

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 N.º de publicación: ES 2 052 942

51 Int. Cl.⁵: A61K 35/78

12

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **89401191.5**

86 Fecha de presentación : **26.04.89**

87 Número de publicación de la solicitud: **0 352 146**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **24.01.90**

54 Título: **Regulador biológico extraído de ginkgo biloba, activo en diversas patologías.**

30 Prioridad: **19.07.88 FR 8809738**

73 Titular/es: **Abraxas Bio Labs S.A.**
231, Val des Bons Malades
L-2121 Luxembourg-Kirchberg, LU

45 Fecha de la publicación de la mención BOPI:
16.07.94

72 Inventor/es: **Beljanski, Mirko**

45 Fecha de la publicación del folleto de patente:
16.07.94

74 Agente: **Ungría Goiburu, Bernardo**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (artº 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

La presente invención tiene por objeto un nuevo producto, extraído de las hojas del árbol *Gingko Biloba* y para uso como regulador biológico activo en diversas patologías. Para comodidad de exposición, este producto se denominará BIOPARYL en la descripción y las reivindicaciones. No es una marca, es un nombre propuesto para designar este producto.

Descripción de la técnica anterior

El documento EP-A-O 086 315 describe un procedimiento de extracción de un producto vaso activo a partir de las hojas verdes de *Gingko Biloba*. El procedimiento de extracción incluye las etapas siguientes:

- agotamiento mediante un disolvente hidrocarbonado,
- recogida del insoluble,
- extracción mediante un disolvente cetónico acuoso,
- separación de la fase orgánica,
- adición de sulfato de amonio y de una cetona alifática insoluble en agua,
- separación de la fase cetónica,
- concentración,
- dilución mediante un alcohol acuoso,
- adición de un ácido mineral u orgánico acuoso,
- tratamiento de esta solución ácida mediante un polímero insoluble de vinilpirrolidona previamente purificado,
- separación del polímero por filtración o centrifugación,
- neutralización del filtrado o sobrenadante, y
- secado.

El documento FR-A-2.132.761 describe otro procedimiento de extracción de un producto vaso activo a partir de las hojas verdes de *Gingko Biloba*. El procedimiento de extracción incluye las etapas siguientes:

- extracción por medio de una cetona o de un alcohol alifático inferior, a una temperatura de aproximadamente 40 a 100°C,
- extracción del extracto obtenido por medio de un disolvente lipófilo no miscible en agua a una temperatura de aproximadamente 15 a 50°C,
- reacción del extracto hidratado con sulfato de amonio,
- extracción de la solución por medio de la metilcetona,

- evaporación del extracto de metilcetona,
- dilución en un alcohol alifático inferior eventualmente hidratado,
- tratamiento de la solución alcohólica así obtenida con un compuesto de plomo, o una poliamida pulverulenta de peso molecular elevado,
- eliminación respectivamente del precipitado así formado o de los residuos sólidos,
- concentración del filtrado o de la solución alcohólica.

Breve descripción de la invención

El mantenimiento celular y luego la división de la célula exigen la reproducción del genoma (ADN), luego la transcripción de éste en diversos ARN, los ARN-mensajeros, dirigiendo estos últimos a su vez la síntesis de las proteínas. La extrema complejidad del medio biológico permite a los enzimas presentes asegurar el conjunto de estas funciones.

La patología puede resultar de alteraciones o de degradaciones de los elementos en causa en una u otra de estas etapas. Además, factores endógenos o exógenos pueden igualmente afectar al desarrollo de estas diversas etapas. Pero a la inversa, un desajuste, un estado patológico pueden ser mejorados por la introducción en el sistema biológico de entidades que actúan directa o indirectamente, pero siempre de forma selectiva, sobre el ADN, sobre los ARN o los enzimas.

Un material ha sido preparado y denominado "BIOPARYL". Este desempeña un papel importante en la regulación de ciertos enzimas, las ribonucleasas en particular pero igualmente otras, enzimas implicadas en los mecanismos fundamentales del funcionamiento de los genes. Actúa a diferentes niveles celulares, siempre de modo selectivo sobre lo que es patológico, enzimas desajustadas, ADNs de células dañadas o incluso cancerosas. Su modo de preparación es original así como su campo de aplicación.

El Bioparyl se obtiene a partir de hojas doradas del árbol *Gingko Biloba*, recogidas a finales del otoño. Se trata de una preparación estandarizada que incluye varias etapas: extracción del principio contenido en las hojas mediante varias horas de ebullición en presencia de agua. Concentración del extracto. Hidrólisis en caliente, neutralización parcial, centrifugación y fraccionamiento sobre columna de cromatografía. Solo una sub-fracción del extracto inicial constituye el Bioparyl. El Bioparyl está desprovisto de efectos tóxicos o secundarios, tanto a nivel celular como en el animal. Puede ser utilizado durante largos períodos de tiempo con el fin de mejorar diversas patologías. Está libre de efectos sobre la tensión arterial habituales a los demás productos preparados por otros métodos a partir de hojas del mismo árbol.

El Bioparyl es muy eficaz en el tratamiento o en la prevención de la fibrosis de diversos tejidos u órganos producida bien sea por causa desconocida o como consecuencia de diferentes tratamientos: rayos, medicamentos (bleomicina). Puede

curar las fibrosis ya producidas por estos agentes. Tiene un cierto poder específico contra las células tumorales. Normaliza también el porcentaje de las gammaglobulinas demasiado elevado, que se acumulan en ciertas enfermedades inflamatorias, enfermedades auto-inmunes o enfermedades virales, tal como el Síndrome de Inmuno Deficiencia (SIDA).

En los pacientes aquejados de enfermedades malignas (cánceres sólidos, cánceres de la sangre o de la linfa), se detectan prácticamente siempre anomalías cuantitativas y/o cualitativas de la actividad de las ribonucleasas (RNasas). El Bioparyl normaliza el funcionamiento y el porcentaje de estas enzimas, lo cual tiene por consecuencia mejorar el estado general del enfermo y obstaculizar la aparición de elementos necesarios para el desarrollo de la patología.

Dibujos

La fig. 1. Actividad in vitro de las RNasas del plasma de personas sanas o portadoras de cáncer sobre los ARN radioactivos ribosómicos y de transferencia (ARN-r y ARN 4 S).

Las fig. 2 y 3. Efecto del BIOPARYL sobre las actividades de las RNasas del plasma de enfermos portadores de diferentes patologías.

La fig. 4. Ausencia de efecto del BIOPARYL sobre las RNasas del plasma de los sujetos sanos.

La fig. 5. Acción del hierro sobre la actividad de las RNasas en un sujeto aquejado de cáncer y en una persona sana.

Acción del BIOPARYL

La fig. 6. Acción normalizadora del BIOPARYL sobre las RNasas plasmáticas en los sujetos portadores de cánceres.

La fig. 7. Actividad de las RNasas de la piel humana fibrosada.

Acción del hierro y del BIOPARYL.

La fig. 8. Estimulación por el BIOPARYL de la síntesis in vitro del ADN de la piel sana. Buena acción inhibidora sobre la del melanoma, y

La fig. 9. Inhibición de la síntesis de ADN de las células cancerosas.

En el otoño, se recogen, justo en el momento de su caída, las hojas doradas del árbol Gingko biloba (también llamado a veces Ginkgo). Las mismas pueden bien sea congelarse o secarse.

De cinco a siete kilos de hojas congeladas (o aproximadamente 2,5 - 3 kg de hojas secas) se recubren con agua corriente (aproximadamente 7-8 litros) y el conjunto se lleva a ebullición durante 3 a 4 horas. El líquido se extrae y luego se concentra en 1 litro. (se realiza una segunda ebullición de las hojas y el líquido procedente de esta segunda extracción servirá para la primera extracción de un nuevo lote de hojas).

Para 1 litro de líquido concentrado, se adiciona ácido clorhídrico concentrado con el fin de disponer de una concentración de ácido de 1 N final. La mezcla se lleva entonces a 100°C durante 30 min. Cuando la temperatura ha bajado a aproximadamente 50°C, el pH se lleva a aproximadamente 3 o 4 (mediante adición de KOH o NaOH). Una centrifugación rápida (de 5-7 min a 6000 vueltas/min) es realizada. Una cantidad muy importante de material "hidrolizado" insoluble se elimina entonces. El sobrenadante (líquido de color castaño-rojizo) es el único que se conserva

y utiliza bien sea directamente, o se congela. Este material se denomina ZAC.

Se depositan de 200 a 300 g de ZAC (aproximadamente 300 -400 ml, en peso seco determinado sobre 0,5 ml) en la parte superior de una columna de Sephadex (R) G-25 fina (70 cm x 7 cm) previamente hinchado y equilibrado con agua desmineralizada.

La elución se realiza con la ayuda de agua desmineralizada, desde el comienzo de la elución al final de la parte fluorescente de color blanco-amarillo (visible con luz ultravioleta); los eluatos se juntan y concentran bien sea por destilación o por ebullición bajo aire comprimido, lo cual es un medio rápido. Cuando el eluato se ha concentrado en aproximadamente 1 litro, el pH se ajusta en aproximadamente 7,0 y la cantidad de material se determina por pesaje de peso seco de una cantidad alicuota.

El peso total dividido por 30 proporcionará el número de cada enfermo que puede utilizar durante 30 días (1 mes) 0,5 g x 2 cada día de BIOPARYL. O sea A es el número de enfermos.

El líquido se concentra entonces de nuevo a aproximadamente 500 ml luego se absorbe sobre polvo de celulosa (Whatman (R) CF1) y se seca en un horno (60 - 80°C) durante varias horas. El material debe ser mezclado de vez en cuando con el fin de evitar la formación de grumos.

Una vez seco, el polvo se pulveriza, se pesa y este peso dividido por la cifra A proporciona el peso de la mezcla a distribuir para un mes en 60 cápsulas (2 cápsulas/día), o sea 2 x 0,5 g de BIOPARYL/día).

El eluato de la columna, concentrado a 500 ml (pH 7,0) es soluble en agua. Este BIOPARYL, preparado según la técnica que acaba de describirse ha sido utilizado en todos los ensayos descritos a continuación. Sin embargo, para reacciones finas, la preparación se diluye previamente, se centrifuga de nuevo y se filtra sobre millipore antes de determinar su peso de nuevo.

Los compuestos que se encuentran en las hojas de Gingko Biloba han sido estudiados por diversos autores. Sin embargo, tanto el método de preparación como las aplicaciones difieren totalmente. El método difiere en la elección del material (hojas doradas y no verdes), en el líquido de extracción (aquí agua y no disolventes como siempre se ha descrito en la literatura), por la hidrólisis que elimina muchos compuestos no deseables, por la centrifugación una vez que el pH haya sido ajustado, que elimina aún una gran parte de material y luego por la selección sobre columna. Aquí también, una importante parte del material inicial se elimina de lo que constituirá el BIOPARYL (cuando se realiza en la columna de Sephadex (R) se lava con sosa (0,1 N 300 ml) luego con agua hasta que a un pH neutro se observa que una parte muy importante de material quedaba en la columna. Lavada de este modo la columna puede servir de nuevo).

Extractos de hojas verdes de Gingko Biloba adicionados con otras sustancias, se encuentran en el comercio y están destinadas para modificar la circulación arterial, capilar o venosa, o para mejorar la circulación en el cerebro. Todos estos preparados presentan contra-indicaciones que pa-

recen no existir para el Bioparyl del cual una dosis en cantidades mucho más importantes (hasta 2 g/día durante semanas) no ha permitido descubrir la menor variación o alteración del estado del paciente.

La dificultad de análisis de los diversos compuestos que se encuentran en las hojas del árbol *Gingko Biloba* es bien conocida. Numerosas firmas farmacéuticas han realizado ensayos en vano y venden una composición estandarizada" de extracto de hojas de *Gingko Biloba*. Es por lo que insistimos muy particularmente sobre el hecho de que nuestra técnica de preparación estandarizada difiere totalmente de la utilizada por las demás firmas farmacéuticas y que las aplicaciones son por si mismas también totalmente diferentes. Es tanto más importante que en el momento actual no existe ningún otro procedimiento para luchar contra la fibrosis o regular la síntesis de diversas enzimas o proteínas, particularmente importantes en enfermedades que, actualmente, ocupan la vanguardia de la actualidad. Además, y aunque nuestra extracto esté completamente desprovisto de efectos secundarios, el Bioparyl tiene un efecto anticanceroso que, sin ser de una actividad muy potente, contribuye sin embargo a mantener y recuperar un estado de salud, deficiente en los animales portadores de cáncer.

Ejemplo 1: *Acción del Bioparyl sobre las RNAsas*

Las personas aquejadas de diversos cánceres presentan muy generalmente anomalías a nivel de la actividad de las RNAsas de su plasma. El Bioparyl tiene un fuerte efecto regulador, in vitro como in vivo, es decir que conduce la actividad de las RNAsas del plasma a unas actividades próximas a las encontradas en las personas sanas. En función del tiempo, un enfermo que toma regularmente Bioparyl normaliza la actividad de sus ribonucleasas. El efecto permanece después de que el tratamiento mediante Bioparyl haya sido suspendido.

La sangre periférica se extrae sobre citrato de sodio (10 mg por 5 ml de sangre) con el fin de evitar la coagulación de la sangre sin interferir con la actividad de los enzimas. Después de la centrifugación, el plasma se extrae cuidadosamente, sirviendo de fuente de ribonucleasa. El plasma se utiliza después de dilución (10 veces) con la ayuda de tampón Tris-Hcl $10^{-3}M$, pH 7,60 y el porcentaje de proteínas determinado (Biuret).

El Bioparyl disuelto en agua destilada (pH 7,0,5 mg/ml) es utilizado (0,01 a 0,05 ml). El medio de incubación (0,15 ml final) contiene: 0,05 ml de tampón Tris-Hcl $10^{-2}M$ (pH 7,60); 0,05 ml de 3H -ARN (ARN-r o ARN 4 S, 100 μg , 15000 CPM); 0,01 a 0,05 ml de la dilución al 1/10 de plasma. Después de la incubación a 36°C durante 10 minutos (baño maría), condiciones generalmente necesarias pero que pueden variar en caso de necesidad, la reacción se detiene mediante adición de 3 ml de ácido tricloracético (ATC) al 5%, los tubos se enfrían con el fin de asegurar una buena precipitación de las proteínas y del ARN (3H) no degradado. El precipitado filtrado sobre millipore de vidrio (GF/C (R), Whatman (R)) se lava mediante el ATC al 5% luego mediante alcohol etílico de 95°, los filtros se secan y la ra-

dioactividad se determina en un contador de centelleo. Los resultados se expresan en porcentaje de ARN radioactivo no degradado. (tomándose la radioactividad del ARN intacto como 100%).

La figura 1 muestra que la RNasa del plasma de un enfermo aquejado de cáncer de senos degrada fuertemente el ARN ribosómico (ARN de larga cadena), mientras que dicha degradación no se observa con el ARN 4 S (ARN de cadena corta). En la figura 1, se aprecia que en el sujeto sano el ARN de cadena larga está mucho menos degradado que por la enzima del sujeto canceroso.

De un modo general, las actividades de las RNAsas de los sujetos portadores de cáncer se encuentran altamente aumentadas, lo cual estimula el catabolismo, debilita al enfermo y participa en el mantenimiento del estado canceroso. Tal y como están las cosas, no se puede decir si este aumento de las RNAsas se debe a un porcentaje más elevado de estos enzimas (sobreactivación de los genes correspondientes) o a la presencia de un metal por ejemplo, que acelera estas actividades.

El Bioparyl inhibe in vitro la actividad de las RNAsas demasiado activas del plasma de los enfermos (Fig. 2 y 3), pero es inactivo sobre la RNasa del plasma de las personas sanas (Fig. 4). Esto indica bien sea que los enzimas son diferentes, o que existan cofactores particulares que permitan la selectividad de acción del Bioparyl, fenómeno extremadamente importante.

Ejemplo 2. *Efecto del hierro y papel del Bioparyl sobre la actividad in vitro de las RNAsas*

El hierro férrico acelera fuertemente la actividad in vitro de las RNAsas de los sujetos aquejados de cáncer (enfermos aquejados de leucemia, cánceres sólidos (de hígado en particular), de enfermedades auto-inmunes (poliartritis, trombope-nias) y en ciertas patologías virales, SIDA por ejemplo). Pero el hierro esta inactivo sobre la actividad in vitro de las RNAsas del plasma de los sujetos sanos. Figura 5. Se sabe que las RNAsas pueden proporcionar ARN cebadores necesarios para la replicación de los ADN y que los cebadores aceptados por los ADN de los tejidos sanos no son los mismos que los cebadores necesarios para la replicación de los ADN de tejidos cancerosos. Por este motivo, la regulación de las RNAsas es un fenómeno capital en cancerología y en virología. El Bioparyl, por su comportamiento en regular lo que está perturbado y ello solamente, incluso en presencia de hierro, es un agente de normalización extremadamente nuevo e importante.

Ejemplo 3: *Normalización in vivo de las RNAsas plasmáticas de un sujeto aquejado de cáncer y que toma regularmente Bioparyl.*

En los casos de cánceres sólidos o en los leucémicos (leucemia mieloide crónica en particular) sometidos o no a la quimioterapia, el Bioparyl, administrado por vía oral (1 g/día cada día) corrige, con el tiempo, la actividad perturbada a partir de las RNAsas de la sangre circulante y aproxima sus valores a los observados en los sujetos sanos.

La figura 6 muestra en función del tiempo la normalización de la actividad de las RNAsas plasmáticas en dos sujetos portadores de dos tipos diferentes de cáncer (detención del tratamiento 3 días antes del análisis).

Ejemplo 4: *fibrosis radiativa . Estudio in vitro.*

Una extracción de piel fibrosada por los rayos ha sido machacada en un mortero (4°C) en presencia de tampón Tris-HCl 0,02 M conteniendo 0,06 M de KCl y 0,001 M de MgCl₂. Volumen final: 1,5 ml. La actividad de las RNAsas contenidas en este extracto ha sido ensayada con respecto al ARN 4 S y con respecto al ARN ribosómico (ARN-r); 0,01; 0,02; 0,03 y 0,04 ml de extracto enzimático se incubaron en presencia de ARN radioactivo ³H-ARN-r o ³H 4S ARN. Tiempo de incubación: 15 min a 36°C. Los resultados se ilustran en la figura 7. La degradación de los ARN marcados es lineal en función de las diversas concentraciones de extracto. El ARN-r se degrada más rápidamente que el ARN 4 S. El Bioparyl inhibe fuertemente pero no totalmente la degradación in vitro del ARN-r. El hierro férrico (FeCl₃) de escasa concentración estimula la degradación del ARN-r pero a fuertes concentraciones lo inhibe. Por motivos de ética, no se ha utilizado la piel normal de un sujeto humano. Pero el Bioparyl no actúa sobre la RNasa de la piel normal de pequeños corderos.

Acción del Bioparyl sobre el ADN de la piel

El Bioparyl estimula la síntesis in vitro del ADN de la piel sana de los pequeños corderos así como la del ADN aislados de la piel de ratoncillos.

El ADN de la piel sana de animales jóvenes se separó por el procedimiento descrito en Experimental Cell Biol. 49 : 220 -231 (1981) que proporciona igualmente el método utilizado para la síntesis in vitro del ADN. La figura 8 muestra que el Bioparyl estimula fuertemente la replicación del ADN de la piel sana. Es completamente destacable observar la muy buena inhibición de la síntesis in vitro del ADN aislado del melanoma del ratón en presencia de concentraciones muy fuertes de Bioparyl (melanoma B 16 F 10 puesto a nuestra disposición amablemente por la Sra. Poupon del Institut Gustave Roussy).

Acción in vivo del Bioparyl sobre la fibrosis

Las lesiones post-radiativas han sido tratadas en sujetos que han experimentado radioterapia, por el Bioparyl. La dosis oral fue de 0,5 g x 2/día durante varias semanas. La eficacia es segura sobre todo en las fibrosis cutáneas, musculares (pericardio del corazón) o mucosas. Se obtiene un 83% de respuestas objetivas en las fibrosis cutáneo-mucosas post -radiativas. Las pericarditis fibrosas pueden ser eficazmente curadas por el Bioparyl. Cuando la fibrosis es de "menos de un año", se obtiene un 71% de respuestas objetivas. El efecto dosis no ha sido aún determinado.

Ejemplo 5 *El bioparyl corrige el porcentaje de las γ - e inmunoglobulinas elevado en los portadores del virus del SIDA o en los enfermos aquejados de enfermedades auto-inmunes.*

Algunas patologías (SIDA, poliartritis, esclerosis u otras enfermedades) inducen porcentajes anormalmente elevados de diversas inmunoglobulinas (IgM, IgG, etc.), lo cual es nefasto para el equilibrio inmunitario. La toma de Bioparyl por vía oral (1 g/día cada día) permite observar en 3-5 semanas de tratamiento una baja del porcentaje de globulinas. Se observa una mejora clínica inmediata que se continúa a todo lo largo del tratamiento por el Bioparyl. Los resultados

se ilustran en la tabla 1, que presenta el papel del Bioparyl en la normalización del porcentaje de las gamma-globulinas e inmuno-globulinas en dos casos de enfermedades auto-inmunes y en un caso de SIDA.

5 TABLA I

Ejemplo I: *enfermos aquejados de enfermedades auto-inmunes*

Días	Inmunoglobulinas M (IgM)	
	gramo/litro	
	Enfermo A	Enfermo B
d.O	5	9 (N =,65-2,10)
Bioparyl		
d.40	2	-
d.60	-	3

10 Ejemplo II: *paciente aquejado de sida-positivo antes y después del tratamiento mediante Bioparyl*

Días	P. de	P. de	P. de
	γ -glo- bulinas	IgG	albú- mina
	%	%	%
d.0	27,7 (N=12-18)	24,5 (N=7-14)	49 (N=52-60)
Bioparyl			
d.15	21	21,8	62
d.25	20	19,5	60

Siendo: P. Porcentaje

15 Ejemplo 6 *Inhibición de la síntesis del ADN de las células cancerosas.*

En las condiciones in vitro, el Bioparyl actúa solamente sobre la síntesis del ADN de las células cancerosas (cáncer de senos, de ovarios y de pulmón humanos) sin afectar, en las mismas condiciones que las del ADN de los tejidos sanos (senos, pulmón, rata o médula ósea de los humanos). La iniciación y el alargamiento de la formación del ADN canceroso son detenidos por el Bioparyl, mientras que las del ADN normal no lo son. Figura 9. Esto se demuestra introduciendo el Bioparyl bien sea al comienzo o una vez que la síntesis se haya iniciado, como se describe con detalle en mi solicitud de patente francesa no. 88-08434 del 23 de Junio de 1988 (FR-A -2633182, EP-A-0352147).

In vivo en los ratones: 60 ratones BALB C (30 ♂ y 30 ♀ de 18 g) portadores de células

20 tumorales (linfoma YC8) y 60 Ratones Cdl Swiss (30 ♂ y 30 ♀) portadores de células tumorales

(Ascitis d'Ehrlich) (4 a 6000 células por vía i.p. 48 h antes del comienzo del tratamiento) reciben Bioparyl dos veces por día (2 x 3 mg/día durante 8 días consecutivos, vía i.p.). Los lotes testigo reciben, en lugar de Bioparyl, una solución isotónica de NaCl. La tabla 1 presenta la inhibición de la multiplicación de las células cancerosas en el ratón bajo el efecto del Bioparyl (Ascitis de Ehrlich). Los resultados expuestos en la tabla II muestran un cierto efecto anticanceroso del

Bioparyl que sin embargo, en el hombre y por vía oral, no es suficiente.

TABLA II

Supervivencia de ratones ♂ Swiss portadores de células ascíticas de Ehrlich y tratadas con Bioparyl

Supervivencia (días)	Ratones sin tratar	Ratones tratados con Bioparyl
0	10/10.....	10/10
21	0/10.....	6/10
60	—	4/10
90	—	4/10

Bioparyl: 2 x 3 mg/d durante 8 días consecutivos vía intraperitoneal)

Supervivencia de ratones ♀ Swiss portadores de células ascíticas de Ehrlich y tratadas con Bioparyl

Supervivencia (días)	Ratones sin tratar	Ratones tratados con Bioparyl
0	10/10.....	10/10
24.....	0/10.....	7/10
60.....	—	5/10
90.....	—	5/10

Bioparyl : 2 x 3mg/d durante 8 días consecutivos (vía intraperitoneal)

La tabla III presenta la inhibición de la multiplicación de las células cancerosas en el ratón bajo el efecto del Bioparyl (Linfoma YC8).

TABLA III

Supervivencia de ratones ♂ BALB/C portadores del linfoma YC8 y tratados con Bioparyl

Supervivencia (días)	Ratones sin tratar	Ratones tratados con Bioparyl
0	10/10.....	10/10
25.....	4/10.....	10/10
30.....	0/10.....	5/10
60.....	—	5/10
90.....	—	5/10

Bioparyl: 2 x 3 mg/d durante 8 días consecutivos (vía intraperitoneal)

Supervivencia de ratones ♀ BALB/C portadores del linfoma YC8 y tratados con Bioparyl

Supervivencia (días)	Ratones sin tratar	Ratones tratados con Bioparyl
0	10/10.....	10/10
24.....	3/10.....	9/10
30.....	0/10.....	8/10
60.....	—	5/10
90.....	—	5/10

Bioparyl : 2 x 3 mg/d durante 8 días consecutivos (vía intraperitoneal)

Toxicidad y posología

Toxicidad aguda del Bioparyl: El preparado estandarizado de Bioparyl administrado por vía oral en dosis única a ratones BALB C y Swiss así como a ratas, se ha mostrado no tóxico. En efecto, la DL50 en los ratones es superior a 2000 miligramos por kilogramo. La DL50 en la rata es superior a 3000 miligramos por kilogramo.

Toxicidad crónica: El Bioparyl administrado por vía oral a las dosis de 2000 miligramos por kilogramo dos veces por semana durante tres meses consecutivos no modifica el comportamiento de los ratones que tienen un crecimiento ponderal normal y una prolificidad inalterada. Una dosis de 1000 miligramos por día (vía oral, lo cual corresponde a la dosis activa diaria) durante unos meses es perfectamente tolerada por el ser humano.

Toxicidad aguda por vía intra-peritoneal o intravenosa: (ratón BALB C y Swiss). La DL50 se sitúa en los 1200 miligramos/kg y la dosis tolerada es de 1000 miligramos por kilogramo. 250 miligramos/kg/día durante 2 meses son perfectamente bien tolerados y el desarrollo de los ratones es completamente normal. Una dosis de Bioparyl de 250 miligramos a 800 miligramos por kilogramo, inyectada por vía intravenosa en los ratones Swiss es perfectamente tolerada. En el hombre, dosis orales de 1000 - 3000 miligramos por día y durante meses son bien toleradas; la vía intramuscular puede ser considerada a las dosis de 250 - 1000 miligramos/día y por vía intravenosa 250 - 8000 miligramos por día.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la obtención de una sustancia a partir de hojas doradas de otoño del árbol Gingko Biloba que comprende:

- (1) una extracción mediante agua,
- (2) una concentración del extracto,
- (3) una hidrólisis ácida,
- (4) un ajuste del pH a un valor comprendido entre 3 y 4,
- (5) una centrifugación para recuperar solo el sobrenadante,
- (6) una cromatografía sobre columna con elución mediante agua y selección de las fracciones que tienen una actividad inhibidora enzimática de la ribonucleasa, constituyendo la mencionada sustancia,
- (7) una concentración y un acondicionamiento.

2. Sustancia que puede ser obtenida por el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1.

3. Composición farmacéutica que incluye la sustancia según la reivindicación 2 y un soporte farmacéutico aceptable.

4. Composición según la reivindicación 3, en forma de unidad de dosificado.

5. Unidad de dosificado según la reivindicación 4, que contiene de 0,1 a 3 gramos de la mencionada sustancia.

6. Utilización de una sustancia según la reivindicación 2 para la obtención de un medicamento que está destinado para inhibir la actividad enzimática de la ribonucleasa de un sistema biológico.

7. Utilización de una sustancia según la reivindicación 2 para la obtención de un medicamento que está destinado para inhibir la actividad enzimática de la ribonucleasa de un sistema biológico conteniendo células cancerosas o de vi-

rus en los mamíferos.

8. Utilización de una sustancia según la reivindicación 2 para la obtención de un medicamento que está destinado para inhibir la actividad enzimática de la ribonucleasa de un sistema biológico que contiene células en disfunciones como el hierro sobreactivo.

9. Utilización de una sustancia según la reivindicación 2, para la obtención de un medicamento que está destinado para inhibir la actividad enzimática de la ribonucleasa de un sistema biológico que contiene células cancerosas o de virus en los mamíferos, y destinado para aminorar la formación de blastos en los sujetos leucémicos.

10. Utilización de una sustancia según la reivindicación 2, para la obtención de un medicamento que está destinado para inhibir la actividad enzimática de la ribonucleasa de un sistema biológico que contiene células cancerosas o de virus en los mamíferos, y destinado a frenar el desarrollo de células cancerosas.

11. Utilización de una sustancia según la reivindicación 2, para la obtención de un medicamento que está destinado para tratar mamíferos que desarrollan una fibrosis de ciertos tejidos (producida por un tratamiento físico, químico o por causa desconocida).

12. Utilización de una sustancia según la reivindicación 2, para la obtención de un medicamento que está destinado para evitar el desarrollo de una fibrosis de ciertos tejidos (producida por un tratamiento físico, químico o por causa desconocida).

13. Utilización de una sustancia según la reivindicación 2, para la obtención de un medicamento que está destinado para eliminar una fibrosis instalada en ciertos tejidos (producida por un tratamiento físico, químico o por causa desconocida).

14. Utilización de una sustancia según la reivindicación 2 para la obtención de un medicamento que está destinado a reducir los porcentajes elevados de las gamma-globulinas o de las inmuno-globulinas en los mamíferos.

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

Figure 1

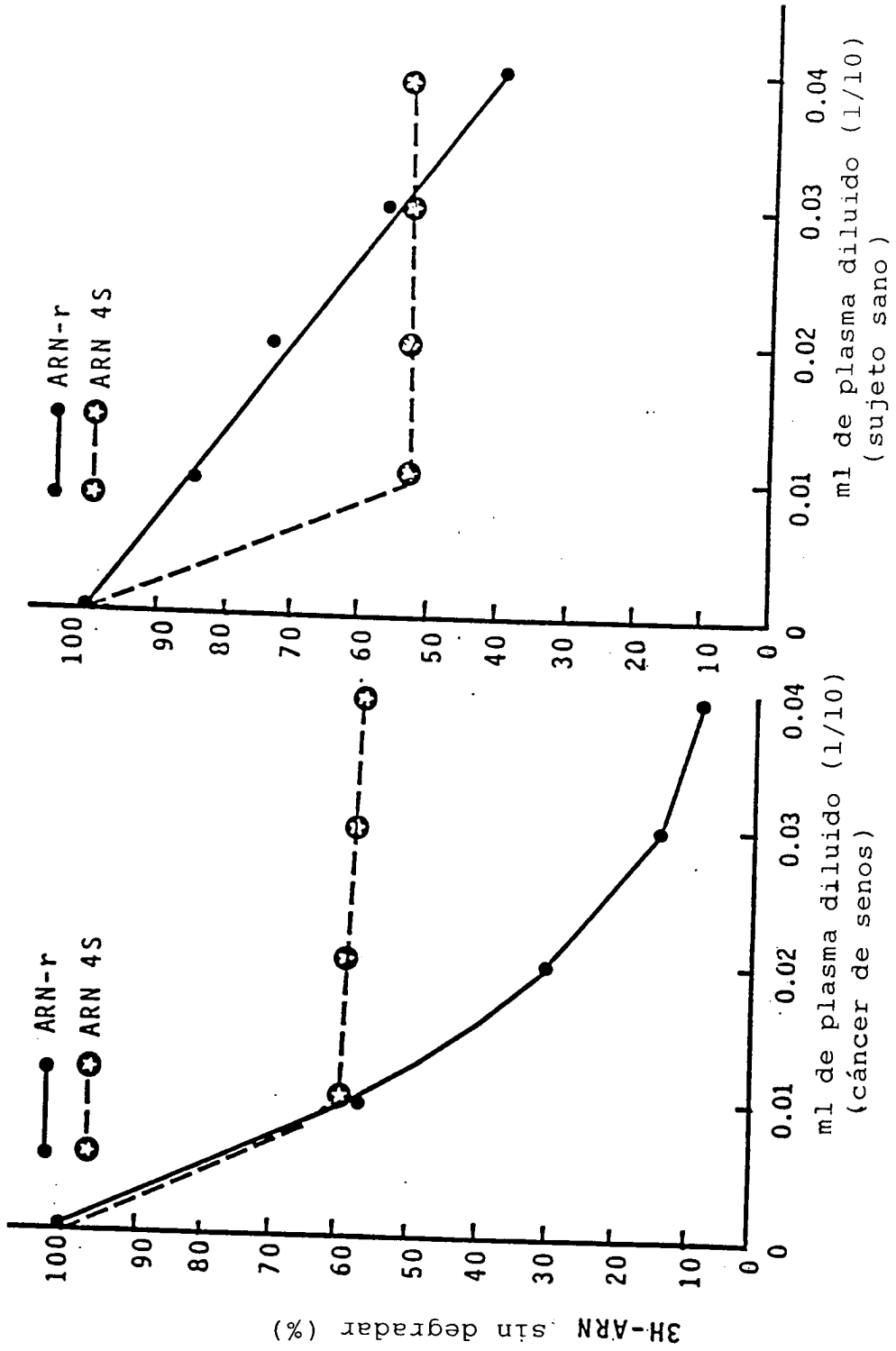


Figure 2

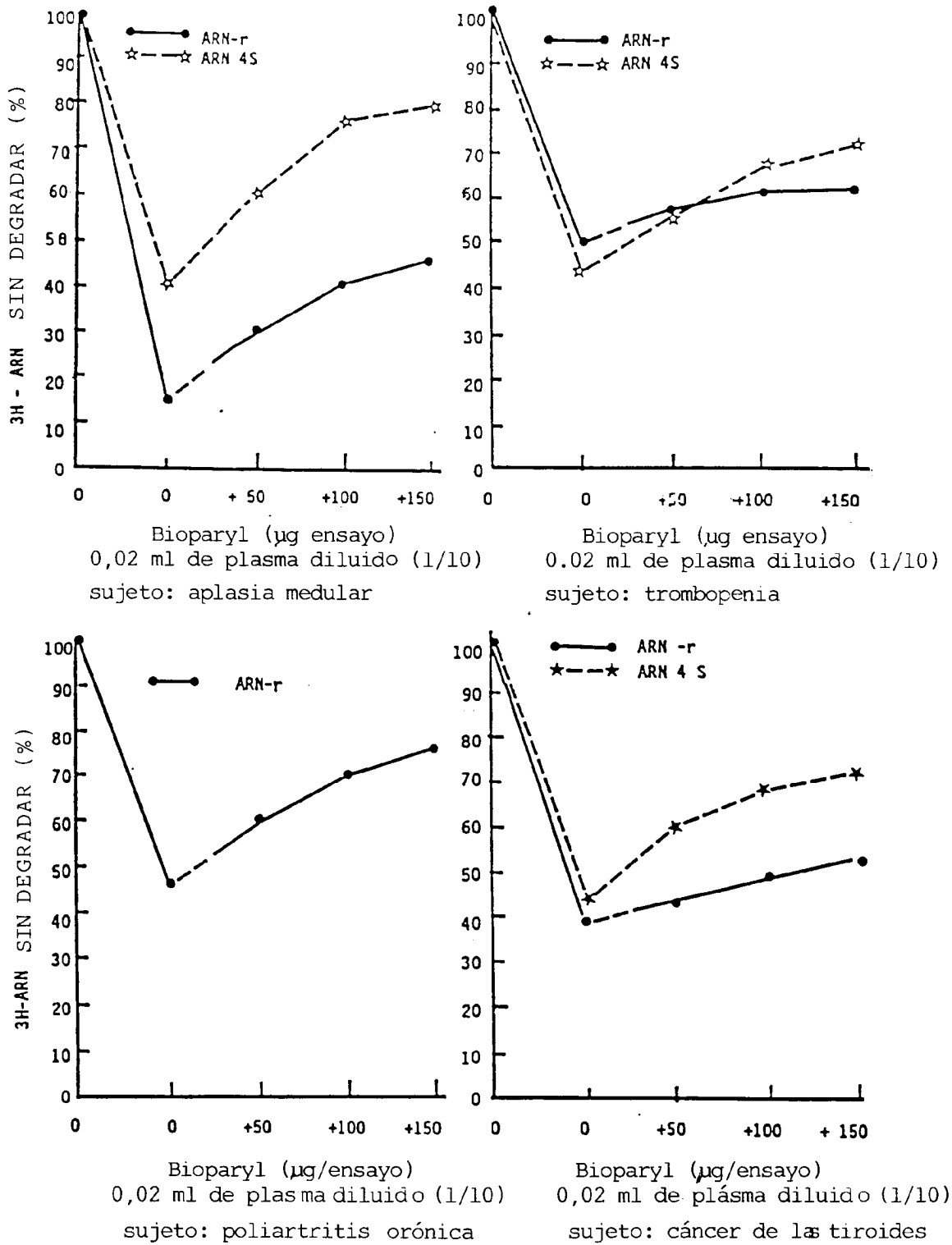


Figure 3

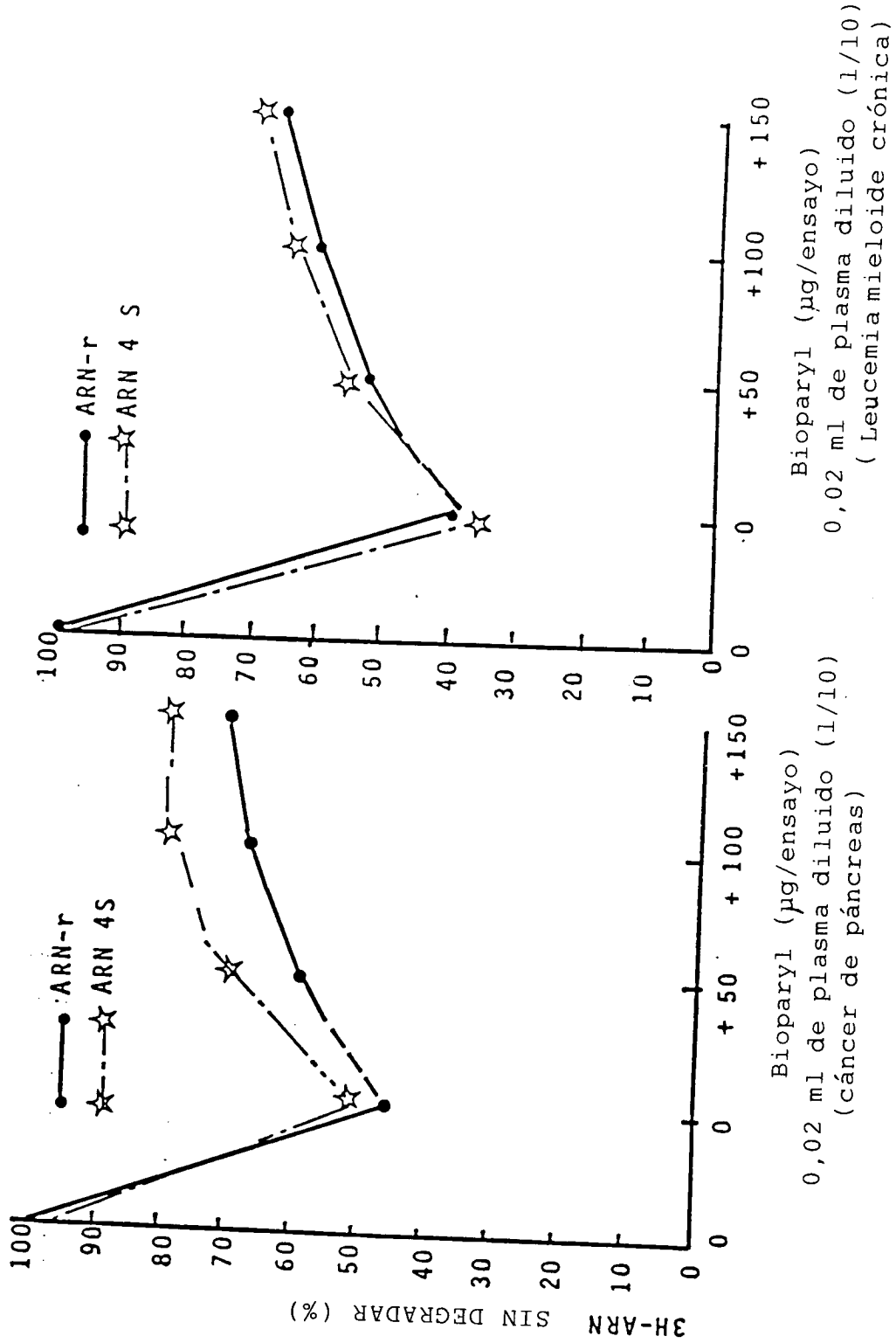
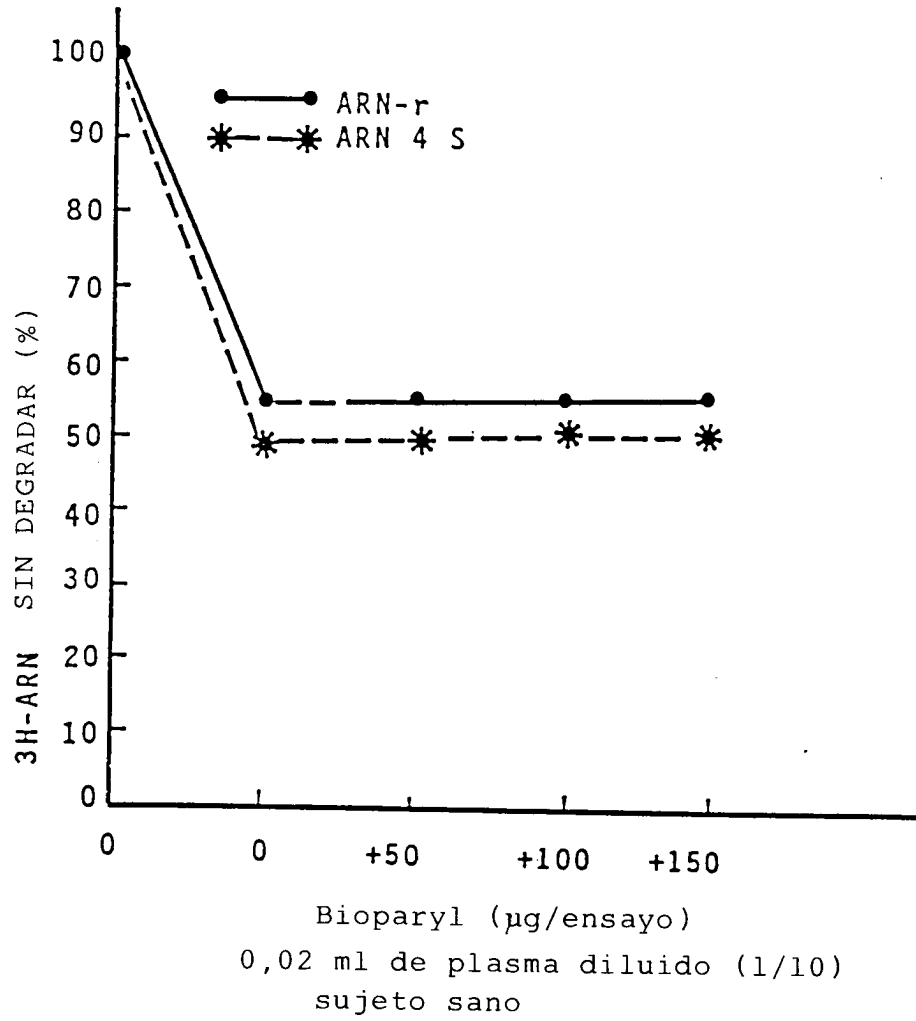


Figure-4



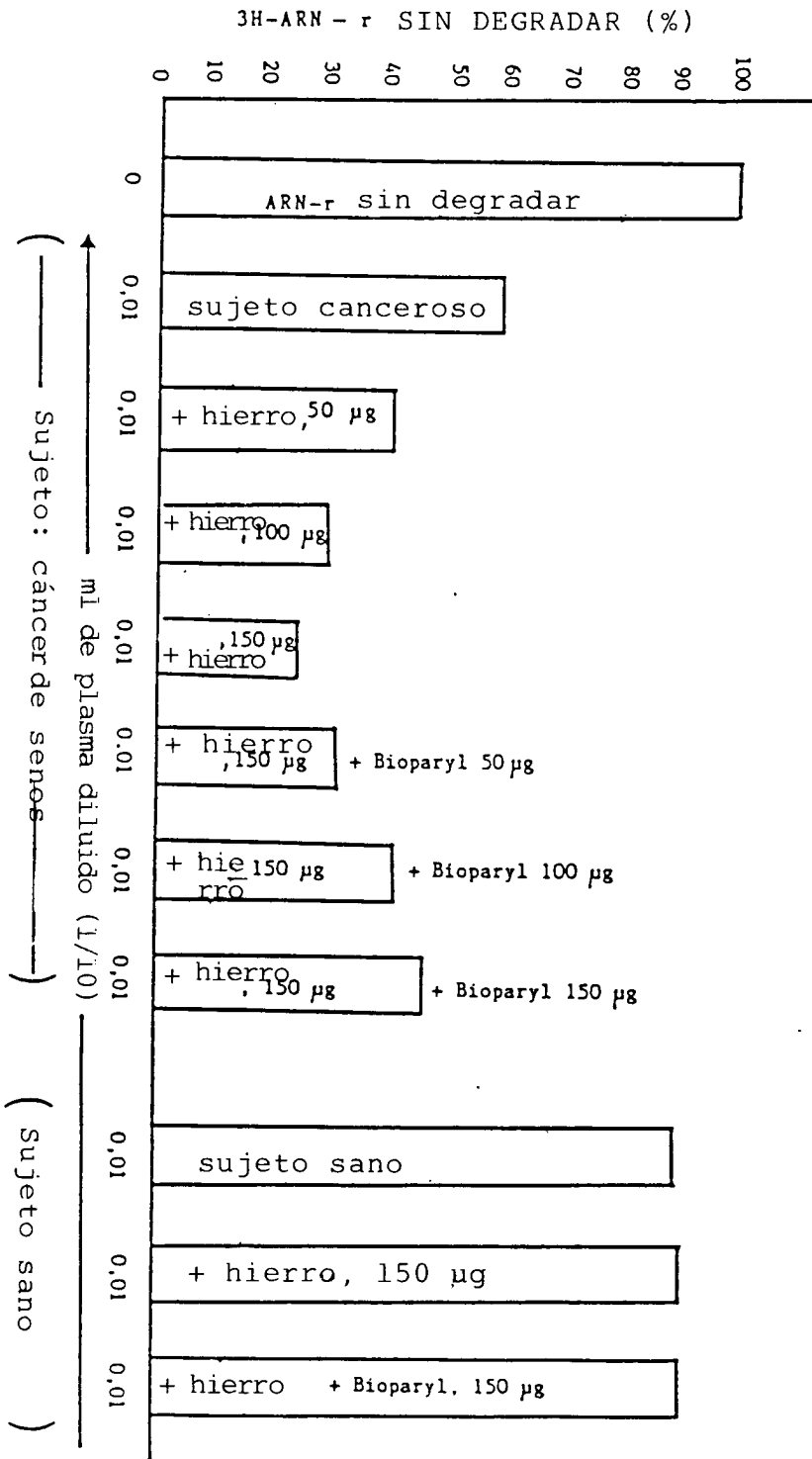


Figure 5

Figure 6

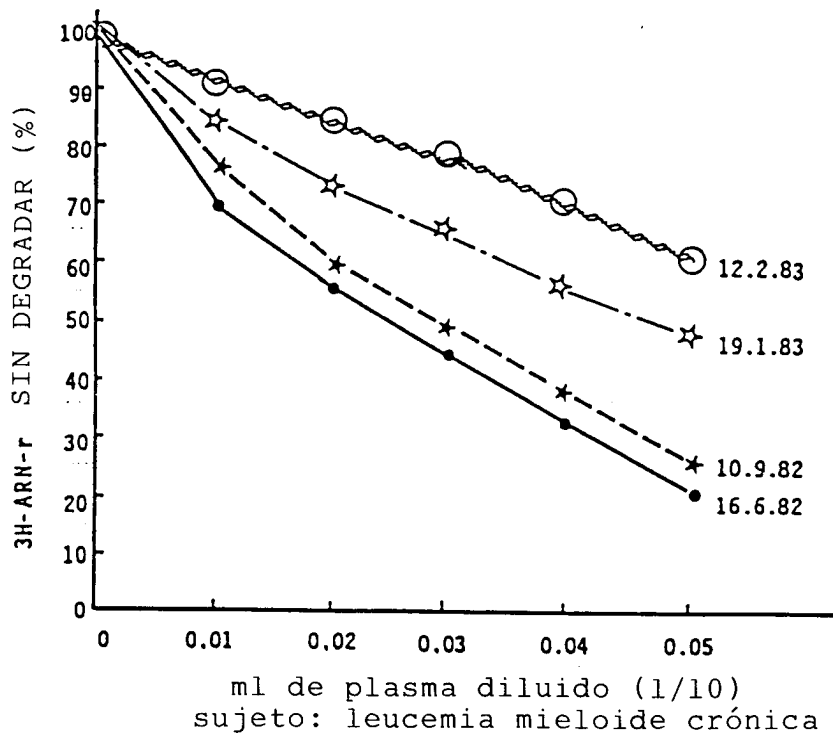
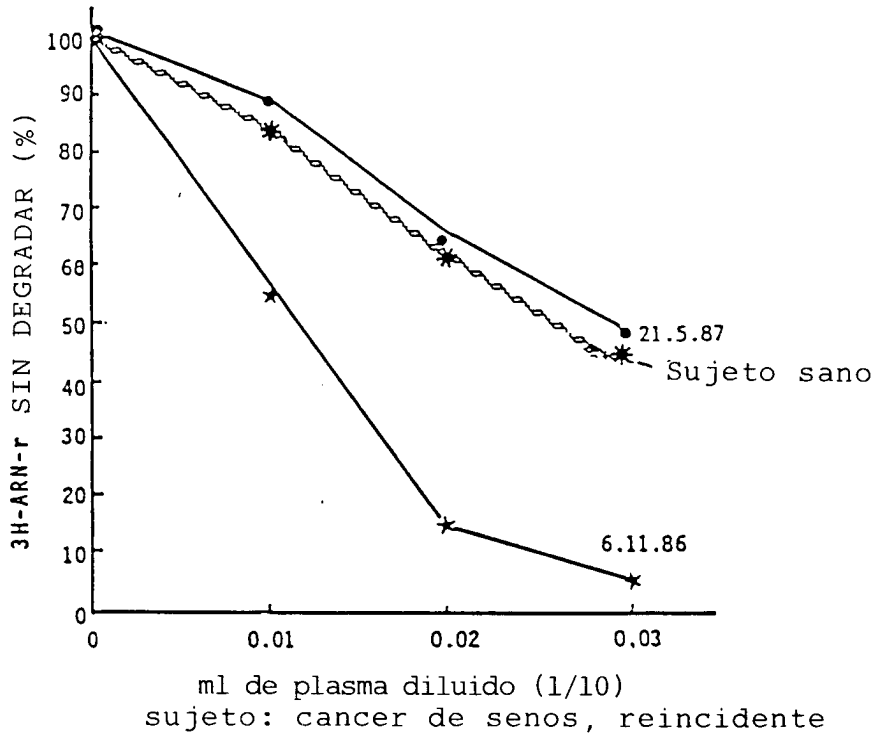


Figure 7

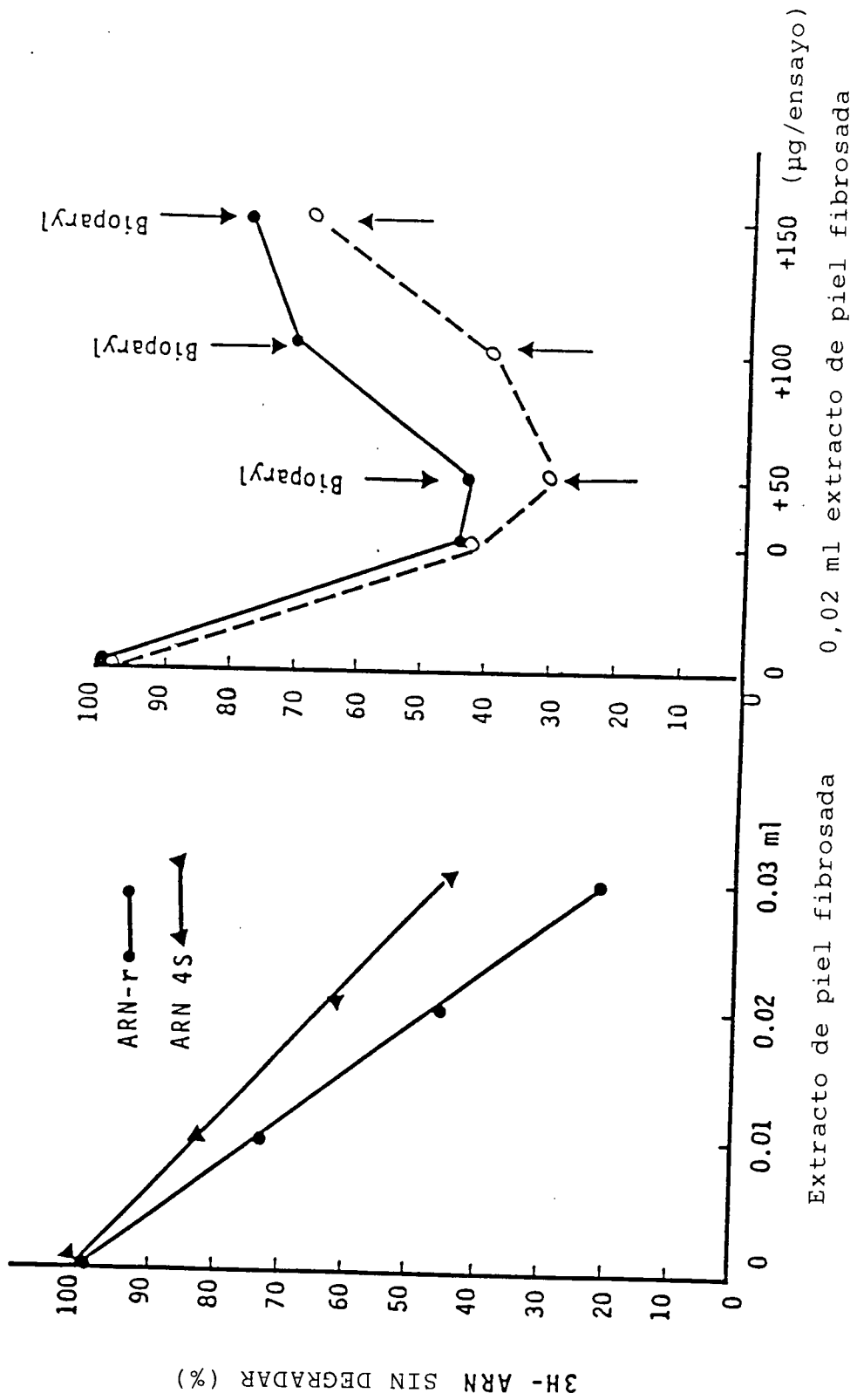


Figure 8

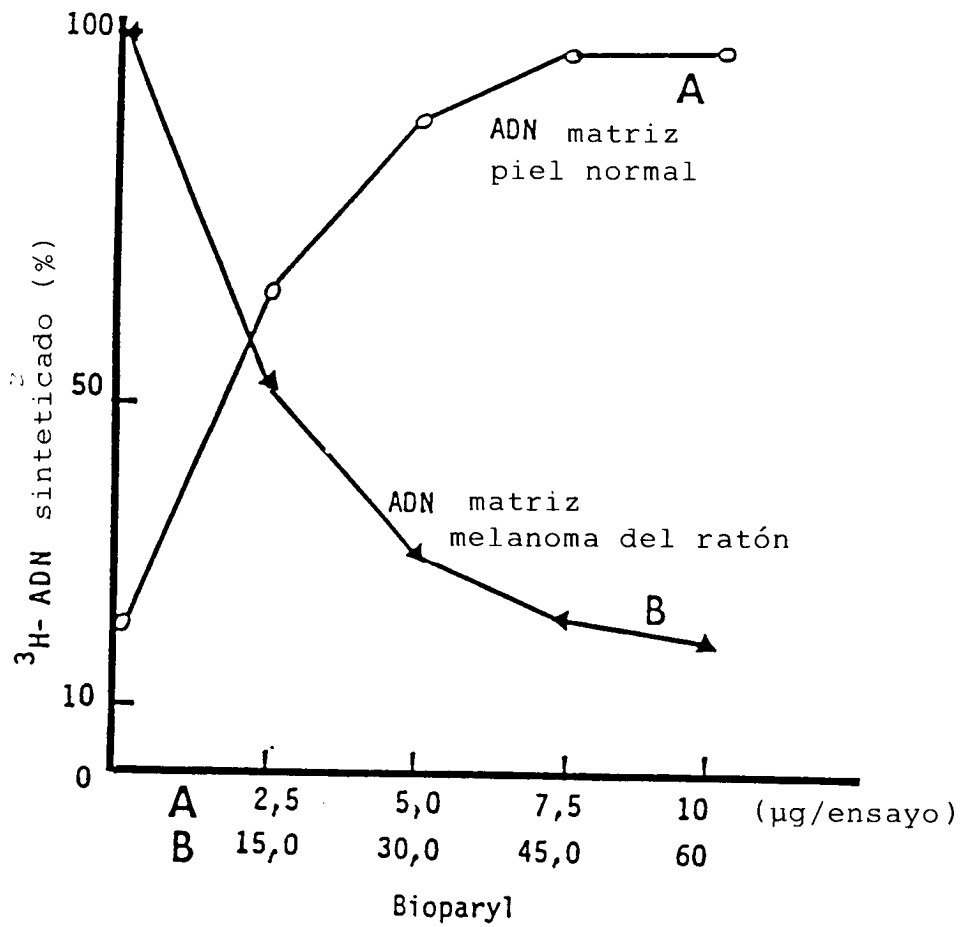


Figure 9

