

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202090091** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2020.06.02

(51) Int. Cl. *A61K 31/6615* (2006.01)  
*A61K 31/7076* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.07.03

---

(54) **СОЛЬ (SS)-АДЕНОЗИЛМЕТИОНИНА С ГЕКСАФОСФАТОМ ИНОЗИТОЛА И СПОСОБ  
ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ**

---

(31) 102017000074957

(32) 2017.07.04

(33) IT

(86) PCT/EP2018/067882

(87) WO 2019/007929 2019.01.10

(71) Заявитель:  
ГНОСИС С.П.А. (IT)

(72) Изобретатель:

Тальяни Ауро Роберто (IT), Грегори  
Даниэле (CH), Бьянки Давиде, Берна  
Марко, Кольцани Федерика (IT)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев  
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU)

---

(57) Изобретение относится к соли (SS)-аденозилметионина с мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексакисфосфатом и к фармацевтическим,нутрицевтическим или ветеринарным композициям, содержащим ее.

**202090091**  
**A1**

**202090091**

**A1**

**СОЛЬ (SS)-АДЕНОЗИЛМЕТИОНИНА С ГЕКСАФОСФАТОМ ИНОЗИТОЛА**  
**И СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ**

*Область изобретения*

Данное изобретение относится к соли (SS)-аденозилметионина с мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексакисфосфатом и к фармацевтическим, нутрицевтическим или ветеринарным композициям, содержащим ее.

*Предшествующий уровень техники*

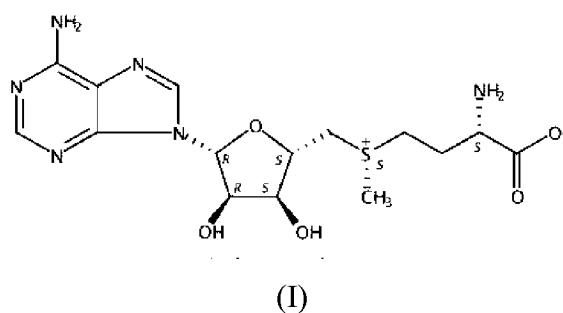
S-Аденозил-L-метионин (SАМе или адеметионин) представляет собой природный продукт, присутствующий во всех живых организмах, где он действует как важный метилирующий агент в клеточном метаболизме. Ввиду его универсальной роли, дефицит этого важного вещества в организме человека способствует появлению многочисленных расстройств; например, он связан с развитием остеоартрита, цирроза печени, муковисцидоза, некоторых депрессивных состояний и возрастных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона. Кроме того, низкие уровни SАМе связаны с развитием сердечно-сосудистых нарушений. SАМе в инъекционной форме представляет собой лекарственное средство, одобренное во многих европейских странах, при этом пероральная форма также используется в качестве пищевой добавки.

SАМе характеризуется сильной химической нестабильностью; он быстро разрушается даже при комнатной температуре, в основном с образованием S-аденозилгомоцистеина (SAH), гомосерина, метилтиоаденозина (MTA), аденина и S-5'-аденозил-(5')-3-метилпропиламина (декарбоксилированного SАМе или deca-SАМе). Этот продукт более стабилен в виде соли с сильной кислотой; известны многочисленные соли SАМе с сильными органическими или неорганическими кислотами, включающими поликислоты, такие как соль с полифосфорной кислотой, описанная в EP0191133. Однако на рынке представлены только композиции, образующие соли с 1,4-бутандисерной кислотой, серной кислотой и *пара*-толуолсульфоновой кислотой; форма, образующая соль со смесью серной/*пара*-толуолсульфоновой кислоты также указана как SАМе Pates (PTS).

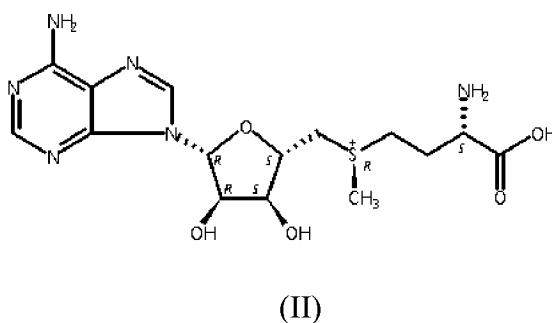
Все соли SАМе более стабильны в очень сухой форме; однако все они

гигроскопичны и стремятся поглощать воду, что вызывает процессы разложения, сокращающие продолжительность существования активного ингредиента. Поэтому композиции, содержащие соли SAdMe, должны быть приготовлены в помещениях с контролируемой влажностью, обычно с уровнями относительной влажности ниже 20%.

SAdMe также существует в двух диастереоизомерных формах: (*S*)-S-аденозил-L-метионин (Формула I)



и (*R*)-S-аденозил-L-метионин (Формула II)



Эти два изомера можно отличить с помощью ВЭЖХ-анализа. SAdMe, продуцируемый живыми организмами, биосинтезируется с использованием L-метионина в качестве субстрата с получением одного диастереоизомера, (*S*)-S-аденозил-L-метионина, также называемого (*S*)-S-аденозилметионин или (SS)SAdMe, который является фармакологически пригодным веществом.

(*R*)-диастереоизомер, также называемый (*R*)-S-аденозилметионином или (SR)SAdMe, представляет собой продукт разложения; (SS)SAdMe стремится к изомеризации вплоть до достижения состояний равновесия с достижением соотношения двух диастереоизомеров 1:1. Изомер (SR) не только неактивен в физиологических функциях, но также считается потенциально вредным (Borchardt and Wu, J. Med. Chem.; 19 (9), 1099, 1976).

SAdMe может быть также получен посредством химического синтеза, однако

промышленное производство обычно осуществляют путем ферментации посредством многоступенчатого процесса. Для получения активного ингредиента наилучшего качества, включая содержание (SS)SAmе, важно контролировать температуру и рН в течение всего процесса получения, поскольку они являются основными факторами, влияющими на процессы изомеризации и разложения (EP1283845, EP 1071001).

Как изомеризация, так и разложение в другие химические вещества является проблемой, которая сокращает срок годности лекарственного средства; изомеризация происходит наиболее быстро, быстро снижая дозу (SS)SAmе, в то время как химическое разложение приводит к образованию вышеупомянутых соединений, которые вызывают изменение цвета и образование неприятного запаха, как сообщается в EP2742943.

Исследование новых методов стабилизации активного ингредиента все еще продолжаются, подтверждая, что стабильность SAmе все еще остается нерешенной проблемой. Например, в US9534010 сообщается о получении соли с 3-индолилпропионовой кислотой, которую получают из SAmе Pates или SAmе-1,4-бутандисульфата; однако процент полученного (SS)-изомера активного ингредиента не указан, и стабильность по отношению к диастереоизомерной чистоте не указана. Используемый метод анализа (УФ-спектр в водном растворе) не дает никаких указаний на изомеризацию активного изомера.

Другой способ повышения стабильности SAmе заключается в использовании эксципиентов, которые при смешивании с солью SAmе замедляют ее деградацию, как описано в EP2742943. Указанное решение частично предотвращает образование неприятных запахов, но не препятствует изомеризации продукта и, следовательно, образованию (SR)SAmе (опять, опубликованный метод анализа не раскрывает изомеризацию продукта). Использование эксципиентов, в общем случае, очевидным образом приводит к композициям с более низкой концентрацией активного ингредиента.

Гексафосфат инозитола (IP6) представляет собой природное соединение, находящееся в семенах многих растений, особенно зерновых и бобовых, и часто сопровождается присутствием низших гомологов (пентафосфата инозитола, тетрафосфата инозитола и т.д., также обозначаемых как IP5, IP4 и т.д.), получаемых в результате деградации. Смесь различных инозитол-фосфатов обычно называется фитиновой кислотой, и она доступна на рынке в водном растворе или в виде натриевой соли; фитиновая кислота также имеется в продаже в форме ее смешанной соли кальция и магния, называемой фитином. Фитиновая кислота обладает хелатирующими свойствами в

отношении би- и трехвалентных металлов и может разрушаться ферментами, называемыми фитазами, продуцируемыми как растениями, так и микроорганизмами, включая некоторые из них, обычно присутствующие в кишечной флоре человека и других млекопитающих.

Смешанная соль или комплекс фитиновой кислоты, содержащие SAME и ионы металлов (по меньшей мере один металл), описанные в EP1896489, содержат по меньшей мере один другой катион в дополнение к SAME, в частности ион щелочного или щелочноземельного металла, такого как Na, K, Ca и т.д. Любое соединение инозитола, имеющее по меньшей мере одну фосфатную группу, а не только гексафосфат, также называют фитиновой кислотой. Ввиду значительного присутствия других веществ, содержание активного ингредиента не превышает 25% (ион SAME). Также в данном примере получение осуществляют через промежуточное соединение, другую соль SAME (сульфат, Pates или 1,4-бутандисульфат), так что конечный продукт может также содержать другие катионы (сульфаты, бутандисульфаты или тозилаты), полученные в процессе изготовления, и фосфаты, полученные в результате деградации гексафосфат инозитола до низших гомологов. И опять, диастереоизомерная чистота полученного продукта не указана, а в испытаниях на стабильность рассматривают только разрушение продукта, но не его изомеризацию.

Смесь SAME Pates с инозитолом описана в WO2007/080010 как продукт для лечения депрессии; в этом случае инозитол присутствует в высоких дозах (около 1 г), превышающих дозы SAME (около 100 мг), и может быть частично заменен его пролекарством, инозитол-1-фосфатом. Композиция также требует присутствия оксида магния в качестве стабилизатора вместе с другими наполнителями, которые значительно разбавляют присутствие SAME.

В WO 2007/04244 раскрыта смесь SAME, фитиновой кислоты, кальция и магния. Заявленное твердое соединение не имеет определенной формулы: возможные предположения о стехиометрии раскрытых смесей соответствуют или  $\text{SAME}_3 \text{Phytate}_5 \text{Ca}_7 \text{Mg}_4$  или  $\text{SAME}_3 \text{Phytate}_4 \text{Ca}_6 \text{Mg}_3$  в комбинации с другими солями или примесями SAME pates. Термин “фитиновая кислота”, при использовании в WO 2007/04244, относится к смеси инозитол-фосфатов, имеющих разные пропорции фосфатных групп, связанных с сахарным компонентом. Молярное соотношение между SAME и фитиновой кислотой ниже 0,75.

В WO 2012035685 раскрыты дрожжи, обогащенные SAME и фитиновой кислотой.

Продукт не выделен из дрожжевых клеток. Указанный документ, в частности, раскрывает: дрожжи, обогащенные SAdMe, высушенные с последующим добавлением фитиновой кислоты, имеющие содержание SAdMe примерно 3%, или композицию, содержащую SAdMe pates с добавлением фитиновой кислоты и других компонентов. Молярное соотношение между SAdMe и фитиновой кислотой составляет примерно 0,66.

### Определения

SAdMe = S-аденозил-L-метионин, или адеметионин, или SAM-e (стереохимия не определена).

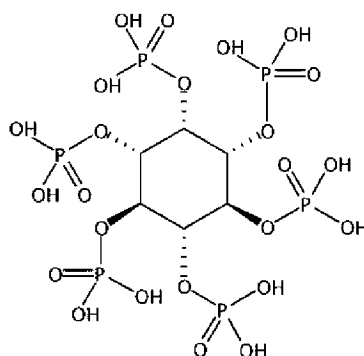
(SS)SAdMe = (SS)-диастереоизомер S-аденозил-L-метионина, формула I

(SR)SAdMe = (SR)-диастереоизомер S-аденозил-L-метионина, формула II

Изомерная чистота = % соотношение между (SS)SAdMe и суммой [(SS)SAdMe + (SR)SAdMe]

ион SAdMe = содержание в твердом веществе или растворе, выраженное как S-аденозил-L-метионин (стереохимия не определена), независимо от противоиона солеобразования.

Гексафосфат инозитола = инозитол-гексафосфат, или *мио*-инозитол-(1,2,3,4,5,6)-гексафосфат, или IP6, формула III.



(III)

### Подробное описание изобретения

Теперь было показано, что соль инозитол-гексафосфата (фитиновая кислота) с (SS)-S-аденозилметионином является особенно стабильной, хорошо поглощается при пероральном введении и характеризуется высокой диастереоизомерной чистотой. Соль по изобретению неожиданно устойчива к деградации посредством изомеризации, таким

образом обеспечивая возможность приготовления препаратов, которые сохраняют свою биологическую эффективность в течение долгого времени.

Кроме того, при пероральном введении кишечная абсорбция новой соли, описанной здесь, неожиданно оказалась более высокой по сравнению с другими соединениями SAME, доступными в настоящее время на рынке.

Соль (SS)SAME по изобретению может быть получена непосредственно из дрожжей, без необходимости выделения промежуточного продукта, что приводит к экономическим преимуществам и к продукту лучшего качества, особенно в отношении его энантиомерной чистоты.

Таким образом, объектом изобретения является соль (S,S)-S-аденозилметионина с инозитол-гексафосфатом, где отношение SAME к фитиновой кислоте является эквимолярным, то есть примерно 1 моль инозитол-гексафосфата к 1 молю (SS)SAME и, обычно находится в диапазоне от 0,75 до 1,0 (моль/моль), предпочтительно от 0,8 до 1,0.

В частности, диастереоизомерная чистота соли по изобретению составляет более 70% с точки зрения содержания фармакологически активного энантиомера (SS)SAME с содержанием (R,S)-S-аденозилметионина, не превышающим 30%, предпочтительно менее 15%, и более предпочтительно менее 5% от общего содержания SAME.

Содержание SAME, выраженное через ион, варьируется от 30% до 40%, предпочтительно от 34% до 39%, по массе. Таким образом, содержание фармакологически неактивного энантиомера (R,S)-SAME в рассматриваемом продукте составляет менее 10%, предпочтительно менее 5%, и даже более предпочтительно менее 1% общей массы.

Соль не содержит или по существу не содержит катионов или анионов, таких как  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ , железо и другие щелочные или щелочноземельные металлы, сульфаты, хлориды, пара-толуенсульфонатов, бутандисульфатов, фосфатов и других анионов сильных органических или неорганических кислот, отличных от инозитол-фосфатов.

"Не содержит или по существу не содержит" означает содержание иона менее 1% по массе, предпочтительно менее 0,1% и даже более предпочтительно менее 0,01% по массе. Особенно предпочтительной является чистая соль, в которой полностью отсутствуют другие катионы и анионы, по меньшей мере в пределах чувствительности обычно используемых методов анализа.

Предпочтительно, продукт почти не содержит пентафосфата инозитола и других низших гомологов, с общим количеством других инозитол-фосфатов (1-5-фосфатов) менее 5%, и более предпочтительно менее 1% по массе соединения.

Данное изобретение также относится к способу получения указанной соли (S,S)-S-аденозилметионина непосредственно из биомассы, без выделения других промежуточных продуктов. В этом способе используют методы хроматографической очистки и тангенциальной фильтрации для получения очищенного водного раствора, из которого продукт по изобретению выделяют при помощи распылительной сушки, сублимационной сушки или осаждения растворителями. Кроме того, способ осуществляют в условиях, которые ограничивают реакции химической деградации, в частности изомеризацию (SS)SAmе, так что качество конечного продукта является превосходным: высокая общая чистота, отсутствие металлов и органических и неорганических солей и высокая диастереомерная чистота.

Процесс по изобретению включает:

- а) получение SAmе из микробной биомассы, предпочтительно дрожжей,
- б) лизис указанной биомассы в кислых условиях,
- в) отделение биомассы и ее фрагментов от водного раствора, содержащего SAmе,
- г) очистка водного раствора SAmе при помощи хроматографии на смоле, посредством одной или более стадий, с использованием водного раствора инозитол-гексафосфата,
- д) возможно, обесцвечивание водного раствора SAmе древесным углем, диатомовыми землями или другими обесцвечивающими агентами,
- е) сушку очищенного раствора SAmе посредством лиофилизации или распылительной сушки, или
- ж) в качестве альтернативы стадии (е), осаждение соли (SS)-S-аденозил-L-метионина инозитол-гексафосфата с использованием органических растворителей, особенно смешивающихся с водой органических растворителей, предпочтительно метанола, этанола, изопропанола или ацетона.

Исходный SAmе может быть получен из биологического источника, такого как дрожжи, в соответствии с методами, описанными в EP1283845. Соответствие значениям температуры и pH, указанным на различных стадиях производства, имеет решающее значение для ограничения разложения и изомеризации изомера (SS)SAmе.

Продукт может быть очищен посредством процессов хроматографии его водных растворов на смолах, с использованием смол на основе природных или синтетических полимеров, либо функционализированных (например ионообменных смол), либо не функционализированных (например адсорбирующих смол). Смолы с полистироловой и



полиакриловой матрицей, такие как описаны в примерах ниже, являются особенно предпочтительными для промышленного процесса.

Продукт можно выделять путем осаждения растворителем, сублимационной сушки или распылительной сушки. Последние две технологии являются предпочтительными, поскольку в них не используются органические растворители; однако качество полученного продукта является превосходным во всех случаях и не зависит от используемой технологии. Важно обеспечивать достаточно сухой продукт, чтобы гарантировать хорошую стабильность; остаточная влажность не должна превышать 10% воды, предпочтительно менее 5% остаточной воды, определенной титрованием по Карлу Фишеру. Остаточные значения влажности даже ниже 1% могут быть получены либо непосредственно указанными способами, либо вторичной сушкой, например путем помещения твердого продукта в сушилку под вакуумом.

Когда (SS)-S-аденозилметионина инозитол-гексафосфат по изобретению получают при помощи распылительной сушки, он характеризуется сферической формой частиц и размером частиц менее 100 мкм; путем соответствующего регулирования рабочих условий может быть также получен меньший размер частиц, если необходимо, менее 10 микрон. Продукт представляет собой белый порошок, характеризующийся хорошей текучестью, хотя он является гигроскопичным.

Процесс распылительной сушки обычно осуществляют в потоке горячего воздуха с температурой поступающего воздуха в диапазоне от 130 до 170°C, предпочтительно от 140 до 160°C. Температура воздуха на выходе регулируется в диапазоне от 75 до 110°C, предпочтительно в диапазоне от 85 до 95°C, путем соответствующего изменения рабочих условий.

Указанные условия приводят к получению (SS)SAmе инозитол-гексафосфата в достаточно сухой твердой форме, ограничивающей разложение продукта, включая изомеризацию, с получением продукта с качеством, эквивалентным качеству продукту, полученному при помощи сублимационной сушки.

Полученный продукт также сочетает в себе лучшие характеристики сферической формы, размера частиц и других физических свойств, тем самым обеспечивая продукт с хорошей текучестью и одновременно с хорошей степенью уплотнения. Это позволяет использовать его в таблеточных прессах и наполнительных машинах для флаконов, саше, капсул и других дозированных форм.

Характеристики текучести и размера частиц порошка имеют решающее значение

для обеспечения точной дозы, так как порошок с плохой текучестью и/или неправильной формой может не полностью заполнять камеру, что делает дозу неточной.

В некоторых случаях у солей SAME существует дополнительная проблема гигроскопичности, приводящая к простоям при очистке машин для изготовления композиций и, следовательно, к снижению производительности предприятия. Эта проблема затрагивает все известные на сегодняшний день соли SAME, требующие осушенных помещений с относительной влажностью менее 20% для операций фракционирования и дозирования; такие уровни сухости можно получить только с помощью специальных технологий, таких как сушилки Munters, что сопряжено с дополнительными затратами. В случае соли с инозитол-гексафосфатом, эта проблема является менее серьезной, потому что этот продукт, несмотря на его гигроскопичность, не становится липким и остается текучим. Поэтому он может быть изготовлен в помещениях, которые не являются особенно сухими, со значениями относительной влажности (RH), достигаемыми при помощи установки обычного кондиционирования воздуха (например RH>40%), со снижением производственных затрат за счет более высокой производительности оборудования и снижения затрат на производство.

Другой аспект данного изобретения также относится к смеси фармакологически приемлемой соли SAME с высоким содержанием (SS)-диастереоизомера и инозитол-гексафосфата или его фармакологически приемлемых солей, для применения в фармацевтических, нутрицевтических или ветеринарных композициях, где молярное отношение SAME к инозитол-гексафосфату составляет менее 1.

Следующие ниже примеры иллюстрируют изобретение более подробно.

#### Пример 1

Раствор чистой фитиновой кислоты (IP6) получают из имеющейся в продаже натриевой соли инозитол-гексафосфата (чистый Na<sub>12</sub> инозитол-гексафосфат), которую растворяют в воде; затем этот раствор загружают на колонку с ионообменной смолой Amberlite IRA1200H, предварительно активированную в кислую форму, и смолу промывают деминерализованной водой. Собирают все выходящие из колонки фракции, имеющие pH менее 2, с получением раствора, состоящего из более чем 90% инозитол-гексафосфата и минимальных процентных содержаний пентафосфата инозитола; тетрафосфат инозитола и другие низшие гомологи почти полностью отсутствуют. Раствор хранят холодным в пластиковых контейнерах.

1000 кг биомассы дрожжей *Saccharomyces carlsbergensis* обогащают в отношении содержания SAME путем добавления 100 кг дрожжевой суспензии, 100 л воды, 2 кг D,L-метионина, 12 кг моногидрата глюкозы и 1,5 кг лимонной кислоты, которые затем выдерживают при ферментации в течение 2 часов при + 27°C и продувают стерильным воздухом. По окончании ферментации биомассу охлаждают до +12°C и добавляют серную кислоту вплоть до достижения pH 1,2. Затем биомассу подвергают механическому разрушению клеток с помощью системы непрерывного разрушения клеток Constant Cell Disruption System (Constant System Ltd.), поддерживая температуру между + 2°C и + 12°C. Клеточный лизат подвергают микрофильтрации для отделения частиц, в то время как супернатант загружают на колонку со смолой IRC86 (Rhom & Haas), поддерживая контролируемую температуру. Смолу промывают деминерализованной водой и уксусной кислотой, и затем продукт элюируют из смолы, используя раствор инозитол-гексафосфата, полученный, как описано выше.

Водный кислый раствор SAME-инозитол-гексафосфата затем загружают на смолу Resindion 825L и получают чистый раствор (SS)SAME инозитол-гексафосфата с чистотой более 96%.

Водный раствор затем концентрируют при помощи ультрафильтрации, с последующей перегонкой под вакуумом до достижения примерно 100 г/л; определяют точную концентрацию SAME (иона) и инозитол-гексафосфата и доводят до эквимольного соотношения. Концентрат затем сушат в установке для распылительной сушки посредством распыления горячим воздухом при + 160°C и собирают продукт с уровнем влажности ниже 4% (определяемым титрованием по Карлу Фишеру).

Получают белый порошок с содержанием иона SAME 39%, 95% которого состоит из (SS)-изомера и 5% из (SR)-изомера. Общее количество присутствующих примесей составляет менее 5% (площадь при ВЭЖХ).

### Пример 2

(SS)S-Аденозилметионин получают посредством биотрансформации дрожжами, как описано в Примере 1. (SS)SAME-обогащенные дрожжи подвергают термокислотному лизису путем добавления инозитол-гексафосфата до pH 2,0 и нагревании при +80°C в течение нескольких секунд, с последующим быстрым охлаждением до температуры ниже +12°C. Полученную таким образом суспензию подвергают микрофильтрации, и полученный фильтрат затем подвергают хроматографической очистке при контролируемой температуре, как описано в примере 1, до получения

концентрированного раствора (SS)SАМе инозитол-гексафосфата с концентрацией примерно 100 г/л при приблизительно эквимолярном соотношении между IP6 и SАМе.

Затем раствор подвергают распылительной сушке путем распыления в камере, нагретой до +140°C, в условиях потока, так что температура выходящего продукта составляет примерно + 90°C.

Получают белый порошок с содержанием иона SАМе 34%, остаточной влажностью 4% и энантиомерной чистотой 85% в виде (SS) SАМе.

Содержание ионов Na, Fe, Ca и Mg в продукте составляет менее 0,1% для каждого элемента, в то время как общее содержание тяжелых металлов (титрованных, как указано в *Ph.Eur. 2,4,8, метод А*) составляет менее 10 млн<sup>-1</sup>. Содержание сульфата, хлорида и фосфата составляет менее 0,1% на анион. Более 90% фитиновой кислоты, присутствующей в продукте, состоит из инозитол-гексафосфата.

#### Пример 3

Процесс осуществляют, как описано в примере 2, но с использованием серной кислоты для термокислотного лизиса дрожжей. Очистка раствора (SS)SАМе происходит, как описано в примере 1, но с использованием водного раствора инозитол-гексафосфата для элюирования продукта со смолы IRC86 и для всех последующих стадий производства, которые осуществляют на холоде.

Полученный раствор анализируют на содержание иона SАМе и доводят раствор фитиновой кислоты до молярного соотношения 1,02 (моли SАМе иона/моли инозитол-гексафосфата).

Продукт выделяют при помощи распылительной сушки и получают белый порошок с содержанием иона SАМе 39,5%, остаточной влажностью 3,3% и энантиомерной чистотой 78,4%.

Содержание неорганического аниона и катиона очень похоже на содержание, описанное в примере 2, включая сульфаты; более 90% противоиона SАМе состоит из инозитол-гексафосфата.

#### Пример 4

Процесс осуществляют, как описано в примере 2, но с использованием соляной кислоты для термокислотного лизиса дрожжей. Очистка раствора (SS)SАМе происходит, как описано в Примере 3, с использованием фитиновой кислоты для всех последующих стадий производства, которые осуществляют на холоде.

Содержание SАМе определяют с помощью анализа ВЭЖХ, и добавляют IP6, пока

молярное отношение иона SAME к инозитол-6-фосфату не достигнет 0,9 моль/моль.

Продукт выделяют при помощи распылительной сушки и получают белый порошок с содержанием иона SAME 34%, остаточной влажностью 2,5% и энантиомерной чистотой 90%.

Содержание неорганических анионов и катионов очень похоже на содержание, описанное в примере 2, включая хлориды; более 90% противоиона SAME состоит из инозитол-гексафосфата.

#### Пример 5

Готовят 7% раствор  $\text{Na}_{12}$  инозитол-гексафосфата в воде и подвергают его электродиализной обработке с получением соответствующего раствора инозитол-гексафосфата в виде кислоты (IP6).

Процесс осуществляют, как описано в примере 4, но с использованием серной кислоты для термокислотного лизиса дрожжей. Очистку раствора (SS)SAME выполняют, как описано в примере 2, с использованием раствора кислоты IP6 для всех последующих стадий производства, которые осуществляют на холоде.

Раствор обесцвечивают активированным углем, после чего определяют содержание иона SAME в ВЭЖХ-анализе и добавляют IP6 с получением молярного отношения 0,76 (ион SAME/инозитол-гексафосфат).

Продукт выделяют при помощи распылительной сушки и получают белый порошок с содержанием иона SAME 31,2%, остаточной влажностью 2,5% и энантиомерной чистотой 98%.

#### Пример 6

Сравнительный пример

Процесс осуществляют, как описано в EP1896489, для получения образца фитата SAME. Используют порошкообразный, имеющийся в продаже SAME 1,4-бутандисульфат, который обрабатывают, как описано в примере 3 EP1896489: растворение в воде, добавление фитиновой кислоты, инкубация во льду, добавление этанола и фильтрация под вакуумом.

Полученный белый осадок фильтруют и сушат под вакуумом. Полученный продукт имеет остаточную влажность 1,45%, содержание иона SAME 25,6% и чистоту 98,45%. Его энантиомерная чистота составляет 76,96% в виде изомера (SS)SAME. Продукт называется 04B17DS.

#### Пример 7

## Сравнительный пример

Продукт, полученный, как описано в Примере 6 (содержащий SAME и фитиновую кислоту) и образец SAME инозитол-гексафосфата, полученный, как описано в Примере 5, подвергают ускоренному тесту на стабильность, инкубируют в термостате при +55°C и анализы повторяют через 5 суток.

В образцах анализируют следующие значения:

- содержание иона SAME (суммарное для всех энантиомеров), определенное посредством ВЭЖХ и выраженное в виде % по массе;
- энантиомерная чистота, определенная посредством ВЭЖХ и выраженная в виде % (SS)-изомера;
- содержание активного ингредиента, рассчитанное путем умножения двух предыдущих значений и выраженное в виде % (SS)SAME по массе;
- общая чистота, определенная посредством ВЭЖХ как площадь SAME/общая площадь хроматограммы, выраженная в виде % площади. Фигура содержит значения всех известных примесей при разложении.

Получены результаты, приведенные в таблице.

|                     | Исходное значение  | Конечное значение |
|---------------------|--------------------|-------------------|
| 04B17DS             |                    |                   |
| Содержание SAME     | 25,6% масс./масс.  | 17,7% масс./масс. |
| (SS)-энантиомер     | 76,96%             | 50,66%            |
| Содержание (SS)SAME | 19,70%             | 8,95%             |
| Чистота (% площади) | 98,45%             | 90,15%            |
| AT1003              |                    |                   |
| Содержание SAME     | 34,45% масс./масс. | 30,6% масс./масс. |
| (SS)-энантиомер     | 77,2%              | 69,56%            |
| Содержание (SS)SAME | 26,59%             | 21,28%            |
| Чистота (% площади) | 95,98%             | 90,0%             |

Данные в таблице ясно показывают, что при равных условиях образец AT1003 сохраняет более высокое содержание активного ингредиента (SS)SAME после стресс-теста. Реакции деградации с получением МТА, САН и других известных примесей, в целом отражаемых данными по чистоте в % площади, сопоставимы для этих двух образцов. Однако реакция деградации путем изомеризации неожиданно ниже для образца

AT1003, который сохраняет избыток формы (SS)SAmе, тогда как образец 04B17DS полностью изомеризован.

Поэтому большая стабильность активного ингредиента в AT1003 обусловлена главным образом большей устойчивостью к изомеризации, а не к другим реакциям разложения.

#### Пример 8

Фармакокинетический профиль у крыс

70 крыс Sprague Dawley (35 самцов и 35 самок), в возрасте 7-9 недель и массой 176-200 г акклиматизировались в клетке в течение двух недель перед началом обработки, поддерживали при + 22°С и относительной влажности 55%. Крыс кормили кормом 4RF 21 (Mucedola) и взвешивали перед началом и в конце теста. На момент обработки 32 животных на группу (16 самцов и 16 самок) выбирали из имеющих наиболее близкую массу, и назначали им две обработки.

SAmе инозитол-гексафосфат (партия 1500282: содержание иона SAmе 37,48%, изомерная чистота в виде (SS)SAmе: 77,2%) сравнивали с имеющимся в продаже образцом SAmе Pates (смешанная соль сульфат/*пара*-толуолсульфат) в тех же дозах (выраженных в виде иона SAmе).

Продукт, растворенный в воде, вводили канюлей, в двух дозах, а именно 134 мг/кг и 95 мг/кг. Крыс не кормили в течение ночи перед введением и еще в течение двух часов после введения. Две эквимолярные дозы гарантировали равный приём SAmе иона.

Уровни SAmе в крови анализировали, отбирая образец из хвостовой вены с фиксированными интервалами времени, начиная с 0 (предварительное введение), и через 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 8 и 24 часа после введения. Образцы крови центрифугировали после добавления ЭДТА для отделения плазмы от клеточной фракции. Затем плазму анализировали методом ВЭЖХ в соответствии со способом, описанным в Wise, Fullerton *J. Liq. Chromatogr.* 18 (1995) 2005-17, и были получены данные, показанные на графике на Фиг. 1 (среднее значение для всех образцов).

Значения концентрации SAmе в плазме также использовали для определения, в соответствии с вычислением площади под кривой (AUC), общего количества поглощенного активного ингредиента, получая значения, приведенные на Фиг. 2.

Как ясно показывают цифры, солеобразование с инозитол-гексафосфатом (SAmе IP6) приводит к лучшей абсорбции и более высокой концентрации в плазме активного ингредиента, чем у продукта, имеющегося в настоящее время на рынке (SAmе Pates).

Пример 9

## Сравнительный пример

Некоторые образцы продуктов, полученные, как описано в предыдущих примерах, подвергают испытаниям на стабильность, путем хранения их при + 25°C, в термостате.

Анализ содержания иона SAME (Фиг. 3) и диастереомерной чистоты в отношении (SS)-изомера (Фиг. 4) периодически повторяют, и результат сравнивают с исходным значением для того же образца, получая представленные результаты.

Сравнивают данные, полученные с продуктом, полученным согласно EP1896489, и двумя имеющимися в продаже образцами SAME, 1,4-бутандисульфатной солью (SD4 тест 1) и солью Pates (партия S1S1057B).

Если наблюдают только содержание иона SAME, то все образцы стабильны (Фиг. 3).

Как ясно показано на Фиг. 4, содержание активного ингредиента, изомера (SS)SAME, является стабильным в течение более продолжительного времени в случае инозитол-гексафосфатной соли (образцы AT1003 и AT1005) и имеющейся в продаже 1,4-бутандисульфатной соли (образец SD4 тест 1). Имеющаяся в продаже соль Pates (S1S1057B) и комплекс SAME-металл-фитат, полученный согласно EP1896489 (образец 04B17DS) теряют диастереоизомер (SS)SAME быстрее, тем самым уменьшается количество активного ингредиента.



## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. (SS)-S-Аденозил-L-метионина инозитол-гексафосфат, где молярное отношение SAMe (S-Аденозил-L-метионин) к инозитол-гексафосфату находится в диапазоне от 0,75 до 1,0.

2. (SS)-S-Аденозил-L-метионина инозитол-гексафосфат по п. 1, где отношение SAMe к инозитол-гексафосфату является эквимольным.

3. (SS)-S-Аденозил-L-метионина инозитол-гексафосфат по п. 1 или 2, имеющий содержание иона SAMe более 30% по массе.

4. (SS)-S-Аденозил-L-метионина инозитол-гексафосфат по п. 3, имеющий содержание иона SAMe в диапазоне от 30% до 40% по массе.

5. (SS)-S-Аденозил-L-метионина инозитол-гексафосфат по п. 4, имеющий содержание иона SAMe в диапазоне от 34% до 39%.

6. (SS)-S-Аденозил-L-метионина инозитол-гексафосфат по любому из пп. 1-5, имеющий изомерную чистоту более 70%.

7. (SS)-S-Аденозил-L-метионина инозитол-гексафосфат по любому из пп. 1-5, имеющий изомерную чистоту более 95%.

8. (SS)-S-Аденозил-L-метионина инозитол-гексафосфат по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что он по существу не содержит неорганических катионов и неорганических или органических анионов.

9. (SS)-S-Аденозил-L-метионина инозитол-гексафосфат по п. 8, отличающийся тем, что он по существу не содержит щелочных и щелочноземельных металлов, железа, сульфатов, *para*-толуолсульфонатов, фосфатов, хлоридов и 1,4-бутандисульфатов.

10. (SS)-S-Аденозил-L-метионина инозитол-гексафосфат по любому из пп. 1-9, где содержание инозитол-пентафосфата или других инозитол-фосфатов (1-4 фосфата), в целом ниже 5% от массы соединения.

11. Способ получения (SS)-S-аденозил-L-метионин инозитол-гексафосфата по пп. 1-10, включающий:

- а) получение SAMe из микробной биомассы, предпочтительно дрожжей,
- б) лизис указанной биомассы в кислых условиях,
- в) отделение биомассы и ее фрагментов от водного раствора, содержащего SAMe,
- г) очистку водного раствора SAMe с помощью хроматографии на смоле, посредством одной или более стадий, с использованием водного раствора инозитол-гексафосфата,

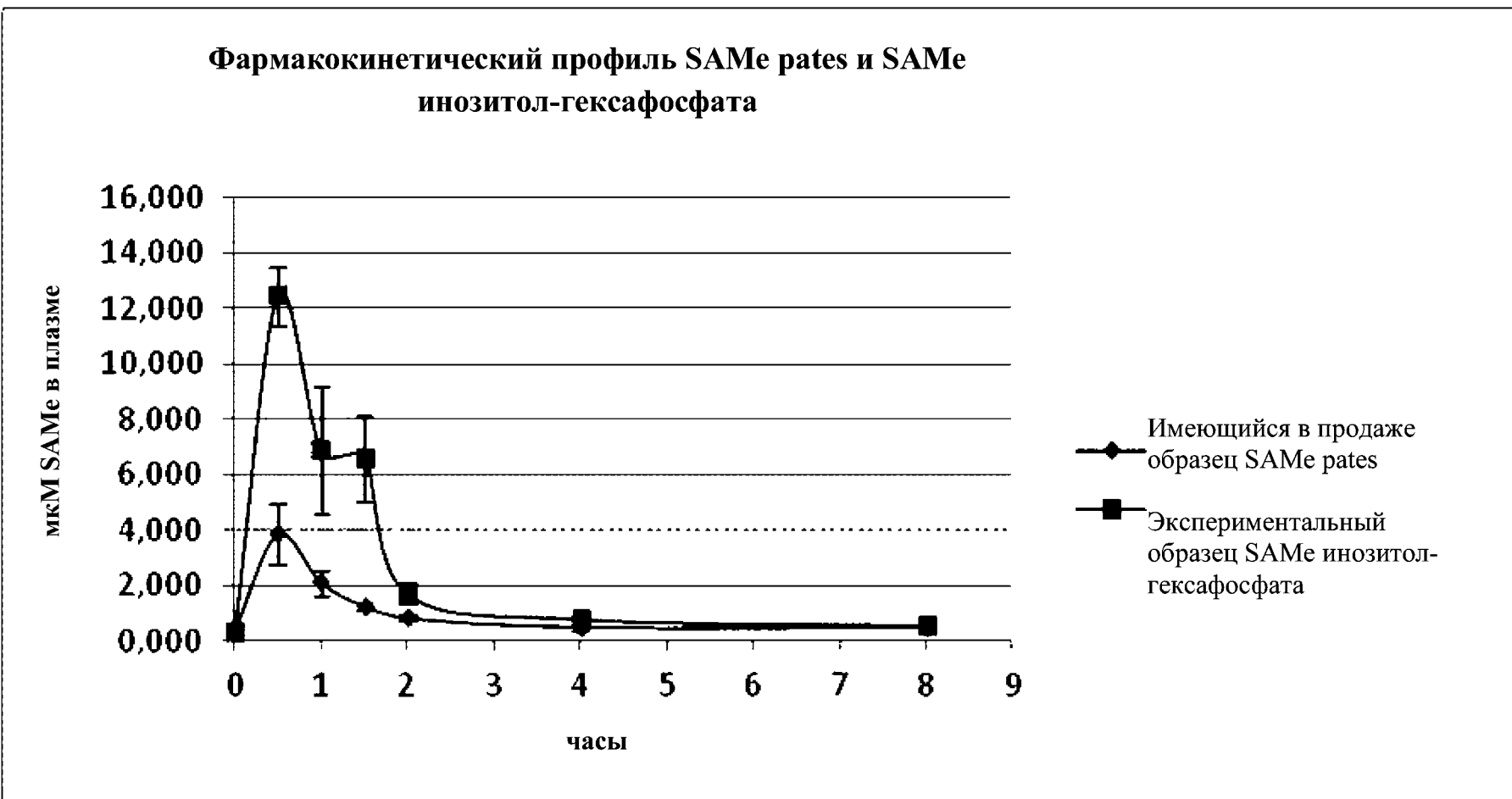
д) возможно обесцвечивание водного раствора SАМе углем, диатомитом или другими обесцвечивающими агентами,

е) сушку очищенного раствора SАМе посредством лиофилизации или распылительной сушки, или

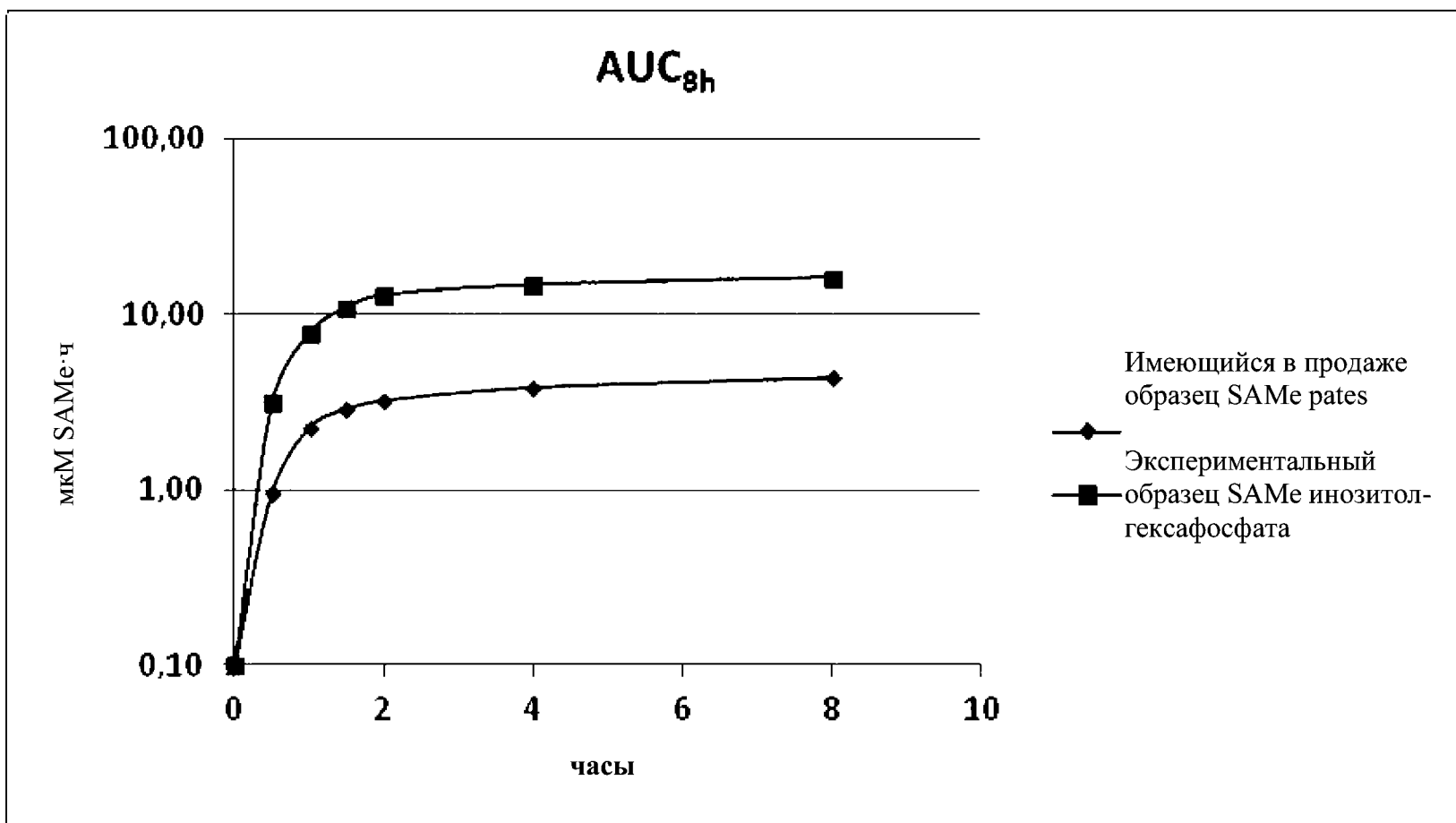
ж) альтернативно стадии (е), осаждение соли (SS)-S-аденозил-L-метионина инозитол-гексафосфата с использованием органических растворителей, в частности смешивающихся с водой органических растворителей, предпочтительно метанола, этанола, изопропанола или ацетона.

12. Фармацевтические, нутрицевтические или ветеринарные композиции, содержащие (SS)-S-аденозил-L-метионина инозитол-гексафосфат по пп. 1-10 в качестве активного ингредиента.

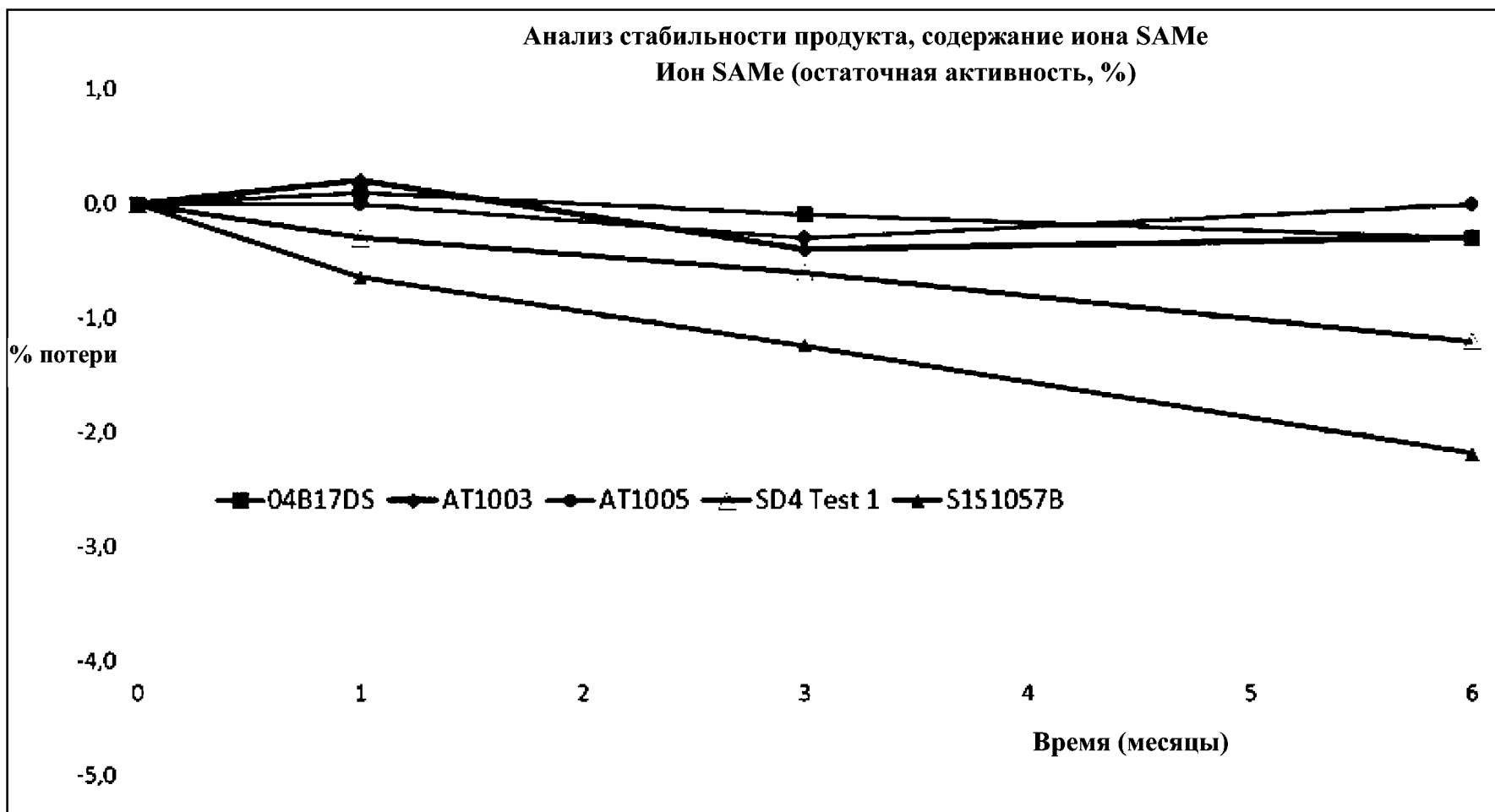
13. Смесь фармакологически приемлемой соли SАМе с высоким содержанием (SS)-диастереомера и инозитол-гексафосфата или его фармакологически приемлемых солей, для применения в фармацевтических, нутрицевтических или ветеринарных композициях, где молярное отношение SАМе к инозитол-гексафосфату составляет менее 1.



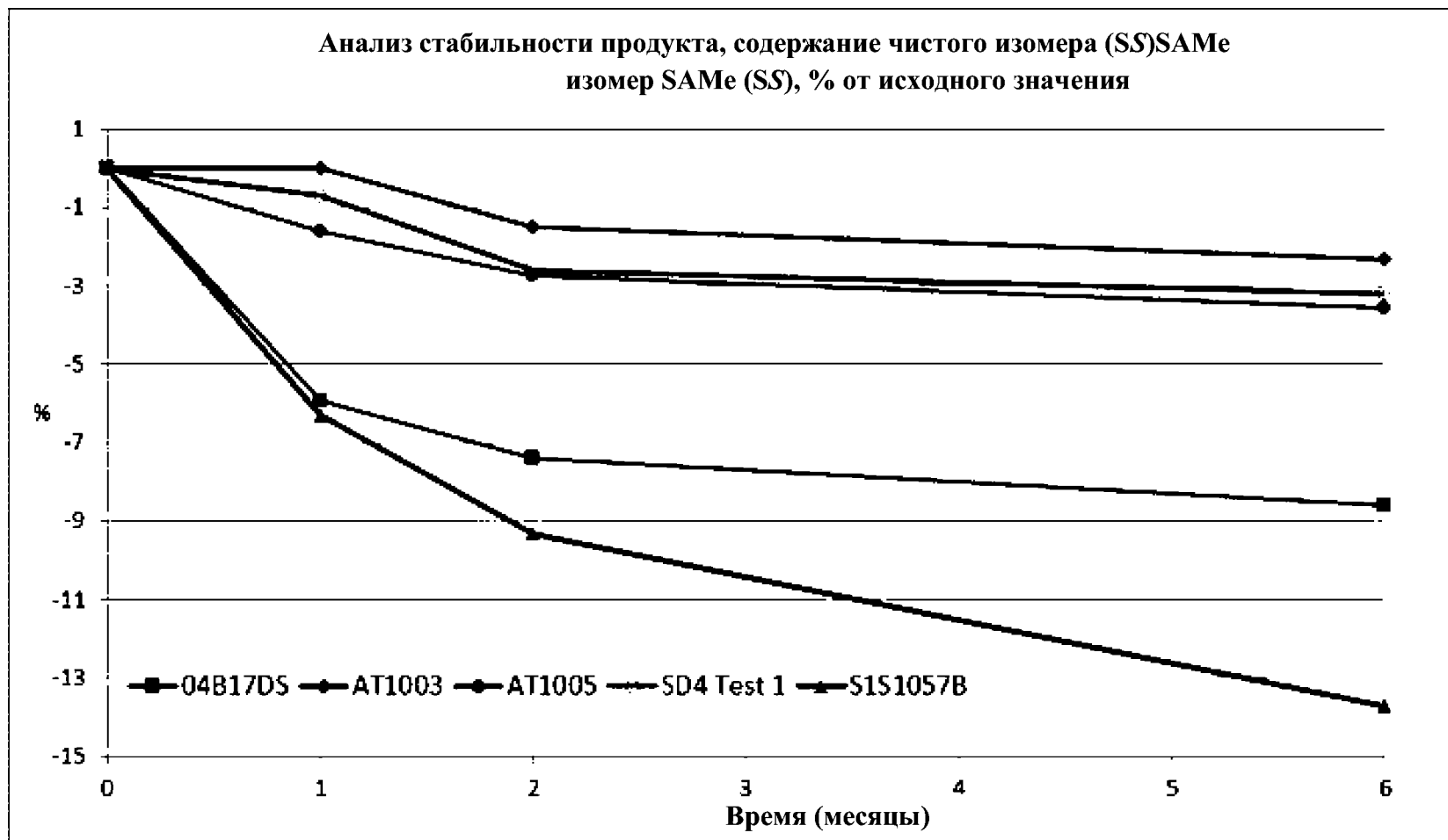
Фиг. 1



Фиг. 2



**Фиг. 3**



**Фиг. 4**