

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 247**

51 Int. Cl.:

A61K 35/30 (2015.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2011 PCT/RU2011/000406**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2012 WO12002840**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2011 E 11801210 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2589390**

54 Título: **Composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central y periférico de origen vascular, traumático, tóxico, hipóxico y autoinmune**

30 Prioridad:

01.07.2010 RU 2010126868

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

05.06.2018

73 Titular/es:

**AKTSIONERNOE OBSHCHESTVO "PHARM-SINTEZ" (100.0%)
Stroenie 46, d.2, Kabelnaya 2-aya ulitsa
Moskow, 111024, RU**

72 Inventor/es:

**NAZARENKO, ANNA BORISOVNA y
SOKOLOV, MIKHAIL ANATOLEVICH**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 671 247 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

Composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central y periférico de origen vascular, traumático, tóxico, hipóxico y autoinmune.

Técnica pertinente

5 La invención se refiere a la medicina, en particular, a la farmacología, industria farmacéutica y medicina veterinaria; es la composición farmacéutica con efecto reparador-regenerador sobre el tejido nervioso, destinada a tratar las enfermedades del sistema nervioso central y periférico de origen vascular, traumático, tóxico, hipóxico y autoinmune, que consiste en el complejo proteico-polipeptídico biológicamente activo que incluye los factores de diferenciación y crecimiento del tejido nervioso organoespecíficos, y moléculas de señalización en proporciones y concentraciones terapéuticamente eficaces, y un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica es un complejo proteico-polipeptídico biológicamente activo, en el que las masas moleculares de los componentes de proteína-polipéptido que lo forman están dentro del intervalo de 5 a 200 kDa; la fracción molecular media del intervalo de 10 a 120 kDa hace min. 80%; la concentración de proteína total está dentro del intervalo de 0,8 a 4,2 mg/ml; la absorción máxima del espectro UV de la solución está en la longitud de onda de 280 ± 5 nm; con un pico en el espectro UV-visible en la longitud de onda de 274-284 nm; con bandas en el intervalo de pI 4,2 a 8,4 en enfoque isoelectrónico en un gel de poliacrilamida al 5%; comprendiendo un diluyente farmacéuticamente aceptable que comprende una solución tampón y excipientes: compuestos de alto peso molecular, estabilizantes, conservantes y solubilizantes, todos en concentraciones suficientes. La sustancia se ha obtenido mediante la cromatografía de intercambio iónico del filtrado del homogeneizado de tejido cerebral embrionario de ganado doméstico unguado de mediados del primer tercio hasta mediados del último tercio, cuya cromatografía se realiza en presencia de la solución tampón, detergentes e inhibidores de proteólisis.

Técnica anterior

Se conoce una serie de fármacos de naturaleza proteica-peptídica con actividad nootrópica y neurometabólica de materia prima animal, que se usan para tratar las enfermedades del sistema nervioso. Lo más cercano en cuanto a los efectos alcanzables son:

- Cerebrolysin: fármaco para tratar los accidentes cerebrovasculares hemorrágicos o isquémicos, por Ebewe (Austria) [1], un producto del tratamiento de cerebro de cerdo intacto;
- Cerebrocurin: fármaco para enfermedades asociadas con las disfunciones del sistema nervioso central, por OOO "NIR" (Ucrania) [2], un producto de tratamiento del cerebro de embriones animales;
- 30 - Cortexin: fármaco de naturaleza polipeptídica obtenido por extracción de la corteza cerebral bovina y porcina, por OOO "Geropharm" (Rusia) [3], con efectos nootrópicos, cerebroprotectores, anticonvulsivos y antioxidantes;
- Cerebrolysate: fármaco que mejora la resistencia del tejido cerebral a la intoxicación, hipoxia, hipoglucemia y lesión mecánica, por la asociación científica-producción "Microgen", una empresa unitaria estatal federal (Immunopreparat) [4], con el efecto nootrópico, un hidrolizado de la corteza cerebral del ganado bovino.
- 35 Cerebrolysin incluye los aminoácidos (~85%), péptidos de bajo peso molecular (-15%) y microelementos, cuya materia prima es el cerebro porcino. Los efectos neuroprotectores y tróficos del fármaco se deben a los péptidos y aminoácidos específicos, de Masa molecular máx. de 10.000 Dalton, donde la alanina, leucina y lisina dominan y determinan las propiedades del fármaco. El fármaco está destinado a la administración intramuscular e intravenosa, la concentración de componentes biológicamente activos es baja; por lo tanto, el tratamiento es de dosis alta y a largo plazo. Los inconvenientes del fármaco conocido son el tratamiento a largo plazo, baja actividad y especificidad debido al débil efecto neuroprotector; y potenciales de regeneración y reparación extremadamente bajos para el tejido nervioso. Cerebrocurin contiene los neuropeptidos prenatales solubles en agua y los productos de la escisión de los precursores inactivos de alto peso molecular del homogenato de cerebro de embriones animales, este homogenato, después de la dilución en solución fisiológica, se expone a la enzima proteolítica inmovilizada; las condiciones de interacción se definen sobre la base de la muestra de verificación de la preparación diana; y la solución resultante se somete a una cura de 30 días a 10°C máx.. Esta técnica ofrece una actividad más alta (en comparación con Cerebrolysin) del fármaco resultante y amplía significativamente su espectro de acción, debido a la mayor masa de péptidos y proteínas de bajo peso molecular que quedan después de la proteólisis. Sin embargo, a pesar de la formación de soluciones a largo plazo antes de que finalicen los procesos de agregación y proteólisis, esta técnica no produce la pureza requerida para uso intravenoso; por lo tanto, la menor biodisponibilidad. La extracción acuosa sin la solución, detergentes, inhibidores de la proteólisis y solubilizantes que se almacenan en las fases de producción de Cerebrocurin, y los términos indeterminados de la gestación del cerebro animal no permiten la normalización necesaria; por lo tanto, las discrepancias significativas a partir de las proporciones de concentraciones proteicas-peptídicas fijadas evolutivamente, y la menor actividad neuroregeneradora específica del tejido y la estabilidad del efecto farmacológico, quedando todas limitadas al efecto biológico del tipo de retroalimentación debido a la función de señal de los productos de proteólisis tisular.
- 55

5 Cortexin contiene el complejo de los polipéptidos alcalinos, ácidos y neutros biológicamente activos solubles en agua con la masa molecular de 500 a 15000 Da y el punto isoelectrico de 3,5 a 9,5. Estos se obtienen a partir del tejido congelado licuado de cerebro de ganado; el proceso consiste en extraer con solución de ácido acético que contiene cloruro de cinc, separar el sedimento, tratar el líquido sobrenadante con acetona, secar con posterior purificación, esterilización y liofilización del producto diana.

10 El fármaco está destinado a la administración intramuscular e intravenosa, la concentración de componentes biológicamente activos de bajo peso molecular es baja; por lo tanto, el tratamiento es a dosis alta y a largo plazo. Aunque Cortexin participa en la regulación de las relaciones inhibitoria y excitante de aminoácidos, y la concentración de serotonina y dopamina, tiene un efecto GABA positivo, reduce los efectos tóxicos de los fármacos neurotrópicos, mejora los procesos de aprendizaje y memoria, acelera las funciones cerebrales de rehabilitación después de tensiones, su actividad y especificidad no son altas debido al débil efecto neuroprotector, su potencial regenerativo es bajo y el potencial de reparación es insignificante para el tejido nervioso; por lo tanto, el tratamiento prolongado a largo plazo.

15 Cerebrolysate también contiene los polipéptidos solubles en agua obtenidos en la hidrólisis de la corteza del cerebro bovino; su actividad enzimática es débil; su masa molecular es 15000 Da máx. Lo mencionado en la variación de patente de la composición de aminoácidos del fármaco admite una variación de composición significativa de las proporciones de concentración de péptidos resultantes, determinando la baja actividad específica de tejido y la estabilidad del efecto farmacológico con los débiles efectos nootrópicos neurometabólicos y no expresados.

20 Las enfermedades vasculares del sistema nervioso y el crecimiento de la incidencia de lesiones traumáticas, tóxicas e hipóxicas del cerebro y la médula espinal (accidentes de tráfico, catástrofes naturales y por el hombre, etc.) incitan al farmacólogo a buscar nuevos medicamentos más eficientes para tratar con éxito a los pacientes neurológicos y neuroquirúrgicos, para rehabilitarlos, y para reducir el nivel de discapacidad de la población.

El documento WO 2010/007620 A1 describe composiciones farmacéuticas que comprenden un extracto de tejido cerebral porcino fetal y el uso del mismo en el tratamiento de enfermedades.

25 El documento WO 2009/088314 A1 se refiere a un procedimiento para producir un complejo biológicamente activo que tiene una acción neuroregeneradora.

Divulgación de la invención

30 El objetivo de la invención fue crear la composición farmacéutica con un efecto reparador-regenerador expresado sobre el tejido nervioso, para tratar las enfermedades del sistema nervioso central y periférico de origen vascular, traumático, tóxico, hipóxico y autoinmune.

35 El objetivo deseado se alcanza porque la composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central y periférico de origen vascular, traumático, tóxico, hipóxico y autoinmune tiene la forma de la solución para administración parenteral, intranasal y subconjuntival; y su principio activo es el complejo proteico-polipeptídico biológicamente activo de 0,01 a 2,0 mg/ml con el efecto reparador específico del tejido sobre el tejido nervioso, obtenido a partir del tejido de cerebro embrionario rápidamente congelado de ganado de mediados del primer tercio hasta mediados del último tercio de la edad gestacional, complejo que contiene las proteínas neutras ligeramente ácidas con carga negativa y polipéptidos relacionados con el factor de crecimiento, factor de diferenciación, moléculas de señalización, que determinan su actividad biológica y farmacológica, con las masas moleculares de 5 a 200 kDa, donde al menos 80% de la masa proteica total tiene la masa molecular de 10 a 120 kDa, y se caracteriza por un pico en la longitud de onda de 274-284 nm en el espectro UV-visible y bandas en el intervalo de pI 4.2 a 8.4 en enfoque isoelectrico en un gel de poli(acrilamida) al 5%, y complejo que contiene un diluyente farmacéuticamente aceptable.

Con todo esto, el diluyente de composición farmacéutica preferible es una solución tampón oficial con excipientes, que incluyen los compuestos de alto peso molecular, estabilizantes, conservantes y solubilizantes.

45 Por lo tanto, el objetivo deseado se alcanza mediante la composición farmacéutica descrita en la que el principio activo es el complejo proteico-polipeptídico biológicamente activo que consiste en proteínas y polipéptidos neutros débilmente ácidos de masa molecular de 5 a 200 kDa con carga negativa, obtenidos a partir del tejido cerebral embrionario rápidamente congelado de ganado de mediados del primer tercio hasta mediados del último tercio de la edad gestacional, complejo que contiene los factores organoespecíficos de crecimiento y diferenciación del tejido nervioso, y las moléculas de señalización, en proporciones terapéuticamente eficientes y compuestos de peso molecular, por ejemplo, carmelosa; y contiene los estabilizantes, por ejemplo, manitol, conservantes, por ejemplo, Nipagina, y solubilizantes, por ejemplo, polisorbato 20. La composición farmacológica reivindicada, que consiste en el complejo proteico-polipeptídico y el diluyente farmacéuticamente aceptable difiere de las sustancias y composiciones obtenidas anteriormente extraídas del cerebro animal, a partir de la fuente de materia prima a edades gestacionales fijas, a partir de las masas moleculares (máx. 200 kDa) y composición cualitativa de las fracciones de proteína-polipéptido, a partir de proteínas de crecimiento de ontogénesis fijadas evolutivamente, factores de diferenciación, y las relaciones de concentración de moléculas de señalización, a partir del procedimiento de administración (parenteral, intratecal, intranasal, subconjuntival), a partir de la seguridad de uso (sin toxicidad,

mutagenicidad, carcinogenicidad y/o alergenicidad), y a partir de la actividad biológica y farmacológica y esta especificidad de actividad (específica del tejido y órgano, reparadora-regenerativa).

Mejor realización de la invención

Ejemplo 1. Procedimiento de producción del complejo biológicamente activo.

5 Producción de fracción proteica a partir de cerebro embrionario porcino. 250 gramos de cerebro embrionario porcino congelado rápidamente, de 14 a 18 semanas de edad gestacional, se descongelaron y se homogeneizaron en 7 minutos en 1200 ml de tampón TRIS-glicina-fosfato 0,05 M, pH 7,0, que contenía EDTA 1 mM y maltosa al 0,1%, en 8°C. El homogeneizado se filtra a través de un paño cerrado para separar las sustancias de lastre, luego se centrifuga a 30 minutos a 18.000 g, y luego se filtra a través de un filtro de membrana de malla de 0,45 µm a 8°C. El filtrado se aplica entonces a una columna cromatográfica de volumen de 200 ml con el medio de intercambio de aniones Toyopearl DEAE-650M; la columna se equilibra con 4 volúmenes del tampón TRIS-glicina-fosfato, pH 7,0, que contiene EDTA 0,1 mM y NaCl 0,1 mM. Las proteínas unidas al transportador se separan por el gradiente escalonado de aumento en 105 etapas de la concentración de sal y recogiendo las fracciones diana. Temperatura de cromatografía: 8°C. La fracción diana se ultra filtra etapa por etapa a contrapresión máx. de 8,0 kfg/cm², a través de materiales de potencial de retención de 5 kDa y 200 kDa; luego se desaliniza y se diluye con la solución de glicina-NaOH 0,05 M, pH 7,4, hasta la concentración de proteína de 1,0 mg/ml. La solución se filtra por esterilización, a través de un filtro de membrana máx. de 0,22 µm de malla. Para caracterizar la fracción proteica resultante, se usaron la espectrofotometría ultravioleta, la cromatografía en gel, la electroforesis en gel de poliacrilamida y el análisis de aminoácidos. La solución del espectro ultravioleta se lee en el intervalo de longitud de onda de 250 a 350 nm, la absorción máxima se observa a 280 ± 5 nm. Para determinar la masa molecular de las proteínas y polipéptidos formadores del complejo se usan los siguientes procedimientos: cromatografía en gel con Superdex 75 (GE Healthcare) y electroforesis SDS-Page desnaturizante en gel de poliacrilamida al 12 por ciento en comparación con un conjunto estándar de proteínas marcadoras. La columna se calibra con los estándares de proteína, intervalo de masas moleculares: 13 kDa a 200 kDa. Los procedimientos anteriores han encontrado que el fármaco contiene las proteínas neutras ligeramente ácidas con carga negativa y polipéptidos relacionados con el factor de crecimiento, factor de diferenciación, moléculas de señalización de masa molecular de 5 a 200 kDa, donde al menos el 82% de la masa de proteína total tiene Masa molecular de 10 a 120 kDa, y en el que existe un pico a la longitud de onda de 274 - 284 nm en el espectro UV visible y bandas en el intervalo de pI 4,2 a 8,4 en enfoque isoelectrónico en un gel de poliacrilamida al 5%; y medicamento que contiene un diluyente farmacéuticamente aceptable.

Análisis de aminoácidos (%): Asp: 10,82 ± 2,8; Thr: 5,4 ± 1,6; Ser: 5,2 ± Glu: 16,2 ± 3,4; Pro: 7,045 ± 2,5; Gly: 5,2 ± 2,4; Ala: 5,4 ± 1,8; Val: 7,08 ± 2,9; Met: 2,65 ± 1,4; He - 4,45 ± 1,8; Leu: 9,4 ± 2,6; Tyr: 4,02 ± 1,2; Phe: 4,8 ± 1,9; Orn: 0,48 ± 0,2; Lys: 8,48 ± 2,4; His: 2,8 ± 0,9; y Arg: 6,52 ± 2,2.

Ejemplo 2. Procedimiento de producción del complejo biológicamente activo.

35 Producción de fracción de proteína a partir del cerebro embrionario porcino. 200 gramos de cerebro embrionario porcino congelado rápidamente, 3 a 4 semanas de edad gestacional, se descongelan y se homogeneizan 5 minutos en 800 ml de tampón TRIS-maleato 50 mM, pH 5,8, que contiene EDTA 1 mM y manitol al 0,1%, a 25 ° DO. El homogenato se filtra a través de una tela cerrada para separar las sustancias de lastre, luego se centrifuga a 30 minutos a 30.000 g, y luego se filtra a través de un filtro de membrana de malla de 0,45 µm a 25°C. El filtrado se aplica después a una columna cromatográfica de volumen de 250 ml con el medio de intercambio de aniones DEAE-Sepharose; la columna se equilibra con 4 volúmenes de la solución tampón de maleato, pH 5,8, que contiene EDTA 0,1 mM. Las proteínas unidas al vehículo se separan mediante el gradiente por etapas de la solución tampón de maleato, pH 5,8, que contiene NaCl 0,04 M, aumentando por etapa 0,02 M la concentración de sal; la recolección de fracciones diana comienza en la concentración de sal 0.06 M. Temperatura de cromatografía: 2 a 4°C. La fracción diana se ultra filtra etapa por etapa a contrapresión máx. de 8.0 kfg/cm², a través de materiales de potencial de retención de 5 kDa y 200 kDa; luego se desaliniza y se diluye con la solución de aspartato de NaOH 50 M, pH 7,4, hasta la concentración de proteína de 1,0 mg/ml, añadiendo el monooleato de polioxietileno sorbitan (Tween 20) hasta la concentración total de 0,01 mg/ml. La solución se filtra por esterilización, a través de un Filtro de membrana máx. de 0,22 µm de malla. Para caracterizar la fracción de proteína-polipéptido resultante se usaron la espectrofotometría ultravioleta, la cromatografía en gel, la electroforesis en gel de poliacrilamida y el análisis de aminoácidos. La solución del espectro ultravioleta se lee en el intervalo de longitud de onda de 250 a 350 nm, la absorción máxima se observa a 280 ± 5 nm. Para determinar la masa molecular de las proteínas formadores de complejos y polipéptidos se usan los siguientes procedimientos: cromatografía en gel con Superdex 75 (GE Healthcare) y electroforesis desnaturizante de SDS-Page en gel de poliacrilamida al 12 por ciento en comparación con un conjunto estándar de proteínas marcadoras. La columna se calibra con los estándares de proteínas, intervalo de masas moleculares: 13 kDa a 250 kDa. Los procedimientos anteriores han encontrado que el fármaco contiene las proteínas neutras ligeramente ácidas con carga negativa y los polipéptidos relacionados con el factor de crecimiento, factor de diferenciación, moléculas de señalización de masa molecular de 5 a 200 kDa, en donde el 82% mín. de la masa de proteína total tiene la masa molecular de 10 a 120 kDa, y existe un pico a la longitud de onda de 284 nm en el espectro UV visible y bandas en el intervalo de pI 4.2 a 8.4 en enfoque isoelectrónico en un gel de poliacrilamida al 5% ; y medicamento que contiene un diluyente farmacéuticamente aceptable.

Análisis resultante de aminoácidos complejos (%): Asp: $10,82 \pm 1,3$; Thr: $5,4 \pm 0,9$; Ser: $5,2 \pm 1,1$; Glu: $16,2 \pm 1,9$; Pro: $7,045 \pm 1,7$; Gly: $5,2 \pm 0,8$; Ala: $5,4 \pm 1,1$; Val: $7,08 \pm 2,3$; Met: $2,65 \pm 0,6$; He: $4,45 \pm 0,8$; Leu: $9,4 \pm 2,5$; Tyr: $4,02 \pm 0,6$; Phe: $4,8 \pm 1,1$; Orn: $0,48 \pm 0,1$; Lys: $8,48 \pm 2,3$; His: $2,8 \pm 0,7$; Arg: $6,52 \pm 2,1$.

Ejemplo 3. Procedimiento de producción de composición farmacéutica.

- 5 La solución de complejo biológicamente activo de cerebro embrionario porcino obtenida del Ejemplo 1 se diluye con la solución tampón de glicina-fosfato 50 mM, que contiene, en total, 0,5% de manitol, 0,1% de carmelosa, 0,0005% de Polisorbato 80 y fosfato de sodio disustituido a pH 8,0 para obtener la proteína total final en la concentración de solución resultante dentro del intervalo de 0,9 a 1,2 mg/ml. Es decir, la composición puede contener 0,9, 1 y/o 1,2 mg/ml del complejo proteico-polipeptídico biológicamente activo.
- 10 La composición farmacéutica resultante se esteriliza por filtración, a través de un Filtro de membrana máx. de 0,1 μm de malla, dispensado en viales de vidrio y tapado. Las propiedades de composición farmacéutica resultantes se han evaluado siguiendo el estudio experimental convencional (preclínico) de nuevas directrices de sustancias farmacológicas [5].

Ejemplo 4. Procedimiento de producción de composición farmacéutica.

- 15 La solución de complejo biológicamente activo de cerebro embrionario porcino obtenida a partir del Ejemplo 2 se diluye con la solución tampón de maleato 50 mM, pH 5,8, que contiene, en total, 0,3% de ácido láctico, 0,5% de manitol, 0,1% de carmelosa, hasta 0,0005. % de polisorbato 80 para obtener la proteína total final en la concentración de solución resultante dentro del intervalo de 0,9 a 1,2 mg/ml, es decir, la composición farmacéutica puede contener 0,9, 1 y/o 1,2 mg/ml de complejo proteico-polipeptídico biológicamente activo. La composición
- 20 farmacéutica resultante se esteriliza por filtración, a través de un filtro de membrana de malla de 0,1 μm máx., dispensado en viales de vidrio y tapado.

Ejemplo 5. Estudio de toxicidad

- La toxicidad se probó en los experimentos agudos y subcrónicos con la composición farmacéutica original. Forma farmacéutica: spray de dosificación intranasal estéril, en vial de polímero o vidrio de 10 y 30 ml (0,1 mg/ml); solución
- 25 inyectable: 5 ampollas de 1 ml cada una (0,1 mg/ml), 5 ampollas de 2 ml cada una (0,1 mg/ml) y 1 ampolla de 2 ml (0,2 mg/ml). Dosis máximas diarias recomendadas: 0,4 mg por vía endolumbar y 0,1 mg por vía intravenosa.

Condiciones y procedimientos experimentales

- El objetivo del estudio fue determinar las dosis tolerables, tóxicas y letales de la composición farmacéutica original. El experimento utilizó los ratones de ambos sexos, línea BALB/C, 18 a 20 g de masa corporal, por vía intragástrica e
- 30 intraperitoneal. Período de observación: 14 días. Los animales fueron recibidos del criadero, estaban certificados. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar, jaulas de plástico, 10 animales en cada una, 10 animales en grupo. Alimentación: alimento combinado, vegetales frescos, cuajada. Acceso libre a agua y alimento. Luz de vivero: artificial. Temperatura del aire: 18 a 20°C. La dosis máxima posible para administración a ratones fue de 0,2 ml, o 10 mg/kg, es decir, dosis terapéutica diaria de 600 veces. Los animales fueron retirados del experimento con éter narcosis; los animales fueron diseccionados; y las vísceras fueron analizadas.
- 35

Resultados del estudio de toxicidad aguda.

Ratones. Masa corporal: de 18 a 20 gramos. Dosis administrada: 0,2 ml, o 10 mg/kg.

Animales en grupo: 10. Dos grupos: intragástrico e intraperitoneal. Período de observación: 14 días.

- Habito. Al final del experimento, todos los animales se veían sanos. Cabello: color blanco denso. No hay diferencias
- 40 entre grupos a partir del hábito.

Comportamiento. No hay diferencias entre grupos, normal.

Índice de mortalidad. No hay muertes en ninguno de los tres grupos.

- Masa corporal. Seis pesadas de control durante el experimento. No se revela pérdida o crecimiento. Vísceras. No
- 45 hay diferencias entre los grupos a partir de las condiciones de vísceras. Sin alteraciones ni aumento de vísceras.

Estudio de toxicidad subaguda (subcrónica)

Condiciones y procedimientos experimentales

- El estudio experimental de toxicidad subcrónica de la composición farmacéutica original utilizó las ratas Wistar machos y hembras de 200 a 250 gramos de peso corporal. Los animales fueron recibidos del criadero. Los animales
- 50 se mantuvieron en condiciones estándar, jaulas de plástico, cada una con 5 animales. Alimentación: alimentación en

ES 2 671 247 T3

cubos, verduras frescas, cuajada. Acceso libre a agua y alimento.

Luz de vivero: artificial. Temperatura del aire: 18 a 20°C. Antes del experimento, los animales estuvieron 10 días en cuarentena. Diez animales (5 machos y 5 hembras) en grupo. Segregación de grupos:

Grupo 1: animales intactos (control);

5 Grupo 2: composición farmacéutica original, dosis terapéutica, subcutánea;

Grupo 3: composición farmacéutica original x 10, subcutánea;

Grupo 4: composición farmacéutica original, dosis terapéutica intravenosa; y

Grupo 5: composición farmacéutica original x 10, intravenosa.

10 Período de observación: administración de 1 mes, observación de efecto resorción de 1 mes. Evaluación de la toxicidad según los puntos de la lista de verificación de observación:

tasa de supervivencia y hábito: (cabello, ojos, orejas, extremidades, dientes);

estado y comportamiento (actividad, caminar, temperamento, comer);

cambio en la masa corporal (peso antes y al final del experimento); y funciones fisiológicas (respiración, salivación, micción, excrementos).

15 Antes y al final del experimento los animales fueron sometidos a análisis de sangre: morfología de la sangre periférica (recuento de eritrocitos, leucocitos, trombocitos, nivel de hemoglobina) y bioquímica (niveles de albúmina, urea, creatinina, glucosa); actividad de ciertas enzimas (aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa, fosfatasa alcalina, lactato deshidrogenasa). La sangre para el estudio hematológico se tomó de la vena de la cola. Para contar los corpúsculos sanguíneos, se utilizó el contador automático Picoscale (Hungría). El nivel de hemoglobina se determinó mediante el procedimiento de cianometahemoglobina. Para determinar los parámetros bioquímicos, se utilizó el sistema automatizado FP-901, Labsystems, Finlandia. Después de completar el experimento crónico, los animales fueron sacrificados mediante sobredosis de narcosis, para exámenes patomorfológicos de los órganos y tejidos. Los animales fueron diseccionados inmediatamente después de la muerte, completaron el patrón de estudio patológico. Para los exámenes patomorfológicos, las muestras de tejido se gelatinizaron y se sometieron a criostato para obtener porciones de hasta 5 µm de espesor. Luego, los tejidos se fijaron y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Para la microscopía se usó el microscopio Opton (Alemania). Los datos experimentales se compararon con los de control y se contaron usando un software estadístico.

20 Resultados del estudio. Macroscópico.

30 Tasa de supervivencia: todos los animales experimentales toleraron todos los procedimientos de administración. No se observaron muertes en los grupos experimentales o de control.

Comportamiento: No se registró ningún comportamiento (hiperactividad o hipoactividad) o desviaciones de estado de los animales experimentales en comparación con los controles. Hipereritismo del tono muscular: ninguno.

35 Hábitos: todos los animales eran de término medio; sin atrofas u obesidades. Cabello: liso y brillante; sin caídas ni fragilidad. Turbidez corneal, lagrimeo, otras patologías: ninguna. Orejas: color rosa, sin costras, sin inflamaciones, sin sacudidas. Dientes: color regular en todos los animales, sin roturas.

Funciones: respiración: ritmo tranquilo y regular, sin obstrucciones en el control y experimental; salivación: sin patologías; micción: velocidad, volumen y color dentro de la norma fisiológica.

Clínica: dinámica de masa corporal: positiva en todos los grupos experimentales. No hay diferencias firmes entre experimental y control.

40 Hematología: nivel de hemoglobina; recuentos de eritrocitos, leucocitos y trombocitos: dentro de la norma fisiológica en todos los grupos.

45 Bioquímica: la dosis de prueba del complejo del péptido no afectó a la proteína del suero sanguíneo en los animales experimentales; por lo tanto, ningún efecto perjudicial del fármaco probado sobre la función de formación de proteína del hígado. Para revelar un eventual efecto hepático adverso, se determinó la actividad de aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa y fosfatasa alcalina en el suero sanguíneo de animales experimentales. El análisis de datos no ha mostrado alteraciones confiables en la actividad de dichas enzimas del suero sanguíneo.

Patomorfolología: macroscópica.

En todos los animales en todos los grupos en disección: piel limpia, capa de grasa subcutánea moderadamente desarrollada. Disposición de vísceras: regular; no hay líquido libre en las cavidades pleurales o abdominales. Luz

traqueal y bronquial: libre; mucosa: limpia, húmeda y lustrosa. El tejido pulmonar en los grupos experimentales tiene una coloración más intensa que en los controles, sin embargo, sin signos de edema.

Miocardio en la sección: sin lesiones.

Lengua: limpia. Cavidad bucal y mucosa del esófago: sin defectos. Estómago e intestinos: sin rastros de irritación.

5 Hígado: no agrandado

La cápsula renal es fácilmente separable; la sustancia medular y cortical en la sección son bien distinguibles. El bazo tiene una cápsula lisa, color marrón grisáceo, sin raspado en la pulpa. Glándulas seminales y ovarios: sin peculiaridades.

Timo: color grisáceo, sin hemorragias.

10 Glándula tiroides: densa, con lóbulos simétricos.

Túnicas cerebrales: relleno de sangre moderado, húmedo, brillante. Materia cerebral: patrón simétrico en la sección.

15 Los índices de masa corporal de los animales experimentales no tenían diferencias válidas con los de los grupos de control. Microscopía: en todos los grupos estudiados: sin alteraciones patomorfológicas en las vísceras (hígado, riñones, pulmones, corazón, bazo, estómago, intestino grueso y delgado) glándulas endocrinas (tiroides, timo, glándulas suprarrenales, glándula pancreática), órganos reproductivos (útero, ovarios), ganglios linfáticos, cerebro, piel, mucosas de nariz y garganta.

Toxicidad subcrónica en administración intranasal.

Animales maduros.

20 El estudio utilizó conejos Chinchilla hembra maduros de 2.500 gramos. Los animales fueron recibidos del criadero. Los animales se mantuvieron en jaulas de metal estándar, un animal por jaula. Alimentación: alimentación en cubos, verduras frescas. Acceso libre a agua y alimento. Luz de vivero: artificial. Temperatura del aire: 18 a 20°C. Tres grupos, cinco animales en cada uno. Segregación de grupos: Grupo 1 (dosis terapéutica): composición farmacéutica, 0,1 mg/ml, 0,2 ml, individual, diariamente; Grupo 2: composición farmacéutica, 0,1 mg/ml, 0,2 ml, dos veces al día, diariamente; y Grupo 3: animales intactos. Período de administración: 1 mes.

25 Evaluación de la toxicidad de acuerdo con los puntos de la lista de verificación de observación: tasa de supervivencia, hábito, estado, comportamiento y cambio de masa corporal (peso antes y al final del experimento). El efecto irritante local durante el experimento se evaluó a partir de las alteraciones mucosas de la nariz.

30 Antes y al final del experimento los animales fueron sometidos a análisis de sangre: morfología de la sangre periférica (recuento de eritrocitos, leucocitos, trombocitos, nivel de hemoglobina) y bioquímica (albúmina, urea, creatinina, niveles de glucosa); actividad de ciertas enzimas (aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa, fosfatasa alcalina, lactato deshidrogenasa). La sangre para determinar lo anterior se tomó de las venas auriculares, de 1,5 a 2,0 ml.

35 Para contar los corpúsculos sanguíneos, se utilizó el contador automático Picoscale (Hungría). El nivel de hemoglobina se determinó mediante el procedimiento de cianometahemoglobina. Para determinar los parámetros bioquímicos, se utilizó el sistema automatizado FP-901, Labsystems, Finlandia.

Después de completar el experimento crónico, los animales se sacrificaron por sobredosis de narcosis. Los animales fueron diseccionados inmediatamente después de la muerte, completaron el patrón de estudio patológico.

La evaluación morfométrica de los parámetros de órganos animales utilizó la escala de Sartorius (Alemania); más adelante, se calcularon las masas de los órganos y sus desviaciones estándar.

40 Para los exámenes patomorfológicos, las muestras de tejido fresco se gelatinizaron y se sometieron a criostato para obtener porciones de hasta 5 µm de espesor. Luego, los tejidos se fijaron y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Para la microscopía se usó el microscopio Opton (Alemania).

Los datos experimentales se compararon con los de control y se contaron usando un software estadístico.

Resultados del estudio

45 1. Visual.

Tasa de supervivencia: Todos los animales experimentales toleraron todas las dosis administradas de la composición farmacéutica. No se registraron muertes.

Comportamiento: No se observó hiperactividad o hipoactividad en los animales experimentales en comparación con

los controles. No se registró hipererretismo de tono muscular en los animales experimentales o de control. Se ha visto que la administración del fármaco no provoca molestias en los animales.

Habito: todos los animales, independientemente de la dosis, tenían un término medio; sin atrofas u obesidades. Cabello: liso y brillante; sin caídas ni fragilidad. Turbidez corneal, lagrimeo, otras patologías: ninguna. Orejeras: color rosa, sin costras, sin inflamaciones, sin sacudidas. Dientes: color regular en todos los animales, sin roturas.

5 Funciones: respiración: ritmo tranquilo y regular, sin obstrucciones en el control y experimental; salivación: sin patologías; micción: velocidad, volumen y color dentro de la norma fisiológica; y excrementos: el color y la forma son iguales que el control.

2. Estudios clínicos:

10 Dinámica de masa corporal: positiva en todos los grupos experimentales, sin diferencia significativa del control.

Examen de sangre: nivel de hemoglobina; recuentos de eritrocitos, leucocitos y trombocitos: dentro de la norma fisiológica en todos los grupos.

15 Bioquímica: actividad normal de glucemia, alanina y asparagina aminotransferasas en todos los grupos. La concentración de proteína no fue estadísticamente diferente entre los animales que recibieron la composición farmacéutica una vez y dos veces al día.

3. Patomorfología:

20 En todos los grupos estudiados: sin alteraciones patomorfológicas en las vísceras (hígado, riñones, pulmones, corazón, bazo, estómago, intestino grueso y delgado) glándulas endocrinas (tiroides, timo, glándulas suprarrenales, glándula pancreática), órganos reproductivos (útero, ovarios), ganglios linfáticos, cerebro, piel, mucosas de nariz y garganta. Por lo tanto, la composición farmacéutica de toxicidad subcrónica de forma nasal ha sido probada. La prueba de ensayo subcrónico de pulverización no ha revelado ninguna alteración significativa de las vísceras de los animales experimentales o efecto irritante local. El estudio de toxicidad subcrónica utilizó los procedimientos clínicos, los procedimientos convencionales para la hematología y bioquímica de la sangre y la histología de las vísceras y las mucosas nasales.

25 Estudio de toxicidad subcrónica en conejos inmaduros en administración intranasal.

30 El estudio usó conejos Chinchilla inmaduros de 300 a 500 gramos de 3 semanas de edad. El fármaco se administró diariamente, una o dos veces, pulverización simple, durante 2 semanas. Los animales fueron recibidos del criadero. Los animales se mantuvieron en jaulas de metal estándar, un animal por jaula. Alimentación: alimentación en cubos, verduras frescas. Acceso libre a agua y alimento. Luz de vivero: artificial. Temperatura del aire: 18 a 20°C. Tres grupos, cinco animales en cada uno. Segregación de grupos: Grupo 1 (dosis terapéutica): composición farmacéutica, 0,1 mg/ml, 0,2 ml, individual, diariamente; Grupo 2: composición farmacéutica, 0,1 mg/ml, 0,2 ml, dos veces al día, diariamente; y Grupo 3: animales intactos. Período de administración: 2 semanas.

35 Evaluación de la toxicidad de acuerdo con los puntos de la lista de verificación de observación: tasa de supervivencia, hábito, estado, comportamiento y cambio de masa corporal (peso antes y al final del experimento). El efecto irritante local durante el experimento se evaluó a partir de las alteraciones mucosas de la nariz.

40 Antes y al final del experimento, los animales se sometieron a análisis de sangre: morfología de la sangre periférica (recuentos de eritrocitos, leucocitos, trombocitos, nivel de hemoglobina) y bioquímica (albúmina, urea, creatinina, niveles de glucosa); actividad de ciertas enzimas (aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa, fosfatasa alcalina, lactato deshidrogenasa). Para determinar lo anterior se tomó sangre de las venas auriculares, de 1,5 a 2,0 ml. Para contar los corpúsculos sanguíneos, se utilizó el contador automático Picoscale (Hungría). El nivel de hemoglobina se determinó mediante el procedimiento de cianometahemoglobina. Para determinar los parámetros bioquímicos, se utilizó el sistema automatizado FP-901, Labsystems, Finlandia.

Después de completar el experimento crónico, los animales se sacrificaron mediante sobredosis de narcosis. Los animales fueron procesados inmediatamente después de la muerte, completaron el patrón de estudio patológico.

45 La evaluación morfométrica de los parámetros de órganos animales utilizó la escala de Sartorius (Alemania); más adelante, se calcularon las masas de los órganos y sus desviaciones estándar.

Para los exámenes patomorfológicos, las muestras de tejido fresco se gelatinizaron y sometieron a criostato para obtener porciones de hasta 5 µm de espesor. Luego, los tejidos se fijaron y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Para la microscopía se usó el microscopio Opton (Alemania).

50 Los datos experimentales se compararon con los de control y se contaron usando un software estadístico.

Resultados del estudio

Evaluación del efecto irritante en la mucosa nasal.

Biomicroscopía intravital.

5 Durante todo el período de observación, el comportamiento del animal permaneció normal; no se registraron exudados de los conductos nasales o costras. Las gotas provocaron en los conejos el reflejo de los estornudos, deteniéndose en 1 a 2 minutos. En la instilación de gotas, tanto el grupo terapéutico como los conejos del grupo de sobredosis tenían el efecto de irritación mecánica, expresado en el reflejo del estornudo, sacudidas en la nariz; los animales se frotaban la nariz con sus patas.

10 Grupo intacto de control. Mucosa: color rosa pálido, sin edemas ni supuración. La observación del espéculo otorrinolaringológico no reveló lesiones en el epitelio. Secreción mucosa nasal: transparente, hidratada. Reflejos: dentro de la norma fisiológica.

Microscopía confocal: capa epitelial de estructura densamente empaquetada de células claramente diferenciadas. Las células están conectadas por uniones gap.

15 En el grupo de dosis terapéutica, la mucosa nasal permaneció clara durante todo el período de observación: color de rosa débil, sin exudados o edemas. Vasos de mucosa: sin cambios. El estado del epitelio se evaluó con la iluminación de hendidura. No se revelaron lesiones.

En el grupo x 10. No se revelaron lesiones.

Clínico y bioquímico

20 Examen de sangre: nivel de hemoglobina; recuentos de eritrocitos, leucocitos y trombocitos: dentro de la norma fisiológica en todos los grupos. Los resultados de los grupos experimentales no mostraron diferencias significativas de los grupos de control intactos y el fármaco de comparación.

Bioquímica: actividad normal de glucosa en sangre, alanina y asparagina aminotransferasas en todos los grupos.

25 Conclusión. La composición farmacéutica original fue ensayada en cuanto a la toxicidad subcrónica en animales inmaduros experimentales.

Se ha revelado que la administración intranasal de la sustancia, tanto en la dosis terapéutica como en la dosis terapéutica de diez veces, en el transcurso de 2 semanas, no provoca alteración de las vísceras ni produce ningún efecto tóxico en el sistema sanguíneo. No se ha revelado ningún efecto irritante local.

Ejemplo 6. Mutagenicidad de la composición farmacéutica.

30 Para evaluar la mutagenicidad de la composición farmacéutica de polipéptido-proteína reivindicada, se utilizó el siguiente conjunto de ensayos:

- Ensayo de mutagenicidad del gen Ames Salmonella/microsoma utilizando las cepas de Salmonella typhimurium TA 97, TA 98, y TA 100 como objetos de prueba; y

- micronúcleos en células de médula ósea murinas.

35 Se analizó una muestra de composición farmacéutica de polipéptido-proteína, en forma de líquido estéril transparente empacado en un vial de vidrio oscuro, 20 ml, 0,1 mg/ml de sustancia.

Evaluación de mutagenicidad de la composición farmacéutica de proteína-polipéptido por ensayo de Ames

40 El ensayo de mutagenicidad de Salmonella typhimurium es un sistema de prueba bacteriano para explicar las mutaciones génicas de prototrofia de histidina bajo el efecto de los compuestos químicos y/o sus metabolitos, induciendo las mutaciones de la sustitución de bases o desplazamiento del marco de lectura en el tipo de genoma del organismo. Los mutágenos que inducen la sustitución de pares de bases son los agentes que provocan las mutaciones de sustitución de pares de bases en la molécula de ADN. Los mutágenos que inducen las mutaciones de cambio de marco de lectura del código genético son los agentes que provocan la adición o el déficit de pares de bases únicos o múltiples en la molécula de ADN.

45 El objetivo del procedimiento es revelar la capacidad de las sustancias farmacéuticas o sus metabolitos para inducir las mutaciones génicas en las cepas indicadoras de Salmonella typhimurium. Las bacterias se tratan con un compuesto bajo prueba con sistema de activación metabólica (SM +) o sin (SM-). Después de un cierto tiempo de incubación, se compara el número de colonias revertidas de las diferentes cepas de prueba con el del revertante espontáneo de control negativo (cultivos no tratados o tratados con disolvente). Si el compuesto bajo prueba y/o sus metabolitos tienen actividad mutagénica, inducirán las mutaciones inversas desde la auxotrofia de histidina hasta la

50

prototrofia en las cepas dependientes de histidina de *Salmonella typhimurium*.

Los ensayos usaron un conjunto de cepas indicadoras de *Salmonella typhimurium* que permiten registrar las mutaciones de sustitución de pares de bases (TA 100) de cambio de marco de lectura de código genético (TA 98 y TA 97). Las cepas provienen de la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales, Instituto de Investigación en Genética y Selección de Microorganismos Industriales, Centro Científico de la Federación de Rusia. Los cultivos bacterianos que manejan las Reglas de procedimiento, las verificaciones genotípicas de cepas, sus reglas de mantenimiento del museo, los utensilios experimentales, reactivos, medios y soluciones nutritivas, obtención de homogenato de hígado de rata, activación de compuestos mixtos y procedimientos de análisis estadístico cumplen con los estándares descritos en detalle en la literatura relevante.

- 5 La activación metabólica utilizó la fracción S9 del hígado de ratas Wistar; 5 días antes del sacrificio las ratas recibieron el inductor de enzimas microsómicas (sovol, 300 mg/kg, simple, por vía intraperitoneal). Para controlar el sistema de activación metabólica se usó el bromuro de etidio (10 µg/placa), cepa TA 98, SM +.

- 15 Se examinó la solución estéril de la composición farmacéutica de proteína-polipéptido estéril de 2,3 mg/ml: 1,0 y 0,3 ml/placa de solución madre y tres diluciones 10X en solución fisiológica (0,1 ml/placa). Las dosis de la prueba de sustancia fueron 300, 100, 10, 1 y 0.1 µg/placa.

- 20 El experimento tuvo controles positivos; para ellos se usaron las sustancias inductoras de mutaciones en cepas de microorganismos relevantes con o sin activación. Las variantes de no activación usaron la azida sódica, 10 µg/placa, cepa TA 100, SM-; 2,7-2,7-diamino-4,9-dioxi-5,10-dioxo-4,5,9,10-tetrahidro-4,9- diazopireno (DDDTDP), 10 µg/placa, cepa TA 98, SM- ; y 9-aminocaridina (9AA), 50 µg/placa, cepa TA 97, SM-. Para controlar la actividad del sistema de activación metabólica, se utilizó el bromuro de etidio (10 µg/placa), cepa TA 98, SM +. El control negativo usó la solución fisiológica (0.1 ml/placa).

El agar semi-enriquecido selectivo (0,7%) en tubos de ensayo se fundió en un baño de agua a 100°C; luego se colocó en el baño de agua con termostato de 45-46°C.

- 25 Primero, se pusieron en los tubos de ensayo de agar 0,1 ml de la muestra diluida de manera relevante, luego 0,1 ml de la suspensión bacteriana y 0,5 ml de la mezcla de activación microsómica (variante de activación metabólica). Luego, el contenido del tubo se mezcló rápidamente y se descargó en el agar mínimo inferior en las placas de Petri. La mezcla de activación microsómica y el tiempo de introducción de la reserva de agar semilíquido por placa no excedió de 10 a 15 segundos. Las placas se dejaron durante 30 a 40 minutos a temperatura ambiente; después de la primera gelificación con agar, se colocaron en un termostato a 37°C. Los resultados fueron contabilizados después de una incubación de 48 horas.

- 30 Las variantes del sistema de activación no metabólica (SM-) y del sistema de activación metabólica (SM +) se experimentaron en paralelo. En la variante SM-, se puede observar el efecto de mutágenos directos (fármacos mutagénicos debido a la actividad de la estructura inicial del compuesto). A partir del efecto de los promutágenos, es decir, los compuestos cuyo efecto se asocia con la formación de metabolitos mutagénicos, esto puede ser tenido en cuenta cuando se comparan los resultados de los datos de análisis de pruebas de los compuestos SM- y SM+. Cada control y variantes experimentales usaron 2 placas cada uno. El efecto mutagénico se consideró significativo cuando el número medio de las colonias revertantes por placa en el experimento excedió el control una, 2 y más veces. Los resultados experimentales se tuvieron en cuenta en la condición de respuesta estándar en todas las variantes de control positivo y negativo. Los números de colonias revertantes en el control del disolvente, variantes SM- y SM +, se encontraban dentro del intervalo de fluctuaciones de nivel espontáneo para las cepas dadas. La respuesta de las cepas a los mutágenos estándar estaba dentro del intervalo de niveles comunes.

- 35 El complejo proteico-polipeptídico examinado con todas las concentraciones no ha mostrado ningún efecto mutagénico para las cepas TA 100, TA 98 y TA 97, con y sin sistema de activación metabólica.

- 45 **CONCLUSIÓN:** la composición farmacéutica de polipéptido-proteína es incapaz de inducir mutaciones génicas con las cepas de prueba de *Salmonella typhimurium* dentro de todo el intervalo de concentraciones experimentales.

Evaluación de mutagenicidad de la composición de proteína-polipéptido por prueba micronuclear en células de mamífero.

La actividad citogenética es la capacidad de una sustancia para provocar anomalías cromosómicas estructurales y cuantitativas en las células somáticas y embrionarias.

- 50 Los micronúcleos son las formaciones que contienen ADN de pequeño tamaño que consisten en los fragmentos acéntricos cromosómicos o están disminuidos en los cromosomas de la ana-telofase. En la etapa de telofase, estos fragmentos pueden entrar en los núcleos de las células hijas o formar micronúcleos individuales o múltiples en el citoplasma.

- 55 El objetivo del estudio es revelar y evaluar cuantitativamente la actividad citogenética (mutagenicidad) de los fármacos farmacológicos en los policromatófilos de médula ósea de mamíferos. La base del procedimiento es el

registro microscópico de las células de micronúcleos.

El experimento utilizó los ratones híbridos F1 (CBAx C57Bl6/J) machos y hembras, dos meses de edad, 18 a 20 gramos de peso corporal. Cada grupo incluyó 6 animales. Los animales se mantuvieron bajo el régimen de luz de 12 horas, con agua y alimentos libremente disponibles. Los experimentos con animales de evaluación de mutagenicidad del complejo proteico-polipeptídico de administración simple y de cinco veces cumplieron con los protocolos oficiales. Se realizaron tres series experimentales con controles relevantes: dosis terapéutica: machos, administración única; dosis subtóxica: machos, administración única; y dosis terapéutica: machos y hembras, administración de cinco veces.

Teniendo en cuenta que el posible procedimiento de administración clínica de la composición farmacéutica de polipéptido-proteína biológicamente activa puede ser intravenoso o endolumbar, este estudio utilizó el intraperitoneal con ratones. La dosis de evaluación de mutagenicidad del complejo de proteína - polipéptido se definió sobre la base de la dosis terapéutica diaria máxima recomendada (TD) para humanos. Se recomienda la administración de concentración IV de 2 ml a 0,1 mg/ml. La dosis terapéutica para humanos, incluidos infantes, puede ser de 0,05 mg/kg/día. Para calcular la dosis experimental de los ratones, se recomienda el factor de conversión para tener en cuenta la relación de área de superficie corporal humana y murina respecto de la masa corporal. En nuestro estudio fue 8,33. Por lo tanto, para la dosis terapéutica murina se tomaron aproximadamente 8,33 dosis terapéuticas humanas (0,42 mg/kg).

Para la dosis subtóxica se usó el máximo experimental posible, 10 mg/kg, ya que la concentración de la sustancia era de 0,1 mg/ml; la sustancia total convencional administrada a ratones es 0,1 ml por 10 g de peso corporal. Por lo tanto, la dosis máxima probada, calculada para humanos, fue de 1,7 mg/kg.

Se formaron siete grupos de animales, cuatro experimentales y tres de control. La sustancia de 0,1 mg/kg se administró cinco veces, a intervalos de 24 horas, tanto a machos como a hembras. En todos los grupos, los animales se sacrificaron 6 horas después de la última administración del complejo proteína-polipéptido.

En otros dos grupos experimentales, el complejo proteico-polipeptídico se administró una vez a los machos, a 0,2 mg/kg y 0,5 mg/kg.

Para el control negativo, se usó el control negativo de la solución fisiológica. Se administró por vía intraperitoneal a los machos y hembras de los dos grupos de control, los tiempos y volúmenes fueron los mismos que para el experimento. Control positivo: 20 mg/kg de ciclofosfamida disuelta improvisadamente en solución fisiológica, administración intraperitoneal única, 24 horas antes del sacrificio.

La preparación de células de la médula ósea para la cuenta de micronúcleos se realizó de manera convencional, de acuerdo con los lineamientos de "Micronuclear Test Environmental Factors Mutagenicity Assessment in Mammalia Organs Cells". El procedimiento de sacrificio fue la dislocación cervical 6 horas después de la última administración del fármaco. Se extrajeron ambos huesos femorales, luego se quitaron los músculos. Para lavar la médula ósea, el suero embrionario bovino (NPP PanECO). La médula ósea de ambos huesos femorales se extrajo en un microtubo con una jeringa. La suspensión se centrifugó a 1000 rpm, 5 minutos; el sobrenadante se eliminó, el sedimento se resuspendió cuidadosamente. Se usó una gota de la suspensión para preparar el frotis y luego se secó al aire. El frotis luego se fijó con metanol durante 3 minutos. Para la tinción se utilizó el procedimiento de Romanowsky-Giemsa. 2000 policromatófilos por animal se analizaron luego con preparaciones codificadas. En el recuento de 500 eritrocitos, se determinó la relación de policromatófilos y eritrocitos normocromáticos. El análisis terminó, se codificaron las preparaciones.

El criterio de resultado positivo es el crecimiento reproducible y estadísticamente significativo del número de eritrocitos de policromatófilos en micronúcleos en al menos un grupo experimental en comparación con el control. El resultado positivo indica que la sustancia induce daños a los cromosomas y/o daños en los aparatos mitóticos de las células en animales experimentales.

El tratamiento estadístico de los resultados de la cuenta de micronúcleos utilizó el criterio X2 experimental para controlar la comparación de series; la comparación intergrupala proporcional de los policromatófilos utilizó el criterio de Mann-Whitney.

Resultados de la cuenta de policromatófilos de micronúcleos de médula ósea de ratones: en ninguna variante experimental, la composición farmacéutica de proteína- polipéptido indujo el aumento de la proporción de policromatófilos de micronúcleos de médula ósea de los ratones en comparación con la serie de control experimental y relevante. Los 20 mg/kg de ciclofosfamida (control positivo) por vía intraperitoneal en ratones machos provocó células de micronúcleos 19,6 veces más altas (62,1 ‰ contra 3,16 ‰ en control, $P < 0,001$). La porción de eritrocitos policromatófilos en el total de eritrocitos de la médula ósea se encontraban aproximadamente al mismo nivel tanto para el grupo experimental como para el control; por lo tanto, no hay efecto tóxico de la sustancia en las dosis probadas sobre la hematogénesis. Bajo el control positivo (ciclofosfamida) se registró el cambio de relación de policromatófilos y eritrocitos normocromáticos a los últimos (en comparación con el control, $P < 0,005$).

Por lo tanto, la prueba para la inducción de micronúcleos en los policromatofilos de micronúcleos de médula ósea de ratones en una y cinco veces la administración intraperitoneal de 0,42 mg/kg de peso corporal a machos y hembras (correspondiente, según el recuento, a la dosis terapéutica diaria para humanos) no ha revelado ninguna actividad mutagénica del complejo proteico-polipeptídico. No se ha revelado ninguna actividad mutagénica para la administración de la composición farmacéutica de polipéptido-proteína única máxima posible, de 10 mg/kg en machos. El complejo proteico-polipeptídico no ha mostrado ningún efecto tóxico a partir del parámetro de "proporción de eritrocitos policrombóticos".

CONCLUSIÓN PARA LA EVALUACIÓN DE MUTAGENICIDAD DE LA COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA DE PROTEÍNA-POLIPÉPTIDO

La composición farmacéutica de polipéptido-proteína no ha mostrado actividad mutagénica en la prueba de Ames Salmonella/microsomas o en la prueba de inducción de micronúcleos de células de médula ósea de ratones realizada de acuerdo con las Directrices para el Estudio Experimental (Preclínico) de Nuevas Sustancias Farmacológicas.

Ejemplo 7. Efecto de la tasa de supervivencia de ratas de composición farmacéutica bajo daño cerebral isquémico en ambas ligaduras de arterias carótidas (isquemia global incompleta de cerebro).

El experimento usó ratas Wistar macho, de 180 a 250 g de peso corporal, bajo oclusión bilateral irreversible de las arterias carótidas comunes [3-5]. Los animales de laboratorio recibidos del criadero fueron mantenidos durante 5 días en cuarentena. Todas las manipulaciones veterinarias fueron asépticas, para mantener el estado de los animales experimentales. Los animales experimentales se mantuvieron en condiciones estándar [6]. Las ratas recibieron la anestesia de éter (éter dietílico químicamente puro, OAO "Medhimprom") a; luego se realizó una incisión cutánea de 8 a 10 cm de largo en la región del cuello, a lo largo de la línea media, para acceder a las arterias carótidas. Ambas arterias carótidas fueron expuestas, separando el nervio vago y el simpático. Los hilos de seda (seda blk 17 x 45 cm/M3/USP2/no cosido/Ethicon Johnson & Johnson, cat. No W203) se colocaron debajo de los vasos; luego, junto con un asistente, las dos arterias carótidas se ligaron en una sola etapa con un nudo de triple fricción. La incisión de la piel se suturó luego con la seda quirúrgica (seda blk 100 cm/M5/Sgle armado KP-3USP2/no cosido/Ethicon Johnson & Johnson, cat. No W794), uno o dos puntos quirúrgicos, con tratamiento adicional de la herida con el 5% de tintura de yodo. La solución fisiológica o la composición farmacéutica se administraron por vía intraperitoneal. El tiempo total de manipulación fue de 8 a 10 minutos; luego los animales fueron colocados en una jaula. Se usaron tres grupos de animales:

- Grupo 1: animales de control, solución fisiológica con jeringa desechable de insulina estéril: 0,5 ml/rata en 1 hora y 0,5 ml/rata en 5 horas después de la ligadura de las arterias carótidas;
- Grupo 2: animales operados simuladamente: mismas manipulaciones que en el control pero sin ligadura de arterias carótidas; solución fisiológica 0,5 ml/rata en 1 hora y 0,5 ml/rata en 5 horas; y
- Grupo 3: animales después de la ligadura de arterias carótidas; sustancia biológicamente activa: 0,5 ml/rata solución al 0,1% (0,2 mg/kg) en 1 hora y 0,5 ml/rata en 5 horas.

La tasa de supervivencia se siguió inmediatamente después del procedimiento y en el transcurso del primer día, es decir, la tasa de supervivencia final se corrigió en 24 horas. La actividad biológica del fármaco en forma de protección cerebral bajo isquemia global incompleta en la ligadura de arterias carótidas en un solo paso se evaluó de la siguiente manera:

- expresada tasa de supervivencia: > 80% de ratas;
- media expresada: tasa de supervivencia: 70% a 80% de ratas; y
- no expresada: tasa de supervivencia: <70% de ratas.

El procesamiento estadístico de datos utilizó la prueba exacta de Fischer, teniendo en cuenta la multiplicidad de las comparaciones.

Los experimentos han demostrado que el mayor número, es decir, 11 de 24, de los animales en control murió dentro de la primera hora después de la ligadura de las arterias carótidas; 4 animales más murieron en las siguientes 24 horas; en total, 15 ratas de 24 murieron (63%, véase la Tabla 1). Entre los animales operados simuladamente, 2 (17%) ratas murieron inmediatamente después de la operación. La composición farmacéutica 0,2 mg/kg (0,5 ml de solución al 0,1%) por vía intraperitoneal en 1 y 5 horas provocó la muerte en solo dos animales: 34/36 ratas sobrevivieron. El aumento de la tasa de supervivencia comparado con el control es del 95%. La Tabla 1 muestra los datos obtenidos.

Tabla 1. Efecto de la composición farmacéutica sobre la tasa de supervivencia de ratas bajo ligadura de ambas arterias carótidas.

Grupos de animales	Bioactividad expresada	
	Sobrevivieron	murieron
Grupo 1 Control: 24 ratas	9 de 24 (37%)	15 de 24 63%
Grupo 2 Operadas en forma simulada 12 ratas	10 de 12* (83%)	2 de 12 (17)%
Grupo 3 Composición farmacéutica 0,2 mg/kg 36 ratas	34 de 36* (95%)	2 de 36 (5%)

* -P ≤ 0,01 en comparación con el control.

Además, la composición farmacéutica asegura un aumento de la tasa de supervivencia de los animales estadísticamente significativa en comparación con el control bajo isquemia global incompleta del cerebro en la ligadura de ambas arterias carótidas en un solo paso.

- 5 El estudio ha revelado que la composición farmacéutica reivindicada tiene los efectos neuroprotectores y neurometabólicos expresados que estimulan la regeneración fisiológica y reparadora del tejido nervioso; su actividad biológica es más alta que la del medicamento de referencia Cerebrolysin.

La composición farmacéutica reivindicada puede encontrar aplicación en el tratamiento de las enfermedades del sistema nervioso central y periférico de origen vascular, traumático, tóxico, hipóxico y autoinmune.

10 **Ejemplo 8. Estudio del efecto de la composición farmacológica en el flujo sanguíneo cerebral local en corteza cerebral de ratas anestesiadas bajo isquemia transitoria global.**

El experimento usó ratas macho Wistar anestesiadas, 220 a 250 gramos de masa corporal, respiración natural. La anestesia usó el uretano (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Alemania), 1400 mg/kg, por vía intraperitoneal.

- 15 Técnica. La circulación sanguínea del cerebro en animales se evaluó utilizando registros de flujometría por láser Doppler del flujo de sangre local de la corteza cerebral de ratas. El flujo sanguíneo local en la región parietal de la corteza cerebral de ratas se registró con el medidor de flujo ALF-21 (Transonic System Inc., EE.UU.). Para esto, el sensor de aguja del medidor de flujo de 0,8 mm de diámetro se instaló en la región parietal de la corteza cerebral de rata con la ayuda de un micromanipulador y una barra. Al mismo tiempo, las fluctuaciones de la presión sanguínea arterial se registraron usando un catéter de polietileno preinsertado en la arteria femoral. El flujo sanguíneo y las lecturas de la presión arterial fueron registrados por el polígrafo BIOPAK (EE.UU.) y la computadora personal. La composición farmacológica de 0,2 mg/kg (solución de 0,5 ml al 0,1%) se administró en la vena femoral a través del catéter de polietileno.

- 25 El modelo de isquemia transitoria global se usa ampliamente para estudiar tanto las alteraciones del flujo sanguíneo cerebral como las diferentes alteraciones bioquímicas post-isquemia del funcionamiento cerebral. La isquemia transitoria global en ratas fue provocada por la oclusión de 10 minutos de ambas arterias carótidas comunes con la ayuda de abrazaderas especiales; al mismo tiempo, la presión arterial se redujo a 40 a 50 mm Hg bombeando la sangre arterial a través del catéter de polietileno preinsertado en la arteria femoral. En 10 minutos, las abrazaderas se retiraron de las arterias carótidas; la sangre tomada anteriormente fue devuelta al animal [3-5]. Los resultados de la prueba fueron tratados por análisis de varianza utilizando para las remediciones el análisis de dispersión y la prueba de comparación múltiple de Dannett y el software Biostat.

30 **Resultados del estudio**

- 35 Los experimentos han demostrado que la isquemia transitoria global de la corteza cerebral de ratas provoca la disminución del flujo sanguíneo local del cerebro, que, en promedio, es de $6,1 \pm 1,0$ RVU u $82 \pm 2,2\%$ del nivel inicial. Al retirar las abrazaderas de las arterias carótidas y reinfundir la sangre, se observa un aumento del flujo sanguíneo, que se reduce gradualmente, y, en 30 minutos después de la reperusión, en promedio, $25 \pm 2,8$ RVU o $23 \pm 2,4\%$ del nivel inicial ($p < 0,05$).

La composición farmacológica administrada 30 minutos después de la reperfusión de 0,2 mg/kg (0,5 ml de solución al 0,1%) indujo, en la mayoría de los casos, ya 10 minutos después de la administración, el aumento del flujo sanguíneo local de la corteza cerebral de ratas, en promedio, $12 \pm 3,3\%$ (7/10 experimentos). El inicio del aumento estadísticamente significativo del flujo sanguíneo cerebral local fue en el minuto 50, el aumento promedio fue del $39 \pm 9,2\%$, y dicho aumento continuó hasta el minuto 90 de observación (véase la Tabla 2). Cabe señalar aquí que en los controles de solución fisiológica el nivel de flujo sanguíneo cerebral local sigue siendo prácticamente el mismo.

La presión arterial se midió en paralelo con el flujo sanguíneo cerebral. El experimento ha demostrado que 10 minutos después de la administración de la sustancia farmacológica a ratas se observó una disminución gradual de la presión arterial; la presión arterial disminuyó en 50 minutos, en promedio, $15 \pm 3,4\%$; y esta hipotensión se mantuvo hasta la finalización del experimento (véase la Tabla).

Se debe observar que los controles de la solución fisiológica también han mostrado una pequeña disminución de la presión arterial, en promedio, 18%; por lo tanto, la sustancia farmacológica no tiene un efecto significativo sobre el nivel de presión arterial.

Conclusión

Por lo tanto, el estudio ha demostrado que la sustancia farmacológica mejora la tasa de supervivencia de los animales experimentales bajo ligadura completa de arterias carótidas. Al mismo tiempo, la sustancia farmacológica aumenta el flujo sanguíneo local de la corteza cerebral de ratas, reducido después de la isquemia transitoria global del cerebro; hasta el final del experimento, este flujo es mayor que el control previo a la isquemia. Puede ser que el aumento de la tasa de supervivencia de los animales con arterias carótidas ligadas bajo el efecto de la sustancia farmacológica se deba a su capacidad para mejorar el suministro sanguíneo de la corteza cerebral de los animales experimentales.

Ejemplo 9. Efectos neuroprotectores de la composición farmacéutica en toxicidad de glutamato in vitro.

El ensayo in vitro de las capacidades neuroprotectoras de la composición farmacéutica del complejo proteico-poli-peptídico biológicamente activo en toxicidad del glutamato utilizó los cultivos celulares de 7 días: células granulares de cerebelo de ratas de línea Wistar, obtenidas en disociación enzimática mecánica. Procedimiento de disociación del tejido cerebral: los cerebelos extraídos se colocaron en una placa de Petri de plástico llena de tampón de fosfato; luego estos se lavaron con la misma solución varias veces y se fragmentaron. Los fragmentos de tejido se incubaron durante 15 minutos a 37°C en la mezcla enzimática a base de tampón de fosfato con 0,05% de tripsina y 0,02% de EDTA. Después de la incubación, el tejido se lavó dos veces en tampones de fosfato y una vez en medio de cultivo; luego fue mecánicamente disociado en el medio de cultivo. El medio nutritivo contenía: suero bovino embrionario al 10%, glutamina 2 mM y tampón HEPES 10 mM, pH 7,2-7,4. La suspensión de células se centrifugó durante 1 minuto a 1000 rpm; el sobrenadante fue descargado; el sedimento se resuspendió en el medio nutriente donde la concentración K⁺ se había llevado a 25 mM, lo que tiene un efecto trófico sobre las células granulares del cerebelo. El cultivo continuó en las cámaras plásticas de 96 cavidades. En cada cavidad, se añadieron 0,1 ml de suspensión de células. Los cultivos se desarrollaron en una incubadora con CO₂, a $35,5^{\circ}\text{C}$, 98% de HR.

Al séptimo día de cultivo, después de la madurez de los receptores de glutamato, se realizó el tratamiento tóxico con glutamato de 15 minutos (25, 37, 50 μM , 15 minutos), en la solución salina equilibrada (mM: 154 NaCl, 25 KCl, 2,3 CaCl₂, 1 MgCl₂, 3,6 NaHCO₃, 0,35 Na₂HPO₄, 10 HEPES (pH 7,6)); luego la preparación se lavó dos veces; la tercera solución contenía la composición farmacéutica (0,05 y 0,1 mg/ml). Control (mismo volumen): tampón de H₂O glicina y albúmina de suero bovino (0,15 mg/ml). Luego, todo se incubó con CO₂ durante 4 horas para desarrollar la neurodegeneración. A continuación, la mezcla se fijó durante 20 minutos con la mezcla de formalina - alcohol - ácido acético 2: 7: 1, se tiñó con azul de tripano y se rellenó con glicerol; las fotos fueron tomadas por una cámara digital.

La viabilidad de las neuronas se evaluó contando las neuronas de morfología normales en las preparaciones teñidas con azul de tripano fija encapsuladas en glicerol. Cada punto utilizó 3 culturas hermanas; las células se contaron en 5 campos visuales de cultivo, lente x 40. La tasa de supervivencia se calculó como porcentaje de control.

La viabilidad de las neuronas se evaluó contando las neuronas de morfología normales en las preparaciones teñidas con azul de tripano fijas encapsuladas en glicerol. Cada punto utilizó 3 cultivos de hermana; las células se contaron en 5 campos visuales de cultivo, lente x 40. La tasa de supervivencia se calculó como porcentaje de control.

El efecto protector es más ilustrativo habiendo calculado el factor de eficacia de protección (PEF) de la fórmula:

$$\text{PEF} = (\text{No} - \text{N}_B) / \text{No} \cdot 100\%$$

donde: N₀: porcentaje medio de pérdida de neuronas debido a la influencia nociva (aquí, glutamato) en los cultivos de adición de H₂O; y N_B: porcentaje medio de la pérdida de neuronas en los cultivos de adición de la composición farmacéutica para neuronas. Este parámetro permite comparar las eficiencias de diferentes sustancias con diferentes modelos de isquemia.

Resultados del estudio

5 Serie 1. Los cultivos disociados de cerebelo consisten en neuronas y neurogliales. La población neuronal está representada por las células granulares, ya que las otras neuronas de cerebelo de mayor tamaño ya están diferenciadas al momento de disociación y, por lo tanto, no sobreviven al procedimiento. Las células granulares forman la clase más grande de neuronas cerebrales; son morfológicamente y neuroquímicamente homogéneos. Hasta el día 7 de cultivo, los receptores de glutamato se vuelven maduros. La exposición de 3 a 5 horas a la solución salina equilibrada con el tampón de glicina (GB), albúmina de suero bovino (BSA) y composición farmacéutica de 0,05 y 0,1 mg/ml añadida no ha llevado al cambio del número de neuronas vivas en comparación con el control .

10 El glutamato a 25, 37 y 50 μ M (15 minutos) provocó la muerte dependiente de la dosis de las células granulares cerebelares cultivadas murinas.

15 Para revelar los efectos protectores de diferentes sustancias, la muerte de las células inducida por glutamato no debe superar el 70%. Por lo tanto, el experimento neuroprotector usó la concentración de glutamato 25 μ M. Ambas composiciones farmacéuticas, de 0,1 y 0,05 mg/ml, mejoran el efecto protector, aumentando la tasa de supervivencia de las células granulares del cerebelo de 54,97 + 6,5% a 72,76 + 9,7%, respectivamente. Sin embargo, este efecto se expresa más en una concentración más baja.

En nuestro caso, para la composición farmacéutica de 0,05 mg/ml, REF = $(45,03-27,24)/45,03 \cdot 100\% = 39,51\%$; 0.1 mg/ml: REF = $(45,03-37,85)/45,03 \cdot 100\% = 15,94\%$.

20 El tampón de glicina y la albúmina de suero bovino añadida en el período posterior al glutamato no modificaron la toxicidad del glutamato. En conjunto, la primera serie experimental contó aproximadamente 2.000 células de 60 cultivos de hermanas.

25 Serie 2. La segunda serie usó las mismas técnicas y patrones experimentales que la primera, excepto que la composición farmacéutica usó dos concentraciones de 0,05 y 0,01 mg / ml, y se usó Cerebrolysin en las mismas concentraciones como fármaco de referencia. Los datos de cálculo de control muestran que la exposición de 3 a 4 horas a la solución salina equilibrada con el tampón de glicina 0,05 y 0,01 mg / ml, la composición farmacéutica y las adiciones de Cerebrolysin no han llevado al cambio del número de neuronas vivas en comparación con el control.

30 El glutamato a 25, 37 y 50 μ M (15 minutos) provocó la muerte dependiente de la dosis de las células granulares cerebelares cultivadas murinas. Para revelar los efectos protectores de diferentes sustancias, la muerte de las células inducida por glutamato no debe superar el 70%. Por lo tanto, el experimento neuroprotector usó la concentración de glutamato 25 μ M. La puntuación de las neuronas supervivientes dependientes de dosis similares observadas en función de la concentración de glutamato a 35 y 50 μ M indicó la saturación de los receptores. La composición farmacéutica tenía un efecto protector fiable, mejorando la tasa de supervivencia de las células granulares del cerebelo. Este efecto depende de la dosis: protección máxima en la concentración máxima del complejo proteico-polipeptídico biológicamente activo en la composición farmacéutica (0,05 mg / ml). Aquí, REF = $(45-20) / 45 \cdot 100\% = 55,6\%$.

35 Para 0,01 mg / ml: REF = $(45-36) / 45 \cdot 100\% = 20\%$

Las dosis probadas de Cerebrolysin no tuvieron un efecto protector confiable (REF = $(45-38) / 45 \cdot 100\% = 15,6\%$, para 0,05 mg / ml y REF = $(45-42) / 45 \cdot 100\% = 6,7\%$, para 0,01 mg / ml).

40 El tampón de glicina añadido al período posterior al glutamato incluso aumentó de algún modo (no fiable) la toxicidad del glutamato.

Afección protectora agregada de la composición farmacéutica a partir de la serie experimental:

45 Los resultados anteriores de experimentos individuales muestran que el efecto protector de la composición farmacéutica después de la exposición tóxica al glutamato es estable, reproducible de experimento a experimento. El medicamento en sí no ha mostrado ningún efecto tóxico en ningún experimento. Tasa de muerte de neuronas y factores de protección: 3 horas después de la exposición a glutamato 25 μ M se pierden 41,49 + 4% de neuronas; si después de la exposición al glutamato, la presencia en la solución salina de la composición farmacéutica de 0,5 o 0,1 mg / ml redujo la tasa de mortalidad de las neuronas cerebelosas cultivadas hasta los respectivos 30,88 + 4,3 y 21,98 + 4,37. Con esto, esta reducción de la toxicidad del glutamato en la introducción de la composición farmacéutica de 0,5 o 0.1 mg / ml después de la lesión fue confiable (n = 45, P <0,05, prueba de dos vías Anova con la prueba posterior de Benferroni). Además, para la composición farmacéutica de 0,1 mg / ml, la tendencia se expresó bien.

Factores de eficacia de protección (PEF) para diversas concentraciones:

REF (0,1 mg / ml) = $(41,49-30,88) / 41,49 \cdot 100\% = 25,57\%$;

55 REF (0,05 mg / ml) = $(41,49-21,23) / 41,49 \cdot 100\% = 48,83\%$;

y

$$\text{REF (0,01 mg / ml)} = (41,49-21,98) / 41,49 \cdot 100\% = 47,02\%.$$

Se debe observar que los resultados experimentales de toxicidad de glutamato superiores al 80% o inferiores al 30% se descuidaron.

- 5 Las dosis probadas de Cerebrolysin no tuvieron un efecto protector confiable (REF = (45-38) / 45 • 100% = 15,6%, para 0,05 mg / ml y REF = (45-42) / 45 • 100% = 6,7 %, para 0,01 mg / ml).

El tampón de glicina añadido después del período de glutamato incluso aumentó de algún modo (no fiable) la toxicidad del glutamato.

Ejemplo 10. Estudio de los mecanismos de efectos farmacológicos de la composición farmacéutica.

- 10 El efecto específico de la composición farmacéutica sobre la dinámica de las concentraciones de neurotransmisores excitadores e inhibidores se estudió in vitro, en fluido intercelular de cultivos de células granulares cerebelares de 7 días, bajo el efecto citotóxico del glutamato. Los medicamentos que afectan la liberación de glutamato (Lubelzil, BW619C89) son conocidos por ser neuroprotectores eficientes.

- 15 Técnica. El ensayo se tomó de 50 µl del medio de cultivo de células granulares de cerebelo, antes y después de la exposición tóxica de glutamato, y adición de composición farmacéutica, tampón de glicina-fosfato y / o solución fisiológica. Las muestras de medios resultantes se congelaron a 20°C, se codificaron y se enviaron al laboratorio para medir las concentraciones de neurotransmisores en la cromatografía líquida de alta eficacia con detección electroquímica. Se usó el LC-4B (BAS, EE.UU.) a un potencial de +850 mV en un electrodo de carbono de vidrio frente al electrodo de Ag / AgCl de referencia. El tampón de fosfato de sodio 0,05 M con EDTA 0,025 mM y acetonitrilo al 5% sirvió como fase móvil. Para obtener los aminoácidos, a 25 µl de perfundido, 25 µl de 0,01 mg / ml patrón interno de L-homoserina en 0,2 n de NaOH y 10 µl de agente # ftalal-dehidsulfito en tampón de borato 0,1 M (pH 9,5). Para el estándar, se usó la solución que contenía la mezcla de aminoácidos en una concentración de 0,01 mmol / l en 0,1 n de glutamato de HClO₄ en una concentración de 0,2 mg / ml en 0,1 n HClO₄. Después de la incubación de 15 minutos a 37°C, las mezclas se aplicaron sobre Agilent Hypersil ODS 5 µm, 4,6 x 250 (5 µl volumen en bucle) del cromatógrafo Agilent 1100 (EE.UU.). La concentración de aminoácidos se calculó con el software Chemstation Agilent (EE.UU.); el resultado final se expresó en nM / mg de tejido en 2 minutos.
- 20
- 25

Los resultados fueron analizados estadísticamente por el software Biostat, utilizando los criterios no paramétricos (prueba U de Wilcoxon-Mann-Whitney).

- 30 La fase móvil que consistía en KH₂PO₄ anhidro 0,069 M (Fluka), monohidrato de ácido cítrico 0,27 M (Fluka), sal de sodio de ácido etilendiaminotetraacético 0,27 mM (Sigma) y octilsulfonato de sodio 1,9 mM (reactivo de ion-pair) (Diapharm) fue preparado de la siguiente manera: el peso del lote se diluyó en 920 ml de agua desionizada, el pH se llevó a 3,15 (pH-340 pH-metro (ZIP)), luego se añadieron 80 ml, es decir, 1,528 M de acetonitrilo (Merck). La solución se filtró al vacío (microfiltro de 0,2 µm) a una presión de 20 a 40 mm de Hg. Antes de los experimentos bioquímicos, la fase móvil se desgasificó al vacío en 40 a 50 segundos con un tratamiento de baño ultrasónico simultáneo (Serga, Rusia).
- 35

Resultados: la composición farmacéutica de 0,05 y 0,1 mg confiable y aumentada de forma dependiente de la dosis del glutamato, glicina, ácido gamma-aminobutírico, taurina y liberación extracelular de aspartato (véase la Tabla).

Series experimentales	Neurotransmisores ensayados (µMol/l)				
	Asp ^p	Glu	Gly	GABA	Tu
Control	0,0008 + 0,00015	0,00014 + 0,00067	0,011 + 0,0048	0,00023 + 0,00013	0,038 + 0,0091
0,05 mg de composición farmacéutica	0,0011 + 0,00052	0,0003 + 0,000083	0,56 + 0,224	0,00047 + 0,0003	0,0635 + 0,029
0,1 mg de composición farmacéutica	0,0011 + 0,0005	0,00034 + 0,00012	0,702 + 0,39	0,0004 + 0,00022	0,075 + 0,034

(continuación)

Control con toxicidad por glutamato 25 µM	0,0009 + 0,0004	0,00021 + 0,00013	0,0516 + 0,0417	0,00021 + 0,00012	0,0457 + 0,02023
0,05 mg de composición farmacéutica con toxicidad por glutamato 25 µM	0,00075 + 0,000067	0,00027 + 0,00006	0,43341 + 0,22624	0,00037 + 0,00016	0,0651 + 0,01613
0,1 mg de composición farmacéutica con toxicidad por glutamato 25 µM	0,0007 + 0,00002	0,00026 + 0,000153	0,7398 + 0,24536	0,00056 + 0,00033	0,07977 + 0,017958

- 5 En la concentración de la composición farmacéutica de 0,05 mg, el nivel de liberación de neurotransmisores fue un 20% mayor ($p < 0,05$), en 0,1 mg, también el cierto aumento fue del 28%. Después de la toxicidad por glutamato 25 µM y de la composición farmacéutica de 0,05 mg y 0,1 mg, se observó el aumento de la dosis dependiente de GABA como neurotransmisor inhibidor; el mismo produjo el 90% y el 160%, respectivamente, en relación con el control ($p < 0,01$). Las concentraciones de taurina y glicina dependientes de la dosis crecieron al mismo nivel, con y sin toxicidad por glutamato. Los neurotransmisores excitadores, aspartato y glutamato, en la toxicidad del glutamato y la composición farmacéutica se redujeron al control del aspartato ($p < 0,05$) y se mantuvieron sin cambios con el glutamato, sin cierta distinción de su efecto sin toxicidad del glutamato.
- 10 Por lo tanto, el efecto fisiológico de la composición farmacéutica se mostró en las concentraciones más altas de glicina, glutamato, taurina y GABA. Esta intensidad del efecto dependía de la concentración de la composición farmacéutica, confiablemente más alta a 0,1 mg que a 0,05 mg.

Fuentes de información tomadas en cuenta:

1. Encyclopedía of Drugs, 2006, página 970.
- 15 2. Patente RF No 2128511(1999)
3. Patente RF No 2104702(1999)
4. Patente RF No 2049472(1999)
5. Guidelines for Experimental (Preclinical) Study of New Pharmacological Substances. Editor general: Prof. R.U. Khabriev, RAMS. 2° edición, revisado y corregido Moscú, OAO "Meditsina" Publishing House. 2005., página 131-170.
- 20 6. Methodological Guidelines. Carcinogenicity Assessment of Pharmacological Drugs. // Guidelines for Experimental (Preclinical) Study of New Pharmacological Substances. Editor general: Prof. R.U. Khabriev, RAMS. 2° edición, revisado y corregido Moscú, OAO "Meditsina" Publishing House. 2005., página 100-122.
- 25 7. Methodological Guidelines. Carcinogenicity Assessment of Pharmacological Drugs and Excipients in Short-Term Tests. // Guidelines for Experimental (Preclinical) Study of New Pharmacological Substances. Editor general: Prof. R.U. Khabriev, RAMS. 2° edición, revisado y corregido Moscú, OAO "Meditsina" Publishing House. 2005., página 131-170.
8. I.V. Silkina, T.S. Gan'shina, S.B. Seredinin, P.S. Mirzoyan. Enhancement of Blood Supply to Ischemic Brain Under Effect of Afobazol. J. Exp. and Clin. Pharmacology, 2004, volumen 67, No 5, página 9-13.
- 30 9. Smith M.L., Bendek G., Dahlgren N. et al., Models for studying, long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. A 2-vessel occlusion model. // Neurol. Scan., 1984, v.69, página 385 - 400.
10. Y.Wang-Fisher. Manual of Stroke Models in rats. CRC press, 2008, página 3-4.
11. Laboratory Animals Care and Keeping Program. Nursery for laboratory animals under Federal Institute of bioorganic chemistry, noviembre de 2005.

35 Aplicabilidad industrial

El efecto de la composición farmacéutica sobre el fondo del modelo de toxicidad del glutamato en comparación con el efecto fisiológico sin toxicidad del glutamato se manifestó en:

- 40 - reducción del nivel extracelular de aspartato;

- aumento significativo dependiente de la dosis del nivel de GABA;
- estabilización de las concentraciones de glicina y taurina; y
- tendencia al descenso del nivel de glutamato.

5 El efecto farmacológico de la composición farmacéutica (mayor tasa de supervivencia de células granulares en cultivo de células cerebelosas bajo efecto citotóxico de glutamato) se debe al efecto regulatorio del fármaco sobre los niveles de mediaciones excitatorias e inhibitoras, asegurando la protección necesaria de las neuronas contra el daño. El efecto más interesante de la acción de la composición farmacéutica sobre el cambio de grupo extracelular de aminoácidos es, además del crecimiento de la concentración de GABA, el aumento del nivel de taurina. Este aminoácido, que es un dador de grupos SH, aumenta el efecto del sistema glutatión-peroxidasa, mejorando así la

10 protección antioxidante de las membranas celulares de las neuronas. El modelo de toxicidad de glutamato utilizado permite evaluar el efecto de la composición farmacéutica sobre la dinámica de los niveles extracelulares de los neurotransmisores, incluidos el conjunto metabólico de aminoácidos y el conjunto sináptico (indirectamente). En otras palabras, el efecto neuroprotector de la composición farmacéutica se explica por la estabilización del nivel de glutamato, con la tendencia a la reducción debido tanto a la activación del componente inhibitor de la

15 neurotransmisión como a la disminución del derrame de los neurotransmisores excitadores.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central y periférico, de origen vascular, traumático, tóxico, hipóxico y autoinmune, en forma de solución para la administración parenteral, intranasal y subconjuntival; en la que el principio activo es el complejo proteico-polipeptídico biológicamente activo de 0,01 a 2,0 mg/ml con el efecto reparador específico del tejido sobre el tejido nervioso, obtenible del tejido cerebral embrionario rápidamente congelado de ganado de mediados del primer tercio hasta mediados del último tercio de la edad gestacional, complejo que contiene las proteínas y polipéptidos neutros débilmente ácidos con carga negativa en relación con el factor de crecimiento, factor de diferenciación, moléculas de señalización, que determinan su actividad biológica y farmacológica, con masas moleculares de 5 a 200 kDa, en la que al menos el 80% de la masa proteica total tiene la masa molecular de 10 a 120 kDa, y se **caracteriza por** un pico en la longitud de onda de 274-284 nm en el espectro UV-visible y bandas en el intervalo de 4,2 a 8,4 en enfoque isoeléctrico en un gel de poliacrilamida al 5%, y complejo que contiene un diluyente farmacéuticamente aceptable.
2. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el diluyente es una solución tampón oficial con excipientes, que incluyen compuestos de alto peso molecular, estabilizantes, conservantes y solubilizantes.