

S/Ref.: EL/mb/6357

N/Ref.: O.G. 30.532/AV

Int. Cl.² C 07 G

441233

PATENTE DE INVENCION

18 NOV. 1976

CONCEDIDA

MEMORIA DESCRIPTIVA

Sobre:

"PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE GANGLIOSIDOS".

Solicitante: La Sociedad italiana: FIDIA, S.p.A., con domicilio en Via A. Diaz 63 - ADANO TERME (Padova).
Italia.

Inventor: D. Luigi Vecchia, italiano.

La presente invención tiene por objeto, un procedimiento para la extracción de gangliosidos del tejido nervioso de mamíferos. Los gangluósidos son glicolípidos que contienen en su molécula, además del aminoalcohol esfingosina, ácidos -
5. grasos (principalmente esteárico, palmítico, aráquico y béqui-
co), azúcares simples (glucosa, galactosa) y N-acetil-glucosa-
mina, un número variable entre uno y cuatro de residuos de -
ácido N-acetil-neuramínico (ácido siálico) por molécula.

Los gangliósidos han sido descubiertos por Landstei-
10. ner y Levene y denominados así por Klenk en 1942.

En lo que respecta a la nomenclatura de los ganglió-
sidos, la propuesta por Svennerholm es la que en la actuali-
dad se usa principalmente; en ella se asignan las letras "M",
"D", "T" ó "Q" puestas a la abreviatura G, a los mono-, -
15. di-, tri- ó tetra-sialo gangliósidos. Tal nomenclatura usa -
además índices numéricos después de las letras, para señalar com-
puestos que presentan el mismo contenido en ácido siálico, pe-
ro movilidad cromatográfica diferente. En la presente descrip-
ción se empleará tal nomenclatura.

Es de señalar asimismo que con el nombre de ganglió-
sidos se pretende identificar glicosil-ceramidos que contienen
ácido siálico y no sialilactosilceramidos (hematósidos), que
sin embargo se hallan corrientemente comprendidos en la gran
clase de los glicoesfingolípidos.

Según la presente invención, por nueva aplicación -
terapéutica de los gangliósidos se extiende la utilización, -
como principio activo, de una mezcla de gangliósidos extraídos
del tejido nervioso de mamíferos que contiene mono-, di-, tri-
y tetra-sialo gangliósidos o bien fracciones en su mayor par-
30. te purificadas, que contienen un número menor de clases gan--

gliósidas.

- Según la presente invención, los gangliósidos se suministran, para una aplicación terapéutica, por vía inyectable, intramuscular o endovenosa, en medio acuoso oportunamente tamponado. La forma farmacéutica de conservación puede ser la de ampollas que contengan un producto líquido o liofilizado, o bien la de frascos para infusión endovenosa.
- 5.

- A título puramente indicativo y por consiguiente no limitativo, los gangliósidos según la invención pueden ser extraídos del tejido nervioso de mamíferos con el método señalado en el siguiente ejemplo.
- 10.

Ejemplo

- El tejido nervioso retirado del animal se homogeneiza en tampón fosfato a un pH de 6,8; luego se añaden 6 volúmenes de tetrahydrofurano y se centrifuga la resultante mezcla. Se extracta dos veces el sobrenadante con tetrahydrofurano. Después de la centrifugación, se separan los materiales no polares por fraccionamiento con éter etílico y la fase acuosa-tetrahydrofuránica se introduce en una columna de cambio iónico equilibrado con etanol al 50%. Como eluyente, se usa siempre etanol al 50%. Al efluente de la columna se añade hidróxido bórico y cuatro volúmenes de etanol helado. Después de 18 horas en frío, se recoge un precipitado, que se acidifica luego ligeramente con ácido clorhídrico después de su disolución en agua. La solución así obtenida se dializa y liofiliza. El rendimiento en este punto es de 0,6 mg aproximadamente de gangliósidos crudos por gramo de tejido nervioso utilizado. El polvo liofilizado se dispersa en 20 volúmenes de cloroformo-metanol 2:1; filtrada la solución obtenida hasta obtenerla perfectamente limpia, se fracciona añadiendo 0,2 volumen de solución de cloruro potásico en agua al 0,88%. La fase superior es
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

- separada, dializada y liofilizada. El rendimiento final es de 0,3 mg aproximadamente de gangliósidos por gramo de tejido nervioso. Para la separación de las fracciones gangliósidas individuales, es necesario utilizar columnas de ácido silícico eluidas con mezclas de metanol-cloroformo. Antes de la utilización para aplicación terapéutica humana, sobre el material obtenido deben efectuarse los ensayos de ausencia de actividad pirógena, de ausencia de proteínas, de falta de actividad anafilatógena y de ausencia de histamina.
- 5.
10. Para las nuevas aplicaciones terapéuticas según la invención, la formulación puede ser, por ejemplo, la siguiente. Cada ampolla de 2 ml in vitro neutro contiene:
- X mg de gangliósidos extraídos de tejido nervioso de mamíferos, titulados en ácido N-acetil-neuramínico, y resto hasta completar 2 ml de tampón fosfato, pH 7,6 M/100, en agua bidestilada apirógena y estéril, donde X representa cantidades de gangliósidos comprendidas entre 5 y 50 mg, según la titulación en ácido N-acetil-neuramínico, a su vez variable entre el 20 y el 35% p/p de gangliósido usado, así como según la patología que se pretende curar.
- 15.
- 20.
25. Aunque las nuevas aplicaciones terapéuticas según la invención sean adecuadas en general para todas las patologías relacionadas con perturbaciones de la conducción del estímulo nervioso en el sistema nervioso central y periférico, pueden citarse las siguientes aplicaciones específicas: neuritis ópticas retrobulbares, parálisis de los nervios oculomotores, neuralgias del trigémino, parálisis del nervio facial o de Bell, síndrome de Garcin, polirracolonsuritis agudas (síndrome de Guillain Berré), radiculitis, lesiones traumáti
- 30.

- cas de los nervios periféricos, lesiones tóxicas de los nervios periféricos, polineuritis diabéticas y alcohólicas, parálisis obstétrica, ciática paralítica, enfermedad de las motoneuronas, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular miopática, parálisis bulbar progresiva, miastenia grave y síndrome de Lambert Eaton, distrofia muscular, alteraciones de la transmisión nerviosa sináptica a nivel del SNC y del SNP, perturbaciones de la conciencia, como estado confusional, conmoción cerebral, secuelas de trauma craneal, turbas vasculares cerebrales, trombosis y embolias.

- Basándose en los conocimientos cada vez más profundos tanto de la composición química dipolar de los gangliósidos como de su localización sobre la membrana celular a nivel de las terminaciones nerviosas, resulta evidente que estos compuestos no sólo participan en la constitución química, sino también en la dinámica funcional del sistema receptor de la célula nerviosa.

- Por consiguiente, es posible atribuir a los gangliósidos una notable importancia en la fisiología cerebral, importancia que resulta más evidente aún si se considera que en muchas enfermedades del SNC se han encontrado alteraciones cuantitativas precisamente de los gangliósidos corticales.

- Con los gangliósidos según la presente invención se ha efectuado una amplia experimentación farmacológica y clínica. Se han realizado muchos ensayos en animales, como los relativos a parálisis por protamina, potenciamiento de la narcosis barbitúrica, hipercapnia experimental, convulsiones por electroshock y por cardiazol, etc., y - - todos estos ensayos han confirmado plenamente las hipótesis de los investigadores.

Se han efectuado luego experimentos para evaluar - los efectos de los gangliósidos cerebrales según la invención en la recuperación funcional obtenida en la regeneración y -- reintegración nerviosa.

5. Se ha estudiado el efecto protector, en el hombre, de los gangliósidos de corteza cerebral bovina según la invención sobre la bradiacusia o dureza de oído, por ruido. En los sujetos voluntarios tratados, expuestos a un ruido de bandas estrechas concentradas en 2 KHz, durante un tiempo de 30 minutos, no se produce ningún deslizamiento del umbral auditivo, 10. contrariamente al grupo de control; se consigue por consiguiente un efecto protector en el hombre sobre la pérdida temporal de oído, inducida por ruido de elevada intensidad.

- La ulterior experimentación clínica se efectuó sobre grupos de pacientes afectados de formas neurológicas diversas, por cuanto que el mecanismo de acción de los productos según la invención hacía pensar que pudiesen experimentar beneficio todos los síndromes morbosos en cuya base se encuentra una estimulación alterada, debida a un inadecuado mensaje bioquímico o en cualquier caso a una variación del umbral de 15. excitabilidad.
20. La ulterior experimentación clínica se efectuó sobre grupos de pacientes afectados de formas neurológicas diversas, por cuanto que el mecanismo de acción de los productos según la invención hacía pensar que pudiesen experimentar beneficio todos los síndromes morbosos en cuya base se encuentra una estimulación alterada, debida a un inadecuado mensaje bioquímico o en cualquier caso a una variación del umbral de excitabilidad.

- Por consiguiente, se han tomado en consideración y se han sometido a terapia con los productos según la invención cuadros patológicos que presentaban alteraciones de la transmisión nerviosa a nivel central o a nivel de los neuroefectores periféricos de las más diversas etiopatogénesis. 25.

- En particular, se han tratado pacientes afectos de intoxicación crónica por alcohol, enfermedad de Parkinson, -- vasculopatías cerebrales y síndromes demielinizantes. El juicio clínico ha sido totalmente positivo, incluso en base a la 30.

evaluación estadística y en confrontación con los resultados obtenidos en los pacientes sometidos a terapia clásica.

5. La experimentación clínica se ha efectuado sobre muchísimos pacientes afectados de varios estados morbosos caracterizados todos ellos por alteraciones de la transmisión nerviosa, tanto a nivel central como periférico; La eficacia del preparado se ha evaluado sobre la base de las modificaciones inducidas por el tratamiento sobre algunos parámetros, aparte del juicio clínico subjetivo de los experimentadores.

10. Aunque se han ofrecido sólo algunas indicaciones terapéuticas de los productos según la invención y una sola forma de aplicación del procedimiento para obtenerlos, resultará ahora fácil a un experto en la materia prever numerosas modificaciones y variantes, que deberán considerarse comprendidas en el ámbito de la presente invención. Es de destacar en particular que los productos según la invención podrán usarse también en asociación con otros fármacos.

15.

N O T A

20. La Patente de Invención, que se solicita por veinte años para España, de acuerdo con la vigente Legislación, deberá recaer sobre: "PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE GANGLIOSIDOS", con Prioridad de la Demanda de Patente en Italia nº 26323, de fecha 13 de Agosto de 1975, según las características esenciales de las siguientes:

25.

R E I V I N D I C A C I O N E S

30. 1º.- Procedimiento de obtención de gangliósidos, — caracterizado porque el tejido venoso, retirado del animal, — es homogeneizado en tampón fosfato con adición de tetrahydrofurano y ulterior centrifugación, siendo reextraído el sobrenadante varias veces con tetrahydrofurano y después de la centrifugación los materiales no polares son retirados por parti

- ción con éter etílico, introduciéndose la fase acuosa-tetrahi-
drofuránica en una columna de cambio iónico equilibrado con -
etanol al 50%; como eluente se usa etanol al 50%; al efluente
de la columna se añade hidróxido bórico y 4 volúmenes de eta-
nol helado; después de muchas horas de permanencia en frío se
5. recoge un precipitado que se acidifica luego con ácido clorhí-
drico después de su disolución en agua; la solución obtenida
se dializa y liofiliza y luego se dispersa en cloroformo-meta-
nol; se fracciona la solución con adición de solución de clo-
10. ruro potásico y se separa la fase superior, se dializa y se -
liofiliza para la ulterior separación de las fracciones gan-
gliósidas, pudiendo emplearse columnas de ácido silícico eluf-
do con mezclas de metanol-cloroformo.

2ª.- "PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE GANGLIOSIDOS".

15. Según queda sustancialmente descrito en la presente
memoria que consta de ocho hojas, escritas a máquina por una
sola cara.

Madrid, 24 SET. 1975

FIDIA, S.p.A.

P. P.

FRANCISCO GARCIA CABREIZO
P.P.

Firmado: M.ª Dolores Jorquera

20.