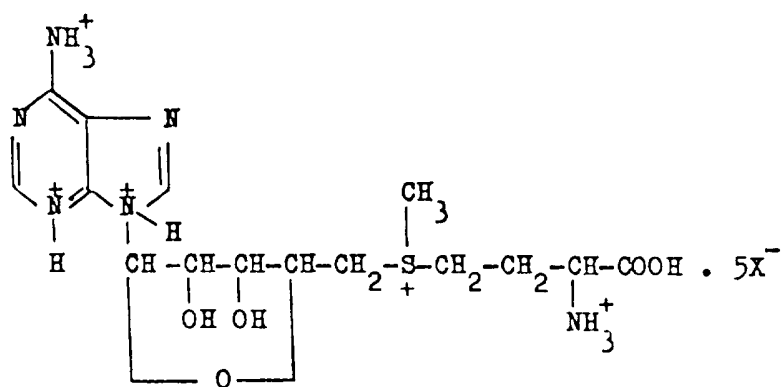
5



10

2)

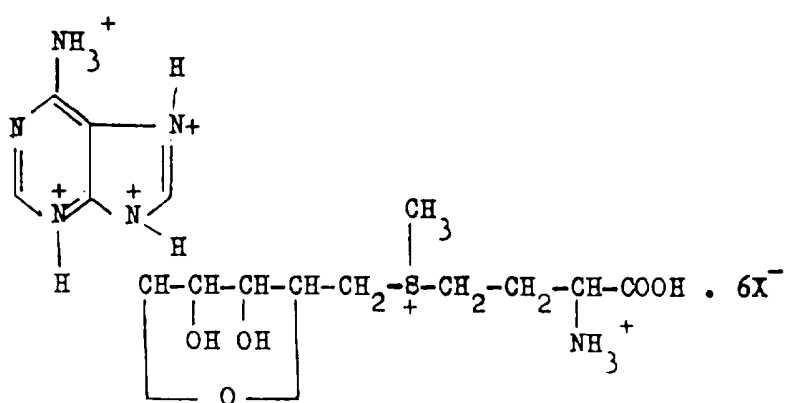
15



20

3)

25



30

joissa X on Cl^- , $\frac{1}{2}\text{SO}_4^{--}$ tai H_2PO_4^- .

Uudet suolat ovat osoittautuneet hyvin käyttökel-
poisiksi lukuisilla ihmisten hoidon aloilla, esimerkiksi
maksaa suojaavina aineina, kuten käy jäljempänä tarkemmin
ilmi.

5 Niitä valmistetaan menetelmällä, joka käsittää seu-
raavat olennaiset vaiheet, jotka kaikki ovat ratkaisevia,
kun tarkoituksena on saada tuote, jolla on ehdottomasti
muuttumaton ja toistettavissa oleva farmaseuttinen puhtaus.

10 a) väkevän vesiliuoksen valmistus raa'asta SAM-
suolasta millä tahansa tunnetulla menetelmällä;

 b) liuoksen puhdistus kromatografisesti johtamalla
se heikosti happaman ioninvaihtohartsipylvään läpi;

 c) SAM:n eluointi vaaditun hapon laimealla vesi-
liuoksella;

15 d) eluaatin titraus ja happomäärän säätö täsmälleen
stökiömetriseen suhteeseen läsnä olevaan SAM-määrään nähden;

 e) eluaatin väkevöinti;

 f) kylmäkuivaus.

 Vaiheessa a) valmistettu vesiliuos voi luonnolli-
20 sesti käsittää minkä tahansa liukenevan SAM-suolan, koska
anioni poistuu seuraavassa vaiheessa kulkiessaan pylvään läpi,
eikä näin ollen häiritse menetelmän loppuosaa. Yleensä
tavallisilla menetelmillä, jotka sisältävät väkevöinnin
ja SAM:n uuttamisen hiivasta, saadaan liuos, jossa on
25 SAM⁺-ioneja ja SO₄⁻-ioneja.

 Kaikissa tapauksissa liuoksen pH säädetään 6:n ja
7:n välille, edullisesti 6,5:een.

 Kromatografinen puhdistusvaihe b) suoritetaan edulli-
sesti käyttäen Amberlite IRC50:ä tai Amberlite CG50:ä.
30 (styreeni-divinyylibentseeni-kopolymeereja).

 Eluointivaihe c) suoritetaan edullisesti vaaditun
hapon 0,1 N vesiliuosta käyttäen.

 Jos eluaatin titraus (vaihe d) osoittaa läsnä olevien
happoekvivalenttien määrän vaadittua määrää (4, 5 tai 6)
35 pienemmäksi, mikä on tavallinen tilanne, lisätään täsmäl-
leen puuttuvaa määrää vastaava happomäärä väkevän kaupal-
lisen vesiliuoksen muodossa. Jos kuitenkin käy selville,

että happoa on läsnä ylimäärin, ylimäärä poistetaan käsittelemällä liuosta vahvasti emäksisellä, OH^- -muodossa olevalla ioninvaihtohartsilla, esimerkiksi Amberlite IRA-401:llä.

- 5 Vaiheessa e) eluaatti väkevöidään seuraavana suoritettavan kylmäkuivausprosessin kannalta parhaaseen arvoon, so. pitoisuuteen 50-100 g/l, edullisesti noin 70 g/l:aan.

10 Viimeisenä oleva kylmäkuivaus suoritetaan tavanomaisin menetelmin, jolloin saadaan täysin kiteinen, 100-%:isen puhdas tuote.

Jos kylmäkuivaus suoritetaan soveltuvan inertin aineen ollessa läsnä, saadaan tuote, jonka jäännöskosteuspitoisuus on alhaisempi, ja joka niin ollen on stabiilimpi.

- 15 Tarkemmin sanoen on todettu, että jos valmistetaan ruiskeina annettaviin farmaseuttisiin muotoihin käytettäväksi tarkoitettua suolaa, kylmäkuivaus tulisi suorittaa mannitolin ollessa läsnä. Jos kuitenkin uusi suola on tarkoitettu suun kautta annettavien tablettien valmistukseen, kylmäkuivaus tulisi suorittaa jauhemaisen piihapon ollessa läsnä.

20 Seuraavat esimerkit kuvaavat keksinnön mukaista menetelmää S-adenosyyylimetioniinisuolojen (SAM-suolojen) valmistamiseksi.

Esimerkki 1

- 25 110 l etyyliasetaattia ja 110 l vettä lisätään ympäristön lämpötilassa 900 kg:aan hiivaa, johon on lisätty SAM:a (6,88 g/kg), Schlenkin mukaisella tavalla (Enzymologia 29 (1965) 283).

- 30 30 minuuttia kestäneen voimakkaan sekoituksen jälkeen lisätään 500 l 0,35 N rikkihappoa, ja sekoitusta jatketaan vielä puolitoista tuntia.

Seos suodatetaan ja jäännös pestään vedellä, jolloin saadaan 1400 l liuosta, joka sisältää 4,40 g/l SAM:a, joka vastaa 99,5 % siitä määrästä, joka oli läsnä lähtöaineessa.

- 35 Liuokseen lisätään 23 kg pikrolonihappoa 250 l:ssa metyylietyyliketonia samalla sekoittaen.

Yön yli seisottamisen jälkeen sakka erotetaan sentrifugoimalla ja pestään vedellä.

Sakka liuotetaan ympäristön lämpötilassa sekoittamisen 62 l:aan 1 N rikkihapon metanoliliuosta.

5 Sen jälkeen kun pienet määrät liukenematonta ainetta on erotettu suodattamalla, liuokseen lisätään 500 l asetonia.

Sakan laskeuduttua täydellisesti supernatantti dekantoidaan ja liukenematon jäännös pestään pienellä määrällä asetonia.

Sakka liuotetaan 800 l:aan tislattua vettä, lisätään 2 kg väriä poistavaa hiiltä, ja seos suodatetaan.

Valmistetaan 200 l Amberlite IRC 50 -hartsia H^+ -muodossa sisältävä pylväs, ja pestään se huolellisesti tislattulla vedellä.

Edellä saatuun vesiliuokseen lisätään samalla sekoittaen 4,8 kg jääetikkaa ja sen jälkeen lisätään 2 N NaOH:a, kunnes saavutetaan pH-arvo 6,5.

20 Liuos johdetaan hartsipylvään läpi virtausnopeuden ollessa 400 l/h, joka pidetään muuttumattomana koko prosessin ajan.

200 l tislattua vettä, 1600 l 0,1 N etikkahappoa ja vielä 200 l tislattua vettä johdetaan sitten peräkkäin pylvään läpi.

25 SAM eluoidaan 400 l:lla 0,1 N rikkihappoa. Näin saatu 400 l eluaattia sisältävää noin 4 kg SAM:a ja se väkevöidään alipaineessa 60 l tilavuuteen.

Lisätään 0,5 kg hiiltä, ja seos suodatetaan. Liuos titrataan.

30 Lisätään väkevää rikkihappoa, kunnes H_2SO_4 :n ja SAM:m moolisuhde 2,5:1 saavutetaan, ja sen jälkeen liuos kylmäkuivataan.

Saadaan 6,5 kg tuotetta, jolla on seuraava koostumus: SAM^+ 61 %; H_2SO_4 37,5 %; H_2O 1,5 %.

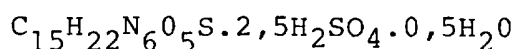
35 Suolalla on kiteinen ulkomuoto, ja sen liukoisuus veteen on yli 20 %, jossa liuotuksessa muodostuu väritön liuos, mutta se ei liukene tavallisiin orgaanisiin liuottimiin.

Suolalla on kiteinen ulkomuoto, ja sen liukoisuus veteen on yli 20 %, jossa liuotuksessa muodostuu väritön liuos, mutta se ei liukene tavallisiin orgaanisiin liuottimiin.

- 5 Ohutkerroskromatografia julkaisun Anal. Biochem. 4 (1971) 16-28 mukaisella tavalla osoittaa, että tuote ei sisällä mitään epäpuhtauksia.

Taulukko 7 esittää analyysitiedot, jotka täsmä-
vät kaavan

10



mukaiseen yhdisteeseen.

- 15 Uusi yhdiste tunnistettiin myös entsymaattisella menetelmällä, joka perustuu nikotiiniamidin ja guanidiini-etikkahapon entsymaattiseen metylointiin SAM:lla (G.L.Cantoni, J. Biol. Chem. 189 (1951) 745; G.De La Hoba, B.A. Jameison, S.H. Mudde, H.H. Richards, J. Am. Chem. Soc. 81 (1959) 3975).

- 20 Toistettaessa menetelmä samalla tavalla mutta lisäämällä ennen kylmäkuivausta rikkihappoa niin paljon, että sen ja SAM:n moolisuhde kohaa 3:1:een, saadaan suola $\text{SAM} \cdot 3\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 0,7\text{H}_2\text{O}$, jonka analyysitiedot on esitetty taulukossa 7.

- 25 Vastaavasti alentamalla H_2SO_4 :n ja SAM:n moolisuhde 2:1:een ennen kylmäkuivausta saadaan suola $\text{SAM} \cdot 2\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 0,4\text{H}_2\text{O}$, jonka analyysitiedot esitetään taulukossa 7.

Esimerkki 2

- 30 11,5 g pikrolonihappoa 100 l:aan isobutyylialkoholia liuotettuna lisätään 700 l:aan liuosta, joka on saatu hajoittamalla hiivasoluja samaa raaka-ainetta ja menetelmää käyttäen kuin esimerkissä 1.

Yön yli seisottamisen jälkeen muodostunut sakka erotetaan sentrifugoimalla.

- 35 Sakka liuotetaan ympäristön lämpötilassa samalla sekoittaen 3l l:aan 1 N rikkihapon etanoliliuosta.

Sen jälkeen kun pieni määrä liukenematonta ainetta on erotettu suodattamalla, liuokseen lisätään 250 l dietyylieetteriä.

Seisottamisen jälkeen seos suodatetaan, ja kiinteä
5 aine pestään pienellä määrällä eetteriä. Se kuivataan alipaineessa.

Kiinteä aine liuotetaan 400 litraan vettä, lisätään 1 kg väriä poistavaa hiiltä, ja seos suodatetaan.

Lisätään jääetikkaa, pH säädetään 6,5:een ja
10 liuos johdetaan Amberlite IRC 50:llä täytetyn pylvään läpi, kuten esimerkissä 1 on kuvattu.

SAM eluoidaan pylväästä 200 l:lla 0,1 N suolahappoa.

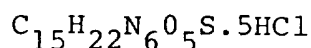
Se väkevöidään alipaineessa 30 litran tilavuuteen. Lisätään 0,25 kg aktiivihiiltä ja seos suodatetaan. Liuos
15 titrataan, ja siihen lisätään riittävä määrä väkevää suolahappoa, jotta HCl:n ja SAM:n moolisuhteeksi saadaan 5:1. Liuos kylmäkuivataan.

Saadaan 2,8 kg tuotetta, jolla on seuraava koostumus: SAM⁺ 67,6 %; HCl 30,9 %; H₂O 1,5 %.

20 Suolalla on kiteinen ulkomuoto, ja sen liukoisuus veteen on yli 20 %. Tässä liuotuksessa muodostuu väritön liuos. Se liukenee huonosti tavallisiin orgaanisiin liuottimiin.

Esimerkin 1 mukainen ohutkerroskromatografia
25 osoittaa, että yhdiste ei sisällä mitään epäpuhtauksia.

Analyysitiedot esitetään taulukossa 7, ja ne täsmäävät kaavan



30

mukaiseen tuotteeseen.

Uusi yhdiste tunnistettiin myös esimerkissä 1 kuvatulla entsymaattisella menetelmällä.

Toimimalla esimerkissä 1 yksityiskohtaisesti kuvatulla tavalla on mahdollista valmistaa suoloja, joissa
35 suolan muodostus on eriasteista, ja erityisesti suolat

SAM.4HCl.0,4H₂O ja

SAM.6HCl.0,7H₂O,

joiden analyysitiedot esitetään taulukossa 7.

Esimerkki 3

- 5 Esimerkissä 1 kuvattu valmistus toistettiin samalla tavalla, mutta ennen kylmäkuivausta liuokseen lisättiin 4,75 kg ei-pyrogeenista mannitolia. Sen jälkeen liuos kylmäkuivattiin tavanomaisella tavalla.

- 10 Mannitolin lisäys kulmäkuivauksen apuaineeksi tekee mahdolliseksi valmistaa tuotteen, jonka jäännöskosteuspitoisuus on 0,1 %.

Tällä tavalla saatu tuote soveltuu muutettavaksi ruiskeina annettaviksi farmaseuttisiksi muodoiksi.

Esimerkki 4

- 15 Noudatetaan esimerkin 1 mukaista menettelytapaa. Liuokseen lisätään 4 kg Aerosiliä (jauhmainen piihappo) ennen kylmäkuivausta, ja saatu kolloidinen suspensio kylmäkuivataan.

- 20 Aerosilin lisäys kulmäkuivauksen apuaineeksi tekee mahdolliseksi valmistaa tuotetta, jonka jäännöskosteuspitoisuus on 0,2 %.

Tällä tavalla saatu tuote soveltuu muutettavaksi suun kautta annettaviksi tableteiksi.

Esimerkki 5

- 25 Noudatetaan esimerkin 2 mukaista menettelytapaa, mutta SAM eluoidaan 0,1 M fosforihappoliuoksella 0,1 N suolahapon asemesta.

- 30 Ennen kylmäkuivausta lisätään riittävä määrä väkevää fosforihappoa, jotta H₃PO₄:n ja SAM:n moolisuhteeksi saadaan 5:1.

Saadaan 4,26 kg tuotetta, jolla on seuraava koostumus: SAM⁺ 44,4 %; H₃PO₄ 54,6 %; H₂O 1 %.

Analyysitiedot esitetään taulukossa 7 ja ne täsmäävät kaavan

- 35 C₁₅H₂₂N₆O₅S.5H₃PO₄.0,5H₂O

mukaiseen tuotteeseen.

Esimerkin 1 mukainen ohutkerroskromatografia osoittaa, että tuote ei sisällä mitään epäpuhtauksia.

5 Uusi tuote tunnistettiin myös esimerkissä 1 kuvatulla entsyymaattisella menetelmällä.

Työskentelemällä esimerkissä 1 kuvatulla tavalla on mahdollista valmistaa suoloja, joissa suolan muodostus on eriasteista, ja erityisesti suolat

10 SAM. $4\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 0,4\text{H}_2\text{O}$ ja
SAM. $6\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 0,7\text{H}_2\text{O}$,
joiden analyysitiedot esitetään taulukossa 7.

Taulukko 7

suola	empiirinen kaava	% N	% S	% SAM	El% 256 nm (6N H ₂ SO ₄)
		laskettu saatu	laskettu saatu	laskettu saatu	
SAM. 2H ₂ SO ₄ · 0.4H ₂ O	C ₁₅ H ₂₆ N ₆ O ₁₃ S ₃ · 0.4H ₂ O	13,98 14,00	15,97 16,01	66,2 66,3	242
SAM. 2.5H ₂ SO ₄ · 0.5H ₂ O	C ₁₅ H ₂₇ N ₆ O ₁₅ S _{3.5} · 0.5H ₂ O	12,88 12,86	17,18 17,15	61,0 60,9	223
SAM. 3H ₂ SO ₄ · 0.7H ₂ O	C ₁₅ H ₂₈ N ₆ O ₁₇ S ₄ · 0.7H ₂ O	11,91 11,89	18,16 18,05	56,5 56,4	207
SAM. 4HCl. 0.4H ₂ O	C ₁₅ H ₂₆ N ₆ O ₅ SCl ₄ · 0.4H ₂ O	15,25 15,55	5,81 5,93	72,2 72,4	264
SAM. 5HCl. 0.5H ₂ O	C ₁₅ H ₂₇ N ₆ O ₅ SCl ₅ · 0.5H ₂ O	14,26 14,25	5,43 5,44	67,6 67,6	247
SAM. 6HCl. 0.7H ₂ O	C ₁₅ H ₂₈ N ₆ O ₅ SCl ₆ · 0.7H ₂ O	13,33 13,15	5,08 5,03	63,2 63,1	231
SAM. 4H ₃ PO ₄ · 0.4H ₂ O	C ₁₅ H ₃₄ N ₆ O ₂₁ SP ₄ · 0.4H ₂ O	10,53 10,54	4,01 4,03	50,0 49,9	176
SAM. 5H ₃ PO ₄ · 0.5H ₂ O	C ₁₅ H ₃₇ N ₆ O ₂₅ SP ₅ · 0.5H ₂ O	9,35 9,33	3,56 3,55	44,4 44,4	156
SAM. 6H ₃ PO ₄ · 0.7H ₂ O	C ₁₅ H ₄₀ N ₆ O ₂₉ SP ₆ · 0.7H ₂ O	8,4 8,38	3,2 3,2	39,9 39,9	140

72525

12

Kuvatulla tavalla valmistettujen suolojen stabiili-
suuskokeet suoritettiin pitämällä tuotetta uunissa, jonka
lämpötila oli säädetty 45°C:seen ja määrittämällä jäl-
jellä olevan suolan osuus prosentteina tiettyjen ajanjakso-
5 jen kuluttua. Kokeet suoritettiin käyttäen vertailukohtei-
na tunnetulla menetelmällä (US-patenttijulkaisu 2 969 353)
valmistettuja SAM.nHCl-suoloja, joissa n on 1, 2 ja 3,
sekä myös tunnetulla tavalla (DE-hakemusjulkaisu
1 803 978) valmistettuja SAM.nH₂SO₄-suoloja, joissa n on
10 0,5, 1 ja 1,5.

Seuraavat taulukot osoittavat hajoneen suolan osuu-
den prosentteina ilmoitettujen ajanjaksojen kuluttua:

Taulukko 1

15 SAM.nHCl

Hajoaminen 45°C:ssa

n	jäännös- kosteus	60 päivän kuluttua	120 päivän kuluttua	180 päivän kuluttua	240 päivän kuluttua	360 päivän kuluttua
20	1 0,2 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
	2 0,5 %	80 %	100 %	100 %	100 %	100 %
	3 0,8 %	30 %	60 %	80 %	100 %	100 %
	4 1 %	5 %	10 %	14 %	17 %	20 %
	5 1,5 %	-	1,5 %	3 %	4,5 %	5 %
25	6 2 %	5 %	10 %	14 %	17 %	20 %

Taulukko 2

SAM.nH ₂ SO ₄	hajoaminen 45°C:ssa					
30	0,5 0,2 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
	1 0,5 %	80 %	100 %	100 %	100 %	100 %
	1,5 0,8 %	30 %	60 %	80 %	100 %	100 %
	2 1 %	5 %	10 %	14 %	17 %	20 %
	3,5 1,5 %	-	1,5 %	3 %	4,5 %	5 %
35	3 2 %	5 %	10 %	14 %	17 %	20 %

Taulukko 3SAM.1,5 H₂SO₄.n HCl

Hajoaminen 45°C:ssa

5	n	jäännös- kosteus	60 päivän kuluttua	120 päivän kuluttua	180 päivän kuluttua	240 päivän kuluttua	360 päivän kuluttua
	1	1 %	5 %	10 %	14 %	17 %	20 %
	2	1,5 %	-	1,5 %	3 %	4,5 %	5 %
10	3	2 %	5 %	10 %	14 %	17 %	20 %

Taulukko 4SAM 2HCl. nH₂SO₄

hajoaminen 45°C:ssa

	0,5	0,8 %	30 %	60 %	80 %	100 %	100 %
15	1	1 %	5 %	10 %	14 %	17 %	20 %
	1,5	1,5 %	-	1,5 %	3 %	4,5 %	5 %
	2	%	5 %	10 %	14 %	17 %	20 %

20 Hajoamattoman SAM:n prosentuaalinen osuus ilmoitettujen ajanjaksojen kuluttua määritettiin uudella jäljempänä kuvatulla menetelmällä, joka takaa mittausten parhaan mahdollisen tarkkuuden, koska se tekee mahdolliseksi erottaa SAM:n täydellisesti kaikista mahdollisista hajoamistuotteista.

25 Tässä suhteessa on todettu, että tähän asti käytetyllä, analyttisen Dowex 50-ioninvaihtohartsipylväaseen perustuvalla menetelmällä (Schlenk ja De Palma, J. Biol. Chem. 229 (1957)) SAM:n erottuminen tietyistä hajoamistuotteista, erityisesti metyyliitioadenosiinista, ei ollut
30 täydellistä, ja se johti sen vuoksi virheeseen SAM:n stabiilisuuden arvioinnissa stabiilisuuden näyttäessä todellista paremmalta.

Tämä menetelmä SAM:n määrittämiseksi perustuu HPLC:n käyttöön.

35 Käytetyt analyysiolosuhteet:

- pylväs PARTISIL 10 SCK - 2,5 x 250 mm
- eluentti 0,1 M ammoniumformaatti, jonka pH on 4, ja
joka sisältää 20 % metanolia HPLC:ä varten
- virtaus ml/minuutti
- 5 - SAM retentioaika noin 400 sekuntia.

Taulukkojen 1, 2, 3 ja 4 tiedoista käy selville, että SAM-suolat saavuttavat suurimman stabiilisuutensa sisältäessään 5 happoekvivalenttia. Suolat, jotka sisältävät 4 tai 6 ekvivalenttia ovat vielä varsin stabiileja, kun sen sijaan vähemmän happoekvivalentteja sisältävät
10 suolat eivät ole käyttökelpoisia epästabiilisuutensa vuoksi.

On myös ilmeistä, että stabiilisuus noudattaa samaa kaavaa käytetystä haposta riippumatta, edellyttäen, että
15 hapon K_P on alle 2,5.

Ei ollut mahdollista valmistaa 4-6 happoekvivalenttia sisältäviä suoloja sellaisten happojen kanssa, joiden pK on yli 2,5.

Stabiilisuuskokeet suoritettiin samaa menetelmää
20 käyttäen myös suoloilla, jotka valmistettiin kulmäkuivauksen apuaineen ollessa läsnä esimerkkien 3 ja 4 mukaisesti.

Näiden määritysten tulokset esitetään seuraavissa taulukoissa 5 ja 6. Kosteuspitoisuuden ratkaiseva väheneminen suoritettaessa kylmäkuivaus apuaineen ollessa läsnä
25 on ilmeistä, samoin kuin sen seurauksena oleva suolojen kokonaisstabiilisuus, joka tällä tavalla saavutetaan.

Taulukko 5

SAM 5 HCl

jäännöskosteus hajoaminen 45°C:ssa
 360 päivän kuluttua

5	kylmäkuivattu ilman apuainetta	1,5 %	5 %
10	kylmäkuivattu mannito- lin kanssa (100 g SAM ⁺ + 120 g mannitolia)	0,1 %	-
15	kylmäkuivattu Aerosilin kanssa (100 g SAM ⁺ + 100 g Aerosilia)	0,2 %	-

Taulukko 6

20	SAM. 2,5 H ₂ SO ₄ kylmäkuivattu ilman apuainetta	1,5 %	5 %
25	kylmäkuivattu mannitolin kanssa (100 g SAM ⁺ + 120 g mannitolia)	0,1 %	-
30	kylmäkuivattu Aerosilin kanssa (100 g SAM ⁺ + 100 g Aerosilia)	0,2	-

Suoloilla SAM.5HCl ja SAM.2,5H₂SO₄ suoritettiin laaja farmakologinen tutkimus ja kaikissa tapauksissa niillä osoittautui olevan erittäin mielenkiintoiset vaikutukset- ja myrkyllisyysominaisuudet, jotka olivat riippumattomia SAM:iin sitoutuneesta anionista. Osoitettiin, että uusien suolojen vaikutus riippuu olennaisesti eliössä vapautuneen SAM⁺-ionin kyvystä toimia metyyli-ryhmien luovuttajana samalla tavalla, kuin monien rasva-, valkuaisaine- ja sokeri-aineenvaihdunnan perusreaktioita katalysoivien transmetylaasientsyymien luonnollinen substraatti.

Uusien suolojen vaikutus aiheutuu siis suureksi osaksi siitä, että ne tekevät S-adenosyyli-metyyli-tioniinin ehdottoman stabiiliksi alle 45°C:n lämpötiloissa mahdollistaen siten sen transmetylointivaikutuksen 100-%:sen hyväksikäytön ihmisessä ilman sitä vaaraa, että muodostuu myrkyllisiä hajoamistuotteita jotka häiritsevät SAM⁺:n aktivoimia biologisia prosesseja.

Myrkyllisyys

Määritettiin akuutti myrkyllisyys hiirillä, jolloin saatiin kummallakin suolalla seuraavat arvot:
LD₅₀ suun kautta annettuna yli 3 g/kg
LD₅₀ laskimonsisäisesti annettuna 1,1 g/kg

Siedettävyyttä ja kroonista myrkyllisyyttä koskevat kokeet suoritettiin Wistar- ja Sprague-Dowley-kannan rotilla antamalla niille päivittäin tuotetta 20 mg/kg 12 kuukauden ajan. Käsittelyn päättyessä eri elimissä ja elinryhmissä ei esiintynyt patologisia muutoksia.

Epämuodostumien syntykokeet suoritettiin kaneilla. Annettaessa kymmenen kertaa suurempia suola-annoksia kuin suurimmat terapeuttiset annokset ei todettu mitään teratogeenista tai epämuodostumia aiheuttavaa vaikutusta alkioon tai loppuvaiheessa olevaan sikiöön.

Laskimonsisäisesti jopa 200 mg/kg:n annoksien antaminen ei aiheuttanut kanilla kuumeoireita.

Laskimoon antaminen annoksen ollessa 40 mg/kg

ei aiheuttanut kanilla ja rotalla muutosta kaulavaltimos-
ta mitatussa verenpaineessa, sydämen lyöntitiheydessä,
hengitystiheydessä eikä EKG-käyrässä.

5 Lihaksensisäisen ruiskeen paikallinen sietokyky,
jopa sen jälkeen kun antamista oli toistettu 30-60 päivän
ajan, ja kanin ulkokorvan pintalaskimoon annetun laskimo-
ruiskeen paikallinen sietokyky olivat erinomaisia.

Farmakologia

10 Kokonainen sarja rotilla suoritettuja kokeita on
osoittanut, että uudet suolat synnyttävät hyvin huomatta-
van suojavaikutuksen rasvamaksaa vastaan sekä rasvamaksaa
vähentävän vaikutuksen joka rasvamaksa on saatu aikaan
runsaasti rasvaa ja valkuaisaineita sisältävällä ruoka-
valiolla Handlerin mukaisesti, tai joka aiheutuu akuutista
15 alkoholin aiheuttamasta myrkytyksestä tai muista myrkyllisistä
aineista, jopa 10 mg/kg SAM⁺:a sisältäviä annoksia
annettaessa.

20 Rotalla kokeellisessa veren runsasrasvaisuudessa,
joka on aiheutettu esimerkiksi Triton S:llä, uudet suolat
ovat osoittaneet hyvin selvää rasvapitoisuutta alentavaa
vaikutusta, joka käytetty annos, so. 10 mg/kg (jälleen
SAM⁺:na ilmaistuna), huomioon ottaen oli paljon voimak-
kaampi kuin muita rasvapitoisuutta alentavia lääkkeitä
käytettäessä.

25 Kanoilla, joille oli aiheutettu ateroskleroosi run-
saasti kolesterolia ja fruktoosia sisältävällä ruokavaliol-
la, uuden tuotteen parenteraalinen antaminen 10 mg/kg:n
annoksina laski veren runsasta kolesterolipitoisuutta ja
muutti edullisesti rint- ja vatsa-aortan sekä aivopohjan
30 pienten verisuonien tarkkailussa todettuja vaurioita.

Mitä tulee fosfolipidiaineenvaihduntaan, kokeelli-
sesti todettiin fosfatidyylikoliinimäärän nousu sellaisten
rottien maksakudoksessa, joilla oli hoitamaton rasvamaksa.
Selvä fosfatidyylikoliinin lisäys veren α -lipoproteiinien
35 kustannuksella määritettiin myös kokeellisin muutoksin,
jotka saatiin aikaan β - ja α -lipoproteiinien suhteilla.

Kaikki nämä kokeet ovat selvästi osoittaneet uusien suolojen lipidiaineenvaihdunnan muutoksia parantavan vaikutuksen.

5 Toinen rotalla suoritettu koesarja on osoittanut, että 1 mg/kg:n annosten antaminen saa aikaan glykogeeni-
varastojen kerääntymisen maksa- ja lihastasolle, mikä osoite-
taan sekä histokemiallisin menetelmin että kvantita-
tiivisin määrityksin. Kokeellisessa alloksaanilla aiheute-
tussa diabeteksessa välttämätön insuliinimäärä kohonnei-
10 den verensokeriarvojen palauttamiseksi normaaliksi laski huomattavasti annettaessa SAM⁺-määrää 0,5 mg/kg vastaava annos tuotetta.

Tämä koesarja on osoittanut keksinnön mukaisten uu-
sien yhdisteiden selvän positiivisen vaikutuksen sokeriaineen-
15 vaihduntaan.

Lopuksi käsiteltiin rottia, joille oli kokeellises-
ti saatu aikaan veren valkuaisainepitoisuuden aleneminen,
SAM:lla määrien ollessa 10 mg/kg. Todettiin, että mainittu
tuote palauttaa kokonaisvalkuaisainearvot normaaleiksi
20 nostamalla merkittävästi albumiinipitoisuutta ja osoitta-
en siten merkittävää proteiininabolista vaikutusta.

Tämä ja muut samanlaiset kokeet ovat osoittaneet
uusien tuotteiden valkuaisaineenvaihdunnan toiminta-
häiriöitä parantavan vaikutuksen.

25 Yhteenvetona edellä mainittujen farmakologisten
ja monien muiden kokeiden perusteella, jotka ovat mahdollis-
taneet uusien suolojen tutkimisen kaikilla ihmiselimestön
tasoilla, uusien tuotteiden vaikutus on kliinisesti
todistettu maksasairauksissa akuutin ja kroonisen maksan
30 vajaatoiminnan ollessa kyseessä, neurologiassa masennusta
lievittävinä aineina ja luuston sairauksissa reuman tapais-
ten niveltulehdusten ollessa kyseessä.

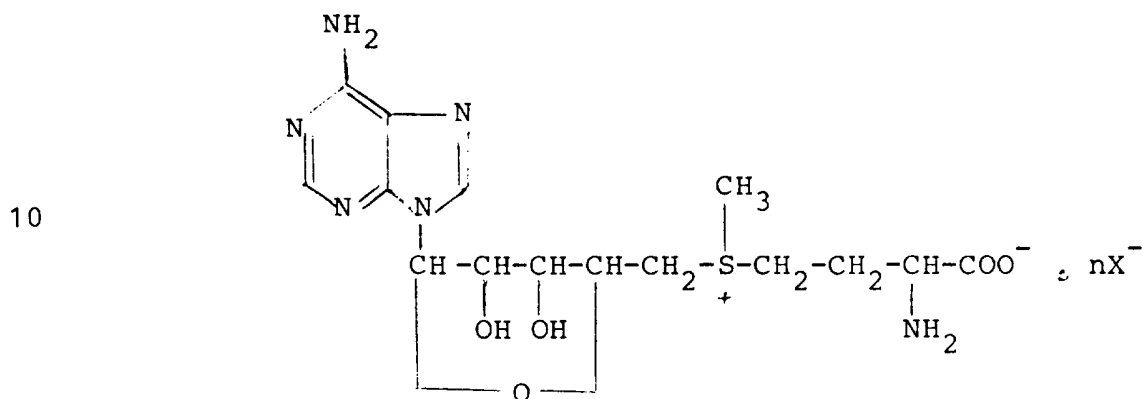
Vaikutusta lukuisilla muilla ihmisten hoidon alu-
eilla tutkitaan.

35 Uudet suolat voidaan antaa suun kautta tai lihaksen-
tai laskimonsisäisinä ruiskeina.

Muita mahdollisia antomuotoja ovat peräpuikot, silmiin
laitettavat nesteet, aerosolit tai paikallisesti käytettävät
muodot.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisten S-adenosyy-
limetioniinisuolojen (SAM-suolojen) valmistamiseksi, joilla
5 on kaava



15 jossa X on suolahapon, rikkihapon tai fosforihapon happoekvi-
valentti ja n on 4, 5 tai 6, t u n n e t t u siitä, että
epäpuhtaan SAM-suolan väkevä vesiliuos puhdistetaan johtamalla
se heikosti happaman ioninvaihtohartsipylvään läpi, SAM elu-
oidaan halutun hapon HX laimealla vesiliuoksella, eluaattiin
20 lisätään tarvittava määrä happoa, joka tarvitaan haluttua suo-
laa vastaavan täsmällisen stökiometrisen määrän saavuttamiseksi,
minkä jälkeen liuos väkevöidään ja erittäin puhdas suola
erotetaan kylmäkuivausta käyttäen, edullisesti inertin aineen,
kuten mannitolin tai jauhemaisen piihapon läsnäollessa.

25 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t-
t u siitä, että SAM:n vesiliuoksen pH säädetään 6:n ja 7:n
välille, edullisesti 6,5:een.

30 3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t-
t u siitä, että heikosti happamana ioninvaihtohartsina käyte-
tään styreeni-divinyylibentseeni-kopolymeereja.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t-
t u siitä, että eluenttina käytettävän hapon HX liuoksen kon-
sentraatio on 0,1 N.

35 5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t-
t u siitä, että stökiometrisestä määrästä puuttuva happo HX
lisätään eluaattiin väkevän kaupallisen vesiliuoksen muodossa.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että eluaatin sisältäessä ylimää-
rin happoa HX stökiömetriseen määrään nähden tämä yli-
määrä poistetaan vahvasti emäksistä ioninvaihtohartsia
5 käyttäen.

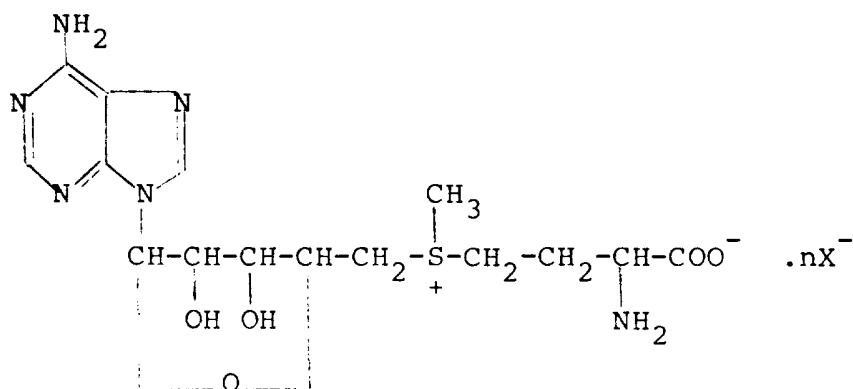
7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että eluaatti väkevöidään pitoi-
suuteen 50-100 g/l SAM:a.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av terapeutiskt använd-
bara S-adenosylmetioninsalter (SAM-salter) med formeln:

5

10



15

20

25

vari X är syraekvivalenten av saltsyra, svavelsyra eller fos-
forsyra och n är 4, 5 eller 6, k ä n n e t e c k n a t där-
av, att en koncentrerad vattenlösning av ett orent SAM-salt
renas genom ledande av densamma genom en svagt sur jonbytar-
hartskolonn, SAM elueras med en utspädd vattenlösning av den
önskade HX-syran, syramängden, vilken behövs för att uppnå
den exakta stökiometriska mängden som motsvarar det önskade
saltet, tillsätts i eluatet, varefter lösningen koncentreras
och ett synnerligen rent salt separeras genom lyofilisering,
företrädesvis i närvaro av ett inert ämne, såsom mannitol
eller pulverartad kiselsyra.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k -
n a t därav, att pH hos SAM-vattenlösningen inställs mellan
6 och 7, företrädesvis till 6,5.

30

3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k -
n a t därav, att som svagt surt jonbytarharts används styren-
divinylbensen-kopolymerer.

4. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k -
n a t därav, att HX-syralösningen, vilken används som elue-
ringsmedel, har en koncentration av 0,1 N.

35

5. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k -
n a t därav, att underskottet på HX-syra i förhållande till
den stökiometriska mängden tillsätts i eluatet i form av en
i handeln föreliggande, koncentrerad vattenlösning.

6. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k -
n a t därav, att ifall eluatet innehåller ett överskott på
HX-syra i förhållande till den stökiometriska mängden, eli-
mineras detta överskott genom användning av ett starkt basiskt
5 jonbytarharts.

7. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k -
n a t därav, att eluatet koncentreras till en koncentration
av 50-100 g/l av SAM.

10

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

—