

Memória descritiva referente à patente de invenção de FIDIA S.p.A., italiana, industrial e comercial, com sede em Via Ponte Della Fabbrica 3/A, 35031 Abano Terme (Padova), Itália, (inventor: Francesco della Valle, residente na Itália), para:
"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM NOVO FACTOR NEURONOTRÓFICO E DE COMPOSIÇÕES FARMACEUTICAS QUE O CONTEM"

Memória Descritiva

I. OBJECTO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um novo factor neuronotrófico macromolecular (SDNF) derivado do cérebro de mamíferos, em particular do núcleo caudato de bovinos e a um processo para a preparação do mesmo. Do ponto de vista químico, o factor neuronotrófico purificado é uma proteína básica com um ponto isoeléctrico aproximado de 10, cujo peso molecular, determinado por electroforese com gel contendo SDS (dodecilsulfato de sódio), é semelhante ao da lisozima, isto é, igual a cerca de 14 400 dalton. Do ponto de vista biológico, a molécula é capaz de incrementar in vitro a sobrevivência de neurónios do sistema nervoso em cultura, especialmente os do sistema nervoso central.

A fonte acima mencionada e as características químicas e biológicas dos factores neuronotróficos distinguem-se das de outros factores neuronotróficos macromoleculares identificados, já descritos. Além disso, as aplicações farmaceuticas da molécula de SDNF foram identificadas e essas aplicações também fazem parte do objecto da presente invenção.

II. INTRODUÇÃO

a. Definição e Papel dos Factores Neuronotróficos

Verificou-se que a sobrevivência e o crescimento de células de mamíferos in vivo e in vitro são regulados por uma série de sinais extracelulares específicos semelhantes a hormonas, conhecidos como de crescimento, a maior parte dos quais são proteínas ou péptidos. Biologicamente, cada factor de crescimento actua sobre um grupo particular de células específicas a que se destina e que lhes respondem.

A investigação sobre os factores de crescimento proteicos macromoleculares, que controlam a sobrevivência e, o desenvolvimento de células de neurónios de mamíferos tanto durante o seu crescimento como quando são adultos, está agora a ter um considerável interesse no campo da investigação neurobiológica. Foi sugerido que, durante o desenvolvimento do sistema nervoso, factores neuronotróficos que ocorrem extrinsecamente e são derivados directamente dos micro-ambientes humorais e celulares, regulam a sobrevivência e a morte das células dos neurónios (Cowan, W. M. e col., Science 225:1258, 1984). Na realidade, foi sugerido que a competição entre axões e de inervamento do crescimento para factores neuronotróficos derivados de células de uma cerca finalidade determina quais são os neurónios que vivem ou que morrem durante a ambriogénese. No adulto, de maneira semelhante, se for da mesma maneira, factores neuronotróficos

foram propostos como indispensáveis para manter a sobrevivência das células dos neurónios e corrigir ligações funcionais intracerebrais (S. Varon, Discussions in Neuroscience, Vol. II, Nº 3, 1985). Portanto, o enfraquecimento progressivo e a morte de células dos neurónios (que ocorrem depois de uma lesão traumática, de processos patológicos tais como choque ou doenças neurodegenerativas e envelhecimento) podem envolver a diminuição da quantidade ou a inibição de factores neuronotróficos in vivo (S. Varon, ibid; S. H. Appel. Ann. Neurol., 10:499. 1981); S. Varon e col., Dev. Neurosci., 6:73, 1984).

Também foi sugerido por estes investigadores que os factores neuronotróficos dos mamíferos adultos são a base dos processos de reparação e regenerativos a seguir a uma lesão não só do sistema nervoso periférico mas também do sistema nervoso central. Na realidade, a aplicação de modernas técnicas neurobiológicas nas experiências de transplantação e de lesões dos sistemas nervoso centrais de animais fortaleceu a ideia de que a reparação dos neurónios é possível no sistema nervoso central de mamíferos adultos, desde que estejam disponíveis sinais tróficos apropriados (F. H. Gage e col., Nature 308;637, 1984).

Até recentemente, o único factor neurotrófico proteico macromolecular bem caracterizado era o factor de crescimento dos nervos (NGF) (R. Levi-Montalcini e col., Physiol. Rev. 48:534. 1968; R. Levi-Montalcini. Ann. Rev. Neurosci., 5:341, 1982). A descoberta de que o NGF era capaz de estimular a sobrevivência apenas num limitado número de tipos de neurónios de mamíferos in vitro e in vivo levou à ideia de que o NGF é apenas um de uma família de factores neuronotróficos macromoleculares, cada um dos quais é capaz de regular a sobrevivência de tipos definidos de neurónios. Presentemente, só dois outros factores neuronotróficos macromoleculares foram purificados e caracterizados - factor neuronotrófico ciliar (CNTF) (S. Varon, Discussions in Neu-

roscience, Vol. II, Número 3, 1985; S. Varon e col., Dev. Neurosci., 6:73, 1984) e factor neuronotrófico derivado do cérebro (BDNF) (S. Varon, Discussions in Neuroscience, Vol. II, Número 3, 1985; Y. Barde e col., Embo J. 1:549, 1982). As fontes, características químicas e actividades biológica referidas nestas literaturas destes factores são esboçadas em seguida.

b. Ensaio Biológico de Factores Neuronotróficos

Os sistemas de cultura de neurónios in vitro provaram ser ferramentas fundamentais e indispensáveis para o estudo da actividade neuronotrófica em extractos de tecido e para o controlo de processos complexos apropriados para o fraccionamento e a purificação de factores neuronotróficos. Verificou-se que as culturas de neurónios dissociadas postmitóticas em monocamadas conservadas in vitro em condições de cultura adequadas "restritivas" necessitam e respondem a um suporte trófico adicionado extrinsecamente ao sistema da cultura. Portanto, a actividade neuronotrófica em preparação brutas semipurificadas ou purificadas pode ser operativamente determinada controlando a sua capacidade para promover a sobrevivência de células de neurónios in vitro.

Além disso, radioisótopos marcadores específicos dos neurónios (por exemplo, a análise do teor de neurofilamentos ou marcadores de absorção específicos) são usados para suportar ou confirmar os critérios morfológicos.

c. Características de Factores Neuronotróficos Identificados

Como se chamou a atenção anteriormente, os factores neuronotróficos macromoleculares identificados até esta data são o factor do crescimento dos nervos (NGF), o factor neuronotrófico ciliar (CNTF) e o factor neuronotrófico derivado do cérebro (BDNF). As fontes biológicas, as caracterís-

ticas químicas e a actividade biológica de cada um destes factores são esboçadas seguidamente, segundo foi indicado nas referências bibliográficas acima mencionadas.

1. Factor de Crescimento dos Nervos (NGF)

Fonte: O NGF foi originalmente descoberto em tumores de sarcomas de ratos (R. Levi-Montalcini e col., J. Exp. Zool., 116 : 321, 1951) e foi depois purificado até à homogeneidade a partir de glândulas salivares submandibulares de ratos do sexo masculino (S. Varon e col., Biochemistry 6:2202, 1967) e de veneno de cobra (R. H. Angeletti, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 65:668, 1970).

Muitas outras fontes relativamente ricas de NGF foram também referidas, incluindo a próstata da cobaia (G. P. Harper e col., Natura 279:160, 1979) e a placenta humana (L. D. Goldstein e col., Neurochem. Res., 3:175, 1979). Pequenas quantidades de NGF foram também encontradas presentes em outros tecidos, incluindo o sistema nervoso central dos mamíferos (S. Varon, Discussions in Neuroscience, Vol. II, Nº 3, 1985; F. Hefti e col., Neuroscience 14:55, 1985).

A relação fisiológica entre estas fontes potenciais de NGF e os sítios de ação aparente não é muito clara, mas supõe-se geralmente que o NGF é segregado a partir de vários tecidos periféricos que necessitam a ineração pelas células que respondem a NGF. A sequência e a clonagem de NGF obtida das glândulas submandibulares de ratos do sexo masculino foram também realizadas (J. Scott e col., Nature 302:538, 1983; A. Ulrich e col., Nature 303:821, 1983). O gene humano é de β -NGF foi também isolado e clonado com êxito (A. Ulrich e col., Nature 303:821, 1983; Patente Europeia Número 0121388).

Características Químicas:

O NGF obtido a partir de glândulas submandibulares de rato foi o tipo mais completamente caracterizado. O NGF de glândulas de rato actua como um complexo proteico 7S (peso molecular igual a cerca de 140 000 dalton) de três subunidades diferentes (α , β , γ) incluindo Zn^+ . A actividade de NGF é exclusivamente associada com a sub-unidade β (conhecida como 2,5S NGF), uma proteína dimérica básica com o peso molecular igual a cerca de 25 300 dalton (apresentando um peso molecular igual a cerca de 12 650 dalton por electroforese com gel/SDS), cujo ponto isoeléctrico é aproximadamente igual a 9,3. Foram já referidas as sequências de β -NGF proveniente de glândulas submandibulares de ratos do sexo masculino e de proveniência humana ou de outras fontes (J. Scott e col., Nature 302:538, 1983; A. Ulrich e col., Nature 303:821, 1983).

Actividade Biológica:

O NGF proveniente da glândula submandibular do rato foi usado para a maior parte dos estudos sobre a actividade de NGF in vitro e in vivo.

Determinou-se a gama de actividade biológica in vitro de NGF quer em células de neurónios primários quer em células clonais em cultura. As células de neurónios primários indicadas como respondendo a NGF in vitro incluem neurónios sensoriais de fetos (dia embriónico 8 - 12) em gânglio de raiz dorsal, neurónios nor-adrenérgicos autonómicos nos gânglios simpáticos de fetos, neurónios colinérgicos de fetos em células do septo e cromafínicas adrenais em desenvolvimento.

Enquanto os neurónios sensoriais e simpáticos dependem de NGF para a sobrevivência e desenvolvimento, os neurónios colinérgicos não parecem necessitar a

presença de NGF para a sobrevivência, mas apenas para a sua diferenciação, isto é, para a expressão de traços fenotípicos característicos ligados ao neuro-transmissor. A adição de NGF às células de cromafina adrenais (células derivadas das extremidades neurais) na fase inicial do seu desenvolvimento provoca a expressão de fenótipos neuronais. As células clonais referidas como respondendo a NGF in vitro incluem células adrenais de cromafina derivadas de tumores da extremidade neural, conhecido como células de feocromacitoma (PC12) e células de neuroblastomas humanos. Após o tratamento com NGF, estas células passam de uma forma intensamente proliferativa de comportamento para um estado neurónico postmitótico.

Os neurónios que se preferem como respondendo a NGF in vivo incluem neurónios sensoriais dos glângulos da raiz dorsal, neurónios simpáticos e neurónios colinérgicos do sistema nervoso central tanto durante o desenvolvimento como também no estado adulto a seguir a uma lesão. Neste último caso, a administração intracerebral de NGF provocou a sobrevivência de células de neurónios e a expressão de traços fenotípicos característicos. Estes efeitos estão associados com um aperfeiçoamento nas variações de comportamento provocadas por lesões,

2. Factor Neuronotrófico Ciliar (CNTF)

Fonte: O CNTF foi detectado pela primeira vez e purificado a partir do tecido embrionário (E_8) de olhos de pinto, incluindo o corpo coroide e ciliar da íris juntamente com apitélio pigmentário. Subsequentemente, identificou-se a presença de actividade de CNTF numa variedade de extractos de diferentes tecidos, incluindo o nervo ciático da ratazana adulta e o líquido de feridas do sistema nervoso central da ratazana.

Características Químicas

O CNTF proveniente de tecido intra-ocular de fetos de pintos contendo aproximadamente 2×10^{-4} em

termos de proteína, 9 % em termos de actividade trófica e purificado por electroforese com gel contendo SDS apresenta um peso molecular igual a 20 400 dalton e tem um ponto isoeléctrico igual a cerca de 5. Este peso molecular e semelhantemente a sua carga negativa líquida diferenciam claramente o CNTF da proteína β -NGF submandibular do rato. Não foi indicada a sequência do CNTF purificado proveniente dos olhos dos pintos nem a sua purificação à escala preparativa a partir de CNTF derivado de mamíferos.

Actividade Biológica :

Realizaram-se estudos biológicos usando principalmente extractos de olhos de pintos, preparações de CNTF semi-purificadas ou purificadas e apenas in vitro. Os neurónios que respondem in vitro incluem gânglios ciliares (E_8) de fetos de pintos, neurónios (E_{10}) derivados de gânglios da raiz dorsal de fetos de pintos, neurónios neonatais de gânglios da raiz dorsal de ratos e neurónios simpáticos E_{11} de gânglios de pintos de gânglios neonatais de ratazana. Verificou-se que nenhum dessas actividades é bloqueada ou inibida por anticorpos de β -NGF submandibular de rato. Não se fez qualquer menção aos efeitos in vivo do CNTF

3. Factor Neuronotrófico Derivado do Cérebro (BDNF)

Fonte: Estudou-se a actividade de BDNF quer em meios condicionados da linha de células clonais de ratazanas C6 quer em extractos de cérebro de várias espécies. O factor foi purificado a partir de cérebro de porco adulto.

Características Químicas

O BDNF purificado a partir do cérebro de porcos adultos (com um rendimento de $3,8 \times 10^{-8}$ em termos de proteína, menos do que 5% em termos de actividade trófica) é um polipeptído fortemente básico (pI 10,1) com um peso molecular igual a cerca de 12 300 dalton por electroforese

com gel contendo SDS. Na literatura, não foi indicada qualquer sequência. A molécula de BDNF e o seu processo de extracção são descritos na Patente Alemã Ocidental DE 3213963 A1.

Actividade Biológica:

Realizaram-se estudos sobre actividade biológica usando extracto bruto derivado de cérebro de porco, preparação de BDNF semipurificadas e purificadas e exclusivamente in vitro. Verificou-se que promove a sobrevivência quer de neurónios sensoriais derivados do placodo quer de neurónios sensoriais derivados da extremidade neural e que promove o desenvolvimento de neurites e a sobrevivência de células de explants de retina in vitro (J. E. Turner, Develop. Brain Res., 18:251, 1985; J. E. Turner, Develop. Brain Res., 18:265, 1985). Muito embora as suas propriedades químicas sejam muito semelhantes às de β -NGF, não se detectaram quaisquer reacções cruzadas imunológicas. Além disso, o BDNF não actua sobre os neurónios simpáticos. Não foram indicados quaisquer efeitos in vivo de BDNF.

III. NOVO FACTOR NEURONOTRÓFICO DERIVADO DE CÉREBRO DE MAMÍFEROS

A presente invención refere-se a um novo factor neuronotrófico (SDNF) com um peso molecular igual a 14 400 dalton que é activo sobre os neurónios do sistema nervoso e, em particular, do sistema nervoso central, e a um processo para a sua preparação.

a. Fonte e Procedimento de Purificação

O novo factor neuronotrófico de acordo com a presente invención pode obter-se de acordo com a seguinte maneira de proceder que é também parte do objecto da presente invención.

A maneira de proceder utilizada caracteriza-se por se homogeneizar cérebro de mamíferos, preferivelmente de animais bovinos, e, preferivelmente, de núcleos caudatos, sob condições neutras, seguida de por uma precipitação com ácido a pH 4-5 e fraccionamento cromatográfico num peneiro molecular com eluente tamponizado diluído, a uma concentração compreendida dentro do intervalo de 10 mM a 30 mM; as fracções activas são ainda melhor purificadas por cromatografia com permuta de catiões com um gradiente compreendido entre 0,1 M e 1 M de tampão de acetato de amónio, e se reunirem e liofilizarem as fracções activas.

Podem usar-se cérebros de mamíferos tanto frescos como congelados (por exemplo, a -70°C). Todas as operações de purificação acima mencionadas realizam-se preferivelmente a uma temperatura compreendida entre 0 e 6°C.

Para a preparação de cada carga, os cérebros completos ou partes de cérebros são homogeneizados em 2 ou 4 volumes de solução tamponizada diluída a um pH variável entre 6 e 7,4 e, em seguida, acidula-se, preferivelmente com CEL, a um pH compreendido entre 4 e 5, preferivelmente igual a 4,5 e agita-se durante várias horas. Separa-se o material que precipitou mediante centrifugação (por exemplo, 40 000 rotações por minuto, durante quarenta minutos), neutraliza-se o sobrenadante e dialisa-se em contra corrente com uma solução tamponizada diluída e liofiliza-se. As membranas de diálise tem um corte de peso molecular compreendida entre 5 e 10 quilodalton. O fraccionamento por meio de filtro molecular realiza-se usando uma fase estacionária com uma gama de fraccionamento compreendida entre 5 000 e 150 000 dalton. A amostra é eluída com uma solução tamponizada diluída até uma concentração que varia entre 10 mM e 30 mM e a um pH que varia entre 6 e 7,4. Reunem-se as fracções biologicamente activas, liofilizam-se, aplicam-se a uma coluna cromatográfica com permuta de catiões e elui-se com um gradiente de tampão de acetato de amónio desde 0,1 molar até 1 molar com um pH com-

— preendido entre 6 e 7. A actividade neuronotrófica é eluída e, aproximadamente, concentração 1 molar e as fracções activas são mais uma vez reunidas e liofilizadas.

A maneira de proceder acima descrita pode ser interrompida em qualquer fase de purificação se o material biologicamente activo já for suficientemente puro ou se se utilizarem outras fracções menos purificadas.

O seguinte exemplo descreve a invención, embora não limite o seu âmbito:

Exemplo

Num matadouro, obtiveram-se cérebros frescos de animais da espécie bovina e dissecaram-se os núcleos caudatos em gelo. Para a preparação de cada carga, homogeneizaram-se aproximadamente 150 gramas de tecido caudato (25 - 30 cérebros) (homogeneizador Polytron, ponto 6, 60 segundos) em três volumes de solução de cloreto de sódio tamponizada com fosfato (PBS), diluída na proporção de 1 : 10 (pH 7,4), contendo fluoreto de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) (0,3 mg/ml) e EGTA (ácido etilenoglicol-bis-β-aminoetil-éter, N,N,N',N'-tetracético) (1 mM), acidulou-se com HCl a pH 4,5- manteve-se dentro de gelo durante duas horas e, subsequentemente, centrifugou-se (40 000 rotações por minuto, durante quarenta minutos). Reuniu-se o sobrenadante, neutralizou-se (pH 7,4), dialisou-se durante a noite (corte a 8 kDa) com PBS diluído na proporção de 1 : 10 (pH 7,4), liofilizou-se e conservou-se a -20°C, subdividido em várias porções. Imediatamente antes da utilização, as partes aliquotas são novamente suspensas em 1/10 do seu volume inicial usando água destilada e avalia-se o teor de proteína de acordo com o método de G. L. Peterson (Anal. Biochem., 83:346. 1977). Diluiu-se então as amostras com meio de cultura, filtrou-se através de filtros Millex de 0,45 micron, previamente saturados com albumina de soro bovino (1 mg/ml) e adicionaram-se quantidades apropriadas da fracção sobrenadante

filtrada às culturas de células mesencefálicas isentas de soro, para ensaiar a actividade neuronotrófica.

Utilizou-se uma coluna de Sephadex G-150 (fino) (que mede 8 cm x 120 cm), para separar os componentes do sobrenadante de acordo com o seu peso molecular. Os sobrenadantes liofilizados foram ressuspensos em água destilada e aplicados à coluna (aproximadamente 750 mg de proteína em 6 ml de tampão de eluição). O tampão de eluição tinha a seguinte composição milimolar (9H 7,30) : NaCl = 13,68; KCl = 0,27; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ = 0,8; KH_2PO_4 = 1,5.

A coluna foi eluída com um caudal de 90 ml por hora, usando uma bomba peristáltica. A densidade óptica do eluído foi continuamente controlada a 280 nm com um contrelador de ultravioletas. Obtiveram-se fracções de 15 ml automaticamente e, depois de se liofilizar, ensaiaram-se relativamente à sua actividade neuronotrópica. A cromatografia por filtração através de gel e a colheita das fracções realizaram-se numa divisão arrefecida a 4°C.

Reuniram-se as fracções biologicamente activas eluídas da coluna contendo Sephadex G-150 e liofilizaram-se. Ressuspenderam-se partes aliquotas de material liofilizado em 110 μl de $\text{CH}_3\text{COO}(\text{NH})_4$ 0,1 M de pH 6,45. Determinou-se as proteínas em 10 μl . Aplicaram-se os restantes 100 μl (1,9 mg de proteína) numa coluna TSK-CM-35W (uma coluna de permuta de iões para cromatografia em fase líquida sob alta pressão). Eluiram-se as fracções com um gradiente de $(\text{NH}_4)_2\text{COOCH}_3$ (0,1 M - 1 M), pH 6,45 a um caudal de 0,5 ml por minuto. Tampão A : $(\text{NH}_4)_2\text{COOCH}_3$ 0,1 M, pH 6,45. Tampão B : $(\text{NH}_4)_2\text{COOCH}_3$ 1 M, pH 6,45. Perfil do gradiente : 0 - 20 minutos, 100% de A/0% de B (isocrático); 20 - 40 minutos, 0% de A/100% de B (linear); 40 - 70 minutos, 0% de A/100% de B (isocrático); 70 - 75 minutos, 100% de A/0% de B (linear). As fracções foram liofilizadas e ressuspensas em 0,6 ml de tampão de fosfato (10 mM, pH 5,7).

~~SECRET~~

As proteínas foram medidas em amostras de 100 µl e o material restante foi utilizado para o ensaio biológico e para a análise de SDS-PAGE.

A Tabela 1 resume as principais fases da maneira de proceder de purificação e refere-se a um exemplo do grau de purificação (em termos de proteína) e o rendimento em percentagem de actividade neuronotrófica que se pode conseguir durante a maneira de proceder de purificação. Os rendimentos em proteína e em actividade trófica distinguem esta maneira de proceder das outras maneiras de proceder usadas para a purificação de CNTF e de BDNF.

TABELA 1

SUMARIO DAS OPERAÇÕES DE PURIFICAÇÃO MAIS IMPORTANTES
DO FACTOR NEURONOTRÓFICO DE CEREBRO DE BOVINO

Material	Proteína total (mg)	Factor de purificação	Actividade espe- cífica µg/TU*	Total TU	Recuperação de TU %
Homogeneizado	11,625	1	-	-	-
Sobrenadante de- pois da precipita- ção com ácido	750	15,5	6	125 000	100%
Sephadex G-150	14,7	791	0,3	49 000	39%
CM-HPLC	0,361	32202	0,01	36 000	29%

* A unidade trófica (TU) define-se como a concentração de proteína (expressa em µg/ml) que favorece a sobrevivência de metade do número máximo de neu-
rónios que sobrevivem em resposta à concentração de saturação de material
ativo,

b. Caracterização Química

A actividade biológica da fracção sobrenadante bruta obtida a partir do homogeneizado total depois da precipitação com ácido, neutralização e diálise é sensível à tripsina, o que indica que a molécula activa é de natureza proteica ou peptídica. A molécula biologicamente activa presente no extracto sobrenadante bruto acima referido é eluída da coluna de Sephadex G-150 em fracções que correspondem a um peso molecular que varia entre 10 000 e 30 000 dalton (Figura 1).

A Figura 1 representa um perfil típico da eluição de Sephadex G-150 de sobrenadante de caudato bovino obtido depois da precipitação com ácido, neutralização e diálise do homogeneizado total conjuntamente com a identificação das fracções biologicamente activas. As condições de preparação foram descritas acima. Todas as fracções foram ensaiadas relativamente à sua actividade biológica com concentrações de proteína variáveis entre 0,01 e 10 ug/ml. Observou-se actividade nas fracções indicadas pela linha horizontal na Figura 1.

A molécula biologicamente activa presente nas fracções activas obtidas a partir da coluna de Sephadex G-150 são eluídas da coluna TSK-CM-3SW, a uma concentração de tampão de acetato de amónio igual a cerca de 1 M (Figura 2).

A Figura 2 representa uma curva típica do perfil de eluição durante a cromatografia em fase líquida sob alta pressão usando uma coluna de TSK-CM-3SW, dos eluídos activos obtidos a partir de uma coluna de Sephadex G-150. As condições de purificação são descritas. Todas as fracções foram examinadas relativamente à sua actividade biológica com concentrações de proteína que variam entre 0,001 e 0,3 ug/ml. A actividade representada pela linha horizontal foi observada

em fracções eluídas com solução de acetato de amónio cerca de 1 molar.

A última fracção de eluição no tempo é semelhante à de citocrómio C, indicando que o ponto isoeléctrico da molécula activa é semelhante ao ponto isoeléctrico da citocromia C, isto é, aproximadamente 10 - 10,5. Esta característica distingue a molécula activa da de CNFF que tem um pI igual a cerca de 5.

A electroforese realizada em SDS-PAGE de acordo com método de V. Lee e col., (Neuroscience, 6:2773, 1981), usando geles de poliacrilamida a 12,5 % em peso/volume e SDS contendo tampão descontínuo de acordo com o método de U. K. Laemmli (Nature, 227:680, 1970) do material biologicamente activo obtido nas operações importantes da maneira de proceder de purificação (extracto sobrenadante obtido a seguir à precipitação com ácido, neutralização e diálise do homogeneizado total numa coluna de Sephadex G-150 e numa coluna TSK-CM-3SW) está representada na Figura 3A.

A Figura 3A apresenta exemplos de electroforese depois do manchamento com prata com proteínas normalizadas BioRad (pistas 1 e 5) e de material activo (5 ug de proteína/pista) derivadas das fases mais importantes da maneira de proceder de purificação, isto é, extração sobrenadante obtido depois da precipitação com ácido, neutralização e liofilização do homogeneizado total (pista 2) e do eluído activo da coluna de Sephadex G-150 (pista 3) e da coluna de TSK-CM-3SW (pista 4).

Os indicadores de peso molecular padrão usados foram miosina (peso molecular 200 000), β -galactosidase (peso molecular 116 250), fosforilase b (peso molecular 92 500), albumina de soro de bovinos (peso molecular 66 200), albumina de ovo (peso molecular 45 000), carbono-anidrase (peso molecular 31 000), inibidor de tripsina de soja (peso molecular 21 500) e lisozima (peso molecular 14 400).

O tampão da amostra para a electroforese consistia em uma solução 62,5 mM de tris [tri-(hidroximetil)-aminometano] (pH 6,8), 10% em peso/volume de glicerol, 2% em peso/volume de SDS (dodecil-sulfato de sódio), 2,5 mM de EDTA, 2,5 mM de EGTA, 0,01% de azul de bromofenol e 5% de β-mercapto-etanol.

O material biologicamente activo obtido a partir da coluna de TSK-CM-3SW migra sob a forma de uma única banda com um peso molecular semelhante ao da lisozima (BioRad) utilizada como padrão e tendo um peso molecular igual a cerca de 14 400 dalton. Este peso molecular distingue a respectiva molécula activa dos outros factores neuronotróficos identificados (NGF, CNTF, BDNF). Na realidade, o material activo eluído da coluna de TSK-CM-3SW não migra depois da electroforese em gel de SDS-PAGE numa posição semelhante ao de β-NGF de glândulas salivares de rato (Figura 3B).

A Figura 3B ilustra um exemplo do resultado da electroforese em gel de SDS-PAGE depois do manchamento com prata com indicadores BioRad padrão (pistas 1 e 4), com 2,5 ug de β-NGF de glândula submandibular de rato (pista 2) e com 2,5 ug de material activo da coluna de TSK-CM-3SW (pista 3). Usou-se a mesma proteína padrão que se indica na Figura 3A.

O NGF migra para uma posição abaixo da posição de migração da molécula activa eluída a partir da coluna de TSK-CM-3SW. Indicou-se que o BDNF migra no movimento electroforético em SDS para uma posição semelhante à do NGF.

Isto constitui uma outra indicação de que a molécula activa eluída da coluna de TSK-CM-3SW pode ser distinta do BDNF.

c. Actividade Biológica

A actividade biológica do material derivado das operações mais importantes da maneira de proceder de

purificação (o extracto sobrenadante bruto obtido depois da precipitação com ácido, neutralização e diálise do homogeneizado total, os eluídos obtidos da coluna G-150 e os eluídos obtidos da coluna de TSK-CM-3SW) é usualmente estabelecida controlando os seus efeitos sobre a sobrevivência de células mesencefálicas primárias dissociadas de feto de rato, conservadas em cultura isenta de soro. Além disso, fizeram-se determinações da absorção específica de ^3H -dopamina em neurônios GABAérgicos presentes no sistema de cultura, de modo a corroborar ou confirmar os critérios morfológicos.

Em seguida, esboçaram-se os métodos de preparação de cultura de células, de avaliação da sobrevivência de células e dos parâmetros de absorção específicos juntamente com as características da preparação da cultura de células e os efeitos do material obtido nas fases mais importantes da maneira de proceder de purificação.

1. Método de Preparação da Cultura de Células e Critérios Imunoquímicos Utilizados para a Avaliação dos Tipos de Células "In Vitro"

Dissociou-se tegumento mesencefálico rostral de cérebros de embriões de ratos de treze dias sob condições esterilizadas. As áreas de cérebro reunidas foram mecanicamente dissociadas em PBS com a seguinte composição milimolar : NaCl = 136,8; KCl = 2,7; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ = 8; KH_2PO_4 = 1,5 e contendo glucose (6 mg/ml) e albumina de soro bovino (0,1 mg/ml) (pH 7,4). As células foram seguidamente centrifugadas (45 rotações por minuto, durante quatro minutos), ressuspensas no meio de cultura, passadas através de um filtro de 20 μm Nytex, contadas com um contador de células de Culter e placadas em placas de plástico de cultura de tecidos Falcon de 35 mm.

Cada placa foi revestida com colagénio de pele de bovino (Vitrogen, 100 μg de proteína), usando meio basal de Eagle (BME), NaHCO_3 e NaOH , de modo a fazer subir a

força iônica e o pH (T. Elsdale e col., J. Cell Biol., 54:626, 1972).

O meio de cultura consistia numa mistura de BME e de F12 de Ham (1 : 1), suplementada com glucose (33 mM), glutamina (2 mM, NaHCO₃ (15 mM), HEPES (ácido N-2-hidroxietil-piperazino-N'-2-etano-sulfónico) (10 mM), suplementado como é referido por U. Di Porzio e col., (Nature 288:370, 1980), com insulina (25 µg/ml), transferrina (100 µg/ml), putrescina (60 µM), progesterona (20 nM), selenito de sódio (30 nM), penicilina G (0,5 U/ml) e estreptomicina (0,5 µg/ml); e contendo T₃ (3,3',5'-tri-iodo-DL-tironina) (30 nM) (J. Puymirat e col., Neuroscience 10:801, 1983). Tipicamente, adicionaram-se a cada placa 2 ml de meio de cultura contendo o número pretendido de células dissociadas.

A identificação dos tipos de células in vitro realizou-se por imunofluorescência indirecta, utilizando anticorpo monoclonal RT97 contra proteínas de neurofilamentos (B. H. Anderton e col., Nature 298:84, 1982), um indicador específico de células de neurónios in vitro, como é referido por P. Doherty e col. (J. Neurochem., 42:1116, 1984). Resumidamente, as culturas foram fixadas durante sete minutos com metanol a -20°C. As culturas fixadas foram permeabilizadas por tratamento durante trinta minutos com 0,1% (em volume/volume) de Triton x-100 (um éter de polioxietileno) em PBS e, em seguida, incubou-se durante sessenta minutos com 10% de soro de feto de vitela (FCS), contendo PBS para bloquear os sítios de ligação da proteína não específicos. A incubação com anticorpo anti-neurofilamentos (diluição 1 : 500 em PBS realizou-se durante sessenta minutos à temperatura ambiente e foi seguida por três lavagens com PBS contendo 10% de FCS.

Adicionou-se em seguida IgG purificada de elevado afinidade de anti-rato de cabra conjugada com rodamina (diluição 1 : 100) à cultura durante sessenta minutos à temperatura ambiente e, depois de três lavagens em PBS com

10% de FCS, recobriu-se com glicerol/PBS (1 : 1) e examinou-se no fotomicroscópio Zeiss III equipado com epifluorescencia de rodamina e um conjunto óptico de contraste de fase.

Realizou-se o ensino de imunofluorescência indireta usando GFAP (proteína acidica fibrilar gli-al) de anti-soro de rato (para marcar especificamente as células astrocíticas in vitro) e IgG conjugada de rodamina purificada por alta afinidade de anti-rato de cabra, de acordo com a maneira de proceder de M. C. Raff e col. (Brain Res., 174:283, 1979).

2. Método de Determinação da Sobrevida de Células na Cultura em Função do Tempo

Verificou-se a sobrevida de células por critério morfológicos (isto é, observação com microscópio de contraste de fase do número de células sobreviventes de acordo com o tempo in vitro) juntamente com a avaliação bioquímica do teor de DNA e do número de células dopaminérgicas sobreviventes por placa de acordo com o tempo in vitro. O teor de DNA estabelecido de acordo com o método indicado por B. G. Erwin e col., (Anal. Biochem., 110:291, 1981), enquanto o número de células dopaminérgicas por placa, foi determinado depois da absorção específica de dopamina e por visualização dos neurônios fluorescentes de acordo com o método de fluorescência provocada por ácido glicoxílico (GIF), descrito por G. Bolstad e col. (Comp. Biochem. Physiol., 62:61, 1979). Para esta última finalidade as células foram observadas com um fotomicroscópico Zeiss III equipado com óptica de epifluorescência de catecolamina e de contraste de fase. Utilizando coordenadas pré-fixadas, contou-se o número de neurônios positivos a GIF que correspondem a, pelo menos, 3% da área superficial total.

3. Método de Determinação da Absorção Específica de Dopamina e de GABA

A determinação da absorção específica de ^3H -dopamina realizou-se como descrito por B. Berger e col. (Neuroscience, 7:193, 1982). As células foram lavadas uma vez com PBS pré-aquecido suplementado com glucose (5 mM), CaCl_2 (1 mM), MgSO_4 (1 mM), ácido ascórbico (0,1 mM), pargilina (0,1 mM) e pré-incubaram-se durante cinco minutos com 0,8 ml de solução acima mencionada. Quando necessário, adicionaram-se ao meio de incubação benzotropina (5 uM), desmetil-imipramina (5 uM) ou fluoxetina (1 uM). Como rotina, adicionou-se então 0,2 ml de ^3H -dopamina (concentração final 50 nM, S.A. (actividade específica) 22 - 33 Ci/nM) e continuou-se a incubação durante quinze minutos, a 37°C. Interrompeu-se a absorção removendo a mistura de incubação seguida por quatro lavagens rápidas com PBS arrefecida com gelo. Extraiu-se então a ^3H -dopamina de cada cápsula por duas vezes (quinze minutos cada) com 0,5 ml de HClO_4 0,4 M mais etanol absoluto (3 : 1 em volume/volume). A recuperação foi superior a 95%. Determinou-se a radioactividade depois da adição de 10 ml de Instagel II (um fluido de contagem de cintilação líquido) usando um contador de cintilação Packard IriC₃rb (modelo 460 C). Em amostras separadas, obtidas no fim da incubação e depois das lavagens, extraiu-se a radioactividade intracelular com 0,5 ml de ácido perclórico (0,4 N) e analisou-se por cromatografia em base líquida sob alta pressão (HPLC) (C. Kotake e col., J. Neurosci., 2:1307, 1982; A. Shum e col., J. Chromatog., 228:123, 1982).

Mais do que 95% da radioactividade injetada estava associada com a fração reunida no momento da retenção da dopamina.

Ensaiou-se a absorção específica de ^{14}C -GABA como foi descrito por A. Prochiantz e col. (Nature 293:570, 1981), com adição de 0,1 uM de ^{14}C -GABA (225 mCi.nmol) durante quinze minutos a 37°C. Utilizou-se ácido aminóxi-acético (10 uM) para evitar o catabolismo de GABA. Quando necessário, adicionou-se ácido diaminobutírico (10^{-3} M), que é um inibidor

a absorção de GABA. As maneiras de proceder de lavagem e de extração são as que se descreveram para os estudos da absorção da ³H-dopamina. A identificação de GABA realizou-se por cromatografia em camada fina (R. S. Lasher, Brain Res., 69:235, 1974). Mais de 90% da radioactividade estava associada com uma mancha que migra simultaneamente com GABA autêntica.

4. Determinação morfológica, Vitalidade e Características Bioquímicas do Sistema de Cultura de Células

Ao fim de quatro e de oito dias in vitro, mais de 98% das células viáveis aderentes presentes na cápsula eram positivamente imuno-reactivas e imuno-citoquímicas de acordo com o manchamento com anticorpo monoclonal RT97. Também, menos de 1% das células de cultura eram, ao fim dos tempos considerados, imuno-reactivos ao manchamento com anti-soro GFAP. Isto indica que mais de 98% das células de cultura podem ser classificadas como elementos de neurónios. A visualização do número de neurónios dopaminoérgicos no sistema de cultura indicou que estas células eram aproximadamente de 0,1 - 0,2 % da população total de células presentes in vitro.

A viabilidade das células no sistema de cultura utilizado não sofreu modificações até quatro dias in vitro. No entanto, entre quatro e oito dias in vitro, a viabilidade diminuiu em cerca de 60 - 80%. Isto era evidente não só depois da avaliação morfológica como também a seguir à determinação do teor de DNA e do número de células dopaminérgicas por cápsula. Isso significa que a viabilidade das células de neurónios mesencefálicos nas condições de cultura era limitada e que não ocorrem variações notáveis na viabilidade dos diferentes tipos de células presentes no sistema de cultura (veja-se Figura 4).

A Figura 4 é um gráfico que representa as variações em função do tempo dos neurónios totais, dos neurónios d. GIF positivos e da absorção de dopamina sensível a BZT. As células mesencefálicas foram semeadas a uma densidade de 1 x

10^6 células/cápsula de 35 mm/2 ml de meio de cultura.

As indicações da Figura 4 são as seguintes:

DNA/cápsula (○ — ○); absorção de dopamina sensíveu a BZT (○ — ○); número de células GIF⁺/cápsulas (histogramas de bloco); absorção de dopamina sensíveis a BZT/ 10^3 células GIF⁺ (histograma a linha tracejada).

Semelhantemente à determinação da viabilidade de células na cultura, a absorção específica de ^3H -dopamina e de ^{14}C -GABA diminuiu em cerca de 60 - 80% entre o quarto e o oitavo dia *in vitro*. Este facto sugere igualmente que não há uma diferença aparente de comportamento entre os vários tipos de células presentes *in vitro* e permite concluir que aqueles parâmetros de absorção são indicadores apropriados da viabilidade das células *in vitro*.

5. Actividade Biológica do Material Derivado das Fases mais Importantes do Processo de Purificação

Para esta finalidade, imediatamente antes da utilização, ressuspenderam-se partes aliquotas do material liofilizado derivado das fases mais importantes de purificação em 1/10 do volume inicial usando água destilada. Avaliou-se o teor de proteína de acordo com G. L. Peterson (Anal. Biochem., 83:346, 1977). As amostras foram então diluídas com meio de cultura, filtradas através de filtros Millex de 0,45 micron e pré-saturadas com albumina de soro bovino (1 mg/ml). Adicionaram-se então quantidades apropriadas de material filtrado à cultura de células mesencefálicas no dia da plasmagem. Adicionaram-se também quantidades equivalentes de albumina de bovino às culturas de células de controlo.

Em todas estas culturas, o meio foi substituído cada dois dias ou, como alternativa, ressuplementado com material derivado das operações de purificação ou com

albumina, no caso das culturas de controlo. O material derivado de todas as mais importantes fases de purificação - o extracto sobrenadante bruto obtido depois da precipitação com ácido do homogeneizado total, as fracções obtidas a partir da coluna contendo Sephadex G-150 e eluídas dentro da gama de peso molecular de 10 até 30 quilodalton e as fracções obtidas da coluna de TSK-CM-3SW aluída com acetato de amónio a cerca de 1 M - são todas capazes de aumentar a viabilidade, isto é, a sobrevivência e o desenvolvimento de células de neurónios mesencefálicos de feto dissociadas na cultura.

A aparência morfológica no oitavo dia da cultura das células in vitro depois da adição do meio de cultura no dia da placagem, (dia 0), ou de a fracção sobrenadante bruta ou de albumina (cultura de controlo) está representada na Figura 5A e 5B.

Estas Figuras representam a aderência típica de células mesencefálicas de feto de rato no oitavo dia in vitro, depois da adição de 10 µg/ml de albumina na cultura de controlo (Figura 5A) e de 10 µg/ml de extracto de sobrenadante obtido a seguir à precipitação com ácido e à diálise do homogeneizado total (Figura 5B).

Este efeito foi também evidente a partir da determinação do teor de DNA total e do número de células dopaminérgicas por cápsula (Figura 6) e também da absorção específica ^3H -dopamina e de ^{14}C GABA em função do tempo in vitro.

A Figura 6 representa uma avaliação do número de células de CIF⁺ (isto é, DA dopaminérgicas) e do teor de DNA por cápsula no oitavo dia in vitro, depois da adição de 10 µg/ml de albumina à cultura de controlo (histogramas em bloco) e de 10 µg/ml do líquido sobrenadante obtido a seguir à precipitação com ácido e à diálise do homogeneizado total (histogramas de linhas tracejadas). Os valores indicados são valores médios \pm erro quadrático médio da média de análises em

triplicado.

A Figura 7 mostra que o efeito do líquido sobrenadante acima referido sobre a absorção da dopamina depende da concentração. Este facto foi observado a partir das determinações da absorção de GABA e de DNA por cápsula.

Especificamente, a Figura 7 mostra o efeito de adição de várias concentrações de extracto bovino (obtido a seguir à precipitação com ácido e à diálise do homogeneizado total) por absorção de dopamina sensível a BZT. As células mesencefálicas foram semeadas com uma densidade de $0,5 \times 10^6$ células/1 ml de meio de cultura conjunto (24 mm). As quantidades indicadas de extractos bovinos foram adicionadas no momento da placagem no volume de 50 μ l. Quando isso for necessário, as amostras foram suplementadas com albumina de soro bovino, de modo a atingir-se concentrações finais de 40 μ g/ml de proteína. Os parâmetros de absorção foram calculados no quarto dia in vitro. Os valores são indicados com a média \pm desvio padrão de amostras em triplicado.

Em conjunto, estes resultados indicam que o material activo é capaz de aumentar a sobrevivência e o desenvolvimento in vitro de vários tipos de neurónios, em particular, os presentes nas culturas utilizadas. Embora se tivessem detectado efeitos semelhantes quando se ensaiava a actividade trófica do extracto sobrenadante, na reunião das fracções de Sephadex G-150 eluídas entre 10 e 30 quilodalton e no grupo de fracções da coluna de TSK-CM-3SW eluídas usando acetato de amónio aproximadamente 1 M, a quantidade de material necessário para se obter esses efeitos diferia. Em particular, enquanto o extracto sobrenadante bruto apresentava uma actividade biológica semi-máxima quando adicionado in vitro a concentrações de cerca de 6 μ g/ml, a actividade semi-máxima das fracções obtidas a partir de Sephadex G-150 e de TSK-CM-3SW era detectável a cerca de 0,3 μ g/ml e 10 ng/ml, respectivamente (ver Tabela 1).

O ensaio da actividade biológica noutras tipos de culturas de células de neurónios in vitro, em particular, de células de neurónios dissociados provenientes do estirato de feto de rato, indicou que a molécula activa era efectiva em melhorar a sobrevivência e provocar o desenvolvimento de vários tipos de neurónios presentes em diferentes áreas do sistema nervoso, em particular, do sistema nervoso central (CNS). Além disso, o material activo era efectivo em aumentar o desenvolvimento neurítico in vitro de neurónios de gânglios da raiz dorsal de embriões de pintos com doze dias mas não em embriões de oito dias. Este efeito indica também que o factor neuronotrófico pode ser distinguido do β -NGF derivado das glândulas salivares de rato. Na realidade, a adição de várias concentrações (desde 1 ng até 300 ng/ml) de β -NGF das glândulas salivares de rato não tem qualquer efeito sobre a sobrevivência de células mesencefálicas dissociadas de ratos usadas rotineiramente na cultura.

IV. APLICAÇÃO IN VIVO DO FACTOR NEURONOTRÓFICO DERIVADO DE CÉREBRO DE MAMÍFEROS

Um outro objecto da presente invención refere-se à aplicação in vivo do factor neuronotrófico (SDNF) derivado do cérebro de mamíferos. Como se referiu acima, sabe-se hoje que os factores neuronotróficos regulam a sobrevivência de células de neurónios e a plasticidade de neurónios (definida como a capacidade de uma célula nervosa sofrer modificações morfofuncionais em resposta a alterações do seu micro-ambiente) não só durante o desenvolvimento do sistema nervoso mas também, presumivelmente, no estado adulto. Na realidade, acumularam-se já factos que sugerem que os factores neuronotróficos controlam provavelmente os neurónios dos adultos relativamente a:

- I. Manutenção, comportamento funcional e envelhecimento de células normais (S. Varon, Discussions in Neuroscience, Vol. II, Número 3, 1985) - isto é, deve haver um abastecimento suficiente e uma utilização suficiente de facto-

~~_____~~

nes neuronotróficos para contrabalançar as variações normais de neurónios adultos in vivo pode reflectir um inadequado suporte por agentes tróficos.

II. Processos de reparação e regeneração em células lesionadas química ou mecanicamente (S. Varon, *ibid*), em particular, a lesão axonal origina um deficiente abastecimento de factores neuronotróficos às células dos neurónios e sabe-se que a morte de células de neurónios se segue a lesões traumáticas ou patologélicas e pode ser envolvida no processo de envelhecimento.

III. Degenerescência e morte em algumas condições patológicas (S. Varon, *ibid*), isto é, podem associar-se diferentes condições patológicas com situações de deficiência e podem obter-se como resultado ou ser devidas a deficientes tróficos derivados ou de um declínio no suporte trófico efectivo ou de um aumento das necessidades tróficas ou de ambos estes factos.

Tendo em vista o que acima se refere, a presente invenção também se refere às seguintes aplicações do factor neuronotrófico conhecida como SDNF, em particular, administração por via parentérica (incluindo, embora não de maneira exclusiva, administração peridural, intracisternal, intraventricular, intratecal, intravenosa, intramuscular, subcutânea, gengival, sublingual, rectal e nasal) das moléculas de SDNF ou sozinhas ou em associação com gangliósidos (em particular, misturas de gangliósidos de cérebro bovino, espécies de gangliósidos individuais de cérebro bovino, preferivelmente GM₁ e derivados de gangliósidos semi-sintéticos, preferivelmente derivados de ésteres internos de gangliósidos) ou fosfolípidos (em particular, misturas de fosfolípidos de cérebro bovino, espécies de fosfolípidos de cérebro de bovinos novinho, preferivelmente, fosfatidil-serina e derivados semi-sintéticos de fosfolípidos), em condições neuropatológicas que derivam de:

- I. danificação aguda, subaguda ou crónica do sistema nervoso, incluindo a danificação traumática, a danificação química, a danificação dos vasos e deficientes [tais como ataques conjuntamente com danificações infecciosas/inflamatórias e provocadas por tumores;
- II. envelhecimento do sistema nervoso, incluindo a doença de Alzheimer;
- III. doenças neurodegenerativas crónicas do sistema nervoso;
- IV. doenças imunológicas crónicas do sistema nervoso ou que afectam o sistema nervoso.

A associação da utilização das moléculas de SDNF com gangliósidos e fosfolípidos é substanciada pela evidencia que indica que os gangliósidos do cérebro de bovinos e os fosfolípidos do cérebro de bovinos potenciam as respostas celulares a factores neuronofrómicos in vitro e muito provavelmente in vivo.

A Tabela seguinte resume o efeito de GM₁ e de extracto de estrias de bovino sobre as culturas de células mesencefálicas:

TABELA A2

Substância	Sensível a BZT absorção de ^3H - -DA fmol placa 15 mins	Sensível a DABA absorção de ^{14}C -GABA pmol/placa 15 mins
Albumina	29,51 \pm 5,78	0,56 \pm 0,14
Albumina + GM ₁	69,14 \pm 3,38	1,04 \pm 0,05
Extracto de estrias	104,68 \pm 7,60	2,41 \pm 0,27
Extracto de estrias +	140,58 \pm 17,82	4,56 \pm 0,10
+ GM ₁		

Cultivaram-se células mesencefálicas (1×10^6 /placa) num meio isento de soro que continha albumina (15 ug/ml) ou extracto estriatal (15 ug/ml), sozinho ou em presença de 10^{-7} M de GM₁. Realizaram-se estudos de absorção ao quarto dia de acordo com os métodos referidos na secção IIIa. Os valores médios são os valores da média \pm desvio padrão de análises em triplicado.

O extracto de estrias de bovino foi preparado como se referiu anteriormente (ver secção IIIa).

a. Composições Farmacêuticas

A formulação de composições farmacêuticas contendo a molécula de SDNF derivada de cérebro de mamífero, descrita a este respeito sem e possivelmente também com gângliosídos e fosfolípidos, incluiu os métodos conhecidos para a preparação de composições farmaceuticamente aceitáveis apropriadas para a administração efectiva ao paciente, por meio da qual se combina uma quantidade efectiva da molécula de

~~SDNF em misturas com um veículo farmaceuticamente aceitável.~~

Os veículos aceitáveis e a sua formulação incluindo outras proteínas são descritos, por exemplo, no livro "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., Estados Unidos da América, 1985). Estes veículos incluem "formulações de depósito" injectáveis.

Com base no que se refere acima, a formulação farmacéutica inclui, embora não exclusivamente, soluções de SDNF ou um pó liofilizado de EDNF em associação com um ou mais veículos ou diluentes farmaceuticamente aceitáveis e estava contida em meios tamponizados com um valor apropriado de pH e iso-ósmotico com os fluidos fisiológicos.

A Tabela 3, mais adiante, mostra, com fins apenas ilustrativos e sem quaisquer efeitos limitativos, as composições possíveis de formulações que podem ser preparadas sob a forma de soluções para o tratamento de perturbações do sistema nervoso. No caso das preparações liofilizadas, podem usar-se excipientes de suporte, tais como, mas não exclusivamente, manitol ou glicina e as soluções tamponizadas apropriadas com o volume pretendido serão proporcionadas de modo a obterem-se soluções tamponizadas isotónicas adequadas ao pH pretendido. Também se podem usar soluções semelhantes para as composições farmacéuticas da molécula de SDNF em soluções isotónicas com o volume pretendido e incluem, mas não exclusivamente, o uso de soluções salinas tamponizadas com fosfato ou citrato, a concentrações apropriadas, de modo a obter-se em todos os casos preparações farmacéuticas isotónicas com o pH pretendido, por exemplo, o pH neutro.

Igualmente com finalidades ilustrativas, as Tabelas 4A e 4B referem algumas composições farmacéuticas possíveis para o tratamento de perturbações do sistema nervoso. As composições farmacéuticas indicadas nas Tabelas 4A e 4B são preparações com dois frascos por dose individual,

O primeiro frasco contém a substância activa com uma composição contendo em peso cerca de 0,01% até 50% de substância activa, conjuntamente com um excipiente farmacologicamente aceitável, tal como glicina ou manitol. O segundo frasco contém um dissolvente preparado com o volume pretendido de solução salina tamponizada com fosfato ou citrato. Os conteúdos dos dois frascos são misturados imediatamente antes da administração e a substância activa liofilizada dissolve-se rapidamente para se obter a solução injectável. A Tabela 4B também apresenta um exemplo possível de uma composição farmacéutica para injeções subcutâneas (Sistema Número 5).

As formulações farmacêuticas também incluem, mas sem serem limitadas pelos mesmos, supositórios para administração por via rectal, com um excipiente lipofílico, isto é, solúvel em água, auto-emulsionável de glico-gelatinas ou de outros tipos. Nestas preparações, o SDNF pode encontrar-se presente em quantidades que variam entre 0,001% e 1% em peso do excipiente total. As formas de composições para supositórios podem conter, sem se limitarem aos mesmos, quantidades apropriadas de acetil-salicilato.

A Tabela 5 apresenta uma lista, apenas para finalidades ilustrativas, de preparações para supositórios possíveis para o tratamento de perturbações do sistema nervoso.

Além disso, as formulações farmacêuticas de SDNF quer sob a forma liofilizada quer sob a forma de solução podem incluir fosfolípidos ou gangliósidos como se descreveu acima em doses efectivas. Por exemplo, as doses podem ser (se bem que não exclusivamente) semelhantes às geralmente usadas no homem para o tratamento de reparações nervosas ou perturbações devidas ao envelhecimento, respectivamente, e podem depender da via de administração.

A dosagem das preparações farmacêuticas de SDNT e os tempos de administração dependem do efeito pretendido (determinado por ensaios clínicos) e a via de administração, por exemplo, a dosagem e o número de administração por dia podem ser semelhantes (muito embora não exclusivamente) às vulgarmente utilizadas em estudos com outros agentes neurotróficos, tais como NGF.

TABELA 3

Exemplos de Composições Farmacêuticas para Soluções Injetáveis

Preparação N° 1

Uma ampola de 2 mililitros contém:

Substância activa	µg	5	(500 TU)
Cloreto de sódio	mg	16	
Tampão de citrato de pH = 7 com água destilada apirogénica q.b.	ml	2	

Preparação N° 2

Uma ampola de 2 mililitros contém:

Substância activa	µg	100	(10 000 TU)
Cloreto de sódio	mg	16	
Tampão de cloridrato de pH = 7 com água destilada apirogénica q.b.	ml	2	

A unidade trófica (TU) é definida como na Tabela 1.

TABELA 4A

Exemplos de Sistemas de Composições Farmacéuticas

SISTEMA Nº 1

a) Um frasco de 2 ml contém:

Substância activa liofilizada	µg	5 (500 TU)
Glicina	mg	30

b) Um frasco de 2 ml de dissolvente contém:

Cloreto de sódio	mg	16
Tampão de citrato em água	ml	2
Água destilada ariogénica q.b.		

SISTEMA Nº 2

a) Um frasco de 2 ml contém:

Substância activa liofilizada	µg	5 (500 TU)
Manitol	mg	40

b) Um frasco de 2 ml de dissolvente contém:

Cloreto de sódio	mg	16
Tampão de citrato em água	ml	2
água destilada ariogénica q.b.		

SISTEMA Nº 3

a) Um frasco de 3 ml contém:

Substância activa liofilizada:	µg	100 (10 000 TU)
Glicina	mg	45

- b) Um frasco de 3 ml de dissolvente contém:

Cloreto de sódio mg 24

Tampão de citrato em água ml 3

Água destilada apirogénica q.b.

A unidade trófica (TU) é definida como na Tabela 1.

TABELA 4B

Exemplos de Sistemas de Composições Farmacêuticas

SISTEMA Nº 4

- a) Um frasco de 3 ml contém

Substância activada liofilizada µg 100 (10 000 TU)

Manitol mg 60

- b) Um frasco de 3 ml de dissolvente contém:

Cloreto de sódio mg 24

Tampão de citrato em água ml 3

Água destilada apirogénica q.b.

SISTEMA Nº 5 (Exemplo de composição para injeção subcutânea)

- a) Um frasco de 2 ml contém:

Substância activa liofilizada µg 10 (1 000 TU)

Glicina mg 30

- b) Um frasco de 2 ml de dissolvente contém:

Cloreto de sódio mg 16

Tampão de citrato em água ml 2

Água destilada apirogénica q.b.

A unidade trófica (TU) é definida como na Tabela 1.

TABELA 5

Exemplos de Composições Farmacêuticas com a
Forma de Supositórios para Administração por
Via Rectal

PREPARAÇÃO Nº 1

Substância activa	µg	100 (10000 TU)
Manteiga de cacau	g	2,5

PREPARAÇÃO Nº 2

Substância activa	µg	100 (10 000 TU)
Carbowax 1540	g	1,75
C ₂ rbowax 6000	g	0,75

PREPARAÇÃO Nº 3

Substância activa	µg	100 (10 000 TU)
Tween 61	g	2,125
Lanolina	g	0,25

PREPARAÇÃO Nº 4

Substância activa	µg	100 (10 000 TU)
Glicerina	g	1,5
Água	g	0,75
Gelatina	g	0,25

A unidade trófica (TU) é definida como na Tabela 1.

REIVINDICAÇÕES

- 1^a -

Processo para a preparação dum novo factor neuronotrófico que é uma proteína básica tendo um peso molecular igual a cerca de 14 400 dalton, caracterizado por compreender as fases que consistem em

- a) se homogeneizar tecido de cérebro de um mamífero,
- b) se precipitar com ácido o homogeneizado assim produzido,
- c) se submeter a diálise o sobrenadante resultante com uma membrana de diálise que tem uma restrição de peso molecular entre 5 e 10 quilodalton e
- d) se fraccional por cromatografia o sobrenadante dialisado de maneira a separar os componentes do sobrenadante de acordo com o peso molecular.

- 2^a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de compreender ainda operação que consiste em e) se purificar as fracções neuronotróficamente activas assim obtidas por cromatografia de permuta de catiões com um gradiente de tampão de acetato de amónio.

- 3^a -

Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo facto de o tecido de cérebro de mamífero ser tecido de cérebro bovino.

- 4a -

Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo facto de se submeter às referidas fases do processo núcleos caudatos de cérebros bovinos.

- 5a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a fase b) se realizar a um pH compreendido entre 4 e 5.

- 6a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a operação de fraccionamento cromatográfico d) se realizar com um peneiro molecular com um agente eluente tamponizado diluído com uma concentração de 10 mM a 30 mM.

- 7a -

Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de o fraccionamento se realizar usando uma fase estacionária com uma gama de fraccionamento de entre 5 000 e 150 000 dalton.

- 8a -

Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de as fracções neuronotroficamente activas serem eluídas da coluna de cromatografia de permuta de catiões com um gradiente de tampão de acetato de amónio tendo uma concentração desde 0,1 M até 1 M e um valor de pH desde


6 até 7.

- 9^a -

Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo facto de se efectuar as operações do processo a uma temperatura desde 0° até 6°C.

- 10^a -

Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo facto de se reunir as fracções neuronotroficamente activas e se liofilizar a mistura.

- 11^a -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo facto de o factor neuronotrofico obtido ser uma proteína básica tendo um peso molecular de cerca de 14 000 dalton.

- 12^a -

Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo facto de a referida proteína ter um ponto de isoeléctrico de cerca de 10.

- 13^a -

Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo facto de o factor neuronotrófico obtido ter uma actividade específica de, pelo menos, cerca de 0,01 ug/unidade trófica, em que a mencionada unidade trófica é a

concentração de proteína (ug/ml) que favorece a sobrevida de metade do número máximo de neurões sobreviventes em resposta à concentração saturante do material activo.

- 14^a -

Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo facto de o factor neuronotrófico obtido ser uma proteína básica derivada do núcleo caudato do cérebro de mamíferos tendo actividade neuronotrófica e um peso molecular de cerca 14 400 dalton.

- 15^a -

Processo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo facto de o factor neuronotrófico obtido ter um ponto isoelectrónico igual a cerca de 10.

- 16^a -

Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo facto de o factor neuronotrófico obtido ser capaz de aumentar a sobrevida e diferenciação de células de neurónios.

- 17^a -

Processo para a preparação de composições farmacêuticas, caracterizado pelo facto de se incorporar uma quantidade neurotrophicamente activa de um facto neuronotrófico, quando preparado de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 16, num excipiente ou numa mistura veicular diluente farmacêuticamente aceitáveis.

- 39 -

- 18^a -

Processo de acordo com a reivindicação
17, caracterizado pelo facto de se adicionar pelo menos um
gangliosido ou pelo menos um fosfolípido.

A requerente declara que os primeiros
pedidos desta patente foram apresentados na Itália em 7 de
Agosto de 1986 e em 23 de Dezembro de 1986, sob os n.os
48370-A/86 e 48782-A/86, respectivamente.

Lisboa, 6 de Agosto de 1987

A handwritten signature, appearing to be in cursive script, is written over a horizontal line. The signature is somewhat stylized and includes a large, rounded flourish on the right side.

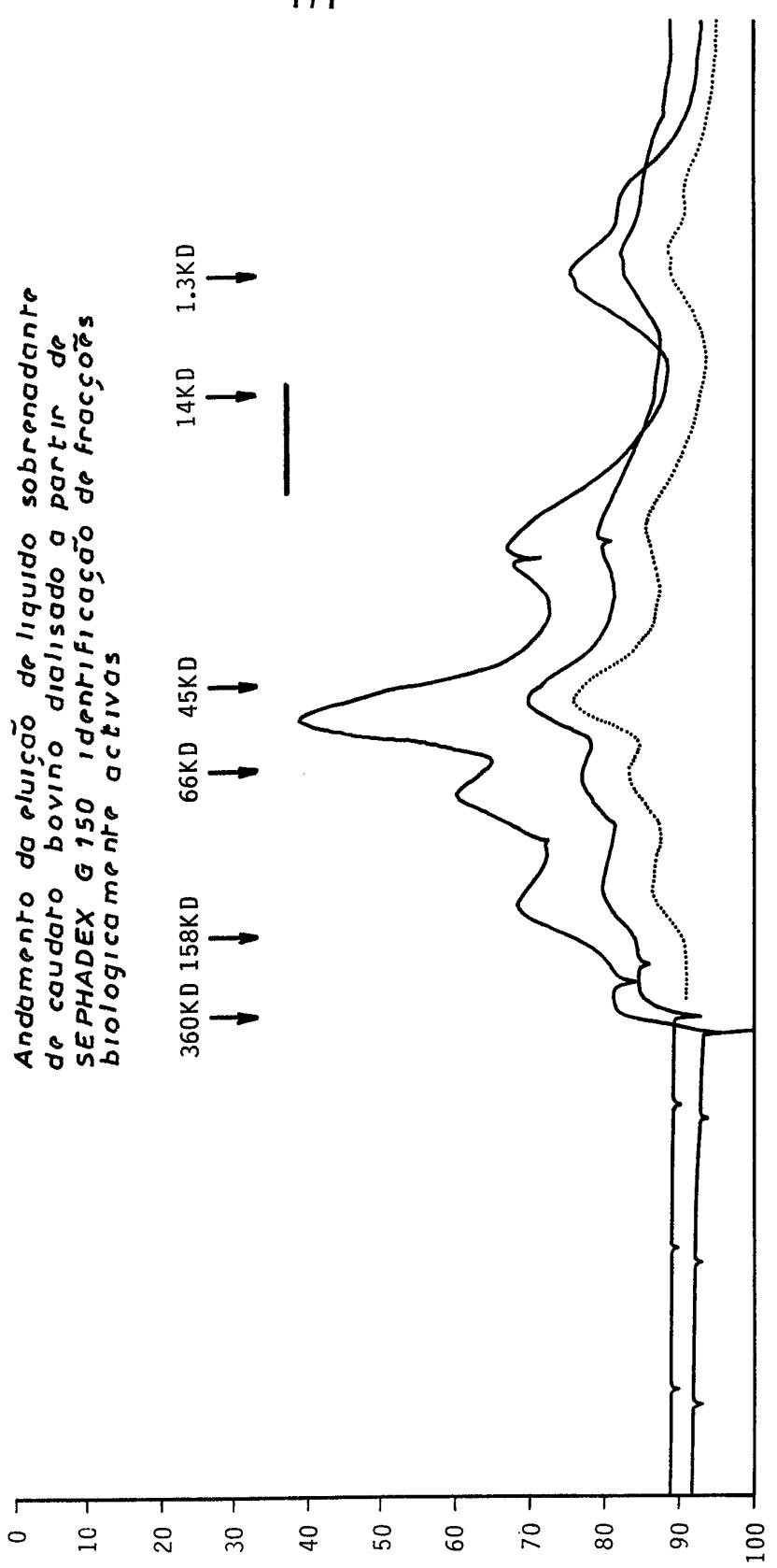
RESUMO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM NOVO FACTOR NEURONOTRÓFICO E DE COMPOSIÇÕES FARMACEUTICAS QUE O CONTEM"

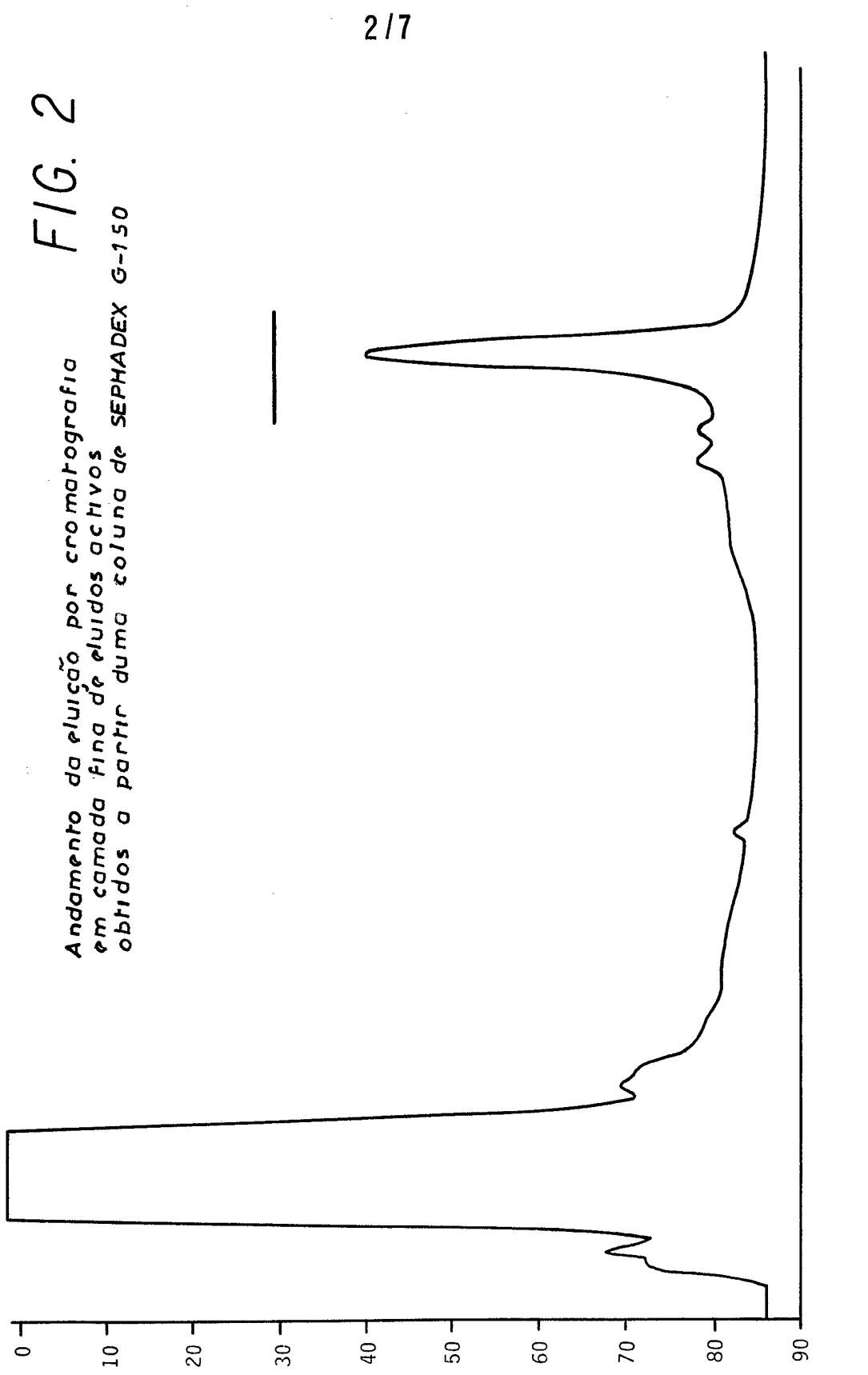
A invenção refere-se ao processo para a preparação de um novo factor neuronotrófico tendo um peso molecular de cerca de 14 400 dalton e um ponto isoeléctrico de cerca de 10 compreendendo homogeneizar-se tecido de cérebro dum mamífero, particularmente tecido de cérebro bovino, precipitar-se com ácido o homogeneizado assim produzido, dialisar-se o sobrenadante resultante com membranas de diálise que tem características de corte de peso molecular entre 5 e 10 quidodalton e fraccionar-se cromatograficamente por permeametria de peso molecular o sobrenadante dialisado assim obtido. As fracções neuronotroficamente activas podem ainda ser purificadas por cromatografia com permuta da catiões com um gradiente de tampão de acetato de amónio. O factor neuronotrófico de acordo com a presente invenção é útil no tratamento de vários estados neuropatológicos.

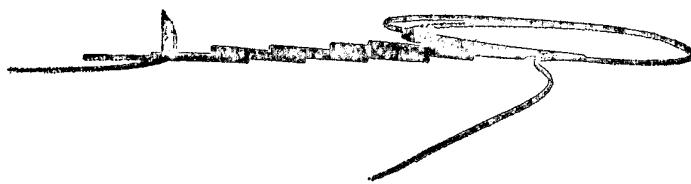
FIG. 1

Andamento da reunião de líquido sobrenadante
de caudro bovino dialisado a partir de
SEPHADEX G 150 identificando frações
biológicamente activas



*Andamento da eluição por cromatografia
em camada fina de fluidos actívos
obtidos a partir dum a coluna de SEPHADEX G-150*





3 / 7

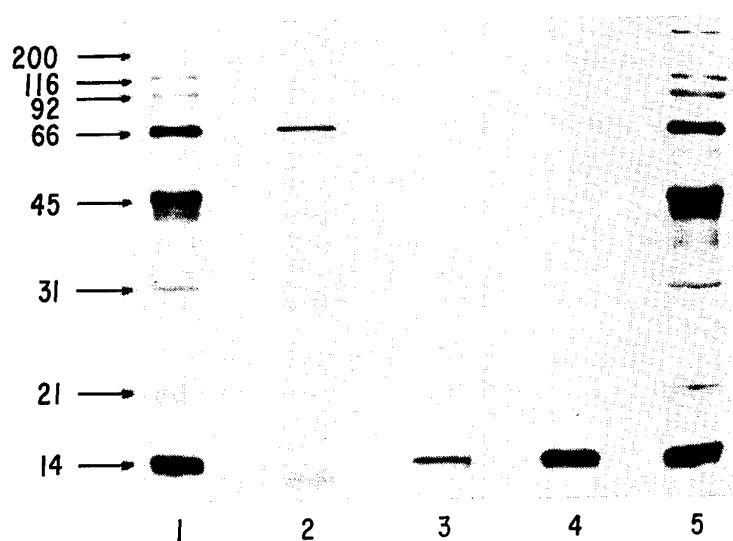


FIG. 3A

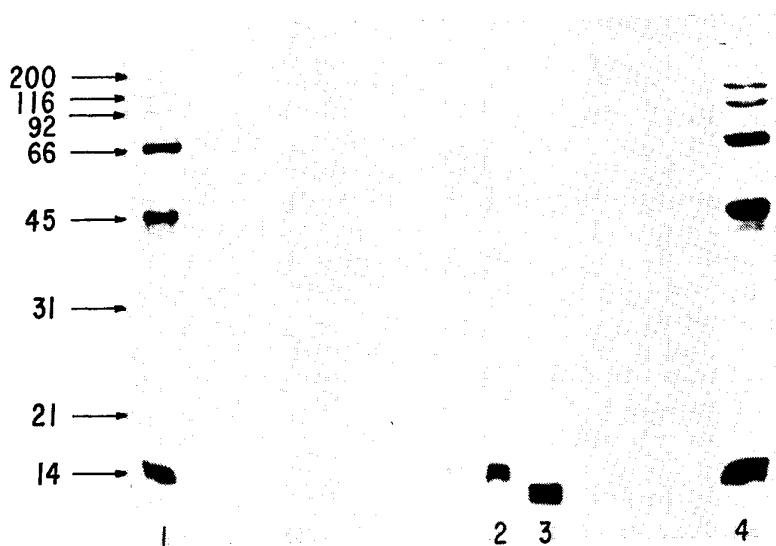
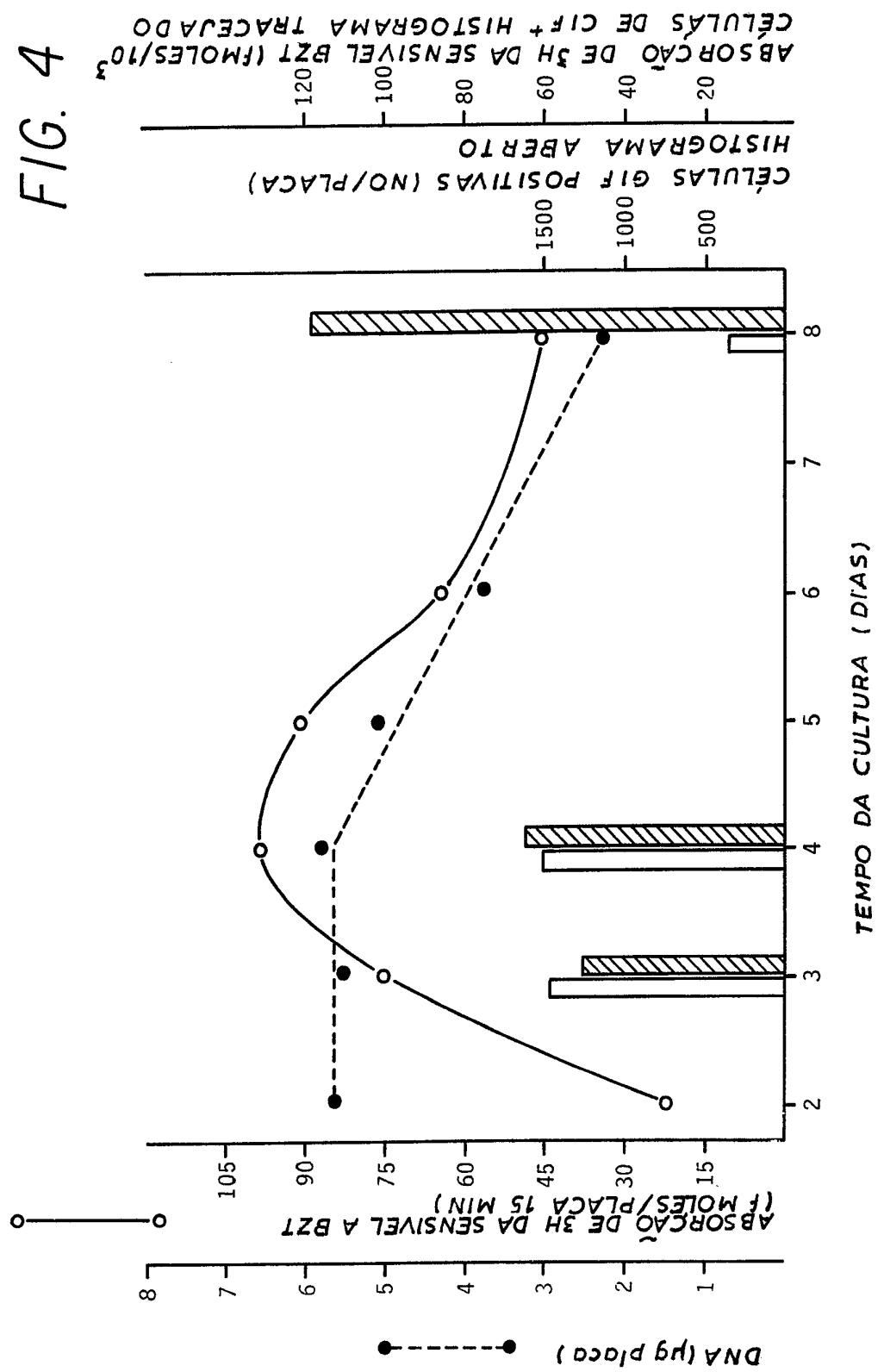
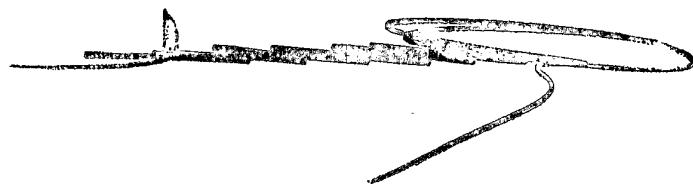


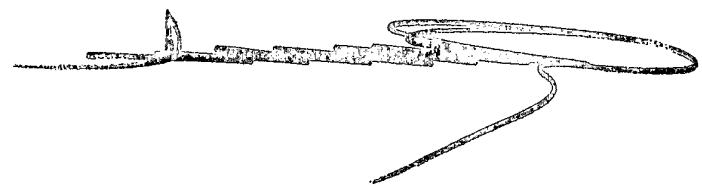
FIG. 3B

FIG. 4



4/7





5 / 7

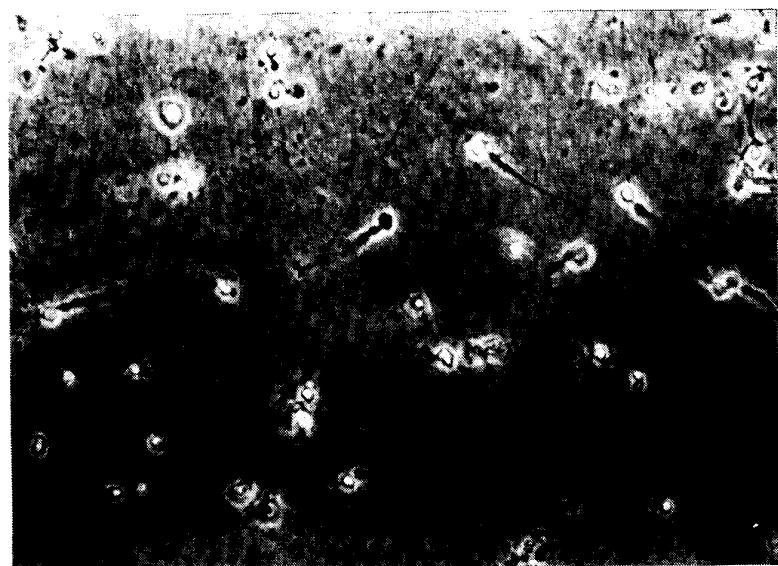


FIG. 5A



FIG. 5B

FIG. 6

Efeito do sobrenadante dialisado sobre o teor de DNA e o numero de células DA com o tempo na cultura

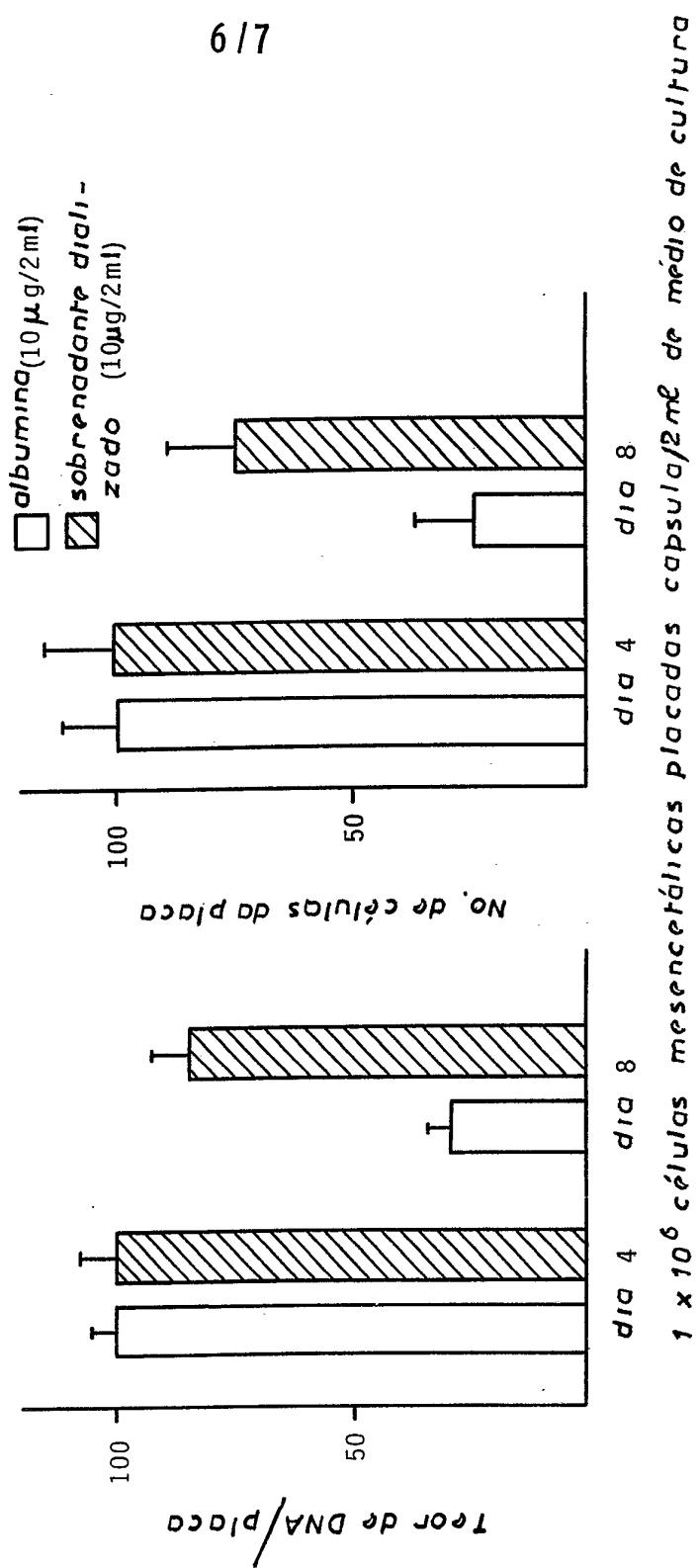
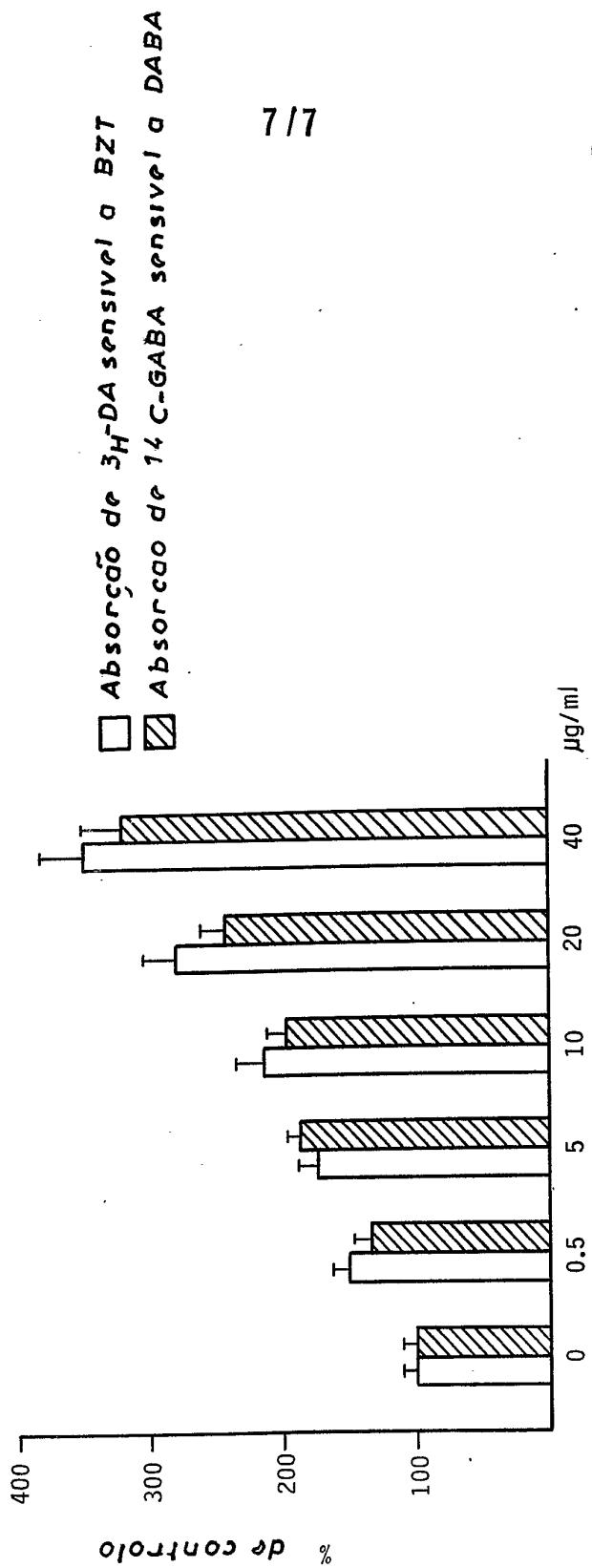


FIG. 7

Efeito do sobrenadante do precipitado com ácido dialisado proveniente de núcleo caudado sobre os parâmetros de absorção específica em culturas de células mesencefálicas



As células mesencefálicas foram semeadas a uma densidade de 0.5×10^6 células/1 ml capsulas de 24 mm. Adicionaram-se as quantidades indicadas de extratos bovinos na placagem a um volume de 50 ml. As amostras foram suplementadas com BST de maneira a atingir concentrações finais de 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de protéina. Os parâmetros de absorção foram determinados *in vitro* no dia 4. Os valores indicados são valores médios \pm desvio quadrático médio de amostras em triplicado.