

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 878**

51 Int. Cl.:

A61K 36/882	(2006.01)	A61K 36/69	(2006.01)
A61K 36/236	(2006.01)	A61K 36/736	(2006.01)
A61K 36/232	(2006.01)		
A61K 36/481	(2006.01)		
A61P 25/00	(2006.01)		
A61P 13/00	(2006.01)		
A61P 9/00	(2006.01)		
A61K 36/286	(2006.01)		
A61K 36/537	(2006.01)		
A61K 36/65	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2013 PCT/SG2013/000118**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013 WO13141818**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2013 E 13764190 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 2838545**

54 Título: **Composición neuroprotectora que comprende Poligalae, Astrágalos, Chuanxiong y Angelicae Sinensis**

30 Prioridad:

23.03.2012 US 201261614698 P
15.03.2013 US 201361790851 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.06.2020

73 Titular/es:

MOLEAC PTE LTD. (100.0%)
11 Biopolis Way Helios No. 09-08
Singapore 138667, SG

72 Inventor/es:

MOHA OU MAATI, HAMID;
LAZDUNSKI, MICHEL;
HEURTEAUX, CATHERINE y
PICARD, DAVID

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 765 878 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 neuroprotectora que comprende *Poligalae*, *Astrágalos*, *Chuanxiong* y *Angelicae Sinensis*

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al uso de componentes de la Medicina Tradicional China (TCM) para la activación de canales de potasio sensibles al ATP (canales K_{ATP}).

No se admite que ninguno de los diversos documentos, etc. citados en este texto sean parte del estado de la técnica referido a la presente invención.

Introducción

10 El MLC 601 (NeuroAid) muestra resultados prometedores en la recuperación de los pacientes después de sufrir accidentes cerebrovasculares (Chen et al., 2009). Combina 9 hierbas y 5 componentes animales. Una fórmula simplificada del MLC601, llamada MLC901 (NurAid II, Neuroaid II o Neuroaid2), basada en sus 9 componentes herbarios, también está disponible en la actualidad. El tratamiento con MLC-601 se utiliza hoy día en varios países, tanto en Asia como en Oriente Medio, para pacientes que han padecido un accidente cerebrovascular. Un estudio multicéntrico, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo para investigar la Eficacia de MLC601 proveniente de la Medicina CHIna en la en la recuperación por Accidentes Cerebrovasculares (CHIMES, por sus siglas en inglés) está vigente actualmente en Asia (Venketasubramanian et al., 2009). La seguridad del MLC601 en la hemostasis, hematología y bioquímica se ha establecido tanto en sujetos normales como en pacientes con accidente cerebrovascular (Gan et al., 2008; Young et al., 2010). Su aparente eficiencia en la mejora de la velocidad del flujo sanguíneo cerebral (Shahripour et al., 2011) y la rehabilitación de accidentes cerebrovasculares, incluso varios meses después del accidente cerebrovascular (Chen et al., 2009), son argumentos contundentes para continuar sus estudios fundamentales y entender mejor, en modelos animales así como a nivel celular y molecular, cómo funciona el MLC901. Los inventores demostraron previamente con roedores que tanto MLC601 como MLC901 mejoraban la supervivencia, protegían el cerebro de padecer una lesión isquémica focal y disminuían drásticamente los déficits funcionales inducidos por accidente cerebrovascular (Heurteaux et al., 2010). Además, en un modelo de isquemia global, imitando a un paro cardíaco, se ha demostrado que MLC901 previene la necrosis y la apoptosis de las neuronas del hipocampo y mejora la recuperación motora y cognitiva (Quintard et al., 2011). Los documentos WO 2007/106049, WO 2010/110755, Sherry y Youne, 2010 (Cerebrovascular Diseases, vol. 30, págs. 1-6) y el documento WO 2010/053456 describe el uso de Neuroaid y/o Neuroaid2 para el tratamiento del accidente cerebrovascular y otros trastornos.

25 Entre los muchos mecanismos posibles de los efectos beneficiosos de MLC601 o MLC901 contra la isquemia, los inventores han establecido que estos estimulan la expresión de BDNF, mejoran la neurogénesis, promueven la proliferación celular y estimulan el crecimiento de neuritas. Además, la vía Akt, que se sabe que está implicada en la supervivencia celular, parece ser crítica en el efecto protector MLC901, y la TCM previene la oxigenación de lípidos exagerada producida por la isquemia (Quintard et al., 2011).

35 El cerebro requiere de un suministro continuo de oxígeno y glucosa para mantener su función. Las neuronas son extremadamente vulnerables a las lesiones hipóxicas. En condiciones clínicas como la isquemia cerebral, la pérdida permanente de funciones neuronales se produce en cuestión de minutos después de padecer una hipoxia grave. La homeostasis iónica (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) del tejido cerebral se altera en gran medida y las neuronas se despolarizan después de la privación de oxígeno lo que conduce a un hinchamiento de éstas, una sobrecarga de calcio y, posteriormente, a la muerte de las neuronas (Dirnagl et al., 1999; Lee et al., 2000; Obrenovitch, 2008). Debido a que, en condiciones isquémicas, el nivel de ATP intracelular cae sustancialmente, porque la relación ADP/ATP se incrementa drásticamente, los canales K_{ATP} se activan dando como resultado la hiperpolarización de la membrana (Amoroso et al., 1990; Ashcroft y Ashcroft, 1990; Mourre et al, 1989). Esta hiperpolarización previene, durante un corto período de tiempo, una liberación masiva de glutamato excitotóxico. Se ha propuesto una activación sostenida de los canales K_{ATP} como una posible forma neuroprotectora contra la isquemia cerebral y, de hecho, se ha demostrado que los canales de potasio abridores K_{ATP} son neuroprotectores (Blondeau et al., 2000; Heurteaux et al., 1993; Heurteaux et al., 1995; Lauritzen et al., 1997, Liss and Roeper, 2001).

45 El trabajo descrito en este documento fue diseñado para investigar la eficacia terapéutica de MLC901 en un modelo celular de privación de glucosa en oxígeno, que imita específicamente el rápido agotamiento de oxígeno y glucosa visto en condiciones isquémicas in vivo. La privación de glucosa en oxígeno inducida por la muerte neuronal es inhibida por la glibenclamida, un inhibidor de los canales K_{ATP} . La activación de estos canales permite que las células sobrevivan. Entre los candidatos interesantes a la neuroprotección contra la isquemia, este trabajo ha demostrado un efecto activador muy interesante en los canales K_{ATP} .

55 Los canales de potasio sensibles al ATP son un tipo de canal de potasio que es inhibido por el ATP y activado por el ADP cuando el nivel de ADP disminuye. Debido a que los canales K_{ATP} tienen amplias y críticas funciones fisiológicas, se han convertido en objetivos farmacológicos. Los abridores del canal K_{ATP} (también conocidos como KCO o abridores del canal de potasio (PCO)) representan un grupo estructuralmente diverso de compuestos que actúan como activadores (agonistas) de la actividad del canal K_{ATP} . Algunos ejemplos de PCO son pinacidil, cromakalim y diazoxida.

Compendio

La presente invención se refiere a una composición o un kit que consta de cuatro componentes particulares seleccionados en los componentes de Neuroaid2 para activar canales K_{ATP} y para usar en el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos como se define en el conjunto de reivindicaciones adjuntas. Los componentes de Neuroaid2 se seleccionan del grupo que consiste en: Salviae Miltiorrhizae, Prunus persica; Polygalae; acori tatarinowii; Astrágalo; Paeoniae Rubra; Chuanxiong; Carthamus tinctorius; y angelicae sinensis, y los componentes seleccionados de Neuroaid2 consisten en Polygalae, Astragali, Chuanxiong y angelicae sinensis.

Las realizaciones, tal como se definen en la presente memoria descriptiva, incluyen el uso de los componentes de Neuroaid2 para activar los canales de potasio sensibles al ATP. Los usos de los componentes del Neuroaid2 incluyen usos in vivo, in vitro y ex vivo. Se prevé que mediante la activación de los canales de K_{ATP} se puedan tratar de manera útil diversas enfermedades y afecciones. Ejemplos de usos de los componentes de Neuroaid2 y enfermedades/afecciones que pueden tratarse con los componentes de Neuroaid2: incluyen obesidad, incontinencia (preferiblemente incontinencia urinaria), hipertensión, prevención de lesiones isquémicas o de reperfusión; tratamiento de hiperinsulemia o hiperinsulinismo; tratamiento de hipoglucemia; prevención de la transición de prediabetes a diabetes; tratamiento de diabetes tipo II; corrección de los defectos en la secreción de insulina y la sensibilidad a la insulina que contribuyen a la prediabetes y la diabetes tipo II; preservación de la función pancreática en diabéticos tipo I; tratamiento de hiperlipidemia; prevención del aumento de peso en individuos predispuestos a la obesidad; tratamiento del síndrome metabólico (o síndrome X); tratamiento del síndrome de ovario poliquístico; tratar el aumento de peso, la dislipidemia o el deterioro de la tolerancia a la glucosa en sujetos tratados con fármacos antipsicóticos; prevenir el aumento de peso, la dislipidemia o el deterioro de la tolerancia a la glucosa en sujetos tratados con fármacos antipsicóticos; tratamiento de cualquier enfermedad en la que la hiperlipidemia, hiperinsulemia, hiperinsulinismo, hiperlipidemia, hiperfagia u obesidad sean factores contribuyentes a la gravedad o progresión de la enfermedad, incluidos, entre otros, el síndrome de Prader Willi, el síndrome de Froelich, el síndrome de Cohen, el síndrome de Summit, el síndrome de Alstrom, el síndrome de Borjesen, síndrome de Bardet-Biedl, hiperlipoproteinemia tipo I, II, III y IV; neurodegeneración; accidente cardiovascular; isquemia; epilepsia; dolor; vejiga hiperactiva; síndrome del intestino irritable; pérdida de cabello; calvicie; alopecia; disfunción eréctil masculina; trastornos sexuales femeninos; parto prematuro; hiperplasia benigna de próstata (BPH); dismenorrea; enfermedad de la arteria coronaria; angina; hiperactividad de las vías respiratorias; trastornos de la alimentación; utilizar como agente antineoplásico (por ejemplo, para tratar cánceres cerebrales); enfermedades del músculo esquelético tales como miotonía congénita y parálisis hipercalemica; utilizar como vasodilatador; asma; detener el latido cardíaco normal para realizar una cirugía de trasplante de órganos cardíacos, aórticos, neurovasculares y cardiopulmonares y otras operaciones relacionadas; impotencia; tratamiento de arritmias; diabetes (por ejemplo, diabetes mellitus tipo I o tipo II); resistencia a la insulina; tratar la piel humana sensible; insuficiencia cardíaca; trastornos vasculares periféricos; insulinoma; hiperinsulinismo congénito; isquemia retiniana; reducir el consumo de alimentos que contienen grasas; hipoglucemia; depresión o trastornos del ánimo relacionados con la depresión; enfermedades/afecciones que se benefician de la neuroprotección (ver discusión a continuación); y neurocondicionamiento. Otros usos y enfermedades/afecciones que pueden tratarse de manera útil incluyen los enumerados en los documentos WO2007/106049, WO2010/053456 y WO2010/110755.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Efecto neuroprotector de MLC901 en la muerte neuronal inducida por la privación de glucosa en oxígeno (OGD) y su inhibición por glibenclamida

Fueron tratados con OGD durante 2 horas neuronas corticales en cultivo. MLC901 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se aplicó dos horas antes que OGD (pre-OGD), durante OGD (OGD) o dos horas después que OGD (post-OGD). Glibenclamida se aplicó después de 30 min que OGD antes que MLC901. Los histogramas muestran la supervivencia celular normalizada después de los tratamientos con MLC901 y glibenclamida.

Se aplicó glibenclamida (10 μM) sola o 30 min antes de MLC901. En ambas circunstancias, la glibenclamida inhibió la protección inducida por MLC901 contra el daño de la OGD (n = 12 placas por grupo experimental, . ***P<0,001 frente al grupo de vehículos y P<0,001 frente al grupo MLC901).

Figura 2. Efecto de MLC901 en corrientes K_{ATP} endógenas en células INS-R9. Rastros de corriente registrados en condiciones de control y en presencia de MLC901(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) solo, MLC901 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) + Pinacidil (10 μM) o MLC901(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) + Pinacidil (10 μM) + Glibenclamida (10 μM).

Figura 3. Efecto de MLC901 en canales K_{ATP} (Kir 6.1/SUR2) expresado en ovocitos de Xenopus.

(A) Rastros de corriente típicos registrados en condiciones de control (90 K, n = 6), en presencia de Azida (3 mM) sola o Azida + Pinacidil (10 μM) o Azida + Pinacidil + Glibenclamida (10 μM) (n = 6 por condición). (B) Las trazas de corriente típicas registradas en condiciones de control (90 K, n = 6), y en presencia de Azida (3 mM) sola, Azida + MLC901 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Azida + MLC901 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + Glibenclamida (10 μM) (n = 6 por condición). (C) Relaciones de corriente de célula completa-tensión obtenidas con rampas de tensión que van desde -160 a +80 mV en condiciones de control (90K), y en presencia de Azida (3 mM) sola, Azida + MLC901 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o Azida + MLC901 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) +

Glibenclamida (10 μ M) (n = 6 por condición). (D) Histogramas correspondientes que muestran la amplitud de corriente a -120 mV para todas las condiciones probadas (n a 6; **P<0,01 y ***P<0,001).

Figura 4: Efectos de NA4 (1 μ g/ml) en corrientes K_{ATP} en ovocitos de Xenopus (n = 4)

5 Las corrientes se registraron en la condición de control simétrico de potasio. La actividad del canal K_{ATP} se evaluó mediante el agotamiento de ATP intracelular en 3 mM de azida sódica.

10 Protocolo de perfusión: la corriente se registró por primera vez en condiciones de control (solución de potasio simétrica) (90K+). Luego, la actividad del canal se mejoró con 6 minutos de perfusión de azida sódica 3 mM que se mantuvo durante todo el experimento. MLC901 u otros productos por lotes se perfundieron 6 minutos después de la perfusión de azida sódica. En todos los experimentos, se evaluó la inhibición de las corrientes registradas por Glibenclamida (glib) (10 μ M).

Figura 5: Efectos de NA4 (1 μ g/ml) en las corrientes K_{ATP} en ovocitos (n=4)

Las corrientes se registraron en la condición de control simétrico de potasio. La actividad del canal K_{ATP} se evaluó mediante el agotamiento de ATP intracelular en 3 mM de azida sódica.

15 Protocolo de perfusión: la corriente se registró por primera vez en condiciones de control (solución simétrica de potasio). Luego, la actividad del canal se mejoró con 6 minutos de perfusión de azida sódica 3 mM que se mantuvo durante todo el experimento. MLC901 u otros productos por lotes se perfundieron 6 minutos después de la perfusión de azida sódica. En todos los experimentos se evaluó la inhibición de las corrientes registradas por Glibenclamida (glib) (10 μ M).

Figura 6:

20 Las 2 muestras, NeuroAid2 (nuestro control con las 9 plantas) y "NA3" (chuanxiong, sinensis, astrágalo (radix astragali)) activan el canal.

Glosario de términos

25 Esta sección tiene por objeto proporcionar orientación sobre la interpretación o el alcance de las palabras y frases que se exponen a continuación (y, en su caso, las variantes gramaticales de las mismas). Además, en otras secciones de esta memoria descriptiva se pueden encontrar más orientaciones sobre la interpretación o el alcance de determinadas palabras y frases utilizadas en el presente documento (y, en su caso, las variantes gramaticales correspondientes).

30 Las palabras "una/uno", "un" y "la/el" se emplean para describir elementos y componentes de la invención. Esto se hace simplemente por conveniencia y para dar un sentido general de la invención. Esta descripción debe leerse para incluir uno o al menos uno y el singular también incluye el plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la expresión "un agente" incluye una referencia a un solo agente, así como a una pluralidad de agentes (incluidas las mezclas de agentes). También debe señalarse que el término "o" se emplea generalmente en su sentido incluyente de "y/o", a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

35 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aproximadamente", tal como se utiliza en relación con un valor numérico, significa, por ejemplo, el ± 25 % del valor numérico, preferiblemente ± 15 %, más preferiblemente el ± 10 %, más preferiblemente ± 5 % y, preferiblemente, ± 2 % o ± 1 %. Cuando sea necesario, la palabra "aproximadamente" podrá omitirse de la definición de la invención.

40 Por "paciente con accidente cerebrovascular cerebral" se incluye a aquellos pacientes que han sufrido un accidente cerebrovascular cerebral isquémico o hemorrágico. Un accidente cerebrovascular cerebral es una muerte repentina y permanente de las células cerebrales que ocurre cuando el flujo de sangre se bloquea y no puede entrar oxígeno al cerebro, el accidente cerebrovascular isquémico ocurre con mayor frecuencia cuando el flujo de sangre se bloquea por una coagulación de la sangre (también conocida como «trombosis» arterial) o por un coágulo separado que se aloja en una arteria (denominado «accidente cerebrovascular embólico»). El accidente cerebrovascular hemorrágico es el resultado de la ruptura de una pared arterial y de la fuga de sangre en el cerebro circundante. El accidente cerebrovascular hemorrágico, al igual que el accidente cerebrovascular isquémico, causa la muerte del tejido al privar al cerebro de sangre y oxígeno, y da como resultado una serie de discapacidades neurológicas (motoras, del habla) así como discapacidades funcionales.

50 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "comprender" significa "incluir". Así, por ejemplo, una composición "que comprende" componentes Neuroaid2 puede consistir exclusivamente en los componentes de Neuroaid2 o puede incluir uno o más componentes adicionales (por ejemplo, un agente activo adicional, un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, etc.). Por lo tanto, debe entenderse que el término "comprender" incluye, dentro de su ámbito de aplicación, realizaciones en las que uno o más elementos adicionales no citados están presentes, así como los términos más restrictivos "que consisten esencialmente en" y "que consisten en" (es decir, cuando sólo están presentes los elementos citados). El término "incluir" debe interpretarse de la misma manera para

abarcas "incluyendo, entre otros...", y las expresiones más restrictivas "que consisten esencialmente en y "que consisten en."

5 El término "extracción", tal como se utiliza en el presente documento, incluye una referencia a un método de separación en el que el material vegetal (por ejemplo, partes picadas de una planta, ya sea fresca o seca) se pone en contacto con un disolvente líquido para transferir uno o más componentes del material vegetal al material vegetal al material vegetal en el disolvente.

10 La expresión "in vivo" tal como se utiliza en el presente documento incluye una referencia al uso de un organismo vivo. Esto contrasta con la expresión "in vitro" donde no se utiliza un organismo vivo entero. La expresión "in vitro" debe entenderse en el sentido de que incluye, entre otras cosas, usos "ex vivo" mediante los cuales se pueden emplear células, tejidos, etc. que no forman parte de un organismo vivo entero (por ejemplo, células o tejidos de cultivos celulares o tisulares, biopsias, organismos muertos, etc.). Otros ejemplos no limitantes de "in vitro" se relacionan con el uso de extractos celulares o lisados.

15 Los términos "paciente" y "sujeto" se utilizan indistintamente en el presente documento y los términos incluyen una referencia a cualquier animal humano o no humano (preferiblemente un mamífero) que se desee tratar utilizando la presente invención. Sin embargo, se entenderá que "paciente" o "sujeto" no implica que los síntomas estén presentes. El término "mamífero", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier miembro de la clase Mammalia, incluyendo, sin limitación, a humanos y primates no humanos como chimpancés y otras especies de simios y monos; animales de granja como ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino; animales domésticos/de compañía como perros y gatos; animales de laboratorio (por ejemplo, conejos y roedores como ratones, ratas y conejillos de indias, y similares). Preferiblemente, el mamífero es humano.

20 La expresión "accidente cerebrovascular" se refiere a la muerte súbita de las células tisulares debido a la falta de oxígeno cuando el flujo sanguíneo se ve afectado por bloqueo o ruptura de una arteria. El accidente cerebrovascular es un accidente vascular que puede ocurrir en el cerebro o en el sistema cardíaco. Esta última condición se conoce médicamente como "infarto de miocardio" y es conocido más comúnmente como "ataque al corazón".

25 El término "tratamiento", tal como se utiliza en el presente documento, está destinado a ser interpretado de una forma amplia e incluye una referencia a todos y cada uno de los usos que remedian un estado de enfermedad o sus síntomas (por ejemplo, reducir la gravedad de la enfermedad o sus síntomas, reducir la frecuencia de los síntomas, etc.), prevenir el establecimiento de enfermedades, o prevenir, obstaculizar, retrasar o revertir la progresión de una enfermedad u otros síntomas indeseables de alguna manera, incluso si el tratamiento no tiene éxito en última instancia. El tratamiento puede ser con respecto a un paciente que ya tiene el trastorno, o con respecto a un paciente que es propenso a tener el trastorno o en el que se debe prevenir el trastorno. Por lo tanto, el término "tratamiento" (y para evitar dudas, las variantes gramaticales del mismo como "tratar", etc.) puede referirse al tratamiento terapéutico o al tratamiento profiláctico o preventivo.

35 Los términos "enfermedad", "trastorno" y "condición" pueden utilizarse en el presente documento indistintamente, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por los expertos ordinarios en la técnica a la que pertenece la invención.

Descripción detallada

40 Un aspecto, tal como se define en la presente memoria descriptiva, proporciona el uso de cuatro componentes Neuroaid2 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad/trastorno en un paciente en el que la enfermedad/trastorno se puede tratar activando los canales de K_{ATP} y en el que los cuatro componentes de Neuroaid2 consisten en Polygalae, Chuanxiong, preferiblemente su rizoma (es decir, el rizoma chuanxiong); angelicae sinensis (Angelica china o DanGui), preferiblemente la raíz (es decir, radix angelicae sinensis); y Astragali (algarroba lechera o Huang Qi), preferiblemente la raíz (es decir, radix astragali).

45 Otro aspecto, tal como se define en la presente memoria descriptiva, proporciona una composición o kit que comprende cuatro componentes de Neuroaid2 que consisten en Polygalae, Chuanxiong, preferiblemente el rizoma de los mismos (es decir, rizoma chuanxiong); angelicae sinensis (Angelica china o DanGui), preferiblemente la raíz (es decir, radix angelicae sinensis); y Astragali (Algarroba lechera o Huang Qi), preferiblemente la raíz (es decir, radix astragali).

50 Los aspectos anteriores, tal como se definen en la presente memoria descriptiva se describen con más detalle a continuación, de modo que las siguientes secciones están destinadas a proporcionar una cierta orientación sobre la implementación y el alcance de los diversos aspectos según se definen en la presente memoria descriptiva y el alcance de la invención tal como se define en el conjunto adjunto de las reivindicaciones.

55

Activación de los canales K_{ATP}

Los diversos aspectos según se definen en la presente memoria descriptiva se relacionan con la activación de los canales K_{ATP} por componentes Neuroaid2. Mediante el uso de los componentes Neuroaid2, los canales K_{ATP} pueden activarse en uno o más tipos de células. Por ejemplo, los canales K_{ATP} pueden activarse en uno o más de los siguientes tipos de células: células neuronales, células del músculo liso (por ejemplo, células musculares lisas vasculares, células musculares lisas de la vejiga), miocitos cardíacos, células beta pancreáticas, células del tejido adiposo y células del músculo esquelético. En al menos algunas realizaciones de los diversos aspectos según se definen en la presente memoria descriptiva, los componentes Neuroaid2 son para activar canales K_{ATP} en células que no son células neuronales. Los canales K_{ATP} se encuentran en varios lugares celulares, incluyendo la membrana plasmática, mitocondrias ("mito K_{ATP} ") y nucleares ("nuc K_{ATP} "). Se prevé que los componentes Neuroaid2 puedan utilizarse para la activación de los canales K_{ATP} en uno o más de estos lugares. Sin embargo, en al menos algunas realizaciones se proporciona el uso de componentes de Neuroaid2 para la activación de los canales K_{ATP} de la membrana plasmática. En al menos algunas realizaciones de la invención se proporciona el uso de los componentes Neuroaid2 para la activación de los canales K_{ATP} sarcolemmas.

Los componentes de Neuroaid2 se utilizan en varios métodos de tratamiento mediante la activación de canales K_{ATP} .

Los componentes Neuroaid2

1. *Salviae Miltiorrhizae* (*Salvia miltiorrhiza* o Dan Shen), por ejemplo la raíz (radix) y/o rizoma (rizoma) de la misma (en las realizaciones preferidas, el radio, o radix et rizome);
2. *Prunus persica* (Melocotón o Tao ren), preferiblemente su semilla;
3. *Polygalae* (polvo fino de tenuifolia, *Polygala tenuifolia* Willd., *Polygala sibirica* L. o Yuanzhi), preferiblemente la raíz de la misma (es decir, radix polygalae);
4. *acori tatarinowii* (ácoro o Shichangpu), preferiblemente el rizoma del mismo (es decir, rizoma acori tatarinowii);
5. Astrágalos (*Algarroba lechera* o Huang Qi), preferiblemente la raíz (es decir, radix Astrágalos);
6. *Paeoniae Rubra* (Peonía Roja, *Paeonia lactiflora* Pall, *Paeonia veitchii* Lynch o Chi Shao), preferiblemente la raíz (es decir, radix paeoniae rubra);
7. Chuanxiong; preferiblemente el rizoma del mismo (es decir, rizoma chuanxiong);
8. *Carthamus tinctorius* (flor de azafrán salvaje o HongHua), preferiblemente su flor; y
9. *Angelicae sinensis* (raíz de angélica o DanGui), preferiblemente la raíz (es decir, radix angelicae sinensis).

Los cuatro componentes de Neuroaid2 seleccionados de los 9 componentes de Neuroaid2 anteriores y que componen *Polygalae*, Chuanxiong, *angelica sinensis* y astrágalos se conocen en este documento como "los componentes Neuroaid2 seleccionados".

Las combinaciones de componentes de Neuroaid2 pueden ser adecuadamente aditivas o sinérgicas. Un efecto "aditivo" se refiere a un efecto farmacéutico beneficioso producido por la combinación que es mayor que el efecto de cualquiera de los componentes de la combinación cuando se presenta individualmente. Un efecto "sinérgico" se refiere a un efecto farmacéutico beneficioso producido por la combinación que es mayor que la suma de los efectos de los componentes de la combinación cuando se presentan individualmente.

Los diversos aspectos según se definen en la presente memoria emplean cuatro de los componentes neuroaid2 antes mencionados que consisten en *Polygalae*, Chuanxiong, preferiblemente el rizoma del mismo (es decir, rhizoma chuanxiong); *Angelicae sinensis* (raíz de angélica o DanGui), preferiblemente la raíz (es decir, radix angelicae sinensis); y astrágalos (*Algarroba lechera* o Huang Qi), preferiblemente la raíz (es decir, radix astragali).

En la presente invención se emplean solo 4 componentes de Neuroaid2 que son *Polygalae*, Chuanxiong, *Angelica sinensis* y Astrágalos.

En la invención, los componentes seleccionados de Neuroaid2 consisten en:

- i. Astrágalos (*Algarroba lechera* o Huang Qi), preferiblemente la raíz (es decir, radix astragali);
- ii. Chuanxiong; preferiblemente el rizoma del mismo (es decir, rizoma chuanxiong).
- iii. *Angelicae sinensis* (raíz de angélica o DanGui), preferiblemente la raíz (es decir, radix angelicae sinensis); y
- iv. *Polygalae* (polvo fino de tenuifolia, *Polygala tenuifolia* Willd., *Polygala sibirica* L. o Yuanzhi), preferiblemente la raíz de la misma (es decir, radix polygalae);

Neuroaid y Neuroaid II

Los componentes de Neuroaid2 son los nueve componentes herbáceos de NeuroAid II (también conocido como NurAid II, Neuroaid2 y MLC901). Los nueve componentes herbáceos de NeuroAid II son:

Radix astragali
Radix salviae miltiorrhizae
Radix paeoniae rubra
Rhizoma chuanxiong
Radix angelicae sinensis
Carthamus tinctorius
Semen persica
Radix polygalae
Rhizoma acori tatarinowii

5 Neuroaid H comprende lo siguiente junto con dextrina o maltodextrina como excipiente:

Componentes de MLC901	*Cantidad (mg) por cápsula
Radix astragali	800
Radix salviae miltiorrhizae	160
Radix paeoniae rubra	160
Rhizoma chuanxiong	160
Radix angelicae sinensis	160
Carthamus tinctorius	160
Semen persica	160
Radix polygalae	160
Rhizoma acori tatarinowii	160

10 NeuroAid® (MLC601) de Moleac Pte Ltd es un producto TCM en forma de cápsula que comprende 9 componentes herbáceos y 5 componentes animales. NeuroAid™ comprende Radix Astragali (raíz membranosa del algarrobo de la leche o Huang Qi), Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae (raíz de salvia roja o Dan Shen), Radix Paeoniae Rubra (raíz de peonía roja, Paeonia lactiflora Pall, Paeonia veitchii Lynch o Chi Shao), rizoma de Ligusticum Chuanxiong (Chuan Xiong), radix angelicae sinensis (raíz de Angelica china o DanGui), Flor de Carthamus Tinctorius (cártamo o HongHua), Prunus Persica (semilla de melocotón o Taoren), Radix Polygalae (raíz de mosto de hoja delgada, Polygala tenuifolia Willd., Polygala sibirica L. o Yuanzhi), Rhizoma acori Tatarinowii (rizoma de hierba dulce o Shichangpu), Buthus martensii (cuerpo seco de escorpión o Quanxie), cuerpo seco de sanguijuelas (Hirudo, Whitmania pigra

15 Whitman, Hirudo nipponica Whitman, Whitmania acran Whitman o Shuizhi), Eupolyphaga Seu Seteleophaga (cuerpo seco de escarabajo molido, Eupolyphaga sinensis Walker, Steleophaga plancyi o Tubiechong), Calculus Bovis Artifactus (bezoar de la vaca natural o artificial o Rengong Niu Huang), y Cornu Saigae Tataricae (Arrecife del Antílope o Lingyangjiao).

20 La composición de MLC601 se muestra en la tabla a continuación. MLC601 comprende lo siguiente junto con dextrina como excipiente.

Nombre científico en Latín	Cantidad
Radix Astragali	0,570 g
Radix salviae miltiorrhizae	0,114 g
Radix paeoniae rubra	0,114 g
Rhizoma chuanxiong	0,114 g

Radix angelicae sinensis	0,114 g
Carthamus tinctorius	0,114 g
Hirudo	0,0665 g
Eupolyphaga seu steleophaga	0,0665 g
Prunus persica	0,114 g
Calculus bovis artifactus	0,0285 g
Cornu saigae tataricae	0,0285 g
Buthus martensii	0,095 g
Radix polygalae	0,114 g
Rhizoma acori tatarinowii	0,114 g

5 NeuroAid™, que puede registrarse con diferentes nombres en diferentes países (por ejemplo, Nuraid, Nu-raid, en Sudáfrica se comercializa como Strocaid™, o Dangi Piantan Jiaonang™), es fabricado y está disponible comercialmente en la República Popular de China de Tianjin Shitian Pharmaceutical Group Co., Ltd (ubicado en la zona industrial Jianxin, Ciudad de Wangwenzhuang, distrito de Xiqing, ciudad de Tianjin, China; Código Postal 300381). También está disponible en Moleac Pte Ltd (anteriormente Molecular Acupuncture Pte Ltd), el principal licenciario fuera de la República Popular China (11 Biopolis Way, Helios N°. 09- 08, Singapur, 138667).

10 Para evitar dudas, NeuroAid™ y NeuroAid II no sólo incluyen NeuroAid™ y NeuroAidII, respectivamente, en las formas en las que se comercializa actualmente, sino que también incluye futuras formulaciones de NeuroAid™ y NeuroAid II, respectivamente, que pueden, por ejemplo, ser comercializadas por Tianjin Shitian Pharmaceutical Group Co., Ltd o Moleac Pte Ltd. Tales formulaciones futuras pueden, por ejemplo, variar en cantidades de dosificación o la concentración de sus ingredientes activos, etc.

15 NeuroAid™ también es conocido como MLC 601 y los términos "NeuroAid™" y "MLC 601" se pueden utilizar indistintamente. Del mismo modo NeuroAid II también se conoce como MLC 901, Neuroaid2, NurAid II, NeuroaidII, Regenaid y Nu-raidII y estos términos se pueden utilizar indistintamente.

Usos de los componentes del Neuroaid2

Varios usos se han descrito en la técnica del Neuroaid y sus composiciones relacionadas. Véanse, por ejemplo, los documentos WO2007/106049, WO2010/053456 y WO2010/110755 (todos de Moleac Pte. Ltd.), en particular en relación con los usos descritos en el mismo para Neuroaid y las composiciones relacionadas.

20 Los documentos WO2007/106049 y WO2010/053456 describen el uso de Neuroaid y las composiciones relacionadas para el tratamiento de accidentes cerebrovasculares (por ejemplo, accidentes cerebrovasculares cerebrales y enfermedades cardiovasculares (accidente cerebrovascular cardíaco, principalmente debido a un accidente cerebrovascular de la arteria coronaria)), trastornos neurológicos, tratamiento de pacientes con infarto cerebral, traumatismo cerebral, traumatismo del sistema nervioso, condiciones relacionadas con la neuroplasticidad, 25 traumatismo craneoencefálico, paro cardíaco, hemorragia subaracnoidea, apoplejía y su uso como suplemento dietético para proporcionar nutrición a individuos sanos, así como a los pacientes afectados con accidentes cerebrovasculares o trastornos neurológicos.

30 Los trastornos neurológicos son trastornos que afectan al sistema nervioso central, el sistema nervioso periférico y el sistema nervioso autónomo, como enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson), epilepsia, convulsiones, enfermedades desmielinizantes (por ejemplo, esclerosis múltiple), parálisis cerebral, lesiones traumáticas o tumores en el cerebro, médula espinal y nervios periféricos.

35 La neuroplasticidad (también conocida como plasticidad cerebral o plasticidad cortical) se refiere a los cambios que se producen en la organización del cerebro y sus circuitos de neuronas, en particular los cambios que se producen en la ubicación de funciones específicas de procesamiento de información. Este proceso apoya la existencia del aprendizaje de nuevas funciones como resultado de la experiencia durante el desarrollo como animales maduros y la creación de nueva información con neuronas sanas pasando por las neuronas dañadas afectadas por traumatismos u otras condiciones médicas.

40 El documento WO2010/110755 incluye datos experimentales relativos a MLC601 y MLC901. Los efectos positivos sobre la viabilidad celular, la liberación LDH, la lesión cerebral isquémica, la neuroproliferación y el crecimiento de neuritas se demuestran en ella para MLC601 y MLC901.

El documento WO2010/110755 describe el uso de Neuroaid y las composiciones relacionadas para promover el crecimiento neuronal y la proliferación de neuronas o células madre, como en tejidos lesionados o enfermos. La expresión "crecimiento neuronal" se relaciona con el crecimiento externo direccional general de axones y dendritas. El crecimiento neuronal es importante en la formación o el desarrollo de la sinapsis.

5 El documento WO2010/110755 describe el tratamiento de pacientes con una condición seleccionada del grupo que consiste en: indicaciones psiquiátricas tales como trastornos de ansiedad, esquizofrenia, depresión y depresión postnatal, envejecimiento natural, muerte traumática de células cerebrales y otras manifestaciones neurológicas como amnesia, dolor de espalda, vértigo, inconsciencia, extremidades fantasma, trastornos de la olfacción, dolor de cuello, dolor de cabeza, migrañas, trastornos del habla. Otros usos que se describen incluyen el tratamiento de:
10 neurodegeneración; lesiones o enfermedades del sistema nervioso (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y demencia senil); enfermedades neurológicas, enfermedades degenerativas; accidente cerebrovascular; artritis reumatoide, trastornos degenerativos musculares, enfermedades renales y enfermedades hepáticas.

El documento WO2010/110755 también describe el uso de Neuroaid y composiciones relacionadas para: el bienestar general de las neuronas; promover la supervivencia celular, la proliferación o la diferenciación de las células (por ejemplo, facilitar así el cultivo in vitro de diversas células que pueden utilizarse para la ingeniería de tejidos o usos terapéuticos ex vivo); promover la diferenciación de células madre y el reclutamiento en tejido sordo o lesionado; tratar a un paciente con tejido enfermo o lesionado del sistema nervioso central o periférico; promover el crecimiento celular; promover el crecimiento controlado de condrocitos, células musculares esqueléticas, miocardios, células musculares lisas, hepatocitos, células renales o células epiteliales de la piel; retrasar los procesos de envejecimiento mejorando la proliferación o funciones de células epiteliales o epidérmicas; promover la supervivencia celular y el crecimiento de neuronas, células madre, condrocitos, células musculares esqueléticas, miocardios, células musculares lisas, hepatocitos, células renales, islotes de langerhans y células epiteliales de la piel.
15
20

En al menos algunas realizaciones de la invención, la composición o el kit constan de cuatro componentes particulares seleccionados en los componentes de Neuroaid2 para activar los canales K_{ATP} para su uso en un método para proporcionar neuroprotección.
25

El término "neuroprotección", como se usa en el presente documento, incluye una referencia a la preservación del tejido neuronal en riesgo de morir, tal como durante un accidente cerebrovascular o después de un accidente cerebrovascular. El término "neuroprotección" (y para evitar dudas, sus variantes gramaticales) puede referirse a la estimulación o promoción de la supervivencia celular, o la prevención de la muerte celular, cuando la célula está en riesgo de muerte celular, tal como cuando la célula ha sufrido un traumatismo y lo haría en circunstancias normales (es decir, sin intervención/tratamiento), con una alta probabilidad de morir. En consecuencia, se entenderá que los términos "neuroprotección", estimulación o promoción de la supervivencia celular, y la prevención de la muerte celular pueden usarse como sinónimos, a menos que el contexto indique lo contrario.
30

La neuroprotección se puede usar para proteger a las células del estrés (por ejemplo, falta de oxígeno, falta de glucosa, estrés por glutamato, radicales libres) dentro del sistema nervioso, tal como dentro del cerebro. Además, al promover la supervivencia, es posible prevenir o ralentizar enfermedades o prevenir o ralentizar una mayor degeneración del sistema nervioso en personas que padecen un trastorno degenerativo.
35

Varios factores pueden poner a las células en riesgo de morir con ejemplos que incluyen: traumas, lesiones, enfermedades agudas y/o trastornos, enfermedades crónicas y/o trastornos, tales como enfermedades neurodegenerativas. La neurodegeneración puede estar causada por enfermedades seleccionadas del grupo de la enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), absceso cerebral, isquemia cerebral, atrofia cerebral asociada con la diabetes, arteriopatía autosómica dominante cerebral con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (CADASIL), trastornos cerebrovasculares, degeneración gangliónica corticobasal (CBGD), isquemia crónica, Síndrome de Creutzfeldt-Jakob, Síndrome de Dandy-Walker, Distrofia muscular de Duchenne, demencia senil, demencia por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), encefalomielitis, temblor esencial, ataxia friedreich, enfermedad del hampario gerstmann, enfermedad de Huntington, hidrocefalia, hipoxia, insomnio familiar fatal, ataque isquémico transitorio, kuru, síndrome de Landau-Kleffner, enfermedad del cuerpo de Lewy, enfermedad de Machado-Joseph, meningitis bacteriana y viral, trastornos de la migraña, mielitis, atrofia olivopococerebelar, neurodegeneración asociada a pantotenato quinasa, enfermedad de Parkinson, poliomielitis, síndrome de postpoliomielitis, enfermedades priónicas, seudotumor cerebral, síndrome de Shy-drager, enfermedad de Steinert, espasmos infantiles, parálisis supranuclear progresiva, siringomielia, enfermedades talámicas, trastornos de Tic, síndrome de Tourette, síndrome de uveomeningoencefalitis, isquemia global y focal y otras enfermedades cardiovasculares en sujetos predisuestos.
40
45
50

Los factores externos también pueden poner a las células en riesgo de morir, como infecciones, exposición tóxica (por ejemplo, radiación, productos químicos o medicamentos), tratamiento médico o quirúrgico (por ejemplo, abertura de la cavidad craneal). Los métodos de diagnóstico también pueden poner a las células en riesgo de morir, ya que los métodos de diagnóstico pueden causar la formación de radicales libres o tener efectos citotóxicos, como radiografías y quimioterapia. En consecuencia, en al menos algunas realizaciones las células están en riesgo de morir debido a una infección, exposición tóxica (por ejemplo, radiación, química o relacionada con medicamentos), o de tratamiento médico, quirúrgico o diagnóstico.
55

Los componentes de Neuroaid2 se pueden utilizar para promover la supervivencia de las células del sistema nervioso que tienen un riesgo de morir debido a una enfermedad, trastorno, lesión o condición del sistema nervioso central (cerebro o médula espinal) y/o periférico.

5 Algunos ejemplos son el cáncer del sistema neural, el daño postoperatorio del nervio, el daño traumático a los nervios, por ejemplo, el resultado de una lesión de la médula espinal, la mielinización de las fibras nerviosas, el daño postisquémico, por ejemplo, el resultado de un accidente cerebrovascular, la demencia multiinfarto, esclerosis múltiple, degeneración nerviosa asociada con diabetes mellitus, degeneración neuromuscular, esquizofrenia, depresión (incluyendo, por ejemplo, depresión postnatal, trastorno bipolar, depresión mayor, etc.), trastornos psiquiátricos, envejecimiento natural, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, demencia o enfermedad de Huntington, y migrañas.

10 Los cuatro componentes de Neuroaid2 seleccionados se pueden utilizar para promover la supervivencia de las células del sistema nervioso que están en riesgo de morir debido a una lesión cerebral, accidente cerebrovascular, isquemia, migraña, lesión de la médula espinal, una enfermedad neurodegenerativa/trastorno/condición, demencia (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, corea de Huntington y degeneración espinocerebellar) o un trastorno psiquiátrico como la depresión.

15 En una realización preferida de la invención, la composición o el kit que consiste en cuatro componentes seleccionados de los componentes Neuroaid2 son para su uso en el tratamiento de accidentes cerebrovasculares. El paciente puede haber tenido un accidente cerebrovascular (por ejemplo, en las últimas 96, 84, 72, 60, 48, 36 o 12 horas) o puede estar en riesgo de sufrir un accidente cerebrovascular, como un paciente que está en riesgo de un primer accidente cerebrovascular o está en riesgo de una recurrencia de accidente cerebrovascular. Cuando los componentes de Neuroaid2 son para el tratamiento de un ictus, los componentes pueden ser opcionalmente para la administración al paciente en aproximadamente 96, 84, 72, 60, 48, 36 o 12 horas de un accidente cerebrovascular, como en aproximadamente 1 a 12 horas después de un accidente cerebrovascular; alrededor de 2 a aproximadamente 10 horas después de un accidente cerebrovascular; o más preferiblemente en aproximadamente de 3 a aproximadamente 9 horas después de un accidente cerebrovascular. Opcionalmente, los componentes de Neuroaid2 son para una administración al paciente en aproximadamente 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 horas después de un accidente cerebrovascular. Cuando los componentes de Neuroaid2 puedan utilizarse para tratar a un paciente que esté en riesgo de recurrencia de un accidente cerebrovascular, los componentes de Neuroaid2 pueden ser para la administración en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días después del accidente cerebrovascular anterior, o al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 semanas después del accidente cerebrovascular anterior, o al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses después del accidente cerebrovascular anterior.

20 Se prevé que los componentes Neuroaid2 encontrarán utilidad con respecto a un uso descrito en la técnica para los activadores de canales de potasio sensibles a ATP (también conocidos como PCO y KCO), como por uno o más de pinacidil, cromakalim y diazoxida. Ejemplos de tales usos se proporcionan a continuación y en una realización preferida de los diversos aspectos descritos en la presente memoria descriptiva y los componentes de Neuroaid2 se emplean para un uso que se enumera a continuación.

25 Varios usos de los abridores de canales K_{ATP} se describen en el documento WO2006026469 y estos incluyen: la prevención de lesiones isquémicas o de reperfusión; el tratamiento de la hiperinsulemia o hiperinsulinismo; tratamiento de la hipoglucemia; la prevención de la transición de la prediabetes a la diabetes; el tratamiento de la diabetes tipo II; corrección de los defectos en la secreción de insulina y sensibilidad a la insulina que contribuyen a la prediabetes y la diabetes tipo II; preservación de la función pancreática en diabéticos de tipo I; tratamiento de la hiperlipidemia; prevención del aumento de peso en individuos que están predispuestos a la obesidad; tratamiento de la obesidad; tratamiento del síndrome metabólico (o síndrome X); tratamiento del síndrome de ovario poliquístico; tratamiento del aumento de peso, dislipidemia o deterioro de la tolerancia a la glucosa en sujetos tratados con antipsicóticos; prevención del aumento de peso, dislipidemia, o deterioro de la tolerancia a la glucosa en sujetos tratados con antipsicóticos; y el tratamiento de cualquier enfermedad en la que la hiperlipidemia, la hiperinsulfemia, el hiperinsulinismo, la hiperlipidemia, la hiperfagia u obesidad sean factores que contribuyan a la gravedad o progresión de la enfermedad, incluidos, entre otros, el Síndrome de Prader Willi, Síndrome de Froelich, síndrome de Cohen, síndrome de Summit, síndrome de Alstrom, síndrome de Borjesen, síndrome de Bardet-Biedl, o hiperlipoproteinemia tipo I, II, III y IV.

30 El documento US 8.053.441 también describe una serie de enfermedades o condiciones que pueden ser tratadas con abridores de canales de potasio incluyendo: hipertensión, neurodegeneración, accidente cerebrovascular, isquemia, epilepsia, dolor, vejiga hiperactiva, incontinencia urinaria, síndrome del intestino irritable, pérdida de cabello, calvicie, alopecia, disfunción eréctil masculina, trastornos sexuales femeninos, parto prematuro, hiperplasia benigna de próstata (HBP), dismenorrea, enfermedad de las arterias coronarias, angina de pecho y trastornos alimentarios de hiperactividad de las vías respiratorias. Otros usos para los abridores de canales K_{ATP} incluyen: el uso como agente antineoplásico, particularmente para el uso de cánceres cerebrales (documento US 7.705.010), y el tratamiento de enfermedades del músculo esquelético como la miotonía congénita y la parálisis hipercémica (documento US 5.744.594).

Preferiblemente, los componentes Neuroaid2 se emplean para un uso descrito en la técnica para pinacidil. Los usos de pinacidil (N-ciano-N'-piridin-4-il-N"-(1,2,2-trimetilpropil)guanidina) incluyen: el uso como vasodilatador para tratar la hipertensión, asma, incontinencia urinaria, detener los latidos del corazón normales con el fin de realizar latidos cardíacos, aórticos, neurovasculares y cirugía de trasplante de órganos cardiopulmonar y otras operaciones relacionadas (con respecto a los usos antes mencionados de pinacidil ver, por ejemplo, documento US5.428.039), el tratamiento de la piel humana sensible (véase, por ejemplo, el documento US 6.572.848) y la impotencia (véase, por ejemplo, US 7.959.550). Preferiblemente, los componentes Neuroaid2 se emplean para un uso descrito en la técnica para el cromakalim. Los usos del cromakalim ((3R,4S)-3-hidroxi-2,2-dimetil-4-(2-oxopirrolidin-1-il)croman-6-carbonitrilo) incluyen: el uso como vasodilatador para tratar la hipertensión (véase, por ejemplo, el documento US 7.964.623), asma (véase, por ejemplo, el documento US 7.964.623), tratamiento de la arritmia (véase, por ejemplo, el documento US 7.964.623), diabetes (por ejemplo, diabetes mellitus tipo I o tipo II), obesidad (véase, por ejemplo, el documento US 7.964.623), síndrome metabólico, síndrome X, resistencia a la insulina, detener los latidos normales del corazón en cirugía de trasplante de órganos cardíacos, aórticos, neurovasculares y cardiopulmonares y otras operaciones relacionadas (con respecto a los usos antes mencionados del cromakalim; véase, por ejemplo, el documento US5.428.039), tratamiento de piel humana sensible (véase, por ejemplo, el documento US 6.572.848), insuficiencia cardíaca e impotencia (documento US 7.959.550).

Preferiblemente, los componentes Neuroaid2 se emplean para un uso descrito en la técnica para la diazoxida. La diazoxida (marca registrada Proglycem, 1,1-dióxido de 7-cloro-3-metil-4H-1,2,4-benzotiadiazina). Los usos incluyen: uso como vasodilatador, para tratar la hipertensión (véase, por ejemplo, el documento US. 2.986.573), trastornos vasculares periféricos (véase, por ejemplo, Patente del Reino Unido GB982072) insulinoma, hiperinsulinismo congénito, síndrome metabólico (con respecto a estos usos, véase, por ejemplo, el documento US 5.284.845 o US 6.197.765), isquemia retiniana (véase, por ejemplo, el documento US 8.063.054), diabetes (véase, por ejemplo, el documento US 7.799.777), obesidad (véase, por ejemplo, el documento US 7.799.777 y la publicación de la patente U.S. 2004/0204472), tratamiento del síndrome X (véase, por ejemplo, el documento U.S. 6.197.765), y reducción del consumo de alimentos que contienen grasa (publicación de la patente U.S. 2003/0035106) e hipoglucemia.

El documento US 8.101.600 describe que el pinacidil, el cromakalim y diazoxida pueden utilizarse para tratar trastornos del ánimo relacionados con la depresión o la propia depresión (la expresión "trastornos del ánimo" que se utiliza para abarcar aquellas condiciones definidas como trastornos del ánimo en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, Cuarta Edición, 1994 ("DSM-IV")). El documento US 7.018.979 describe que el pinacidil, el cromakalim y el diazoxida pueden ser útiles para suministrar selectivamente un medicamento a un tumor maligno en el cerebro o a un tumor en otra parte del cuerpo de un sujeto mamífero.

Se prevé que los componentes del Neuroaid2 puedan emplearse para un uso como se ha descrito anteriormente en relación con los KCO, pinacidil, cromakalim o diazoxida. Con respecto a los usos antes mencionados de los activadores del canal K_{ATP} y pinacidil, diazoxida y cromakalim, se pueden consultar diversas publicaciones en la técnica, incluyendo, por ejemplo, los documentos US5.744.594; WO2006026469; US 8.101.600; US 8.058.264; US 8.053.441; US 7.799.777.; US 7.115.620 US 6.417.207, así como las publicaciones enumeradas anteriormente.

En al menos algunas realizaciones descritas en la presente memoria descriptiva, los componentes Neuroaid2 se utilizan para tratar una afección seleccionada del grupo que consiste en: incontinencia (preferiblemente incontinencia urinaria), obesidad e hipertensión.

En al menos algunas realizaciones descritas en la presente memoria descriptiva, los componentes Neuroaid2 se utilizan para el tratamiento de la incontinencia, preferiblemente la incontinencia urinaria. El uso de KCO en el tratamiento de la incontinencia urinaria se describe, entre otros, en los documentos de Estados Unidos 8.053.441, 7.115.620 y 6.417.207; y se describe el uso de pinacidil en el tratamiento de la incontinencia, entre otros, en el documento EP260.790.

En al menos algunas realizaciones descritas en la presente memoria descriptiva, los componentes del Neuroaid2 se utilizan para el tratamiento de la obesidad. El uso de KOR y diazoxida en el tratamiento de la obesidad se describe, entre otros, en los documentos WO2006026469 y US7.799.777.

En al menos algunas realizaciones descritas en la presente memoria descriptiva, los componentes del Neuroaid2 se utilizan para el tratamiento de la hipertensión. Los KCO se han caracterizado por tener una potente actividad antihipertensiva in vivo y actividad vasorelajante in vitro (Quasi, U., et al., Cellular Pharmacology of Potassium Channel Openers in Vascular Smooth Muscle, Cardiovasc. Res., Vol. 28, págs. 805-810 (1994)). El documento US 8.053.441 describe el uso de KCO en el tratamiento de la hipertensión; el documento US7.115.620 describe el uso de pinacidil y cromakalim en el tratamiento de la hipertensión; los documentos WO2006026469, US 8.063.054, U.S. 2.986.573 y US 7.799.777 describen el uso de la diazoxida en el tratamiento de la hipertensión; y el documento US 7.964.623 describe el uso de cromakalim en el tratamiento de la hipertensión.

En al menos algunas realizaciones de la invención, la composición o el kit que consiste en cuatro componentes particulares seleccionados de los componentes Neuroaid2 se utilizan para proporcionar neuroacondicionamiento.

El término "neurocondicionamiento", tal como se utiliza en el presente documento, incluye una referencia a eventos moleculares inducidos farmacológicamente que previenen o reducen posibles daños cerebrales futuros. El neurocondicionamiento da como resultado la generación de tolerancia al cerebro contra un evento isquémico, epiléptico u otro evento lescicio. El efecto es similar al precondicionamiento (un enfoque clínico y experimental que ha demostrado ser eficaz), pero no requiere exposición a estímulos estresantes. El neurocondicionamiento induce profilácticamente tolerancia en el paciente, como aquellos en riesgo de sufrir un infarto. Ejemplos de tales infartos incluyen infartos resultantes de una condición seleccionada del grupo que consiste en: isquémica, transitoria o permanente, focal o generalizada; convulsiones, focales o generalizadas; inflamatorias; tóxicas (por ejemplo, radiación, productos químicos o relacionados con medicamentos); inmunológica; infecciosas; metabólica, nutricional; traumática; compresiva; neoplásica; degenerativa; genética, congénita; y de procedimiento (incluyendo, por ejemplo aquellas que requieren anestesia general, sujeción de los vasos principales o abertura de la cavidad craneal). Así, en al menos algunas realizaciones de la invención, los componentes de Neuroaid2 son para su administración a un paciente que está en riesgo de padecer un infarto como, por ejemplo, un infarto resultante de una condición seleccionada del grupo que consiste en: isquémico, transitorio o transitorio permanente, focal o generalizado; convulsiones, focales o generalizadas; inflamatorio; tóxicos (por ejemplo, radiación, productos químicos o relacionados con medicamentos); inmunológico; infecciosos; metabólico, nutricional; traumático; compresivo; neoplásico; accidente cerebrovascular, degenerativo; genético, congénito; y de procedimiento (incluyendo, por ejemplo, aquellos que requieren anestesia general, sujeción de los vasos principales o abertura de la cavidad craneal).

Preparación de los componentes Neuroaid2

Como se indicó anteriormente, el Neuroaid2 comprende nueve componentes herbarios diferentes. Las plantas utilizadas para obtener los componentes herbarios pueden ser utilizadas en su totalidad (es decir, se utiliza toda la planta) o se pueden utilizar una o más partes de las plantas. Las partes de las plantas que se pueden utilizar incluyen: las hojas, flores, tallos, raíces, semillas, esporas, tallos, rizomas, frutas, cuerpos fructíferos, y mezclas de dichas partes de la planta. A menos que el contexto indique lo contrario, el término "planta" está destinado a abarcar plantas enteras, así como una o más partes de las mismas, incluyendo las hojas, flores, tallos, raíces, semillas, esporas, tallos, rizomas, frutas y cuerpos fructíferos.

En al menos algunas realizaciones de la invención, cuando el rizoma de una planta en particular se indica como la parte preferida de la planta (por ejemplo, el rizoma chuanxiong) la raíz (radix) puede emplearse alternativa o adicionalmente. Del mismo modo, en al menos algunas realizaciones de la invención, cuando la raíz de la planta en particular está indicada como la parte preferida de la planta (por ejemplo, radix polygalae, radix astragali, y radix angelicae sinensis) el rizoma puede emplearse alternativa o adicionalmente.

Los componentes del Neuroaid2 pueden estar en su forma natural, herbácea (por ejemplo, picado en trozos pequeños o molido para producir un polvo) o en una forma más refinada (por ejemplo, extractos), o combinaciones de los mismos. El material de partida para los componentes de Neuroaid2 puede ser las plantas correspondientes en forma recién preparada o en seco. Las plantas que representan los diversos componentes de Neuroaid2 pueden procesarse individualmente o pueden combinarse y procesarse juntas. Opcionalmente, las plantas pueden ser cortadas en trozos pequeños y, cuando sea necesario, secarlas. Los ingredientes secos pueden ser molidos opcionalmente para producir un polvo. El material vegetal procesado de esta manera puede utilizarse en los diversos aspectos de la invención.

Los métodos adecuados para preparar extractos herbarios serán conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, extracción sólido-líquido, extracción líquido-líquido, extracción de fluidos supercríticos, extracción de disolvente presurizado, extracción asistida por microondas, extracción de agua subcrítica, extracción asistida por ultrasonido y extracción acelerada de disolventes. Un extracto según la presente invención puede ser preparado de manera convencional, por ejemplo, combinando material vegetal con uno o más disolventes en condiciones adecuadas para preparar el extracto. Después de que el material vegetal y el disolvente hayan estado en contacto durante un período de tiempo adecuado para formar el extracto, el disolvente y el material vegetal se separan por un método adecuado, como el filtrado o la centrifugación. El extracto (es decir, el líquido que comprende el disolvente) puede procesarse opcionalmente, como al concentrar o deshidratar el extracto, combinar el extracto con otros ingredientes (por ejemplo, diluyentes, otras hierbas/extractos herbarios, ingredientes TCM, conservantes, etc.), o una mezcla de lo anterior, etc.

Presentación de los componentes Neuroaid2

Los diversos aspectos de la invención se relacionan con los componentes de Neuroaid2 y sus usos. En la invención dichos componentes Neuroaid2 se proporcionan en forma de una composición, como una composición farmacéutica. Por lo tanto, en la invención se proporciona una composición (por ejemplo, una composición) que consiste, como ingredientes activos, en dichos cuatro componentes de Neuroaid2 particulares.

Una composición farmacéutica, como se describe en este documento, puede incluir opcionalmente un aditivo, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y, además, puede incluir otros ingredientes activos, agentes farmacéuticos, portadores, adyuvantes, etc. Ejemplos de aditivos farmacéuticamente aceptables incluyen excipientes farmacéuticamente aceptables, tampones, adyuvantes, estabilizadores, diluyentes, rellenos, tampones, estabilizadores, conservantes, lubricantes u otros materiales farmacéuticamente aceptables muy conocidos por los

expertos en la técnica o como se describe en el presente documento. En al menos algunas realizaciones, una composición farmacéutica como se describe en el presente documento comprende un excipiente y en la que dicho excipiente es opcionalmente dextrina o maltodextrina.

5 En al menos algunas realizaciones, una composición de la invención (por ejemplo, una composición farmacéutica) puede estar compuesta dentro de un kit.

10 Se entenderá que las composiciones, como se describen en el presente documento, pueden administrarse en forma pura o en una composición farmacéutica adecuada. En general, las composiciones farmacéuticas pueden prepararse según métodos que son conocidos por los expertos ordinarios en la técnica. Las composiciones que comprenden los componentes activos o los ingredientes descritos en este documento pueden incluir un portador farmacéutico convencional o diluyente y además pueden incluir otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, portadores, adyuvantes, etc. Ejemplos de portadores farmacéuticos o diluyentes adecuados incluyen soluciones salinas tamponadas de fosfato, agua, emulsiones (como emulsiones de aceite/agua), varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Algunos ejemplos de excipientes que pueden emplearse son, por ejemplo, azúcares, almidones, celulosas, gomas, proteínas, dextrina y maltodextrina. Varias formulaciones son comúnmente conocidas y se discuten a fondo en la última edición de Las Ciencias Farmacéuticas de Remington (Maack Publishing, Easton PA).

15 La composición puede ser, por ejemplo, una solución, una suspensión, líquido, hierbas picadas, polvo, una pasta, acuosa, no acuosa o cualquier combinación de los mismos.

La invención también proporciona un kit que consiste, como ingredientes activos, en los cuatro componentes particulares de Neuroaid 2 (es decir, Chuanxiong, Angelica sinensis, Polygalae y Astrágalos).

20 En al menos algunas realizaciones, los kits de la invención pueden, además de los componentes de Neuroaid2, comprender instrucciones de uso. Los kits de la invención podrán ser promovidos, distribuidos y/o vendidos como una unidad para realizar uno de los aspectos de la presente invención.

En al menos algunas realizaciones, un kit de la invención comprende los componentes Neuroaid2 y un excipiente (por ejemplo, dextrina o maltodextrina).

25 Los kits y composiciones descritas en la presente memoria descriptiva pueden utilizarse opcionalmente como se describen en la presente memoria descriptiva.

En al menos algunas realizaciones, los kits y las composiciones descritas en la presente memoria descriptiva se utilizan para la neuroprotección, el neurocondicionamiento, el tratamiento de la obesidad, el tratamiento de la hipertensión o el tratamiento de la incontinencia.

30 Administración de los componentes de Neuroaid2

35 Los componentes de Neuroaid2 descritos en el presente documento pueden administrarse por cualquier vía adecuada, como por vía oral, parenteral, intravenosa, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal o tópica, en forma líquida, semi-líquida o sólida y están formulados de una manera adecuada para cada vía de administración. El término "administración", y las variaciones de ese término, incluidas "administrar" y "administración", incluyen la puesta en contacto, la aplicación, la entrega o el suministro de una composición de la invención a un organismo o a una superficie por cualquier medio apropiado.

40 Los componentes de Neuroaid2 deben administrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como una dosis única o como parte de una serie de dosis). Por una "cantidad efectiva" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende que la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es fisiológicamente significativo si está presente en una cantidad que resulta en un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor de tal manera que se logran resultados beneficiosos o deseados (por ejemplo, para prevenir, aliviar o mejorar uno o más síntomas de una enfermedad o condición médica, y/o para prolongar la supervivencia del sujeto que está siendo tratado).

45 La cantidad exacta requerida variará entre diferentes sujetos dependiendo de factores tales como la especie que está siendo tratada, la edad, el peso y la salud general del sujeto, la condición que se está tratando y la gravedad de la condición, el modo de administración, si el tratamiento es profiláctico o para tratar una condición existente, el género del sujeto, dieta, tiempo y frecuencia de administración, combinación de fármacos, y tolerancia/respuesta a la terapia y así sucesivamente. Por lo tanto, no es posible especificar una "cantidad efectiva" exacta. La dosis efectiva para una situación determinada puede determinarse mediante la experimentación rutinaria y está dentro del juicio de cada persona experta. Por ejemplo, con el fin de formular una gama de valores de dosificación, se pueden utilizar ensayos de cultivo celular y estudios en animales.

50 Con fines ilustrativos, se administra MLC 901 típicamente en forma de 2 cápsulas, 3 veces al día.

NeuroAid se administra típicamente por vía oral (por os) 3 veces al día y cuatro cápsulas de 0,4 g cada vez. La duración del tratamiento suele ser de 3 meses/3 cursos, adaptables con respecto a la condición del paciente. Esta dosis es

adecuada para el tratamiento de accidentes cerebrovasculares. Para otras enfermedades, el tratamiento puede durar más tiempo. Para los pacientes con dificultades para tragar, las cápsulas pueden abrirse y diluirse en polvo en agua que puede beberse como tal o inyectarse a través de una sonda gástrica. Por lo tanto, se prevé una dosis diaria de aproximadamente 4,8 g. En una realización, la dosis diaria del paciente es de aproximadamente 1g a 8g; 2g a 8g; 3g a 7g; 4g a 6g; 4,25g a 5,75g; 4,5g a 5,25g; 4,5g a 5g; 4,6g a 4,10g; o 4,7g a 4,9g. Una "dosis diaria" puede ser un solo comprimido o cápsula, etc. o múltiples comprimidos o cápsulas, etc. que se deben tomar en un día determinado. Sin embargo, es de entender que las dosis pueden variar dependiendo de la necesidad de los pacientes y la gravedad de la condición que se trate, etc.

Cada curso del tratamiento de NeuroAid puede durar aproximadamente 4 semanas. Por lo general, se administran 3 cursos, más comúnmente de espaldas. No se requiere ninguna ventana terapéutica, pero se pueden agregar cursos adicionales incluso después de unos días de cese del tratamiento. Por lo tanto, cada tratamiento de NeuroAid puede durar alrededor de 12 semanas. El curso de tratamiento de NeuroAid puede ser de aproximadamente 4 a 24 semanas; 7 a 16 semanas; 9 a 15 semanas; 10 a 14 semanas; o de 11 a 13 semanas.

Ejemplos

Ejemplo 1 (no forma parte de la presente invención)

NeuroAid (MLC601 y MLC901), una medicina tradicional utilizada en China para pacientes después de un accidente cerebrovascular se ha descrito en modelos preclínicos de isquemia para inducir neuroprotección y neuroplasticidad. Este trabajo muestra los efectos de MLC901 en un modelo in vitro de privación de glucosa en oxígeno (OGD). MLC901 previene la muerte neuronal inducida por 2 horas de OGD y disminuye la entrada exagerada de Ca^{2+} inducida por glutamato en neuronas corticales expuestas a 2 horas de OGD. El efecto neuroprotector de MLC901 se asocia con una gran hiperpolarización de ~20 mV que es antagonizada por glibenclamida, el inhibidor específico de los canales K_{ATP} . Además, MLC901 fortalece la activación de los canales de K_{ATP} . Se ha demostrado directamente que MLC901 actúa como un activador de los canales K_{ATP} tan potentemente como el clásico abridor de canales K_{ATP} . La capacidad de MLC901 para producir una gran hiperpolarización, particularmente en las neuronas que han sufrido de privación de energía probablemente desempeña una función importante en los efectos neuroprotectores de este TCM que viene además de sus, previamente demostradas, propiedades neuroregenerativas.

Materiales y metodos

Cultivo celular

Neuronas de ratón embrionarias corticales

Cultivo primario de neuronas corticales

Fueron anestesiados ratones preadolescentes (E14) C57B16/J con isopentano seguido de la luxación cervical como se describió anteriormente (Heurteaux, et al., 2010). Los fetos fueron retirados y colocados en solución fría de HBSS⁺. Las cortezas cerebrales se diseccionaron en solución fría de HBSS⁺ y se eliminaron las meninges. Las muestras corticales se cortaron en trozos pequeños y se trituraron suavemente con una pipeta Pasteur de vidrio pulido al fuego en 8 ml de solución HBSS⁺. La mezcla se filtró (filtro de 40 μ m) y se centrifugó a 800 rpm durante 8 min. El sobrenadante fue retirado y el sedimento se disolvió en medio de cultivo de 2 ml. Las células se colocaron en placas de 12 pocillos recubiertas de poli-D-lisina (Sigma-Aldrich Chimie, St Quentin Fallavier, Francia) (24 mm de diámetro) con portaobjetos de vidrio (12 mm de diámetro) (CML, Nemours, Francia) a una densidad de 1×10^6 células/pocillo. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una incubadora de atmósfera humidificada del 95% de aire/5% CO₂ en Neurobasal complementada con B27, Glutamax, 100 unidades/ml de penicilina, y 100 g/ml de estreptomycin y fueron utilizados para experimentos de hasta 12 días. El crecimiento de la glía se suprimió mediante la adición de 5-fluoro-2-desoxiuridina (2 μ M) y uridina (2 μ M) durante el segundo día de cultivo.

Cultivo celular INS-R9

Las células INS-R9 se mantuvieron en medio RPMI (Coppola et al., 2008) suplementadas con 5% de suero de becerro fetal, piruvato sódico 1 mM, glutamato 2 mM, 2-mercaptoetanol 50M, 100 unidades/ml de penicilina, y 100 g/ml de estreptomycin en una atmósfera de aire del 95 %/5 % CO₂.

Modelo de privación de glucosa en oxígeno (OGD)

Se realizaron experimentos de OGD en neuronas corticales de ratón primarias sembradas a una densidad de 1.000.000 de células/placa de 35 mm después de 4 días de cultivo (Goldberg y Choi, 1993). Después de tres lavados con la solución salina equilibrada de Earl (BSS) sin glucosa y desoxigenada, las células se mantuvieron en el mismo medio BSS. La composición de la solución BSS fue (en mM): 140 NaCl, 5,4 KCl, 1,2 CaCl₂, 0,9 MgCl₂, 0,44 KH₂PO₄, 4,17 NaHCO₃ y 0,34 Na₂HPO₄. Antes de su uso, la BSS se equilibró con la mezcla de gas anaeróbico (1,2% O₂) burbujeando durante 15 minutos, si era necesario el pH ajustaba a 7,4, y se calentaba a 37°C. Luego, las células se colocaron en una incubadora humidificada a 37°C en condiciones anaeróbicas (1,2% O₂) durante dos horas. Las neuronas corticales fueron tratadas con solución salina o MLC901 (1 μ g/ml). Los tratamientos se aplicaron durante

dos horas antes de la OGD (condición pre-OGD), durante la OGD (condición de OGD) o durante dos horas después de la OGD (condición post-OGD).

Electrofisiología

Registros de corriente celular entera

- 5 Todos los experimentos electrofisiológicos se realizaron en células INS-R9 transfectadas y sembradas a una densidad de 20.000 células/placa de 35 mm. Las células transfectadas se utilizaron 48-72 h después de la transfección. Todas las grabaciones electrofisiológicas se realizaron en la configuración de células enteras de la técnica Patch Clamp (Hamill et al., 1981). Cada corriente se evaluó utilizando un amplificador Patch Clamp RK 400 (Axon Instrument, EE.UU.), de paso bajo filtrado a 3 kHz y digitalizado a 10 kHz utilizando un convertidor analógico a digital de 12 bits
- 10 digidata (serie 1322, Axon Instrument, EE. UU.). Todas las amplitudes de corriente se expresan en densidades de corriente. Los resultados se expresan como error medio y estándar de la media (SEM). Las pipetas Patch Clamp se tiraron utilizando un tirador vertical (PC-10, Narishige) de capilares de vidrio de borosilicato y tenían una resistencia de 3-5 MΩ. Para las corrientes de K⁺ la solución del baño contenía (en mM) 150 NaCl, 5 KCl, 3 MgCl₂, 1 CaCl₂ y 10 HEPES ajustada a pH 7,4 con NaOH. La solución de la pipeta contenía (en mM) 155 KCl, 3 MgCl₂, 5 EGTA y 10 HEPES ajustada a pH 7,2 con KOH. Para las corrientes de Na⁺, la solución del baño contenía (en mM) 150 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl₂, 1,5 CaCl₂, 10 glucosa y 10 HEPES ajustados a pH 7,4 con NaOH. La solución de la pipeta contenía (en mM) 135 CsCl, 2 MgCl₂, 2,5 Na₂-ATP, 5 EGTA, 2,1 CaCl₂ y 10 HEPES ajustada a pH 7,2 con CsOH. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (21-22°C). Los protocolos de estimulación y la adquisición de datos se llevaron a cabo utilizando un microordenador (Dell Pentium) que se utilizó como un software y hardware
- 20 comercial (pClamp 8.2). Las corrientes de K⁺ se registraron por pasos Patch Clamp a potenciales de membrana de -140 a +80 mV para las neuronas o -100 a +60 mV para líneas celulares transfectadas en pasos de 20 mV aplicados desde un potencial de retención de -80 mV. La duración de los pulsos de despolarización fue de 0,825 ms, y la velocidad de ciclo del pulso fue de 5 s. Las amplitudes de corriente se evaluaron al final de los pulsos de estimulación. Las corrientes de Na⁺ se registraron mediante pasos Patch Clamp a potenciales de membrana de -80 a +50 mV en pasos de 5 mV aplicados desde un potencial de retención de -100 mV. La duración de un pulso de despolarización fue de 100 ms, y la velocidad del ciclo del pulso fue de 2 s. Las amplitudes de la corriente se evaluaron en el pico de los pulsos de estimulación. Para aislar las corrientes nativas de Na⁺, se utilizó TEA en la solución extracelular para bloquear los canales de K⁺. La presencia de cadmio en la solución extracelular permitió el bloqueo de las corrientes de calcio en estas neuronas. Las células se superfusionaron continuamente con un sistema de microperfusión. Para las células INS-R9, las corrientes se registraron en condiciones de control, luego en presencia de MLC901 (1 µg/mL), MLC901 + Pinacidil (10 µM) y MLC901 + Pinacidil + Glibenclamida (10 µM). También se realizó la perfusión de secuencia de Control, Pinacil, Pinacidil + MLC901 y Pinacidil + MLC901 + Glibenclamida (10).

Grabaciones de ovocitos

- 35 Los ovocitos de *Xenopus* desfoliados fueron inyectados con 100 nL de ARNm a 0,02-0,4 µg/l para detectar la expresión Kir 6.2 y SUR 1, y se registraron 2-4 días después.

Para los estudios de electrofisiología, los ovocitos individuales se colocaron en una cámara de perfusión de 0,3 ml y se empalaron con dos microelectrodos estándar (resistencia de 1-2,5 MΩ) llenos de 3 M de KCl y un voltaje mantenido con un amplificador Dagan CA-1, en solución de potasio simétrica (en mM) con 90 KCl, 1,8 CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 Hepes, pH 7,4 con KOH.

- 40 La estimulación de la preparación, adquisición de datos y análisis se realizaron utilizando el software pClamp (Axon Instruments). Las corrientes se registraron en esta condición de control simétrico de potasio. La actividad del canal K_{ATP} se evaluó mediante el agotamiento del ATP intracelular en 3 mM de azida sódica. Se probaron MLC901 (1 µg/ml) y Pinacidil (10 µM) antes y después del agotamiento de ATP de los ovocitos. En todos los experimentos, se evaluó la inhibición por Glibenclamida (10 µM) de las corrientes registradas.

45 Análisis estadísticos

Los datos se expresaron como medias ± S.E.M. El análisis estadístico de las diferencias entre los grupos se realizó mediante el uso de prueba t no pareada o ANOVA. Cuando las proporciones F fueron significativas, se ampliaron los análisis estadísticos y se realizaron comparaciones post hoc utilizando las pruebas múltiples de pruebas de Tukey. En todos los análisis, el nivel de significancia se fijó en <0,05.

50 Resultados

MLC901 protege a las neuronas corticales contra la muerte asociada con la privación de glucosa en oxígeno

- 55 Los efectos de MLC901 se estudiaron en un modelo in vitro de isquemia en el que las neuronas corticales estaban expuestas a una privación de glucosa y oxígeno. La tinción Hoechst de núcleos de neuronas vivas se utilizó para evaluar la muerte neuronal inducida por OGD en neuronas cultivadas. Las neuronas corticales se trataron primero con solución salina o MLC901 (1 µg/ml). La dosis de MLC901 utilizada fue seleccionada sobre la base de un estudio

anterior de los inventores, en el que la aplicación de 1 µg/ml de MLC901 indujo la mejor protección contra la muerte celular en neuronas corticales en cultivo (Heurteaux et al., 2010).

5 Durante la exposición a OGD, las células se sometieron a tres condiciones de tratamiento: se aplicó MLC901 1/durante dos horas antes de OGD (condición pre-OGD), 2/durante 2 horas OGD (condición OGD) y 3/durante dos horas después de OGD (condición post-OGD). Se compararon los efectos protectores de MLC901 con la neurodegeneración inducida por OGD de células corticales. La OGD grave indujo una disminución dramática en el número de células Hoechst positivas vivas. El tratamiento con MLC601 antes, durante o después de la OGD dio lugar a un aumento significativo en la viabilidad neuronal en comparación con los controles respectivos (***P < 0,001) (n = 12 placas de 35 mm por grupo) (Figura 1). La aplicación de MLC901 después de OGD dio la mejor protección (Figura 1). Una aplicación de un inhibidor específico de los canales K_{ATP}, glibenclamida (Fosset et al., 1988, Bernardi et al., 1988) inhibió la protección inducida por MLC901, sugiriendo una participación de los canales K_{ATP} en el efecto protector de MLC901 contra el daño de la OGD (Figura 1).

El efecto neuroprotector de MLC901 puede estar relacionado con la abertura del canal K_{ATP}

15 Se realizaron experimentos en células de insulinaoma INS-R9 de rata que se sabe que expresan canales K_{ATP} sensibles a la glibenclamida que son esenciales para la secreción de insulina. Los canales K_{ATP} en las células INS-R9 fueron activados significativamente por MLC901 (1 µg/mL) y se observó un efecto aditivo con la aplicación de 10 µM de pinacidil, un activador muy conocido de los canales de K_{ATP} (Edwards y Weston, 1990; Mannhold, 2004; Quast, 1992) (Figura 2). La glibenclamida (10 µM) inhibió la corriente K_{ATP} activada por MLC901 + Pinacidil (Figura 2). Los resultados obtenidos en células INS-R9 confirman que los efectos electrofisiológicos de MLC901 están, al menos en parte, mediados por los canales K_{ATP}.

20 Las dos subunidades que constituyen el canal K_{ATP} neuronal son SUR₁ y Kir_{6.2} (Inagaki et al., 1995). La expresión de ovocitos de *Xenopus* de SUR₁ y Kir_{6.2} condujo a la generación de grandes corrientes rectificadoras internamente en respuesta a la aplicación de azida sódica (3 mM) para disminuir el ATP intracelular y aumentar la relación ADP/ATP (Ashcroft y Ashcroft, 1990) (Figura 3A). La amplitud de la corriente del canal K_{ATP} inducida por azida, sensible a la glibenclamida, se amplió mediante la aplicación de pinacidil (10 µM) y, como se esperaba, se inhibió por la glibenclamida (10 µM) (Figura 3A). A continuación, se realizó el mismo tipo de experimentos mediante MLC901. Claramente, MLC901 se comportó de igual forma que los canales K_{ATP} activados por pinacidil descritos por el tratamiento de azida (Figura 3B-C-D). Doce minutos después de la aplicación de azida, la amplitud media de la corriente a -120 mV fue -480 ± 57 nA antes y -770 ± 67 después de la aplicación de MLC901. Esta activación inducida por MLC901, como la producida por pinacidil, desapareció en presencia de glibenclamida (Figura 3B-C-D). MLC901 se comporta de forma similar al pinacidil activando el canal K_{ATP}.

Discusión de los resultados

35 Los resultados descritos en este documento demuestran que MLC901 protege a las neuronas corticales contra la muerte en un modelo in vitro de isquemia. El modelo de privación de glucosa en oxígeno imita los procesos de muerte celular observados en las regiones recuperables (penumbral) del cerebro isquémico in vivo. MLC901 previene significativamente la muerte de las células neuronales. Este efecto neuroprotector está bloqueado por glibenclamida, el inhibidor específico de los canales K_{ATP}.

40 El efecto activador de MLC901 en los canales K_{ATP} ha sido demostrado por experimentos electrofisiológicos sobre ovocitos que expresaban canales recombinantes y células de insulinaoma. Las células de insulinaoma tienen naturalmente canales K_{ATP}, esenciales para acoplar los cambios de los niveles de glucosa extracelular respecto a la secreción de insulina (Lazdunski, 1996). MLC901 induce una gran hiperpolarización en estos dos tipos de células. Se espera que esta gran hiperpolarización producida por MLC901 proteja fuertemente a las neuronas contra la muerte. MLC901 se comportó como pinacidil, un clásico abridor de canales K_{ATP} (Edwards y Weston, 1990; Mannhold, 2004, Heurteaux et al., 1995), y los efectos estimulantes de MLC901 y pinacidil fueron abolidos por glibenclamida.

45 El efecto activador de MLC901 en los canales K_{ATP} se observa a concentraciones terapéuticas utilizadas en modelos de roedores de isquemia (Heurteaux et al., 2010; Quintard et al., 2011). Por lo tanto, además de sus propiedades neuroregenerativas (Heurteaux et al., 2010), el cóctel de moléculas activas presentes en esta TCM parece actuar a través de canales K_{ATP} durante al menos una parte de sus propiedades contra la isquemia cerebral.

Ejemplo 2

50 Grabaciones de ovocitos

55 Para la expresión Kir 6.2 y SUR 1 se inyectaron ovocitos de *Xenopus* desfolículo con 100 nL de ARNm a 0,02-0,4 µg/µl, y las corrientes se registraron después de 2-4 días. Cada ovocito se colocó en una cámara de perfusión de 0,3 ml y se empaló con dos microelectrodos estándar (resistencia de 1-2,5 MΩ) llenos de KCl 3 M y voltaje mantenido con un amplificador Dagan CA-1, en solución de potasio simétrica con (90 KCl, 1,8 CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 Hepes, pH 7.4 con KOH (en mM)). La estimulación del óvulo, la adquisición de datos y el análisis se realizaron utilizando el software pClamp (Axon Instruments). Las corrientes se registraron en una condición de control simétrico de potasio. La actividad del canal K_{ATP} se evaluó mediante el agotamiento de ATP intracelular en 3 mM de azida sódica.

Protocolo de perfusión:

La corriente se registró por primera vez en condiciones de control (solución simétrica de potasio). Luego, la actividad del canal se mejoró con 6 minutos de perfusión de azida sódica 3 mM que se concentró durante todo el experimento. MLC901 u otros productos por lotes se perfundieron 6 minutos después de la perfusión de azida sódica. En todos los experimentos, se evaluó la inhibición de las corrientes registradas por Glibenclamida (10 μ M).

Resultados

Los resultados se muestran en las figuras 4 y 5. Tanto NA4A (combinación de Astragalus + Chaunxiong + Sinensis + Polygala), que se encuentran dentro del alcance de la presente invención, y NA4B (combinación de Astragalus + Chaurixiong + Sinensis + Salvia), que no forman parte de la invención, activaron el canal K(ATP) preactivado por azida. El aumento de la corriente inducida por la abertura del canal se inhibe mediante la adición de glibenclamida. 90K es la corriente de la célula no tratada.

Ejemplo 3

Los efectos in vitro de ambas muestras (Neuroaid2 y "NA3" (chuanxiong, sinensis, astrágalo)) en los canales de potasio Kir6.2/SUR2A clonados (expresados por los genes humanos KCNJ11 y SUR2A y expresados en células HEK293) se evaluaron a temperatura ambiente utilizando los genes humanos KCNJ11 y SUR2A y coexpresados en células HEK293 usando QPatch HT® (Sophion Bioscience A/S, Dinamarca), un sistema Patch Clamp automático paralelo. Las muestras se evaluaron a 10 μ g/ml con cada concentración probada en dos o más células ($n \geq 2$). Los canales se activaron con una exposición de 8 minutos a pinacidil de 10 μ M y la duración de la exposición a cada concentración de artículo de ensayo fue de 5 minutos.

Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 6. Ambas muestras NeuroAid2 y NA3 son capaces de activar el canal, los datos se expresan en porcentaje de activación del canal.

La activación del canal por ambas muestras se inhibe por una exposición de glibenclamida.

Referencias

- Amoroso, S., Schmid-Antomarchi, H., Fosset, M., Lazdunski, M., 1990. Glucose, sulfonylureas, and neurotransmitter release: role of ATP-sensitive K⁺ channels. *Science* 247, 852-854. Ashcroft, S. J., Ashcroft, F. M., 1990. Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal* 2, 197-214.
- Bernardi, H., Fosset, M., Lazdunski, M., 1988. Characterization, purification, and affinity labeling of the brain [3H]glibenclamide-binding protein, a putative neuronal ATP-regulated K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 9816-9820. Blondeau, N., Nguemeni, C., Debruyne, D. N., Piens, M., Wu, X., Pan, H., Hu, X., Gandin, C., Lipsky, R. H., Plumier, J. C., Marini, A. M., Heurteaux, C., 2009. Subchronic alpha-linolenic acid treatment enhances brain plasticity and exerts an antidepressant effect: a versatile potential therapy for stroke. *Neuropsychopharmacology* 34, 2548-2559.
- Blondeau, N., Plamondon, H., Richelme, C., Heurteaux, C., Lazdunski, M., 2000. K(ATP) channel openers, adenosine agonists and epileptic preconditioning are stress signals inducing hippocampal neuroprotection. *Neuroscience* 100, 465-474.
- Blondeau, N., Widmann, C., Lazdunski, M., Heurteaux, C., 2002. Polyunsaturated fatty acids induce ischemic and epileptic tolerance. *Neuroscience* 109, 231-241.
- Catterall, W. A., 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26, 13-25.
- Chen, C., Venketasubramanian, N., Gan, R. N., Lambert, C., Picard, D., Chan, B. P., Chan, E., Bousser, M. G., Xuemin, S., 2009. Danqi Piantang Jiaonang (DJ), a traditional Chinese medicine, in poststroke recovery. *Stroke* 40, 859-863.
- Choi, D. W., 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1, 623-634.
- Coppola, T., Beraud-Dufour, S., Antoine, A., Vincent, J. P., Mazella, J., 2008. Neurotensin protects pancreatic beta cells from apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 2296-2302.
- Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M. A., 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22, 391-397. Edwards, G., Weston, A. H., 1990. Structure-activity relationships of K⁺ channel openers. *Trends Pharmacol Sci* 11, 417-422.
- Enyedi, P., Czirjak, G., 2010. Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev* 90, 559-605.

- Fosset, M., De Weille, J. R., Green, R. D., Schmid-Antomarchi, H., Lazdunski, M., 1988. Antidiabetic sulfonylureas control action potential properties in heart cells via high affinity receptors that are linked to ATP-dependent K⁺ channels. *J Biol Chem* 263, 7933-7936.
- 5 Gan, R., Lambert, C., Lianting, J., Chan, E. S., Venketasubramanian, N., Chen, C., Chan, B. P., Samama, M. M., Bousser, M. G., 2008. Danqi Piantan Jiaonang does not modify hemostasis, hematology, and biochemistry in normal subjects and stroke patients. *Cerebrovasc Dis* 25, 450-456.
- Goldberg, M. P., Choi, D. W., 1993. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci* 13, 3510-3524.
- 10 Gribkoff, V. K., Winkquist, R. J., 2005. Voltage-gated cation channel modulators for the treatment of stroke. *Expert Opin Investig Drugs* 14, 579-592.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F. J., 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391, 85-100.
- 15 Heurteaux, C., Bertaina, V., Widmann, C., Lazdunski, M., 1993. K⁺ channel openers prevent global ischemia-induced expression of c-fos, c-jun, heat shock protein, and amyloid beta-protein precursor genes and neuronal death in rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 9431-9435. Heurteaux, C., Gandin, C., Borsotto, M., Widmann, C., Brau, F., Lhuillier, M., Onteniente, B., Lazdunski, M., 2010. Neuroprotective and neuroproliferative activities of NeuroAid (MLC601, MLC901), a Chinese medicine, in vitro and in vivo. *Neuropharmacology* 58, 987-1001.
- 20 Heurteaux, C., Guy, N., Laigle, C., Blondeau, N., Duprat, F., Mazzuca, M., Lang-Lazdunski, L., Widmann, C., Zanzouri, M., Romey, G., Lazdunski, M., 2004. TREK-1, a K⁽⁺⁾ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *Embo J* 23, 2684-2695.
- Heurteaux, C., Laigle, C., Blondeau, N., Jarretou, G., Lazdunski, M., 2006. Alpha-linolenic acid and riluzole treatment confer cerebral protection and improve survival after focal brain ischemia. *Neuroscience* 137, 241-251. Heurteaux, C., Lauritzen, I., Widmann, C., Lazdunski, M., 1995. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K⁺ channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 4666-4670.
- 25 Inagaki, N., Gonoi, T., Clement, J. P. t., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S., Bryan, J., 1995. Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 270, 1166-1170.
- Lauritzen, I., Blondeau, N., Heurteaux, C., Widmann, C., Romey, G., Lazdunski, M., 2000. Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *Embo J* 19, 1784-1793.
- 30 Lauritzen, I., De Weille, J. R., Lazdunski, M., 1997. The potassium channel opener (-)- cromakalim prevents glutamate-induced cell death in hippocampal neurons. *J Neurochem* 69, 1570-1579.
- Lazdunski, M., 1996. Ion channel effects of antidiabetic sulfonylureas. *Horm Metab Res* 28, 488-495.
- Lee, J. M., Grabb, M. C., Zipfel, G. J., Choi, D. W., 2000. Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest* 106, 723-731. Legos, J. J., Barone, F. C., 2003. Update on pharmacological strategies for stroke: prevention, acute intervention and regeneration. *Curr Opin Investig Drugs* 4, 847-858.
- 35 Lesage, F., 2003. Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharmacology* 44, 1-7.
- Lesage, F., Lazdunski, M., 2000. Molecular and functional properties of two pore domain potassium channels. *Am. J. Physiol.* 279, 793-801.
- Leybaert, L., De Ley, G., de Hemptinne, A., 1993. Effects of flunarizine on induced calcium transients as measured in fura-2-loaded neurons of the rat dorsal root ganglion. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 348, 269-274.
- 40 Liss, B., Roeper, J., 2001. Molecular physiology of neuronal KA channels. *Mol Membr Biol* 18, 117-127.
- Mannhold, R., 2004. KATP channel openers: structure-activity relationships and therapeutic potential. *Med Res Rev* 24, 213-266.
- Mazighi, M., Amarenco, P., 2011. Reperfusion therapy in acute cerebrovascular syndrome. *Curr Opin Neurol* 24, 59-62. Mourre, C., Ben Ari, Y., Bernardi, H., Fosset, M., Lazdunski, M., 1989. Antidiabetic sulfonylureas: localization of binding sites in the brain and effects on the hyperpolarization induced by anoxia in hippocampal slices. *Brain Res* 486, 159-164.
- 45 Obrenovitch, T. P., 1997. Sodium and potassium channel modulators: their role in neuroprotection. *Int Rev Neurobiol* 40, 109-135. Obrenovitch, T. P., 2008. Molecular physiology of preconditioning-induced brain tolerance to ischemia. *Physiol Rev* 88, 211-247.

- Plamondon, H., Blondeau, N., Heurteaux, C., Lazdunski, M., 1999. Mutually protective actions of kainic acid epileptic preconditioning and sublethal global ischemia on hippocampal neuronal death: involvement of adenosine A1 receptors and KATP channels. *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 1296-1308.
- 5 Quast, U., 1992. Potassium channel openers: pharmacological and clinical aspects. *Fundam Clin Pharmacol* 6, 279-293. Quintard, H., Borsotto, M., Veysiere, J., Gandin, C., Labbal, F., Widmann, C., Lazdunski, M., Heurteaux, C., 2011. MLC901, a traditional Chinese medicine protects the brain against global ischemia. *Neuropharmacology* 61, 622-631.
- 10 Shahripour, R. B., Shamsaei, G., Pakdaman, H., Majdinasab, N., Nejad, E. M., Sajedi, S. A., Norouzi, M., Hemmati, A., Manouchehri, R. H., Shiravi, A., 2011. The effect of NeuroAid (MLC601) on cerebral blood flow velocity in subjects' post brain infarct in the middle cerebral artery territory. *Eur J Intern Med* 22, 509-513.
- Venketasubramanian, N., Chen, C. L., Gan, R. N., Chan, B. P., Chang, H. M., Tan, S. B., Picard, D., Navarro, J. C., Baroque, A. C., 2nd, Pongvarin, N., Donnan, G. A., Bousser, M. G., 2009. A double-blind, placebo-controlled, randomized, multicenter study to investigate CHInese Medicine Neuroaid Efficacy on Stroke recovery (CHIMES Study). *Int J Stroke* 4, 54-60.
- 15 Young, S. H., Zhao, Y., Koh, A., Singh, R., Chan, B. P., Chang, H. M., Venketasubramanian, N., Chen, C., 2010. Safety profile of MLC601 (Neuroaid) in acute ischemic stroke patients: A Singaporean substudy of the Chinese medicine Neuroaid efficacy on stroke recovery study. *Cerebrovasc Dis.* 30, 1-6.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición o kit para su uso en un método para proporcionar neuroprotección, tratar los accidentes cerebrovasculares, los trastornos neurológicos y las isquemias o proporcionar neuroacondicionamiento para proporcionar tolerancia al cerebro contra un evento isquémico, epiléptico u otro evento lesivo, en el que la composición o el kit consta de ingredientes activos de los siguientes cuatro componentes:
- i. Poligalae (polvo fino de tenuifolia, *Polygala tenuifolia* Willd., *Polygala sibirica* L. o Yuanzhi), preferiblemente la raíz de la misma (es decir, *radix polygalae*)
 - ii. Astrágalos (Algarroba lechera o Huang Qi), preferiblemente la raíz (es decir, *radix astragali*);
 - iii. Chuanxiong; preferiblemente el rizoma del mismo (es decir, *rizoma chuanxiong*); y
- 10 iv. *Angelicae sinensis* (raíz de angélica o DanGui), preferiblemente la raíz (es decir, *radix angelicae sinensis*).
2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la composición es una composición farmacéutica que comprende un aditivo, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
3. La composición o el kit para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la neuroprotección es contra los accidentes cerebrovasculares o los trastornos degenerativos.
- 15 4. La composición o el kit para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el accidente cerebrovascular es accidente cerebral.
5. La composición o el kit para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el accidente cerebrovascular es una enfermedad cardiovascular (accidente cerebrovascular cardíaco principalmente debido a un accidente cerebrovascular de la arteria coronaria).
- 20 6. La composición o el kit para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el trastorno neurológico es una enfermedad neurodegenerativa o una lesión traumática en el cerebro.
7. Una composición o kit que consiste en ingredientes activos como los siguientes cuatro componentes:
- i. Poligalae (polvo fino de tenuifolia, *Polygala tenuifolia* Willd., *Polygala sibirica* L. o Yuanzhi), preferiblemente la raíz de la misma (es decir, *radix polygalae*)
 - 25 ii. Astrágalos (Algarroba lechera o Huang Qi), preferiblemente la raíz (es decir, *radix astragali*);
 - iii. Chuanxiong; preferiblemente el rizoma del mismo (es decir, *rizoma chuanxiong*); y
 - iv. *Angelicae sinensis* (raíz de angélica o DanGui), preferiblemente la raíz (es decir, *radix angelicae sinensis*).
8. La composición o el kit según la reivindicación 7 que comprende un aditivo, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 30

Figura 1

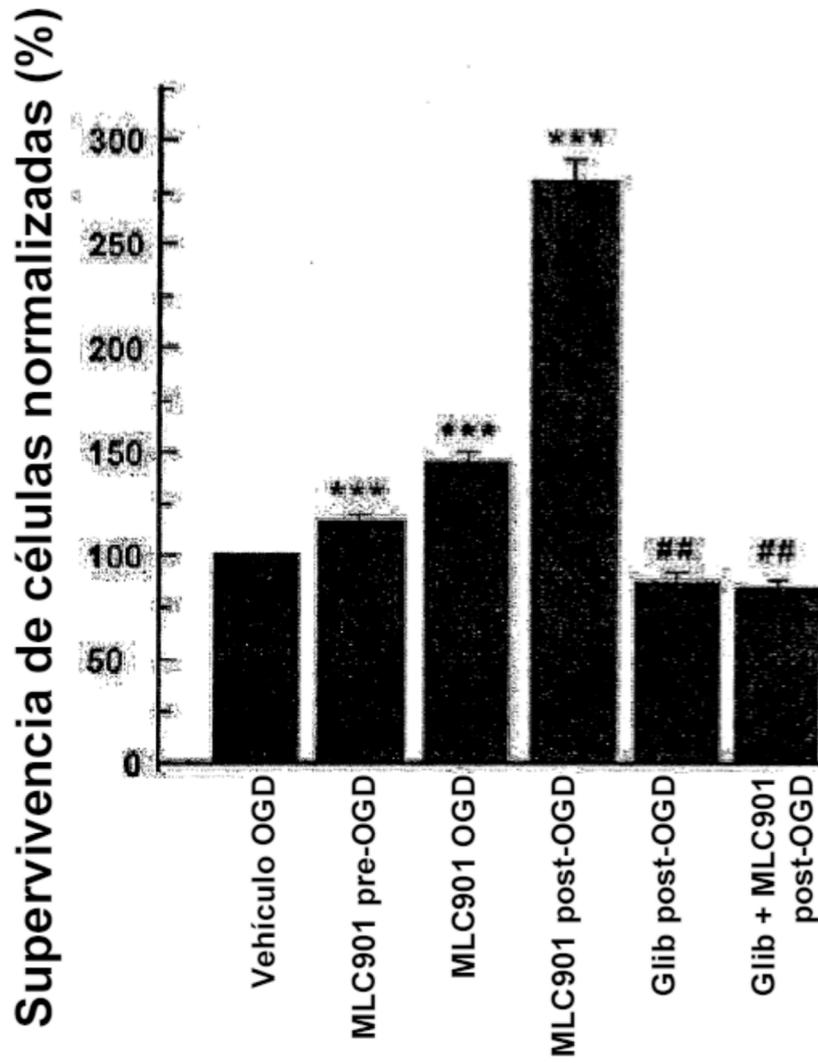


Figura 2

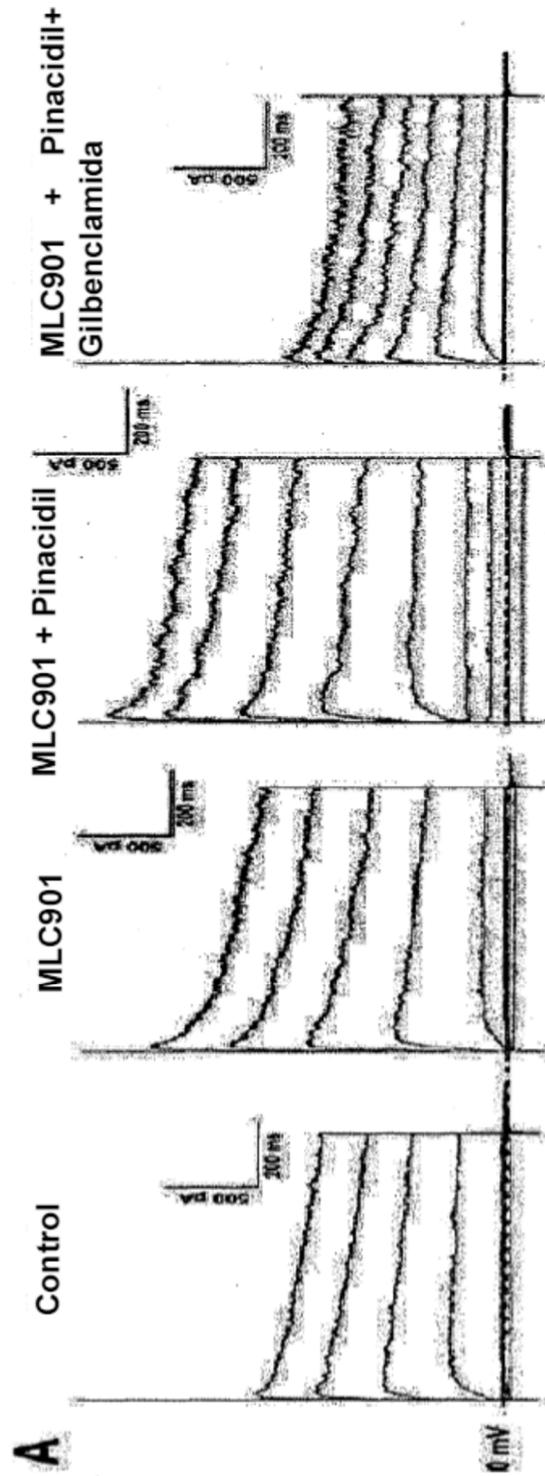


Figura 3

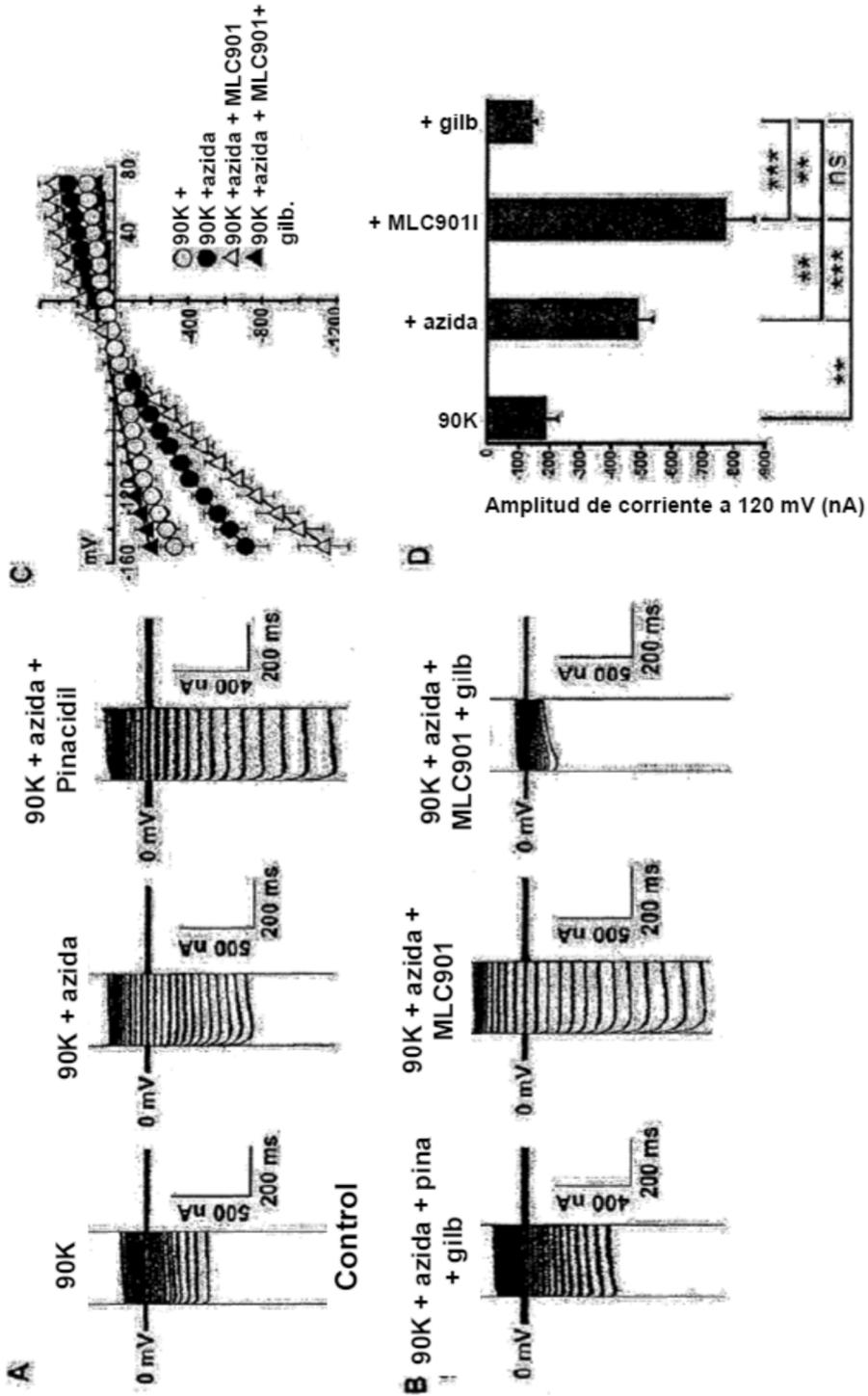


Figura 4

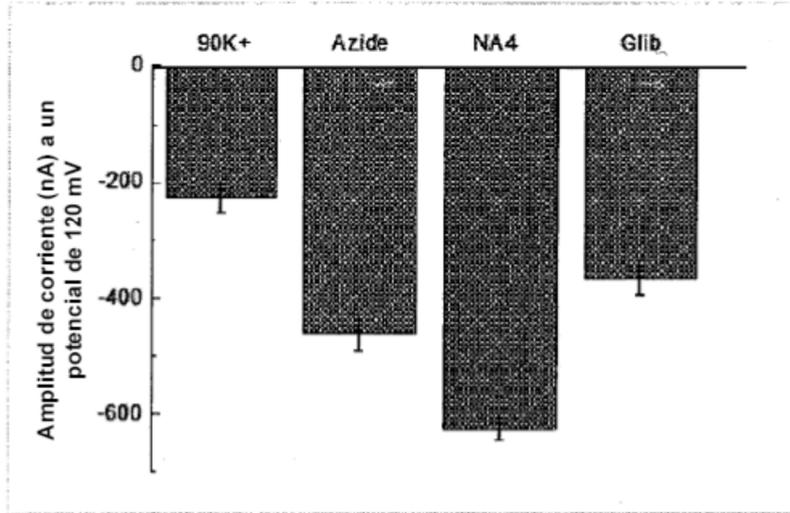


Figura 5

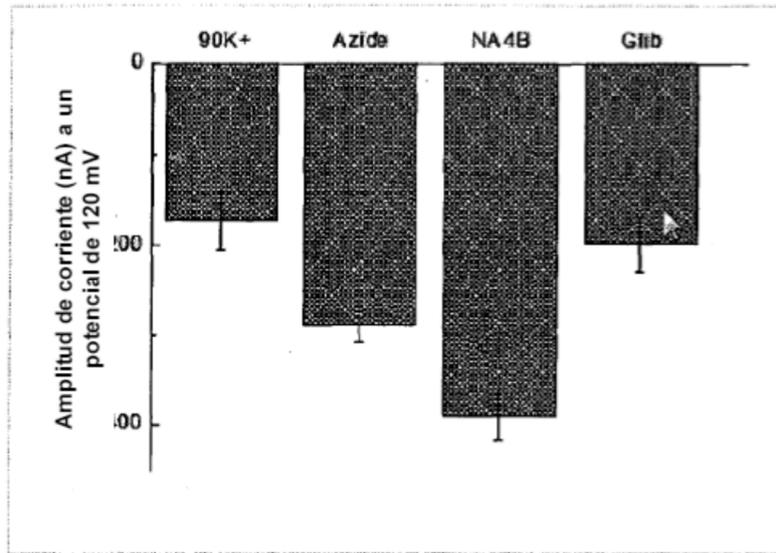


Figura 6

