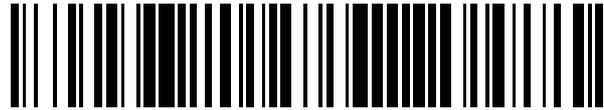


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 347**

51 Int. Cl.:

C07H 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2008 E 08010558 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 2011799**

54 Título: **Proceso para la obtención de monosialogangliósido GM1 puro para su uso médico**

30 Prioridad:

18.06.2007 US 812331

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.08.2015

73 Titular/es:

**LABORATOIRE MEDIDOM S.A. (100.0%)
ENETRIEDERSTRASSE 44
6060 SARNEN, CH**

72 Inventor/es:

**CARLINO, STEFANO y
BUNTER, RENÉ-PIERRE**

74 Agente/Representante:

LÓPEZ CAMBA, María Emilia

ES 2 542 347 T3

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 (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proceso para la obtención de monosialogangliósido GM1 puro para su uso médico

5 La presente invención se refiere al monosialogangliósido GM1 y más especialmente a los procesos para la obtención y la purificación del monosialogangliósido GM1.

ANTECEDENTES

10 Los gangliósidos son una clase de glicoesfingolípidos, que tienen uno o más residuos de ácido siálico y que son encontrados de manera abundante en el tejido cerebral y nervioso de los seres humanos y de los animales. El monosialogangliósido GM1 es conocido por un número de aplicaciones farmacéuticas, especialmente en la reparación y tratamiento de los trastornos de los sistemas nerviosos central y periférico.

15 Los gangliósidos son convenientemente extraídos del tejido cerebral bovino o porcino, de acuerdo con el documento de patente US 4.849.413. Con la finalidad de que sea adecuado para aplicaciones farmacéuticas, el monosialogangliósido GM1 debe ser entonces aislado y purificado.

20 Es conocido el tratar las mezclas extraídas de lípidos mediante métodos químicos o enzimáticos con el fin de transformar otros componentes gangliósidos del monosialogangliósido GM1, con la finalidad de aumentar la producción de monosialogangliósido GM1. Tales métodos incluyen la hidrólisis ácida con un ácido débil, tal y como se describe en el documento de patente CN 1353112 o hidrólisis enzimática usando un sialidasa, por ejemplo tal y como está descrito además en el documento de patente US 5.296.360.

25 La purificación adicional de tal mezcla lipídica mejorada GM1 por cromatografía de exclusión, utilizando un eluyente de cloroformo: metanol: agua 60:30:4.5 está descrita en el documento de patente EP 0 150 712. El documento de patente EP 0 489 352 describe la purificación de una mezcla lipídica mejorada GM1 mediante la ultrafiltración de una solución de la mezcla lipídica con alfa-ciclo-dextrina, seguida de la extracción de GM1 por extracción por solventes con etanol. Está divulgado que puede obtenerse GM1 con una pureza del 95%.

30 Ha sido previamente demostrado que tales procesos tienen desventajas con respecto a la pureza y al rendimiento de GM1 y con respecto al costo, la eficiencia y la efectividad cuando son aplicados a una escala industrial.

35 Para las aplicaciones farmacéuticas es requerido producir el gangliósido GM1 con una pureza alta. Por consiguiente, sigue existiendo una necesidad permanente de procesos con el fin de obtener el gangliósido GM1 de pureza alta.

Los inventores de la presente solicitud han encontrado sorprendentemente que el gangliósido GM1 puede ser separado efectivamente de otros gangliósidos mediante un proceso basado en la cromatografía de intercambio iónico.

40 De acuerdo con la presente invención ha sido encontrado que el gangliósido GM1 puede ser preparado en pureza alta mediante un proceso en donde el GM1 es separado de Fucosyl-GM1 en una mezcla lipídica que contiene el monosialogangliósido GM1 como el principal componente gangliósido por una cromatografía de columna de intercambio iónico utilizando un eluyente que comprende iones de potasio o de cesio.

45 De acuerdo con la presente invención se proporciona un proceso para el aislamiento y la purificación del gangliósido GM1 de acuerdo con la reivindicación 1.

50 De acuerdo con una realización preferente de la presente invención se proporciona un proceso que comprende de manera general los pasos de:

- (a) la separación de GM1 del Fucosyl-GM1 en una mezcla lipídica que contiene el monosialogangliósido GM1 como el componente gangliósido principal mediante la cromatografía de columna de intercambio iónico utilizando un eluyente que incluye iones de potasio o de cesio,
- 55 (b) la recuperación del soluto desde la solución eluyente,
- (c) la diafiltración de una solución acuosa del soluto recuperado,
- (d) la adición de una sal de sodio y la diafiltración de la solución resultante y
- (e) la recuperación de GM1.

60 De forma ventajosa, el proceso de la presente invención permite la preparación del monogangliósido GM1 en pureza alta. De acuerdo con la presente invención el monosialogangliósido GM1 puede prepararse con una pureza superior al 98%, incluso superior al 99,0% e incluso 99,9%.

65 Además, el proceso de la presente invención utiliza de manera ventajosa unos pasos sencillos, es eficiente desde el punto de vista de costes y es adecuado para la aplicación a escala industrial.

Otros objetivos y ventajas de la presente invención serán evidentes de las reivindicaciones y de la siguiente descripción detallada y los ejemplos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

5 La presente invención proporciona un proceso para la purificación del monogangliosido GM1, en donde el GM1 es separado de Fucosyl-GM1 en una mezcla lipídica que contiene monosialogangliosido GM1 como el componente gangliósido principal mediante la cromatografía de columna de intercambio iónico utilizando un eluyente que comprende iones de potasio o de cesio.

10 En una realización preferente es proporcionado un proceso para preparar monosialogangliosido GM1 de pureza alta que comprende los pasos de:

15 (a) la separación de GM1 desde Fucosyl-GM1 en un mezcla lipídica que contiene el monosialogangliosido GM1 como el componente gangliósido principal mediante la cromatografía de columna de intercambio iónico utilizando un eluyente que comprende iones de potasio o de cesio.

(b) la recuperación del soluto de la solución eluida del paso (a),

(c) la diafiltración de una solución acuosa del soluto recuperado del paso (b), con el fin de eliminar las sales residuales de potasio o de cesio,

20 (d) la adición de iones de sodio, preferentemente en la forma de una sal de sodio adecuada, con el fin de desplazar a los iones de potasio o de cesio ligados a GM1 y la diafiltración de la solución acuosa, con la intención de eliminar la sal de sodio residual y

(e) la recuperación de GM1, en la forma de su sal de sodio.

25 La mezcla lipídica puede ser preparada de un extracto crudo lípido de tejido cerebral bovino, ovino, equino o porcino.

De manera ventajosa la mezcla lipídica que contiene el monogangliosido GM1, como el componente gangliósido que prevalece puede prepararse de un extracto lípido que contiene por lo menos un 30%, preferiblemente por lo menos el 50% y más preferiblemente por lo menos el 70% de una mezcla de los gangliósidos. El extracto lípido restante puede estar generalmente compuesto de sulfátidos, cerebrósidos, ácidos grasos y proteínas.

30 El extracto lípido puede ser, de manera ventajosa, sometido en primer lugar a una diafiltración a través de una membrana que tiene un tamaño de poro de 10000 a 100000 Daltons, preferiblemente alrededor de 50000 Daltons, con la finalidad de desalar la solución. Para la diafiltración puede ser utilizada cualquier membrana de diálisis convencional. De forma ventajosa pueden ser utilizadas las cassettes de filtro, por ejemplo, los tipos de cassettes de polisulfona SARTOCON[®] (Sartorius), por ejemplo con un límite de unos 50000 Daltons.

35 Preferentemente el extracto lipídico es sujeto a un tratamiento mediante hidrólisis con el fin de transformar los otros componentes gangliósidos importantes, tales como GT1b, GD1a y GD1b, en GM1 con el fin de aumentar el contenido de GM1.

40 La hidrólisis puede ser llevada a cabo utilizando métodos convencionales. De forma ventajosa, la hidrólisis puede ser llevada a cabo usando cualquiera de los dos métodos generales para la hidrólisis de los gangliósidos conocidos en la literatura, conocidos como la hidrólisis ácida o la hidrólisis enzimática.

45 La hidrólisis ácida puede ser llevada a cabo, por ejemplo, utilizando un ácido mineral diluido, tal como el ácido clorhídrico diluido, el ácido sulfúrico y el ácido nítrico. La hidrólisis ácida puede ser efectuada ajustando el pH de una solución acuosa del extracto lípido a un pH entre 3,5 y 5, preferiblemente alrededor de pH 4,0 y calentar la solución a una temperatura preferiblemente entre 90° C y 100° C durante el tiempo necesario para completar la conversión de los otros grandes componentes gangliósidos a GM1. El tiempo necesario para hidrolizar los principales gangliósidos a GM1 depende de la temperatura y del pH elegidos. En general, cuanto más alto sea el pH será más largo el tiempo requerido para completar la hidrólisis y cuanto más alta sea la temperatura de reacción más corto será el tiempo requerido para completar la hidrólisis. La reacción de hidrólisis puede llevarse a cabo de manera general durante más de 2 a 5 horas. Por ejemplo, donde la hidrólisis se lleva a cabo con el pH a 4,0 y 95° C el tiempo requerido para completar la reacción de hidrólisis es de alrededor de 3 horas.

50 La hidrólisis enzimática puede ser llevada a cabo utilizando cualquier sialidasa adecuada. Preferiblemente, pueden ser utilizadas la sialidasa cepa S *Arthrobacter ureafaciens* o la sialidasa *Vibrio cholerae*. De forma ventajosa la sialidasa cepa S *Arthrobacter ureafaciens* o la sialidasa *Vibrio cholerae* son activas en GT1a, GD1a, GD1b pero no en GM1. La hidrólisis enzimática puede ser llevada a cabo, por ejemplo, ajustando el pH de una solución acuosa del extracto lípido a un pH al cual la enzima utilizada tiene su actividad óptima, en concreto entre pH 4 y pH 6, por ejemplo alrededor de pH 5, mediante la adición de un tampón adecuado, tal como un tampón de acetato, añadiendo los iones Ca²⁺ en el caso de que la sialidasa sea una sialidasa *Vibrio cholerae* y calentando la solución a una temperatura a la cual la enzima utilizada tiene su actividad óptima, por ejemplo alrededor de 37° C, durante el tiempo necesario para completar la transformación. La hidrólisis puede ser generalmente llevada a cabo durante más de 12-24 horas, dependiendo de las unidades añadidas de la enzima.

La hidrólisis ácida es menos preferible ya que es un proceso no específico de hidrólisis y generalmente proporciona un rendimiento más reducido en GM1 debido a la conversión a otros gangliósidos. Además el proceso de hidrólisis ácida conduce a la formación de la impureza asialo-GM1.

5 Los métodos de hidrólisis enzimática son preferidos generalmente puesto que proporcionan un mayor rendimiento en GM1 debido a la alta especificidad de la transformación química. Para la hidrólisis enzimática es preferida la sialidasa *Arthrobacter ureafaciens* puesto que no necesita la adición de los iones de Ca²⁺ para su actividad. Además, debido a su peso molecular de 52 000 Daltons (comparado con los 82 000 Daltons de la sialidasa *Vibrio cholerae*), puede, de manera ventajosa, ser lavada mediante diafiltración.

15 Con el fin de recuperar la mezcla lipídica producida de esta manera que tiene un contenido mejorado del monosialogangliósido GM1 desde la solución de la reacción, la reacción de la solución puede ser de manera ventajosa ser diafiltrada, por ejemplo, a través de una membrana con un tamaño de poro de 10000 a 100000 Daltons, preferiblemente de alrededor de 50000 Daltons. Para la diafiltración puede ser utilizada cualquier membrana convencional de diálisis. Pueden usarse, de manera ventajosa las cassettes de filtro, tales como las cassettes de tipo de polisulfona de SARTOCON[®] (Sartorius), preferiblemente con un límite de 50000 Daltons. El permeato puede entonces ser secado con el fin de obtener un polvo de la mezcla lipídica que contiene monosialogangliósido GM1 como el componente gangliósido principal. El secado puede ser llevado a cabo mediante métodos convencionales. De forma ventajosa, el secado puede ser llevado a cabo por secado por aspersión o por secado al vacío.

25 La mezcla lipídica puede, de manera general, tener una concentración de GM1 de 10 a 200 g/lit y preferiblemente de por lo menos 100 g/lit.

De acuerdo con el proceso de la presente invención el gangliósido GM1 es separado de los otros gangliósidos en la mezcla lipídica utilizando cromatografía de intercambio iónico.

30 Ha sido encontrado sorprendentemente que cuando es utilizado un eluyente que contiene iones de cesio o de potasio es posible separar con éxito el GM1 de otros monosialogangliósidos.

35 Las técnicas de intercambio iónico convencionales utilizadas han encontrado que, de manera general, no permiten la separación efectiva de GM1 de los otros monosialogangliósidos. De manera especial debe hacerse notar el monosialogangliósido Fucosil-GM1 el cual está presente como una impureza importante de gangliósido en la mezcla lipídica de porcino producida por los conocidos tratamientos mediante hidrólisis.

40 Las dos moléculas GM1 y Fucosyl-GM1 tienen propiedades físicas muy similares. Ambos tienen una carga negativa simple, proporcionada por el grupo carboxilo del ácido siálico y tienen similares pesos moleculares; 1558 y 1704 respectivamente. Por consiguiente, cuando se cargan en la columna pre-equilibrada de intercambio de iones, la fuerza de vinculación de los dos gangliósidos con la resina es la misma.

45 Se ha observado que cuando el acetato de sodio es agregado al eluyente con el fin de aumentar la fuerza iónica del eluyente y proporcionar las condiciones para el desplazamiento de los gangliósidos, ambos, el GM1 y Fucosyl-GM1 eluyen al mismo tiempo con la misma fuerza iónica. No puede lograrse la separación de los dos monosialogangliósidos.

50 Mientras que los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que si son utilizados iones de cesio o de potasio, además de la adición de potasio metanólico o acetato de cesio, los GM1 y Fucosyl-GM1 eluyen separadamente, con el Fucosyl-GM1 eluyendo en primer lugar. La separación es completa y cada uno de los gangliósidos GM1 y Fucosyl-GM1 puede ser aislado.

55 Mientras que no desean estar limitados por ninguna teoría, es considerado por los inventores de la presente invención, que la separación observada puede atribuirse al hecho que, de manera contraria a la teoría convencional de intercambio de iones, los solutos GM1 y Fucosyl-GM1 no son sólo liberados desde la columna en orden de su fuerza de vinculación con la resina, sino también en el orden de su afinidad por el contra-ión al cual ellos deben vincularse con el fin de ser separados del gel. De acuerdo con esto, siguiendo esta teoría, si uno de los dos solutos tiene una afinidad diferente por el contra-ión, entonces los solutos pueden ser liberados con dos fuerzas iónicas diferentes y la purificación puede ocurrir.

60 Se ha encontrado sorprendentemente por los presentes inventores que los monosialogangliósidos GM1 y Fuc-GM1 tienen la misma afinidad para el sodio pero no tienen la misma afinidad para el potasio o el cesio, a pesar del hecho que los tres metales pertenecen al mismo grupo. Por los presentes inventores se ha encontrado que el Fuc-GM1 tienen una afinidad más alta para el potasio y cesio que el GM1 y es eluido en primer lugar.

65 El método de la cromatografía de intercambio iónico de la presente invención permite de manera ventajosa una separación efectiva del GM1 desde Fucosyl-GM1. Además, el método de la presente invención de manera ventajosa

también permite separar GM1 de los ácidos grasos correspondientes. Los ácidos grasos tienen la misma carga que el gangliósido, pero una más alta afinidad por los iones de cesio o de potasio.

5 Para la cromatografía de intercambio iónico puede ser utilizada cualquier resina adecuada. De manera ventajosa puede ser utilizada una resina que contenga un grupo amino cuaternario, por ejemplo, FRACTOGEL[®] EMD TMAE (S) o resinas de Sefarosa, por ejemplo resinas Q-Sepharose HP.

10 En una primera etapa la resina es equilibrada con un solvente adecuado. Los solventes adecuados incluyen el etanol, el metanol o una mezcla de metanol y cloroformo. Preferiblemente, el solvente es el metanol, debido a que es un solvente en el cual los gangliósidos y las sales de cesio y de potasio son solubles.

15 Entonces, la columna puede ser cargada con una solución de la mezcla lipídica en un solvente de elución apropiado. El solvente de elución debe contener los mismos componentes de solvente del disolvente utilizado para el equilibrado de la resina. Preferiblemente el solvente elegido es el metanol. La elución preliminar con el solvente de elución permite la elución de las sustancias no vinculadas, por ejemplo los cerebrósidos.

20 Entonces, se agregan los iones potasio o de cesio al solvente de elución. Los iones potasio o cesio son preferiblemente proporcionados en forma de una solución metanólica de potasio o de acetato de cesio, formiato, propionato o como una sal de otro ácido orgánico. Se prefiere una solución metanólica de acetato de potasio o de sodio. De manera ventajosa, el acetato de cesio o de potasio puede estar presente en el eluyente en una cantidad suficiente para alcanzar una conductividad de 1100-1400 $\mu\text{S}/\text{cm}$, preferiblemente una conductividad de 1200-1300 $\mu\text{S}/\text{cm}$ en el eluyente. Esta sal de sodio o de potasio que contiene la solución de eluyente puede ser pasada isocráticamente a través de la columna a cualquier velocidad adecuada de flujo, por ejemplo con un ratio de flujo entre 100 ml/h a 140 ml/h.

25 En donde la separación es llevada a cabo mediante el proceso de cromatografía de intercambio de iones de acuerdo con la presente invención, los ácidos grasos y el Fuc-GM1 son eluidos antes que el GM1, mientras que los sulfátidos que permanecen ligados a la columna pueden ser eluidos durante el lavado de la columna.

30 El GM1 que contiene eluado es recogido y, de manera ventajosa, el solvente de elución eluido de la columna puede ser recuperado por destilación.

35 El GM1 que contiene soluto puede ser recuperado mediante el secado de la solución de eluado con el fin de producir un polvo que contiene el GM1. El secado puede ser llevado a cabo mediante métodos convencionales, por ejemplo secado por aspersión o secado por vacío.

40 El GM1 que contiene soluto puede entonces ser purificado mediante la diafiltración de una solución acuosa a través de una membrana que tiene tamaño de poro de 10000 a 100000 Daltons, preferiblemente de alrededor de 50000 Daltons, con el fin de eliminar las sales residuales de potasio o de cesio. Opcionalmente, se puede añadir un ácido mineral, tal como ácido sulfúrico acuoso, ácido nítrico o preferiblemente ácido clorhídrico, con el fin de ajustarlo a un pH entre pH 6 a 8, preferiblemente alrededor de pH 7 antes de la diafiltración.

45 Los iones de sodio, convenientemente en la forma de una solución acuosa de una sal de sodio, preferiblemente NaCl, pueden entonces ser añadidos a la solución, con el fin de desplazar a los iones de cesio o de potasio vinculados al GM1 y obtener GM1 en la forma de la sal de sodio fisiológico. La solución pueden entonces ser sometida a una segunda diafiltración con la finalidad de eliminar la sal residual (por ejemplo, NaCl), utilizando una membrana que tiene un tamaño de poro de 10000 a 100000 Daltons, preferiblemente alrededor de 50000 Daltons. De manera ventajosa pueden ser utilizadas, las cassettes de filtro, tales como las cassettes de tipo de polisulfona SARTOCON[®] (Sartorius), preferiblemente con un límite de 50000 Daltons.

50 La solución puede entonces ser secada con el fin de recuperar el GM1 en forma de un polvo. El secado puede ser llevado a cabo mediante los métodos convencionales. De manera ventajosa el secado puede ser llevado a cabo mediante secado por aspersión o mediante secado al vacío.

55 El GM1 obtenido de acuerdo con la presente invención tiene un grado de pureza del 98% ó más, generalmente de alrededor de 99,0 a 99,9%. El GM1 obtenidos de acuerdo con el proceso de la presente invención contiene menos de 0,1% de impureza Fucosyl-GM1.

60 El proceso de la presente invención consigue de manera ventajosa la separación eficiente de GM1 de otros monosialogangliósidos. Particularmente, el proceso de la presente invención permite la separación de GM1 de la impureza Fucosyl-GM1.

65 De forma ventajosa el proceso de la presente invención permite la preparación del monosialogangliósido GM1 con un buen rendimiento y un alto nivel de pureza.

El GM1 purificado, de acuerdo con el proceso de la presente invención, puede ser utilizado en el tratamiento de

sujetos humanos o animales. En particular, el GM1 purificado, de acuerdo con el proceso de la presente invención está previsto para el tratamiento de seres humanos o mamíferos especialmente para la reparación o el tratamiento de trastornos y enfermedades de los sistemas nerviosos central y periférico, incluyendo infartos cerebrales, enfermedad de Parkinson, lesión medular, enfermedad de Alzheimer, Disquinesia tardía, Esclerosis Lateral Amiotrófica, Neuropatías periféricas y neuropatía autonómica.

La presente invención está más ilustrada mediante los ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Preparación de una mezcla lipídica que contiene el monosialogangliósido GM1 como principal gangliósido

El extracto lípido conteniendo una mezcla de gangliósidos que tiene una pureza del 70% es disuelto en agua purificada a una concentración de alrededor de 25 g/l. Esta solución es entonces diafiltrada a través de cassettes de filtro de polisulfona SARTOCON[®] (Sartorius) que tienen un límite de 50 000 Daltons.

Entonces, son equilibrados 200 l de la solución a un pH 5,5 mediante la adición de 50 mM de tampón de acetato y 4 mM cloruro de calcio. Entonces, son añadidos 30000 U de sialidasa *Vibrio cholerae* y la solución se calienta a 37° C durante 12 h con el fin de completar la transformación de otros gangliósidos principales (GT1b, GD1a, GD1b) a GM1. La solución resultante tiene una concentración de GM1 de 14-15 g/l.

Después de la hidrólisis enzimática la solución es diafiltrada a través de las cassettes de filtro que tienen un límite de 50000 Daltons. Entonces, se agrega 1 M de NaCl al retenido y la solución es sometida a una segunda diafiltración. Después de la diafiltración el retenido es concentrado a una concentración de GM1 de 100 g/l dejando al permeado fluir sin cualquier recambio de agua. Entonces, la solución es secada bajo vacío para obtener alrededor de 3200 g de un polvo que tiene una concentración de GM1 de 85% medida por HPLC.

Purificación de GM1 de la mezcla lipídica que contiene el monosialogangliósido GM1 como el gangliósido principal

Con el polvo obtenido en el paso previo es preparada una solución metanólica a una concentración de 10 g/l y la solución se filtra a través de un filtro de cartucho Sartopore de 0,22 µm (fabricado por Sartorius AG).

Para cada ciclo, son entonces cargados 7 litros de la solución filtrada en una columna FPLC que contiene 20 l de resina Fractogel[®] EMD TMAE (S) equilibrada en metanol. La columna es entonces eluida con metanol: solución metanólica de acetato de potasio con una conductividad de 1200-1300 µS/cm, con un caudal de 120 l/h. El ciclo es repetido hasta el final de la solución de GM1.

El eluado (aproximadamente 60-70 l) es concentrado de forma continua mediante la destilación y luego se seca para obtener un polvo y se recupera el metanol. El polvo obtenido de esta manera es una mezcla de GM1 puro y acetato de potasio.

El polvo obtenido de esta manera se disuelve en agua purificada a una concentración de 25 g/l y equilibrado a un pH 7 mediante la adición de HCl al 18%. La solución es diafiltrada a través de cassettes del filtro con un límite de 50 000 Daltons. Entonces, es añadido 1 M de NaCl y la solución es otra vez es diafiltrada a través de cassettes del filtro con un límite de 50 000 Daltons. Después de esta segunda diafiltración el retenido es concentrado hasta 100-120 g/l dejando al permeado fluir sin ningún recambio de agua.

La solución concentrada es entonces filtrada a través de un filtro de 0,22 µm y secada por secado por aspersión con la intención de proporcionar 2700 g de un polvo blanco a blanco amarillento de GM1, identificado por TLC, teniendo este polvo de GM1 una pureza de 99,8% medida por HPLC. El polvo de GM1 resultante tiene un contenido de Fuc-GM1 de menos del 0,1%, medido mediante HPLC.

Ejemplo Comparativo

El proceso para la preparación y la purificación de GM1 fue llevado a cabo como en el Ejemplo 1, excepto que en la cromatografía en columna, el metanol: solución metanólica de acetato de potasio fue substituida por metanol: solución metanólica de acetato de sodio.

Fueron obtenidos 3100 g de polvo de GM1 que contienen 91% de GM1 y 8% de Fuc-GM1, medido por HPLC.

De los ejemplos anteriores puede ser visto que se obtiene una mucha menor pureza de GM1 cuando es utilizado el acetato de sodio para la elución de GM1. Esto puede ser atribuido al hecho de que el contra-ion de sodio no hace ninguna diferencia entre GM1 y Fuc-GM1 en el proceso de elución, en comparación con los contra-iones de potasio o de cesio, que por el contrario separan completamente ambos picos.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un proceso para el aislamiento y la purificación de monosialogangliosido GM1 que consta de la separación del monosialogangliosido GM1 desde Fucosyl-GM1 en una mezcla lipídica que contiene el monosialogangliosido GM1 como el componente gangliósido principal mediante la cromatografía de columna de intercambio iónico utilizando un eluyente que comprende iones potasio o de cesio.
- 10 **2.** El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende además los pasos de:
(a) la recuperación desde la solución eluida,
(b) la diafiltración de una solución acuosa del soluto recuperado del paso (a),
(c) la adición de una sal de sodio y la diafiltración de la solución acuosa resultante,
(d) la recuperación de GM1 en la forma de su sal de sodio.
- 15 **3.** El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 ó la reivindicación 2 en donde el eluyente comprende potasio o acetato de cesio.
- 4.** El proceso de acuerdo con la reivindicación 3 en donde el eluyente es una solución metanólica de potasio o acetato de cesio.
- 20 **5.** El proceso de acuerdo con alguna de las reivindicaciones precedentes en donde la columna de intercambio iónico contiene una resina que tiene un grupo amino cuaternario.
- 6.** El proceso de acuerdo con alguna de las reivindicaciones precedentes en donde la columna de intercambio iónico en primer lugar es equilibrada con metanol.
- 25 **7.** El proceso de acuerdo con la reivindicación 2 en donde es adicionado NaCl en el paso (c).
- 8.** El proceso de acuerdo con la reivindicación 2 en donde la diafiltración es llevada a cabo utilizando una membrana con un tamaño de poro de 10000 a 100000 Daltons.
- 30 **9.** El proceso de acuerdo con la reivindicación 2 en donde la recuperación de GM1 en el paso (d) consta del secado de la solución de permeado mediante el secado por aspersion o por secado al vacío con el fin de producir un polvo.
- 35 **10.** El proceso de acuerdo con alguna de las reivindicaciones precedentes que comprende un paso preliminar de purificación a la separación de GM1 por cromatografía de intercambio iónico, comprendiendo dicho paso de purificación:
(a) la diafiltración de una solución acuosa de una mezcla lipídica que contiene el monosialogangliosido GM1 como el principal componente gangliósido a través de una membrana que tiene un tamaño de poro de 10000-100000 Daltons,
(b) la concentración del permeado y la recuperación del soluto de la mezcla lipídica que incluye el GM1.
- 40 **11.** El proceso de acuerdo con alguna de las reivindicaciones precedentes en donde la mezcla lipídica que contiene el monosialogangliosido GM1 como el componente gangliósido principal es obtenida mediante la hidrólisis de un extracto lípido que contiene una mezcla de gangliósidos que tiene una pureza de por lo menos el 50%.
- 45 **12.** El proceso de acuerdo con alguna de las reivindicaciones precedentes en donde la hidrólisis es llevada a cabo mediante el tratamiento del extracto lípido con una sialidasa *Arthrobacter ureafaciens* cepa S o sialidasa *Vibrio cholerae*.