

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 794**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4152 (2006.01)

A61K 31/045 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2009 E 09717857 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2013 EP 2255804**

54 Título: **Una composición farmacéutica y la aplicación de la misma en la preparación de una medicina para el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares**

30 Prioridad:

04.03.2008 CN 200810020387

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

21.03.2013

73 Titular/es:

**JIANGSU SIMCERE PHARMACEUTICAL R&D
CO., LTD. (100.0%)
699-18, Xuanwu Avenue
Nanjing Jiangsu 210042**

72 Inventor/es:

**YIN, XIAOJIN;
YANG, SHIBAO;
LI, XIAOQIANG;
JIANG, ZHENG;
HE, JIAN;
ZHANG, ANYUAN y
HUANG, XIN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 398 794 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

Una composición farmacéutica y la aplicación de la misma en la preparación de una medicina para el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares.

5 La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente China n.º 200810020387.1 presentada el 4 de marzo de 2008 y titulada "A Composition Comprising 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona", que se incorpora en este documento por referencia en su totalidad.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica y el uso de la misma en el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares.

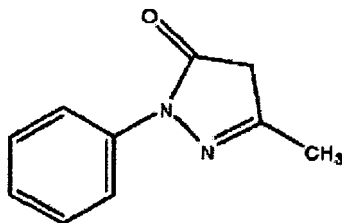
15 Antecedentes de la invención

Las enfermedades cerebrovasculares (ECV) son un grupo de enfermedades que son gravemente perjudiciales para la salud humana y actualmente se han convertido en uno de los factores importantes de discapacidad y mortalidad del ser humano.

20 Enfermedad cerebrovascular se refiere a un trastorno cerebral debido a una anomalía cerebrovascular. Ictus generalmente se refiere a una enfermedad cerebrovascular aguda.

25 Las enfermedades cerebrovasculares pueden dividirse simplemente en dos clases: (1) enfermedad cerebrovascular isquémica causada por una reducción o bloqueo del flujo sanguíneo, y (2) enfermedad cerebrovascular hemorrágica causada por la rotura de un vaso sanguíneo. Las enfermedades cerebrovasculares isquémicas se manifiestan principalmente como infartos cerebrales (incluyendo trombosis cerebral y embolia cerebral). Además, otra manifestación de enfermedad cerebrovascular isquémica se denomina ataque isquémico transitorio (AIT, abreviado habitualmente por los médicos), con una completa recuperación en 24 horas sin ninguna secuela. Las enfermedades cerebrovasculares hemorrágicas pueden dividirse en dos clases: (1) hemorragia cerebral, en la que un vaso sanguíneo se rompe y la sangre fluye en el parénquima cerebral; y (2) hemorragia subaracnoidea (HSA, abreviada por los médicos), en la que un vaso sanguíneo se rompe y la sangre fluye en el espacio subaracnoideo que rodea el cerebro.

35 La 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona, también denominada Edaravona, tiene una fórmula estructural de



una fórmula molecular de $C_{10}H_{10}N_2O$ y un peso molecular de 174,19.

40 La 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona es un agente protector cerebral, que elimina los radicales libres, inhibe la peroxidación lipídica, y de este modo inhibe el daño oxidativo de las células cerebrales, las células endoteliales vasculares y las células nerviosas. La administración intravenosa de Edaravona en ratas después de la isquemia/reperfusión suprime el desarrollo de edema cerebral e infarto cerebral, alivia los síntomas neurológicos acompañantes e inhibe la muerte neuronal retardada. Se ha descubierto que la 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona, con una dosificación clínica de 60 mg/día para un adulto, tiene algunos efectos secundarios y adversos, tales como fallo renal agudo en una medida incierta, disfunción hepática, trombocitopenia, trombosis intravascular diseminada.

50 El borneol, usado comúnmente en la medicina tradicional China, se conoce como un agente aromático de hierbas que induce la reanimación y ceba otros fármacos hasta el máximo. El borneol se usa generalmente como un agente cebador para promover la eficacia de otros fármacos. Se indica en *Augmented Materia Medica* (Bencao Yanyi) que el borneol es deficiente cuando se usa solo y por el contrario significativo cuando se usa como adyuvante.

Resumen de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un producto farmacéutico.

El uso de Borneol para el tratamiento de una enfermedad cerebrovascular se ha descrito, por ejemplo, en los documentos CN 1846740 y CN 1823922, que también desvelan que la Edavarona es útil para el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares y se usa como un compuesto de referencia para los ejemplos comparativos.

El uso de Edavorona (como una inyección en bajo volumen y alta concentración) para el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares se ha desvelado, por ejemplo, en el documento EP 1 386 606 A1.

Sin embargo, no hay una divulgación de una combinación de Borneol y Edavarona y su uso en el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares.

La composición comprende 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona y borneol. La composición farmacéutica en combinación tiene un efecto sinérgico y mejor eficacia para el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares.

Preferiblemente, la proporción en peso de 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona con respecto a borneol es de 4:1 a 1:4, y más preferiblemente de 2:1 a 1:2.

Dicho borneol incluye borneol natural y borneol sintético, y se usa preferiblemente borneol natural. Puede usarse el borneol natural indicado en la Pharmacopoeia of People's Republic of China, Ed. de 2005, que es dextro-canfol (LongNao).

Las composiciones farmacéuticas anteriores pueden comprender adicionalmente un disolvente, que puede facilitar la mezcla de 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona y borneol. El disolvente puede seleccionarse entre un grupo que consiste en un disolvente orgánico soluble en agua o una mezcla de un disolvente orgánico soluble en agua y agua. Los disolventes orgánicos solubles en agua que se usan comúnmente incluyen, pero sin limitación, disolventes alcohólicos, disolventes de éter y disolventes de cetona. Los disolventes alcohólicos usados comúnmente incluyen, pero sin limitación, etanol, isopropanol, etilenglicol y propilenglicol. Los disolventes de éter usados comúnmente incluyen, pero sin limitación, etilenglicol monoetil éter y etilenglicol monobutil éter. Los disolventes de cetona usados comúnmente incluyen, pero sin limitación, acetona y N-metil-2-pirrolidona. Preferiblemente, el disolvente orgánico soluble en agua es propilenglicol.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar el uso de la composición farmacéutica anterior en el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares.

Preferiblemente, la composición farmacéutica anterior se usa en el tratamiento de enfermedad cerebrovascular isquémica o infarto cerebral.

La composición farmacéutica proporcionada en este documento comprende 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona y borneol, que tiene un efecto sinérgico en el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares y de esta manera tiene eficacias significativamente mejoradas. Por consiguiente, la composición farmacéutica puede tener una dosificación reducida de 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona y aún ser eficaz, y tener así una toxicidad reducida.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describe adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos. La Edaravona indicada en los ejemplos es 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona. El borneol natural indicado es el registrado en la Pharmacopoeia of People's Republic of China (edición de 2005), concretamente dextro-canfol.

Ejemplo 1

[0021] Se añaden 2 g de Edaravona y se disuelven completamente por agitación en una solución de 200 g de propilenglicol. Después, se añade lentamente agua para inyección y la mezcla se disuelve hasta un volumen de 1000 ml.

Ejemplo 2

Se añaden 2 g de borneol sintético y se disuelven completamente por agitación en una solución de 200 g de propilenglicol. Después, se añade lentamente agua para inyección y la mezcla se disuelve hasta un volumen de 1000 ml.

Ejemplo 3

5 Se añaden 2 g de borneol natural y se disuelven completamente por agitación en una solución de 200 g de propilenglicol. Después, se añade lentamente agua para inyección y la mezcla se disuelve hasta un volumen de 1000 ml.

Ejemplo 4

10 Se añaden 2 g de Edaravona y 1 g de borneol sintético y se disuelven completamente por agitación en una solución de 200 g de propilenglicol. Después, se añade lentamente agua para inyección y la mezcla se disuelve hasta un volumen de 1000 ml.

Ejemplo 5

15 Se añaden 2 g de Edaravona y 1 g de borneol natural y se disuelven completamente por agitación en una solución de 200 g de propilenglicol. Después, se añade lentamente agua para inyección y la mezcla se disuelve hasta un volumen de 1000 ml.

Ejemplo 6

20 Se añaden 1 g de Edaravona y 2 g de borneol natural y se disuelven completamente por agitación en una solución de 100 g de propilenglicol. Después, se añade lentamente agua para inyección y la mezcla se disuelve hasta un volumen de 1000 ml.

Ejemplo 7

25 Se añaden 4 g de Edaravona y 1 g de borneol natural y se disuelven completamente por agitación en una solución de 400 g de propilenglicol. Después, se añade lentamente agua para inyección y la mezcla se disuelve hasta un volumen de 1000 ml.

Ejemplo 8

30 Se añaden 1 g de Edaravona y 1 g de borneol natural y se disuelven completamente por agitación en una solución de 200 g de propilenglicol. Después, se añade lentamente agua para inyección y la mezcla se disuelve hasta un volumen de 1000 ml.

Ejemplo 9

35 Se añaden 1 g de Edaravona y 2 g de borneol natural y se disuelven completamente por agitación en una solución de 200 g de propilenglicol. Después, se añade lentamente agua para inyección y la mezcla se disuelve hasta un volumen de 1000 ml.

Ejemplo 10

40 Se añaden 2 g de Edaravona y 0,5 g de borneol natural y se disuelven completamente por agitación en una solución de 200 g de propilenglicol. Después, se añade lentamente agua para inyección y la mezcla se disuelve hasta un volumen de 1000 ml.

Ejemplo 11

45 Se añaden 4,5 g de Edaravona y 0,5 g de borneol natural y se disuelven completamente por agitación en una solución de 400 g de propilenglicol. Después, se añade lentamente agua para inyección y la mezcla se disuelve hasta un volumen de 1000 ml.

Ejemplo 12

50 Se añaden 2 g de Edaravona y 1 g de borneol natural y se disuelven completamente por agitación en una solución de 100 g de propilenglicol. Después, se añade lentamente agua para inyección y la mezcla se disuelve hasta un volumen de 1000 ml.

55

Ejemplo 13

5 Se añaden 8 g de Edaravona y 4 g de borneol natural y se disuelven completamente por agitación en una solución de 500 g de propilenglicol. Después, se añade lentamente agua para inyección y la mezcla se disuelve hasta un volumen de 1000 ml.

Ejemplo 14

10 Se añaden 2 g de Edaravona y se disuelven completamente por agitación en una solución de 100 g de propilenglicol. Después, se añade lentamente agua para inyección y la mezcla se disuelve hasta un volumen de 1000 ml.

Ejemplo 15

15 Se añaden 8 g de Edaravona y se disuelven completamente por agitación en una solución de 400 g de propilenglicol. Después, se añade lentamente agua para inyección y la mezcla se disuelve hasta un volumen de 1000 ml.

20 Los Ejemplos 16-19 son ejemplos para la comparación de eficacias.

Ejemplo 16

1 Materiales y Procedimientos

25 1.1 Animales: ratas Wistar macho sanas con un peso de 280-320 g.

1.2 Fármacos y Reactivos: Edaravona para inyección (2 mg/ml) del Ejemplo 1, inyección de borneol natural (2 mg/ml) del Ejemplo 3 e inyección de Edaravona + borneol natural del Ejemplo 5.

30 1.3 Procedimientos

1.3.1 Preparación de un modelo de reperusión de isquemia cerebral focal

35 Las etapas principales se describen como se indica a continuación. Las ratas se anestesiaron con hidrato de cloral al 10% (350 mg/kg, i.p.). La carótida externa derecha se separó, se ligó y se cortó. Un hilo de nailon con punta redonda se insertó lentamente en aproximadamente 18 mm de profundidad en el extremo residual de la carótida externa derecha y a través de la carótida común y la carótida interna para inducir isquemia bloqueando el origen de la arteria cerebral media. Después de una isquemia durante 2 h, el hilo de nailon se retiró para su reperusión durante 24 h. Los animales del grupo simulado se trataron de manera idéntica a los del grupo modelo, con la excepción de que solo se usó un hilo de nailon para separar la arteria. La manifestación del síntoma de Horner y la discinesia del cuerpo lateral opuesto después de la reanimación del animal significa un modelo de éxito.

1.3.2 Agrupación de los Animales y Administración

45 Los animales experimentales se dividieron de manera aleatoria en cinco grupos, incluyendo un grupo simulado, un grupo de control y grupos de fármaco. Los animales en los grupos de fármacos se inyectaron por vía intraperitoneal dos veces, 30 min antes de la isquemia y 12 h después de la reperusión. Los animales del grupo simulado y el grupo de control se inyectaron cada uno con un volumen igual de solución salina normal.

50 1.3.3 Determinación de la puntuación de déficit neurológico, del Tamaño del Infarto Cerebral y Contenido de Agua en el Cerebro

Puntuación del déficit neurológico: Se realizó una evaluación conductual 24 h después de la reperusión de acuerdo con el sistema de puntuación de 5 puntos Longa.

55 Determinación del tamaño del infarto cerebral: Los animales se decapitaron para obtener el cerebro después de la última puntuación de déficit neurológico. El rinencéfalo, el tronco cerebral inferior y el cerebelo se retiraron, y los cerebros restantes se pesaron inmediatamente para obtener el peso húmedo. Los cerebros se seccionaron coronalmente en cinco rodajas con un grosor sustancialmente idéntico sobre hielo, y después se incubaron en cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio durante 30 min a 37 °C. Los tejidos cerebrales normales parecían de color rosa, mientras que las áreas infartadas parecían de color blanco. Después, las rodajas cerebrales se fijaron en formaldehído al 10%, y los tejidos de color blanco se retiraron cuidadosamente y se pesaron. El tamaño del infarto

se determinó por el porcentaje de peso de tejido infartado en el peso cerebral total.

Determinación del contenido de agua en el cerebro: El contenido de agua en el cerebro se determinó mediante un procedimiento seco y un procedimiento húmedo. Los animales se sacrificaron para obtener todo el cerebro. El rinencéfalo, el tronco cerebral inferior y el cerebelo se retiraron y el peso húmedo de los cerebros restantes se determinó inmediatamente. El peso seco se obtuvo después del horneado en un horno durante aproximadamente 18 h a 120 °C. El contenido de agua en el cerebro se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación: Contenido de agua en el cerebro (%) = (peso húmedo del cerebro - peso seco del cerebro)/peso húmedo del cerebro x 100.

2 Resultados

2.1 Efectos sobre el tamaño del infarto cerebral y la puntuación del déficit neurológico después de la isquemia/reperfusión

El tamaño del infarto después de la isquemia-reperfusión se redujo significativamente en las ratas de todos los grupos de fármacos (P<0,01) en comparación con las del grupo de control. Ni la Edaravona sola ni el borneol natural solo tuvieron un efecto significativo sobre los síntomas de los déficits neurológicos en las ratas. Sin embargo, la combinación de Edaravona y borneol natural mejoró significativamente los síntomas de los déficits neurológicos, lo que indica que los dos fármacos tienen un efecto sinérgico. Los resultados se mostraron en la tabla 1.

Tabla 1: Efectos sobre el tamaño del infarto cerebral y la puntuación del déficit neurológico después de la isquemia/reperfusión ($\bar{X} \pm S$) (media \pm DT)

Grupo	Tamaño del infarto cerebral (%)	Puntuación del déficit neurológico (puntos)
control	35,7 \pm 7,52	3,1 \pm 1,05
Edaravona (1,0 mg·kg ⁻¹)	18,0 \pm 5,29**	2,5 \pm 1,02
Borneol natural (0,5 mg·kg ⁻¹)	19,8 \pm 6,37**	2,0 \pm 0,98
Combinación (0,5 mg·kg ⁻¹ de Edaravona + 0,25 mg·kg ⁻¹ de Borneol natural)	18,1 \pm 3,61**	1,1 \pm 0,69*

* P<0,05, ** P<0,01, en comparación con el grupo de control.

2.2 Efectos sobre el contenido de agua en el cerebro después de isquemia/reperfusión

El edema cerebral inducido por isquemia/reperfusión se redujo significativamente en ratas de todos los grupos de fármacos. Tanto la Edaravona sola como el borneol natural solo tienen un efecto significativo sobre el contenido de agua en el cerebro en comparación con el grupo de control (P<0,05). La combinación de Edaravona y borneol natural tuvo un efecto altamente significativo sobre el contenido de agua en el cerebro en comparación con el grupo de control (P<0,01), lo que indica que los dos fármacos tienen un efecto sinérgico. Los resultados se mostraron en la Tabla 2.

Tabla 2: Efectos sobre el contenido de agua en el cerebro después de isquemia/reperfusión ($\bar{X} \pm S$) (media \pm DT)

Grupo	Contenido de agua en el cerebro (%)
Simulado	78,41 \pm 1,15
control	82,19 \pm 1,07
Edaravona (1,0 mg·kg ⁻¹)	81,65 \pm 1,24*
Borneol natural (0,5 mg·kg ⁻¹)	81,25 \pm 0,97*
Combinación (0,5 mg·kg ⁻¹ de Edaravona + 0,25 mg·kg ⁻¹ de Borneol natural)	80,12 \pm 1,43**

* P<0,05, ** P<0,01, en comparación con el grupo de control.

Ejemplo 17

1 Materiales y Procedimientos

1.1 Animales: Ratas Wistar macho sanas con un peso de 280-320 g

1.2 Fármacos y Reactivos: Edaravona + borneol natural para inyección de los Ejemplos 5, 8 y 9.

1.3 Procedimientos

1.3.1 Preparación del modelo de Isquemia Cerebral Focal/Reperusión

La oclusión de la arteria cerebral media (OACM), un modelo de isquemia cerebral/reperusión, se preparó usando el procedimiento de las hebras de la carótida interna. Los animales se anestesiaron con hidrato de cloral al 10% (3,5 ml/kg), y después se fijaron sobre la mesa de operaciones en la posición decúbito ventral. La piel se desinfectó y se hizo una incisión en el cuello desde la línea central. La carótida común derecha, la carótida externa y la carótida interna se separaron, y el nervio vago se separó cuidadosamente. La carótida externa se ligó y se cortó. Se avanzó a lo largo de la carótida interna, y después se ligó la arteria pterigopalatino. La parte proximal de la carótida común se sujetó y se hizo un corte en el extremo distal de la ligadura de la carótida externa. Se insertó un hilo de nailon con un diámetro externo de 0,285 mm en el corte, a través de la rama de la carótida común y después en la carótida interna lentamente hasta que se encontró una ligera resistencia (aproximadamente 20 mm de distancia del punto de divergencia). El suministro de sangre en la arteria cerebral media se bloqueo de este modo completamente. El flujo sanguíneo cerebral se controló por usando flujometría cerebral por láser-Doppler. Después de la isquemia en el cerebro derecho durante 2,0 h, el hilo de nailon se retiró lentamente y después el suministro sanguíneo se recuperó para su reperusión. El cuero cabelludo se suturó y se desinfectó. En el grupo simulado, solo se separaron los vasos sanguíneos sin la inserción de un hilo de nailon. Durante la operación, se usó una placa calefactora para las ratas y una lámpara de escritorio con 60 W para mantener la temperatura corporal de las ratas a $37,0 \pm 0,5$ °C.

1.3.2 Agrupación de los Animales y Administración

Los animales experimentales se dividieron de manera aleatoria en seis grupos, incluyendo un grupo simulado, un grupo modelo, un grupo de control positivo y grupos de fármaco (la dosificación total de Edaravona + borneol natural fue 0,75 mg/kg). Después de que se modelara la isquemia cerebral en los animales experimentales, todos los animales se dividieron en los grupos de una manera ciega simple con probabilidad idéntica. Los fármacos respectivos se administraron de una vez inmediatamente después de la isquemia cerebral, y después se administraron secuencialmente después de 2, 4 y 24 horas. Las cuatro administraciones se fabricaron totalmente para cada animal. Las ratas en el grupo modelo se inyectaron a través de la vena de la cola con un volumen igual de solución salina normal. Las ratas del grupo simulado se inyectaron a través de la vena de la cola con un volumen igual de solución salina normal. Las ratas del grupo de control positivo se administraron con una inyección de Nimodipina. La dosificación en el grupo de control positivo fue 1,2 mg/kg por animal para tres dosificaciones y una sola dosificación fue de 0,4 mg/kg por cada animal.

1.3.3 Determinación de la Puntuación del Déficit Neurológico y del Tamaño del Infarto Cerebral

Puntuación del déficit neurológico: Los síntomas del déficit neurológico se evaluaron de acuerdo con el sistema de puntuación Bederson modificado de 5 puntos. Los síntomas del déficit neurológico después de un trauma cerebral en ratas se evaluaron usando un procedimiento ciego simple. Es decir, el diseñador del experimento marcó los animales en grupos, mientras que el realizador del experimento que puntuó los síntomas de déficit neurológico los cegó para el agrupamiento de los animales. Después de la finalización de la evaluación, el puntuador presentó el resultado de puntuación de los animales marcados al diseñador. El diseñador abrió el experimento y obtuvo la puntuación de cada animal en grupos respectivos.

Puntuación del Déficit Neurológico: El criterio en detalle del sistema de puntuación de 5 puntos Bederson es:

- 0: Ambas extremidades superiores del animal se extienden hacia el suelo cuando el animal se mantiene suspendido sujetando la cola del animal, y no se observa ningún otro defecto de comportamiento.
- 1: El animal en su extremidad superior (izquierda) opuesta al lado lesionado muestra la flexión de la muñeca y el codo, la aducción del hombro, la abducción del codo y una estrecha fijación a la pared torácica.
- 2: Al poner al animal en una placa lisa y empujar el hombro en el lado lesionado hacia el lado opuesto, se encuentra una resistencia reducida.
- 3: Cuando anda en libertad, el animal hace un movimiento circular opuesto al lado lesionado.
- 4: El animal muestra los miembros flácidos y paralizados y no tiene movimiento activo de los miembros.

Determinación del área de infarto cerebral y lesión cerebral: El animal se anestesió con hidrato de cloral al 10% y se decapitó para obtener el cerebro. Después de retirar el rinencéfalo, el cerebelo y el tronco cerebral inferior, la sangre sobre la superficie cerebral se lavó con una solución salina normal y el agua residual sobre la superficie se secó. Después de colocarse a -80 °C durante 7 min, el cerebro se recogió y la sección inmediatamente coronal se hizo verticalmente y hacia abajo desde el quiasma óptico, y así el cerebro se cortó en rodajas hacia atrás cada 2 mm. Las rodajas de cerebro se sumergieron en 20 g/l de una solución de tinción de TTC (37 °C, 90 min) recién formulada en 0,2 mol/l de PBS a pH 7,4-7,8. Los tejidos cerebrales normales se tiñeron de color carmesí, mientras que los tejidos cerebrales isquémicos parecían de color blanco. Después del aclarado con una solución salina normal, las rodajas de cerebro se dispusieron en una fila secuencial y rápidamente. El agua residual sobre la superficie se secó y las

rodajas se fotografiaron. Los tejidos cerebrales izquierdo y derecho se separaron y se pesaron respectivamente como $P_{\text{izquierdo}}$ (peso del cerebro izquierdo) y P_{derecho} (peso del cerebro derecho). Se añadieron 15 ml de una solución de exacción recién formulada (DMSO (dimetilsulfóxido):etanol = 1:1) a los tejidos cerebrales izquierdo y derecho respectivamente. Los tejidos se extrajeron a 25 °C durante 24 horas en la oscuridad. La sustancia de color rojo generada, formazan, se extrajo lo suficiente hasta que las rodajas de cerebro se volvieron de color blanco.

(1) los análisis de las fotos se fabricaron usando un software de análisis de imágenes. El área de isquemia derecha (blanco) y el área total derecha se marcaron, y el porcentaje del área de infarto se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ del área de infarto} = 100 \times \frac{\text{área de isquemia total}}{\text{área total derecha}}$$

(2) La absorbancia de los extractos respectivos (solución de extracto de 100 μl + extracto de 1900 μl) se determinó a 485 nm y se hizo un promedio a partir de cuatro determinaciones independientes para producir $A_{\text{izquierda}}$ y A_{derecha} . El porcentaje de lesión cerebral se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de lesión cerebral} = 100 \times \left(1 - \frac{A_{\text{derecho}} \times P_{\text{izquierdo}}}{A_{\text{izquierdo}} \times P_{\text{derecho}}}\right)$$

1.3.4 Análisis estadístico

Los datos cuantitativos se expresaron en media \pm DT. Las puntuaciones del área de infarto cerebral y el déficit neurológico se evaluaron por un ANOVA de una vía. La importancia de la diferencia entre los dos grupos se determinó mediante la prueba de Scheffé. Se comparó la mortalidad animal entre los grupos mediante una prueba X^2 . $P < 0,05$ se definió como una diferencia significativa.

2. Resultados

2.1 Efectos sobre los síntomas de déficit neurológico

Las puntuaciones de los síntomas de déficit neurológico se mostraron en la Tabla 3. En comparación con el grupo modelo, las formulaciones de Edaravona y borneol natural en diversas proporciones y Nimodipina mejoraron significativamente los síntomas de déficit neurológico ($F_{4,35} = 14,59$, $P = 0,000$). Se demostró que la Edaravona y el borneol natural en combinación pueden mejorar significativamente los síntomas de déficit neurológico.

Tabla 3: Efectos de la Edaravona (A) y el borneol natural (B) en combinación sobre los síntomas de déficit neurológico

Grupo	Modelo	Nimodipina	A:B = 2:1	A:B = 1:1	A:B = 1:2
media \pm DT	2,6 \pm 0,52	1,1 \pm 0,58 *	0,81 \pm 0,26 *	1,1 \pm 0,35 *	1,5 \pm 0,76 *
X \pm DT, n = 8; * $P < 0,05$, en comparación con el grupo modelo.					

2.2 Efectos sobre el área de infarto cerebral

Las áreas de infarto cerebral en diversos grupos se mostraron en la Tabla 4. En comparación con el grupo modelo, el tratamiento con Edaravona y borneol natural en las proporciones de 2:1 y 1:1, y con Nimodipina, redujo significativamente el área de infarto cerebral ($F_{4,35} = 5,38$, $P = 0,002$). En comparación con el grupo modelo, el tratamiento con Edaravona y borneol natural en una proporción de 1:2 tiene la tendencia de reducir el área de infarto cerebral ($F_{4,35} = 5,38$, $P = 0,358$).

Tabla 4: Efectos de la Edaravona (A) y el borneol natural (B) en combinación sobre área de infarto cerebral

Grupo	Modelo	Nimodipina	A:B = 2:1	A:B = 1:1	A:B = 1:2
media \pm DT	27,4 \pm 13,4	8,8 \pm 4,0 *	9,4 \pm 4,9 *	10,8 \pm 5,0 *	17,2 \pm 14,7 *
X \pm DT, n = 8; * $P < 0,05$, en comparación con el grupo modelo.					

2.3 Efectos sobre una lesión cerebral

Las lesiones cerebrales en diversos grupos se mostraron en la Tabla 5. En comparación con el grupo modelo, el

tratamiento con Edaravona y borneol natural en las proporciones de 2:1 y 1:1, y con Nimodipina, redujo significativamente la gravedad de la lesión cerebral ($F_{4,35} = 5,36$, $P = 0,002$). En comparación con el grupo modelo, el tratamiento con Edaravona y borneol natural en una proporción de 1:2 tiene la tendencia de reducir la gravedad de la lesión cerebral ($F_{4,35} = 5,36$, $P = 0,239$).

5

Tabla 5: Efectos de la Edaravona (A) y el borneol natural (B) en combinación sobre una lesión cerebral

Grupo	Modelo	Nimodipina	A:B = 2:1	A:B = 1:1	A:B = 1:2
media \pm DT	33,2 \pm 14,8	11,6 \pm 5,0 *	11,7 \pm 6,4 *	11,1 \pm 6,8 *	19,3 \pm 18,2 *
X \pm DT, n = 8; * P<0,05, en comparación con el grupo modelo.					

Ejemplo 18

10

1 Materiales y Procedimientos

1.1 Animales: Ratas Wistar macho sanas con un peso de 280-320 g.

15

1.2 Fármacos y Reactivos: Edaravona para inyección (2 mg/ml) del Ejemplo 1, y Edaravona + borneol natural para inyección de los Ejemplos 5, 7 y 11.

1.3 Procedimientos

20

Los procedimientos experimentales y los procedimientos de evaluación son los mismos que para el Ejemplo 13.

2. Resultados

25

2.1 Efectos sobre los síntomas de déficit neurológico

Las puntuaciones de los síntomas del déficit neurológico se mostraron en la Tabla 6. En comparación con el grupo modelo, el tratamiento con Edaravona y borneol natural en diversas proporciones, y con Nimodipina, mejoró significativamente los síntomas de déficit neurológico ($F_{4,35} = 10,31$, $P = 0,000$). Se demostró que la Edaravona y el borneol natural en combinación pueden mejorar significativamente los síntomas de déficit neurológico.

30

Tabla 6: Efectos sobre los síntomas de déficit neurológico con Edaravona (A) y el borneol natural (B) en combinación

Grupo	Modelo	Edaravona (3 mg/kg)	A:B = 2:1	A:B = 1:1	A:B = 9:2
media \pm DT	2,7 \pm 0,5	0,94 \pm 0,46 *	1,1 \pm 0,54 *	1,3 \pm 0,87 *	1,6 \pm 0,55 *
X \pm DT, n = 8; * P<0,05, en comparación con el grupo modelo.					

35

2.2 Efectos sobre el área de infarto cerebral

Las áreas de infarto cerebral en diversos grupos se mostraron en la Tabla 7. En comparación con el grupo modelo, el tratamiento con Edaravona y borneol natural en una proporción de 2:1, y con 3 mg/kg de Edaravona, redujo significativamente el área de infarto cerebral ($F_{4,35} = 4,62$, $P = 0,03$). En comparación con el grupo modelo, el tratamiento con Edaravona y borneol natural en las proporciones de 4:1 y 9:1 tenía la tendencia de reducir el área de infarto cerebral ($F_{4,35} = 4,62$, $P = 0,081$).

40

Tabla 7: Efectos de la Edaravona (A) y el borneol natural (B) en combinación sobre el área de infarto cerebral

Grupo	Modelo	Edaravona (3 mg/kg)	A:B = 2:1	A:B = 1:1	A:B = 9:2
media \pm DT	25,4 \pm 14,8	9,7 \pm 4,6 *	10,3 \pm 5,3 *	14,6 \pm 10,9	16,5 \pm 11,0
X \pm DT, n = 8; * P<0,05, en comparación con el grupo modelo.					

45

2.3 Efectos sobre la lesión cerebral

Las lesiones cerebrales en diversos grupos se mostraron en la Tabla 8. En comparación con el grupo modelo, el tratamiento con Edaravona y borneol natural en una proporción de 2:1, y con 3 mg/kg de Edaravona redujo significativamente la gravedad de la lesión cerebral ($F_{4,35} = 5,78$, $P = 0,04$). En comparación con el grupo modelo, el tratamiento con Edaravona y borneol natural en las proporciones de 4:1 y 9:1 tenía la tendencia de reducir la gravedad de la lesión cerebral ($F_{4,35} = 5,78$, $P = 0,159$).

50

Tabla 8: Efectos de la Edaravona (A) y el borneol natural (B) en combinación sobre la lesión cerebral

Grupo	Modelo	Edaravona (3 mg/kg)	A:B = 2:1	A:B = 1:1	A:B = 9:2
media \pm DT	32,2 \pm 15,1	11,6 \pm 9,7 *	13,1 \pm 8,3 *	22,3 \pm 17,7	23,9 \pm 19,8
X \pm DT, n = 8; * P<0,05, en comparación con el grupo modelo.					

Ejemplo 19

- 5 1 Materiales y Procedimientos
- 1.1 Animales: 36 conejos New Zealand, calidad general, con un peso corporal de 2,0-3,0 kg, 18 ♀ y 18 ♂ (hembra y macho), respectivamente.
- 10 1.2 Fármacos y Reactivos: fármacos obtenidos de los Ejemplos 12, 13, 14 y 15; 1,2-propilenglicol, inyección de cloruro sódico al 0,9%.
- 15 1.3 Dosificación y Agrupación
- | | |
|---------------------|---|
| Disolvente | Inyección de cloruro sódico al 0,9% (en peso) 10 ml/kg |
| Vehículo | Solución de propilenglicol al 40% (en volumen) 10 ml/kg |
| Edaravona | 80 mg/kg (contenido de propilenglicol: 40%) |
| Edaravona | 20 mg/kg (contenido de propilenglicol: 10%) |
| Edaravona Combinada | 120 mg/kg (contenido de propilenglicol: 50%) |
| Edaravona combinada | 30 mg/kg (contenido de propilenglicol: 10%) |

La Edaravona combinada en este Ejemplo se refiere a Edaravona + borneol natural (proporción en peso = 2:1).

20 En los grupos de dosificaciones anteriores, la dosificación por día por conejo se calculó de acuerdo con el peso real de cada conejo. Los fármacos de prueba se administraron en un volumen igual de acuerdo con el peso corporal de los conejos respectivos.

2. Procedimientos

25 Se numeraron 36 conejos y se dividieron de forma aleatoria en seis grupos de acuerdo con el peso corporal, incluyendo 4 grupos de dosificación, "Edaravona + borneol natural (proporción en peso = 2:1)" 120 mg/kg, 30 mg/kg; "Edaravona" 80 mg/kg, 20 mg/kg; así como un grupo de vehículo (solución de propilenglicol al 40%) y un grupo de disolvente (inyección de cloruro sódico al 0,9%). Había 6 conejos en cada grupo, incluyendo 3 machos y 3 hembras

30 en cada uno. Los conejos se habituaron y se observaron durante 3 días antes de la prueba. Durante la prueba, los conejos se dosificaron una vez al mismo tiempo cada mañana a través de una inyección en la vena marginal de la oreja. Los conejos en los grupos de alta dosificación se dosificaron continuamente durante 13 días, mientras que en los grupos de baja dosificación, el grupo de disolvente y el grupo de vehículo durante 20 días. Las dosificaciones se regularon de acuerdo con la variación del peso corporal. Las respuestas animales, las estimulaciones en los sitios de inyección y el examen histopatológico en los riñones y el sitio de inyección se usaron para evaluar extensamente la

35 toxicidad de la Edaravona combinada o la Edaravona en los conejos.

3. Resultados

40 Hematuria: Durante la administración intravenosa continua, tuvo lugar la hematuria temporal de 30 min a 2 h después de la administración en grupos tratados con 80 mg/kg o 20 mg/kg de Edaravona, 120 mg/kg o 30 mg/kg de Edaravona combinada, o 10 ml/kg de una solución de propilenglicol al 40%. La incidencia de hematuria fue del 100% en el grupo de 80 mg/kg de Edaravona, del 100% en el grupo de 20 mg/kg de Edaravona, del 100% en el grupo de 120 mg/kg de Edaravona combinada, del 50% en el grupo de 30 mg/kg de Edaravona combinada, del 100% en el grupo de 10 ml/kg de solución de propilenglicol al 40%. Sin embargo, no hubo hematuria en el grupo de inyección de

45 cloruro sódico al 0,9%.

50 Necropsia macroscópica y exámenes histopatológicos: 1) Necropsia macroscópica: En el grupo de 80 mg/kg de Edaravona, 3 de 6 conejos tenían color caqui e inflamación renal con superficie desigual, uno de los conejos padecía hepatonecrosis y tenía un color caqui e hígado duro. En el grupo de 20 mg/kg de Edaravona, 3 de 6 conejos tenían una inflamación renal. En el grupo de 120 mg/kg de Edaravona combinada, 2 de 6 conejos tenían un color claro e inflamación renal. No se observaron cambios obvios en el riñón en el grupo de 30 mg/kg de Edaravona combinada y el grupo de 10 ml/kg de una solución de propilenglicol al 40%. 2) Examen histopatológico: En los grupos de de 80 mg/kg y 20 mg/kg de Edaravona y los grupos de 120 mg/kg y 30 mg/kg de Edaravona combinada, se observaron

5 cambios estimuladores, tales como oclusión vascular en varios grados en los sitios de inyección. En los grupos anteriores, también se observaron lesiones renales de los conejos, cuyas manifestaciones principales fueron lesión renal progresiva, tales como lesión tubular renal, infiltración inflamatoria del mesenquimo, y lesión glomerular. En el grupo de 10 ml/kg de una solución de propilenglicol al 40%, también tuvieron lugar cambios estimuladores, tales como oclusión vascular en los sitios de inyección, mientras que solo se observó una hinchazón renal tubular moderada y degeneración vacuolar de sus riñones.

10 Se concluyó a partir de los resultados experimentales anteriores que, en las condiciones de dosificación anteriores, 1: La Edaravona y la Edaravona combinada muestran sustancialmente efectos estimuladores similares sobre los sitios de inyección de los conejos. 2: Edaravona induce más incidencia de hematuria en conejos que la Edaravona combinada. 3: Edaravona tiene mayor toxicidad en el riñón de los conejos que la Edaravona combinada. Solo se describen algunas realizaciones preferidas de la presente invención como las indicadas anteriormente. Se ha de observar que el experto en la técnica puede hacer mejoras y/o modificaciones adicionales sin apartarse del espíritu de la presente invención, que aún se reivindican en la presente invención.

15

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona y borneol.
- 5 2. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** la proporción en peso de 3-metil -1-fenil-2-pirazolin-5-ona con respecto a borneol es de 4:1 a 1:4.
- 10 3. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** la proporción en peso de 3-metil -1-fenil-2-pirazolin-5-ona con respecto a borneol es 4:1
4. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada porque** la proporción en peso de 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona con respecto a borneol es de 2:1 a 1:2.
- 15 5. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** la proporción en peso de 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona con respecto a borneol es 2:1.
6. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada porque** el borneol es borneol natural.
- 20 7. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada porque** la composición comprende adicionalmente un disolvente.
8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizada porque** el disolvente es un disolvente orgánico soluble en agua, o una mezcla del disolvente orgánico soluble en agua y agua.
- 25 9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizada porque** el disolvente orgánico soluble en agua es propilenglicol.
10. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en el tratamiento de una enfermedad cerebrovascular.
- 30 11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizada porque** la enfermedad cerebrovascular es enfermedad cerebrovascular isquémica.
- 35 12. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizada porque** la enfermedad cerebrovascular es infarto cerebral.