

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 637**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4015 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2012 PCT/CN2012/074576**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2013 WO13075459**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2012 E 12850864 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 2783685**

54 Título: **Uso de levo-oxiracetam para la preparación de medicamentos para la prevención o el tratamiento del coma**

30 Prioridad:

23.11.2011 CN 201110376607

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

14.02.2018

73 Titular/es:

**CHONGQING RUZER PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
No.9 Qinye Road, Yubei District
Chongqing 401120, CN**

72 Inventor/es:

YE, LEI

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 654 637 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

Uso de levo-oxiracetam para la preparación de medicamentos para la prevención o el tratamiento del coma

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a levo-oxiracetam para su uso en la prevención o el tratamiento del coma, como se define en las reivindicaciones.

10 **Descripción de la técnica anterior**

Oxiracetam (oxiracetam) es un fármaco nootrópico que fue sintetizado por vez primera en 1974 por la compañía farmacéutica italiana, ISF S.P.A., el fármaco se introdujo en el mercado italiano en 1987. Oxiracetam es una composición racémica que incluye dos isómeros (S)-oxiracetam y (R)-oxiracetam. Los informes sobre oxiracetam muestran que oxiracetam, que puede promover ATP cerebral, promover la síntesis de la acetilcolina, potenciar la conducción nerviosa, mejorar el efecto de amnesia retrógrada inducida por hipoxia y la memoria, y mejorar la capacidad de aprendizaje, es el tratamiento para la demencia tipo Alzheimer (DA), demencia vascular (DV), etc. y trastornos de fármacos eficaces.

L-oxiracetam ((S)-4-hidroxi-2-oxo-pirrolidinacetamida) es oxiracetam de tipo levo (número CAS 62613-82-5), un polvo blanco microcristalino con un punto de fusión a 135-136 °C y rotación óptica de -36,0° (C = 1,00 en agua). La solubilidad de L-oxiracetam es significativamente mejor que el racemato.

El documento CN 101367757A desvela un método de preparación para la preparación de (S)-4-hidroxi-2-oxo-1-pirrolidinacetamida. Se utiliza éster del ácido (S)-4-halo-3-hidroxi-butírico como materia prima en un disolvente polar y en condiciones básicas para producir L-oxiracetam. Las condiciones básicas significan que la reacción se lleva a cabo a través del aumento alcalino en el curso de la reacción, y dejando caer cloruros para controlar el valor pH. El producto crudo obtenido mediante el uso de la resina de intercambio catiónico es una solución acuosa ácida del producto, y a continuación se utiliza una resina de intercambio aniónico para neutralizar la solución ácida, y la solución neutralizada se concentró para obtener el producto crudo y el producto crudo se recristalizó por etanol una vez con disolvente de cristalización o recristalización mixto de metanol/acetona a partir de isopropanol antes de un proceso para preparar L-oxiracetam.

El coma es la alteración más grave de la conciencia debido a la alta supresión de la estructura cortical inferior y reticular subcortical, es decir, una interrupción sostenida o estado más altamente suprimido de la pérdida completa de conciencia de las actividades nerviosas más altas, y una condición sería en pacientes con pérdida completa de la conciencia. El alcoholismo es una de las tres causas del coma. Con el vertiginoso ritmo de vida moderna y el aumento del estrés mental de las personas, el aumento de alcohólicos es cada vez más frecuente, el fenómeno de estar ebrio y el coma por alcohol son cada vez más comunes. El coma inducido por traumatismo es una de las tres causas de coma producidas actualmente en un accidente de tráfico, caídas y otros comas inducidos por traumatismos también es más común. El coma inducido por anestesia es hoy en día una negligencia médica común. Algunos pacientes no podrían despertar y no hay percepción alguna después de la anestesia. El coma inducido por anestesia es una de las tres causas de coma. Cómo mejorar aún más la tasa de curación de despertar del coma para reducir la mortalidad y mejorar el nivel de la función de excitación y cognitiva es una cuestión importante que se afronta hoy en día, para resolver este problema tendría que tener un significado práctico importante. Zhang *et al.* desvelan en la Tesis de Máster titulada "*The neuroelectrophysiological study of the effects of oxiracetam treating the mild and moderate traumatic brain injury*" (1 de mayo de 2005), que el oxiracetam trata a los pacientes en coma que quedan comatosos debido a una operación quirúrgica y les permite ganar conciencia. El documento CN-A-101396358 desvela la administración parenteral de oxiracetam para el tratamiento de lesiones craneoencefálicas, tal como coma. El documento WO-A-2011/120281 desvela L-oxiracetam con una pureza del 99,3 % para su uso en el tratamiento de la disfunción cognitiva. El documento CN-A-101766597 enseña que L-oxiracetam es un nootrópico.

Sumario de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar levo-oxiracetam para su uso en la prevención o el tratamiento del coma.

Específicamente, la presente invención se refiere a la preparación de L-oxiracetam para la prevención o el tratamiento del alcoholismo como un medicamento de coma inducido, medicamento de coma inducido por narcóticos y medicamento de coma traumático. La presente divulgación se refiere a la preparación de oxiracetam para la prevención o el tratamiento del alcoholismo como un medicamento de coma inducido, medicamento de coma inducido por narcóticos y medicamento de coma traumático.

El uso de levo-oxiracetam y oxiracetam en la preparación de medicamentos para la prevención o el tratamiento del coma se refiere específicamente a la preparación de la composición farmacéutica de principios activos como oxiracetam o L-oxiracetam. Las formas de dosificación pueden ser inyecciones tales como polvo para inyección o

solución de inyección, o pueden ser formulaciones orales tales como comprimidos, píldoras, polvos, gránulos, cápsulas y similares. Las formulaciones descritas anteriormente se pueden preparar de acuerdo con los métodos convencionales.

5 Dichas formas de dosificación se encuentran preferentemente en forma de cápsulas orales, comprimidos o inyecciones.

10 La dosificación de las formulaciones orales de L-oxiracetam descrita anteriormente es 5-30mg/kg/día, más preferentemente 10-20 mg/kg/día. La dosis de inyección de L-oxiracetam es 50-90 mg/kg/veces. La dosificación de las formulaciones orales de L-oxiracetam descrita anteriormente es 10-60mg/kg/día, y más preferentemente es 20-40 mg/kg/día. La dosificación de inyección de oxiracetam es 50-90mg/kg/veces, 100-180mg/kg/veces.

15 Lo más preferentemente, el uso de levo-oxiracetam en la preparación de medicamentos para la prevención o el tratamiento del coma utiliza una pureza del 99,3 % (pureza óptica) de L-oxiracetam como principio activo, basado en el porcentaje en peso.

Para verificar adicionalmente el efecto farmacéutico de la presente invención, los inventores han llevado a cabo los siguientes ensayos.

20 A. La farmacocinética de L-oxiracetam *in vivo* y estudios de biodisponibilidad absoluta

El estudio de la comparación de la farmacocinética de oxiracetam racémico y L-oxiracetam determina la dosis por vía oral y por vía intravenosa a perros de raza Beagle para 50 mg/kg.

25 Se cogen seis perros de raza Beagle adultos, el número de hembras y machos era idéntico, que fueron pesados 10,0 ± 0,5 kg y se dividieron aleatoriamente en tres grupos, y siendo cada grupo de dos con el mismo número de machos y hembras. Se utilizó un método de cruce en cuadrado latino (véase la Tabla 1). A los perros de raza Beagle se les administró por vía oral y por vía intravenosa una dosis de 50 mg/kg. Se utilizaron muestras de L-oxiracetam con una pureza del 99,3 % (ópticamente pura). Cada vía de administración se realizó cada semana. Los animales administrados por vía oral se dejaron en ayunas durante 12 horas después de la administración, y luego se continuó con el ayuno tres horas después de la administración. La sangre en blanco fue extraída antes de la administración. Se extrajo una muestra de sangre de 1 ml de la vena de las extremidades anteriores en tubos heparinizados en 0,083, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 12,0 y 24,0 horas después de la administración oral, o se extrajo en 0,083, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 12,0 y 24,0 horas después de la administración intravenosa, y se centrifugó para obtener plasma. Las concentraciones de fármacos en plasma se determinaron por el método LC-MS-MS. Los resultados se muestran en la siguiente tabla 2-7.

Tabla 1 Diseño experimental de un cruce en cuadrado latino de tres ciclos para un agrupamiento de perros de raza Beagle

	ORT, p.o		s-ORT, p.o		sORT, i.v	
Género	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Primer ciclo	1	4	2	5	3	6
Segundo Ciclo	3	6	1	4	2	5
Tercer ciclo	2	5	3	6	1	4

Nota: ORT es oxiracetam; s-ORT es levo-oxiracetam

40 Las concentraciones de fármaco en plasma de los perros administrados con 50 mg/kg de oxiracetam y L-oxiracetam por vía intravenosa y oral se enumeran en la Tabla 2-4.

45 Tabla 2 Concentraciones de fármaco en plasma de perros de raza Beagle tras la administración por vía intravenosa de 50 mg/kg de oxiracetam y L-oxiracetam (µg/ml)

Tiempo (h)	1	2	3	4	5	6	x	s
0,083333333	20,80	ND	19,80	ND	2,12	0,70	10,86	10,927932
0,25	18,50	4,02	20,90	4,02	3,19	11,10	10,29	7,8697914
0,5	19,90	12,60	23,30	22,00	7,52	19,90	17,54	6,1483711
0,75	17,20	28,70	38,80	36,70	15,00	28,80	27,53	9,7754113
1	30,80	35,30	43,40	45,60	23,30	40,20	36,43	8,3934895
1,5	38,80	34,50	39,30	45,00	27,30	47,60	38,75	7,3055458
2	35,30	31,00	32,60	39,40	22,20	41,00	33,58	6,7676929
4	13,00	14,30	11,10	14,70	9,37	13,40	12,65	2,0381732
6	9,35	Aborto	6,49	9,00	6,50	6,57	7,58	1,4597842
8	3,95	3,56	3,93	5,43	8,10	4,14	4,85	1,7160118
12	1,51	1,27	1,46	2,56	2,4	2,15	1,95	0,6216564
24	0,05	0,05	0,64	1,18	ND	ND	0,48	0,54

ND: Inferior a 0,5 µg/ml

ES 2 654 637 T3

Tabla 3 Concentraciones de fármaco en plasma de perros de raza Beagle tras alimentarse por vía oral con 50 mg/kg de L-oxiracetam (µg/ml)

Tiempo (h)	1	2	3	4	5	6	x	s
0,083333333	ND	ND	42,00	ND	ND	21,90	31,95	14,21
0,25	1,51	38,50	39,60	1,42	1,17	31,50	18,95	19,46
0,5	10,30	23,90	42,20	10,60	5,52	31,30	20,64	14,32
0,75	27,50	5,45	52,60	17,00	17,30	43,20	27,18	17,76
1	24,70	46,60	48,40	27,00	34,00	42,90	37,27	10,17
1,5	26,30	52,10	46,70	27,60	44,30	41,50	39,75	10,52
2	23,00	39,10	36,50	21,60	44,70	37,10	33,67	9,28
4	12,40	14,00	13,70	9,80	15,80	13,60	13,22	2,00
6	4,09	8,92	4,76	4,85	8,72	5,31	6,11	2,14
8	2,33	6,55	2,56	3,34	4,47	2,81	3,68	1,60
12	1,07	2,01	1,01	4,60	1,48	1,15	1,89	1,38
24	ND	ND	ND	1,47	ND	ND	1,47	ND

ND: Inferior a 0,5 µg/ml

Tabla 4 Concentraciones de fármaco en plasma de perros de raza Beagle tras la administración por vía intravenosa de 50 mg/kg de L-oxiracetam (µg/ml)

5

Tiempo (h)	1	2	3	4	5	6	x	s
0,083333333	117,20	160,60	107,00	127,00	150,40	132,60	132,47	20,12
0,25	156,00	198,00	78,40	105,00	124,20	85,80	124,57	45,60
0,5	94,10	89,10	99,80	92,90	94,60	94,50	94,17	3,44
0,75	64,70	85,70	77,80	74,80	77,30	70,00	75,05	7,19
1	51,00	72,50	65,40	60,60	66,20	60,80	62,75	7,22
1,5	37,00	51,20	50,60	43,40	49,00	74,20	50,90	12,62
2	26,40	38,90	69,80	33,20	36,60	32,00	39,48	15,46
4	9,13	13,90	9,33	11,60	13,30	24,10	13,56	5,53
6	3,79	4,88	5,03	4,97	5,99	24,90	8,26	8,18
8	1,79	2,65	2,19	2,73	2,75	2,28	2,40	0,38
12	0,82	1,18	0,64	0,92	1,11	0,75	0,90	0,21
24	ND	ND						

ND: Inferior a 0,5 µg/ml

Tabla 5 Parámetros farmacocinéticos de perros de raza Beagle tras una perfusión de 50 mg/kg de L-oxiracetam ($\mu\text{g/ml}$)

Parámetros del momento estadístico	N.º 1	N.º 2	N.º 3	N.º 4	N.º 5	N.º 6	Media	Desviación estándar	Valor mínimo	Valor máximo
T _{máx.} (h)	1,50	1,00	1,00	1,00	1,50	1,50	1,25	0,27	1,00	1,50
C _{máx.} (mg/l)	38,80	35,30	43,40	45,60	27,30	47,60	39,67	7,55	27,30	47,60
ABC(0-t _n) (mg/l*h)	159,73	148,16	161,50	195,78	118,22	161,36	157,46	25,03	118,22	195,78
ABC(0- ∞) (mg/l*h)	159,90	148,34	166,74	207,03	137,18	171,07	165,04	24,02	137,18	207,03
MRT(0- ∞) (h)	3,77	3,66	4,80	6,32	6,27	3,85	4,78	1,24	3,66	6,32
CL (l/h/kg)	0,31	0,34	0,30	0,24	0,36	0,29	0,31	0,04	0,24	0,36

Tabla 6 Parámetros farmacocinéticos de perros de raza Beagle tras alimentarse por vía oral con 50 mg/kg de L-oxiracetam ($\mu\text{g/ml}$)

Parámetros del momento estadístico	N.º 1	N.º 2	N.º 3	N.º 4	N.º 5	N.º 6	Media	Desviación estándar	Valor mínimo	Valor máximo
T _{máx.} (h)	0,75	1,50	0,75	1,50	2,00	0,75	1,21	0,53	0,75	2,00
C _{máx.} (mg/l)	27,5	52,10	52,60	27,60	44,70	43,20	41,28	11,29	27,50	52,60
ABC(0-t _n) (mg/l*h)	103,10	178,87	170,95	143,12	162,18	159,69	152,98	27,23	103,10	178,87
ABC(0- ∞) (mg/l*h)	106,77	187,21	174,16	166,96	167,17	163,52	160,97	27,86	106,77	187,21
MRT(0- ∞) (h)	3,56	3,85	2,66	11,49	3,66	2,94	4,69	3,36	2,66	11,49
CL (l/h/kg)	0,47	0,27	0,29	0,30	0,30	0,31	0,32	0,07	0,27	0,47

Tabla 7 Parámetros farmacocinéticos de perros de raza Beagle tras la administración por vía intravenosa de 50 mg/kg de L-oxiracetam ($\mu\text{g/ml}$)

Parámetros del momento estadístico	N.º 1	N.º 2	N.º 3	N.º 4	N.º 5	N.º 6	Media	Desviación estándar	Valor mínimo	Valor máximo
ABC(0-tn) (mg/l*h)	190,41	254,39	260,14	214,36	238,36	298,64	242,72	37,75	190,41	298,64
ABC(0- ∞) (mg/l*h)	193,19	258,38	262,01	217,34	241,97	300,20	245,52	37,34	193,19	300,20
MRT(0- ∞) (h)	1,92	2,03	1,91	2,10	2,12	2,58	2,11	0,25	1,91	2,58
Biocompatibilidad absoluta	55,27 %	72,46 %	66,47 %	76,82 %	69,08 %	54,47 %	65,76 %	9,12 %	54,47 %	76,82 %

Se puede saber que, el $ABC_{0-\infty}$ era $165,04 \pm 4,02$ h, la depuración era $0,31 \pm 0,04$ l/h/kg, el momento pico y la concentración pico eran $1,25 \pm 0,27$ h y $39,67 \pm 7,55$ g/ml, respectivamente, de perros de raza Beagle después de alimentarse por vía oral con 50 mg/kg de Oxiracetam. El $ABC_{0-\infty}$ era $160,97 \pm 27,86$ h, el momento pico y la concentración pico eran $1,21 \pm 0,53$ h y $41,28 \pm 11,29$ g/ml, respectivamente, de perros de raza Beagle después de alimentarse por vía oral con 50 mg/kg de L-oxiracetam; la biodisponibilidad absoluta estimada por $ABC_{0-\infty}$ era $242,72 \pm 37,75$ h, tras la administración intravenosa era $65,76 \pm 9,12$ %.

Se puede concluir que, L-oxiracetam reservó las propiedades de los parámetros farmacocinéticos de oxiracetam original.

B. Ensayos de toxicología

Para comparar la toxicidad en ratones ICR de L-oxiracetam y oxiracetam en condiciones experimentales GLP, la dosis se establece a 5 g/kg y se prepara con una solución de CMC al 0,5 %. Cada grupo tiene 20 animales con el mismo número de machos y hembras alimentados por vía oral. Los resultados muestran que dos grupos de animales eran normales, y no se observó toxicidad significativa continua durante 14 días sin producirse muertes de animales entre los dos grupos y no hubo ninguna diferencia significativa en la toxicidad. La descripción de L-oxiracetam no aumenta la eficacia aunque aumenta la toxicidad.

Oxiracetam está disponible comercialmente y su farmacocinética, toxicología y otras propiedades son de conocimiento común.

C. El estudio experimental de Oxiracetam, L-Oxiracetam y D-Oxiracetam sobre el impacto del coma inducido por alcohol en ratones

(A) Materiales

1. Medicamentos y reactivos: L-Oxiracetam, D-Oxiracetam y oxiracetam racémico; naloxona, adquiridos en Chongqing Yaoyou Pharmaceutical Co., Ltd.; etanol anhidro, adquirido en Shanghai Chemical Reagent Co., Ltd.. La solución salina fisiológica está disponible comercialmente. Cada solución se preparó poco antes de utilizarse.

2. Preparación de solución de etanol: se diluyó etanol anhidro con solución salina para producir una solución de etanol al 30 %, preparada poco antes de utilizarse.

3. Animales experimentales: Se proporcionaron ratones macho con un peso de 18-22 gramos por un comité especial, granjas de animales experimentales de Sichuan (Licencia: SCXK (Chuan) 2008-14). Las instalaciones de animales experimentales continuaron manteniendo barreras como normas medioambientales. Control de indicadores medioambientales clave: la temperatura de $20,0-25,0$ °C, humedad relativa del 40-70 %. 10-20 cambios de aire/hora, luz: oscuridad = 14h: 10h. Los animales se alojaron en cajas convencionales, cada caja contenía 5 animales.

(B) Métodos experimentales

1. Preparación de un modelo de ratón con coma alcohólico: Con referencia a la literatura [1] (M.EL Yacoubi, C.Ledent, M.parmentier, *et al Caffeine reduces hypnotic effects of alcohol through adenosine A2A receptor blockade [J] Neuropharmacology*, 2003,.45(7):977-985) se modeló el proceso de solución de etanol al 30 % por vía intraperitoneal (0,2 ml/10g).

2. Método de determinación de los estados de conciencia de discriminación del ratón:

De acuerdo con la literatura [2] (Jeffrey R. Stephens, Rene H. Levy. *Effects of valproate and citrulline on ammonium-Induced encephalopathy [J] Epilepsia*, 1994,35 (1):164-171) se llevó a cabo la determinación de los estados de conciencia: nivel 1, reducción de la actividad en la jaula; nivel 2, ataxia de los miembros asociada con la reducción de la actividad; nivel 3, desplazamiento cuando se coloca en la parte inferior de la parte posterior de la jaula (reflejo de enderezamiento), pero no podía ponerse en pie; nivel 4, de nuevo en la jaula en una posición final que no puede ser corregida, aunque el daño se manifiesta como la retracción de la estimulación física; nivel 5, reflejo de enderezamiento (pérdida del reflejo de enderezamiento, LORR) y la falta de respuesta a estímulos nocivos. Nivel 4, 5, se considera al animal en coma.

3. Grupos experimentales y diseño

Los 150 animales se dividieron al azar en 10 grupos: grupo de control modelo (sólo solución salina); Oxiracetam racémico estableció tres grupos, a saber: grupo de 60, 180, 360 mg/kg; Oxiracetam dextral estableció dos grupos, respectivamente: grupo de 90, 180 mg/kg; L oxiracetam estableció tres grupos, a saber: grupo de 30 mg/kg, 90 mg/kg y 180 mg/kg; grupo de naloxona, una dosis de 1,5 mg/kg. Después de preparar con éxito cada grupo de modelos animales, las tablas aleatorias se agruparon en un reflejo de enderezamiento un minuto después de la

inyección en vena de la cola. Los ratones se observaron durante la duración del reflejo de enderezamiento, que era el tiempo de sueño. Resultados estadísticos: los datos experimentales con $x \pm d.e.$, dicha comparación entre los grupos se analizó mediante ANOVA y el ensayo de q , nivel de ensayo: $\alpha = 0,05$.

5 (C) Resultados

Tras la administración, el tiempo de sueño de ratones en cada grupo se muestra en la Tabla 8:

Grupos	Dosis (mg/kg)	Número de animales (número)	Peso (g)	Tiempo de sueño (La duración de la acción reflejo, min)
L-oxiracetam	30	15	19,6±1,1	85,8±10,6*
	75	15	19,5±1,0	63,5±9,8**
	180	15	19,5±1,1	48,5±9,1**
D-oxiracetam	30	15	19,8±1,3	105,3±15,8
	180	15	19,3±1,2	98,8±11,6
Oxiracetam racémico	60	15	19,2±1,1	96,8±12,7
	150	15	19,5±1,2	86,1±9,4*
	360	15	19,4±1,3	65,1±10,2**
Naloxona	1,5	15	19,3±1,0	60,5±7,8**
Solución salina	0,1 g mo/10	15	19,7±1,3	116,6±10,1

10 A partir de los resultados anteriores, los efectos de L-oxiracetam que promueven el despertar en el coma inducido por alcohol eran obvios. D-oxiracetam básicamente no tuvo ningún efecto. Oxiracetam racémico tuvo cierto efecto de despertar en el coma debido al alcoholismo. El efecto de L-oxiracetam en el despertar con respecto a oxiracetam racémico es de 2 veces.

15 (D) El estudio de coma inducido por ketamina y experimentos para despertar de Oxiracetam, L-Oxiracetam y D-Oxiracetam en ratones.

Debido a la sedación con ketamina, olvidadas las propiedades analgésicas y anestésicas, el anestésico típico es ampliamente utilizado en la práctica clínica, pero se descubrió que la sedación con ketamina es demasiado profunda y con una duración demasiado larga, a menudo causada por el retraso en la recuperación o no se ha recuperado la conciencia, lo que lleva a una condición potencial que pone en peligro la vida. Para una recuperación retardada o el no despertarse, los fármacos para despertarse se utilizan comúnmente en naloxona clínica, los ratones estudiados inducidos por el coma por ketamina despertaron gracias al papel de L-oxiracetam etc.

25 1. Materiales y métodos

1.1 Animales experimentales y 150 ratones Kunming, macho con un peso (25,3±1,9) g, agrupados, se proporcionaron por un comité especial de granjas de animales experimentales de Sichuan (Licencia: SCXK (Chuan) 2008-14). Las instalaciones de animales experimentales continuaron manteniendo barreras como normas medioambientales. Control de indicadores medioambientales clave: la temperatura de 20,0-25,0 °C, humedad relativa del 40-70 %, 10-20 cambios de aire/hora, luz: oscuridad = 14h: 10h. Los animales se alojaron en cajas convencionales, cada caja contenía 5 animales.

Después de 120 mg/kg de inyección intraperitoneal con coma inducido por ketamina, se seleccionaron con éxito 120 ratones modelados del diseño de bloque aleatorizado estratificado en 10 grupos (n = 12): L oxiracetam tres grupos de 30, 75, 180 mg/kg; Oxiracetam dextral dos grupos de 30, 180 mg/kg; oxiracetam centrifugado mixto tres grupos de 60, 150, 360 mg/kg; naloxona un grupo de 1,5 mg/kg; un grupo de solución salina (grupo NS).

1.2 Reactivos: L-oxiracetam (de acuerdo con la preparación de la solicitud de patente CN 101367757A), D-oxiracetam (producto disponible comercialmente, número de lote: 20100205) y oxiracetam racémico (producto disponible comercialmente, número de lote: 20100105); inyección de clorhidrato de naloxona 1 ml: 0,4 mg (Chongqing Yaoyou Pharmaceutical Co., Ltd., número de lote 1001020); inyección de clorhidrato de ketamina 2 ml: 0,1 g (Henry Co., Ltd., Provincia de Jiangsu, lote KH091201).

1.3 Métodos experimentales y mediciones: a los ratones se les administró una inyección intraperitoneal de 120 mg/kg de ketamina, para que el reflejo de enderezamiento desaparezca después de 1 min, a cada grupo se le inyectó 30, 75, 180 mg/kg de L-oxiracetam; 30, 180 mg/kg de Olato Tan dextral; 60, 150, 360 mg/kg de Oxiracetam centrifugado mixto, 1,5 mg/kg de naloxona y 10 ml/kg de solución salina normal, los ratones se observaron durante la duración del reflejo de enderezamiento (tiempo de recuperación). Los ratones después de las tres posiciones supinas consecutivas durante 5 s no pudieron restaurar la recuperación del reflejo de enderezamiento después de tres posiciones sentadas y de pie consecutivas para el reflejo de enderezamiento.

1.4 El análisis estadístico de los datos con $x \pm d.e$ se expresó utilizando el software estadístico SPSS 12.0 para el análisis de datos. Los grupos se compararon mediante ANOVA, ensayo de nivel: A = 0,05.

2. Resultados

El efecto de L-oxiracetam, D-oxiracetam y oxiracetam racémico de duración del coma inducido por ketamina de los ratones se muestra en la Tabla 9.

5

Tabla 9 L-oxiracetam, D-oxiracetam y oxiracetam racémico de duración del coma inducido por ketamina en ratones

Grupos	Dosis (mg/kg)	Número de animales (número)	Peso (g)	Tiempo de sueño (La duración de la acción reflejo, min)
L-Oxiracetam	30	12	19,2±1,5	19,6±5,6*
	75	12	20,6±1,1	15,2±4,9**
	180	12	19,9±1,3	13,8±3,8**
D-Oxiracetam	30	12	20,5±1,2	25,6±8,9
	180	12	19,8±1,3	22,8±6,5
Oxiracetam racémico	60	12	20,4±1,2	21,3±6,7
	150	12	19,8±1,3	15,3±6,4*
	360	12	19,6±1,3	14,2±6,2**
Naloxona	1,5	12	20,2±1,1	13,5±4,2**
Solución salina	0,1 mo/10 g	12	20,3±1,4	23,5±5,5

10 La tabla anterior muestra que L-oxiracetam tuvo un efecto en el despertar significativo en el intervalo de dosis 30-180 mg/kg. Oxiracetam racémico también tuvo tal efecto en el intervalo de dosis 150-360 mg/kg. D-oxiracetam con la misma dosis que L-oxiracetam no tuvo ningún efecto. El fármaco de referencia positiva, naloxona, también mostró un efecto significativo en los ratones con coma.

(E) Estudio de L-oxiracetam en experimentos que promueven el despertar en ratas con cerebro traumático que despiertan del coma

15 1. Materiales

1.1 Reactivos y fármacos

20 L-oxiracetam (preparado basándose en la patente CN101367757A); inyección de clorhidrato de naloxona 1 ml: 0,4 mg (Chongqing Yaoyou Pharmaceutical Co., Ltd., número de lote 1001020)

2. Métodos

25 2.1 Construcción de modelos animales, administración de agrupación

30 Los experimentos animales utilizaron 50 ratas SD de grado limpio, macho, peso en el experimento de 350~400 g, adquiridas en el Hospital de Daping, Third Military Medical University Experimental Animal Center, licencia de producción: SLXK (Chongqing) 2007-0005. Las instalaciones de los experimentos de animales siguen manteniendo barreras como normas medioambientales. El control de los indicadores medioambientales clave: la temperatura de 20,0-25,0 °C, humedad relativa del 40-70 %. 10-20 cambios de aire/hora, luz: oscuridad = 14h: 10h. Los animales fueron alojados en cajas convencionales, cada caja contenía 5 animales.

35 2.2 Modelo animal

40 El modelo de coma cerebral traumático se estableció con referencia al método Feeney, un modelo de rata experimental de lesión cerebral traumática grave en la rata se estableció con el método Feeney de referencia. La fuerza experimental fue utilizada como 6.000 g/cm [es decir, peso de impactadores (g) x distancia de caída de impactadores (cm)]. Para una anestesia de hidrato cloral poco profunda, se retiró y desinfectó pelo parietal. Las ratas se fijaron con una incisión por craneotomía estereotáctica a la derecha del torno dental en la sutura coronal y sutura sagital de una intersección de perforación de 3 mm y 3 mm expandida en la ventana ósea a 6 mm x 6 mm (la parte frontal se encuentra respecto a la sutura coronal, el límite izquierdo está a 2mm del lado derecho de la sutura sagital). La duramadre intacta se mantuvo. 30 g de la varilla cilíndrica para un golpe pesado (golpe con diámetro del extremo 4 5 mm) vertical fijado con un manguito interior estereotáctico a la altura de 20 cm para liberar el sitio de

45 combate es el punto de perforación; soplar después de una esponja de gelatina hemostática tópica, para no activar el sangrado después de la sutura del cuero cabelludo. Después del modelado no se está en coma profundo y los animales muertos se retiraron inmediatamente, los animales inconscientes se seleccionaron más de 10 minutos.

50 2.3 Agrupación y administración

30 animales fueron seleccionados después del golpe que causó un coma y se dividieron aleatoriamente en tres grupos de 10. Uno de ellos se utiliza como un grupo de control con 0,5 ml/100 g de solución salina dada. El segundo grupo se le dio 125 mg/Kg de L-oxiracetam. El tercer grupo se le dio 1 mg/kg de inyección de clorhidrato de

naloxona. Se administró cada grupo en coma durante 10 minutos, a continuación, se dejaron en la jaula trasera en silencio. Los animales se observaron en coma en 1, 2, 4, 8 horas después de la administración, y luego se continuó con una puntuación para la puntuación del grado.

5 2.4 Método de clasificación de coma en ratas

Nivel 1: activo en la jaula como de costumbre

Nivel 2: reducción de la actividad en la jaula

10

Nivel 3: reducción de la actividad y trastornos del movimiento en la jaula

Nivel 4: desplazamiento cuando vuelve a la parte inferior de la jaula (existe reflejo de enderezamiento), aunque no se pone de pie

15

Nivel 5: desaparición del reflejo de enderezamiento pero la reacción a la retracción de una extremidad ante un estímulo es dolorosa

20

Nivel 6: desaparición del reflejo de enderezamiento, no hay respuesta a estímulos dolorosos, desaparición del reflejo de los colgajos de las orejas, reflejo corneal, y presiones en la cola no provocan reacciones de escape.

Nivel 5 y 6 son considerados como un estado de coma.

3. Resultados

25

L-oxiracetam en ratas con un papel por coma cerebral traumático se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10 El efecto de L-oxiracetam, hidrocloreuro de naloxona en coma traumático en el cerebro de rata

Grupos	Número de animales	Dosificación	Punto de observación post-traumático (h)				Observación
			1	2	4	8	
Control	10	5 ml/kg	5,8±0,42	5,4±0,52	4,8±0,78	4,2±1,01	2 muertes
Hidrocloreuro de naloxona	10	1 mg/kg	4,4±0,96**	3,6±0,84**	3,0±0,92**	1,9±0,88**	Todos sobrevivieron
L-oxiracetam	10	125 mg/kg	5,1±0,88*	3,8±0,78**	3,0±0,82**	2,0±0,67**	Todos sobrevivieron

Nota: * indica la comparación con el grupo de control P <0,05 ** indica la comparación con el grupo de control P <0,01

30 La tabla anterior muestra: animales modelos del daño cerebral después de más de ocho horas para la puntuación de 4 puntos para su mantenimiento, y hay un 20 % de mortalidad en los animales. Para el resto, 125 mg/kg de oxiracetam tras 1 hora, el estado de la rata comenzó a mejorar significativamente, puntuación media 5,1, y el grupo de control fue significativamente diferente (P <0,05), y desde entonces se ha mostrado una mejora significativa en la conciencia del efecto, el periodo experimental completo. No murió ningún animal, lo que indica el efecto de coma traumático de oxiracetam restante en el cerebro de rata fue concluyente. El fármaco similarmente positivo

35 hidrocloreuro de naloxona también está mostrando un buen efecto promotor del despertar, el efecto deseado, y la aplicación clínica de estos resultados coinciden.

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

40

La siguiente descripción son varias realizaciones de la presente invención.

Ejemplo 1:

45 Composición de materias primas:

- (a) L-oxiracetam (99,5 % de pureza) 200 mg/comprimido
- (b) Lactosa 80 mg/comprimido
- (c) Celulosa microcristalina 70 mg/comprimido

Por ejemplo, para producir 1.000 cápsulas de L-oxiracetam, el método de preparación específico es: las materias primas se pasaron sobre tamiz de malla 80. Se toman la cantidad prescriptiva de L-oxiracetam, lactosa, celulosa microcristalina, y se mezclan para rellenar directamente las cápsulas.

50

Ejemplo 2:

Composición de materias primas:

(a) L-oxiracetam (99,6 % de pureza)	200 mg/comprimido
(b) Almidón	34 mg/comprimido
(c) Celulosa microcristalina	60 mg/comprimido
(d) Polvo de talco	6 mg/comprimido
(e) 2 % de hidroxipropil metil celulosa (modelo K4M)	cantidad adecuada

5 Por ejemplo, para producir 1.000 comprimidos de L-oxiracetam, el método de preparación específico es: las materias primas se pasaron sobre tamiz de malla 80. Se tomó la cantidad prescriptiva de L-oxiracetam, almidón, celulosa microcristalina y se mezclaron homogéneamente, después se añadieron a un material blando hecho por solución de HPMC al 2 %. Después de la granulación, secado, granulación, los gránulos se añadieron a una cantidad prescriptiva de polvo de talco y después se mezclaron y se formaron los comprimidos.

Ejemplo 3:

Composición de materias primas:

(a) L-oxiracetam (99,3 % de pureza)	200 mg/comprimido
(b) Lactosa	80,8mg/comprimido
(c) Carboximetilalmidón de sodio	72 mg/comprimido
(d) Polvo de talco	7,2 mg/comprimido
(e) 10 % de polivinilpirrolidona	cantidad adecuada

15 Por ejemplo, para producir 1.000 cápsulas de L-oxiracetam, el método de preparación específico es: las materias primas se pasaron sobre tamiz de malla 80. Se tomó la cantidad prescriptiva de L-oxiracetam, lactosa, carboximetilalmidón de sodio y se mezclaron homogéneamente, después se añadieron a un material blando hecho por solución de etanol PVP al 10 %. Después de la granulación, secado, granulación, los gránulos se añadieron a una cantidad prescriptiva de polvo de talco y después se mezclaron y rellenaron en cápsulas.

REIVINDICACIONES

1. L-oxiracetam para su uso en la prevención o el tratamiento del coma, **caracterizado por que** la pureza de L-oxiracetam es superior a 99,3 %, basándose en el porcentaje en peso.
5
2. L-oxiracetam para su uso en la prevención o el tratamiento del coma según la reivindicación 1, en el que el coma es un coma inducido por alcohol, un coma inducido por anestesia o un coma inducido por un traumatismo.
3. L-oxiracetam para su uso en la prevención o el tratamiento del coma según la reivindicación 2, en el que en la anestesia se utiliza ketamina.
10
4. L-oxiracetam para su uso en la prevención o el tratamiento del coma según la reivindicación 2, en el que el traumatismo es una lesión cerebral traumática.
- 15 5. Una composición farmacéutica que comprende L-oxiracetam como principio activo para su uso en la prevención o el tratamiento del coma, en la que la composición farmacéutica es una inyección o una formulación oral, y la pureza de L-oxiracetam es superior a 99,3 %, basándose en el porcentaje en peso.