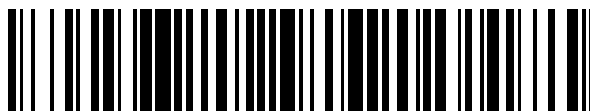


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 042**

51 Int. Cl.:

C07D 209/46 (2006.01)

A61K 31/4035 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2013 PCT/CN2013/083237**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2014 WO14040524**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2013 E 13836329 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2896611**

54 Título: **Uso de 3-n-butil isoindolina cetona en la preparación de fármacos para prevenir y tratar el infarto cerebral**

30 Prioridad:

14.09.2012 CN 201210341648

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

08.11.2018

73 Titular/es:

**SUN YAT-SEN UNIVERSITY (50.0%)
Xingangxi Road No.135, Haizhu District
Guangzhou, Guangdong 510275, CN y
ZHAO, CHUNSHUN, SCHOOL OF
PHARMACEUTICAL SCIENCES, SUN YAT-SEN
UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ZHAO, CHUNSHUN y
XU, WENKAI**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 689 042 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 3-n-butil isoindolina cetona en la preparación de fármacos para prevenir y tratar el infarto cerebral

5 La invención pertenece al campo de los compuestos farmacéuticos, y más particularmente al uso de 3-n-butil isoindolina cetona y una composición farmacéutica que comprende la misma en la preparación de fármacos para prevenir y tratar el infarto cerebral.

10 El infarto cerebral (CI), también conocido como accidente cerebrovascular isquémico cerebral (CIS), se refiere al reblandecimiento y la necrosis del tejido cerebral local que resulta de trastornos de la circulación sanguínea, isquemia e hipoxia. El CI se forma principalmente porque la aterosclerosis y la trombosis se producen en las arterias que suministran sangre al cerebro, lo que conduce a estenosis u oclusión de la luz y otros resultados en enfermedad aguda relacionada con insuficiencia cerebral focal, o debido a objetos anormales (sólido, líquido, gas) entran en las arterias cerebrales o las arterias carótidas que irrigan la circulación sanguínea cerebral a través de la circulación sanguínea, lo que provoca una oclusión vascular o una disminución aguda del flujo sanguíneo y causa además el ablandamiento y la necrosis de los tejidos cerebrales de las regiones controladas correspondientes.

15 CI es uno de los tres asesinos mortales que ponen en peligro la vida y la salud humanas y la clasificación después de las enfermedades cardíacas y cánceres. Además, la alta tasa de discapacidad (75%) en los pacientes con CI trae un gran sufrimiento a los pacientes, así como una gran carga financiera para sus familias. Por lo tanto, la búsqueda de fármacos ideales para tratar el CI ha sido uno de los enfoques en el campo de la medicina.

20 Actualmente, el tratamiento más eficaz reconocido para el CI isquémico agudo es la terapia trombolítica. Una preparación más comúnmente usada es un activador de plasminógeno de tipo tisular (rt-PA), pero la aplicación del mismo en el tratamiento tiene una alta probabilidad de hemorragia intracraneal y el precio de la misma es muy alto. Otras preparaciones neuroprotectoras presentan una eficacia clínica no tan buena y tienen efectos secundarios relativamente graves.

25 En la década de 1990, el famoso farmacólogo Feng Yipu desarrolló a través de incesantes esfuerzos un nuevo fármaco butilftalida, con un nombre comercial de NBP, para el tratamiento del CI isquémico agudo. El NBP ha sido el tercer fármaco químico en China que posee derechos de propiedad intelectual independientes después de la artemisinina y el biciclol. Se ha encontrado a partir de estudios del mecanismo farmacodinámico y los efectos farmacológicos que la butilftalida es un fármaco neuroprotector adaptado para mejorar el flujo sanguíneo cerebral, así como para bloquear una pluralidad de etapas patológicas de la isquemia cerebral. La butilftalida se origina a partir de plantas naturales y se ha encontrado por primera vez en el extracto de la semilla del apio acuático del sur y se ha sintetizado artificialmente posteriormente. Después de muchos ensayos clínicos, se ha demostrado que la butilftalida tiene buena eficacia, alta seguridad, comodidad en el uso y pocas reacciones adversas.

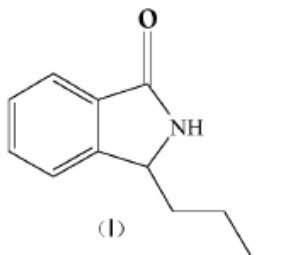
35 La butilftalida es un fármaco de isquemia anticerebral multifactorial y sus mecanismos de acción se presentan en los siguientes aspectos: 1. mejora de la función de la mitocondria, aumento de los niveles de NO y PGI2 del endotelio vascular cerebral e inhibición liberación de ácido glutámico. 2. Mejora del flujo sanguíneo cerebral local, la microcirculación cerebral y el agotamiento del metabolismo energético de la isquemia cerebral y el alivio de los síntomas de edema cerebral causados por la isquemia cerebral. 3. Reducción del contenido de ácido araquidónico y la concentración de calcio dentro de la célula, inhibiendo los radicales libres de oxígeno y mejora de las actividades de las enzimas antioxidantes. 4. Antitrombosis y agregación antiplaquetaria, mejorando el deterioro de la memoria de isquemia cerebral y el déficit neurológico, y reduciendo el área de CI. La patente china número de publicación CN1257706 A ha descrito el uso de butilftalida en la preparación de fármacos anti trombóticos antiplaquetarias. El documento EP 1679070 A1 y el número de publicación chino CN102008464 A han descrito el uso de L-butilftalida en la preparación de fármacos para prevenir y tratar el CI.

45 Aunque la butilftalida tiene una eficacia significativa en el tratamiento de CIS, solo se puede preparar en forma de preparación líquida soluble en aceite debido a sus características de líquido oleoso e insolubilidad en agua, lo que resulta en una gran limitación en los tipos de preparación de los mismos.

50 La invención proporciona un compuesto 3-n-butil isoindolina cetona que tiene una estructura similar a butilftalida, esto es, -O- está sustituido con -NH- pero la estructura bicíclica no se modifica, el producto de 3-n-butil isoindolina cetona obtenido es un sólido cristalino de color blanco que es beneficioso para cumplir los requisitos de las preparaciones. Debido a que el compuesto y la butilftalida son muy similares en estructura y peso molecular, se presume que el compuesto tiene una eficacia del fármaco similar a la butilftalida. Los estudios farmacodinámicos indican que la 3-n-butil isoindolina cetona tiene un efecto evidente en el tratamiento del CI causado por la isquemia cerebral local y no presenta una diferencia estadística significativa en la eficacia del tratamiento en comparación con la butilftalida. De este modo, el compuesto 3-n-butil isoindolina cetona está adaptado para mantener la eficacia en el tratamiento de la isquemia cerebral, así como para superar la escasez existente en las preparaciones de butilftalida, por lo que es de gran importancia en el tratamiento de enfermedades causadas por isquemia cerebral.

55

- 5 Para superar los problemas existentes en el uso de la butilftalida en la técnica anterior, uno de los objetivos de la invención es proporcionar el uso de un compuesto 3-n-butil isoindolina cetona representado por la fórmula I para prevenir o tratar la isquemia cerebral y para demostrar que el compuesto 3-n-butil isoindolina cetona no tiene una diferencia estadísticamente significativa en el tratamiento de la isquemia cerebral en comparación con la butilftalida a través de experimentos farmacodinámicos. Mientras tanto, debido a que el compuesto 3-n-butil isoindolina cetona tiene una estructura sólida cristalina, el compuesto tiene un amplio rango selectivo en preparaciones, superando así las limitaciones de la butilftalida en aspectos de preparación y tiene gran importancia en la producción industrial y disminuye el costo del medicamento.



- 10 Para lograr el objetivo anterior, se adopta la siguiente solución técnica de la invención:

La invención se refiere específicamente al uso de un fármaco o una composición farmacéutica que comprende 3-n-butil isoindolina cetona en el tratamiento de CI causada por isquemia local.

Los estudios muestran que, en comparación con la 3-n-butilftalida, la 3-n-butil isoindolina cetona no tiene diferencia estadística en el tratamiento de CIS.

- 15 El modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) en ratas se construye para observar la isquemia anticerebral de 3-n-butil isoindolina cetona. El modelo de MCAO se divide en tres grupos: 1) un grupo de control negativo, esto es, un aceite vegetal, 3 mL/kg; 2) grupo 3-n-butil isoindolina cetona, 30 mg/kg; 3) un grupo de control positivo, esto es, 3-n-butilftalida, 30 mg/kg. Todos los tres grupos se administran por inyección intraperitoneal. Se seleccionan ratas SD macho que tienen un peso de 250 g y se administran 15 minutos después de la isquemia.
- 20 Después de 2 horas de infarto cerebral y 24 horas de reperfusión, se preparan cortes de cerebro y se llevan a cabo con tinción TTC. La imagen de software J se usa para procesar resultados de tinción, calcular áreas de infarto y comparar los resultados entre diferentes grupos. Se sabe por los resultados que un área de infarto promedio del grupo blanco es 24.430%, el área de infarto promedio del grupo 3-n-butil isoindolina cetona es 14.365% y el área de infarto promedio del grupo butilftalida es 14.402%. Los resultados estadísticos indican que la 3-n-butil isoindolina cetona no tiene una diferencia estadísticamente significativa en la eficacia del tratamiento de la isquemia cerebral en comparación con la butilftalida.

- 25 Los resultados de la invención demuestran que la 3-n-butil isoindolina cetona tiene una buena eficacia en el tratamiento de la isquemia cerebral. Además, en comparación con la estructura líquida oleosa de butilftalida, la estructura sólida cristalina de 3-n-butil isoindolina cetona proporciona un rango selectivo más amplio en el campo de la preparación, proporciona la posibilidad de cambiar las formas de administración y es beneficioso para disminuir el costo farmacéutico y mejorar la eficiencia de fármacos. De este modo, la 3-n-butil isoindolina cetona tiene una gran perspectiva de aplicación.
- 30

- 35 La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende el compuesto 3-n-butil isoindolina cetona como componente activo y un excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable. En general, la composición farmacéutica contiene entre 0.1 y 95% en peso del compuesto 3-n-butil isoindolina.

La composición farmacéutica se puede preparar usando métodos bien conocidos en el campo técnico. Para tal fin, el compuesto 3-n-butil isoindolina cetona está adaptado para mezclarse con uno o una pluralidad de excipientes y/o adyuvantes de fármacos sólidos o líquidos si es necesario, preparando así los fármacos para humanos o animales en formas de administración o formas de dosificación adecuadas.

- 40 En los aspectos de la preparación, debido a que el compuesto 3-n-butil isoindolina cetona está en la morfología del cristal, el compuesto 3-n-butil isoindolina cetona o la composición farmacéutica que comprende el compuesto se puede preparar en formas de dosificación líquidas, formas de dosificación de gas, formas de dosificación semisólidas y formas de dosificación sólidas. Por ejemplo, las formas de dosificación líquidas comprenden: soluciones verdaderas, formas de dosificación en emulsión, formas de dosificación en suspensión, formas de dosificación de partículas y forma de dosificación coloidal. Las formas de dosificación de gases comprenden:
- 45 aerosoles, pulverizaciones e inhalaciones de polvo seco. Las formas de dosificación semisólidas comprenden: pastas orales, pastas usadas externamente y pastas. Las formas de dosificación sólidas comprenden: comprimidos, cápsulas, píldoras de caída, píldoras, polvo, supositorios, gránulos, polvo liofilizado y similares.

El compuesto 3-n-butil isoindolina cetona y la composición farmacéutica que comprende el mismo se administran en forma de la dosis unitaria. La administración se realiza a través de vías enteral o parenteral, tales como administración oral, intramuscular, subcutánea, nasal, de la mucosa oral, de la piel, del peritoneo y del recto.

- 5 Las rutas de administración del compuesto 3-n-butil isoindolina cetona y la composición farmacéutica que comprende el mismo son aplicables para administración por inyección, que incluye inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección subcutánea, inyección intradérmica e inyección de punto de acupuntura.

El compuesto 3-n-butil isoindolina cetona y la composición farmacéutica que comprende el mismo se preparan en preparaciones comunes, o en preparaciones de liberación sostenida, sistemas de suministro en seco objetivo, y otros sistemas de suministro de partículas.

- 10 Para hacer las formas de dosificación unitarias en comprimidos, se puede usar ampliamente una pluralidad de portadores conocidos en el campo técnico. Los portadores comprenden: diluyentes y absorbentes, tales como almidón, dextrina, sulfato de calcio, lactosa, manitol, sacarosa, cloruro de sodio, glucosa, urea, carbonato de calcio, caolín, celulosa microcristalina y silicato de aluminio, etc.; agentes humectantes y adhesivos, tales como agua, glicerol, polietilenglicol, etanol, propanol, pasta de almidón, dextrina, jarabe, miel, solución de glucosa, goma arábica, gelatina, carboximetilcelulosa de sodio, goma laca, metilcelulosa, fosfato de potasio y polivinilpirrolidona, etc.; agentes desintegrantes, tales como almidón seco, alginato, agar en polvo, almidón de alginato, bicarbonato de sodio y ácido cítrico, carbonato de calcio, ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán, dodecilsulfonato de sodio, metilcelulosa y etilcelulosa, etc.; inhibidores de la desintegración, tales como sacarosa, triestearato de glicerol, manteca de cacao, aceite hidrogenado, etc.; aceleradores de la absorción, tales como sales de amonio cuaternario y dodecilsulfato de sodio, etc.; y lubricantes, tales como talco, sílice, almidón de maíz, sales de ácido esteárico, ácido bórico, parafina líquida, polietilenglicol y similares. Los comprimidos también se pueden preparar en comprimidos recubiertos, tales como comprimidos recubiertos de azúcar, comprimidos recubiertos con película, comprimidos con recubrimiento entérico, o comprimidos de doble capa y comprimidos multicapa.

- 25 Por ejemplo, para hacer las formas de dosificación unitarias en píldoras, se puede adoptar ampliamente una pluralidad de portadores conocidos en el campo técnico. Los portadores para píldoras comprenden: diluyentes y absorbentes, tales como glucosa, lactosa, almidón, manteca de cacao, aceite vegetal hidrogenado, polivinilpirrolidona, caolín, talco, etc.; adhesivos, tales como goma arábica, tragacanto, gelatina, etanol, miel, glucosa líquida, pasta de arroz o panada, etc.; y agentes disgregantes, tales como agar en polvo, almidón seco, alginato, dodecilsulfonato de sodio, metilcelulosa y etilcelulosa, etc.

- 30 Por ejemplo, para hacer las formas de dosificación unitaria en cápsulas, se mezclan el componente eficaz 3-n-butil isoindolina cetona y los portadores anteriores, y una mezcla resultante se encapsula en cápsulas de gelatina dura o cápsulas blandas. O bien, el componente eficaz 3-n-butil isoindolina cetona se transforma en microcápsulas y se suspende en soluciones acuosas para formar suspensiones, o encapsularse en cápsulas duras, o convertirse en inyectables para su aplicación.

- 35 Por ejemplo, para hacer las formas de dosificación unitaria en preparaciones para inyección, tales como soluciones, suspensiones, emulsiones, polvo secado en seco, tales preparaciones pueden ser acuosas o no acuosas y comprenden una y/o una pluralidad de portadores, diluyentes, adhesivos, lubricantes, conservantes, surfactantes o dispersantes farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, los diluyentes se pueden seleccionar entre agua, etanol, polietilenglicol, 1,3-propilenglicol, alcoholes isoestearílicos etoxilados, alcoholes isoestearílicos multioxidados y ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán. Además, para preparar inyecciones isotónicas, se puede añadir una dosis adecuada de cloruro de sodio, glucosa o glicerol a las preparaciones de inyección. Además, también se pueden añadir cosolventes convencionales, soluciones reguladoras, agentes de ajuste del pH. Tales adjuntos se usan comúnmente en el campo técnico.

- 45 Además, si es necesario, se pueden añadir colorantes, conservantes, perfumes, agentes aromatizantes, edulcorantes u otros materiales a las preparaciones de fármacos.

Para lograr el objetivo de la administración y mejorar la eficacia del tratamiento, el fármaco o la composición farmacéutica de la invención se puede administrar mediante cualquier método conocido.

- 50 La dosis de la composición farmacéutica que comprende el compuesto 3-n-butil isoindolina cetona se determina por una pluralidad de factores, por ejemplo, la naturaleza y la gravedad de la enfermedad que se va a prevenir o tratar, el sexo, la edad, el peso, temperamento y respuesta individual de los pacientes o animales, la ruta de administración, los tiempos de administración y el propósito del tratamiento. De este modo, la dosis terapéutica de la composición farmacéutica puede variar dentro de un amplio intervalo. En general, las personas expertas en el arte conocen dosis de ingredientes farmacéuticos y se pueden ajustar adecuadamente según la dosis de los ingredientes reales contenidos en la preparación final de la composición que comprende el compuesto 3-n-butil isoindolina cetona, alcanzando así la cantidad eficaz para el tratamiento y la realización del propósito para la prevención o el
- 55 tratamiento. Una dosis apropiada del compuesto 3-n-butil isoindolina cetona es preferiblemente entre 0.1 y 100 mg por kg de peso por día, y más preferiblemente 0.1-100 mg/día/persona. La dosis anterior puede estar en forma de

una forma de dosis única o dividirse en varias formas, por ejemplo, dos, tres o cuatro dosis, que está limitada por la experiencia clínica de los médicos y otros métodos de administración que aplican otros medios de tratamiento.

5 Una dosis total requerida para cada tratamiento se puede dividir en varias veces o una vez administrada la dosis. El compuesto o la composición que comprende el mismo se puede administrar solo, o administrar junto con otros fármacos de tratamiento o fármacos sintomáticos con dosis ajustadas.

La invención se describe en detalle a continuación en combinación con ejemplos, y se debe observar que los siguientes ejemplos no pretenden limitar la invención.

La figura 1 es una imagen digital que muestra los resultados de tinción de los cortes de cerebro de ratas después de 2 horas de MCAO y 24 horas de reperusión en un grupo de control blanco;

10 La figura 2 es una imagen digital que muestra los resultados de tinción de los cortes de cerebro de ratas después de 2 horas de MCAO y 24 horas de reperusión en un grupo de 3-n-butil isoindolina cetona;

La figura 3 es una imagen digital que muestra los resultados de tinción de cortes de cerebro de ratas después de 2 horas de MCAO y 24 horas de reperusión en un grupo butilftalida;

15 La figura 4 es un diagrama de bloques que muestra los puntajes de comportamiento de un grupo control blanco, un grupo 3-n-butil isoindolina cetona y un grupo butilftalida; y

La figura 5 es un diagrama de bloques que muestra los porcentajes de área de infarto de un grupo control blanco, un grupo 3-n-butil isoindolina cetona y un grupo butilftalida.

Ejemplo 1 Preparación de comprimidos de 3-n-butil isoindolina cetona

Prescripción	
3-n-butil isoindolina cetona	20 g
Almidón	20 g
Etanol (50% en v)	Cantidad apropiada
Carboximetilalmidón de sodio	3 g
Estearato de magnesio	0.3 g
200 comprimidos	

20 La 3-n-butil isoindolina cetona se recoge con un peso exactamente constante según la prescripción, se muele en polvo y se criba mediante un tamiz de malla 100. El almidón se recoge con un peso exactamente constante y se criba con un tamiz de malla 100. La 3-n-butil isoindolina cetona y el almidón después del cribado se mezclan uniformemente, y se añade una cantidad apropiada de 50% en v de etanol a la mezcla resultante para preparar una masa húmeda. Se usa un tamiz de nailon de malla 18 para la granulación. Los gránulos se secan a una temperatura de entre 60 y 70°C. El tamiz de malla 18 se usa luego para dar forma a los gránulos. Después de eso, se añaden carboximetilalmidón de sodio y estearato de magnesio y se mezclan uniformemente. Una prensa de Φ 8 mm se usa para preparar comprimidos.

25

Ejemplo 2 Preparación de cápsulas duras de 3-n-butil isoindolina cetona

Prescripción	
3-n-butil isoindolina cetona	20 g
Almidón	20 g
Etanol (50% en v)	Cantidad apropiada
Carboximetilalmidón de sodio	3 g
Estearato de magnesio	0.3 g
200 cápsulas	

El método de granulación en húmedo en este documento es el mismo que en el ejemplo 1. La 3-n-butil isoindolina cetona se recoge con un peso exactamente constante según la prescripción, se muele en polvo y se criba con un tamiz de malla 100. El almidón se recoge con un peso exactamente constante y se criba con un tamiz de malla 100. La 3-n-butil isoindolina cetona y el almidón después del cribado se mezclan uniformemente, y se añade una cantidad apropiada de 50% en v de etanol a la mezcla resultante para preparar una masa húmeda. Se usa un tamiz de nailon de malla 18 para la granulación. Los gránulos se secan a una temperatura de entre 60 y 70°C. El tamiz de malla 18 se usa para dar forma a los gránulos. Después de eso, se miden los contenidos de los ingredientes y los gránulos calificados se encapsulan en las cápsulas número 1.

Ejemplo 3 Preparación de cápsulas blandas de 3-n-butil isoindolina cetona

Se recogen 1 g de 3-n-butil isoindolina cetona preparada, 10 g de aceite vegetal, 1 g de ésteres de poliglicerol y se mezclan uniformemente en un molino de bolas para preparar el contenido que se va a encapsular en las cápsulas blandas. La gelatina, el glicerol, el agua y el opacificador en una proporción de 1:0.4:0.8:0.01 se recogen como materia prima para fabricar las cápsulas. El método de moldeo por compresión se adopta para preparar las cápsulas blandas. Las cápsulas blandas se solidifican y se secan con aire frío, y se lavan y se secan mediante solventes apropiados, y se preparan 100 gránulos de las cápsulas blandas.

Ejemplo 4 Preparación de polvo secado en seco de 3-n-butil isoindolina cetona

Se recoge 1 g de 3-n-butil isoindolina cetona preparada y se disuelve en 800 mL de agua para inyección. Luego se agregan 6 g de manitol. Después de la disolución completa, se añade el agua para inyección hasta que la solución resultante alcance los 1000 mL. La solución resultante se descarboniza con carbón activo y se hace pasar a través de una membrana microporosa y luego se dispensa en frascos de penicilina de 7 mL con cada frasco que contiene 4 mL. Luego se colocan los tapones de los frascos. Los frascos de penicilina luego se secan y se tapan. Una especificación de los mismos es 4 mg del polvo secado en seco de 3-n-butil isoindolina cetona para cada frasco.

Ejemplo 5 Preparación de inyecciones de 3-n-butil isoindolina cetona

Se añaden 1 g de 3-n-butil isoindolina cetona preparada y 9 g de cloruro de sodio con 900 mL de agua para inyección, y se ajusta un valor de pH de la mezcla resultante para que esté entre 6.5 y 7.2. Se añaden 3 g de carbón de aguja, se agita uniformemente y se hierve durante 15 minutos. Una solución caliente resultante se filtra con un papel de filtro para eliminar el carbón y se filtra finamente mediante una membrana microporosa de 0.22 µm. El agua para inyección se añade hasta que la solución resultante alcanza los 1000 mL. Después de eso, se examina la claridad de la solución y se dispensa una solución calificada en ampollas de 5 mL. Las ampollas se sellan por fusión y luego se esterilizan a presión a la temperatura de 110°C, durante 30 minutos.

Ejemplo 6 Influencia de la 3-n-butil isoindolina cetona sobre el volumen del infarto en modelos MCAO de ratas

1) Construcción de modelos de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) de ratas

Se seleccionan ratas SD macho que tienen un peso de entre 250 y 270 g. Las ratas macho SD se cultivan a una temperatura ambiente de 25°C y están restringidos de ingesta de alimentos, excepto agua 12 horas antes de la operación. Los modelos MCAO están contruidos según el método Longa o similares. 10% de hidrato de cloral se usa para anestesiarse a las ratas mediante inyección intraperitoneal con una dosis de 350 mg/kg. La rata se fija entonces hacia arriba en una placa de rata en posición supina y se ilumina con una lámpara incandescente para mantener una temperatura corporal de la misma a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Los pelos de la rata en la posición media del cuello se cortan, y la piel en dicha posición se incide después de la desinfección. La arteria carótida común (CCA), la arteria carótida externa (ECA) y la arteria carótida interna (ICA) del lado derecho se separan cuidadosamente. La ECA se corta, y un extremo cortado se endereza y alinea con el ICA, y luego se inserta un hilo desde allí. El hilo se inserta para una profundidad de aproximadamente 19.0 ± 0.5 mm. Después de 2 horas, se saca una parte del hilo para realizar la reperusión. La rata después de la ligadura de la sutura se vuelve a colocar en la jaula de la rata. Después de 24 horas de reperusión, se preparan cortes de cerebro para la tinción.

2) Agrupación y administración

Las ratas se dividen en tres grupos con 10 en cada grupo: 1) un grupo de control blanco, esto es, un aceite vegetal, 3 mL/kg; 2) grupo 3-n-butil isoindolina cetona, 30 mg/kg; 3) un grupo de control positivo, esto es., 3-n-butiltalida, 30 mg/kg. Todos los tres grupos se administran con fármacos por inyección intraperitoneal 15 minutos después del modelado.

3) Evaluación neuroconductual

De acuerdo con la evaluación de Zea Longa, la observación de la etología se lleva a cabo después de 2 horas de modelado y 24 horas de reperusión y antes de matar a las ratas. Se agarra la cola de la rata para levantar la rata a aproximadamente 1 pie del suelo para observar la condición de la extremidad anterior izquierda. La rata se coloca

en un suelo plano, y los hombros derecho e izquierdo de la rata se empujan desde el lado derecho y el lado izquierdo, respectivamente, para comparar la diferencia en las fuerzas de resistencia de los dos lados. La rata se coloca en el suelo plano para actividades libres, y se observan las condiciones de marcha de la rata. Se adopta el método de puntaje de cuatro etapas (puntajes de 0-5), y cuanto más alto es el puntaje, más grave es el daño neuroconductual.

1. Si el comportamiento es completamente normal, se registra una puntuación de 0.

2. Levante la cola de la rata del suelo, si la rata se pone en posición prona en la extremidad anterior de un lado opuesto de la operación, se registra la puntuación de 1.

3. Coloque la rata en el suelo, use la mano para empujar los dos lados de la misma para examinar las fuerzas de resistencia, y si la fuerza de resistencia del lado opuesto de la operación disminuye, se registra la puntuación de 2.

4. Coloque la rata en el suelo y observe su caminar, y si la rata gira alrededor del lado opuesto de la operación, se registra una puntuación de 3.

5. Si el daño es muy grave, la rata no puede realizar ninguna actividad independiente, se registra la puntuación de 4.

Cuanto más alta es la puntuación, más serio es el daño cerebral, como resultado, en este documento, demasiado débil o demasiado serio no se puede elegir el daño como el modelo de prueba final. Un modelo estándar satisface que el resultado de la evaluación neuroconductual 2 horas después del modelado y antes de retirarse del hilo es una puntuación de 3, esto es, se pueden observar comportamientos circundantes obvios.

Después de 24 horas de reperfusión de los modelos MCAO de las ratas, la evaluación neuroconductual se lleva a cabo en las ratas de nuevo, y se registran los resultados.

4) Medición y cálculo del área del infarto cerebral

Después de 24 horas de reperfusión, los cerebros se recogen de ratas muertas y se colocan en placas de Petri. Los tejidos del cerebro se recogen rápidamente y se colocan en un refrigerador a una temperatura de -20°C, durante 20 min y se retiran. Se extirpa el bulbo olfatorio, el cerebelo y el tallo cerebral inferior, y luego se corta el cerebro restante cinco veces con un intervalo de 2 mm, con lo que se forman seis cortes coronarios coronales consecutivos. Se añade una solución de colorante TTC al 2% a las placas de Petri para sumergir el corte del cerebro en la solución. Las placas de Petri se colocan a la temperatura de 37°C y se incuban en ausencia de luz durante entre 25 y 30 minutos durante los cuales los cortes de cerebro se vuelcan una vez cada 5 min. Después de la tinción con TTC de los cortes de cerebro, un tejido normal de las mismas se presenta rojo y una región isquémica presenta de color blanco. Cuando finaliza la tinción TTC, la solución de colorante TTC se elimina de las placas de Petri mediante jeringas. Luego se añade solución de formalina con una cantidad que permite sumergir los cortes de cerebro, y las placas de Petri se colocan en la oscuridad. Después de 24 horas, se sacan cortes de cerebro solidificados y se ordenan en un fondo azul para tomar fotografías. Imagen del software del sistema de análisis de imagen J se usa para procesar las imágenes, y se calculan un área de infarto y un área total del corte de cerebro, respectivamente, y el porcentaje de infarto cerebral se deriva usando la ecuación: porcentaje de infarto cerebral (%) = (área de infarto/área total del corte de cerebro) X 100%. Debido a que cada corte tiene el mismo grosor de 2 mm, el área del infarto es capaz de representar el volumen del infarto en cierto grado.

5) Resultados del experimento

Se sabe a partir de los resultados de la evaluación neuroconductual que, en el grupo de control del solvente, las ratas registradas con la puntuación de 0 no existen, mientras que las ratas registradas con la puntuación de 2 o la puntuación de 3 son las predominantes. Aquellas ratas que se colocan en la posición prona en los miembros anteriores cuando se levantan y presentan disminuyen las fuerzas de resistencia en el lado opuesto de la oposición al enfrentarse a las fuerzas de empuje externas se registran con la puntuación 2. Las ratas que presentan un comportamiento circulatorio tienen una puntuación de 3. Algunas ratas que presentan síntomas relativamente serios y se paralizan en el suelo se registran con la puntuación 4. Los datos experimentales son procesados linealmente por el software estadístico SPSS17.0 y el análisis de varianza de un factor (ANOVA) se usa para examinar las diferencias neuroconductuales entre los grupos, lo que indica que el grupo 3-n-butil isoindolina cetona tiene una diferencia significativa ($P = 0.003 < 0.01$) en el alivio del comportamiento neurológico en comparación con el grupo control blanco y no tiene una diferencia significativa ($P = 0.384 > 0.05$) comparado con el grupo butilftalida, y que el grupo butilftalida tiene una diferencia significativa en el alivio del comportamiento neurológico en comparación con el grupo control blanco ($P = 0.031 < 0.05$). Los resultados de la evaluación neuroconductual demuestran que la 3-n-butil isoindolina cetona tiene una cierta eficacia en el alivio de los síntomas causados por la isquemia cerebral local en ratas, y la eficacia de alivio de la 3-n-butil isoindolina cetona es incluso ligeramente mejor que la de butilftalida. Esta conclusión es coincidente con los resultados de tinción de los cortes de cerebro, y además indica que la mejora en la eficacia del fármaco en el comportamiento neurológico está en correlación paralela con el efecto de reducir el área del infarto.

La influencia de la 3-n-butil isoindolina cetona sobre el volumen del infarto cerebral se ilustra en las imágenes adjuntas de los resultados del experimento.

5 El área de infarto y el área total de los cortes de todos los grupos se recogen mediante la imagen J para calcular el porcentaje de infarto. Ha demostrado que la eficacia de la 3-n-butil isoindolina cetona para reducir la región del infarto es muy obvia y es incluso mejor que el grupo de control positivo de butilftalida. Comparado con el grupo de control de solvente, el volumen de infarto del grupo de 3-n-butil isoindolina cetona se reduce en un 41.199%, presentando así un efecto obvio. Los efectos de la reducción de las regiones de infarto de los tres grupos se comparan usando el método ANOVA de un factor, y de las comparaciones se deduce que el grupo 3-n-butil isoindolina cetona tiene una diferencia significativa ($P < 0.001$) en el área reducida del infarto en comparación con el grupo control blanco, y la diferencia entre el grupo 3-n-butil isoindolina cetona y la butilftalida no tiene significación estadística ($P = 0.989$). La butilftalida también tiene una diferencia significativa ($P < 0.01$) en el área de infarto reducido en comparación con el grupo control blanco.

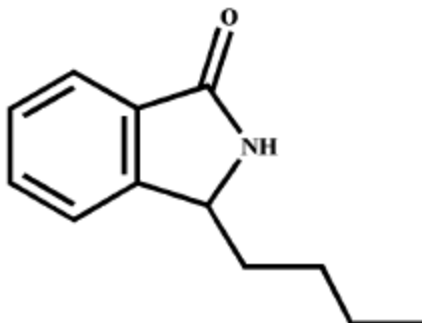
10

Los resultados anteriores demuestran que la 3-n-butil isoindolina cetona tiene un cierto efecto terapéutico sobre el infarto cerebral de isquemia y tiene gran importancia en el tratamiento del infarto cerebral clínico.

15

REIVINDICACIONES

1. Compuesto representado por la fórmula I para uso en la prevención o el tratamiento del infarto cerebral.



(I)

- 5 2. El compuesto representado por la fórmula I, para uso según la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto es (\pm) 3-n-butil isoindolina cetona, (+) 3-n-butil isoindolina cetona o (-) 3-n-butil isoindolina cetona.
3. El compuesto representado por la fórmula I, para uso según la reivindicación 1, caracterizado porque el infarto cerebral es causado por isquemia local.
4. El compuesto representado por la fórmula I, para uso según la reivindicación 1, caracterizado porque una dosis terapéuticamente eficaz del compuesto está entre 0.1 y 100 mg por kg por día.
- 10 5. Una composición farmacéutica para uso en la prevención o tratamiento de infarto cerebral, comprendiendo la composición farmacéutica:
- a) una dosis terapéuticamente eficaz del compuesto representado por la fórmula I de la reivindicación 1; y
 - b) un portador farmacéutico o un excipiente.
- 15 6. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 5, caracterizada porque la composición farmacéutica está en formas de dosificación de comprimidos, cápsulas, inyecciones, gránulos, píldoras, polvos, preparaciones de liberación modificada, preparaciones de liberación sostenida y sistemas de administración de partículas.

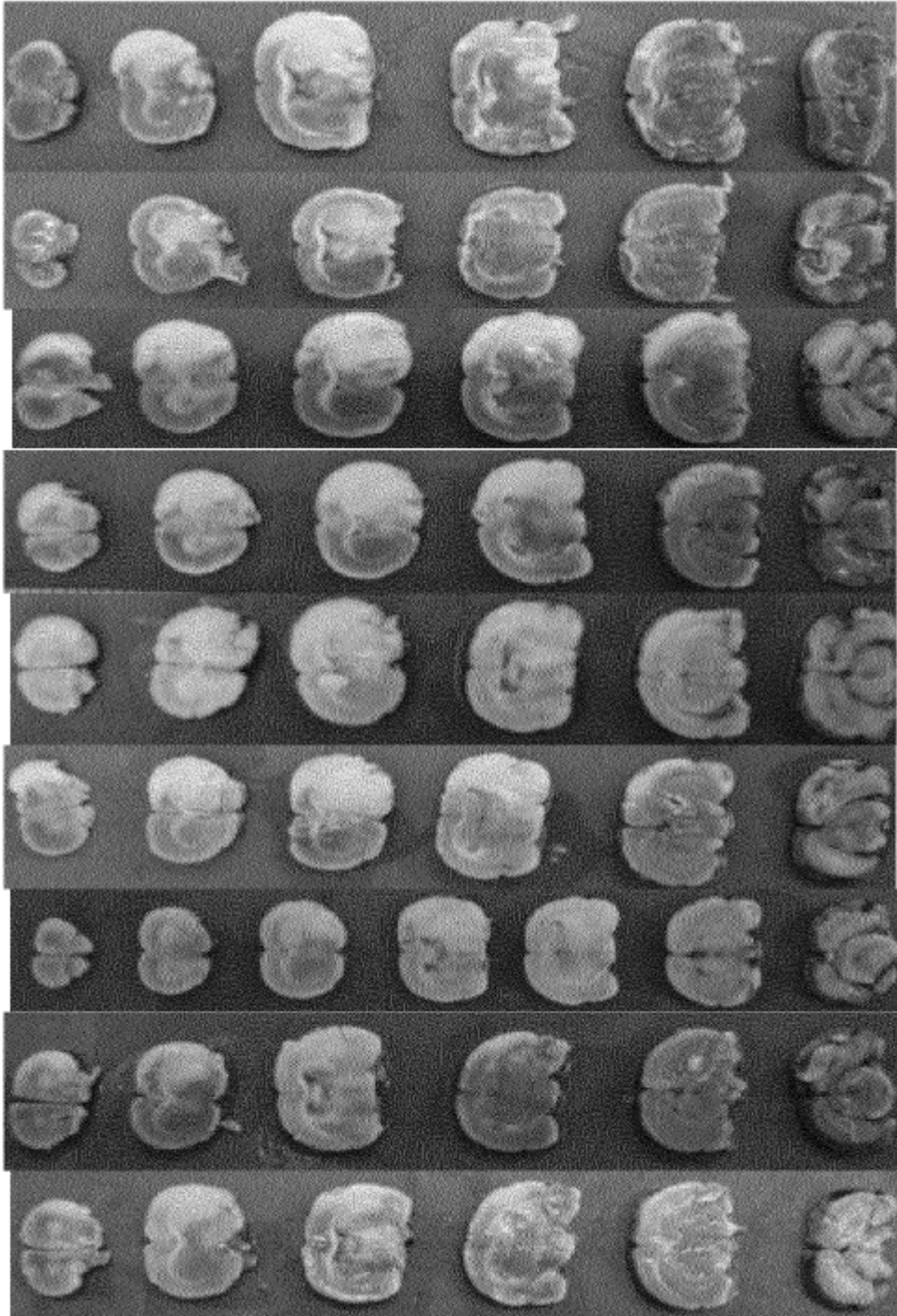


FIG. 1

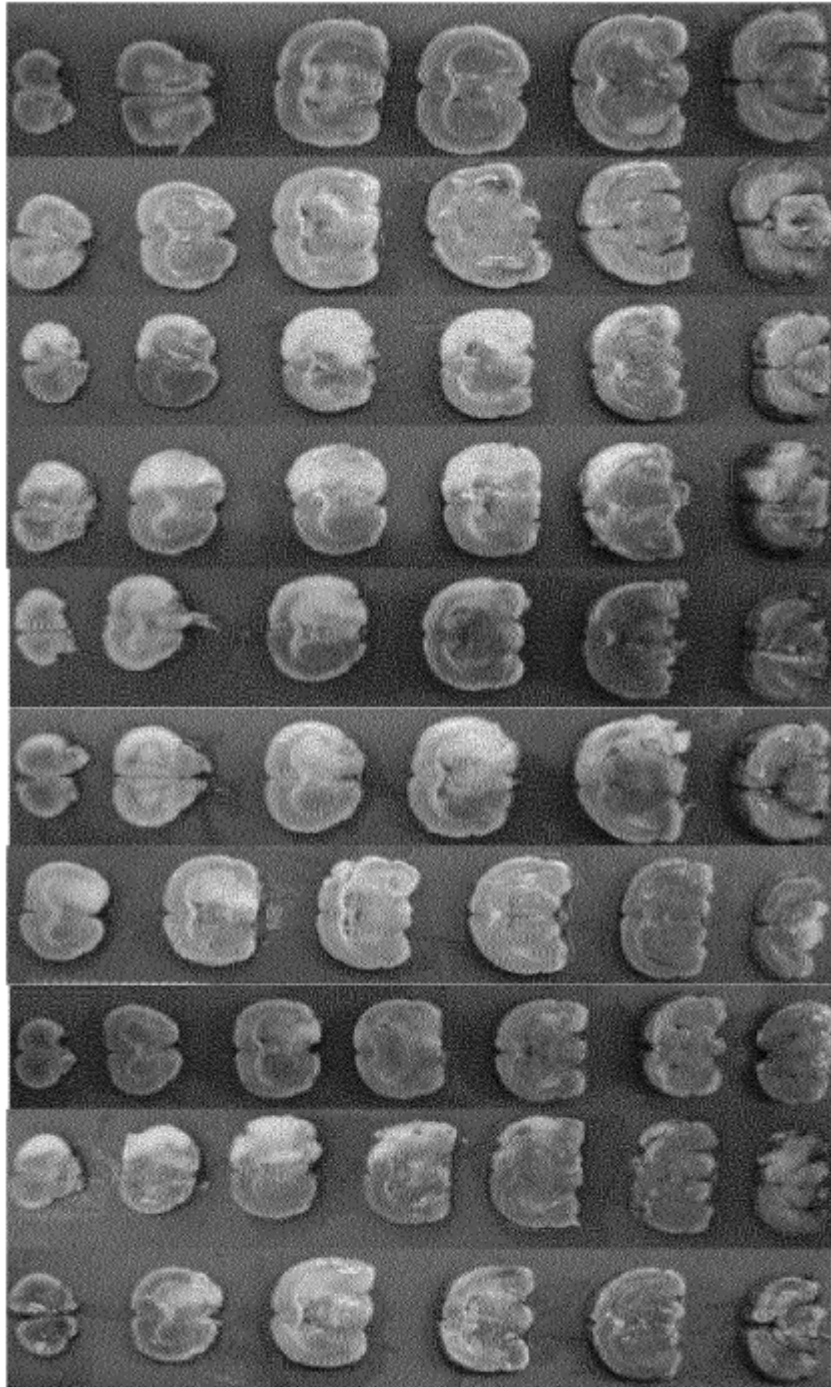


FIG. 2

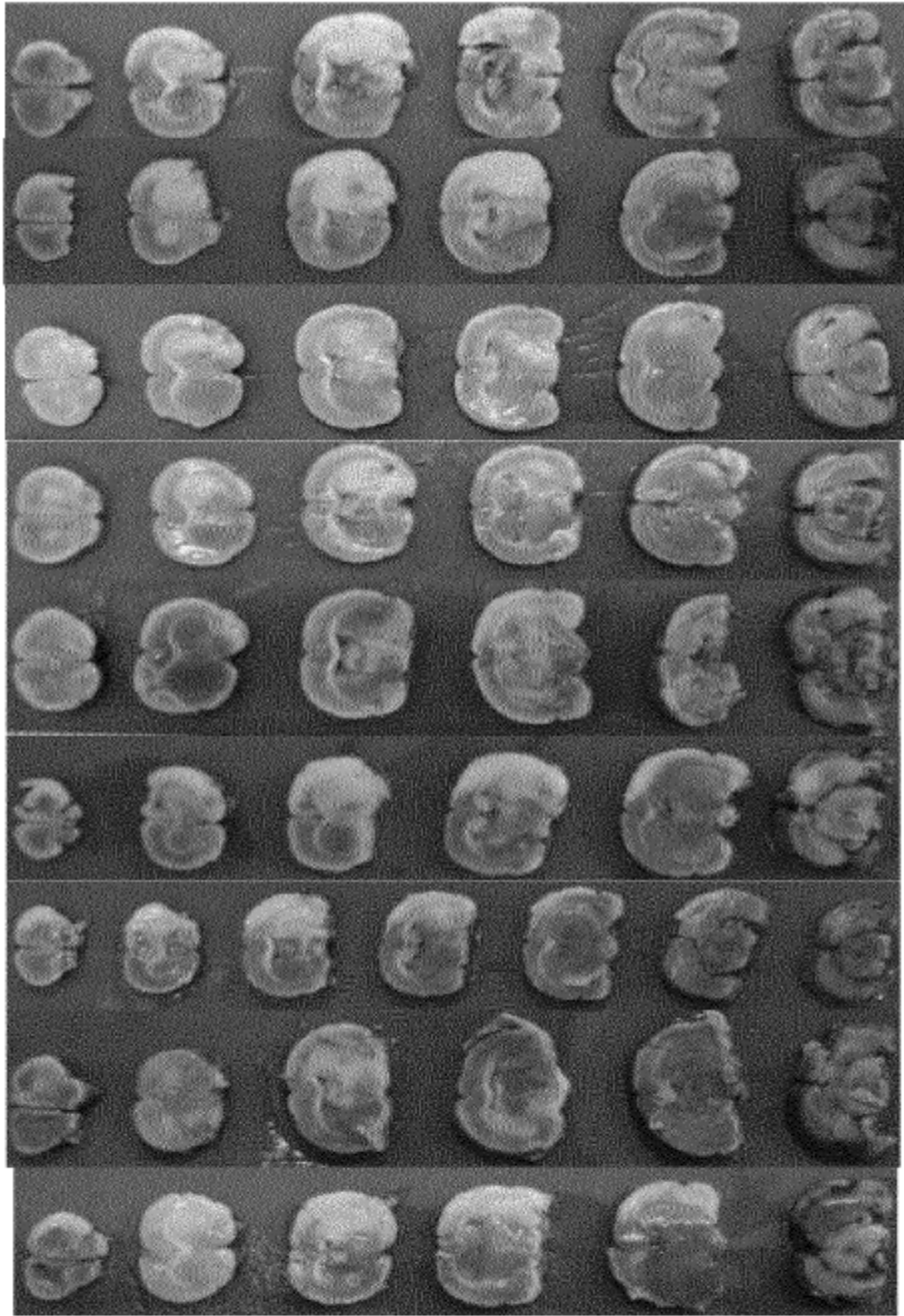


FIG. 3

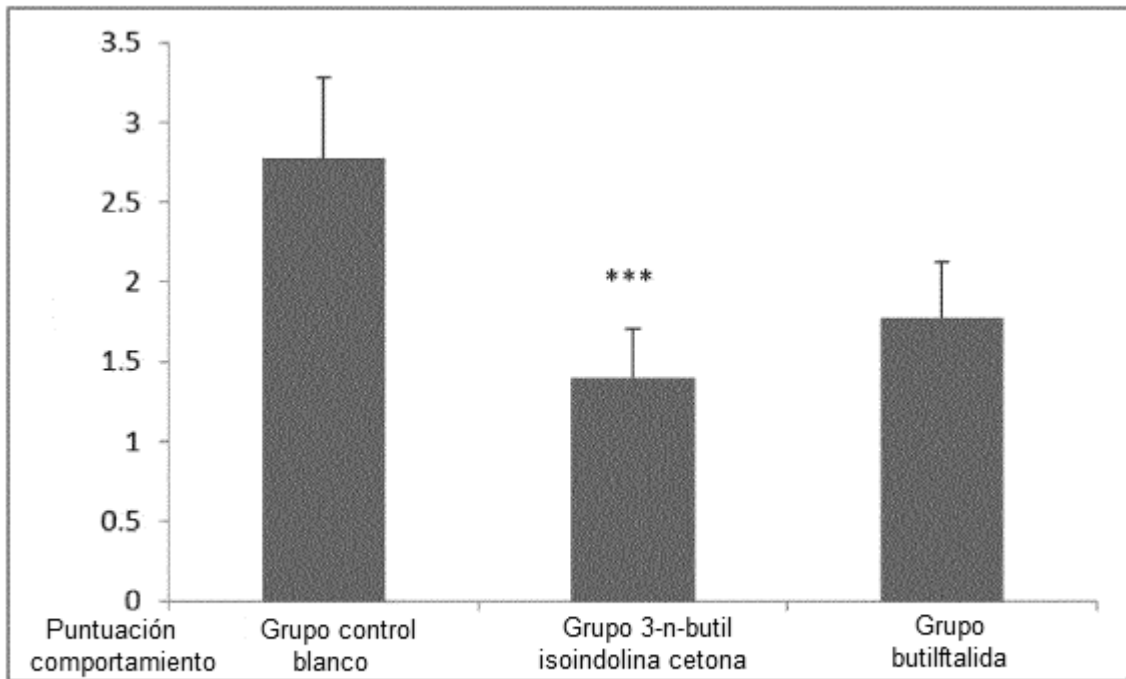


FIG. 4

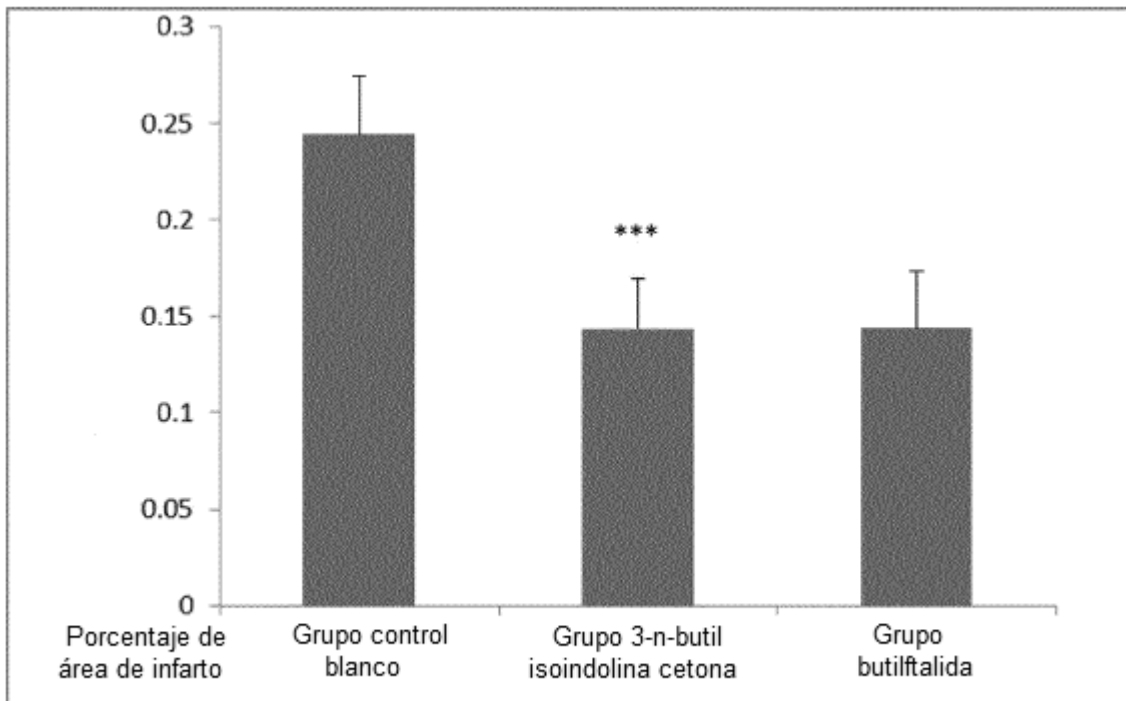


FIG. 5