



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 3569/84

(51) Int.Cl.5

C 07 H 15/04

(22) Indleveringsdag: 20 jul 1984

(41) Alm. tilgængelig: 22 jan 1985

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 19 jul 1993

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 21 jul 1983 IT 48724/83

(73) Patenthaver: THE *WELLCOME FOUNDATION LIMITED; 183-193 Euston Road; London; N.W.1., GB

(72) Opfinder: Ezio *Tubaro; IT, Giovanni *Cavallo; IT

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Mono-sialo gangliosid GM1P, præparater indeholdende dette samt anvendelse deraf til fremstilling af et lægemiddel

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

3569-84

Mono-sialo gangliosidderivater, der i det væsentlige kemisk og fysisk er identiske med et produkt fremstillet ved

- (a) koncentrering af en vandig opløsning af et mono-sialo gangliosid og calciumioner under subatmosfærisk tryk ved 40 til 80°C i 18 til 24 timer,
- (b) justering af pH til 2 til 3 efterfulgt af dialyse og

(c) afdampning af det vandige opløsningsmiddel.

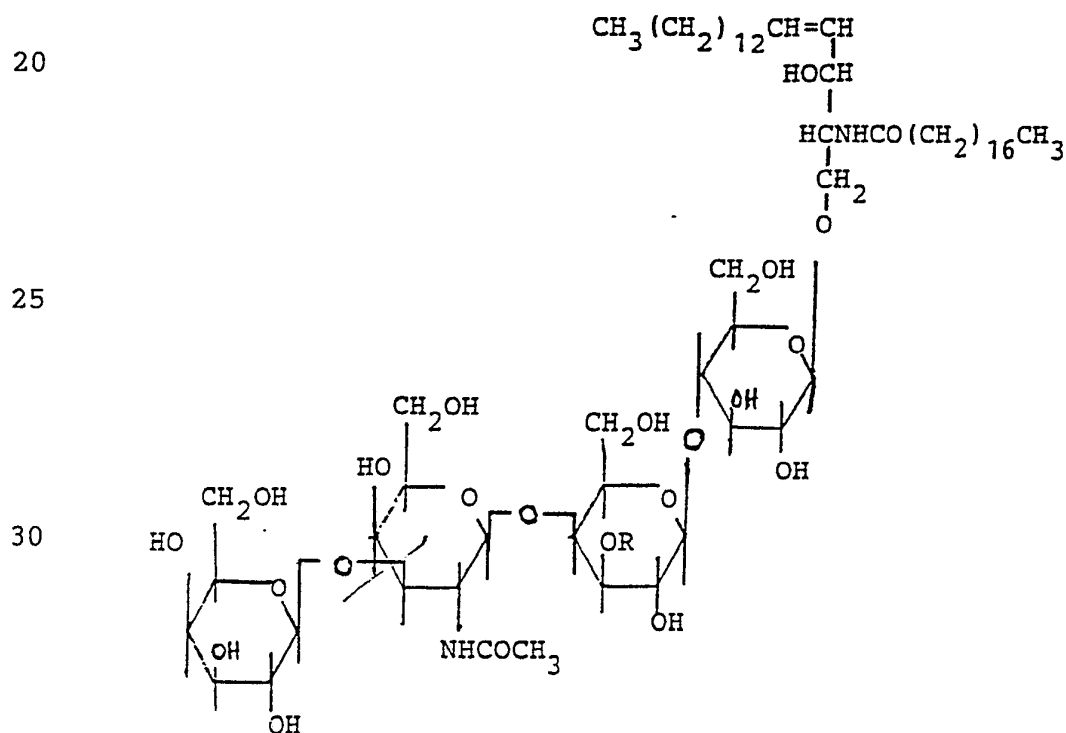
Det hidtil ukendte gangliosid menes at være en ny fysisk form for det kendte gangliosid GM1 og udviser virkning overfor bakterier, vira, protozoer, fungi og tumorer. Det er tidligere blevet foreslået, at gangliosider i almindelighed kan være anvendelig ved behandlingen af neurologiske lidelser, men ikke, at de påvirker fagocytters virkning.

Opfindelsen angår mono-sialo gangliosid G_{M1P} , præparater indeholdende dette samt anvendelse deraf til fremstilling af et lægemiddel.

De pågældende forbindelser er effektive til behandling af bakterielle, virale, protozoale og fungale infektioner samt tumorer hos pattedyr.

Gangliosider er en klasse naturligt forekommende glycosphingolipider, der indeholder en oligosaccharid, hvortil der kan være knyttet en eller flere sialsyregrupper. Gangliosider er blevet fundet i hjernen, milten, leveren, nyrerne og blodet på pattedyr og også i hønseæg (se Ledeen, J. Supramolecular Structure, 8:1-17 (1978) Cell Surface Carbohydrates and Biological Recognition 437-453, for en almen oversigt over gangliosider).

Strukturen af gangliosid G_{GNT1} er anført (Wiegandt, Angew Chemie Internat. Edn. 7. 87 (1968)) til at være som følger:



35 hvori R er en sialsyregruppe.

Ifølge den nomenklatur, der er foreslået af Svennerholm (J. Neurochem., 10, 613, 1963) betegnes de for-

skellige gangliosider med bogstavet G efterfulgt af et blandt fire bogstaver M, D, T eller Q afhængigt af om gangliosidet er et mono-, di-, tri- eller tetrasialo-gangliosid. Disse bogstaver efterfølges af talangivelser, der muliggør betegnelse af gangliosider, der indeholder den samme mængde sialsyre, men med forskellige chromatografiske mobiliteter. Disse gangliosider kan have stillingsisomere, der kan skelnes ved anvendelse af et bogstav efter det numeriske indeks, f.eks. gangliosid GM1b. Gangliosid G_{M1} er det samme som G_{GNT}^1 .

Det er blevet postuleret, at gangliosider spiller en rolle i centralnervesystemets (CNS) normale virkning, og der er blevet fremført hypoteser (Micele, Caltagirone og Gainotti, Acta Psychiatria Scand., 1977, 55, 102) om, at gangliosider kan udøve en positiv virkning ved behandlingen af neuropatiske syndromer. For nylig er det blevet foreslået (Spiegel Ravid og Wilchek, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 76, 5277, (1979)), at gangliosider er involveret i lymfocytstimuleringen hos pattedyr. Der er imidlertid ikke fremført nogen antydning om, at gangliosiderne kan påvirke virkningen af phagocytter (polymorphkernede leukocytter, makrophager, histiocytter osv.).

Polymorphkernede leukocytter (PMN) og makrophager (MC) udgør de væsentlige typer hvide blodceller og er ansvarlige for bekæmpelse af infektioner ved især bakterielle og fungale infektioner, samt forebyggelse af spredning af tumorer hos pattedyr. Fagocytter virker normalt i blodstrømmen eller ved infektionsstedet via blodstrømmen.

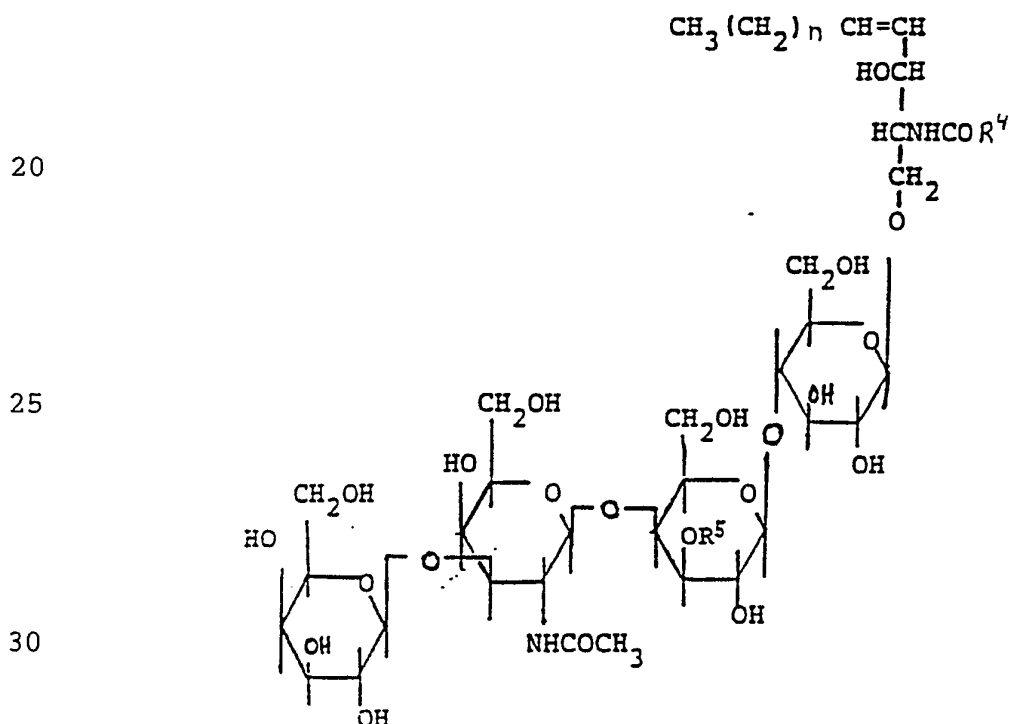
Det har nu vist sig, at visse gangliosider har en antibakteriel, antiviral, antifungal, antiprotozoal og/eller antitumor virkning og kan forøge virkningen af antibakterielle, antivirale, antifungale, antiprotozoale og/eller antitumorvirkende midler in vivo. Den antibakterielle, antivirale, antifungale, antiprotozoale

og/eller antitumorvirkning, der observeres, når gangliosidet indgives alene, menes at skyldes, at gangliosidet forøger fagocytvirningen.

Fysiske og kemiske undersøgelser viser, at gangliosiderne ifølge opfindelsen, der herefter benævnes som gangliosider $G_{M1}P$, har den samme kemiske struktur som de naturligt forekommende gangliosider, men en anden fysisk form end disse. Det menes, at gangliosiderne $G_{M1}P$ aggregerer sig på en anden måde end de naturligt forekommende gangliosider G_{M1} , hvorfra $G_{M1}P$ er afledt.

Følgelig angår opfindelsen et mono-sialo gangliosid $G_{M1}P$, der er ejendommeligt ved, at det (A) er fremstillet ved følgende fremgangsmåde:

(1) koncentrering af en vandig opløsning indeholdende et mono-sialo gangliosid med formelen I



35

hvor R^4 betyder en C_{15-23} alifatisk kæde, n er 12 eller 14, og R^5 betyder acetylneuraminsyre; og calciumkationer under sub-

atmosfærisk tryk ved en temperatur mellem 40°C og 80°C i et tidsrum mellem 18 og 240 timer,

- 5 (2) justering af pH til mellem 2 og 3 efterfulgt af dialyse, og
- (3) afdampning af det vandige opløsningsmiddel, og (B) ved, at
- (a) det ved tyndtlagschromatografi
- 10 (i) giver en positiv reaktion overfor svovlsyrereagens (koncentreret svovlsyre:vand, 1:1), resorcinolreagens, orcinol/ FeCl_3 og andre typiske reagenser for gangliosidbestemmelse,
- (ii) giver ringe reaktion overfor ninhydrinreagens (0,2% ninhydrin i ethanol),
- 15 (b) det i vandig opløsning af et ^{13}C -NMR spektrum, som vist i fig. 2,
- (c) det in vivo har aktivitet i mus overfor Klebsielle pneumonia, og
- 20 (d) det in vivo har aktivitet i mus overfor Herpes HSV-1 (stamme F).

Det har vist sig, at poly-sialo gangliosider let hydrolyserer termisk til opnåelse af de tilsvarende mono-sialo gangliosider. Især hydrolyserer poly-sialo gangliosider ved den temperatur, der anvendes til at fremstille de omhandlede produkter. Det mono-sialo gangliosid, der anvendes ved fremstillingen af de omhandlede produkter er derfor passende et mono-sialo gangliosid opnået kommercielt som et monokomponent gangliosid eller

25 i en blanding af gangliosider (f.eks. gangliosid G_{III} fra Sigma) eller i form af materiale ekstraheret fra naturlige kilder (hjerne, blod, blodceller osv.), der indeholder gangliosider, f.eks. acetonisk pulver (opnået efter konventionelle metoder) eller frysetørret hjerne

30 opnået fra dyrehjerner, passende oksehjerner, eller som dannes in situ ud fra et eller flere poly-sialo ganglio-

sider under betingelserne i trin 1 ved den omhandlede fremgangsmåde til fremstilling af de omhandlede produkter.

De gangliosider, der anvendes ved fremstillingen af de omhandlede produkter, er passende i en i det væsentlige ren form (dvs. mindre end 50%, passende mindre end 20% og fortrinsvis mindre end 10% urenheder), der kan opnås ved konventionelle rensningsmetoder, der anvendes til at rense gangliosider, såsom søjlechromatografi (se f.eks. L. Svennerholm, *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 6, 464-474).

Den vandige opløsning i trin 1 i krav 1 fremstilles fortrinsvis ved simpel blanding af gangliosidet med en vandig opløsning indeholdende calciumioner (såsom en vandig opløsning af calciumchlorid) til at give en calciumionkoncentration på mellem 1 og 10 mM (fortrinsvis ca. 5 mM) efterfulgt af grundig blanding. Alternativt kan den vandige opløsning fremstilles ved dialyse af gangliosidet overfor en vandig opløsning indeholdende calciumkationer (såsom en vandig opløsning indeholdende calciumhydrogencarbonat) for at opnå en calciumionkoncentration på 1 til 5 mM. Dialysen udføres passende i et tidsrum på mellem 24 og 72 timer, bekvemt 48 timer. Det vand, der anvendes ved denne dialyse, kan enten være naturligt vand eller destilleret vand, der indeholder calciumkationer, eller destilleret vand, hvortil sådanne kationer er blevet sat. Inden koncentrering af den vandige opløsning tilsættes bekvemt en mindre andel C_{1-4} alkanol, fortrinsvis methanol. Det har vist sig, at tilsætningen af 25% v/v methanol (i forhold til rumfanget af den totale opløsning) er særligt bekvemt i det tilfælde, hvor den vandige opløsning fremstilles ved dialyse, idet methanolet fortrinsvis tilsættes efter dialysen.

Ved koncentreringstrinnet holdes rumfanget af den opløsning, der koncentrerer bekvemt konstant ved kon-

tinuerlig tilsætning af yderligere opløsning indeholdende gangliosid og calciumkationer til erstatning for afdestilleret vand. Det totale rumfang af den vandige opløsning reduceres derved med en faktor på mellem 10 og 5 40 ved en typisk præparation. Der påtrykkes bekvemt et vakuum (passende mellem 20 og 50 mm Hg), og den indre temperatur holdes mellem 55 og 80°C, passende 59,5°C, ved anvendelse af et ydre temperaturområde på mellem 60 og 90°C, passende 67,5°C. Koncentreringsproceduren er 10 herunder fortrinsvis kontinuerlig og lineært progressiv.

Koncentreringen er passende afsluttet efter mindre end 110 timer. Når koncentreringen udføres på en vandig opløsning ved en temperatur på 59,5°C, udføres koncentreringsprocessen bekvemt i ca. 55 timer.

15 Den koncentrerede opløsnings pH justeres i trin 2 med organiske eller mineralske syrer til et foretrukket pH på ca. 2,6. Den anvendte syre er bekvemt HCl, passende 6 N HCl. Dialysen udføres passende overfor destilleret vand eller en fortyndet syreopløsning med et pH på 20 ca. 2,6 (en fortyndet saltsyreopløsning foretrækkes) efterfulgt af dialyse overfor destilleret vand. Det destillerede vand er passende gendestilleret inden anvendelse. Denne dialyse udføres passende ved en temperatur på mellem 1 og 10°C, bekvemt 4°C, i ca. 24 til 72 25 timer, passende 48 timer.

Afdampningen af det vandige opløsningsmiddel i trin 3 udføres ved konventionelle metoder, der er velkendte for fagmænd, f.eks. ved den teknik, der kendes som frysetørring, dvs. ved frysning af den vandige opløsning og afdampning af vandet under vakuum. 30

Det omhandlede gangliosid $G_{M1}P$ vil normalt indeholde mindre end 80%, passende mindre end 50%, mere passende mindre end 20% og fortrinsvis mindre end 5% urenheder såsom gangliosid G_{M1} , andre gangliosider eller 35 andre derivater deraf. Det omhandlede gangliosid $G_{M1}P$ kan adskilles fra ikke derivatiserede gangliosider ved

dialyse af en vandig suspension af en blanding af derivatiserede og ikke-derivatiserede gangliosider, der indeholder en mindre andel methanol, overfor destilleret vand og frysetørring af den resulterende suspension.

5 Et gangliosid $G_{M1}P$ ifølge opfindelsen har vist sig at have en R_f -værdi på 0,245 (sammenlignet med R_f på 0,31 for gangliosid G_{M1}) ved tyndlagschromatografi (substrat: Merck Silica Gel 60 F254, opvarmet til $110^\circ C$ i 30 minutter, pladetykkelse 0,25 mm, elueringsmiddel: chloroform/methanol/vand, 55/45/10; pladen mættet i en time inden eluering), skønt det også har vist sig, at denne værdi nærmer sig værdien for G_{M1} efterhånden som renheden af $G_{M1}P$ stiger. Det giver positiv reaktion ved sprøjtning med svovlsyre (koncentreret svovlsyre:vand 15 1:1) med resorcinolreagens med orcinol/ $FeCl_3$ og med andre typiske reagenser til bestemmelse af gangliosider, men ringe reaktion ved sprøjtning med ninhydrin (0,2% i ethanol). Det har et NMR spektrum, der er som vist i fig. 2.

20 Ud fra en sammenligning af ^{13}C NMR spektrene for mono-sialo gangliosidet G_{M1} (fig. 1) i vand og produktet ifølge opfindelsen $G_{M1}P$ (fig. 2), er det klart, at de væsentlige forskelle i spektrene er, at mange af toppene fra $G_{M1}P$ er meget bredere end de tilsvarende toppe fra G_{M1} (NB de viste spektre er blevet udjævnet med et digitalt filter, hvis liniebredde er den samme som den gennemsnitlige topbredde i hvert tilfælde). Det menes, at disse forskelle skyldes modifikationer i den måde, hvorpå gangliosidmolekylerne er forbundet med hinanden 25 både i fast tilstand og i vand. Det er velkendt, at gangliosider aggregerer i vand, f.eks. M. Corti, V. Degiorgio, R. Ghidoni, S. Sonnino og G. Tettamanti, Chemistry and Physics of Lipids 26 (1980) 225-238.

Det menes også, at der ikke er nogen kemiske for- 35 skelle mellem $G_{M1}P$ og G_{M1} , eftersom ^{13}C nmr spektrene af en blanding af $G_{M1}P$ og G_{M1} i opløsning i chloroform:methanol:vand (60:34:6 v/v) kun viser et sæt toppe.

Gangliosidet $G_{M1}P$ kan også skelnes fra det naturligt forekommende gangliosid G_{M1} på basis af deres optiske aktiviteter, f.eks. ved cirkulær dichroismemåling og ved differentiell kalorimetri.

- 5 Gangliosidforbindelserne ifølge opfindelsen har anvendelige farmakologiske egenskaber som ikke besiddes af udgangsforbindelserne med formlen I.

Den omhandlede opfindelse angår også et farmaceutisk præparat, der er ejendommelig ved, at det omfat-
10 ter et gangliosid $G_{M1}P$ som defineret ovenfor sammen med et farmaceutisk acceptabelt bæremiddel. Mængden af gangliosid, der er til stede i et sådant præparat, vil normalt ligge mellem 0,05 og 100 mg, passende mellem 0,5 og 10 mg og bekvemt 1 mg. Dosis af det indgivne gangliosid
15 vil normalt være mellem 0,1 og 500 mg, passende mellem 0,5 og 50 mg, bekvemt 0,5 til 10 mg pr. person pr. dag pr. uge. Den nøjagtige dosis vil naturligvis variere alt efter patientens tilstand og indgivningsvejen. Det menes, at de farmaceutiske præparater ifølge opfindelsen
20 kan anvendes f.eks. inden operationer for at hjælpe med til at afhjælpe de immunodepressante virkninger af visse anæstetika (halothan osv.); profylaktisk til at forbedre celleforsvaret hos børn under epidemier, efter virale infektioner for at forhindre udviklingen af bakterielle
25 og fungale infektioner og tumorer, og ved behandlingen af immunodepression, f.eks. for at modvirke den immunodepressante virkning af cytostatisk lægemidler, der f.eks. gives til cancerpatienter. Gangliosid $G_{M1}P$ kan også med nytte kombineres med andre aktive midler og
30 indgives i form af passende farmaceutiske præparater.

Følgelig angår opfindelsen et farmaceutisk præparat, der er ejendommeligt ved, at det omfatter et mono-sialo gangliosid $G_{M1}P$ som defineret tidligere i kombination med et antibakterielt, antiviralt, antipro-
35 tozoalt, antifungalt og/eller antitumormiddel eller i kombination med et stof, der nedsætter eller forøger

virksomheden af fagocytter hos pattedyr sammen med et farmaceutisk acceptabelt bæremiddel.

Passende antibakterielle midler inkluderer benzylpyrimidiner, tetracykliner, β -lactamantibiotika, såsom penicillinerne og cephalosporinerne, sådanne antibiotika, der indeholder sukkerkomponenter, såsom aminoglycosidantibiotikaene, og sulfonamider.

Trimethoprim, diaveridin og tetroxoprim er særligt kendte eksempler på benzylpyrimidiner, der har en antibakteriel virkning, men andre benzylpyrimidiner, hvori phenylgruppen er substitueret med en eller flere substituent, fortrinsvis tre substituent, er også egnede til inkludering i de omhandlede præparater. Passende substituent inkluderer C_{1-4} alkoxygrupper inklusiv sådanne, der indeholder et yderligere oxygenatom i carbonkæden, såsom methoxyethoxy, C_{1-4} alkylgrupper, C_{2-4} alkenylgrupper, C_{1-4} alkylthiogrupper, halogenatomer, aminogrupper, eventuelt substitueret med en eller to C_{1-4} alkylgrupper, samt andre substituent, der er velkendte indenfor teknikken.

Passende tetracykliner inkluderer tetracyklin, oxytetracyklin, doxycylin, chlortetracyklin, demethylchlortetracyklin og tetracyklinphosphatkompleks.

Passende penicilliner inkluderer de naturligt forekommende penicilliner og de semisyntetiske penicilliner, såsom de der indeholder en acylaminosidekæde knyttet til 6-stillingen i penicillinkernen. Ampicillin, amoxycillin, azidocillin, talampicillin, carbencillin, ticarcillin, piperacillin, oxacillin, azlocillin, mezocillin, hetacillin, flucloxacillin, cloxacillin og benzylpenicillin er særligt passende penicilliner til inkludering i de omhandlede præparater.

Passende cephalosporiner inkluderer de, der dannes som gæringsprodukter, såsom cephalosporin C, og de, der fremstilles semisyntetisk, såsom de der indeholder en acylaminosidekæde i 7-stillingen i cephalosporinkernen.

nen, f.eks. cephadin, cephoxitin, cephamandol, cephamycinerne, cephaloridin, cephalixin, cephalatin, cephur-oxim, cephaloglycin og cepharimnatrium.

Andre β -lactamantibiotika er grundigt blevet gen-
5 nemgået indenfor teknikken. Eksempler på særligt egnede aminoglycosidantibiotika til inkludering i de omhandlede præparater er streptomycin, erythromycin, carbomycin, kanamycinerne, amicetin, gentamycin og oleandomycin.

Passende sulfonamider til inkludering i de om-
10 handlede præparater inkluderer sulfanilamid, sulfadiazin, sulfamethiazol, sulfapyridin, sulfathiazol, sulfamerazin, sulfamethazin, sulfioxazol, sulformethoxin, 2-(p-aminobenzen)sulfonamid-3-methoxypyrazin (Kelfizina), p,p¹-diamino-diphenylsulfon, amino-p-toluensulfon-
15 amid, 5-sulfanilamido-2,4-dimethyl-pyrimidin, 4-(N¹-acetylsulfanilamido)-5,6-dimethoxy-pyrimidin, 3-sulfanilamido-4,5-dimethylisoxazol, 4-sulfanilamido-5-methoxy-6-decyloxy-pyrimidin-sulfamonomethoxin, 4-p-(9-hydroxy-quiniliny-4-azo)-phenyl-sulfanilamido-5,6-dimethoxypyrimi-
20 din, sulfadimethoxin, sulfadimidin, sulfamoxol, sulfadoxin, sulfaguanidin, sulfathiodimethoxin, sulfamethoxazol, sulfaguinoxalin og p-(2-methyl-8-hydroxy-quinoliny-5-azo)-phenyl-sulfanilamido-5,6-dimethoxypyrimidin.

Et særligt passende antiviralt middel til brug i
25 kombination med det omhandlede mono-sialo gangliosid G_{M1}^P er acyclovir.

Stoffer, der nedsætter virkningen af fagocytter hos pattedyr og derfor er egnede til inkludering i de omhandlede farmaceutiske præparater, er godt dokumente-
30 rede i litteraturen. Sådanne stoffer inkluderer cyto- statiske midler, f.eks. adriamycin og alkyleringsmidler (f.eks. cyclophosphamid) og vincaalkaloider samt corti- costeroider, f.eks. β -methazon.

Tilsvarende er stoffer, der forøger fagocytters
35 virkning hos pattedyr, og som derfor er egnede til in- kludering i de omhandlede farmaceutiske præparater, vel-

dokumenterede i litteraturen. Sådanne stoffer inkluderer pyrancopolymer, glucan, muramyldipeptid, lentinan, tuftsin, CP og BCG osv.

En gruppe foretrukne farmaceutiske præparater
5 ifølge opfindelsen omfatter et mono-sialo gangliosid $G_{M1}P$ som defineret tidligere sammen med et antibakterielt middel og et farmaceutisk bæremiddel. Særligt foretrukne antibakterielle midler inkluderer benzylpyrimidinerne, f.eks. trimethoprim, tetracyklinerne,
10 f.eks. tetracyklin, aminoglycosidantibiotikaene, f.eks. gentamycin, de semisyntetiske penicilliner, f.eks. ampicillin samt cephalosporinerne.

En yderligere gruppe foretrukne farmaceutiske præparater ifølge opfindelsen omfatter et gangliosid
15 $G_{M1}P$ som defineret tidligere sammen med et stof, der nedsætter eller forøger fagocytters virkning hos pattedyr, i kombination med et farmaceutisk acceptabelt bæremiddel.

En yderligere gruppe foretrukne farmaceutiske
20 præparater omfatter et mono-sialo gangliosid $G_{M1}P$ som defineret tidligere sammen med et antibakterielt middel, der nedsætter virkningen af polymorphokernede leukocytter hos pattedyr, i kombination med et farmaceutisk acceptabelt bæremiddel. Tetracyklinerne er eksempler på sådanne
25 antibakterielle midler.

Endnu en yderligere gruppe foretrukne farmaceutiske præparater omfatter mono-sialo gangliosid $G_{M1}P$ som defineret tidligere sammen med et antiviralt middel, såsom acyclovir. En yderligere gruppe foretrukne farmaceutiske præparater omfatter mono-sialo gangliosid $G_{M1}P$
30 som defineret tidligere sammen med et antiprotazoalt middel såsom pyrimethamin.

Forholdet mellem mono-sialo gangliosidderivatet og den anden aktive komponent i præparatet vil normalt
35 ligge fra 100:1 til 1:500 og passende 1:1 til 1:100 efter vægt.

Det nøjagtige vægtforhold mellem mono-sialo gangliosidderivatet og den anden aktive komponent vil variere afhængigt af den særlige anden aktive komponent, der inkorporeres i præparaterne.

5 Den optimale dosis af mono-sialo gangliosidderivatet og den anden aktive komponent vil naturligvis variere afhængigt af arten af den anden komponent, patientens tilstand og indgivningsvejen, men dosis af mono-sialo gangliosidderivatet vil normalt ligge fra 0,01 mg
10 til 500 mg, og fortrinsvis 0,1 til 10 mg pr. person pr. dag (0,001 til 0,1 mg/kg legemsvægt pr. dag). Kombinationen af gangliosidet med den anden aktive komponent vil normalt blive givet i en dosis på 0,1 til 500 mg, passende 1 til 100 mg, og fortrinsvis 1 til 50 mg pr.
15 person pr. dag.

Det farmaceutisk acceptable bæremiddel skal naturligvis være "acceptabelt" i den forstand, at det er foreneligt med de andre ingredienser i præparatet og ikke er skadeligt for præparatets modtager. Bæremidlet
20 kan være fast eller flydende, en blanding af faste og flydende stoffer, og det kan formuleres med andre komponenter i præparatet som en enhedsdosis, f.eks. en tablet, kapsel eller dosispulver til oral indgivning eller et suppositorie til rektal indgivning. Andre far-
25 maceutisk aktive stoffer kan også inkluderes i de omhandlede præparater, og præparatet kan formuleres efter en vilkårlig af de indenfor farmacien velkendte teknikker, der grundlæggende består i blanding af komponenterne. Enhedsdosisformuleringer til oral, rektal eller
30 parenteral indgivning indeholder bekvemt en kombination af gangliosid $G_{M1}P$ -derivatet og den anden aktive komponent i præparatet i en mængde i området 0,1 til 500 mg, fortrinsvis 1 til 50 mg.

Til oral indgivning kan fine pulvere eller granu-
35 later af komponenterne indeholde fortyndingsmidler og dispergeringsmidler samt overfladeaktive midler og kan

foreligge i en mixtur i vand eller i en sirup, i kapsler eller dosispulvere i tør tilstand, eller i en vandig eller ikke-vandig suspension, der også kan inkluderes et suspensionsmiddel; i tabletter, der fortrinsvis fremstilles ud fra granulater af den aktive ingrediens med et fortyndingsmiddel ved komprimering med bindemidler og smøremidler; eller i en suspension i vand eller en sirup eller olie eller i en vand/olieemulsion, hvor smags-, konserverings-, suspensions-, fortykkelses- og emulgeringsmidler også kan være inkluderet. Granulaterne eller tabletterne kan være overtrukne, og tabletterne kan være opdelte.

Til parenteral indgivning (ved intravenøs, intraperitoneal eller subkutan indgivning) kan de omhandlede præparater foreligge i enhedsdosis- eller multidosisbeholdere i vandige eller ikke-vandige injicerbare opløsninger, der kan indeholde antioxidanter, puffere, bakteriestater og solutter, der gør præparaterne isotoniske med blodet; eller i vandige eller ikke-vandige suspensioner, såfremt suspensions- og fortykkelsesmidler kan inkluderes; extemporane injektionsopløsninger og -suspensioner kan fremstilles ud fra sterile pulvere, granulater eller tabletter, der kan indeholde fortyndings-, dispersions- og overfladeaktive midler, bindemidler og smøremidler. De opløsningsmidler, der anvendes i disse præparater er opløsningsmidler, der ikke er skadelige for mono-sialo gangliosidderivatets stabilitet. Foretrukne opløsningsmidler inkluderer vand, saltopløsning og EDTA. Organiske opløsningsmidler såsom glycolerne, især ethylen- og propylenglycol, kan ofte inkorporeres i de omhandlede injicerbare opløsninger.

Såfremt vand er opløsningsbæremidlet, vil en puffer også normalt være til stede. Saltopløsning er det foretrukne opløsningsmiddel.

Præparaterne kan også foreligge i form af todelspakninger, idet delene blandes inden indgivning. I en

sådan todelspakning vil gangliosid $G_{M1}P$ bekvemt foreligge som et frysetørret fast stof.

Det foretrækkes at indgive de omhandlede præparater parenteralt.

- 5 Det kan ofte være ønskeligt at indgive en dosis af mono-sialo gangliosid $G_{M1}P$ inden indgivningen af et præparat ifølge opfindelsen, der indeholder en anden aktiv ingrediens. De omhandlede præparater kan således foreligge i form af en pakning, der indeholder i det
- 10 mindste én enhedsdosis af mono-sialo gangliosid $G_{M1}P$ som defineret tidligere og i det mindste én enhedsdosis af et præparat ifølge opfindelsen, der indeholder en anden aktiv ingrediens, som defineret tidligere, idet de separate enhedsdosis tydeligt er afmærket, sammen med in-
- 15 struktioner til sikring af, at dosis indgives i den korrekte rækkefølge.

- De omhandlede præparater og mono-sialo gangliosid $G_{M1}P$ kan anvendes til behandling eller profylakse af bakterielle, virale, fungale og protozoale infektioner
- 20 samt tumorer hos pattedyr, især mennesker. Præparaterne og mono-sialo gangliosid $G_{M1}P$ anvendes fortrinsvis til profylakse af bakterielle, virale, fungale og protozoale infektioner samt til at forebygge tumorer i at brede sig hos pattedyr.

- 25 Den omhandlede opfindelse angår således også anvendelsen af et mono-sialo gangloisid $G_{M1}P$ som tidligere defineret til fremstilling af et lægemiddel til forøgelse af modstandsdygtigheden mod bakterie-, virus-, fungus- eller protozoininfektion eller mod tumorer.

- 30 De følgende eksempler belyser fremstillingen af gangliosiderne $G_{M1}P$ samt deres farmakologiske egenskaber, jfr. eksemplerne.

Eksempel 1

Fremstilling af gangliosid $G_{M1}P$.

- 5 (i) friskt gråt materiale (1 kg) fra oksehjerne
homogeniseredes med acetone (3 liter), og den
resulterende suspension filtreredes under
vakuum. Resten blandedes med acetone (1 li-
ter), og homogeniseredes og filtreredes som
ovenfor. Den faste rest af acetonetørret
pulver tørredes under en luftstrøm ved stue-
10 temperatur i 18 timer. Typisk udbytte af ace-
tonetørret pulver var 150-200 g/kg gråt mate-
riale.
- 15 (ii) Det triturerede acetonetørrede pulver (19,2
g) fra oksehjerne sættes til en chloroform/
methanolblanding (2100 ml, 1:1). Blandingen
rystedes kraftigt i 1 time og filtreredes
derefter. Chloroform (1050 ml) og 0,1 M
kaliumchloridopløsning (625 ml) sættes til
filtratet.
- 20 Blandingen rystedes i yderligere 1 time
og henstilledes derefter natten over. Den
øvre fase på ca. 1270 ml, der var udskilt ved
henstand, fraskiltes og dialyseredes overfor
gendestilleret vand ved 15°C i 48 timer i en
25 Visking slange.
- 30 (iii) Den vandige opløsning frysetørredes efter
dialyse, og det frysetørrede pulver toges op
i gendestilleret vand og dialyseredes igen i
48 timer. Den vandige opløsning frysetørre-
des, og det resulterende produkt chromatogra-
feredes på en silicagelsøjle efter Svenner-
holm's metode (Methods in Carbohydrate Che-
mistry, 6, 464-474) under eluering med en
35 chloroform-methanol-vandblanding. De frak-
tioner, der indeholdt gangliosid G_{M1} samle-
des og frysetørredes.

Det frysetørrede produkt optoges i gendestilleret vand og dialyseredes med løbende hanevand ved 15°C i 48 timer i en Visking slange (9,5 cm's diameter, 110 cm's længde). En vandig opløsning af calciumhydrogencarbonat i destilleret vand (calciumionkoncentration ca. 200 µg/ml) kan anvendes som erstatning for hanevand.

(iv) En vandig opløsning af mono-sialo gangliosidet koncentreredes ved kontinuerlig fordampning under vakuum med den fordamper, der er vist i fig. 3. 200 ml af den vandige opløsning anbragtes i en rundbundet kolbe, og kolben opvarmedes ved en badtemperatur på 67,5°C (ydre temperatur 59,5°C). Det vand, der afdestillerede under vakuum, erstattedes kontinuerligt med yderligere vandig gangliosidopløsning fra en flaske (2) ved hjælp af en føler (9) og en automatisk ventil (5), der var justeret til at reagere på signaler fra føleren, således at der sattes det samme væskerumfang til kolben via ventilen (5), som der fordampede og passerende forbi føleren (9) som kondensat.

(v) pH af den koncentrerede gangliosidopløsning (200 ml) justeredes til pH 2,6 ved tilsætning af koncentreret (50%) saltsyre. Den resulterende opløsning dialyseredes overfor løbende gendestilleret vand (100 liter) i 48 timer under magnetomrøring ved 4°C i en Visking slange (4,5 cm's diameter, 160 cm's længde). Den således opnåede opløsning lyofiliseredes i et standard frysetørringsapparat. Udbyttet var mellem 95 og 100 mg udfra 19,2 g acetonetørret pulver.

Eksempel 2

Proceduren fra eksempel 1 gentoges op til afslutningen af trin (iv). Den koncentrerede gangliosidopløsnings (200 ml) pH justeredes derefter til pH 2,6 ved tilsætning af koncentreret (50%) saltsyre. Den resulterende opløsning dialyseredes overfor en vandig opløsning af saltsyre (pH 2,6) med et "Amicon" membransystem (membran U5UM05 med 500 M.W. og diameter 62 mm), indtil effluenter fra dialysen havde et pH på 2,6 (dette skete efter ca. 18 timer). Den sure opløsning dialyseredes overfor destilleret vand med en Visking slange som i eksempel 1, og den således opnåede opløsning lyofiliseredes i et standard frysetørningsapparat.

15 Biologisk virkning af de omhandlede gangliosidderivater.

1. Overfor K. pneumonia.

Schweiziske hankønsalbinomus (Charles River CD1) med en vægt på 20 ± 1 g randomiseredes og opdeltes i to grupper på hver 20 dyr. Musene injiceredes intraperitonealt med 0,25 ml/10 g mus med en 24 timers bouillonkultur af Klebsiella pneumonia CN 3632 i hjerne-hjertebouillon (Difco), der var blevet centrifugeret, vasket med saltopløsning og derefter gensuspenderet i saltopløsning til opnåelse af 2×10^7 mikroorganismer/ml. En gruppe på 20 mus havde forinden fået 2,5 mg/kg gangliosid $G_{M1}P$ opnået efter fremgangsmåden i eksempel 2 indgivet intravenøst 24 timer inden K. pneumonia-infektion. Resultaterne på den 8. dag efter infektion var som følger:

Gruppe	Dødelighed	
	Antal døde	%Dødelighed
Kontroller	16/20	80
Gangliosid $G_{M1}P$	0/20	0

2. Overfor Herpes HSV-1 (stamme F) virus.

BALB/c mus med en vægt på 16 g randomiseredes i tre grupper på hver 6 dyr. Musene injiceredes intraperitonealt med $2,5 \times 10^{10}$ pfu/ml (12 LD₅₀) HSV-1 (stamme F) virus fra Dr. B. Roizman på University af Chicago. To grupper mus fik henholdsvis 0,6 mg/kg og 3 mg/kg G_{M1}P opnået efter fremgangsmåden i eksempel 2 indgivet intraperitonealt to gange dagligt begyndende 48 timer inden infektion, indtil den 7. dag efter infektion. Dyrene i den tredje gruppe, der virkede som kontroller, injiceredes det samme rumfang opløsningsmiddel samtidig som de behandlede dyr.

Gruppe	Overlevelsestid for hver mus i timer	GOT (timer)	Antal over- levende den 7. dag	
15	1	12,12,12,24,24,36	20	0/6
	2	180,192, 288, 288, 288	254	4/6
20	3	180,192, 288, 288, 288, 288	254	4/6
Gruppe 1 = kontroller				
2 = 0,6 mg/kg gangliosid G _{M1} derivat				
25	3 = 3,0 mg/kg gangliosid G _{M1} derivat			
GOT	= gennemsnitlig overlevelsestid			

3. Overfor Plasmodium berghei protozoa.

40 schweiziske hankønsalbinomus (Charles river CD1) med en vægt på 22 ± 1 g fordeltes tilfældigt i grupper på 10 og injiceredes intraperitonealt med 0,1 ml/10 g citreret blod fra 6 dage parasitiserede mus, hvilket blod var blevet fortyndet 1:1000 (v/v) med saltopløsning til opnåelse af $1,58 \times 10^6$ P. berghei I.S.S./ml. Kontrolgruppen (1) injiceredes saltopløsning, gruppe 2 ganglio-

sid $G_{M1}P$ fremstillet efter fremgangsmåden i eksempel 1 (5 mg/kg s.c. i saltopløsning), gruppe 3 med det kendte antipprotozoale middel pyrimethamin (1 mg/kg s.c. i CMC 0,25% i vand, w/v) og gruppe 4 med både $G_{M1}P$ og pyrimethamin i de ovenfor anførte dosis. Dosisrumfanget var 0,25 ml/10 g. $G_{M1}P$ blev indgivet 24 timer og 2 timer inden infektion (dag 0), og pyrimethaminet på dagene 0, 1 og 2.

10

Resultaterne var som følger:

Dødelighed (%)			
	Gruppe	Dag 9	Dag 13
	1	100	(100)
15	2	90	100
	3	50	90
	4	20	80

$G_{M1}P$ har således en antipprotozoal virkning og forøger også effektiviteten af et standard antipprotozoalt middel.

4. Overfor *Candida albicans*.

53 schweiziske hankønsalbinomus (Charles River CD1) med en vægt på 23 ± 1 g fordeltes tilfældigt i grupper på henholdsvis 10, 14, 14 og 15 mus (grupperne 1 til 4). Dyrene i gruppe 1 injiceredes saltopløsning som kontrolgruppe; gruppe 2 injiceredes cyclophosphamid 50 mg/kg (0,2 ml/mus) intravenøst 96 timer inden infektion; gruppe 3 cyclophosphamid 50 mg/kg (0,2 ml/mus) intravenøst 96 timer inden infektion og $G_{M1}P$ 10 mg/kg (0,25 ml/10 g) subkutan 96 og 24 timer inden infektion og gruppe 4 $G_{M1}P$ 10 mg/kg (0,25 ml/10 g) subkutan 96 og 24 timer inden infektion. Musene injiceredes derefter intravenøst med 0,225 ml/mus

20

18 timers kultur af Sabouraud glucosebouillon indeholdende $1,204 \times 10^7$ Candida albicans celler/ml (stamme CN7996).

5 Resultaterne var som følger:

	Gruppe	Gennemsnitlig overlevelsestid	Antal i live dag 23
	1	8,0	0
	2	1,21	0
10	3	6,28	0
	4	12,06	3

Disse resultater viser, at $G_{M1}P$ har en antifungal virkning og også, at det i en vis grad reverterer den 15 immunosuppressante virkning af cyclophosphamid.

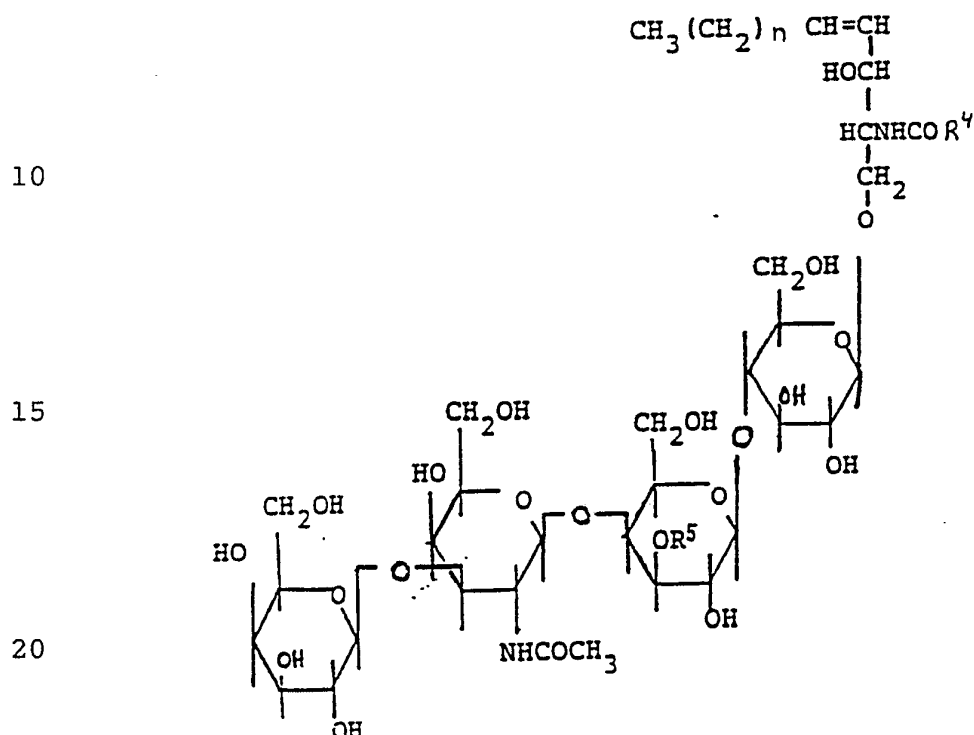
Toksicitet.

Gangliosid $G_{M1}P$ fra eksempel 2 injiceredes intra-20 peritonealt til mus til en maksimal dosis på 30 mg/kg. Der bemærkedes ingen toksiske virkninger.

P A T E N T K R A V

1. Mono-sialo gangliosid $G_{M1}P$, k e n d e t e g -
n e t ved, at det (A) er fremstillet ved følgende frem-
gangsmåde:

- (1) koncentration af en vandig opløsning indehol-
dende et mono-sialo gangliosid med formelen I



25 hvori R^4 betyder en C_{15-23} alifatisk kæde,
n er 12 eller 14, og R^5 betyder acetyl-
neuraminsyre; og calciumkationer under sub-
atmosfærisk tryk ved en temperatur mellem
 $40^{\circ}C$ og $80^{\circ}C$ i et tidsrum mellem 18 g 240
timer,

- 30 (2) justering af pH til mellem 2 og 3 efterfulgt
af dialyse, og
(3) afdampning af det vandige opløsningsmiddel,
og (B) ved, at
(a) det ved tyndtlagschromatografi

- (i) giver en positiv reaktion overfor svovlsyrereagens (koncentreret svovlsyre: vand, 1:1), resorcinolreagens, orcinol/ FeCl_3 og andre typiske reagenser for gangliosidbestemmelse,
- 5 (ii) giver ringe reaktion overfor ninhydrinreagens (0,2% ninhydrin i ethanol),
- (b) det i vandig opløsning har et ^{13}C -NMR spektrum, som vist i fig. 2,
- 10 (c) det in vivo har aktivitet i mus overfor Klebsielle pneumonia, og
- (d) det in vivo har aktivitet i mus overfor Herpes HSV-1 (stamme F).

2. Farmaceutisk præparat, k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter et mono-sialo gangliosid G_{M1P} ifølge krav 1 sammen med et farmaceutisk acceptabelt bæremiddel.

3. Præparat ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at det yderligere omfatter en eller flere blandt:

20 et antibakterielt middel, et stof, der nedsætter fagocytters virkning hos pattedyr, et antiviralt middel, et antiprotozoalt middel, et antifungalt middel og et antitumormiddel.

4. Anvendelse af et mono-sialo gangliosid G_{M1P}

25 ifølge krav 1 til fremstilling af et lægemiddel til forøgelse af modstandsdygtigheden mod bakterie-, virus-, fungus- eller protozainfektion eller mod tumorer.

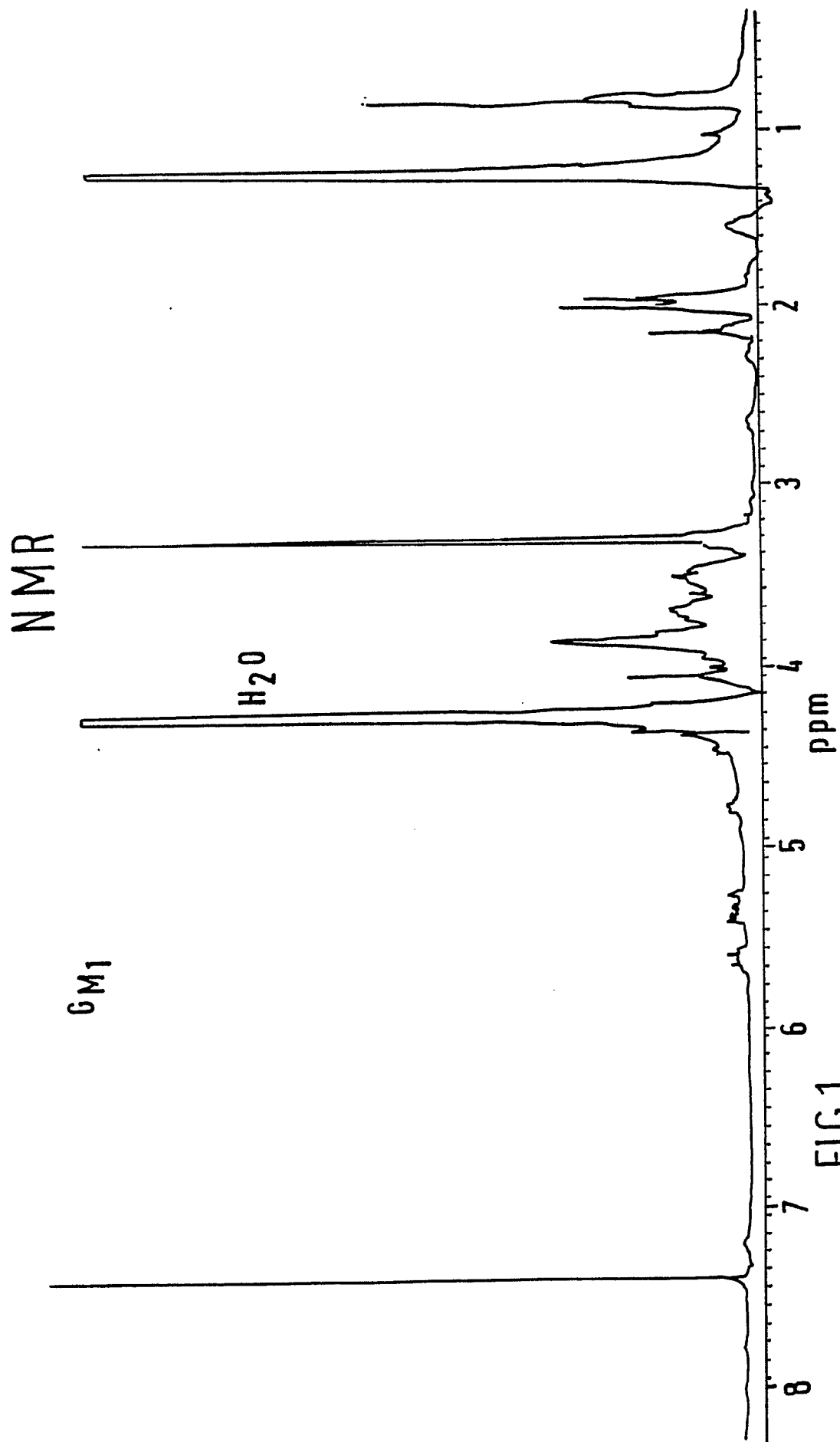


FIG.1

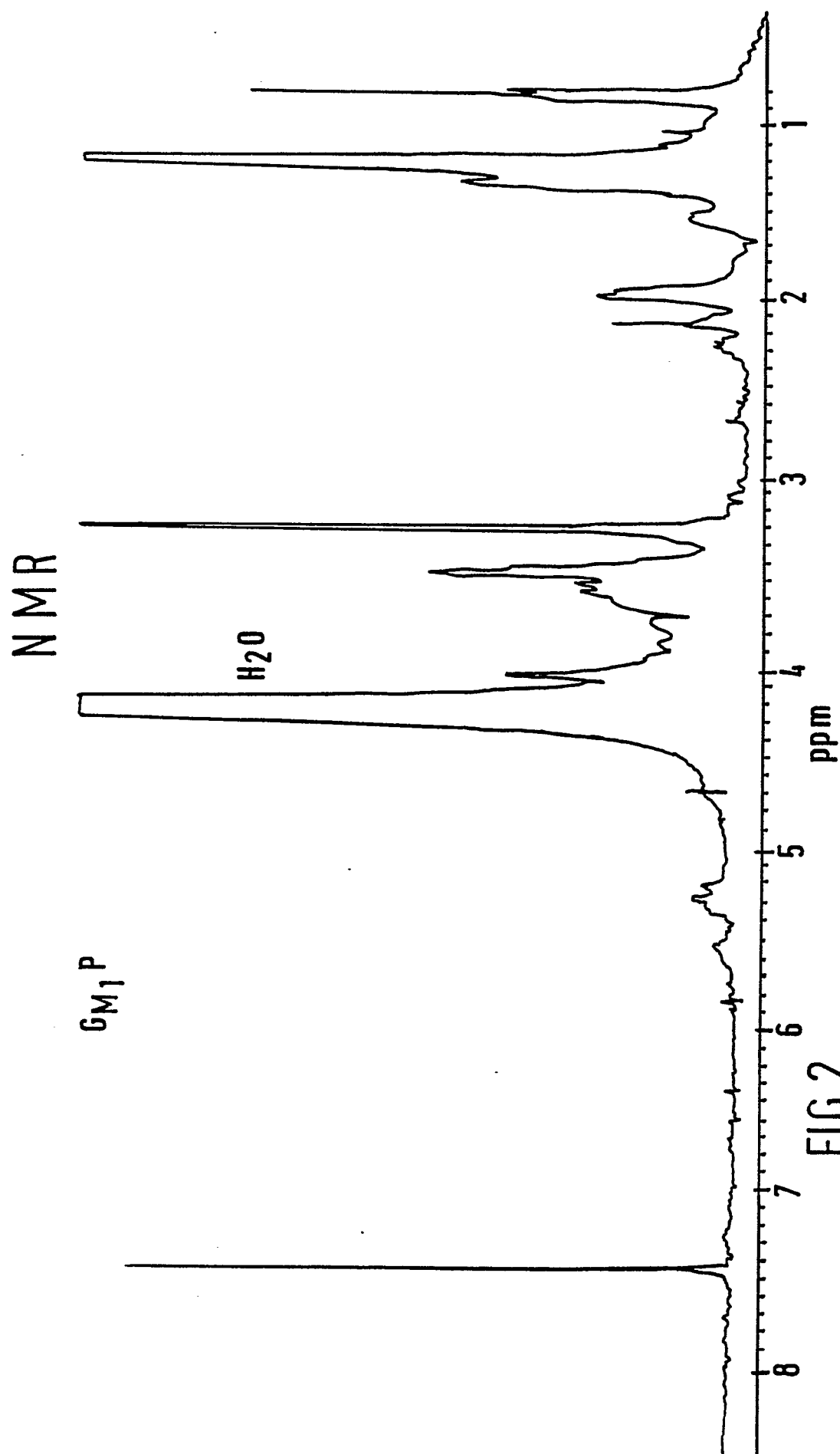


FIG.2

Fordampningsapparat anvendt i Eksempel 3

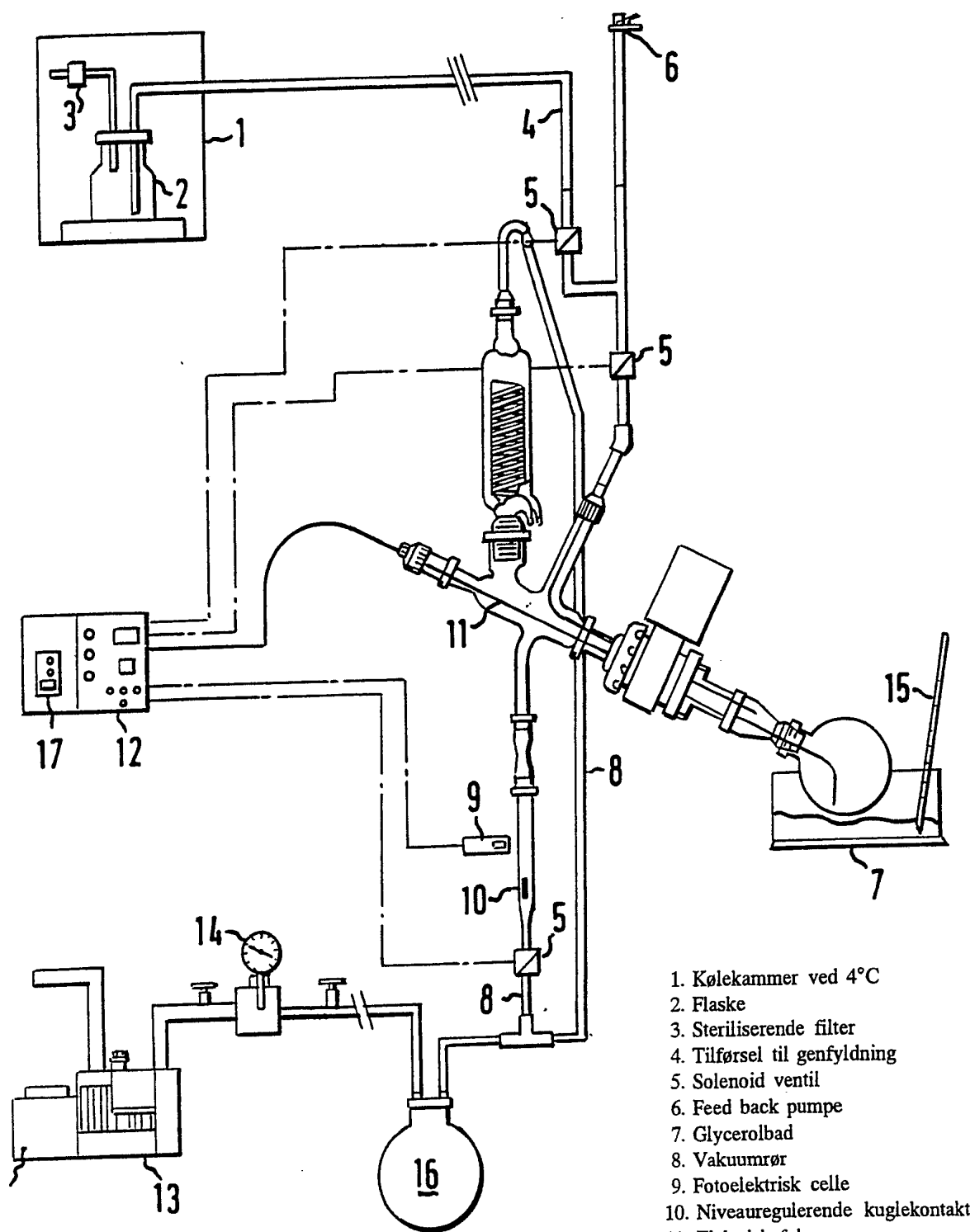


FIG. 3

1. Kølekammer ved 4°C
2. Flaske
3. Steriliserende filter
4. Tilførsel til genfyldning
5. Solenoid ventil
6. Feed back pumpe
7. Glycerolbad
8. Vakuumrør
9. Fotoelektrisk celle
10. Niveauregulerende kuglekontakt
11. Elektrisk føler
12. Temperaturstyringssystem
13. Edwards højvakuumpumpe
14. Vuotometer
15. Thermometer
16. Drænkolbe
17. Styling af solenoid ventil