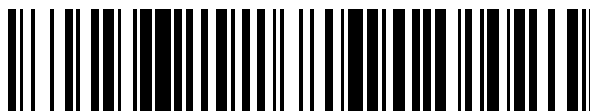


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 476 041**

51 Int. Cl.:

A61K 31/407 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2010** **E 10796931 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.05.2014** **EP 2452679**

54 Título: **Agente citoprotector trifenilfenólico**

30 Prioridad:

06.07.2009 JP 2009160278

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.07.2014

73 Titular/es:

**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO
UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND
TECHNOLOGY (33.3%)
3-8-1 Harumi-cho Fuchu-shi
Tokyo 183-8538, JP;
SHOWA UNIVERSITY (33.3%) y
TMS CO., LTD. (33.3%)**

72 Inventor/es:

**HONDA, KAZUO;
HASHIMOTO, TERUMASA;
SHIBATA, KEITA;
HASEGAWA, KEIKO y
HASUMI, KEIJI**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 476 041 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

Agente citoprotector trifenílfenólico

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un agente citoprotector.

10 **Técnica anterior**

Se entiende por daño isquémico un estado patológico que incluye todos y cada uno de los síntomas producidos por un flujo sanguíneo restringido en cualquier parte del cuerpo, en el que las células se necrotizan por el agotamiento de energía en una región isquémica, de modo que la región entra en disfunción. Como método de tratamiento para un caso en el que la isquemia está producida por un trombo, se ha perseguido el desarrollo de un fármaco trombolítico y una terapia con fármaco trombolítico usando el mismo con el objeto de lisar el trombo para recuperar el suministro de sangre a la región isquémica.

Por ejemplo, se ha desarrollado un fármaco trombolítico de alteplasa (activador de plasminógeno tisular de ADN recombinante, rt-PA) que centra su atención en la acción del activador de plasminógeno (t-PA). Según Brain Res., 2000; 854: 245-248, la alteplasa activa el plasminógeno dando lugar a plasmina, y la plasmina degrada la fibrina, que constituye un núcleo para generar un trombo.

Además, los compuestos de SMTP (triprenilfenol de *Stachybotrys microspora*) son un grupo de compuestos que tienen un esqueleto de triprenilfenol producido por una bacteria filamentososa, y se sabe que tienen una acción de estimulación de la trombólisis o una acción inhibidora de la vascularización según la patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2004-224737, la patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2004-224738 y el documento WO2007/111203. Con respecto a la acción de estimulación de la trombólisis, se indica un mecanismo de acción en FEBS Letter, 1997; 418: 58-62, de que un compuesto de SMTP produce un cambio en la conformación del plasminógeno dando como resultado un aumento en la sensibilidad del plasminógeno a t-PA y la unión del plasminógeno sobre un trombo, etc., para promover la lisis del trombo.

Sumario de la invención

Problema técnico

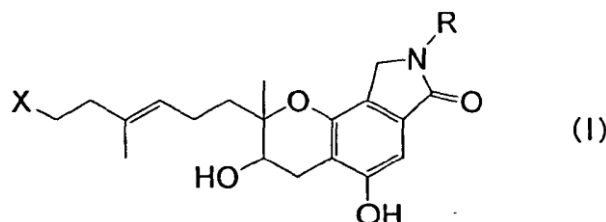
Cuando se elimina un trombo mediante la administración de un fármaco trombolítico y se restablece el flujo sanguíneo en la región en la que se ha producido isquemia, surge el problema del denominado daño por isquemia-reperusión. En el cerebro, por ejemplo, puede aumentarse el edema cerebral o puede tener lugar una hemorragia intracraneal. Por consiguiente, es importante el desarrollo de un fármaco que tenga una acción citoprotectora para reducir el riesgo de diversos daños celulares producidos por isquemia, especialmente el riesgo de daño por isquemia-reperusión.

En lo que se refiere a un compuesto de SMTP, puesto que tiene una acción de activación del plasminógeno, se ha supuesto que presentaría una acción de estimulación de la trombólisis, pero todavía no se conocen otros efectos del mismo sobre el daño isquémico.

En vista de lo anterior, la presente invención pretende proporcionar un agente citoprotector con eficacia superior en la inhibición de la disfunción producida por la isquemia, así como un uso novedoso de un compuesto de triprenilfenol como fármaco según las reivindicaciones.

Solución al problema

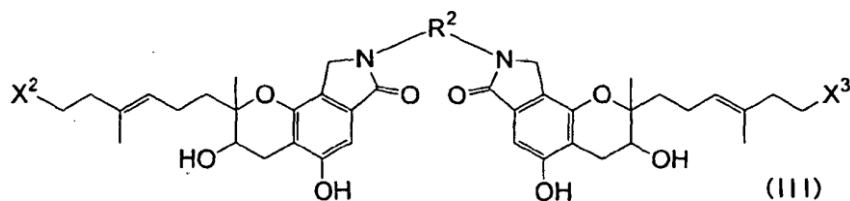
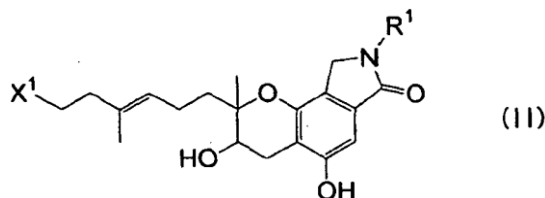
Un aspecto de la presente invención es un agente citoprotector para su uso con respecto al daño isquémico que comprende como principio activo un compuesto de triprenilfenol representado por la siguiente fórmula general (I) según las reivindicaciones.



En la fórmula general (I), X es -CH₂-C(CH₃)₂Z, Y y Z son cada uno independientemente -H u -OH, o forman juntos

un enlace sencillo, y R representa un átomo de hidrógeno o un sustituyente con un peso molecular de 1000 o menos.

- 5 Los ejemplos específicos del compuesto de triprenilfenol representado por la fórmula general (I), en la que R es un sustituyente con un peso molecular de 1000 o menos incluyen un compuesto de triprenilfenol representado por la siguiente fórmula general (II) o (III).

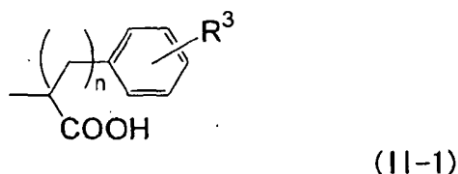


En la fórmula general (II) o (III), X¹, X² y X³ son cada uno independientemente -CHY-C(CH₃)₂Z; Y y Z son cada uno independientemente -H u -OH, o forman juntos un enlace sencillo; R¹ representa uno cualquiera entre los siguientes (A) a (D):

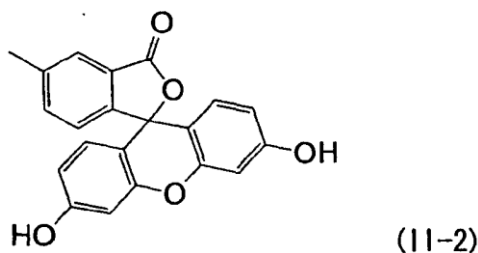
(A) un residuo de un compuesto de amino seleccionado del grupo que consiste en un aminoácido natural, un isómero D de un aminoácido natural y un compuesto derivado sustituyendo un grupo carboxilo en un aminoácido natural o un isómero D de un aminoácido natural por un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo hidroximetilo, del que se ha eliminado un grupo amino (siempre que se excluya -(CH)₂-OH);

(B) un grupo aromático que tiene al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo, un grupo sulfónico y un grupo amino secundario como sustituyente o parte de un sustituyente, o un grupo aromático que contiene un grupo amino secundario y puede contener un átomo de nitrógeno;

(C) un residuo de aminoácido aromático representado por la siguiente fórmula (II-1);



En la fórmula (II-1), R³ es un sustituyente, que puede estar presente o ausente, que representa al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo y un grupo alquilo C1 a C5, y n representa un número entero de 0 ó 1; o (D) un sustituyente representado por -L¹-L²-R⁴, en el que L¹ representa un grupo de unión que comprende un grupo alquileo C1 a C4 que tiene un grupo carboxilo, L² representa un grupo de unión expresado por -NH-C(=O)- o -NHC(=S)-NH- y R⁴ representa un grupo 9-fluorenilalquiloxilo que tiene un grupo alquiloxilo C1 a C3 o un grupo poliheterocíclico representado por la siguiente fórmula (II-2),



y R² representa un residuo de un compuesto de amino seleccionado del grupo que consiste en un aminoácido natural con dos grupos amino, un isómero D de un aminoácido natural con dos grupos amino, un compuesto derivado sustituyendo un grupo carboxilo en un aminoácido natural con dos grupos amino o un isómero D de un

aminoácido natural con dos grupos amino por un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo hidroximetilo, compuestos representados por $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$ (siendo n un número entero de desde 0 hasta 9), y compuestos representados por $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_m-\text{S}_p-(\text{CH}_2)_q-\text{CH}(\text{COOH})-\text{NH}_2$ (siendo cada uno de m , p y q independientemente un número entero de desde 0 hasta 9), de los que se han eliminado dos grupos amino.

Con respecto a un agente citoprotector según la presente invención, el daño isquémico es preferiblemente trombosis (incluyendo tromboembolia; a continuación en el presente documento se aplicará lo mismo). Además, con respecto al agente citoprotector según la presente invención, el daño isquémico es más preferiblemente infarto cerebral.

Efectos ventajosos de la invención

Según la presente invención, puede proporcionarse un agente citoprotector que tiene eficacia superior en la inhibición de la disfunción producida por isquemia, así como un uso novedoso de un compuesto de triprenilfenol como fármaco, según las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La figura 1 es un diagrama que muestra el porcentaje de área de infarto cerebral en el ejemplo 2 según la presente invención.

[Figura 2] La figura 2 es un diagrama que muestra el síntoma neurológico en el ejemplo 2 según la presente invención.

[Figura 3] La figura 3 es un diagrama que muestra el porcentaje de área de infarto cerebral en el ejemplo 3 según la presente invención.

[Figura 4] La figura 4 es un diagrama que muestra el síntoma neurológico en el ejemplo 3 según la presente invención.

[Figura 5] La figura 5 es un diagrama que muestra el porcentaje de edema en el ejemplo 3 según la presente invención.

Descripción de las realizaciones

A continuación se describirá en más detalle un agente citoprotector según la presente invención. Un intervalo numérico expresado en el presente documento mediante “de a a b ” significa un intervalo que incluye a y b como valor mínimo y valor máximo.

Un agente citoprotector según la presente invención contiene un compuesto de triprenilfenol representado por la fórmula general (I) como principio activo y se usa contra el daño isquémico.

Un compuesto de triprenilfenol representado por la fórmula general (I) según la presente invención (a continuación en el presente documento denominado ocasionalmente “un compuesto de triprenilfenol según la presente invención”) protege a las células de resultar dañadas por daño isquémico e inhibe la disfunción producida por la isquemia, aunque la acción y el mecanismo específicos del mismo todavía no se han aclarado.

En este sentido, “daño isquémico” se entiende generalmente como un estado patológico que incluye todos y cada uno de los síntomas producidos por el flujo sanguíneo restringido a cualquier parte del cuerpo. Concretamente, se entiende que las células resultan dañadas por el agotamiento de energía en una región isquémica, o que las células resultan dañadas tras la recuperación del flujo sanguíneo (daño por isquemia-reperfusión) con motivo del daño isquémico, por lo que se produce disfunción en la región. Según la presente invención, se piensa que el compuesto de triprenilfenol inhibe eficazmente el daño por isquemia-reperfusión. Con respecto a esto, la acción anterior es diferente de reanudar el flujo sanguíneo hacia la región isquémica y restablecer el suministro de energía promoviendo la lisis de un trombo, inhibiendo de ese modo el daño celular.

Además, “disfunción producida por isquemia” en el presente documento incluye todos y cada uno de los síntomas expresados como resultado de un flujo sanguíneo restringido en cualquier parte del cuerpo.

“Inhibición de la disfunción” es un concepto que también incluye “mejora de la disfunción”, y la eficacia de la misma puede evaluarse por el tamaño de una región dañada y por la gravedad de un síntoma de una enfermedad particular. Por ejemplo, con respecto a la disfunción cerebral, la eficacia puede evaluarse por el tamaño de un área cerebral dañada o por el tamaño de un edema reconocido por TC, IRM, angiografía cerebral, o similar, o la eficacia puede evaluarse por un indicador, tal como un síntoma neurológico, la alteración de la actividad de la vida diaria, la parálisis motriz, o similar, que aparecen como síntomas. Además, la eficacia puede evaluarse por el grado de aumento de interleucina-1 β (IL-1 β), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) o similar, cuya expresión está potenciada por la inflamación de tejidos.

Con el fin de ejercer eficazmente la función de un agente citoprotector según la presente invención, resulta eficaz usarlo con respecto a trombosis, que es un tipo de daño isquémico. Generalmente, la trombosis se entiende como un estado en el que la sangre se solidifica intravascularmente. Los ejemplos específicos de un estado patológico o una enfermedad incluyen ataque isquémico transitorio, síndrome de coagulación intravascular diseminada, miangiopatía trombótica, flebitis trombótica, trombosis venosa profunda, trombosis idiopática, infarto cerebral (trombosis cerebral, embolia cerebral), infarto de miocardio y tromboembolia pulmonar. En particular, puede usarse un agente citoprotector según la presente invención favorablemente con respecto a infarto cerebral.

Un compuesto de triprenilfenol que va a contenerse como principio activo en un agente citoprotector según la presente invención es un compuesto de triprenilfenol representado por la fórmula general (I). Un agente citoprotector según la presente invención contiene al menos 1 compuesto de triprenilfenol según la presente invención como principio activo.

En la fórmula general (I), X es $-\text{CHY}-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{Z}$, e Y y Z son cada uno independientemente $-\text{H}$ u $-\text{OH}$, o forman juntos un enlace sencillo. R representa un átomo de hidrógeno o un sustituyente con un peso molecular de 1000 o menos. Como sustituyente con un peso molecular de 1000 o menos, es preferible un sustituyente con el peso molecular de 800 o menos, es más preferible un sustituyente con el peso molecular de 700 o menos, y es preferible adicionalmente un sustituyente con el peso molecular de 600 o menos, desde el punto de vista de la eficacia como agente citoprotector.

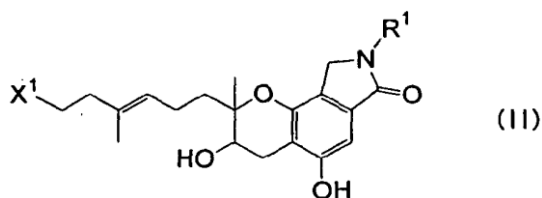
Como compuesto de triprenilfenol según la presente invención, puede utilizarse el obtenido mediante síntesis química, así como el obtenido mediante la purificación de un cultivo de una bacteria filamentosas, por ejemplo *Stachybotrys microspora*. Los ejemplos de un método para obtener un compuesto de triprenilfenol según la presente invención mediante la purificación de un cultivo de una bacteria filamentosas incluye un método que comprende la purificación de un compuesto objeto a partir de un cultivo que va a obtenerse añadiendo un compuesto de amino orgánico aditivo predeterminado a un líquido de cultivo de *Stachybotrys microspora*. Un método de este tipo se describe, por ejemplo, en la patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2004-224737, la patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2004-224738 y el documento WO 2007/111203.

Con respecto a un compuesto de triprenilfenol según la presente invención, pueden utilizarse un enantiómero, un diastereómero y una mezcla de enantiómeros o una mezcla de diastereómeros. Puede obtenerse un enantiómero, un diastereómero y una mezcla de enantiómeros o una mezcla de diastereómeros de este tipo mediante síntesis química o mediante la purificación de un cultivo de una bacteria filamentosas. En caso de que se obtenga mediante la purificación de un cultivo de una bacteria filamentosas, puede obtenerse el isómero correspondiente mediante el uso de un isómero D o un isómero L de un compuesto de amino orgánico aditivo que va a añadirse al medio de cultivo de una bacteria filamentosas.

En caso de que R de un compuesto de triprenilfenol según la presente invención sea un sustituyente con un peso molecular de 1000 o menos, los ejemplos específicos incluyen un compuesto de triprenilfenol representado por la siguiente fórmula general (II) o (III).

[Compuesto de triprenilfenol representado por la fórmula general (II)]

Uno de los ejemplos específicos de un compuesto de triprenilfenol según la presente invención es un compuesto representado por la siguiente fórmula general (II).



En la fórmula general (II), X^1 es $-\text{CHY}-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{Z}$, e Y y Z son cada uno independientemente $-\text{H}$ u $-\text{OH}$, o forman juntos un enlace sencillo.

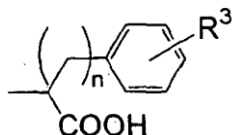
R^1 representa uno cualquiera entre los siguientes (A) a (D):

(A) un residuo de un compuesto de amino seleccionado del grupo que consiste en un aminoácido natural, un isómero D de un aminoácido natural y un compuesto derivado sustituyendo un grupo carboxilo en un aminoácido natural o un isómero D de un aminoácido natural por un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo hidroximetilo, del que se ha eliminado un grupo amino (siempre que se excluya $-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$);

(B) un grupo aromático que tiene al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un grupo carboxilo, un

grupo hidroxilo, un grupo sulfónico y un grupo amino secundario como sustituyente o parte de un sustituyente, o un grupo aromático que contiene un grupo amino secundario y puede contener un átomo de nitrógeno;

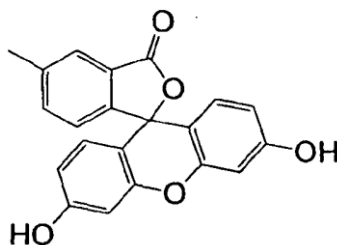
(C) un residuo de aminoácido aromático representado por la siguiente fórmula (II-1):



(II-1)

en la que R^3 es un sustituyente, que puede estar presente o ausente, que representa al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo y un grupo alquilo C1 a C5, y n representa un número entero de 0 ó 1; o

(D) un sustituyente representado por $-L^1-L^2-R^4$, en el que L^1 representa un grupo de unión que comprende un grupo alquileo C1 a C4 que tiene un grupo carboxilo, L^2 representa un grupo de unión expresado por $-NH-C(=O)-$ o $-NH-C(=S)-NH-$, y R^4 representa un grupo 9-fluorenilalquiloxilo que tiene un grupo alquiloxilo C1 a C3 o un grupo poliheterocíclico representado por la siguiente fórmula (II-2):



(II-2)

Se describirá un compuesto según la fórmula general (II), en la que R^1 es (A).

(A) es un residuo de un compuesto de amino seleccionado del grupo que consiste en un aminoácido natural, un isómero D de un aminoácido natural y un compuesto derivado sustituyendo un grupo carboxilo en un aminoácido natural o un isómero D de un aminoácido natural por un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo hidroximetilo, del que se ha eliminado un grupo amino (siempre que se excluya $-(CH)_2-OH$).

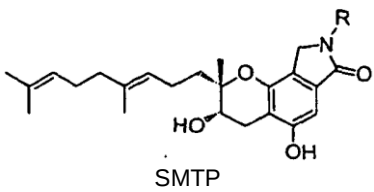
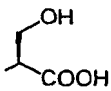
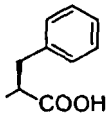
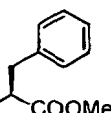
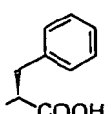
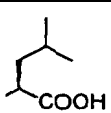
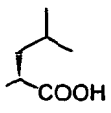
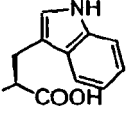
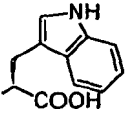
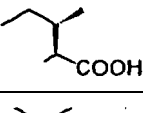
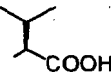
No hay restricción particular en el aminoácido natural en la medida en que sea un aminoácido que puede existir de manera natural, los ejemplos del mismo incluyen un α -aminoácido, un β -aminoácido, un γ -aminoácido y un δ -aminoácido. Un aminoácido de este tipo puede obtenerse de un producto natural, o de manera artificial por medio de una síntesis orgánica o de otro modo.

Los ejemplos de un aminoácido natural incluyen, como α -aminoácido, glicina, alanina, treonina, valina, isoleucina, tirosina, cisteína, cistina, metionina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina, arginina, lisina, hidroxilisina, ornitina, citrulina, homocisteína, 3,4-dihidroxifenilalanina, homocistina, ácido diaminopimélico, ácido diaminopropiónico, serina, leucina, fenilalanina y triptófano; como β -aminoácido, β -alanina; como γ -aminoácido, ácido γ -aminobutírico y carnitina; y como δ -aminoácido, ácido 5-aminolevulínico y ácido 5-aminovalérico.

Los ejemplos de un compuesto derivado sustituyendo un grupo carboxilo en el aminoácido natural y un isómero D del aminoácido natural por un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo hidroximetilo incluyen un aminoalcohol y una amina. Los ejemplos del aminoalcohol incluyen 2-aminoetanol.

Los ejemplos específicos de un compuesto según la fórmula general (II), en la que R^1 es (A), incluyen los compuestos mostrados en la siguiente tabla 1. "Compuesto de amino orgánico aditivo" en la tabla significa un compuesto de amino orgánico aditivo de este tipo tal como se usa, cuando se obtiene un compuesto de triprenilfenol mediante la purificación de un cultivo obtenido añadiendo un compuesto de amino orgánico aditivo predeterminado a un líquido de cultivo de *Stachybotrys microspora* (a continuación en el presente documento se aplicará lo mismo).

[Tabla 1]

 SMTP			
Compuesto n.º	Masa molecular	R=	Compuesto de amino orgánico aditivo
SMTP-3	473,6		L-serina
SMTP-4	533,7		L-fenilalanina
SMTP-4Me	547,7		éster metílico de L-fenilalanina
SMTP-4D	533,7		D-fenilalanina
SMTP-5	499,6		L-leucina
SMTP-5D	499,6		D-leucina
SMTP-6	572,7		L-triptófano
SMTP-6D	572,7		D-triptófano
SMTP-10	499,6		L-isoleucina
SMTP-11	485,6		L-valina
SMTP-12	457,6		L-glicina
SMTP-13	517,7		L-metionina

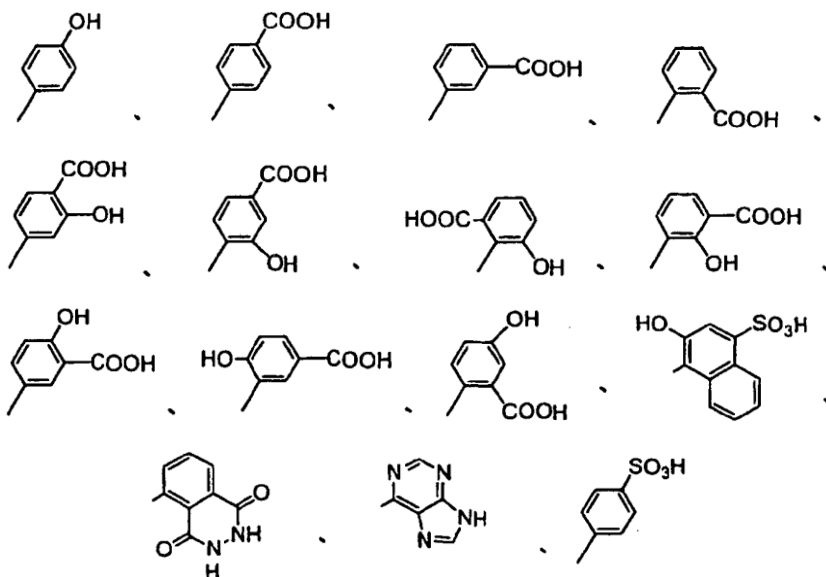
SMTP-14	549,7		L-tirosina
SMTP-15	542,7		L-arginina

Un compuesto mostrado en la tabla 1 anterior puede usarse favorablemente como compuesto de triprenilfenol según la presente invención.

5 Se describirá un compuesto según la fórmula general (II), en la que R^1 es (B).

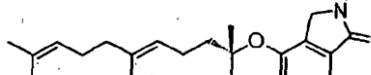
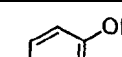
(B) es un grupo aromático que tiene al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo, un grupo sulfónico y un grupo amino secundario como sustituyente o parte de un sustituyente, o un grupo aromático que contiene un grupo amino secundario y puede contener un átomo de nitrógeno.

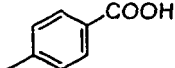
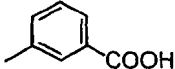
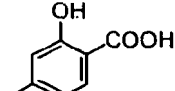
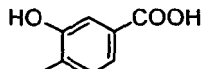
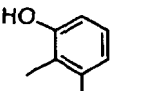
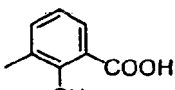
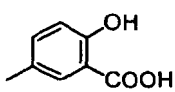
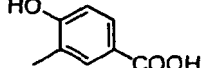
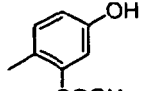
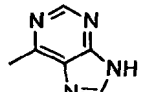
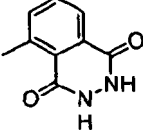
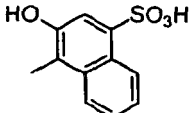
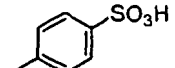
Los ejemplos del grupo aromático incluyen un compuesto expresado por las siguientes fórmulas estructurales.



Los ejemplos específicos de un compuesto según la fórmula general (II), en la que R^1 es (B), incluyen los compuestos mostrados en la siguiente tabla 2.

[Tabla 2]

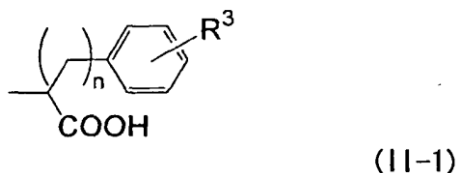
 SMTP			
Compuesto n.º	Masa molecular	R=	Compuestos de amino orgánico aditivo
SMTP-18	477,6		p-aminofenol

SMTP-19	505,6		ácido p-aminobenzoico
SMTP-20	505,6		ácido m-aminobenzoico
SMTP-21	505,6		ácido o-aminobenzoico
SMTP-22	521,6		ácido 4-aminosalicílico
SMTP-23	521,6		ácido 4-amino-3-hidroxybenzoico
SMTP-24	521,6		ácido 3-hidroxiantranílico
SMTP-25	521,6		ácido 3-aminosalicílico
SMTP-26	521,6		ácido 5-aminosalicílico
SMTP-27	521,6		ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico
SMTP-28	521,6		ácido 5-hidroxiantranílico
SMTP-32	503,6		adenina o adenosina
SMTP-36	545,3		5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazindiona
SMTP-37	607,7		ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico
SMTP-42	541,7		ácido p-sulfanílico

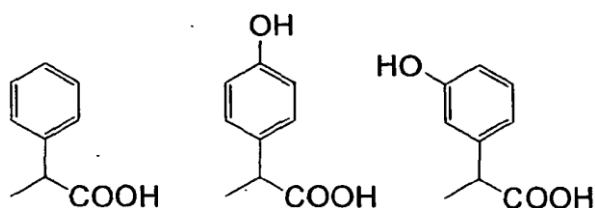
Un compuesto mostrado en la tabla 2 anterior puede usarse favorablemente como compuesto de triprenilfenol según la presente invención.

Se describirá un compuesto según la fórmula general (II), en la que R^1 es (C).

- 5 (C) es un residuo de aminoácido aromático representado por la siguiente fórmula (II-1); en la que R^3 es un sustituyente, que puede estar presente o ausente, que representa al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo y un grupo alquilo C1 a C5, y n representa un número entero de 0 ó 1.



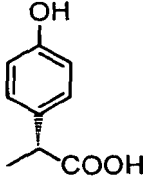
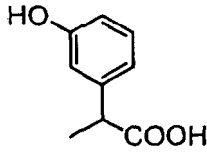
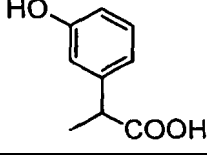
- 10 Los ejemplos de un residuo de aminoácido aromático representado por la fórmula (II-1) incluyen los compuestos representados por las siguientes fórmulas estructurales.



- 15 Los ejemplos específicos de un compuesto según la fórmula general (II), en la que R^1 es (C), incluyen los compuestos mostrados en la siguiente tabla 3.

[Tabla 3]

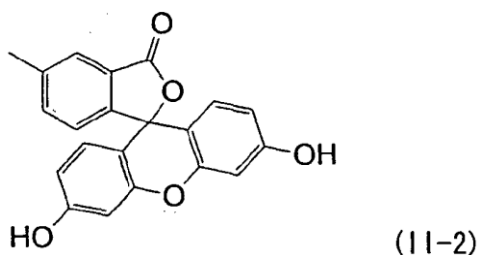
SMTP			
Compuesto n.º	Masa molecular	R=	Compuestos de amino orgánico aditivo
SMTP-43	519,6		L-fenilglicina
SMTP-43D	519,6		D-fenilglicina
SMTP-44	535,6		L-4-hidroxi-fenilglicina

SMTP-44D	535,6		D-4-hidroxi-fenilglicina
SMTP-45-I	535,6		DL-3-hidroxifenilglicina
SMTP-45-II	535,6		DL-3-hidroxifenilglicina

Un compuesto mostrado en la tabla 3 anterior puede usarse favorablemente como compuesto de triprenilfenol según la presente invención.

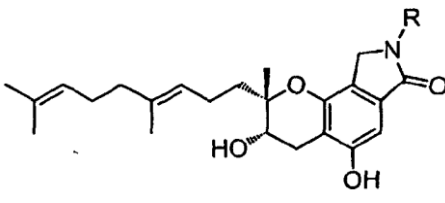
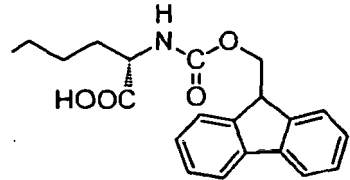
- 5 Se describirá un compuesto según la fórmula general (II), en la que R^1 es (D).

(D) es un sustituyente representado por $-L^1-L^2-R^4$, en el que L^1 representa un grupo de unión que comprende un grupo alquileo C1 a C4 que tiene un grupo carboxilo, L^2 representa un grupo de unión expresado por $-NH-C(=O)-$ o $-NH-C(=S)-NH-$, y R^4 representa un grupo 9-fluorenilalquiloilo que tiene un grupo alquiloilo C1 a C3 o un grupo poliheterocíclico representado por la siguiente fórmula (II-2).



- 15 Los ejemplos específicos de un compuesto según la fórmula general (II), en la que R^1 es (D), incluyen los compuestos mostrados en la siguiente tabla 4.

[Tabla 4]

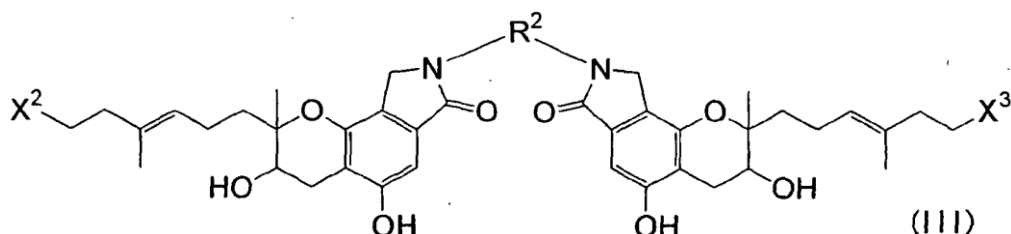
 SMTP			
Compuesto n.º	Masa molecular	R=	Compuesto de amino orgánico aditivo
SMTP-46	722,9		N-α-Fmoc-L-ornitina

SMTP-47	722,9		N-δ-Fmoc-L-ornitina
SMTP-48	890,0		N-δ-FITC-L-ornitina
SMTP-49	890,0		N-α-FITC-L-ornitina

Un compuesto mostrado en la tabla 4 anterior puede usarse favorablemente como compuesto de triprenilfenol según la presente invención.

5 [Compuesto de triprenilfenol representado por la fórmula general-(III)]

Uno de los ejemplos específicos de un compuesto de triprenilfenol según la presente invención es un compuesto representado por la siguiente fórmula general (III).



En la fórmula general (III), X^2 y X^3 son cada uno independientemente $-CHY-C(CH_3)_2Z$; Y y Z son cada uno independientemente $-H$ u $-OH$, o forman juntos un enlace sencillo. R^2 representa un residuo de un compuesto de amino seleccionado del grupo que consiste en un aminoácido natural con dos grupos amino, un isómero D de un aminoácido natural con dos grupos amino, un compuesto derivado sustituyendo un grupo carboxilo en un aminoácido natural con dos grupos amino o un isómero D de un aminoácido natural con dos grupos amino por un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo hidroximetilo, compuestos representados por $H_2N-CH(COOH)-(CH_2)_n-NH_2$ (siendo n un número entero de desde 0 hasta 9) y compuestos representados por $H_2NCH(COOH)-(CH_2)_m-Sp-(CH_2)_q-CH(COOH)-NH_2$ (siendo cada uno de m, p y q independientemente un número entero de desde 0 hasta 9), de los que se han eliminado dos grupos amino.

La n representa un número entero de desde 0 hasta 9, preferiblemente un número entero de desde 0 hasta 6, más preferiblemente un número entero de desde 1 hasta 5 y de manera adicionalmente preferible un número entero de desde 1 hasta 4.

La m representa un número entero de desde 0 hasta 9, preferiblemente un número entero de desde 0 hasta 4, más preferiblemente un número entero de desde 1 hasta 3 y de manera adicionalmente preferible 1 ó 2.

La p representa un número entero de desde 0 hasta 9, preferiblemente un número entero de desde 0 hasta 4, más preferiblemente un número entero de desde 1 hasta 3 y de manera adicionalmente preferible 1 ó 2.

La q representa un número entero de desde 0 hasta 9, preferiblemente un número entero de desde 0 hasta 4, más preferiblemente un número entero de desde 1 hasta 3 y de manera adicionalmente preferible 1 ó 2.

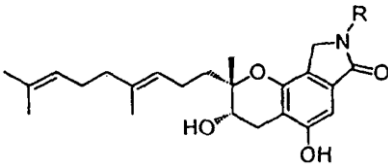
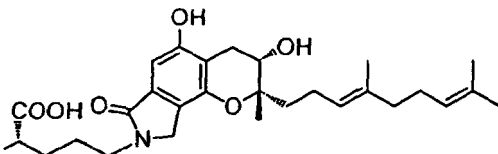
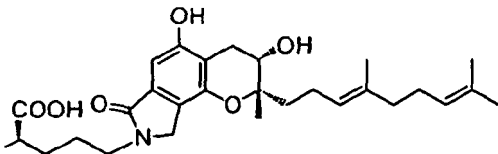
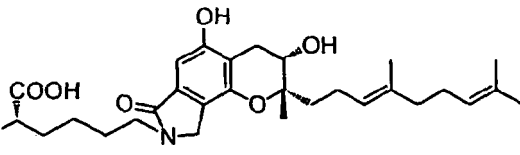
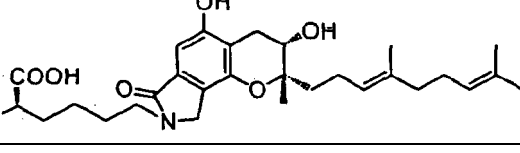
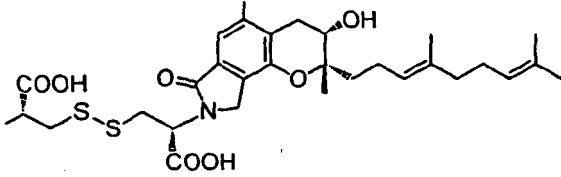
Si la p es 0, m+q es preferiblemente un número entero de desde 0 hasta 9, más preferiblemente un número entero de desde 0 hasta 6, de manera adicionalmente preferible un número entero de desde 1 hasta 5 y de manera especialmente preferible un número entero de desde 1 hasta 4.

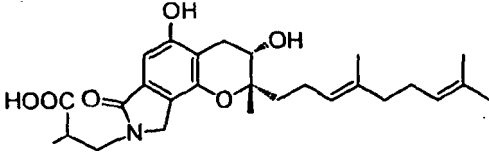
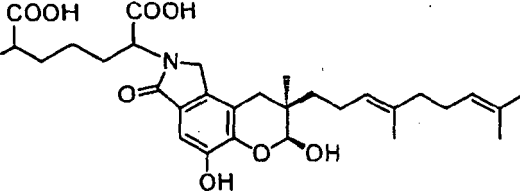
5 Los ejemplos de un aminoácido natural con 2 grupos amino incluyen, como α -aminoácido, hidroxilisina, citrulina, cistina, homocistina, ácido diaminopimélico, ácido diaminopropiónico, lisina y ornitina.

10 Los ejemplos de un compuesto derivado sustituyendo un grupo carboxilo en un aminoácido natural con 2 grupos amino y un isómero D de un aminoácido natural con 2 grupos amino por un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo hidroximetilo incluyen $H_2N-(CH_2)_k-NH_2$ (k es un número entero de desde 1 hasta 10, preferiblemente un número entero de desde 1 hasta 6 y más preferiblemente un número entero de desde 1 hasta 4).

15 Los ejemplos específicos de un compuesto representado por la fórmula general (III) incluyen los compuestos mostrados en la siguiente tabla 5.

[Tabla 5]

 SMTP			
Compuesto n.º	Masa molecular	R =	Compuesto de amino orgánico aditivo
SMTP-7	869,1		L-ornitina
SMTP-7D	869,1		D-ornitina
SMTP-8	883,1		L-lisina
SMTP-8D	883,1		D-lisina
SMTP-9	977,2		L-cistina

SMTP-29	839,1		ácido DL-2,3-diaminopropiónico
SMTP-31	925,2		ácido DL-2,6-diaminopimélico

Un compuesto mostrado en la tabla 5 anterior puede usarse favorablemente como compuesto de triprenilfenol según la presente invención.

- 5 Los ejemplos específicos de un compuesto representado por la fórmula general (I) incluyen, además de un compuesto de triprenilfenol representado por la fórmula general (II) o (III), los compuestos de triprenilfenol mostrados en la siguiente tabla 6.

[Tabla 6]

Compuesto n.º	Masa molecular	Compuestos de amino orgánico aditivo
SMTP-0	385,5	cloruro de amonio
SMTP-1	429,6	2-aminoetanol
SMTP-2	463,3	2-aminoetanol

Un compuesto mostrado en la tabla 6 anterior puede usarse favorablemente como compuesto de triprenilfenol según la presente invención.

Un compuesto de triprenilfenol según la presente invención puede usarse en forma liberada, en forma de una sal o un éster farmacéuticamente permisibles, o en forma de un solvato. Se usa favorablemente un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y un ácido orgánico, tal como ácido cítrico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido málico, ácido acético, ácido succínico, ácido tartárico, ácido metanosulfónico y ácido *p*-toluenosulfónico para formar una sal farmacéuticamente permisible de un compuesto según la presente invención. Además, un compuesto que contiene un metal alcalino, tal como sodio, potasio, calcio, y magnesio, o un metal alcalinotérreo, una amina básica y un aminoácido básico también es ventajoso para formar una sal farmacéuticamente permisible de un compuesto según la presente invención. Además, un alcohol o un ácido carboxílico C1 a C10, preferiblemente alcohol metílico, alcohol etílico, ácido acético o ácido propiónico, es ventajoso para formar un éster farmacéuticamente permisible de un compuesto según la presente invención. Además, el agua también es ventajosa para formar un solvato farmacéuticamente permisible de un compuesto según la presente invención.

No hay restricción particular en el tipo de portador o aditivo de formulación que va a usarse para preparar un agente citoprotector según la presente invención. Un agente citoprotector según la presente invención se formula usando un compuesto de triprenilfenol según la presente invención y un portador sólido farmacéuticamente permisible (por ejemplo gelatina y lactosa) o un portador líquido (por ejemplo agua, solución salina fisiológica y una disolución acuosa de glucosa).

Dependiendo del tipo de un compuesto de triprenilfenol que va a usarse como principio activo, de la gravedad del daño isquémico y de la ubicación de una parte afectada en el cuerpo, se administra preferiblemente un agente citoprotector según la presente invención a de 0,01 a 100 mg/kg como dosis eficaz única para un adulto y más preferiblemente se administra a de 0,1 a 30 mg/kg. No hay restricción particular en el número de administraciones y es aceptable el uso mediante cualquiera de administración una vez, múltiples administraciones y una administración continua. El intervalo de administración y la duración de la administración pueden seleccionarse por los expertos en la técnica según hallazgos clínicos, hallazgos de diagnóstico por imagen, hallazgos hematológicos, una enfermedad comórbida, historia pasada, etc.

Si se usa un agente citoprotector según la presente invención mediante múltiples administraciones, desde el punto de vista de un contacto sostenible de una parte afectada con el agente citoprotector según la presente invención, es preferible un modo con administraciones inmediatamente después del comienzo de un síntoma y 12 horas después del comienzo, y también es preferible un modo con una administración continua durante de 1 hora a 24 horas al día.

No hay restricción particular en el medio de administración a un adulto y pueden seleccionarse diversas vías de administración, tales como administración intravenosa, administración subcutánea, administración intramuscular y administración oral. Por ejemplo, en una fase aguda de diversas enfermedades, es preferible una administración intravenosa, más precisamente una inyección intravenosa o una infusión por goteo desde el punto de vista de una administración rápida y segura de una dosis deseada a un paciente. Por ejemplo, los expertos en la técnica pueden elegir una inyección intravenosa rápida para el 10% de una dosis única y una infusión por goteo a lo largo de 30 min a 1 hora para el 90% de la misma.

Un agente citoprotector según la presente invención puede usarse sin ninguna restricción particular en un periodo, en el que aumenta la posibilidad de daño celular producido por isquemia. Los ejemplos de "un periodo en el que aumenta la posibilidad de daño celular" incluyen un periodo afectado por las diversas trombosis descritas anteriormente. Además, puede incluirse un periodo durante o después de un tratamiento de trombosis utilizando un agente anticoagulante, un agente antiplaquetario, un fármaco trombolítico, etc. También puede incluirse un periodo después de la recuperación de la trombosis y en el periodo el agente citoprotector puede usarse profilácticamente.

Si es posible que el daño celular esté producido por isquemia, se usa el mismo sin limitación a los periodos descritos anteriormente.

Un agente citoprotector según la presente invención puede usarse de manera individual o junto con uno o más fármacos trombolíticos.

Mediante el uso combinado de un agente citoprotector según la presente invención y un fármaco trombolítico, se espera que se potencie el efecto terapéutico inhibiendo eficazmente la disfunción por daño por isquemia-reperusión producido por trombólisis debido a un fármaco trombolítico. En este caso, pueden usarse un agente citoprotector según la presente invención y un fármaco trombolítico al mismo tiempo o por separado en diferentes momentos.

Los ejemplos de un fármaco trombolítico que puede usarse en combinación incluyen alteplasa, urocinasa, desmoteplasa y monteplasa.

Un agente citoprotector según la presente invención es eficaz para un grupo de pacientes, a los que ya no puede

aplicarse más un fármaco trombolítico, porque ha pasado mucho tiempo tras el comienzo de un síntoma. En caso de infarto cerebral, es eficaz usar un agente citoprotector según la presente invención para un paciente al que, por ejemplo, no puede administrarse alteplasa, porque han pasado 3 o más horas tras el comienzo de un síntoma. Con respecto a esto, si el momento de comienzo no está claro, se considera el último momento sin síntomas (el último momento en el que se confirmó que un paciente no tenía síntomas) como el momento de comienzo.

Si se usa un agente citoprotector según la presente invención contra la trombosis (incluyendo tromboembolia), es eficaz para usarlo para un paciente para el que está contraindicado un fármaco trombolítico. También es eficaz usar un agente citoprotector según la presente invención para un paciente que ha interrumpido la administración de un fármaco trombolítico debido a la aparición de un signo o un síntoma de contraindicación durante la administración de un fármaco trombolítico. Tales contraindicaciones incluyen diátesis hemorrágica, hemorragia, hipertensión y glucemia alterada. Por ejemplo, en caso de infarto cerebral, para un paciente al que no puede administrarse un fármaco trombolítico, porque aumentaría el riesgo de hemorragia intracraneal, puede usarse un agente citoprotector según la presente invención.

Si se usa un agente citoprotector según la presente invención contra la trombosis (incluyendo tromboembolia), es eficaz usarlo para aquellos, entre los pacientes de trombosis, en los que no puede usarse habitualmente un fármaco trombolítico para tratamiento. Los ejemplos de tales pacientes incluyen pacientes de ataque isquémico transitorio, síndrome de coagulación intravascular diseminada, miangiopatía trombótica, flebitis trombótica, trombosis venosa profunda y trombosis idiopática.

Un agente citoprotector según la presente invención puede usarse sin limitación para el uso en seres humanos. Los ejemplos de otro sujeto para la aplicación incluyen un animal doméstico, tal como ganado, un caballo y una oveja, y una mascota, tal como un perro, un gato y un mono.

La presente invención incluye el tratamiento de daño isquémico incluyendo la administración de un fármaco que contiene un compuesto de triprenilfenol según la presente invención a un paciente afectado por daño isquémico según las reivindicaciones. Con respecto al tratamiento de daño isquémico según la presente invención, el término "tratamiento" significa mejora de un síntoma, que incluye inhibición del agravamiento y reducción o relajación de un síntoma.

Mediante el tratamiento de daño isquémico según la presente invención, puede lograrse la inhibición del agravamiento del daño isquémico o la reducción o relajación de un síntoma.

La dosis, el intervalo de administración, la duración de la administración y el método de administración de un fármaco que contiene un compuesto de triprenilfenol según la presente invención para un método de tratamiento de daño isquémico según la presente invención son similares a los del agente citoprotector según la presente invención descrito anteriormente.

El tratamiento de daño isquémico según la presente invención puede aplicarse favorablemente a trombosis (incluyendo también tromboembolia) como daño isquémico, y puede aplicarse más favorablemente a infarto cerebral.

Un modo del tratamiento de daño isquémico según la presente invención es el tratamiento de daño isquémico que incluye la administración de un fármaco que contiene un compuesto de triprenilfenol según la presente invención a un paciente durante un periodo en el que aumenta la posibilidad de daño celular producido por isquemia según las reivindicaciones. La expresión "un periodo en el que aumenta la posibilidad de daño celular" es tal como se describió anteriormente. El uso de este tratamiento se aplica favorablemente a trombosis (incluyendo también tromboembolia), que es un tipo de daño isquémico, y su uso con respecto a infarto cerebral es más favorable.

Un modo del tratamiento de daño isquémico según la presente invención es el tratamiento de daño isquémico que incluye el uso de un fármaco que contiene un compuesto de triprenilfenol según la presente invención junto con uno o más fármacos trombolíticos. El uso de este tratamiento se aplica favorablemente a trombosis (incluyendo también tromboembolia), que es un tipo de daño isquémico, y su uso con respecto a infarto cerebral es más favorable.

Los ejemplos de un fármaco trombolítico que va a usarse junto con un fármaco que contiene un compuesto de triprenilfenol según la presente invención incluyen alteplasa, urocinasa, desmoteplasa y monteplasa. Un fármaco que contiene un compuesto de triprenilfenol según la presente invención y un fármaco trombolítico pueden administrarse a un paciente al mismo tiempo o por separado en diferentes momentos.

Un modo de tratamiento de daño isquémico según la presente invención es el tratamiento de daño isquémico que incluye la administración de un fármaco que contiene un compuesto de triprenilfenol según la presente invención a un paciente 3 o más horas después del comienzo de un síntoma. El uso de este tratamiento se aplica favorablemente a trombosis (incluyendo también tromboembolia), que es un tipo de daño isquémico, y su uso con respecto a infarto cerebral es más favorable.

Por ejemplo, en el caso de infarto cerebral, es eficaz usar un fármaco que contiene un compuesto de triprenilfenol según la presente invención para un paciente al que no puede administrarse alteplasa porque han pasado 3 o más horas desde el comienzo de un síntoma. Con respecto a esto, si el momento de comienzo no está claro, se considera el último momento sin síntomas (el último momento en el que se confirmó que un paciente no tenía síntomas) como el momento de comienzo.

Un modo del tratamiento de daño isquémico según la presente invención es el tratamiento de daño isquémico que incluye la administración de un fármaco que contiene un compuesto de triprenilfenol según la presente invención a un paciente para el que está contraindicado un fármaco trombolítico. El uso de este tratamiento se aplica favorablemente a trombosis (incluyendo también tromboembolia), que es un tipo de daño isquémico, y su uso con respecto a infarto cerebral es más favorable.

Tales contraindicaciones incluyen diátesis hemorrágica, hemorragia, hipertensión y glucemia alterada. Por ejemplo, en el caso de infarto cerebral, para un paciente al que no puede administrarse un fármaco trombolítico porque aumentaría el riesgo de hemorragia intracraneal, puede administrarse un fármaco que contiene un compuesto de triprenilfenol según la presente invención.

El tratamiento de daño isquémico según la presente invención es un tratamiento de daño isquémico que incluye la administración de un fármaco que contiene un compuesto de triprenilfenol según la presente invención a un paciente en el que no puede usarse habitualmente un fármaco trombolítico para tratamiento. El uso de este tratamiento se aplica favorablemente a trombosis (incluyendo también tromboembolia), que es un tipo de daño isquémico, y su uso con respecto a infarto cerebral es más favorable.

Los ejemplos de un paciente en el que no puede usarse habitualmente un fármaco para tratamiento incluyen pacientes de ataque isquémico transitorio, síndrome de coagulación intravascular diseminada, miangiopatía trombótica, flebitis trombótica, trombosis venosa profunda y trombosis idiopática.

Un modo de tratamiento de daño isquémico según la presente invención es un método de tratamiento de daño isquémico que incluye la administración de un fármaco que contiene un compuesto de triprenilfenol según la presente invención a un paciente que está padeciendo o que se prevé que padezca daño por isquemia-reperfusión. El uso de este método de tratamiento se aplica favorablemente a trombosis (incluyendo también tromboembolia), que es un tipo de daño isquémico, y su uso con respecto a infarto cerebral es más favorable.

Mediante el tratamiento de daño isquémico anterior, puede lograrse la prevención del daño por isquemia-reperfusión, la inhibición del agravamiento o la reducción o relajación de un síntoma.

Ejemplos

La presente invención se describirá ahora mediante los ejemplos de la misma. A menos que se especifique otra cosa en el presente documento, "%" es en masa.

(Ejemplo 1)

[Producción de modelo de infarto cerebral usando ácido acético]

[Modelo de infarto cerebral de jerbo de Mongolia]

Se indujo anestesia en un jerbo de Mongolia macho (peso corporal de 55 a 65 g) mediante inhalación de isoflurano al 5% (nombre comercial Escain, Milan Inc.) y se mantuvo con isoflurano a del 1 al 1,5%. Se fijó el jerbo de Mongolia en posición dorsal, y se eliminó el pelo del cuello y entonces se desinfectó con etanol al 70%. Tras la incisión media del cuello, se separó la arteria carótida común derecha, se pinzó para bloquear el flujo sanguíneo temporalmente y se recubrió con ácido acético al 100% mediante 30 movimientos de vaivén para producir un trombo. Volvió a abrirse el vaso sanguíneo tras 10 min de bloqueo del flujo sanguíneo para transferir el trombo por el torrente sanguíneo al interior del cerebro para hacerlo isquémico y generar un infarto cerebral. Se cerró el campo de operación con un adhesivo instantáneo (nombre comercial Aron Alpha (Krazy Glue), Toagosei Co., Ltd.) y se desinfectó con etanol al 70%.

[Evaluación del síntoma neurológico]

Veinticuatro horas después del inicio de la operación, se observaron los síntomas neurológicos como indicador para infarto cerebral. Se han notificado muchos tipos de síntomas neurológicos específicos para infarto cerebral, tales como extensión de una extremidad posterior o realización de círculos en un sentido. Aplicando un método de evaluación modificado del método propuesto por Longa, *et al.* (Stroke 1989; 20:84-91) se evaluaron los síntomas neurológicos posoperatorios según: sin déficit, 0; extensión de la extremidad, 1; realización de círculos en un sentido, 2; postura inclinada, 3; disminución del movimiento, 4.

Con respecto al análisis estadístico, para comparaciones múltiples se realizó en primer lugar un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y luego se realizó una prueba de Bonferroni, si se detecta diferencia significativa. Se reconoció positivamente la diferencia significativa con el nivel de significación del 5% ($P < 0,05$). Todos los resultados se expresan en media $\pm$ error estándar.

5

[Evaluación del porcentaje de área de infarto]

Tras la evaluación de los síntomas neurológicos según el método anterior, se decapitó al animal bajo anestesia con isoflurano. Se exfolió la piel del hueso craneal y se abrió y, tras la escisión del nervio óptico, se extirpó el cerebro y se sumergió en solución salina fisiológica para eliminar los pelos corporales unidos, etc. Se colocó el cerebro extirpado en una matriz cerebral (RBM-1000C, ASI Instruments) para llevar a cabo el corte coronal desde el polo frontal con un grosor de 2 mm. Se sumergieron los cortes en cloruro de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolio (TTC) al 2% y se incubaron para su tinción a 37°C durante 30 min en un incubador de CO₂. El TTC incoloro se reduce por el hidrógeno liberado por la acción de la deshidrogenasa contenida en una célula normal convirtiéndose en 1,3,5-trifenilformazán (TPF) insoluble en agua de color rojo oscuro, de modo que se tiñe la célula normal. El área no teñida (área blanca) se definió como área de infarto. Mientras, el cuerpo calloso, que son las fibras de la comisura que conectan los hemisferios cerebrales derecho e izquierdo, no se tiñe y es blanco, y por tanto se realizó procesamiento de imágenes para los análisis tal como se describe a continuación excluyendo el cuerpo calloso.

Tras la tinción, se tomaron imágenes de los cortes cerebrales mediante una cámara digital bajo un microscopio estereoscópico. Para el análisis del porcentaje de área de infarto se usó un software de análisis de imágenes Image J (versión 1.4). Se convirtieron las imágenes completas, excluyendo el cuerpo calloso, de las imágenes tomadas de los cortes cerebrales 2º, 3º y 4º, a escala de grises. A partir de las imágenes en escala de grises se obtuvo un histograma para el cerebro completo como el alcance de objeto que muestra en el eje de ordenadas la frecuencia de aparición (frecuencia) a determinado brillo, y que muestra en el eje de abscisas el brillo (de 0 a 255). Se definió la suma desde 0 hasta 255 como el tamaño de área del cerebro completo, y se definió la suma desde 160 hasta 219 como el tamaño de área del área de infarto. Entonces se determinó el porcentaje de área de infarto según la siguiente fórmula usando el tamaño de área total de las áreas de infarto y el tamaño de área total del cerebro completo, de las 3 imágenes de corte cerebral. Se realizó el análisis estadístico igual que antes.

Porcentaje de área de infarto (%) = $\frac{\text{Tamaño de área total de áreas de infarto excluyendo el cuerpo calloso}}{\text{tamaño de área total del cerebro completo}} \times 100$

[Modelo de infarto cerebral de ratón]

Usando un ratón de la línea ddY macho (peso corporal de 35 a 45 g), se produjo un modelo de infarto cerebral y se evaluó acerca de los síntomas neurológicos y el porcentaje de área de infarto según métodos similares al método de producción y el método de evaluación para el modelo de infarto cerebral de jerbo de Mongolia.

(Ejemplo 2)

[Comparación de la eficacia de diversos fármacos en el modelo de infarto cerebral de jerbo de Mongolia]

Se comparó la eficacia de mejora de SMTP-7, alteplasa y edaravona (fármaco cerebroprotector) sobre el porcentaje de área de infarto y el síntoma neurológico usando el modelo de infarto cerebral de jerbo de Mongolia. Al mismo tiempo se investigó la dependencia de la dosis del grado de mejora.

Se produjo SMTP-7 según un procedimiento descrito en la patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2004-224738 mediante la purificación de un cultivo obtenido añadiendo L-ornitina como compuesto de amino orgánico aditivo a un medio de cultivo de *Stachybotrys microspora*, cepa IFO30018. A SMTP-7 producido a través de purificación y desecado, se le añadieron NaOH 0,3 N y solución salina fisiológica (NaCl al 0,9%) para preparar una disolución de 50 mg/ml. Después de eso, se ajustó la disolución a 10 mg/ml y pH alcalino débil con HCl 0,3 N y solución salina fisiológica, se sometió a esterilización por filtración, se dividió en pequeñas fracciones y se crioconservó a -30°C. Se usó el SMTP-7 tras dilución según la necesidad con solución salina fisiológica.

Se disolvió el SMTP-7 crioconservado como anteriormente a 1 mg/ml en solución salina fisiológica justo antes de una prueba. Se disolvió alteplasa (nombre comercial Activacin, Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.) en un disolvente para Activacin a 1,03 mg/ml. En cuanto a edaravona (nombre comercial Radicut, Mitsubishi Tanabe Pharma Corp.), se usó una disolución madre de 1,5 mg/kg. Se usaron los medicamentos anteriores tras dilución según la necesidad con solución salina fisiológica.

Se fijaron las dosis de SMTP-7 a 0,1 mg/kg, 1 mg/kg y 10 mg/kg; las dosis de alteplasa a 0,01 mg/kg, 0,1 mg/kg y 10 mg/kg; y las dosis de edaravona a 1 mg/kg, 3 mg/kg y 10 mg/kg.

Se comenzaron las administraciones de SMTP-7 y alteplasa 1 hora, 3 horas o 6 horas después del inicio de la isquemia de un modelo de infarto cerebral de jerbo de Mongolia. Se comenzó la administración de edaravona

inmediatamente después (0 horas), 1 hora después o 3 horas después del inicio de la isquemia.

Se indujo anestesia en un modelo de infarto cerebral de jerbo de Mongolia mediante inhalación de isoflurano al 5% y después se mantuvo a del 1 al 1,5%, de modo que una administración debe poder comenzar en cuanto haya transcurrido el tiempo definido anterior desde el inicio de la isquemia. Se fijó el jerbo de Mongolia en posición dorsal y se insertó un catéter de polietileno con una aguja 27G en la vena femoral izquierda. Se administraron SMTP-7 y alteplasa a través del catéter, siendo el 10% de la dosis mediante administración en bolo y el resto mediante una administración continua a lo largo de 30 min. Se administró edaravona de manera continua a lo largo de 30 min. Se usaron seis jerbos de Mongolia para cada estado.

Veinticuatro horas después del inicio de la operación, se examinaron los síntomas neurológicos de los jerbos de Mongolia respectivos para clasificar el síntoma neurológico. Entonces se extirpó el cerebro de cada jerbo de Mongolia y se midió el área de infarto y se determinó el porcentaje de área de infarto. El porcentaje de área de infarto y las puntuaciones del síntoma neurológico se muestran en la tabla 7. Además, para SMTP-7 y alteplasa, con respecto a grupos de administración de 10 mg/kg, se muestra el porcentaje de área de infarto en la figura 1 y se muestra la puntuación del síntoma neurológico en la figura 2 (*: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ##: $P < 0,01$), en la que t-PA en las figuras significa alteplasa (a continuación en el presente documento se aplicará lo mismo).

[Tabla 7]

	Área de infarto [%]						Puntuaciones neurológicas			
Simulado	2,9 ± 0,2						0 ± 0			
Control	14,9 ± 3,08						3,33 ± 0,67			
	Tiempo de inicio de la administración						Tiempo de inicio de la administración			
	0 h	1 h	3 h	6 h			0 h	1 h	3 h	6 h
SMTP-7 (1 mg/kg)	-	11,4 ± 2,69	-	-			-	2,67 ± 0,33		-
SMTP-7 (10 mg/kg)	-	7,01 ± 0,56**	590 ± 0,36**	7,93 ± 1,64**			-	1,50 ± 0,67*	1,67 ± 0,61*	2,00 ± 0,45
alteplasa (0,01 mg/kg)	-	11,2 ± 2,74	-	-			-	2,67 ± 0,56	-	-
alteplasa (0,1 mg/kg)	-	9,67 ± 2,35	-	-			-	2,00 ± 0,77	-	-
alteplasa (10 mg/kg)	-	5,43 ± 1,33##	11,0 ± 3,61	13,8 ± 2,40			-	0,17 ± 0,17##	1,33 ± 0,67##	3,17 ± 0,48
edaravona (1 mg/kg)	-	12,8 ± 2,87	-	-			-	3,17 ± 0,17	-	-
edaravona (3 mg/kg)	9,95 ± 3,22	8,29 ± 1,61*	12,3 ± 5,59	-			1,50 ± 0,67*	1,50 ± 0,67*	2,50 ± 0,56	-
edaravona (10 mg/kg)	-	9,29 ± 2,17	-	-			-	1,83 ± 0,65	-	-
argatroban (1 mg/kg)	10,0 ± 2,66	12,1 ± 2,46	-	-			2,33 ± 0,61	2,50 ± 0,50	-	-
argatroban (10 mg/kg)	-	11,5 ± 2,57	-	-			-	2,50 ± 0,56	-	-
ticlopidina HCl (1 mg/kg)	8,83 ± 1,73	13,1 ± 3,89	-	-			2,33 ± 0,42	2,67 ± 0,56	-	-
ticlopidina HCl (10 mg/kg)	-	9,84 ± 1,81	-	-			-	2,33 ± 0,42	-	-

La expresión numérica representa: media ± DE (n=6)

Simulado: Grupo de tratamiento simulado para generar infarto cerebral

*, P<0,05; **, P<0,01 (Se compararon los valores del control y los valores de los grupos de administración de SMTP-7 (10 mg/kg), y los valores del control y los valores de los grupos de administración de edaravona (3 mg/kg) mediante ANOVA y después de eso mediante la prueba de Bonferroni). #, P<0,05; ##, P<0,01 (Se compararon los valores del control y los valores de los grupos de administración de alteplasa (10 mg/kg) mediante ANOVA y después de eso mediante la prueba de Bonferroni).

Cuando se administró SMTP-7 1 hora después del inicio de la isquemia, se reconoció una mejora dependiente de la dosis del porcentaje de área de infarto y el síntoma neurológico. En el grupo de administración de 10 mg/kg, tanto para el porcentaje de área de infarto como para el síntoma neurológico, se reconoció una mejora significativa en comparación con el grupo control.

Con respecto al porcentaje de área de infarto en el grupo de administración de SMTP-7 (10 mg/kg), hubo una mejora estadísticamente significativa en comparación con el grupo control, aunque se retrasara el momento de inicio de la administración tras el inicio de la isquemia (se iniciaron las administraciones 1 hora, 3 horas y 6 horas después del inicio de la isquemia). La tasa de mejora del grupo, para el que se inició la administración 1 hora después del inicio de la isquemia, fue del 65,7% mostrando eficacia casi equivalente al caso de administración de alteplasa, cuya tasa de mejora fue del 78,9%.

Con respecto a la puntuación del síntoma neurológico de los grupos de administración de SMTP-7 (10 mg/kg), para los que se inició la administración 1 hora después o 3 horas después del inicio de la isquemia, no hubo mejora notable en comparación con el grupo de administración de alteplasa (10 mg/kg), pero se reconoció una mejora estadísticamente significativa en comparación con el grupo control. En el grupo de administración de SMTP-7 (10 mg/kg), para el que se iniciaron las administraciones 6 horas después del inicio de la isquemia, no se reconoció una mejora estadísticamente significativa, pero se reconoció cierta tendencia a la mejora.

Cuando se administró alteplasa 1 hora después del inicio de la isquemia, se reconoció una mejora dependiente de la dosis del porcentaje de área de infarto y el síntoma neurológico. En el grupo de administración de 10 mg/kg, tanto para el porcentaje de área de infarto como para el síntoma neurológico, se reconocieron diferencias significativas en comparación con el grupo control.

Entre los grupos de administración de alteplasa (10 mg/kg), se reconoció una mejora significativa en el porcentaje de área de infarto en comparación con el grupo control en el caso de la administración 1 hora después del inicio de la isquemia. En el caso de la administración 3 horas después del inicio de la isquemia, se reconoció cierta tendencia a la mejora, pero no se reconoció una mejora significativa en comparación con el grupo control. En el caso de la administración 6 horas después del inicio de la isquemia, no hubo diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo control.

Con respecto a la puntuación del síntoma neurológico de los grupos de administración de alteplasa (10 mg/kg), para los que se inició la administración 1 hora después o 3 horas después del inicio de la isquemia, se reconoció una mejora significativa en comparación con el grupo control. Sin embargo, en el caso de la administración 6 horas después del inicio de la isquemia, no hubo diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo control.

Cuando se administró edavarona 1 hora después del inicio de la isquemia, se reconoció una mejora dependiente de la dosis del porcentaje de área de infarto y el síntoma neurológico. En el grupo de administración de 3 mg/kg, tanto para el porcentaje de área de infarto como para el síntoma neurológico, se reconoció una mejora significativa en comparación con el grupo control. Al aumentar la dosis hasta 10 mg/kg, no se reconoció una mejora adicional de la eficacia y se mantuvo el mismo nivel.

Entre los grupos de administración de edaravona (3 mg/kg), se reconoció tendencia de mejora en el caso de la administración 0 horas o 1 hora después del inicio de la isquemia. No se reconoció una mejora en el caso de la administración 3 horas después del inicio de la isquemia.

Con respecto a la puntuación del síntoma neurológico entre los grupos de administración de edaravona (3 mg/kg), se reconoció una mejora significativa en el caso de la administración 0 horas o 1 hora después del inicio de la isquemia. No se reconoció una mejora significativa en el caso de la administración 3 horas después del inicio de la isquemia.

(Ejemplo 3)

[Comparación de eficacia entre SMTP-7 y alteplasa en el modelo de infarto cerebral de ratón]

Se comparó la eficacia de mejora de SMTP-7 y alteplasa sobre el porcentaje de área de infarto, el síntoma neurológico y el porcentaje de edema usando el modelo de infarto cerebral de ratón. Al mismo tiempo se investigó la dependencia de la dosis del grado de mejora de SMTP-7.

Se prepararon SMTP-7 y alteplasa como en el ejemplo 2. Se administraron diez mg/kg de cada uno en la vena femoral 1 hora o 3 horas después del inicio de la isquemia en un modelo de infarto cerebral de ratón, en el que el 10% se administró mediante administración en bolo y el resto mediante administración continua a lo largo de 30 min. Además, se administraron 0,1 mg/kg ó 1 mg/kg de SMTP-7 en la vena femoral 1 hora después del inicio de la isquemia en un modelo de infarto cerebral de ratón, en el que el 10% se administró mediante administración en bolo y el resto mediante administración continua a lo largo de 30 min. Se usaron seis ratones para cada estado.

Veinticuatro horas después del inicio de la operación, se examinó el síntoma neurológico de cada ratón para clasificar el síntoma neurológico. Entonces, se extirpó el cerebro de cada ratón y se midió el área de infarto y se determinó el porcentaje de área de infarto. Se determinó el porcentaje de edema según la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de edema (\%)} = (\text{Volumen del hemisferio cerebral afectado por isquemia} - \text{Volumen del otro hemisferio cerebral}) / \text{Volumen del otro hemisferio cerebral} \times 100$$

Los resultados de la evaluación para SMTP-7 y alteplasa a la dosis de 10 mg/kg se muestran en la tabla 8. El porcentaje de área de infarto de los mismos se muestra en la figura 3, la puntuación del síntoma neurológico se muestra en la figura 4 y el porcentaje de edema se muestra en la figura 5. (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; #, $P < 0,05$; ##, $P < 0,01$)

Los resultados de la evaluación de SMTP-7 a diferentes dosis se muestran en la tabla 9.

[Tabla 8]

	Área de infarto [%]		Puntuaciones neurológicas		Porcentaje de edema [%]	
Simulado	$2,99 \pm 0,27$		0 ± 0		$0,568 \pm 0,796$	
Control	$11,9 \pm 2,54$		$3,17 \pm 0,477$		$13,2 \pm 1,76$	
	Tiempo de inicio de la administración		Tiempo de inicio de la administración		Tiempo de inicio de la administración	
	1 h	3 h	1 h	3 h	1 h	3 h
SMTP-7	$4,87 \pm 1,06^{**}$	$5,05 \pm 0,576^{**}$	$1,67 \pm 0,422^{*}$	$1,33 \pm 0,558^{**}$	$5,81 \pm 0,967^{**}$	$6,23 \pm 1,07^{**}$
alteplasa	$6,15 \pm 1,94^{\#}$	$11,9 \pm 2,26$	$1,17 \pm 0,749^{##}$	$2,50 \pm 0,500$	$3,63 \pm 2,67^{##}$	$12,6 \pm 1,84$
La expresión numérica representa: media $\pm$ DE (n=6) Simulado: Grupo de tratamiento simulado para generar infarto cerebral *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ (Se compararon los valores del control y los valores de los grupos de administración de SMTP-7 mediante ANOVA y después de eso mediante la prueba de Bonferroni). #, $P < 0,05$; ##, $P < 0,01$ (Se compararon los valores del control y los valores de los grupos de administración de alteplasa mediante ANOVA y después de eso mediante la prueba de Bonferroni).						

Se reconoció un aumento significativo en el porcentaje de área de infarto en el grupo control en comparación con el grupo simulado (grupo de tratamiento simulado para generar infarto cerebral).

Entre los grupos de administración de alteplasa, se reconoció una mejora significativa en el porcentaje de área de infarto en comparación con el grupo control en el grupo que había iniciado la administración 1 hora después del inicio de la isquemia. En el grupo que había iniciado la administración 3 horas después del inicio de la isquemia, no se reconoció una mejora significativa en comparación con el grupo control.

Entre los grupos de administración de SMTP-7 (10 mg/kg), se reconoció una mejora significativa en el porcentaje de área de infarto en comparación con el grupo control tanto en el grupo que había iniciado la administración después de 1 hora como en el grupo que había iniciado la administración después de 3 horas.

Se reconoció un aumento significativo en la puntuación del síntoma neurológico en el grupo control en comparación con el grupo simulado (grupo de tratamiento simulado para generar infarto cerebral).

Entre los grupos de administración de alteplasa, se reconoció una mejora significativa en la puntuación del síntoma neurológico en el grupo que había iniciado la administración después de 1 hora. En el grupo que había iniciado la administración después de 3 horas, no se reconoció una mejora significativa.

Entre los grupos de administración de SMTP-7 (10 mg/kg), se reconoció una mejora estadísticamente significativa en la puntuación del síntoma neurológico en comparación con el grupo control tanto en el grupo que había iniciado la administración después de 1 hora como en el grupo que había iniciado la administración después de 3 horas.

Con respecto al porcentaje de edema, entre los grupos de administración de alteplasa, se reconoció una mejora significativa en el grupo que había iniciado la administración después de 1 hora, pero no se reconoció una mejora significativa en el grupo que había iniciado la administración después de 3 horas.

Entre los grupos de administración de SMTP-7 (10 mg/kg), se reconoció una mejora significativa en comparación con el grupo control tanto en el grupo que había iniciado la administración después de 1 hora como en el grupo que había iniciado la administración después de 3 horas.

[Tabla 9]

		Área de infarto [%]	Puntuaciones neurológicas	Porcentaje de edema [%]
Simulado		2,99 ± 0,27	0 ± 0	0,568 ± 0,796
Control		11,9 ± 2,54	3,17 ± 0,477	13,2 ± 1,76
SMTP-7	0,1 mg/kg	10,08 ± 2,07	2,5 ± 0,5	10,15 ± 1,817
	1 mg/kg	6,66 ± 0,71*	2 ± 0,632	8,81 ± 2,292
	10 mg/kg	4,87 ± 1,06**	1,67 ± 0,422*	5,81 ± 0,967**
La expresión numérica representa: media ± DE (n=6) Simulado: Grupo de tratamiento simulado para generar infarto cerebral *, P<0,05; **, P<0,01 (Comparación con los valores del control mediante ANOVA y después de eso mediante la prueba de Bonferroni).				

- 5 Se reconoció una mejora significativa en cualquiera del porcentaje de área de infarto, la puntuación del síntoma neurológico y el porcentaje de edema en comparación con el grupo control en el grupo de administración de SMTP-7 (10 mg/kg) y el grupo de administración de SMTP-7 (1 mg/kg).

(Ejemplo 4)

- 10 [Comparación de eficacia entre SMTP-7 y alteplasa sobre el flujo sanguíneo cerebral]

Se comparó la eficacia de mejora de SMTP-7 y alteplasa sobre el flujo sanguíneo cerebral usando el modelo de infarto cerebral de ratón.

- 15 Se prepararon SMTP-7 y alteplasa como en el ejemplo 2. Se administraron SMTP-7 y alteplasa en una cantidad de 10 mg/kg en la vena femoral 1 hora después del inicio de la isquemia en un modelo de infarto cerebral de ratón, en el que el 10% se administró mediante administración en bolo y el resto mediante administración continua a lo largo de 30 min. Se usaron tres ratones para cada estado.

- 20 Se midió el flujo sanguíneo cerebral en 6 puntos de tiempo, concretamente antes del inicio de la isquemia, inmediatamente después del inicio de la isquemia y después de la finalización de la administración del fármaco a las 0 horas (inmediatamente después la finalización), 1 hora, 3 horas y 24 horas.

- 25 Se realizó La medición del flujo sanguíneo cerebral cortando piel de la cabeza de un ratón para exponer el hueso craneal y midiendo el flujo sanguíneo de todas las superficies cerebrales mediante un aparato de láser-Doppler (moorFLPI, Moor Instruments Ltd., RU). Se realizó el análisis usando moorFLPI (Versión 2,1) mediante la clasificación del porcentaje (%) en relación con el valor antes del el inicio de la isquemia de cada grupo. Los resultados se muestran en la tabla 10.

30

[Tabla 10]

	Antes del inicio de la isquemia	Inmediatamente después del inicio de la isquemia	Tras finalizar la administración			
			0 h	1 h	3 h	24 h
Control	100%	30,61 ± 2,22%	45,08 ± 7,99%	38,52 ± 2,92%	31,97 ± 4,92%	43,37 ± 7,51%
alteplasa	100%	27,30 ± 2,35%	56,45 ± 14,70%	73,49 ± 20,33%*	66,83 ± 11,10%*	71,63 ± 6,06%*
SMTP-7	100%	34,17 ± 5,22%	43,74 ± 12,67%	44,48 ± 12,59%	48,90 ± 15,89%	76,01 ± 9,71%*

La expresión numérica representa: media ± DE (n=3)
 *, P<0,05 (Comparación con los valores inmediatamente después del inicio de la isquemia mediante ANOVA y después de eso mediante la prueba de Bonferroni).

En el grupo de administración de SMTP-7 la recuperación del flujo sanguíneo cerebral fue más lenta que en el grupo de administración de alteplasa, pero 24 horas después de la finalización de la administración, el flujo sanguíneo cerebral se recuperó al mismo nivel que el grupo de administración de alteplasa. Hubo una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo control.

(Ejemplo 5)

[Estudio de eficacia de compuesto de triprenilfenol en modelo de infarto cerebral de ratón]

Se estudio la eficacia de mejora en el modelo de infarto cerebral de ratón usando SMTP-6, SMTP-22, SMTP-25, SMTP-43 y SMTP-44D como compuestos de triprenilfenol.

Se preparó el SMTP-6 usado de manera idéntica a SMTP-7, excepto porque se usó L-triptófano como compuesto de amino orgánico aditivo. Se preparó el SMTP-22 usado de manera idéntica a SMTP-7, excepto porque se usó ácido 4-aminosalicílico como compuesto de amino orgánico aditivo. Se preparó el SMTP-25 usado de manera idéntica a SMTP-7, excepto porque se usó ácido 3-aminosalicílico como compuesto de amino orgánico aditivo. Se preparó el SMTP-43 usado de manera idéntica a SMTP-7, excepto porque se usó L-fenilglicina compuesto de amino orgánico aditivo. Se preparó el SMTP-44D usado de manera idéntica a SMTP-7, excepto porque se usó D-4-hidroxifenilglicina como compuesto de amino orgánico aditivo. Con estos compuestos de triprenilfenol, se prepararon disoluciones de 50 mg/ml añadiendo NaOH 0,3 N y una solución salina fisiológica (NaCl al 0,9%). Después de eso, se ajustaron las disoluciones a 10 mg/ml y pH alcalino débil con HCl 0,3 N y una solución salina fisiológica, se sometieron a esterilización por filtración, se dividieron en pequeñas fracciones y se crioconservaron a -30°C.

Se disolvieron los compuestos de triprenilfenol crioconservados a 1 mg/ml en una solución salina fisiológica justo antes de la prueba. Se administraron diez mg/kg de cada uno en la vena femoral 1 hora después del inicio de la isquemia en un modelo de infarto cerebral de ratón, en el que el 10% se administró mediante administración en bolo y el resto mediante administración continua a lo largo de 30 min. Se usaron seis ratones para cada estado.

Veinticuatro horas después del inicio de la operación, se evaluaron el porcentaje de área de infarto, el síntoma neurológico y el porcentaje de edema de cada ratón. Los resultados de la evaluación se muestran en la tabla 11. En la tabla 11 también se muestran los resultados de la evaluación del grupo, en la que se inició la administración de SMTP-7 (10 mg/kg) después de 1 hora en el ejemplo 3.

[Tabla 11]

	Área de infarto [%]	Puntuaciones neurológicas	Porcentaje de edema [%]
Simulado	2,99 ± 0,27	0 ± 0	0,568 ± 0,796
Control	11,9 ± 2,54	3,17 ± 0,477	13,2 ± 1,76
SMTP-7	4,87 ± 1,06**	1,67 ± 0,422*	5,81 ± 0,967**
SMTP-6	9,81 ± 1,43	3 ± 0,447	9,80 ± 2,74
SMTP-22	4,37 ± 0,51**	1,67 ± 0,422*	4,55 ± 0,99**
SMTP-25	10,16 ± 1,04	2,5 ± 0,5	10,95 ± 2,57
SMTP-43	5,70 ± 1,17**	1,5 ± 0,5*	3,28 ± 1,37**
SMTP-44D	7,75 ± 2,71	2,17 ± 0,401	6,86 ± 2,92*
La expresión numérica representa: media ± DE (n=6) Simulado: Grupo de tratamiento simulado para generar infarto cerebral *, P<0,05; **, P<0,01 (Comparación con los valores del control mediante ANOVA y después de eso mediante la prueba de Bonferroni).			

En el grupo de administración de SMTP-22 y el grupo de administración de SMTP-43 se reconoció una mejora significativa en el porcentaje de área de infarto, la puntuación del síntoma neurológico y el porcentaje de edema.

(Ejemplo 6)

[Estudio de cambio de parámetros mediante un método de RT-PCR en tiempo real]

Usando el modelo de infarto cerebral de ratón, se evaluaron los cambios de parámetros relacionados con la inflamación entre los grupos de administración del compuesto de triprenilfenol (10 mg/kg), los grupos de administración de alteplasa (10 mg/kg) y el grupo de administración combinada de alteplasa (10 mg/kg) y aspirina (10 mg/kg) mediante un método de RT-PCR en tiempo real. Como parámetros, se seleccionaron IL-1β, TNF-α e IL-

6, que son parámetros típicos relacionados con inflamación.

Como compuestos de triprenilfenol, se usaron SMTP-7, SMTP-6, SMTP-22, SMTP-25, SMTP-43 y SMTP-44D.

5 Se prepararon los compuestos de triprenilfenol y alteplasa igual que en el ejemplo 2 y el ejemplo 5. Se disolvió la aspirina a 1 mg/ml en una solución salina fisiológica.

Se iniciaron las administraciones de SMTP-7 (10 mg/kg) y alteplasa (10 mg/kg) 1 hora o 3 horas después del inicio de la isquemia. El método de administración fue igual que en el ejemplo 3.

10 Se inició la administración combinada de alteplasa (10 mg/kg) y aspirina (10 mg/kg) 3 horas después del inicio de la isquemia. Se administró alteplasa igual que en el ejemplo 3 y se administró aspirina mediante una inyección intravenosa en bolo en la vena femoral.

15 Se iniciaron las administraciones de SMTP-6, SMTP-22, SMTP-25, SMTP-43 y SMTP-44D 1 hora después del inicio de la isquemia. El método de administración fue igual que en el ejemplo 5.

Se usaron seis ratones para cada estado.

20 Tras 24 horas del inicio de la operación, se perfundió un tampón de Krebs-HEPES desde el corazón y luego se extirpó el cerebro.

25 Tras preparar cortes cerebrales, se dividió el cuarto corte en la parte izquierda del cerebro y la parte derecha del cerebro, y se homogeneizaron respectivamente con 1 ml del reactivo TRIZOL (marca comercial registrada) (Invitrogen). Tras incubar a temperatura ambiente durante 5 min, añadir cloroformo (0,2 ml) y mezclar durante 15 s, se llevó a cabo la incubación a temperatura ambiente durante 3 min. Se centrifugaron las muestras a 4°C durante 15 min a 12.0003 g.

30 Puesto que el ARN se desplazó hacia la fase acuosa, se recogió la fase acuosa y, tras la adición de 5 ml de alcohol isopropílico, seguido por incubación a temperatura ambiente durante 10 min, se centrifugó a 4°C durante 10 min a 12.000 X g. Puesto que se formó un sedimento en el tubo tras la centrifugación, se retiró el sobrenadante y se añadió 1 ml de etanol al 75% seguido por agitación para lavar el sedimento. Entonces se centrifugó la mezcla a 4°C durante 5 min a 7.500 X g. Tras retirar de nuevo el sobrenadante, dejándolo para un secado natural durante 8 min, se disolvió el sedimento que contenía el ARN en 100 µl de agua libre de ARNasa. Se produjo ADNc mediante transcripción inversa del ARN usando un kit de síntesis de ADNc SuperScript VILO™ (marca comercial registrada) (Invitrogen) mediante un ciclador térmico 2720 (Applied Biosystems). Más particularmente, se mezclaron 4 µl de mezcla de reacción VILO™ x 5, 2 µl de mezcla de enzimas SuperScript x 10 (marca comercial registrada) y 1 µg de cada ARN y se diluyó hasta 20 µl con agua libre de ARNasa.

40 Se realizó la transcripción inversa usando las muestras anteriores en las condiciones siguientes. Tras hacer reaccionar a 25°C durante 10 min, a 42°C durante 60 min y a 85°C durante 5 min, se almacenó el producto a 4°C. Con el ADNc como molde, se llevó a cabo RT-PCR en tiempo real mediante el instrumento ABI PRISM 7000 usando SYBR (marca comercial registrada) GreenERTM qPCR SuperMix para ABI PRISM (marca comercial registrada; invitrogen). Más particularmente, se mezclaron 12,5 µl de SYBR (marca comercial registrada) GreenER™ qPCR SuperMix para ABI PRISM (marca comercial registrada), 0,5 µl de cebador directo, 0,5 µl de cebador inverso y 2,5 µl de molde diluido 20 veces y se diluyó hasta 25 µl con agua libre de ARNasa.

45 Se realizó RT-PCR en tiempo real usando las muestras anteriores en las condiciones siguientes. Tras hacer reaccionar a 50°C durante 2 min y a 95°C durante 15 min, se repitió 40 veces un ciclo de 94°C durante 15 s, 55°C durante 30 s y 72°C durante 30 s. Se determinaron los cambios de los parámetros respectivos mediante un método de curva de calibración. Se midió la β-actina como control interno y se calcularon los parámetros respectivos como un valor relativo basándose en la β-actina. Los resultados se muestran en la tabla 12. Los valores en la tabla 12 son los valores ipsilesionales (la parte derecha del cerebro).

55 Se usaron los cebadores siguientes:

Directo de β-actina: 5'-CCTTCCTTCTTGGGTATGGAATC-3' (SEQ. ID. NO: 1), inverso de β-actina: 5'-TGCTAGGAGCCAGAGCAGTAATC-3' (SEQ. ID. NO: 2), IL-1β (Quiagen, QT01048355), TNF-α (Quiagen, QT00104006) e IL-6 (Quiagen, QT00098875).

60

[Tabla 12]

Valor relativo para β -actina	IL-1 β	TNF- α	IL-6
Simulado	0,00358 $\pm$ 0,000676	0,0102 $\pm$ 0,00334	0,00235 $\pm$ 0,000457
Control	0,116 $\pm$ 0,0428*	0,474 $\pm$ 0,191**	0,173 $\pm$ 0,0464*
	Tiempo de inicio de la administración	Tiempo de inicio de la administración	Tiempo de inicio de la administración
	1 h	1 h	1 h
alteplasa	0,0408 $\pm$ 0,0173	0,164 $\pm$ 0,0332##	0,0582 $\pm$ 0,0254
alteplasa + aspirina	-	-	-
SMTP-7	0,0314 $\pm$ 0,0171	0,151 $\pm$ 0,0313##	0,0356 $\pm$ 0,0138
SMTP-6	0,165 $\pm$ 0,0930	0,261 $\pm$ 0,119*	0,220 $\pm$ 0,0850**
SMTP-22	0,040 $\pm$ 0,0140	0,087 $\pm$ 0,0295##	0,071 $\pm$ 0,0437
SMTP-25	0,060 $\pm$ 0,0249	0,049 $\pm$ 0,0158##	0,0560 $\pm$ 0,0259
SMTP-43	0,025 $\pm$ 0,0118	0,058 $\pm$ 0,0147##	0,0234 $\pm$ 0,0115
SMTP-44D	0,070 $\pm$ 0,0435	0,081 $\pm$ 0,0304##	0,0562 $\pm$ 0,0354
La expresión numérica representa: media $\pm$ DE (n=6)			
Simulado: Grupo de tratamiento simulado para generar infarto cerebral			
*, P<0,05; **, P<0,01 (Comparación con los valores de simulado mediante ANOVA y después de eso mediante la prueba de Bonferroni).			
#, P<0,05; ##, P<0,01 (Comparación con los valores del control mediante ANOVA y después de eso mediante la prueba de Bonferroni).			

TNF- α e IL-6 en el grupo control aumentaron significativamente en comparación con el grupo simulado.

En el grupo en el que se inició la administración de alteplasa después de 1 hora desde el inicio de la isquemia, no se reconoció ningún parámetro que mostrara un aumento notable en comparación con el grupo simulado, pero en el grupo en el que se inició la administración después de 3 horas, se reconoció un aumento significativo en IL-1 β , TNF- α e IL-6 en comparación con el grupo simulado. Entre otros, también se reconoció un aumento significativo en IL-1 β e IL-6 relevante con respecto al grupo control.

En el grupo al que se le administró alteplasa y aspirina en combinación, no se reconoció el aumento de IL-1 β y TNF- α , que fue obvio cuando se administró alteplasa individualmente.

Entre los grupos de administración de SMTP-7, no sólo en el grupo en el que se inició la administración después de 1 hora, sino también en el grupo en el que se inició la administración después de 3 horas, no se reconoció un aumento notable en IL-1 β , TNF- α e IL-6, concretamente SMTP-7 inhibió el aumento de tales parámetros.

En el grupo de administración de SMTP-22, el grupo de administración de SMTP-25, el grupo de administración de SMTP-43 y el grupo de administración de SMTP-44D, no se reconoció un aumento notable en IL-1 β , TNF- α e IL-6, concretamente SMTP-22, SMTP-25, SMTP-43 y SMTP-44D inhibieron el aumento de tales parámetros.

En el grupo de administración de SMTP-6, no se inhibió el aumento en IL-1 β , TNF- α e IL-6.

(Ejemplo 7)

[Estudio de actividad de eliminación de radicales libres del compuesto de triprenilfenol]

Para estudiar la actividad de eliminación de radicales libres de un compuesto de triprenilfenol, se realizaron el siguiente ensayo de H-ORAC (capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno hidrófilos) y un ensayo de H-ORAC modificado (mH-ORAC).

Se usaron los compuestos de SMTP evaluados mediante H-ORAC respectivamente en forma de una disolución acuosa de sal de sodio y se usaron los compuestos evaluados mediante mH-ORAC respectivamente en forma de una disolución en acetona.

En H-ORAC, se diluyó un compuesto de prueba apropiadamente con una disolución tampón (disolución de tampón fosfato 75 mM, pH 7,4) y se usó para la medición. En mH-ORAC, se diluyó un compuesto de prueba apropiadamente mediante una disolución de acetona al 50% (v/v), preparada diluyendo una disolución de acetona con agua, para preparar una disolución de 40 veces la concentración final. Se diluyó la disolución 10 veces con una disolución tampón para la medición (concentración final de acetona del 1,25%). En cuanto al material de referencia Trolox, se diluyó una disolución tampón 500 μ M apropiadamente con una disolución tampón.

En una microplaca de 96 pocillos (transparente, fondo plano, paredes negras) se colocaron 50 μ l de una disolución de compuesto de prueba o una disolución de Trolox, y se añadieron adicionalmente 100 μ l de una disolución de fluoresceína 140 nM/tampón como sustancia fluorescente (concentración final 70 nM), seguido por incubación a 37°C durante 10 min.

Como generador de radicales libres, se añadieron 50 μ l de una disolución tampón 48 mM de dicloruro de 2,2'-azobis(amidinopropano) (concentración final 12 mM) y se midió la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda de fluorescencia de 535 nm con una longitud de onda de excitación de 485 nm a intervalos de 2 min durante 90 min. Se preparó la curva de calibración entre las concentraciones finales de Trolox de 5 a 15 μ M. Se realizó la medición cambiando la concentración con n=3, y se representó gráficamente en un diagrama con el tiempo en el eje de abscisas y la intensidad de fluorescencia en el eje de ordenadas. Con ello, se realizó la evaluación usando el valor obtenido restando el área bajo la curva para el blanco del área bajo la curva para la muestra. Se expresó el resultado como un equivalente con respecto a Trolox. Los resultados se muestran en la tabla 13, en la que TE significa equivalente de Trolox.

[Tabla 13]

	Método de medición	mol TE/mol		Método de medición	mol TE/mol
SMTP-0	mH-ORAC	7,76 $\pm$ 0,36	SMTP-23	H-ORAC	6,34 $\pm$ 0,37
SMTP-1	mH-ORAC	4,35 $\pm$ 0,55	SMTP-24	H-ORAC	3,95 $\pm$ 0,13
SMTP-4	H-ORAC	1,79 $\pm$ 0,02	SMTP-25	H-ORAC	5,03 $\pm$ 0,72
SMTP-5D	H-ORAC	1,71 $\pm$ 0,20	SMTP-26	mH-ORAC	2,05 $\pm$ 0,27
SMTP-6	H-ORAC	3,73 $\pm$ 0,42	SMTP-27	H-ORAC	5,01 $\pm$ 0,27
SMTP-7	H-ORAC	2,08 $\pm$ 0,13	SMTP-28	H-ORAC	6,89 $\pm$ 0,03

SMTP-7	mH-ORAC	1,82 ± 0,27	SMTP-29	H-ORAC	5,60 ± 0,08
SMTP-8	mH-ORAC	1,69 ± 0,14	SMTP-36	H-ORAC	3,61 ± 0,04
SMTP-11	H-ORAC	2,52 ± 0,12	SMTP-37	H-ORAC	4,09 ± 0,07
SMTP-12	H-ORAC	3,18 ± 0,13	SMTP-42	H-ORAC	3,28 ± 0,25
SMTP-13	H-ORAC	3,07 ± 0,51	SMTP-43	H-ORAC	2,74 ± 0,26
SMTP-14	H-ORAC	4,43 ± 0,49	SMTP-43D	H-ORAC	2,32 ± 0,12
SMTP-18	mH-ORAC	7,34 ± 0,22	SMTP-44	H-ORAC	4,84 ± 0,43
SMTP-19	H-ORAC	1,36 ± 0,05	SMTP-44D	H-ORAC	5,56 ± 0,18
SMTP-20	H-ORAC	1,80 ± 0,46	SMTP-46	H-ORAC	3,19 ± 0,13
SMTP-21	H-ORAC	3,57 ± 0,13	SMTP-47	H-ORAC	2,13 ± 0,22
SMTP-22	H-ORAC	3,63 ± 0,15			

Mientras, tan sólo como valor de referencia, el valor de ORAC para α -tocoferol medido mediante un ensayo de ORAC igual que el anterior fue de $0,50 \pm 0,02$ mediante el equivalente de Trolox (Huang *et al.*, J. Agric. Food Chem., 50, 1815-1821 (2002)).

5 Tal como resulta obvio a partir de la tabla 13, todos los compuestos de SMTP según la presente invención tienen actividad de eliminación de radicales libres equivalente a o superior a Trolox. Por consiguiente, está claro que los compuestos de SMTP según la presente invención tienen alta actividad antioxidativa.

10 (Ejemplo 8)

[Estudio de la actividad de plasmina mediante el método de zimografía de fibrinógeno]

15 Se midió la cantidad de plasmina/ α_2 -antiplasmina en plasma mediante un método de zimografía de fibrinógeno para evaluar la actividad de plasmina cuando se administró un compuesto de triprenilfenol a un modelo de infarto cerebral de ratón. Como compuestos de triprenilfenol, se usaron SMTP-7, SMTP-6, SMTP-22, SMTP-25, SMTP-43 y SMTP-44D.

20 Se prepararon los compuestos de triprenilfenol como en el ejemplo 2 y el ejemplo 5. Se inició la administración de 10 mg/kg de un compuesto de triprenilfenol 1 hora después del inicio de la isquemia. El método de administración fue igual que el del ejemplo 3. Se usaron seis ratones para cada estado.

25 Se extrajo una muestra de sangre según el siguiente método en 3 puntos de tiempo, concretamente después de la finalización de la administración a las 0 horas (inmediatamente después la finalización), 1 hora y 3 horas. Bajo anestesia con isoflurano a del 1 al 1,5%, se cortó la cola y se extrajeron 90 μ l de sangre de la vena cava abdominal en una jeringa que contenía 10 μ l de citrato de sodio (3,8%) (citrato de sodio:sangre =1:9, concentración final de citrato de sodio del 0,38%).

30 Tras la extracción, se centrifugó la sangre (5000 rpm, 15 min, 4°C) para separar el plasma. Se mezcló una parte del plasma con una cantidad igual de un tampón de muestra (Tris-HCl 125 mM (pH 6,8), SDS al 4% (p/v), azul de bromofenol al 0,04% (p/v), sacarosa al 20% (p/v)), que entonces se dividió en pequeñas fracciones y se crioconservó.

35 Se reservó una parte del plasma y se diluyó 300 veces con NaOH 0,1 N y se determinó el contenido en proteínas mediante el método de Bradford con el fin de igualar la masa de proteínas que iba a aplicarse a un gel de electroforesis.

40 Como muestra patrón, se preparó una muestra haciendo reaccionar 10 μ l de plasmina 120 nM (de SIGMA) y 10 μ l de α_2 -antiplasmina 600 nM (de Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a 37°C durante 30 min, y mezclando las mismas con 20 μ l del tampón de muestra.

45 Se preparó un gel de electroforesis superponiendo un gel de apilamiento sobre un gel de ejecución al 7,5% que contenía fibrinógeno 2 mg/ml (de SIGMA). Basándose en la masa de proteínas determinada, se aplicaron de 3 a 15 μ l de la muestra, de modo que se aplicó una cantidad igual de proteína.

50 Tras la electroforesis a 10 mA/lámina durante 3 horas, se retiró el gel de apilamiento y se aclaró durante 30 min dos veces con aproximadamente 100 μ l/gel de un líquido de aclarado (Triton X-100 al 2,5%). Tras el aclarado, se llevó a cabo la incubación a 37°C durante de 24 a 60 horas con agitación suave con aproximadamente 100 μ l/lámina de un tampón de incubación (glicina 0,1 M-Tris-HCl 50 mM, pH 8,3 a 37°C).

Después de eso se tiñó el gel mediante una disolución de tinción (CBB R250 al 0,075%, metanol al 22,5%, ácido sulfosalicílico dihidratado al 2,25%, ácido tricloroacético al 7,5%) a temperatura ambiente durante de 15 a 30 min con agitación suave. Retirando la disolución de tinción, se decoloró el gel mediante una disolución de decoloración

(metanol:ácido acético:agua = 1:1:6), que se substituyó con agua en un punto de tiempo apropiado según el aspecto de las bandas observadas.

Se leyó la imagen en el gel mediante un analizador de imágenes (Printgraph (AE-6933FXCF) de ATTO) y se evaluó la intensidad de las bandas. Se expresan los resultados como una razón con respecto al valor del grupo control a las 0 horas después de la finalización de la administración (inmediatamente después de la finalización). Los resultados se muestran en la tabla 14.

[Tabla 14]

	Después de la finalización de la administración		
	0 h	1 h	3 h
Control	$1 \pm 60,26$	$1,01 \pm 0,27$	$0,99 \pm 0,23$
SMTP-7	$1,49 \pm 0,13$	$3,23 \pm 0,47^{**}$	$3,27 \pm 0,67^{**}$
SMTP-6	$1,08 \pm 0,12$	$1,17 \pm 0,14$	$1,68 \pm 0,10$
SMTP-22	$1,79 \pm 0,21^*$	$2,08 \pm 0,33^*$	$1,99 \pm 0,78$
SMTP-25	$2,44 \pm 0,28^{**}$	$2,68 \pm 0,33^{**}$	$2,98 \pm 0,60^{**}$
SMTP-43	$2,64 \pm 0,56^{**}$	$3,04 \pm 0,47^{**}$	$3,18 \pm 0,78^{**}$
SMTP-44D	$0,53 \pm 0,11$	$0,66 \pm 0,10$	$0,75 \pm 0,22$
La expresión numérica representa: media $\pm$ DE (n=6) *, P<0,05; **, P<0,01 (Comparación con los valores del control del mismo momento de administración mediante ANOVA y después de eso mediante la prueba de Bonferroni).			

Entre los grupos de administración de SMTP-7, en el caso de 1 hora después de la finalización de la administración se reconoció un aumento significativo de la actividad de plasmina y se mantuvo una actividad similar en el caso de 3 horas después de la finalización de la administración.

Entre los grupos de administración de SMTP-22, los grupos de administración de SMTP-25 y los grupos de administración de SMTP-43, incluso en el caso inmediatamente después de la finalización, se reconoció un aumento significativo de la actividad de plasmina y se mantuvo una actividad similar en los casos de 1 hora y 3 horas después de la finalización de la administración.

Entre los grupos de administración de SMTP-6 y los grupos de administración de SMTP-44D, no se reconoció un aumento significativo de la actividad de plasmina.

(Ejemplo 9)

[Estudio del efecto terapéutico de SMTP-7 en el modelo de infarto cerebral de mono cangrejero]

Se estudiaron un efecto de reducción del tamaño de infarto cerebral y un efecto de mejora de un síntoma neurológico de SMTP-7 en un modelo de infarto cerebral de mono cangrejero según el siguiente método de prueba.

[Constitución de los grupos]

Grupo de medio: solución salina fisiológica, monos cangrejeros macho de 2 a 3 años de edad, 6 monos;

grupo de administración de SMTP-7: 10 mg/kg, monos cangrejeros macho de 2 a 3 años de edad, 6 monos

[Condiciones medioambientales de la sala de animales]

Jaula: jaula de acero inoxidable, A x P x A = 600 x 600 x 800 (mm)

Tamaño del suelo de la jaula: 0,36 m²

Temperatura (intervalo permisible): de 20 a 26°C

Humedad (intervalo permisible): del 40 al 70%

Horas de luz (instalación): 12 horas/día (de 7:00 a 19:00)

Condición de peso en libras: alojamiento individual

[Alimentación]

Tipo: alimentación sólida LabDiet (de PMI Nutrition International)

Método de alimentación: 100 g diarios

[Agua para beber]

Tipo: agua del grifo

Método de suministro de agua: suministro libre mediante una botella de agua de 500 ml

[Administración de la sustancia de prueba]

Vía de administración de la sustancia de prueba: administración intravenosa

Dosis de la sustancia de prueba: 10 mg/kg

Método de administración de la sustancia de prueba: Se fijó el volumen de administración a 10 ml/kg. Se colocó de manera permanente una aguja permanente Surflo en la vena safena izquierda, se administró 1 mg/kg (1 ml/kg) 1 hora después de la isquemia como un bolo a lo largo de 5 s, entonces se administraron 9 mg/kg (9 ml/kg) de manera continua a lo largo de 30 min usando una bomba de jeringa.

Preparación del líquido de administración: Se disolvió SMTP-7 en solución salina fisiológica a 1 mg/ml. Más particularmente, a 70,0 mg de una sal de sodio de SMTP-7 (que contenía 63,1 mg de SMTP-7) se le añadieron 63,1 ml de solución salina fisiológica y se agitó el líquido mediante un agitador magnético con calentamiento en un baño de agua caliente (37°C) para disolución. Se realizó un tratamiento ultrasónico según la necesidad. Tras la disolución, se sometió el líquido a esterilización con filtro mediante un filtro estéril (0,22 µm, fabricado de acetato de celulosa). Se preparó el líquido de administración antes de su uso. Tras la preparación, se mantuvo en un baño de agua caliente a 37°C hasta inmediatamente antes del uso y se terminó la administración en el plazo de 4 horas tras la preparación.

[Tratamiento de infarto cerebral]

Se aplicó la anestesia de los animales según el protocolo experimental convencional (SPHPR400-3A). Más particularmente, se indujo anestesia mediante administración intramuscular de ketamina (Daiichi Sankyo Propharma Co. Ltd). (10 mg/kg) + atropina (Mitsubishi Tanabe Pharma Corp.) (0,05 mg/kg). Después de eso, realizando intubación traqueal, se fijó el animal a una mesa de operaciones con anestesia por inhalación con isoflurano (Abbott).

Se realizó el tratamiento de infarto cerebral según el protocolo experimental convencional (SPHPR710-15A). Más particularmente, tras extirpar el globo ocular derecho, se extrajo el hueso del fondo del ojo fuera de la salida del nervio óptico mediante una fresa dental para exponer la duramadre. Se desprendió cuidadosamente la duramadre para identificar la arteria cerebral media. Se separó la parte de origen de la arteria cerebral media de la aracnoides y se fijó una sonda de irradiación de luz para generar un trombo en la arteria cerebral media. En el extremo distal de la sonda se colocó una sonda de un medidor del flujo sanguíneo Doppler de impulsos (Crystal Bio, PDV-20). Se inició la administración intravenosa de rosa de Bengala (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) (20 mg/kg) a lo largo de 6 min y se realizó una irradiación con luz verde con una longitud de onda de 540 nm (1,40 millones de LUX) durante 20 min para bloquear la arteria cerebral media mediante un trombo. El tiempo de inicio de la irradiación de luz y la administración de rosa de Bengala se definieron como el tiempo de inicio de la isquemia. Se midió el flujo sanguíneo de la arteria cerebral media mediante el medidor de flujo sanguíneo Doppler de impulsos de manera continua durante 2 horas desde el tiempo de inicio de la irradiación de luz y luego se cerró la incisión. Se llevaron a cabo una serie de procedimientos completamente bajo un microscopio quirúrgico para minimizar al máximo la hemorragia intraoperatoria. Además, se monitorizó la temperatura rectal del animal que estaba operándose y se mantuvo al animal caliente mediante una almohadilla de calentamiento, para mantener la temperatura corporal del animal en un intervalo fisiológico (de 37,0 a 38,5°C).

[Tratamiento posoperatorio]

Se llevó a cabo la administración intramuscular de penicilina G (Meiji Seika Pharma, Limited) (100.000 unidades/cabeza/día) como medida preventiva contra la infección y un tratamiento analgésico por medio de la administración de 0,02 mg/cabeza de clorhidrato de buprenorfina (Lepetan, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.).

[Método de evaluación del síntoma neurológico]

Se observaron los síntomas neurológicos tal como se describe a continuación 24 horas tras la isquemia según J. Neurosci. Met., 2001; 105: 45-53.

Clasificación de la puntuación del síntoma neurológico:

(1) Consciencia

- 5 Movimiento activo, igual que el animal normal (0)
 Estado de alerta, agresivo (4)
 Estado de alerta, puede escapar (6)
 10 Estado de alerta, pero lento para reaccionar (8)
 Somnolencia (leve), reactivo a estimulación (10)
 Somnolencia (grave), el ojo se abre con estimulación fuerte (16)
 15 Pérdida de sensación, reactivo a estimulación persistente (20)
 Coma (leve), sólo movimientos reflejos (24)
 20 Coma (grave), inmóvil (28)

(2) Sistema sensorial

- 25 Sensibilidad de la cara (ipsilesional / contralesional)
 Reacción normal a estimulación facial (0/0)
 Reacción no normal reacción a estimulación facial (3/3)
 30 Reacción auricular (ipsilesional / contralesional)
 Reactivo cuando se tira de la oreja (0/0)
 No reactivo cuando se tira de la oreja (3/3)
 35 Estimulación dolorosa (extremidad inferior, ipsilesional / contralesional)
 Cuando se pellizca un dedo, se aparta rápidamente (0/0)
 40 Cuando se pellizca un dedo, se aparta lentamente (3/3)
 Cuando se pellizca un dedo, no se aparta (5/5)

(3) Sistema motor

- 45 Mano (capacidad para agarrar / moverse, ipsilesional / contralesional)
 Normal (0/0)
 50 Disminución en la fuerza de agarre / movimiento discordante (2/2)
 Paralizada, incapaz de agarrar (4/4)
 55 Pata / pie (capacidad para agarrar / moverse, ipsilesional / contralesional)
 Normal (0/0)
 Puede doblar y levantar la rodilla (2/2)
 60 Puede moverla pero no puede levantarla (4/4)
 Paralizada, incapaz de moverla (6/6)
 65 Tono muscular de la parte superior del brazo (ipsilesional / contralesional)
 Normal (0/0)

	Relajación muscular obvia (espástico) (3/3)
5	Tono muscular de las extremidades inferiores (ipsilesional / contralesional)
	Normal (0/0)
	Relajación muscular obvia (espástico) (3/3)
10	(4) Sistema de coordinación musculoesquelético
	Normal, puede andar (0)
15	Fallo de coordinación muscular (leve), alteración al caminar (4)
	Fallo de coordinación muscular, incapaz de subirse a una percha (6)
	Puede levantarse espontáneamente, dificultad para andar (10)
20	Posición sentada en el suelo, movimiento circular mediante estimulación (12)
	Posición acostada de lado en el suelo (16)
	Inmóvil (18)
25	[Recogida de muestra de cerebro]
30	Tras la observación del síntoma neurológico 24 horas después de la operación, se realizó un tratamiento de eutanasia por medio de una megadosis de pentobarbital y se extirpó el cerebro. Se prepararon cortes coronales de seis mm de grosor y se fotografiaron para la determinación cuantitativa de un infarto hemorrágico. Después de eso, se tiñó el área de infarto en una disolución de TTC al 2% y se tomaron fotografías para la determinación cuantitativa del tamaño de infarto. Para las evaluaciones del infarto hemorrágico y el área de infarto, se usó el lado del lóbulo occipital de cada corte.
35	[Método de análisis]
	Se convirtieron fotografías de un individuo en imágenes TIF y se marcaron las áreas de infarto hemorrágico y las áreas de infarto respectivas mediante Photoshop 7.0 (Adobe), tamaños que se midieron luego mediante Scion Image 0.4.0.3 (Scion Corporation).
40	Como área de infarto hemorrágico se usó la suma de los tamaños de área de las secciones transversales respectivas.
45	Se midió un área de infarto para la corteza cerebral, materia blanca y ganglio basal por separado con respecto a cada sección transversal y se calculó el volumen de infarto (mm^3) multiplicando por el grosor (6 mm) del corte.
	Se tabularon los datos del resultado experimental y se representaron en un gráfico mediante Microsoft Excel (versión 2003, Microsoft Inc.) y se expresaron en media $\pm$ desviación estándar (D.E.).
50	Se realizó el análisis estadístico usando Microsoft Excel (versión 2003, Microsoft Inc.) y se llevó a cabo una prueba de la t desapareada (varianzas iguales) entre el grupo de medio y el grupo de administración de SMTP-7 determinando que estaba presente diferencia significativa si $P < 0,05$.
	[Resultados de la medición del flujo sanguíneo]
55	El tiempo hasta la oclusión y el tiempo de oclusión total se muestran en la tabla 15. Con respecto al tiempo hasta la oclusión y el tiempo de oclusión total, no se reconocieron diferencias significativas entre el grupo de medio y el grupo de administración de SMTP-7.
60	Puesto que la administración del medio y SMTP-7 se inició 60 min después de la isquemia, se dividió el tiempo de oclusión total en el tiempo hasta la oclusión desde el inicio de la isquemia hasta 60 min después de la misma, y el tiempo hasta la oclusión desde 60 min después de la misma hasta 120 min después de la misma y se analizaron respectivamente. Tal como se muestra en la tabla 16, no se reconoció ninguna acción de reducción significativa en el tiempo hasta la oclusión.

[Tabla 15]

Tratamiento	Tiempo hasta la oclusión (min)	Tiempo de oclusión total (min)
Grupo de medio	6,9 ± 2,8	103,3 ± 6,5
Grupo de administración de SMTP-7	6,9 ± 2,5	86,8 ± 18,8

[Tabla 16]

Tratamiento	Tiempo de oclusión (min)	
	0 ~ 60 min	60 ~ 120 min
Grupo de medio	46,3 ± 4,9	57,0 ± 2,3
Grupo de administración de SMTP-7	45,5 ± 3,8	41,3 ± 18,9

[Resultados de la observación del síntoma neurológico]

Los resultados de la observación de un síntoma neurológico 24 horas después de la isquemia se muestran en la siguiente tabla 17. En el grupo de administración de SMTP-7 se reconoció una acción de mejora significativa del síntoma neurológico ($P < 0,05$) en el sistema sensorial y el sistema de coordinación musculoesquelético. Además, también se reconoció una acción de mejora significativa del síntoma neurológico ($P < 0,05$) en la puntuación total.

[Tabla 17]

Tratamiento	Consciencia	Sistema sensorial	Sistema motor	Sistema de coordinación musculoesquelético	Total
Grupo de medio	10,3 ± 3,2	9,7 ± 1,0	13,7 ± 2,7	10,0 ± 3,1	43,7 ± 8,1
Grupo de administración de SMTP-7	7,7 ± 2,0	7,5 ± 1,6*	10,7 ± 2,7	5,3 ± 2,4*	31,2 ± 7,9*
*, $P < 0,05$ frente a grupo de medio					

[Resultados de la medición del tamaño de infarto]

Los resultados de la medición del tamaño de área de infarto hemorrágico y el tamaño de infarto cerebral 24 horas después de la isquemia se muestran en las siguientes tabla 18 y tabla 19. En el grupo de administración de SMTP-7, se reconoció una reducción significativa ($P < 0,05$) sobre el infarto hemorrágico. Además, mediante la administración de SMTP-7, se reconocieron una reducción significativa ($P < 0,05$) en el tamaño de infarto del ganglio basal y una reducción significativa ($P < 0,05$) en el tamaño de infarto global.

[Tabla 18]

Tratamiento	Tamaño de área de infarto hemorrágico (mm ²)
Grupo de medio	29,0 ± 9,6
Grupo de administración de SMTP-7	14,1 ± 7,4 ($P < 0,05$)

[Tabla 19]

Tratamiento	Total	Corteza cerebral	Ganglio basal	Materia blanca
Grupo de medio	3358,2 ± 1299,3	877,7 ± 1081,3	2291,2 ± 379,7	189,3 ± 105,8
Grupo de administración de SMTP-7	1745,1 ± 749,5*	237,8 ± 198,8	1419,7 ± 633,8*	87,7 ± 71,8
Unidad: mm ³ , *, $P < 0,05$ frente a grupo de medio				

A partir de lo anterior ha quedado claro que se presentó una acción de reducción significativa del tamaño de infarto 24 horas después de la isquemia en un modelo de oclusión de arteria cerebral media trombótica de mono cangrejero como resultado de la administración de SMTP-7 (10 mg/kg) 1 hora después de la isquemia. Según este resultado, se indicaron una acción de mejora significativa de un síntoma neurológico y una acción de reducción significativa de un infarto hemorrágico.

Aunque se cree que la acción de reducción del área de infarto cerebral de SMTP-7 puede atribuirse a la acción trombolítica del mismo, no hubo influencia sobre el tiempo de oclusión de la arteria cerebral media según los resultados del estudio anterior. Un motivo para esto es que puede atribuirse a un tiempo de medición corto del flujo sanguíneo después de la administración de SMTP-7. SMTP-7 redujo significativamente el tamaño de infarto del ganglio basal incluyendo un cuerpo estriado como parte principal. El cuerpo estriado es el sitio más vulnerable a la isquemia y es una región que depende del flujo sanguíneo de la arteria perforante desde la parte de origen de la

arteria cerebral media. Mientras, el punto de medición del flujo sanguíneo fue una parte distal de la arteria cerebral media y SMTP-7 debe haber lisado gradualmente un trombo de la parte de origen de la arteria cerebral media ocluida por el trombo, dando como resultado por tanto presumiblemente una reducción notable del tamaño de infarto del ganglio basal.

Los resultados de los ejemplos 1 a 9 pueden resumirse de la siguiente forma.

Tal como resulta obvio a partir de los resultados de los ejemplos 2 y 3, se ha confirmado que SMTP-7 presenta una acción de supresión sobre el porcentaje de área de infarto y sobre la expresión de un síntoma neurológico en un animal modelo de infarto cerebral.

Tal como resulta obvio a partir de los resultados del ejemplo 4, se ha confirmado que SMTP-7 puede recuperar gradualmente el flujo sanguíneo cerebral tras el infarto en un animal modelo de infarto cerebral. A partir de este hecho puede presumirse que con SMTP-7 está limitado el riesgo de producir daño por isquemia-reperusión inherente a recuperación rápida del flujo sanguíneo.

Tal como resulta obvio a partir de los resultados del ejemplo 6, se ha confirmado que SMTP-7 presenta una acción inhibitoria sobre el aumento en los parámetros de inflamación de IL-1 β , TNF- α e IL-6 en un animal modelo de infarto cerebral.

Tal como resulta obvio a partir de los resultados del ejemplo 7, se ha confirmado que SMTP-7 presenta una fuerte acción de eliminación sobre un radical libre, que es uno de los factores perjudiciales con respecto al daño celular producido por isquemia y tiene actividad antioxidativa.

Tal como resulta obvio a partir de los resultados del ejemplo 8, se ha confirmado que SMTP-7 presenta una acción de potenciación sobre la actividad de plasmina en la sangre.

Tal como resulta obvio a partir de los resultados del ejemplo 9, se ha confirmado que SMTP-7 presenta una acción de reducción significativa sobre el tamaño de infarto y presenta una acción de mejora significativa sobre un síntoma neurológico y una acción de mitigación significativa sobre un infarto hemorrágico, en un animal modelo de infarto cerebral.

A partir de lo anterior, puede usarse una composición que contiene SMTP-7 como agente citoprotector que tiene eficacia para inhibir la disfunción producida por isquemia.

Tal como resulta obvio a partir de los resultados del ejemplo 5, se ha confirmado que SMTP-22 y SMTP-43 presentan una acción de supresión sobre el porcentaje de área de infarto y sobre la expresión de un síntoma neurológico en un animal modelo de infarto cerebral.

Tal como resulta obvio a partir de los resultados del ejemplo 6, se ha confirmado que SMTP-22, SMTP-25, SMTP-43 y SMTP-44D presentan una acción inhibitoria sobre el aumento en los parámetros de inflamación de IL-1 β , TNF- α e IL-6 en un animal modelo de infarto cerebral.

Tal como resulta obvio a partir de los resultados del ejemplo 7, se ha confirmado que SMTP-6, SMTP-22, SMTP-25, SMTP-43 y SMTP-44D presentan una fuerte acción de eliminación sobre un radical libre, que es uno de los factores perjudiciales con respecto al daño celular producido por isquemia y tienen actividad antioxidativa.

Tal como resulta obvio a partir de los resultados del ejemplo 8, se ha confirmado que SMTP-22, SMTP-25 y SMTP-43 presentan una acción de potenciación sobre la actividad de plasmina en la sangre.

Sin embargo, con respecto a SMTP-6, SMTP-25 y SMTP-44D, no se ha confirmado en el ejemplo 5 que presenten una acción de supresión sobre el porcentaje de área de infarto y sobre la expresión de un síntoma neurológico. Por otra parte, se ha confirmado que SMTP-6 tiene una actividad de eliminación sobre un radical libre. Además, se ha confirmado que SMTP-25 inhibe el aumento de un parámetro de inflamación, tiene actividad de eliminación sobre un radical libre y potencia la actividad de plasmina en la sangre. Se ha confirmado que SMTP-44D inhibe el aumento de un parámetro de inflamación y tiene actividad de eliminación sobre un radical libre.

Puede suponerse que SMTP-6, SMTP-25 y SMTP-44D mostrarían una actividad de supresión sobre el porcentaje de área de infarto y sobre la expresión de un síntoma neurológico, si la dosis de los mismos a un animal modelo se ajustara apropiadamente.

A partir de lo anterior, puede usarse una composición que contiene uno cualquiera seleccionado de SMTP-6, SMTP-22, SMTP-25, SMTP-43 y SMTP-44D como agente citoprotector que tiene eficacia para inhibir la disfunción producida por isquemia.

Tal como resulta obvio a partir de los resultados del ejemplo 7, se ha confirmado que SMTP-0, SMTP-1, SMTP-4,

SMTP-5D, SMTP-8, SMTP-11 a 14, SMTP-18 a 21, SMTP-23, SMTP-24, SMTP-26 a 29, SMTP-36, SMTP-37, SMTP-42, SMTP-43D, SMTP-44, SMTP-46 y SMTP-47 presentan una acción de eliminación tan fuerte como, o más fuerte que la de Trolox, sobre un radical libre, que es uno de los factores perjudiciales con respecto al daño celular producido por isquemia y tienen actividad antioxidativa.

A partir de lo anterior, puede usarse una composición que contiene uno cualquiera seleccionado de SMTP-0, SMTP-1, SMTP-4, SMTP-5D, SMTP-8, SMTP-11 a 14, SMTP-18 a 21, SMTP-23, SMTP-24, SMTP-26 a 29, SMTP-36, SMTP-37, SMTP-42, SMTP-43D, SMTP-44, SMTP-46 y SMTP-47 como agente citoprotector que tiene eficacia para inhibir la disfunción producida por isquemia.

Por consiguiente, puede usarse una composición que contiene un compuesto de triprenilfenol según la presente invención como agente citoprotector que tiene eficacia para inhibir la disfunción producida por isquemia.

Además, puede usarse una composición que contiene un compuesto de triprenilfenol según la presente invención para un método de tratamiento para daño isquémico que incluye la administración de la composición a un paciente afectado por daño isquémico.

Lista de secuencias

<110> Universidad de Tokio, universidad de Showa de agricultura y tecnología, TMS CO., LTD

<120> Agente protector celular

<130> CO-F03401

<150> Documento JP2009-160278

<151> 06-07-2009

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<223> cebador para b-actina

<400> 1

ccttccttct tgggtatgga atc 23

<210> 2

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

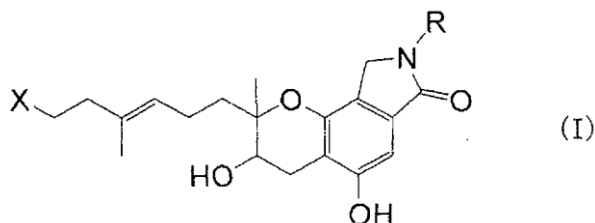
<223> b-actina R

<400> 2

tgctaggagc cagagcagta atc 23

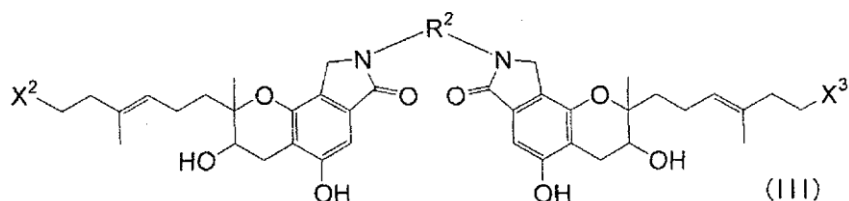
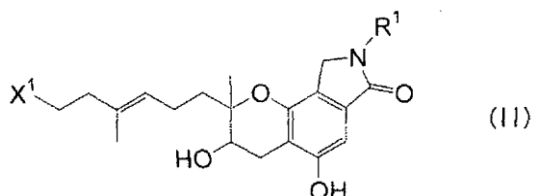
REIVINDICACIONES

1. Agente citoprotector para su uso en un método de tratamiento de daño isquémico en un paciente para el que está contraindicado un fármaco trombolítico, que comprende como principio activo un compuesto de triprenilfenol representado por la siguiente fórmula general (I):



en la que, en la fórmula (I), X es $-\text{CHY}-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{Z}$, Y y Z son cada uno independientemente $-\text{H}$ u $-\text{OH}$, o forman juntos un enlace sencillo, y R representa un átomo de hidrógeno o un sustituyente con un peso molecular de 1000 o menos.

2. Agente citoprotector para su uso según la reivindicación 1, en el que el compuesto de triprenilfenol representado por la fórmula general (I) es un compuesto de triprenilfenol representado por la siguiente fórmula general (II) o (III):

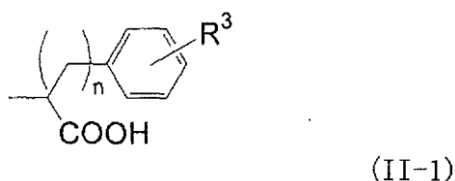


en las que, en las fórmula (II) y (III), X^1 , X^2 y X^3 son cada uno independientemente $-\text{CHY}-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{Z}$; Y y Z son cada uno independientemente $-\text{H}$ u $-\text{OH}$, o forman juntos un enlace sencillo; R^1 representa uno cualquiera entre los siguientes (A) a (D):

(A) un residuo de un compuesto de amino seleccionado del grupo que consiste en un aminoácido natural, un isómero D de un aminoácido natural y un compuesto derivado sustituyendo un grupo carboxilo en un aminoácido natural o un isómero D de un aminoácido natural por un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo hidroximetilo, del que se ha eliminado un grupo amino (siempre que se excluya $-(\text{CH}_2)_2\text{OH}$);

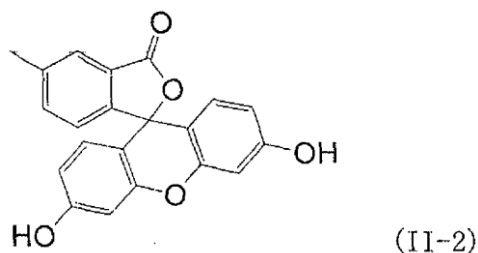
(B) un grupo aromático que tiene al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo, un grupo sulfónico y un grupo amino secundario como sustituyente o parte de un sustituyente, o un grupo aromático que contiene un grupo amino secundario y puede contener un átomo de nitrógeno;

(C) un residuo de aminoácido aromático representado por la siguiente fórmula (II-1):



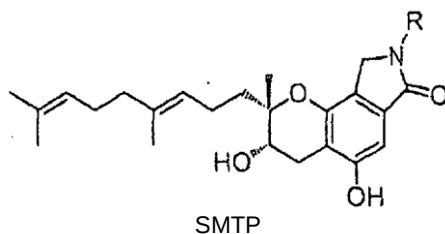
en la que, en la fórmula (II-1), R^3 es un sustituyente, que puede estar presente o ausente, que representa al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo y un grupo alquilo C1 a C5, y n representa un número entero de 0 ó 1; o

(D) un sustituyente representado por $-L^1-L^2-R^4$, en el que L^1 representa un grupo de unión que comprende un grupo alquileo C1 a C4 que tiene un grupo carboxilo, L^2 representa un grupo de unión expresado por $-NH-C(=O)-$ o $-NH-C(=S)-NH-$ y R^4 representa un grupo 9-fluorenilalquiloxilo que tiene un grupo alquiloxilo C1 a C3 o un grupo poliheterocíclico representado por la siguiente fórmula (II-2):

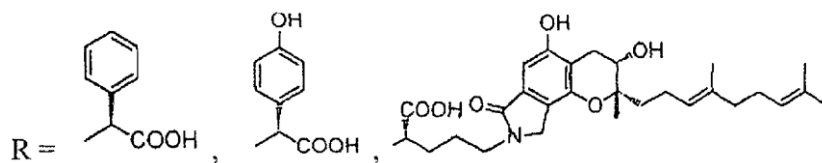


y R^2 representa un residuo de un compuesto de amino seleccionado del grupo que consiste en un aminoácido natural con dos grupos amino, un isómero D de un aminoácido natural con dos grupos amino, un compuesto derivado sustituyendo un grupo carboxilo en un aminoácido natural con dos grupos amino o un isómero D de un aminoácido natural con dos grupos amino por un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo hidroximetilo, compuestos representados por $H_2N-CH(COOH)-(CH_2)_n-NH_2$ (siendo n un número entero de desde 0 hasta 9), y compuestos representados por $H_2N-CH(COOH)-(CH_2)_m-S_p-(CH_2)_q-CH(COOH)-NH_2$ (siendo cada uno de m, p y q independientemente un número entero de desde 0 hasta 9), de los que se han eliminado dos grupos amino.

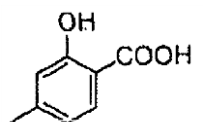
3. Agente citoprotector para su uso según la reivindicación 1, en el que el compuesto de triprenilfenol se representa por la fórmula



con



o



4. Agente citoprotector para su uso según una cualquiera de la reivindicación 1 a la reivindicación 3, en el que la administración se realiza en un paciente 3 o más horas después del comienzo de un síntoma.
5. Agente citoprotector para su uso según una cualquiera de la reivindicación 1 a la reivindicación 3, que es para su administración a un paciente que padece o que se prevé que padezca daño por isquemia-reperfusión.
6. Agente citoprotector para su uso según una cualquiera de la reivindicación 1 a la reivindicación 3, que es

para su administración a un paciente durante un periodo en el que aumenta la posibilidad de daño celular producido por isquemia.

- 5
7. Agente citoprotector para su uso según una cualquiera de la reivindicación 1 a la reivindicación 6, en el que el daño isquémico es trombosis.
 8. Agente citoprotector para su uso según una cualquiera de la reivindicación 1 a la reivindicación 6, en el que el daño isquémico es infarto cerebral.

FIG.1

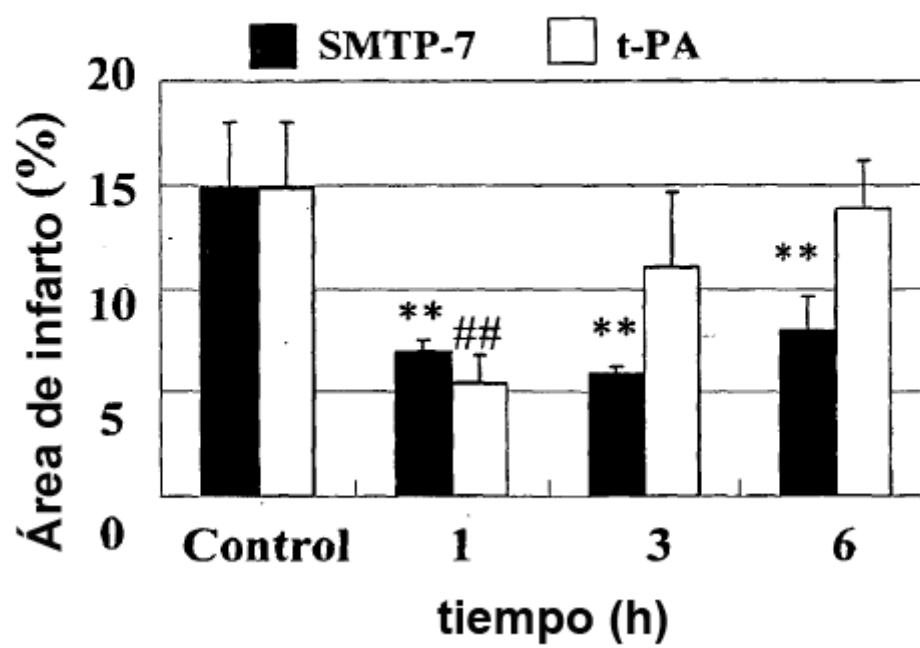


FIG.2

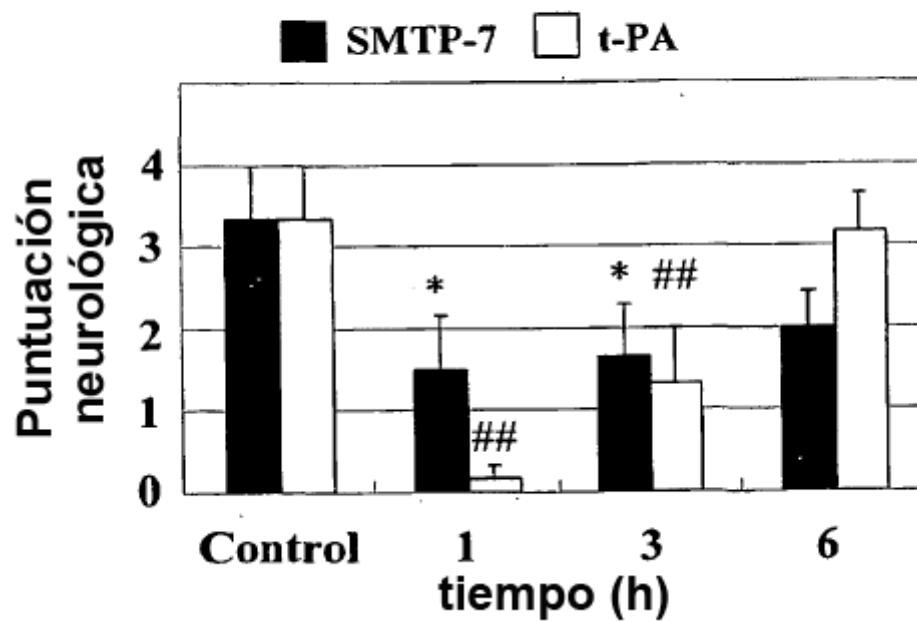


FIG.3

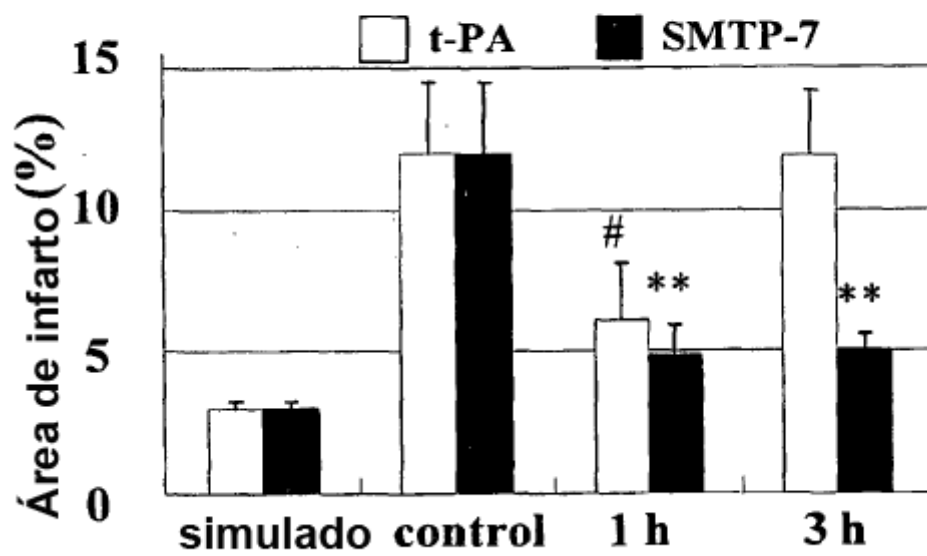


FIG.4

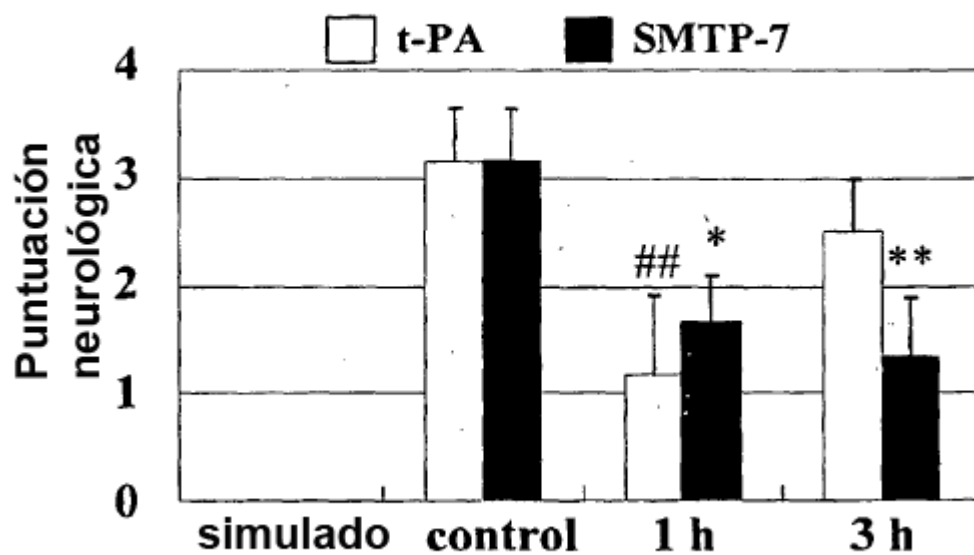


FIG.5

