

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 051**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/36** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.10.2009 PCT/CN2009/001181**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.05.2010 WO10054531**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2009 E 09825706 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2364711**

54 Título: **Uso de extractos procedentes de piel de conejo inflamada por el virus de la variolovacuna para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad cerebrovascular aguda**

30 Prioridad:

**11.11.2008 CN 200810176703**

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

**17.03.2017**

73 Titular/es:

**VANWORLD PHARMACEUTICAL (RUGAO) CO., LTD. (100.0%)  
No. 139, Puqing Road, Rucheng Town  
Rugao, Jiangsu 226500, CN**

72 Inventor/es:

**LAU, MAN SANG JAMES**

74 Agente/Representante:

**BOTELLA REYNA, Antonio**

ES 2 606 051 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

5      Uso de extractos procedentes de piel de conejo inflamada por el virus de la variolovacuna para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad cerebrovascular aguda.

### **Campo de la invención**

10     Esta invención se refiere al analgésico para su uso en un medicamento para el tratamiento de una enfermedad cerebrovascular isquémica aguda.

### **Antecedentes de la invención**

15     El ictus, una de las enfermedades cerebrovasculares agudas, es la tercera causa de muerte en la población mundial e induce la mayor tasa de incapacidad de entre diversas enfermedades. Según indican las recientes referencias epidemiológicas, la incidencia de enfermedades cerebrovasculares en China varía entre aproximadamente un 0,12% y un 0,18%, que es la segunda causa de muerte entre la población. Existen entre 1,2 y 1,5 millones de personas recién diagnosticadas con enfermedades cerebrovasculares cada  
20     año, y entre 0,8 y 1 millón de pacientes mueren, aproximadamente un 75% de los supervivientes estaban incapacitados, y la tasa de recaída en 5 años era de hasta un 41%. Las enfermedades cerebrovasculares podrían afectar de forma importante a la calidad de vida de los ancianos, suponen una enorme carga para la familia de los pacientes y para la sociedad. También tienden a aumentar en la población joven.

25     Las enfermedades cerebrovasculares se clasifican principalmente en dos tipos, hemorrágicas e isquémicas, de las cuales las últimas son el 60-70%, y es el tipo más habitual de enfermedades cerebrovasculares. Es importante estudiar el mecanismo fisiopatológico de las enfermedades cerebrovasculares isquémicas y buscar fármacos  
30     que funcionen como neuroprotectores.

35     La búsqueda del mecanismo fisiopatológico de la isquemia cerebral ha sido uno de los focos más importantes del campo de la neurociencia desde los años 80, y hasta ahora se han propuesto teorías relativas a la isquemia cerebral tales como el metabolismo energético, la intoxicación por ácidos, la peroxidación, la lesión por una toxicidad inducida por aminoácidos excitadores y la sobrecarga de calcio, en las que las dos últimas juegan un importante papel en la lesión y la muerte neuronal isquémica. Según las bases fisiopatológicas de las enfermedades cerebrovasculares isquémicas, los fármacos usados  
40     habitualmente para el tratamiento clínico de la isquemia cerebral comprenden principalmente antagonistas del ión calcio (nimodipino), capturadores de radicales de oxígeno (Vit. E, SOD), factores neurotróficos (factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico), antagonistas de los aminoácidos excitadores, antioxidantes y fármacos que mejoran la lesión neuronal de aparición tardía. Estos fármacos funcionan a través de  
45     diversos mecanismos de acción, con unos efectos terapéuticos inciertos o una menor especificidad o con unos graves efectos secundarios concomitantes, y por lo tanto todavía no pueden cumplir los requisitos clínicos. Hay muchos fármacos disponibles comercialmente que pueden usarse para mejorar la circulación, el metabolismo y las funciones del cerebro, tales como piracetam, flunarizina, calan, extractos de ginkgo. Aunque todos tienen unas ciertas características, los efectos del tratamiento con los  
50     mismos en las enfermedades cerebrovasculares son inciertos. La investigación y el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de las enfermedades

cerebrovasculares isquémicas es una tarea importante en el campo de los productos farmacéuticos y de la farmacología.

5 Según se usa en el presente documento, "los extractos de piel de conejo inflamada por el virus de la variolovacuna" se refieren a las sustancias activas extraídas a partir de la piel de conejo inflamada por el virus de la variolovacuna, según se describe en la patente china nº ZL98103220.6, cuya totalidad se incorpora al presente documento como referencia. Dichos extractos de piel de conejo inflamada por el virus de la variolovacuna están disponibles comercialmente, con el nombre comercial de analgécine, que es  
10 elaborado por Vanworld Pharmaceutical (Rugao) Co. Ud. Los efectos farmacológicos del analgécine incluyen: (1) efectos analgésicos, incluyendo los efectos analgésicos obvios sobre la hiperalgesia inducida de forma compleja por repetidos estreses por frío, que se consiguen mediante la activación del sistema inhibitor descendente del sistema nervioso central; (2) efectos sobre la sensibilidad al enfriamiento y una percepción anormal: mediante experimentos *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que dicho agente tiene los efectos de cambiar la actividad esporádica neuronal del hipotálamo, lo que sugiere que el agente tiene unos efectos de reparación y de regulación sobre la actividad esporádica neuronal sensitiva anormal, que se considera que es la causa de la neuralgia y de la percepción anormal; (3) efecto de mejora de la circulación sanguínea periférica; (4) efecto sobre la regulación de los nervios autónomos: el experimento *in vivo* e *in vitro* ha sugerido que el agente puede mejorar los síntomas de la desregulación del sistema nervioso autónomo mediante la regulación de la actividad del nervio autónomo central; (5) efectos sobre la reacción antialérgica: experimentos con animales han sugerido que el agente tiene efectos sobre la reacción antialérgica de tipo 1, que tiene efectos inhibidores sobre  
15 la hipersecreción del tracto respiratorio resultante de la excitación del nervio parasimpático, y también tiene efectos inhibidores sobre la regulación por aumento de la densidad del receptor de la mucosa nasal M; (6) efectos de sedación: los experimentos con animales han sugerido que el agente tiene un efecto sedante sobre el estado de excitación afectiva causado por diversos estímulos externos.

30 Adicionalmente, los extractos de piel de conejo inflamada por el virus de la variolovacuna fueron analizados en las siguientes solicitudes: la solicitud de patente china nº 99123485.5, depositada el 12 de noviembre de 1999; la solicitud de patente china nº 96123286.2, depositada el 19 de diciembre de 1996; y la solicitud de patente china nº 98103914.6, depositada el 7 de enero de 1998.

40 Sin embargo, todavía no se han notificado efectos protectores del analgécine sobre la lesión por isquemia cerebral. La presente invención ha investigado dichos efectos y ha encontrado que el analgécine tiene un efecto beneficioso sobre la isquemia cerebral en los modelos con animales de experimentación.

#### Documentos citados de la técnica anterior

45 • MAO J., "Observation on Treatment of Neurotropic to Ischemic Stroke", HEBEI MEDICINE, January 2005, Vol. 11, No.1, pages 53-56, XP008143928, ISSN: 1006-6233

50 • ZHAI YU *et al.*, "Observation on Treatment of Neurotropic to Ischemic Stroke", Acta Universitatis Medicinalis Secundae Shanghai, 1 September 2002 (2002-09-01), Vol. 22, No. 5, pages 450-452, XP008143930, ISSN: 0258-5898

- CHEN JI *et al.*, "A Comparison between Neurotrophin and Enzaishi with Respect to their Effects in Combating Brain Ischemia and Relieving PAIN in Murines", Herald of Medicine February 2007 (2007-02), Vol. 26, No. 2.), pages 149,152
- 5 • DE REUCK J *et al.*, "A double-blind study of neurotrophin in patients with acute ischemic stroke", ACTA NEURO-LOGICA SCANDINAVICA, MUNKSGAARD, COPENHAGEN, DK, 1 May 1994 (1994-05-01), Vol. 89, No. 5, pages 329-335, XP002109696, ISSN: 0001-6314
- 10 • DE REUCK J *et. al.*, "NEUROTROPIN TREATMENT OF BRAIN EDEMA ACCOMPANYING ACUTE MIDDLE CEREBRAL-ARTERY INFARCTION", ACTA NEUROCHIRURGICA, SPRINGER VERLAG, AT, 1 January 1994 (1994-01-01), Vol. 60, No. suppl. pages 332-334, XP008139980, ISSN: 0001-6268
- 
- 15 TATSUKI ITOH *et al.*, "Neuroprotective effects of an extract from the inflamed skin of rabbits inoculated with vaccinia virus on glutamate-induced neurotoxicity in cultured neuronal cell line", NEUROLOGICAL RESEARCH, MANEY PUBLISHING, GB, vol. 30, no. 4, 31 January 2008 (2008-01-31), pages 430-434, XP008139983, ISSN: 0161-6412
- 20 • US 2006/051375 A1
- PIERRE SPRUMONT *et al.*, "Effect of neurotrophin on cerebral edema, calcium and other elements in mice subarachnoidally injected with carrageenan", EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, 1 February 1995 (1995-02-01), Vol. 274, No. 1-3, pages 95-99, 25 XP55042755, ISSN: 0014-2999, 001: 10.1016/0014-2999(94)00724-L
- KITA T. *et al.*, "Effect of neurotrophin on SART stress (stress caused by alteration of rhythms in environmental temperature) in mice and rats", MEDLINE, 1 March 1975 (1975-03-01), XP002592899.
- 30 • CHEN Z. *et al.*, "The Extract of Inflamed Rabbit Skin Induced by Inoculation of Vaccinia Virus Possesses Antioxidant and Neuroprotective Effects in Acute Ischemic Stroke", JOURNAL OF STROKE AND CEREBROVASCULAR DISEASES, DEMOS PUBLICATIONS, NEW YORK, NY, US, 1 November 2009 (2009-11-01) Vol. 18, No. 6, 35 pages 475-481, XP026745007, ISSN: 1052-3057

### **Problemas que van a ser resueltos por la invención**

40 El objeto de la invención es proporcionar un compuesto para el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares agudas en mamíferos.

### **Medios para resolver los problemas**

45 Con el fin de resolver el objeto se propone proporcionar analgésico para su uso como un medicamento para el tratamiento de una enfermedad cerebrovascular isquémica aguda, en el que después de la isquemia del tejido cerebral se usa analgésico para proteger una célula nerviosa de daños o para disminuir el nivel de ácido láctico en el tejido cerebral o para aumentar la actividad de la dismutasa de superóxido, y en el que la enfermedad cerebrovascular isquémica aguda se selecciona entre el grupo que consiste en embolia 50 cerebral, ataque isquémico cerebral transitorio, trombosis cerebral, arteriosclerosis

cerebral, arteritis cerebral, síndrome de robo de la arteria cerebral, trombosis de los senos venosos craneales y venosa.

### Descripción de la invención

5

Las enfermedades cerebrovasculares son lesiones en la función neural causadas por anomalías en el suministro sanguíneo en una región del cerebro. En la mayoría de los países, las enfermedades cerebrovasculares, las tres primeras causas de todas las muertes, pueden dar como resultado una lesión cerebral en un adulto. La enfermedad cerebrovascular es la principal causa de riesgo para la salud de las personas de mediana edad y en ancianos, y una importante causa de muerte o de discapacidad en las personas de mediana edad y en ancianos de la mayoría de los países. Las enfermedades cerebrovasculares isquémicas son en su mayoría el resultado de una oclusión cerebrovascular, que generalmente se conoce como embolia o trombosis; y sus cambios fisiopatológicos son muy complicados. En una realización, las enfermedades cerebrovasculares isquémicas agudas según se describen en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, embolia cerebral, ataque isquémico cerebral transitorio, trombosis cerebral, arteriosclerosis cerebral, arteritis cerebral, síndrome de robo de la arteria cerebral, trombosis de los senos venosos craneales y venosa.

20

La enfermedad cerebrovascular isquémica está causada por una reducción transitoria o permanente en el flujo sanguíneo en ciertas áreas de suministro sanguíneo arterial debido a una embolia, y sus procesos patológicos se relacionan con una complicada reacción en cascada temporal y espacial. El mecanismo fisiopatológico de la isquemia cerebral ha sido ampliamente investigado en los últimos años. Sin embargo, la razón directa de esta enfermedad es que cada arteria tiene sus intervalos básicos de suministro de sangre en el cerebro, y la oclusión de la arteria dará lugar a un ablandamiento de los tejidos cerebrales en las respectivas áreas, dando como resultado los correspondientes síndromes clínicos, en los que las lesiones sintomatológicas neurológicas (tales como la hemiplejía de las extremidades contralaterales) causadas por oclusiones en la arteria cerebral media son las más habituales. Adicionalmente, en los casos clínicos de la primera aparición de una apoplejía, el porcentaje de obstrucciones en la arteria cerebral media es grande, por lo que los procesos fisiopatológicos simulados en un modelo animal de obstrucción de la arteria cerebral media (MCAO) tienen una gran similitud con la de las apoplejías clínicas.

35

Los resultados de la escala de Bederson y una prueba de pendiente han demostrado que los signos de las lesiones sintomatológicas neurológicas, tales como debilidad y parálisis de las extremidades contralaterales, aparecieron después de la isquemia en los tejidos cerebrales de ratas. Los presentes inventores han averiguado que el analgécico puede mejorar notablemente los síntomas neurológicos de los animales. Por lo tanto, en una realización, puede usarse analgécico para el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares mediante una mejora de la función neural.

40

Las áreas de los focos de infarto cerebral están relacionadas con la magnitud de la isquemia, una tinción TIC de los tejidos cerebrales contralaterales mostró focos blancos y en licuefacción que podían observarse 24 h después de una embolia unilateral de la arteria cerebral media. Los resultados del análisis estadístico demostraron que había una diferencia estadísticamente significativa en el volumen del infarto cerebral en un grupo de referencia en comparación con un grupo con disolvente, y el volumen del infarto cerebral en un grupo con una dosis intermedia de analgécico disminuyó significativamente en

50

comparación con la de un grupo con lesiones. Por lo tanto, en una realización, se usa analgécine para el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares mediante la reducción de las áreas de infarto cerebral.

5 El cerebro es el órgano con el metabolismo más activo con el menor almacenamiento de energía y de oxígeno per se. El oxígeno consumido por parte de los tejidos cerebrales suponía el 20% del consumo total de oxígeno del cuerpo en estado de reposo. Las neuronas constituyen las principales partes que consumen oxígeno en la corteza cerebral o en la totalidad del cerebro, y son muy sensibles a las lesiones por isquemia y por  
10 hipoxia. Cuando no hay ninguna fuente de oxígeno fresco, los tejidos sólo pueden consumir su propio almacenamiento de compuestos de fosfato de alta energía, y obtener la energía mediante el metabolismo de las glucosas y los glucógenos almacenados en MOA. La isquemia y/o la hipoxia de los tejidos cerebrales dan lugar a un agotamiento de la energía, dando como resultado una serie de reacciones en cadena que incluyen un  
15 fracaso en la función de bombeo de energía, una sobrecarga del ión calcio en las células nerviosas, un aumento de los radicales de oxígeno tóxicos, una intoxicación celular por ácido; y la estructura de la membrana celular y su integridad quedan dañadas, como resultado, la permeabilidad de las membranas aumenta, la magnitud del edema citotóxico se expande, y algunas enzimas intracelulares son liberadas en grandes cantidades a la sangre. Los resultados demostraron que el nivel de ácido láctico y de MOA en los tejidos  
20 cerebrales aumentó significativamente después de una isquemia, mientras que el nivel de ácido láctico en los tejidos cerebrales disminuyó significativamente a través de la intervención con analgécine. Por lo tanto, en una realización, se usa analgécine para el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares mediante la disminución del nivel de  
25 ácido láctico en los tejidos cerebrales.

La SOD es una importante enzima antioxidante que puede inhibir las reacciones de los radicales libres de una forma eficaz, y una elevada actividad de la SOD representa una fuerte capacidad antioxidante. La actividad de la SOD de los tejidos cerebrales de ratas  
30 disminuye significativamente, y consecuentemente la capacidad para eliminar los radicales libres disminuyó después de las lesiones por isquemia cerebral. Los resultados demostraron que la actividad de la SOD puede mejorarse a través de la intervención del analgécine, lo que indica que el analgécine puede jugar un papel en la neuroprotección mediante el aumento de la capacidad antioxidante de los tejidos cerebrales.  
35 Consecuentemente, en una realización, se usa analgécine para el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares mediante el aumento de la actividad de la SOD.

En otro aspecto, el presente inventor descubrió que el analgécine puede tener un efecto protector en la lesión de una célula nerviosa.  
40

El  $H_2O_2$  es un importante componente de oxígeno reactivo que está implicado en la aparición de enfermedades del sistema nervioso tales como la isquemia cerebral, traumatismo, envejecimiento cerebral, enfermedad de Alzheimer etc. Peroxida la membrana lipídica, disminuye la fluidez de la membrana celular, cambia los componentes  
45 y las actividades de las proteínas intracelulares, concentra la cromatina y rompe el ADN, y finalmente da como resultado la muerte de la célula. Por lo tanto, en una realización, se usa analgécine para mejorar la lesión inducida por  $H_2O_2$  en una célula PC12. Los aminoácidos excitadores, tales como el ácido glutámico, jugaban un importante papel en el curso de una diversidad de neuropatías crónicas o agudas que estarán acompañadas  
50 por la muerte neuronal. El ácido glutámico puede lesionar la línea celular nerviosa y la célula del nervio primario de una forma dependiente de la dosis. Es responsable del

aumento en el ión calcio intracelular y del bloqueo de la captación de cistina, e induce la pérdida del glutatión reducido intracelular (GSH), un aumento en radicales de oxígeno y la muerte de la célula nerviosa. Por lo tanto, puede usarse un modelo de lesión de la célula nerviosa inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o por ácido glutámico como un modelo de cribado de agentes neuroprotectores. Por lo tanto, en una realización, el analgécine es útil para mejorar la lesión inducida por ácido glutámico de la célula PC12, para inhibir la expresión o la excreción de la ICAM-1 en una célula endotelial de los vasos cerebrales y/o para inhibir las transformaciones de los linfocitos T y B.

Los linfocitos T muestran un aumento en el volumen celular, un metabolismo robusto, un aumento en la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos y son capaces de conseguir las divisiones de los linfoblastos después de ser estimulados por un antígeno específico o por un mitógeno no específico durante su cultivo in vitro. El nivel de la tasa de transformación de los linfocitos refleja la función inmunológica de las células en los individuos. Por lo tanto, la prueba de transformación de los linfocitos se usa ampliamente para determinar uno de los indicadores de las funciones inmunológicas de las células en un individuo, y también para el cribado de inmunomoduladores. Los estudios experimentales han averiguado que el analgécine tiene unos ciertos efectos inhibidores sobre la transformación de los linfocitos. Por lo tanto, en una realización, el analgécine es útil para inhibir las transformaciones de los linfocitos T y B.

Las membranas internas de los vasos, de las que está formado el endotelio, que consisten en células endoteliales, juegan un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis de los vasos. Las funciones de las células endoteliales pueden verse fácilmente afectadas por los ingredientes de la sangre debido a que dichas células están en contacto directo con la sangre. Las células endoteliales se activan en condiciones patológicas, tales como hipoxia, inflamación crónica y aguda, lesiones por isquemia, y a su vez expresan algunas moléculas de adhesión: la ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular 1), la VCAM-1 (molécula de adhesión celular vascular 1), la E-selectina y la P-selectina. Las moléculas de adhesión juegan un importante papel en los procesos patológicos del endotelio de los vasos sanguíneos y en los vasos, en los que la ICAM-1 juega un papel clave en la adhesión estrecha de los leucocitos al endotelio. Por lo tanto, en una realización, el analgécine es útil para inhibir la expresión o la excreción de la ICAM-1 en las células endoteliales de los vasos cerebrales.

### Breve descripción del dibujo

Fig 1. Efectos del analgécine sobre el volumen del infarto cerebral 48 horas después de una MCAO permanente

### Modo específico para llevar a cabo la invención

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado al comprendido normalmente por el experto habitual en la materia. A continuación se describen los métodos y los materiales ejemplares.

La presente invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos.

## Ejemplos 1: efectos protectores del analgécine en la isquemia cerebral aguda (MCAO) en ratas

### Materiales experimentales

5

#### 1. Fármacos y reactivos

10 Inyecciones de 10 u/ml de analgécine, 25 ml/vial (proporcionadas por Vanworld Pharmaceutical (Rugao) Co. Ud.); cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TIC), fabricado por Sigma (American); kit de MOA, SOD y deshidrogenasa de lactato, fabricado por el Nanjing Bioengineering Institute.

#### 2. Animales de prueba y agrupamiento

15 Las ratas Wistar macho, con un peso de 280-300 g, fueron proporcionadas por el Beijing Vitalriver Experimental Animal Center (北京维通利华实验动物中心) (Licencia: SCXK 京 2007-0004). Los animales fueron alojados de la forma convencional a la temperatura ambiente a 23-25°C antes o después de la cirugía, y se les proporcionó alimento y agua ad libitum.

20

25 Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en 6 grupos: un grupo de referencia, un grupo de modelo de lesión (control con vehículo), un grupo dosificado con analgécine (10 u/kg, 20 u/kg, 40 u/kg), un grupo dosificado con edaravone (3 mg/kg). Los fármacos se administraron a los animales 5 veces comenzando 2 h después de la cirugía (2 h, 6 h, 20 h, 24 h, 47 h). Los animales fueron sacrificados 48 horas después de la cirugía, y después se llevó a cabo cada prueba.

### Métodos experimentales

30

#### 1. Preparación de un modelo de rata de obstrucción de la arteria cerebral media

Se usó un método de inserción de hilo para la preparación de un modelo de isquemia cerebral con referencia al método de oclusión a través de la ligación con hilo de la arteria cerebral media de rata establecido por Zea Longa *et al* <sup>[5-6]</sup>.

35

##### 1.1 Preparación del trombo de hilo de nailon

40

Se crearon marcas en el punto de inicio y a 18,5 mm del punto de inicio del hilo, que se lavó con etanol al 75% (v/v), y se colocó en solución salina heparinizada a 1:2.500 hasta su uso.

##### 1.2 Anestesia prequirúrgica

45

A las ratas se les inyectó por vía intraperitoneal una solución de hidrato de cloral al 10% a 400 mg/kg.

50

### 1.3 Procesos quirúrgicos

#### (1) Preparación del campo visual quirúrgico:

5 Las ratas se fijaron en una posición dorsal y se realizó una incisión sobre la piel justo en la línea media del cuello. Se expuso la arteria carótida izquierda común (CCA) tras diseccionar en romo las capas de tejido.

#### (2) Separación de la arteria carótida:

10

Se separó cuidadosamente la arteria carótida interna (ICA) de la arteria carótida externa (ECA) hasta la última parte del punto de bifurcación, para evitar lesiones en el nervio vago y en la tráquea, y se colocaron los hilos para su uso posterior. Se separaron las arterias carótidas externas ipsilaterales y se realizó una ligación aproximadamente a 0,8 cm del comienzo de la ramificación de la ECA.

15

#### (3) Ligación de la arteria cerebral media:

20

Se usó una pinza de bulldog para pinchar el extremo proximal de la CCA, y se realizó una incisión de tipo "V" de aproximadamente 2 mm de diámetro entre la ligación de la ECA y el punto de bifurcación. Antes de retirar la pinza de bulldog, se insertó cuidadosamente el hilo de nailon en la CCA desde la incisión, y después se pasó a través del punto de bifurcación entre la arteria carótida interna y la arteria carótida externa en la arteria carótida interna. El hilo de nailon se empujó lentamente hacia la parte de la ICA en dirección intracraneal durante aproximadamente  $18,5 \pm 0,5$  mm de profundidad, hasta que apareció una ligera fuerza de resistencia, y después se pasó el otro extremo del hilo de nailon a través del comienzo de la MCA hasta alcanzar una arteria cerebral anterior más delgada. En este momento se ha conseguido el bloqueo del flujo sanguíneo en la arteria cerebral media izquierda, después se suturó la ICA para fijar el hilo de nailon y para evitar una hemorragia, seguido de la suturación en capas dejando 1 cm del extremo del hilo de nailon en el exterior de las pieles. La anestesia previa a la cirugía y a la operación de separación vascular sólo se llevaron a cabo en el grupo de referencia sin la ligación y la introducción del hilo. La temperatura ambiente se mantuvo a 24-25°C a lo largo del proceso quirúrgico.

25

30

35

### 2. Prueba neuroetológica

#### 2.1 Escala de Bederson

40

Antes de sacrificar los animales, fueron observados neuroetológicamente según los métodos descritos por Bederson<sup>[7]</sup> y Belvyev<sup>[8]</sup> etc., que incluyen: agarrar una rata por la cola aproximadamente 1 chi por encima del suelo para observar el estado de ambas extremidades anteriores; colocar la rata sobre un suelo plano y empujar sus dos hombros para observar si hay alguna diferencia en la resistencia entre los dos lados; colocar la rata en el suelo para observar su deambulación. Se puntuó cada animal. Todos los animales fueron clasificados en 3 grados con 10 puntuaciones en total basadas en la gravedad del síntoma. Una puntuación mayor representa el trastorno de comportamiento más grave según la clasificación de comportamiento estándar.

45

50

El método de puntuación en particular es como sigue:

| Método  | Síntoma   | Clasificación | Puntuación |
|---|---|---------------|------------|
| 1 + 2 + 3   | Resultados negativos de la prueba 1, 2, 3   | 0             | 0          |
| 1. Cuando se agarraba la cola de una rata aproximadamente 1 chi por encima del suelo, las extremidades anteriores de una rata normal se extienden simétricamente hacia atrás. | Las extremidades anteriores contralaterales se retraen con rotación interna tras una lesión.                            | 1             | 1          |
| 2. Colocar el animal sobre un plano liso y apretar los lados laterales de su cuerpo con las manos respectivamente.  | Disminuye la fuerza del músculo contralateral, y el animal tiende a caerse hacia el lado contralateral tras una lesión. | 2             | 3          |
| 3. Colocar el animal en el suelo y observar su deambulación.  | El animal se gira hacia un lado.  | 3             | 6          |

5

### 3. Determinación del volumen del infarto cerebral

Las ratas fueron decapitadas después de ser clasificadas. Los tejidos cerebrales se extrajeron y se colocaron en un congelador a -20°C durante 10 min, después a la temperatura ambiente. Después de la extracción del bulbo olfatorio, del cerebelo y del tallo cerebral inferior, se realizaron 4 incisiones en corona en 5 secciones cerebrales consecutivas en corona a un intervalo de 2 mm, según se muestra en la figura 1. La primera incisión se realizó en la zona media de la línea de conexión entre el polo procerebral y el quiasma óptico; la segunda fue en el quiasma óptico; la tercera fue en el infundíbulo; y la cuarta fue entre el infundíbulo y el núcleo caudado. Después, las secciones cerebrales se sumergieron rápidamente en 5 ml de una solución de TTC (que contiene 1,5 ml de una solución de TTC al 4% + 3,4 ml de agua destilada + 0,1 ml de una solución de 1 mol/l de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) en un baño a 37°C en la oscuridad durante 30 min. Las secciones se voltearon una vez cada 7-8 min. Después de la tinción, los tejidos cerebrales normales eran de color rosa, mientras que los tejidos infartados eran blancos y estaban claramente definidos. Se colocaron por orden las secciones cerebrales de cada grupo y se tomaron imágenes y se guardaron. Se usó un programa informático de un sistema de análisis de imagen para el procesado y el análisis estadístico. El volumen del infarto cerebral se determinó a través de la suma de los productos del área de cada sección cerebral para cada animal y 2 mm, el espesor de cada sección. El volumen del infarto se expresó en forma de un porcentaje del volumen del hemisferio, con objeto de eliminar los errores causados por el edema cerebral.

volumen de infarto cerebral (%) = (volumen del hemisferio contralateral en la cirugía - volumen del hemisferio contralateral en la cirugía sin infarto) / volumen del hemisferio contralateral en la cirugía x 100%

### 4. Determinación de los indicadores bioquímicos en los tejidos cerebrales

#### 4.1 Preparación de un homogeneizado de tejido cerebral

Después de decapitar las ratas, se extrajeron los cerebros. Se separó el hemisferio izquierdo del derecho y se extrajeron 1 mm del polo frontal y 1 mm del polo occipital. Los tejidos cerebrales se colocaron en tampón de homogenización frío (50 mmol/l de Tris-HCl, 150 mmol/l de NaCl, 5 mmol/l de CaCl, 0,1 mmol/l de PMSF, a pH 7,4) a una

proporción en volumen de 1:10, después se cortaron en trozos pequeños y se homogeneizaron a 4°C. La concentración de la proteína se determinó mediante el método de Bradford 101.

5 4.2 Medición de la deshidrogenasa de lactato en los tejidos cerebrales de las ratas

(1) Principio experimental

10 El sustrato, ácido láctico, fue catalizado en ácido pirúvico por la deshidrogenasa de lactato en presencia de coenzima 1 oxidada a pH 10, después, el ácido pirúvico resultante pudo reaccionar con 2,4-dinitrofenilhidrazina para dar piruvato de dinitrofenilhidrazona de un color parduzco. El contenido en ácido pirúvico puede ser determinado mediante un ensayo colorimétrico, a partir del cual puede derivarse la actividad de la deshidrogenasa de lactato.

15

(2) Método de la prueba

20 La actividad de la deshidrogenasa de lactato se determinó según las instrucciones del kit. Se añadieron 10 µl de homogeneizado y 10 µl de coenzima I a 5 g l<sup>-1</sup> a la solución del medio tamponado, y se incubaron a 37°C durante 15 m in; después se añadieron 50 µl de 2,4-dinitrofenilhidrazina a 0,2 g l<sup>-1</sup>, se incubaron a 37°C durante 15 min; se añadieron 150 µl de NaOH a 0,4 mol/l y se mezclaron, después se leyó la absorbancia a 440 nm después del calibrado. La curva patrón se representó gráficamente con patrones de piruvato de sodio.

25

4.3 Determinación de la actividad de la dismutasa de superóxido (SOD) en los tejidos cerebrales de las ratas

(1) Principio experimental

30

Se produjeron radicales de anión superóxido mediante un sistema de reacción de xantina y oxidasa de xantina, que puede oxidar la hidroxilamina para formar un nitrito que será desarrollado con un color rojo púrpura por el agente cromogénico. La SOD de la muestra inhibe específicamente los radicales de anión superóxido, y consecuentemente se reducirá el nitrito producido.

35

(2) Método de la prueba

40 La homogeneización se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente. La actividad de la SOD fue determinada según las instrucciones del kit después de haber mezclado bien el homogeneizado. Una unidad de nitrito se corresponde con el valor cuando se ha alcanzado una inhibición del 50% de la SOD por cada miligramo de proteína de los tejidos en 1 ml de solución de reacción.

45 5. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como las medias ± DT. Las comparaciones de datos entre los grupos se llevaron a cabo mediante la prueba de la t.

50

## Resultados del ensayo

## 1. Efectos del analgécine sobre la sintomatología neurológica de la isquemia cerebral aguda en ratas

5

Las ratas anestesiadas recuperaron la consciencia y han desarrollado diversos grados de disfunción neural focal después de la isquemia cerebral, lo que se representa en forma de una ausencia de fuerza en la parte inferior de sus extremidades izquierdas, girando a la izquierda cuando caminan erguidas, girando hacia la izquierda e incluso no siendo capaces de caminar, e incluso mostrando un trastorno de la consciencia; cuando se agarran por la cola muestran una flexión de la extremidad anterior izquierda, una retracción, así como una extensión de la extremidad posterior y un giro a la derecha. Los animales del grupo de modelo mostraron los síntomas obvios de una lesión neural después de una isquemia cerebral, con un aumento significativo en la puntuación de la función neural ( $P < 0,01$ ); 40 u/kg de analgécine mejoraron significativamente los síntomas de la función neural ( $P < 0,05$ ), mientras que los grupos con 10, 20 u/kg no tenían efectos significativos de mejora. No había ninguna diferencia significativa entre el grupo con edaravone y el grupo de modelo. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

15

Tabla 1: efectos del analgécine sobre la puntuación de los síntomas neurológicos de la MCAO en ratas

| Grupos                                       | Dosis   | Animales (n) | Puntuaciones            |
|--|---------|--------------|-------------------------|
| Grupo de referencia                          | --      | 8            | 0                       |
| Grupo de modelo                              | --      | 8            | 5,3 ± 2,8 <sup>##</sup> |
| Grupo con una dosis baja de analgécine       | 10 u/kg | 8            | 3,4 ± 2,5               |
| Grupo con una dosis intermedia de analgécine | 20 u/kg | 8            | 3,4 ± 2,8               |
| Grupo con una dosis alta de analgécine       | 40 u/kg | 7            | 2,0 ± 2,6 *             |
| Grupo con edaravone                          | 3 mg/kg | 6            | 4,3 ± 1,6               |

Los valores se expresaron como las medias ± E.E.M., 6 ~ 8 animales por grupo.  
<sup>##</sup>  $P < 0,05$  en comparación con el grupo de referencia.  
\*  $P < 0,05$  en comparación con el grupo de modelo.

20

## 2. Efectos del analgécine en el volumen del infarto cerebral de una isquemia cerebral aguda en ratas

25

Los tejidos cerebrales normales mostraron un color rosa en su totalidad después de la tinción, mientras que los tejidos infartados mostraban un color blanco y estaban claramente definidos. Excepto para el grupo de referencia, todas las cortezas cerebrales de los demás grupos mostraron evidentes focos de infarto e incluso el estriado está afectado. El área del infarto cerebral en el grupo con edaravone y con una dosis intermedia de analgécine disminuyó significativamente. Los resultados se mostraron en la Figura 1.

30

## 3. Efectos del analgécine sobre el nivel de ácido láctico en los tejidos cerebrales isquémicos agudos de ratas

35

El nivel de ácido láctico en los tejidos cerebrales de las ratas aumentó hasta  $0,98 \pm 0,09$  mmol/g de proteína después de la lesión por isquemia, con una diferencia significativa ( $P < 0,01$ ) en comparación con el grupo de referencia; el nivel de ácido láctico en el grupo con 40 u/kg de analgécine disminuyó significativamente hasta  $0,70 \pm 0,07$  mmol/g de proteína con una significación estadística ( $P < 0,05$ ) en comparación con el grupo de

40

modelo; el nivel de ácido láctico en el grupo con edaravone disminuyó significativamente hasta  $0,64 \pm 0,08$  mmol/g de proteína con una significación estadística ( $P < 0,05$ ) en comparación con el grupo de modelo. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: efectos del analgécico sobre el nivel de ácido láctico en los tejidos cerebrales de las ratas 48 horas después de una MCAO permanente

| Grupos                                       | Dosis   | Animales (n) | Nivel de ácido láctico (mmol/g de proteína) |
|--|---------|--------------|---|
| Grupo de referencia                          | ---     | 4            | $0,37 \pm 0,01$                             |
| Grupo de modelo                              | ---     | 6            | $0,98 \pm 0,09^{##}$                        |
| Grupo con una dosis baja de analgécico       | 10 u/kg | 5            | $0,74 \pm 0,14$                             |
| Grupo con una dosis intermedia de analgécico | 20 u/kg | 5            | $0,88 \pm 0,11$                             |
| Grupo con una dosis alta de analgécico       | 40 u/kg | 5            | $0,70 \pm 0,07^*$                           |
| Grupo con edaravone                          | 3 mg/kg | 6            | $0,64 \pm 0,08^*$                           |

Los valores se expresaron como las medias  $\pm$  E.E.M., 4 ~ 6 animales/grupo.

$## P < 0,01$  en comparación con el grupo de referencia.

$* P < 0,05$  en comparación con el grupo de modelo.

5

4. Efectos del analgécico sobre la actividad de la dismutasa de superóxido en los tejidos cerebrales de ratas

- 10 El nivel de la SOD en los tejidos cerebrales de las ratas disminuyó hasta  $165,84 \pm 13,14$  nmol/g de proteína con una diferencia significativa ( $P < 0,01$ ) en comparación con el grupo de referencia después de la lesión por isquemia; el nivel aumentó significativamente en los grupos con una dosis de 20 u/kg y de 40 u/kg de analgécico en comparación con el grupo de modelo ( $P < 0,05$ ); el nivel de la SOD en el grupo con edaravone aumentó significativamente en comparación con el grupo de modelo ( $P < 0,01$ ). Los resultados se muestran en la Tabla 3.
- 15

Tabla 3. Efectos del analgécico sobre la actividad de la SOD en los tejidos cerebrales de ratas 48 horas después de una MCAO permanente

| Grupos                                       | Dosis   | Animales (n) | Actividad de la SOD (U/mg de pro) |
|--|---------|--------------|-----------------------------------|
| Grupo de referencia                          | ---     | 4            | $354,17 \pm 64,26$                |
| Grupo de modelo                              | ---     | 6            | $165,84 \pm 13,14^{##}$           |
| Grupo con una dosis baja de analgécico       | 10 u/kg | 5            | $198,96 \pm 12,89$                |
| Grupo con una dosis intermedia de analgécico | 20 u/kg | 5            | $263,46 \pm 34,86^*$              |
| Grupo con una dosis alta de analgécico       | 40 u/kg | 5            | $268,09 \pm 32,42^*$              |
| Grupo con edaravone                          | 3 mg/kg | 6            | $234,66 \pm 15,85^*$              |

Los valores se expresaron como las medias  $\pm$  S.E.M., 4--6 animales/grupo.

$## P < 0,05$  en comparación con el grupo de referencia.

$* P < 0,05$  en comparación con el grupo de modelo.

## 20 Ejemplos 2: efectos del analgécico sobre una lesión en células PC12 inducida por $H_2O_2$

Materiales experimentales

### 25 1. Fármacos y reactivos

Las células PC12 se adquirieron en el Institute of Basic Medical Sciences of Chinese Academy of Medical Sciences; el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

(MTT), la tripsasa, la polilisina, el suero bovino fetal estándar (FBS), el medio 1640, el kit de LDH (disponibles como anteriormente). Todos los demás reactivos convencionales son reactivos analíticamente puros disponibles comercialmente en China.

5 2. Instrumentos

Banco de trabajo súper limpio; lector de microplacas Fluostar (BMG, Alemania); estufa de incubación celular (Sanyo, Japón); centrífuga refrigerada DL-40008 (Shanghai Anting Scientific Instrument Factory); y Microscopio IX71 (OLYMPUS).

10

Método experimental

1. Cultivo de las células PC 12

15

Las células PC12, proporcionadas por el Institute of Basic Medical Sciences of Chinese Academy of Medical Sciences, se cultivaron en medio 1640 completo (que contiene un 10% de suero equino, un 5% de suero bovino fetal, 100 U/mi de penicilina, 100 ug/ml de estreptomycin) a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub> en una estufa de incubación termostatzada, cambiándose el medio cada 2-3 días <sup>[6]</sup>.

20

2. Procesado de las células

Grupo de control normal: las células PC12 se cultivaron normalmente en medio DMEM que contiene suero; grupo de modelo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: los medios originales se retiraron después de que los cultivos de las células PC12 fueran confluentes en una monocapa, se añadió medio exento de suero que contiene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la concentración final de 200 µmol/l, y los cultivos se incubaron en una estufa de incubación termostatzada a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h; grupo de tratamiento con muestra: después de que los cultivos de las células PC12 fueran confluentes en una monocapa, los medios originales se retiraron, se añadió una muestra para el pretratamiento durante 1 h, seguido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración final de 200 µmol/l, después los cultivos se incubaron exentos de suero durante 24 h.

25

30

3. Ensayo de vitalidad de las células

35

A cada pocillo se añadieron soluciones de 100 µl de MTT a una concentración final de 0,5 mg/ml, y los cultivos se incubaron adicionalmente a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 h, después se desechó el sobrenadante. A cada pocillo se añadieron 100 µl de DMSO y se agitaron, después se midió el valor de la DO de la absorbancia a 540 nm.

40

Viabilidad de las células =  $A_{\text{pocillo de prueba}} / A_{\text{pocillo de control normal}} * 100\%$

Resultados del ensayo

45

La viabilidad de las células PC12 disminuyó hasta un 71,94 ± 3,54% que mostró una diferencia significativa (P < 0,01) en comparación con el grupo de control normal después de la lesión por peróxido de hidrógeno; y la viabilidad en los grupos con las dosis de 0,25, 0,5, 1 u/mi de analgécine aumentó significativamente en comparación con el grupo de modelo (P < 0,05).

50

Tabla 4 Efectos protectores del analgécico sobre las células PC12 lesionadas por peróxido de hidrógeno

| Grupos                    | Dosis                                | Viabilidad de las células (%) |
|---------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| Grupo de control normal   | --                                   | 100 ± 4,30                    |
| Grupo de modelo de lesión | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 uM | 71,94 ± 3,34 ##               |
| Analgécico                | 1 U/ml                               | 80,17 ± 0,64 *                |
| Analgécico                | 0,5 U/ml                             | 91,53 ± 2,24 **               |
| Analgécico                | 0,25 U/ml                            | 91,57 ± 0,35 **               |

Los valores se expresaron como las medias ± DT, n = 3 para cada grupo.  
 # P < 0,05, ## P < 0,01 en comparación con el grupo normal.  
 \* P < 0,05, \*\* P < 0,01 en comparación con el grupo de modelo.

**Ejemplo 3 Efectos protectores del analgécico sobre células nerviosas lesionadas por ácido glutámico Materiales experimentales**

5

1. Fármacos y reactivos

Las células PC12 se adquirieron en el Institute of Basic Medical Sciences of Chinese Academy of Medical Sciences; el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTI), la tripsina, la polilisina se adquirieron en Sigma. El suero bovino fetal estándar (FBS), el medio 1640 se adquirieron en Gibco. Todos los demás reactivos convencionales son reactivos analíticamente puros disponibles comercialmente en China.

10

2. Instrumentos

15

Banco de trabajo súper limpio; lector de microplacas Fluostar (BMG, Alemania); estufa de incubación celular (Sanyo, Japón); centrifuga refrigerada DL-40008 (Shanghai Anting Scientific Instrument Factory); Microscopio IX71 (OLYMPUS).

20

Método experimental

1. Cultivo de las células PC12

25

Las células PC12 se cultivaron en medio 1640 completo (que contiene un 10% de suero equino, un 5% de suero bovino fetal, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin) en una estufa de incubación termostatazada a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub> cambiándose el medio cada 2-3 días.

2. Procesado de las células

30

Después de que los cultivos de las células PC 12 fueran confluyentes en una monocapa, se retiraron los medios originales, se añadió una solución de Earle exenta de Mg<sup>2+</sup> (142,6 mmol/l de NaCl, 5,4 mmol/l de KCl, 1,8 mmol/l de CaCl<sub>2</sub>, 1,0 mmol/l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,38 mmol/l de HEPERS, 5,6 mmol/l de Glucosa, a pH 7,4, L-gly 0,5 uM) que contiene ácido L-glutámico 1 mM. La solución fue sustituida por medio 1640 exento de suero después de 15 min. La determinación se llevó a cabo 24 h después. La solución del grupo con las dosis fue sustituida por medio 1640 exento de suero que contiene el fármaco, y la determinación se llevó a cabo después de la incubación de las células durante 24 h.

35

40

3. Ensayo de vitalidad de las células

A cada pocillo se añadieron soluciones de 100 JJI de MTI a una concentración final de 0,5 mg/ml, y los cultivos se incubaron adicionalmente a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 h. El sobrenadante se desechó. Se añadieron 100 µl de DMSO a cada pocillo y se agitaron, después se midió el valor de la DO de la absorbancia a 540 nm.

$$\text{Viabilidad de las células} = A_{\text{pocillo de prueba}} / A_{\text{pocillo de control normal}} * 100\%$$

10 Resultados del ensayo

La viabilidad de las células PC12 disminuyó hasta un 74,76 ± 4,86 % después de la lesión por ácido glutámico, que mostró una diferencia significativa (P < 0,01) en comparación con el grupo de control normal; la viabilidad en el grupo con las dosis de 0,25, 0,5, 1 u/ml de analgécine aumentó significativamente en comparación con el grupo de modelo (P < 0,01).

| Grupos                    | Dosis                                | Viabilidad de las células (%) |
|---------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| Grupo de control normal   |                                      | 100 ± 7,15                    |
| Grupo de modelo de lesión | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 uM | 74,76 ± 4,86 <sup>##</sup>    |
| Analgécine                | 1 U/ml                               | 90,88 ± 5,67 <sup>**</sup>    |
| Analgécine                | 0,5 U/ml                             | 93,42 ± 4,13 <sup>**</sup>    |
| Analgécine                | 0,25 U/ml                            | 91,69 ± 3,61 <sup>**</sup>    |

Los valores se expresaron como las medias ± DT, n = 4 para cada grupo.  
<sup>#</sup> P < 0,05, <sup>##</sup> P < 0,01 en comparación con el grupo normal.  
<sup>\*</sup> P < 0,05, <sup>\*\*</sup> P < 0,01 en comparación con el grupo de modelo.

15 **Ejemplos 4 Efectos del analgécine sobre la expresión o la excreción de la ICAM-1 inducida por LPS en las células endoteliales de los vasos cerebrales**

Materiales experimentales

20 1. Fármacos y reactivos

Los kits de ensayo de ELISA de la ICAM-1 se adquirieron en Wuhan Boster Bio-engineering Ud. Co. El factor de crecimiento de las células endoteliales fue proporcionado por Rache. El suero bovino fetal era un producto de Gibco. El bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), la tripsasa, la polilisina y el lipopolisacárido (LPS) se adquirieron en Sigma. El suero bovino fetal estándar (FBS), el medio 1640 se adquirieron en Gibco.

30 2. Instrumentos

Banco de trabajo súper limpio; lector de microplacas Fluostar (BMG, Alemania); estufa de incubación de cultivos celulares (Sanyo, Japón); centrifuga refrigerada DL-40008 (Shanghai Anting Scientific Instrument Factory); Microscopio IX71 (OLYMPUS); espectrofotómetro UV-Vis Zenyth 200st (Anthos Co. Austria).

35

## Método experimental

## 1. Cultivo de las células endoteliales de los vasos cerebrales de ratas

5 Se decapitaron ratas Wistar neonatales de 1-5 días de edad. Se recogieron los tejidos de la corteza, se homogeneizaron y se filtraron antes de recoger los segmentos de los microvasos en la pantalla del filtro. Los segmentos se digirieron con un 0,1‰ de colagenasa de tipo VII, seguido de una centrifugación. Se añadió medio M199 que  
10 contiene un 15% de suero bovino fetal al precipitado, que se cultivó en una estufa de incubación a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se digirieron con un 0,25% de tripsinasa para los pases. VIII F: se llevó a cabo el ensayo de inmunocitoquímica del Ag para las células endoteliales de los vasos sanguíneos con una pureza superior al 95%. En este ensayo se usa el pase 3 de las células endoteliales de los microvasos.

15 2. Determinación de la secreción de la ICAM-1 de las células endoteliales mediante un ensayo de ELISA

20 Las células endoteliales de los vasos cerebrales se cultivaron en una placa de 96 pocillos. Se añadió LPS (10 ug/ml) a los pocillos para una estimulación durante 24 h cuando las células endoteliales eran confluyentes en una monocapa, después se determinó la ICAM-1 en el sobrenadante de las células. La cantidad de ICAM-1 para cada muestra se derivó a partir de una curva patrón.

## Resultados del ensayo

25 Después de la lesión por el lipopolisacárido (LPS), la ICAM-1 expresada o excretada por las células endoteliales en los vasos cerebrales mostró una diferencia significativa ( $P < 0,01$ ) en comparación con el grupo de control normal; la ICAM-1 en los grupos con las dosis de 0,25, 0,5, 1 u/ml de analgécine aumentó significativamente en comparación  
30 con el grupo de modelo ( $P < 0,01$ ).

Tabla 6 Efectos del analgécine sobre la expresión o la excreción de la ICAM-1 por parte de las células endoteliales de los vasos cerebrales en ratas

| Grupos                    | Dosis          | ICAM-1 (pg/ml)               |
|---------------------------|----------------|------------------------------|
| Grupo de control normal   |                | 62,34 ± 4,54                 |
| Grupo de modelo de lesión | LPS (10 ug/ml) | 485,09 ± 12,88 <sup>##</sup> |
| Analgécine                | 1 U/ml         | 205,54 ± 3,21 <sup>**</sup>  |
| Analgécine                | 0,5 U/ml       | 167,73 ± 25,50 <sup>**</sup> |
| Analgécine                | 0,25 U/ml      | 179,55 ± 58,43 <sup>**</sup> |

Los valores se expresaron como las medias ± DT, n = 4 para cada grupo.

<sup>#</sup>  $P < 0,05$ , <sup>##</sup>  $P < 0,01$  en comparación con el grupo normal.

<sup>\*</sup>  $P < 0,05$ , <sup>\*\*</sup>  $P < 0,01$  en comparación con el grupo de modelo.

## Ejemplos 5 Efectos del analgécine sobre la transformación de linfocitos

35

## Materiales experimentales

## 1. Fármacos y reactivos

40 El medio 1640 (que contiene un 10% de suero bovino, anticuerpo doble, glutamina), el agua bidestilada, la solución salina, los ConA y PMA, se adquirieron todos en Sigma.

## 2. Animales

Los ratones Balb/c se adquirieron en el Institute of Zoology of Chinese Academy of Medical Sciences.

5

## 3. Instrumentos

Banco de trabajo súper limpio; lector de microplacas Fluostar (BMG, Alemania); estufa de incubación de cultivos celulares (Sanyo, Japón); centrifuga refrigerada DL-40008 (Shanghai Anting Scientific Instrument Factory); Microscopio IX71 (OLYMPUS); y espectrofotómetro UV-Vis Zenyth 200st (Anthos Co. Austria).

10

## Método experimental

1. Se recogieron los bazo de los ratones Balb/C mediante el uso de un método convencional en condiciones asépticas, y se trituraron suavemente con una mano de mortero, seguido de un paso a través de un tamiz de acero de 200 de malla, después se lavaron una vez con medio 1640, y se centrifugaron a 2.000 rpm x 5 min.

15

2. Los sedimentos de las células se lavaron con agua bidestilada y solución salina para disrumpir los eritrocitos, se centrifugaron y el sobrenadante se desechó. Las concentraciones de las células se ajustaron a  $2 \times 10^6$ /ml con medio 1640, después se colocaron en placas de 96 pocillos a 100  $\mu$ l/pocillo, mientras se añadía ConA (concentración final de 5  $\mu$ g/ml) o PMA (concentración final de 5  $\mu$ g/ml) a 90  $\mu$ l/pocillo. Se añadieron las muestras o ciclosporina A (concentración final de 50 nM, control positivo) a 10  $\mu$ l/pocillo, con pocillos establecidos como pocillo de control en blanco (exento del inductor y del fármaco) o pocillo de control negativo (con la inclusión del inductor pero exento de fármaco), después se incubaron a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 h.

20

25

3. El sobrenadante se desechó y se añadieron 100  $\mu$ l de MTI (concentración final del 0,04%) 4 horas antes de la finalización del cultivo. La DO se determinó a 540 nm al finalizar el cultivo.

30

4. Los efectos de la muestra sobre la transformación de los linfocitos se expresaron en forma de un porcentaje, en el que las cifras positivas representan una mejora en la transformación de los linfocitos, y las cifras negativas representan una inhibición en la transformación de los linfocitos. Transformación de los linfocitos, % = (valor de la DO del pocillo de la muestra - valor de la DO del pocillo de control negativo) / (valor de la DO del pocillo de control negativo - valor de la DO del pocillo de control en blanco) x 100%

35

40

## Resultados del ensayo

Los resultados mostrados en la Tabla 7 indicaron que el analgécico tiene ciertos efectos inhibidores sobre la transformación de los linfocitos.

45

Tabla 7 Efectos del analgécico sobre la transformación de los linfocitos

| Grupo      | Dosis    | Transformación de los linfocitos T (%) | Transformación de los linfocitos B (%) |
|------------|----------|--|--|
| Analgécico | 0,5 U/ml | -67,70                                 | -70,66                                 |
|            | 0,25 U   | -68,62                                 | -19,46                                 |
|            | 0,125 U  | -71,76                                 | -25,86                                 |

## Referencias

- 5 1. Koroshetz WJ, and Moskowitz MA. Emerging treatments for stroke in human. Trends Pharmacol Sci. 1996, 17 (6): 227-233.
2. Higashida RT, Furlan AJ, Roberts H, Tomsick T, Connors B, Barr J, Dillon W, Warach S, BrDOerick J, Tilley B, Sacks D. Trial design and reporting standards for intra-arterial cerebral thrombolysis for acute ischemic stroke. Stroke. 2003, 34: 109-137.
- 10 3. Feng YP. Pathophysiology of ischemic stroke and status of drug intervention. Acta Pharm Sin. 1999, 34: 72-78.
4. Fisher M, Bogosky J. Further evaluation toward effective therapy for acute ischemic stroke. JAMA. 1998, 279 1298-1303.
- 15 5. Langa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke. 1989, 20: 84-91.
6. Maier CM, Ahern K, Cheng ML et al. Optimal depth and duration of mild hypothermia in a focal mDOel of transient cerebral ischemia: effects on neurologic outcome, infarct size, apoptosis, and inflammation. Stroke. 1998, 29: 2171-2180.
- 20 7. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M et al., Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the mDOel and development of a neurologic examination. Stroke. 1986, 17: 4 72-476.
- 25 8. Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture: Neurological and pathological evaluation of an improved mDOel. Stroke. 1996, 27: 1616-1622.
- 30 9. Bederson JB, Pitts LH, Germano SM. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. Stroke. 1986, 17: 1304-1309.
- 35 10. Bradford. MM. A rapid and sensitive methDO for the quantition of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976, 72: 248-252.
- 40 11. Okawa M, Kinjo J. Nohara T; DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. Biol Pharm Bull. 2001; 24 (10):1202-5.
- 45 12. Leizhimeing, Xuebin, Zhaoxiong, et al., Determination of the proliferation of lymphocyte by MTT color reaction assay using 721 spectrophotometer (Jf]721 & /LMMTTMfc), Current Immunology ( ), 1990; 10 (3): 172.
- 50 13. Emerich DF, Dean RL, Bartes RT, et al., The role of leukocytes following cerebral ischemia: pathogenic variable or bystander reaction to emerging infarct. Exp Neurol, 2002, 173:168.

**REIVINDICACIONES**

1. Analgécine para su uso como un medicamento para el tratamiento de una enfermedad cerebrovascular isquémica aguda,

5

en el que después de la isquemia del tejido cerebral se usa analgécine para proteger una célula nerviosa de una lesión o para disminuir el nivel de ácido láctico en el tejido cerebral o para aumentar la actividad de la dismutasa de superóxido, y en el que la enfermedad cerebrovascular isquémica aguda se selecciona entre el grupo que consiste en embolia cerebral, ataque isquémico cerebral transitorio, trombosis cerebral, arteriosclerosis cerebral, arteritis cerebral, síndrome de robo de la arteria cerebral, trombosis de los senos venosos craneales y venosa.

10

2. Analgécine para su uso como un medicamento según la reivindicación 1, en el que el analgécine mejora la lesión inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las células PC12 o el analgécine mejora la lesión inducida por el ácido glutámico en una célula PC12 o el analgécine inhibe la expresión o la excreción de la ICAM-1 por parte de una célula endotelial en un vaso cerebral o el analgécine inhibe la transformación de los linfocitos T y B.

15

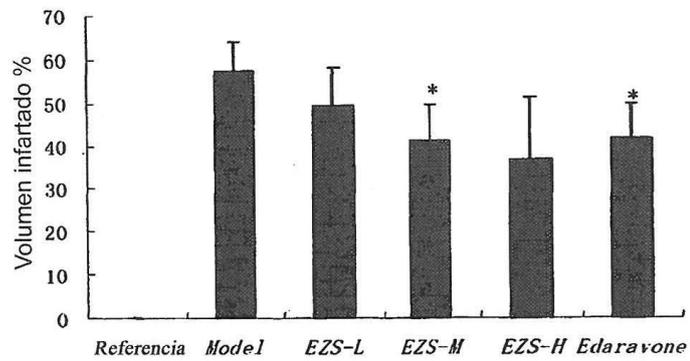
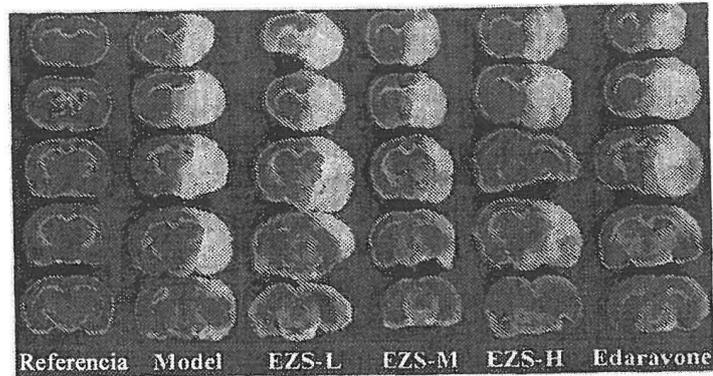


Fig 1. Efectos del analgésico sobre el volumen del infarto cerebral 48 horas después de una MCAO permanente. Los valores se expresaron en forma de porcentaje en volumen (medias  $\pm$  DT) para 3 animales por grupo. Referencia: grupo de referencia. Modelo: grupo de modelo. Analgésico-L: dosis baja de analgésico; Analgésico-M: dosis intermedia de analgésico; Analgésico-H: dosis alta de analgésico. \*  $P < 0,05$  en comparación con el grupo de modelo.