



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0414655-7 B1

(22) Data do Depósito: 23/09/2004

(45) Data de Concessão: 07/03/2017



(54) Título: COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE DOENÇA VASCULAR E CÉREBROVASCULAR

(51) Int.Cl.: A61K 36/537; A61K 36/258; A61K 36/481; A61K 31/045; A61K 36/48; A61P 9/00

(30) Prioridade Unionista: 23/09/2003 CN 03144311.7

(73) Titular(es): TASLY PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.

(72) Inventor(es): FENG WEI; DEKUN LI; CHONGNIAN LUO; HONGSHUI YUE; QINGCHUANG CHEN; ZHIJUAN HUANG

“COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE DOENÇA VASCULAR E CÉREBROVASCULAR”

CAMPO TÉCNICO

5 A invenção refere-se a uma composição medicamentosa. Em particular, ela refere-se a uma composição farmacêutica para o tratamento de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares.

TÉCNICA ANTECEDENTE

10 A estatística tem demonstrado que a morbidez e a mortalidade de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares na China tem aumentado durante as últimas cinco décadas. Durante as décadas de 1950 a 1960, as doenças cardiovasculares e cerebrovasculares foram classificadas em quinto e sexto lugar de todas as doenças que causam mortes. Desde 1975, no entanto, elas ascenderam ao segundo e terceiro lugares respectivamente, e a morte causada por doenças cardiovasculares e cerebrovasculares têm assumido o
15 primeiro lugar em todas as mortes causadas por doenças. De fato, a mortalidade de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares em chineses respondeu por 42,6% de todas as mortes em 2001, a partir de 12,07% em 1975. Atualmente, elas causam cerca de 2 milhões de mortes a cada ano. Alguns pacientes sobrevivem, mas a maior parte dos sobreviventes estão
20 incapacitados e são incapazes de cuidar de si mesmos em sua vida diária, o que vem a causar sobrecargas para as suas famílias e para a sociedade.

As doenças cardiovasculares e cerebrovasculares estão também conduzindo a causas de mortes em países ocidentais. Com base em dados epidemiológicos correntes, é estimado que até 2020 a doença arterial
25 coronária e a hemorragia cerebral sejam ainda a primeira e a segunda causas de mortes de seres humanos, mesmo apesar do fato de que a ordem de causas de morte devido a doenças humanas terá sido significativamente alterada. É estimado que até então, as mortes globais por doença arterial coronária irão aumentar de 6,3 milhões em 1990 para 11 milhões; e as mortes por
30 hemorragia cerebral serão de até 4,4 milhões a 7,7 milhões. Durante estes 30

anos, a morte causada por doenças do sistema circulatório aumentarão para 59,6%. As mortes por doença arterial coronária e derrame aumentarão para 74, 6% e 75%, respectivamente. Todos estes dados mostram que as doenças cardiovasculares e cerebrovasculares não são apenas as doenças principais, 5 que afetam danosamente a saúde humana; elas são também correntes e permanecerão a “causa de morte nº 1” conduzindo à morte ou à incapacidade.

Dentre as drogas terapêuticas para o tratamento de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, medicações com patente chinesa tradicionais e medicações ocidentais são administradas com efeitos 10 focalizados em diferentes aspectos: medicações de patente chinesa tradicionais apresentam menos efeitos colaterais e portanto, conquistaram uma boa parte do mercado. Dentre as medicações de patente chinesa tradicionais para o tratamento de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, aquelas que compreendem, como componentes ativos, 15 ingredientes ativos de partes efetivas biológicas de ervas, tais que notoginsenosídeo, ácido salvianólico, isoflavonas de radix puerarina, e gipenosídeos, estão atraindo mais e mais atenções. Como as partes biologicamente efetivas nas ervas medicinais de patente chinesa tradicionais para o tratamento de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares têm 20 alcançado as respectivas funções e efeitos focalizados em diferentes aspectos, é esperado que elas encontrem uso em administração combinada. Por outro lado, correntemente, as medicações de patente chinesa tradicionais, baseadas em partes de ervas biologicamente efetivas únicas, em especial sob a forma de soluções para injeção, tais que XUESAITONG, XUESHUANTONG (marcas 25 registradas), não satisfazem à demanda quanto à administração combinada. Além disso, a simples mistura de algumas soluções para injeção de medicações de patente chinesa tradicional sem a aprovação prévia da State Food and Drug Administration representa um risco de reações adversas inesperadas, tais que o rápido aumento da pressão sanguínea, febre e alergia.

Além disso, será muito importante prover composições mais efetivas e convenientes e partes biologicamente ativas de ervas para aplicações clínicas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO:

Deste modo, é um objeto da presente invenção prover uma
5 composição mais efetiva e conveniente de partes bioativas de ervas e uma
preparação das mesmas para o tratamento de doenças cardiovasculares e
cerebrovasculares, o que torna possível superar os defeitos das medicações de
patente chinesa tradicionais, com base em partes de ervas biologicamente
ativas únicas, que não podem satisfazer à necessidade clínica quanto à
10 administração combinada, e evitar reações colaterais potenciais, associadas
com a simples mistura conjunta de drogas.

A presente invenção pode ser implementada como descrito nas
modalidades que se seguem.

As composições farmacêuticas da presente invenção
15 compreendem

Extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae;

Extrato de Radix Notoginseng;

Extrato de Radix Astragali; e

Borneol ou óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae.

20 Em uma modalidade preferida da presente invenção, a
composição de acordo com a invenção compreende:

5,0% - 70,0% de Extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae;

10,0% - 85,0% de Extrato de Radix Notoginseng;

5,0% - 70,0% de Extrato de Radix Astragali; e

25 1,0%- 15,0% de Borneol ou óleo de Lignum Dalbergiae
Odoriferae.

Em uma outra modalidade preferida da presente invenção, a
composição de acordo com a invenção compreende:

15,0% - 50,0% de Extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae;

25,0% - 65,0% de Extrato de Radix Notoginseng;
 15,0% - 50,0% de Extrato de Radix Astragali; e
 2,0% - 12,0% de Borneol ou óleo de Lignum Dalbergiae
 Odoriferae.

5 Em ainda uma outra modalidade de acordo com a presente invenção, a composição de acordo com a invenção compreende:

20,0% - 30,0% de Extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae;
 30,0% - 55,0% de Extrato de Radix Notoginseng;
 20,0 % - 30,0% de Extrato de Radix Astragali; e
 10 4,0% - 10,0% de Borneol ou óleo de Lignum Dalbergiae
 Odoriferae.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, a composição de acordo com a invenção compreende:

23% de Extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae;
 15 45,0 % de Extrato de Radix Notoginseng;
 23% de Extrato de Radix Astragali; e
 9% de Borneol ou óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae.

Em ainda uma outra modalidade da composição de acordo com a invenção, o referido extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae
 20 compreende de 45%-70% de ácido salvianólico B, 2% -10% de ácido salvianólico E, 4% - 20% de ácido rosmarínico, 1% - 10% de ácido litospérmico, e mais do que 70% de ácidos salvinólicos.

Em ainda uma outra modalidade preferida da composição de acordo com a invenção, o referido extrato de Radix Notoginseng compreende
 25 de 2% - 10% de notoginsenosídeo R1, 2% - 6% de ginsenosídeo Re, 15% - 40% de ginsenosídeo Rg1, 15% - 40% de ginsenosídeo Rb1, 5%-12% de ginsenosídeo Rd, e mais do que 70%, preferivelmente mais do que 80%, de saponinas de Radix Notoginseng.

Em ainda uma outra modalidade preferida da modalidade da

composição de acordo com a invenção, o referido extrato de Radix Astragali compreende de 5% - 15% de astragalosídeo I e mais do que 70% de saponinas de Radix Astragali.

5 Em uma outra modalidade preferida da composição de acordo com a invenção, o referido Extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae compreende mais do que 80% de ácidos salvínolicos; o referido Extrato de Radix Notoginseng compreende mais do que 80% de saponinas de Radix Notoginseng; o referido extrato de Radix Astragali compreende mais do que 80% de saponinas de Radix Astragali.

10 Em ainda uma outra modalidade preferida da composição de acordo com a invenção, ela está sob a forma de injeção, comprimidos, comprimidos para a liberação sustentada, pastilhas, grânulos, pó para injeção, cápsulas e microgrânulos.

15 Em ainda uma outra modalidade preferida da composição de acordo com a invenção, ela está sob a forma de uma injeção ou pó para a injeção.

A composição de acordo com a invenção é usada para o tratamento de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares.

20 O extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae das composições farmacêuticas acima pode ser preparado através de processos da arte anterior, por exemplo, através do processo exposto nos pedidos de patente CN 1352985A, CN1247855A, CN1242364A, CN 1384090A, CN 1459448A, e Guo Ying et al., *The Journal of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine*, 2001, 24 (4); 6. Ele pode ser também obtido através de processos
25 similares ao acima com modificações apropriadas.

O presente extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae compreende de 45% -70% de ácido salvianólico B, 2% -10% de ácido salvianólico E, 4-20% de ácido rosmarínico, 1%- 10% de ácido litospérmico, e mais do que 70%, preferivelmente mais do que 80%, de ácidos salvínolicos.

Independentemente do processo de preparação do extrato de *Radix Salviae Miltiorrhizae*, a expressão “*Radix Salviae Miltiorrhizae*”, como aqui usada, significa que o conteúdo dos extratos está dentro dos escopos, conforme relacionados; e para aquele propósito, os extratos brutos podem ser
5 adicionalmente refinados, tal como através de concentração, de modo a satisfazer os requerimentos em termo do conteúdo dos componentes. Os componentes e seu conteúdo podem ser caracterizados e determinados como se segue, respectivamente:

1. Determinação dos conteúdos do ácido salvianólico B,
10 ácido salvianólico E, ácido rosmarínico, e ácido litospérmico e no extrato de *Radix Salviae Miltiorrhizae* (HPLC).

- a. Condições Cromatográficas:

Carga: Octadecilsilil- Sílica gel; fase móvel: acetonitrila- água-
ácido fosfórico

- 15 (23,5: 76, 5: 0,02); comprimento de onda de detecção: 288 nm
As placas teóricas não são inferiores a 5000, calculadas com base no pico do ácido salvianólico B.

- b. Preparação de Soluções de Controle:

- 0,2 mg/ ml de solução de controle de ácido salvianólico B é
20 preparada pela mistura da amostra de controle com a fase móvel. De modo similar, são também preparados 0,02 mg/ ml da solução de controle de ácido Salvianólico E, 0,05 mg/ ml da solução de controle de ácido Rosmarínico, e 0,01 mg/ ml da solução de controle do ácido Litospérmico.

- c. Preparação de Soluções de Amostra:

- 25 35 mg do extrato de *Radix Salviae Miltiorrhizae* são pesados acuradamente em uma garrafa de medição de 25 ml. À garrafa, é adicionada a fase móvel para dissolver a amostra. A solução resultante é adicionalmente diluída com agitação simultânea para 25 ml com a fase móvel. 5 ml da solução da amostra são colocados no interior de uma garrafa de medição de

25 ml, e à garrafa é adicionada a fase móvel para completar 25 ml, com agitação da solução resultante para que ela seja intimamente misturada.

d. O Procedimento de Ensaio

10 10 µl de cada uma das soluções de controle e soluções de amostra são testados em cromatografia líquida, respectivamente.

2. Determinação dos ácidos salvinólicos no extrato de *Radix Salviae Miltiorrhizae* (Espectrofotometria)

a. Preparação de Soluções de Controle:

10 20 µl/g/ ml da solução de ácido Salvianólico B são preparados pela mistura da amostra com a mistura de acetonitrila- água- ácido fosfórico (23,5: 76,5: 0,02).

b. Preparação de Soluções de Amostra:

15 25 mg de extrato de *Radix Salviae Miltiorrhizae* são pesados acuradamente no interior de uma garrafa de medição de 50 ml. À garrafa, é adicionada a mistura de acetonitrila- água- ácido fosfórico (23, 5: 76, 5: 0,02). A solução resultante é diluída com agitação simultânea para 25 ml com a referida mistura. 2 ml da solução da amostra são então introduzidos acuradamente ao interior de uma garrafa de medição de 50 ml. A referida mistura é adicionada e completada até 25 ml, com agitação da solução
20 resultante para torná-la intimamente misturada.

b. O Procedimento de Teste:

25 Tomar acetonitrila- água- ácido fosfórico (23,5: 76,5: 0,02) como a fórmula neutra, o valor de absorção das soluções de controle e das soluções de amostra sendo determinado individualmente sob o comprimento de onda de 288 nm usando Espectrofotometria (China Pharmacopoeia, edição 1955, volume 1, apêndice VA). Os cálculos são baseados na fórmula que se segue:

$$\text{Ácidos Salvinólicos (\%)} = f(A - B) + B$$

em que, f é 0,626, fator de correção; A é o conteúdo de ácidos

salvinólicos determinado através de espectrofotometria contra o ácido salvinólico B; B é o conteúdo de ácido salvianólico B, determinado através de HPLC.

3. Espectro de impressão digital por HPLC do referido 5 extrato de *Radix Salviae Miltiorrhizae*

Para o método de determinação, é feita referência à descrição em conexão com a determinação do ácido salvianólico B e E, ácido rosmarínico, ácido litospérmico no acima (1). A duração do tempo de gravação é de 60 minutos.

10 De todos os picos de impressão digital comuns, o pico do ácido salvianólico B, um pico comum, que representa uma área de pico relativamente grande e estável, é selecionada como o pico de referência. O tempo de retenção relativo e a área de pico relativa são calculados contra o tempo de retenção e a área de pico do pico de referência. Existem 5-7 picos
15 comuns na impressão digital do extrato de *Radix Salviae Miltiorrhizae*, e existem tipicamente 6 picos comuns. Os tempos de retenção relativos dos 6 picos comuns são da ordem de 0,55 - 0,65 (pico do ácido salvianólico E), 0,66 – 0,70 (pico do ácido rosmarínico), 0,71 - 0,79 (pico do ácido litospérmico), 1 (pico do ácido salvianólico B), 1,03 – 1,12, 1,21 - 1,30. De todos os picos
20 comuns, apenas o pico do ácido salvianólico B, o pico de referência, possui uma razão de pico único para área de pico total superior a 20%. A área de pico do ácido salvianólico B responde por 57% - 87% da área de pico total; a sua área de pico relativo é 1. Com o tempo de retenção relativo de 0,66 – 0,70, a área de pico do pico do ácido rosmarínico responde por 3% - 18% da
25 área de pico total; e a sua área de pico relativa é de 0,03 - 0,25. A área de pico total do pico não- comum é inferior a 10% da área de pico total.

O extrato de *Radix Notoginseng* das composições farmacêuticas acima pode ser preparado através de processos da arte anterior, por exemplo, através do processo exposto na patente chinesa ZL 1095363C,

pedido de patente chinês CN1352985A, Qian Tianxiang et al., *Foreign Medical Sciences, Plant Medicine Section*, 1997, 12 (4)), Tang Doguang, *The Journal of Chinese Traditional Patent Medicine*, 1990, 12 (8): 5, *The Standard of Public Health Ministry of China* WS3- B- 3590- 2001 (z). Ele
 5 pode ser também obtido através de processos similares aos acima, com modificações apropriadas. Ele está também disponível comercialmente no mercado, tal que sob a forma de um extrato compreendendo 95% (determinado por UV) de saponinas de Radix Notoginseng ($Rb1 \geq 30\%$, $Rg1 \geq 20\%$, $R1 \geq 15\%$, determinado por HPLC).

10 O presente extrato de Radix Notoginseng compreende de 2% - 10% de notoginsenosídeo R1, 2% - 6% de ginsenosídeo Re, 15% - 40% de ginsenosídeo Rg1, 15% - 40% de ginsenosídeo Rb1, 5% - 12% de ginsenosídeo Rd, e mais do que 70%, preferivelmente mais do que 80%, de saponinas de Radix Notoginseng. Independentemente do processo de
 15 preparação do extrato de Radix Notoginseng, a expressão “ Extrato de Radix Notoginseng ”, tal como aqui usada, significa que os conteúdos dos extratos recaem dentro dos escopos, tal como relacionados; e para este propósito, os extratos brutos podem ser adicionalmente refinados, tal que através de concentração, de modo a satisfazer os requerimentos, em termos de conteúdos
 20 dos componentes. Os componentes e o seu conteúdo podem ser caracterizados e determinados respectivamente como se segue:

1. Determinação dos conteúdos de ginsenosídeo Re, ginsenosídeo Rd, notoginsenosídeo R1, ginsenosídeo Rg1, e ginsenosídeo Rb1 no extrato de Radix Notoginseng (HPLC).

25 a. Condições Cromatográficas e Teste de Adequabilidade do Sistema

Carga: Octadecil- Sílica Gel; Temperatura da Coluna: 40°C; Taxa de Fluxo: 0,7 ml/ min.; comprimento de onda de detecção: 203 nm; Gradiente de Fase Móvel como se segue:

Tempo	Água	Acetonitrila
0	70	30
10	70	30
30	10	90

b. Preparação de Soluções de Controle:

0,2 mg/ ml de solução de controle de ginsenosídeo Re são preparados pela mistura da amostra de controle com metanol. De modo similar, são também preparados 0,4 mg/ ml de solução de controle de ginsenosídeo Rd, 0,2 mg/ ml de solução de controle de ginsenosídeo R1, 0,4 mg/ ml de solução de notoginsenosídeo Rg1 e 0,4 de solução de controle de ginsenosídeo Rb1, respectivamente.

c. Preparação de Soluções da Amostra:

20 mg do extrato de Radix Notoginseng são pesados acuradamente em uma garrafa de medição de 50 ml. À garrafa, é adicionada a fase móvel à amostra dissolvida. A solução resultante é adicionalmente diluída com agitação simultânea para 50 ml com a fase móvel.

d. O Procedimento de Teste

10 µl e cada uma das soluções padrões e das soluções de amostra são injetadas no sistema de HPLC, e são analisadas. O espectro de HPLC do extrato de Radix Notoginseng da presente invenção é então obtido.

(1) Determinação de saponinas de Radix Notoginseng no extrato de Radix Notoginseng acima (Espectrofotometria)

(2) Espectro de Impressão Digital de HPLC do extrato de Radix Notoginseng

O método de determinação é referido na descrição do ginsenosídeo Re, ginsenosídeo Rd, ginsenosídeo R1, notoginsenosídeo Rg1, e ginsenosídeo Rb1 acima (1) através de HPLC. A duração do tempo de gravação é de 30 minutos.

De todos os picos de impressão digital comuns, o pico de

ginsenosídeo Rg1, representando uma área de pico relativamente grande e estável, é selecionado como o pico de referência. O tempo de retenção relativo e a área de pico relativo são calculados contra o tempo de retenção e a área de pico do pico de referência. Existem 9-12 picos comuns no espectro de impressão digital do extrato de Radix Notoginseng acima, e existem tipicamente 11 picos comuns. Os tempos de retenção relativos dos 11 picos comuns são da ordem de 0,77 - 0,85 (pico de notoginsenosídeo R1), 0,87 - 0,97 (pico de ginsenosídeo Re), 1 (pico de ginsenosídeo Rg1, isto é pico de referência), 2,58- 2,67, 0,68- 2,76, 2,77 - 2,81, 2,82 - 2,91 (pico de ginsenosídeo Rb1), 2,95 - 3,03, 3,05 - 3,13, 3,15 - 3,22 (pico de ginsenosídeo Rd), 3,24 - 3,91. De todos os picos comuns, apenas o pico do ginsenosídeo Rg1 e o pico do ginsenosídeo Rb1 possuem a razão de área de pico único para a área de pico total superior a 20%. A área de pico de ginsenosídeo Rg1, o pico de referência responde por de 20% - 35% da área total de pico; a sua área de pico relativa é 1. A área de pico de ginsenosídeo RB1 responde por de 30% - 50% da área de pico total; a sua área de pico relativo é de 0,85 - 2,50. A área de pico de notoginsenosídeo R1 responde por de 2% - 8% da área de pico total; a sua área de pico relativa é de 0,06 - 0,40. A área de pico de ginsenosídeo Rd responde por de 5% - 14% da área de pico total; a sua área de pico relativa é de 0,14 - 0,70. A área de pico total do pico não- comum é inferior a 10% da área de pico total.

O extrato de Radix Astragali da composição farmacêutica acima pode ser preparado através da arte antecedente, por exemplo, através das exposições na patente chinesa CN1096269C, Yu Hao et al., *West China Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 1993, 8 (3): 163, Teng Xinglong et al., *Heilongjiang Medical Journal*, 2002, 15 (5): 340, Wang Zhijie et al., *Journal of Zhejiang College of Traditional Chinese Medicine*, 2001, 25 (5): 43. Ele pode ser também obtido através de processos similares aos acima com modificações apropriadas. Ele está também comercialmente disponível, tal

que sob a forma de um extrato compreendendo 80%-98% (determinado por UV) de extrato de Radix Astragali.

O presente extrato de Radix Astragali compreende de 5% - 15% de Astragalosídeo I e saponinas de Radix Astragali em mais do que 70%,
5 ou saponinas de Radix Astragali em mais do que 80 %, preferivelmente. Independentemente do processo de preparação do extrato de Radix Astragali, a expressão “extrato de Radix Astragali”, como aqui usada, significa que os conteúdos dos extratos recaem dentro dos escopos, tal como relacionados; e para aquele propósito, os extratos brutos podem ser adicionalmente refinados,
10 de modo a satisfazer os requerimentos em termos dos conteúdos dos componentes.

O Borneol usado na composição acima pode ser de ocorrência natural ou sintetizado.

O óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae usado na referida
15 composição pode ser obtido através da destilação de Lignum Dalbergiae Odoriferae.

As composições da presente invenção podem ser formuladas em várias formas de dosagem, através da combinação com um ou mais adjuvantes farmacêuticamente aceitáveis. O referido adjuvante inclui, mas
20 não está limitado a, amido, dextrina, lactose, celulose microcristalina (avicel), hidroxipropil metil celulose (HPMC), polietileno glicol, estearato de magnésio, gel de microsilício, xilitol, lactitol, glicose, glicina, D-manitol e os similares. A presente composição pode estar sob as formas de injeções, comprimidos, comprimidos de liberação sustentada, pastilhas, grânulos, pó
25 para a injeção, cápsulas, microgrânulos e os similares. Comprimidos, pastilhas, pó para a injeção, e cápsulas são preferidos. O conteúdo total dos ácidos salvinólicos, saponinas de Radix Notoginseng e saponinas de Radix Astragali está, de modo preferido, acima de 80%, se as composições da presente invenção forem formuladas sob a forma de injeções ou pó para

injeção.

As matérias primas da composição de acordo com a invenção são fáceis de serem obtidas e, deste modo, facilitam a produção comercial da composição de acordo com a invenção. A presente composição pode ser
 5 formulada sob várias formas, conforme desejado, a prover medicação de patente tradicional chinesa moderna mais conveniente, eficiente e de alta qualidade controlada para aplicações clínicas.

A presente invenção compara os efeitos de isquemia anticerebral das composições de acordo com a invenção; ácidos salvinólicos,
 10 acrescidos de saponinas de *Radix Notoginseng*, além de broneol ou óleo de *Lignum Dalbergiae Odoriferae*; ácidos salvinólicos acrescidos de saponinas de *Radix Notoginseng*; ácidos salvinólicos e saponinas de *Radix Notoginseng*, usando o modelo de isquemia cerebral localizada causado pela aplicação de hexaidrato de cloreto de ferro (III) localmente na artéria cerebral mediana, e
 15 pela determinação dos sintomas neurológicos e da área de enfarte cerebral. Os resultados mostram que a presente composição possui um efeito significativo sobre a isquemia anticerebral. Os seus efeitos terapêuticos são mais significativos do que aqueles de ácidos salvinólicos únicos ou de saponinas de *Radix Notoginseng*, mais significativos do que os ácidos salvinólicos
 20 acrescidos de saponinas de *Radix Notoginseng*, e mais significativos do que saponinas de ácidos salvinólicos acrescidas de *Radix Notoginseng*, além de Broneol ou óleo de *Lignum Dalbergiae Odoriferae*. Os resultados indicam que a composição farmacêutica da presente invenção, isto é a combinação de extrato de *Radix Salviae Miltiorrhizae* acrescido de extrato de *Radix*
 25 *Notoginseng*, além de extrato de *Radix Astragali* e Broneol, ou extrato de *Radix Salviae Miltiorrhizae* acrescido de *Radix Notoginseng*, além de extrato de *Radix stragali* e óleo de *Lignum Dalbergiae Odoriferae*, possuem efeito sinérgico significativo.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Fig. 1: espectro de impressão digital de HPLC de extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae (0- 60 min.);

Fig. 2: extrato de impressão digital de HPLC de extrato de Radix Notoginseng (0- 30 min.).

5 Nas descrições da presente invenção, todos os percentuais estão em peso, a não ser que indicado de outro modo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS MODALIDADES

A invenção será melhor entendida com referência aos exemplos que se seguem. Os exemplos que se seguem destinam-se a
10 propósitos ilustrativos e não têm a intenção de limitar o escopo da invenção.

Exemplo 1:

Extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae:

O extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae foi preparado através do método exposto no pedido de patente chinês CN 1459448A. Deste modo, 5
15 kg de Radix Salviae Miltiorrhizae foram moídos a um pó grosso e então extraídos, 3 vezes, com água deionizada a 100° sob uma condição de ebulição branda. Para a primeira extração, foram adicionados 27,5 kg de água e aquecidos durante 1 hora; para a segunda e terceira extrações, 15 kg de água foram adicionados e aquecidos durante 0,5 hora, respectivamente. A acidez
20 do extrato foi ajustada ao pH de 2 com 10% de HCl e então filtrada. O filtrado foi carregado sobre uma coluna de resina de poliamida (a quantidade de resina seca é de dois terços da quantidade do extrato bruto). A coluna foi eluída com água deionizada em 5 vezes o volume da coluna, seguido por 5 vezes o volume da coluna de solução de NaHCO₃ a 0,1 %. O eluato foi coletado.
25 Após ajuste do pH para 2 com 10% de HCl, o eluato foi carregado sobre resina de absorção macroporosa D₁₀₁. A resina foi eluída com água deionizada até que o eluato se tornou neutro. Então, a coluna foi eluída com 95% de etanol e a faixa de cor foi coletada. A solução coletada foi concentrada sob pressão reduzida até a secagem. O material seco foi dissolvido em água e

então armazenado no refrigerador durante a noite. Após a filtração através de um filme de filtro microporoso de celulose misto, foi obtido o extrato de ácidos salvianólicos. Ele foi ajustado para o pH de 6, 0 com 2% de solução de NaOH e imediatamente liofilizado para fornecer 221 g de pó seco congelado da material de extrato de *Radix Salviae Miltiorrhizae*. O rendimento foi de 4,4% de material bruto de *Radix Salviae Miltiorrhizae*.

O extrato de *Radix Salviae Miltiorrhizae* assim obtido continha ácido salvianólico A, ácido salvianólico B, ácido salvianólico C, ácido salvianólico D, ácido salvianólico E, ácido salvianólico G, miltionona I, ácido rosmarínico, ácidos litospérmico, danshensu e assim por diante. Caracterizado pelo fato de que o conteúdo do referido ácido salvianólico B era de 53,73%, do ácido salvianólico E de 3,7%, do ácido rosmarínico de 5,2%, do ácido litospérmico de 1,7% e dos ácidos salvianólicos de 83,94%. Ocorreram 6 picos comuns apresentados no espectro de impressão digital de HPLC do extrato de *Radix Salviae Miltiorrhizae* (a média de 10 bateladas). As médias dos tempos de retenção relativos para estes 6 picos comuns foi, na ordem dada, de 0,60 (pico de ácido salvianólico E), 0,68 (pico de ácido rosmarínico), 0,73 (pico de ácido litospérmico), 1 (pico de ácido salvianólico B), 1,08, 1,26. Dos picos comuns, apenas o pico do ácido salvianólico B, que era o pico de referência, possuía a razão de área de pico único para a área de pico total superior a 20%. A área de pico do ácido salvianólico B respondeu por 72% (média) da área de pico total; e sua área de pico relativa foi de 1; A área de pico do ácido rosmarínico respondeu por 10% (média) da área de pico total; e sua área de pico relativa foi de 0,14 (média). A área de pico total de picos não- comuns foi inferior a 10% da área de pico total. O espectro de impressão digital de HPLC de *Radix Salviae Miltiorrhizae* é apresentada na Figura 1.

Extrato de *Radix Notoginseng*:

As saponinas de *Radix Notoginseng*, que estavam

comercialmente disponíveis, foram refinadas para produzir o extrato de Radix Notoginseng desejado. O extrato obtido continha ginsenosídeo Rb 1, ginsenosídeo Rd, ginsenosídeo Re, ginsenosídeo Rg1, ginsenosídeo Tg2, ginsenosídeo Rg3, ginsenosídeo Rh1, ginsenosídeo Rh2, panaxitriol, notoginsenosídeo R1, notoginsenosídeo R2, notoginsenosídeo R3, 20-gluco-
 5 ginsenosídeo RF. Caracterizado pelo fato de que o conteúdo de Re é de 3,9%, de ginsenosídeo RG1 é de 34,3%, de ginsenosídeo Rb1 de 31,0%, de ginsenosídeo Rd de 8,8%, de notoginsenosídeo R1 de 6,8%, e de saponinas de Radix Notoginseng de 94%. Ocorreram 11 picos comuns apresentados no
 10 espectro de impressão digital por HPLC (a média de 10 bateladas) do extrato de Radix Notoginseng. As médias dos tempos de retenção relativos para estes 11 picos comuns, foram, na ordem dada, 0,82 (pico de notoginsenosídeo R1), 0,94 (pico de ginsenosídeo Re), 1 (pico de ginsenosídeo Rg1, pico de referência), 2,63, 2,745, 2,79, 2,85 (pico de ginsenosídeo Rb1), 2,99, 3,08,
 15 3,18 (pico de ginsenosídeo Rd), e de 3,28. De todos os picos comuns, o pico de ginsenosídeo Rg1 e o pico de ginsenosídeo Rb1 e a razão de área de pico único para área de pico total superior a 20%. A área de pico de ginsenosídeo Rg1 (isto é, pico de referência) respondeu por 28% (média) da área de pico total; e a sua área de pico relativa foi de 1. A área de pico de ginsenosídeo Rb1 respondeu por 39% (média) da área de pico total; e a sua área de pico
 20 relativa foi de 1,36 (média). A área de pico de notoginsenosídeo R1 respondeu por 6% (média) da área de pico total; e a sua área de pico relativa foi de 0,20 (média). A área de pico de ginsenosídeo Rd respondeu por 10% (média) da área de pico total; e sua área de pico relativa foi de 0,37 (média).
 25 A área de pico total de picos não- comuns foi inferior a 10% da área de pico total. O espectro de impressão digital de HPLC de Radix Notoginseng é apresentado na Fig. 2.

Extrato de Radix Astragali:

O extrato de Radix Astragali que estava comercialmente

disponível foi adicionalmente refinado. O extrato obtido continha acetilastragalosídeo, astragalosídeo I, astragalosídeo II, astragalosídeo III, astragalosídeo IV, isoastragalosídeo I, isoastragalosídeo II, astramembranina II, cicloastragenol, sojaasaponina I, lupeol, β -sitosterol, daucosterina.

- 5 Caracterizado pelo fato de que o conteúdo de astragalosídeo I era de 9,5% e o conteúdo do extrato de Radix Astragali era de 88,9%.

75 mg do extrato de Radix Salviae Miltorrhizae, 150 mg do extrato de Radix Notoginseng, 75 mg do extrato de Radix Astragali, todos obtidos a partir de acima e 30 mg de Borneol foram misturados
10 suficientemente. Então, a mistura foi liofilizada, de modo a que fosse obtida a composição da invenção.

Exemplo 2:

100 mg do extrato de Radix Salviae Miltorrhizae, 200 mg do extrato de Radix Notoginseng, 75 mg do extrato de Radix Astragali, todos
15 obtidos a partir do presente Exemplo 1, e 30 mg de óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae foram misturados com 400 mg de polietileno glicol - 6000, e fundidos para fornecer uma mistura. Então a mistura foi deixada resfriar, de modo a que fosse obtida a composição da invenção.

Exemplo 3:

20 96 mg de extrato de Radix Salviae Miltorrhizae, 136 mg de extrato de Radix Notoginseng, 70 mg de extrato de Radix Astragali, obtidos a partir do presente Exemplo 1 e 28 mg de Borneol foram misturados suficientemente. Então a mistura foi deixada ser liofilizada, de modo a que fosse obtida a composição da invenção.

25 Exemplo 4:

70 mg de extrato de Radix Salviae Miltorrhizae, 150 mg de extrato de Radix Notoginseng, 90 mg de extrato de Radix Astragali, obtidos a partir do presente Exemplo 1, e 20 mg de Borneol foram suficientemente misturados. Então a mistura foi deixada ser liofilizada, de modo a que fosse

obtida a composição da invenção.

Exemplo 5:

165 mg de extrato de Radix Salviae Miltorrhizae, 80 mg de extrato de Radix Notoginseng, 60 mg de extrato de Radix Astragali, obtidos a partir do presente Exemplo 1, e 25 mg de Borneol, foram suficientemente misturados. Então a mistura foi deixada ser liofilizada, de modo a que fosse obtida a composição da invenção.

Exemplo 6:

75 mg de extrato de Radix Salviae Miltorrhizae, 135 mg de extrato de Radix Notoginseng, 82 mg de extrato de Radix Astragali, obtidos a partir do presente Exemplo 1, e 38 mg de Borneol, foram suficientemente misturados. Então a mistura foi deixada ser liofilizada, de modo a que fosse obtida a composição da invenção.

Exemplo 7:

230 mg de extrato de Radix Salviae Miltorrhizae, 75 mg de extrato de Radix Notoginseng, 17 mg de extrato de Radix Astragali, obtidos a partir do presente Exemplo 1, e 8 mg de Borneol, foram suficientemente misturados. Então a mistura foi deixada ser liofilizada, de modo a que fosse obtida a composição da invenção.

Exemplo 8:

17 mg de extrato de Radix Salviae Miltorrhizae, 70 mg de extrato de Radix Notoginseng, 230 mg de extrato de Radix Astragali, obtidos a partir do presente Exemplo 1, e 13 mg de Borneol, foram suficientemente misturados. Então a mistura foi deixada ser liofilizada, de modo a que fosse obtida a composição da invenção.

Exemplo 9:

55 mg de extrato de Radix Salviae Miltorrhizae, 160 mg de extrato de Radix Notoginseng, 63 mg de extrato de Radix Astragali, obtidos a partir do presente Exemplo 1, e 48 mg de Borneol, foram suficientemente

misturados. Então a mistura foi deixada ser liofilizada, de modo a que fosse obtida a composição da invenção.

Exemplo 10:

96 mg de extrato de Radix Salviae Miltorrhizae, 136 mg de
5 extrato de Radix Notoginseng, 70 mg de extrato de Radix Astragali, obtidos a partir do presente Exemplo 1, e 28 mg de óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae foram suficientemente misturados com 400 mg de polietileno glicol- 6000 e fundidos. Então a mistura foi deixada resfriar, de modo a que fosse obtida a composição da invenção.

10 Exemplo 11:

70 mg de extrato de Radix Salviae Miltorrhizae, 150 mg de
extrato de Radix Notoginseng, 90 mg de extrato de Radix Astragali, obtidos a partir do presente Exemplo 1, e 20 mg de óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae foram suficientemente misturados com 400 mg de polietileno
15 glicol- 6000 e fundidos. Então a mistura foi deixada resfriar, de modo a que fosse obtida a composição da invenção.

Exemplo 12:

165 mg de extrato de Radix Salviae Miltorrhizae, 80 mg de
extrato de Radix Notoginseng, 60 mg de extrato de Radix Astragali, obtidos a
20 partir do presente Exemplo 1, e 25 mg de óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae foram suficientemente misturados com 400 mg de polietileno glicol- 6000 e fundidos. Então a mistura foi deixada resfriar, de modo a que fosse obtida a composição da invenção.

Exemplo 13:

25 75 mg de extrato de Radix Salviae Miltorrhizae, 135 mg de extrato de Radix Notoginseng, 82 mg de extrato de Radix Astragali, obtidos a partir do presente Exemplo 1, e 38 mg de óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae foram suficientemente misturados com 400 mg de polietileno glicol- 6000 e fundidos. Então a mistura foi deixada resfriar, de modo a que

fosse obtida a composição da invenção.

Exemplo 14:

230 mg de extrato de Radix Salviae Miltorrhizae, 75 mg de extrato de Radix Notoginseng, 17 mg de extrato de Radix Astragali, obtidos a partir do presente Exemplo 1, e 38 mg de óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae foram suficientemente misturados com 400 mg de polietileno glicol- 6000 e fundidos. Então a mistura foi deixada resfriar, de modo a que fosse obtida a composição da invenção.

Exemplo 15:

17 mg de extrato de Radix Salviae Miltorrhizae, 70 mg de extrato de Radix Notoginseng, 230 mg de extrato de Radix Astragali, obtidos a partir do presente Exemplo 1, e 13 mg de óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae foram suficientemente misturados com 400 mg de polietileno glicol- 6000 e fundidos. Então a mistura foi deixada resfriar, de modo a que fosse obtida a composição da invenção.

Exemplo 16:

55 mg de extrato de Radix Salviae Miltorrhizae, 160 mg de extrato de Radix Notoginseng, 63 mg de extrato de Radix Astragali, obtidos a partir do presente Exemplo 1, e 48 mg de óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae foram suficientemente misturados com 400 mg de polietileno glicol- 6000 e fundidos. Então a mistura foi deixada resfriar, de modo a que fosse obtida a composição da invenção.

Exemplo 17:

75 mg de extrato de Radix Salviae Miltorrhizae, 135 mg de extrato de Radix Notoginseng, 96 mg de extrato de Radix Astragali, obtidos a partir do presente Exemplo 1, e 25 g de Borneol, 90 g de manitol, 15 g de edato de cálcio dissódico e 15 ml de água destilada foram suficientemente misturados com 400 mg de polietileno glicol-6000 e fundidos. Então a mistura foi deixada resfriar, de modo a que fosse obtida a composição da

invenção.

Exemplo 18:

67 g de extrato de Radix Salviae Miltorrhizae (Pedido de Patente CN 1351985A, Exemplo 1) 180 g de extrato de Radix Notoginseng (Exemplo 1 da invenção), 67 g de extrato de Radix Astragali (Exemplo 1 da invenção) e 16 g de Borneol foram suficientemente misturados com 40 g de celulose microcristalina. Solução de povidona- etanol a 3% foi então adicionada de modo a amolecer a mistura. A mistura foi então passada através de uma peneira # 18 para formar grânulos e secada a 60°C durante 30- 45 minutos. Os grânulos assim obtidos foram aparados e 4 g de talco foram adicionados e misturados intimamente. Os grânulos assim formados foram enchidos ao interior da cápsula.

Exemplo 19:

50 g de extrato de Radix Salviae Miltorrhizae (preparado de acordo com o método de extração de água e precipitação de álcool, Guo Ying et al. *The Journal of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine*, 2001, 24 (4): 6), 210 g do extrato de Radix Notoginseng (Qian Tian Xiang et al. *Foreign Medical Sciences, Plant Medicine Section*, 1997, 12 (4)), 50 g de extrato de Radix Astragali (Exemplo 1 da invenção), e 20 g de Borneol foram dissolvidos individualmente com uma pequena quantidade de solução salina fisiológica. A quantidade apropriada de Tween 80 foi então adicionada. Cada mistura foi finamente moída, e descolorida após a solução salina fisiológica ter sido adicionada. A solução foi filtrada sob pressão reduzida, até que se tornasse clara e transparente. O filtrado foi coletado em um recipiente contendo solução salina fisiológica. O recipiente foi selado e esterilizado por meio de água em ebulição. Os três tipos de soluções claras foram então misturados e a acidez foi ajustada para 5. O volume apropriado de solução salina fisiológica foi adicionado. O processo de filtração foi repetido para que fosse obtida uma solução clara e transparente. A injeção desejada foi obtida.

Exemplo 20:

60 g de extrato de Radix Salviae Miltorrhizae (Pedido de Patente CN 1384090 A, Exemplo 1), 80 g de extrato de Radix Notoginseng (Tang Di Guang, *The Journal of Chinese Traditional Patent Medicine*, 1990, 12 (8): 5), 165 g de extrato de Radix Astragali (Exemplo 1 da invenção), e 25 g de Borneol foram suficientemente misturados com 40 g de celulose microcristalina, solução de povidona- etanol a 3 % foi adicionada para amolecer a mistura. A mistura foi então passada através de peneira # 18, e secada a 60°C durante 30- 45 minutos para fornecer grânulos, 4 g de talco foram adicionados e intimamente misturados. Os grânulos formados foram comprimidos sob a forma de comprimidos.

Exemplo 21:

90 g de extrato de Radix Salviae Miltorrhizae (Pedido de Patente CN- CN 1384090 A, Exemplo 1), 150 g de extrato de Radix Notoginseng (Exemplo 1 da invenção), 82 g de extrato de Radix Astragali (Exemplo 1 da invenção), e 8 g de Borneol foram suficientemente misturados com 40 g de celulose microcristalina. Solução de povidona-etanol a 3% foi adicionada para amolecer a mistura. A mistura foi passada através de uma peneira # 18 para formar grânulos e secada a 60°C durante de 30- 45 minutos. Os grânulos assim obtidos foram aparados, e então 4 g de talco foram adicionados e intimamente misturados.

Exemplo 22:

85 g de extrato de Radix Salviae Mitrorrhizae (Pedido de Patente CN - CN 1384090 A, Exemplo 1), 135 g de extrato de Radix Notoginseng (Exemplo 1 da invenção), 80 g de extrato de Radix Astragali (Teng Xing Long et al., *Hei Long Jiang Medical Journal*, 2002, 15 (5): 340) e 30 g de Borneol foram suficientemente misturados com 700 g de polietileno glicol- 6000, e fundidos. Foram então despejados em parafina líquida em baixa temperatura, as pílulas selecionadas e removidas da parafina líquida em

baixa temperatura.

Exemplo 23:

17 g de extrato de Radix Salviae Miltorrhizae (Pedido de Patente CN - CN 1384090, Exemplo 1), 280 g de extrato de Radix Notoginseng (Exemplo 1 da invenção), 17 g de extrato de Radix Astragali (Exemplo 1 da invenção, (Extração: Yu Hao et al, *West China Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1993, 8 (3): 163); Refinamento: Teng Xing Long et al., *Hei Long Jiang Medical Journal*, 2002 (15 (5): 340) e 16 g de Borneol foram suficientemente misturados com 700 g de polietileno glicol- 6000, e fundidos. Foram então despejados em parafina líquida em baixa temperatura, as pílulas selecionadas e removidas da parafina líquida em baixa temperatura.

Exemplo 24:

67 g de extrato de Radix Salviae Miltorrhizae (Pedido de Patente CN - CN 1352985A, Exemplo 1), 180 g de extrato de Radix Notoginseng (Exemplo 1 da invenção), 677 g de extrato de Radix Astragali (Exemplo 1 da invenção), e 16 g de óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae foram suficientemente misturados com 40 g de celulose microcristalina. Solução de povidona- etanol a 3% foi adicionada para amolecer a mistura. A mistura foi passada através de peneira # 18 para formar grânulos, e secada a 60°C durante 30- 45 minutos. Após aparados, 4 g de talco foram adicionados e intimamente misturados. Os grânulos formados foram enchidos ao interior de cápsula.

Exemplo 25:

60 g de extrato de Radix Salviae Miltorrhizae (Pedido de Patente CN - CN 1384090A, Exemplo 1), 80 g de extrato de Radix Notoginseng (Tang Di Guang, *The Journal of Chinese Traditional Patent Medicine*, 1990, 12 (8): 5), 165 g de extrato de Radix Astragali (Exemplo 1 da invenção), e 25 g de óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae foram suficientemente misturados com 40 g de celulose microcristalina. Solução de

povidona-etanol a 3% foi adicionada para amolecer a mistura. A mistura foi passada através de uma peneira # 18 para formar grânulos e secada a 60°C durante 30-45 minutos. Após aparados, 4 g de talco foram adicionados e intimamente misturados. Os grânulos formados foram comprimidos sob a
5 forma de comprimidos.

Exemplo 26:

90 g de extrato de Radix Salviae Miltorrhizae (Pedido de Patente CN - CN 1384090 A, Exemplo 1), 150 g de extrato de Radix Notoginseng (Exemplo 1 da invenção), 82 g de extrato de Radix Astragali
10 (Exemplo 1 da invenção), e 8 g de óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae foram suficientemente misturados com 40 g de celulose microcristalina. Solução de povidona- etanol a 3 % foi então adicionada para amolecer a mistura. A mistura foi passada através de uma peneira # 18 para formar grânulos e secada a 60°C durante 30- 45 minutos. Após aparados, 4 g de talco
15 foram adicionados e intimamente misturados. Os grânulos assim obtidos foram aparados e embalados.

Exemplo 27:

85 g de extrato de Radix Salviae Mitrorrhizae (Pedido de Patente CN - CN1384090A, Exemplo 1), 135 g de extrato de Radix
20 Notoginseng (Exemplo 1 da invenção), 80 g do extrato Radix Astragali (Teng Xing Long et al., *Hei Long Jiang Medical Journal*, 2002, 15 (5): 340 e 30 g de óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae foram suficientemente misturados com 700 g de polietileno glicol - 6000 e fundidos. Foram então despejados em parafina líquida em baixa temperatura, as pílulas selecionadas e removidas da
25 parafina líquida em baixa temperatura.

Exemplo 28:

17 g de extrato de Radix Salviae Miltorrhizae (Pedido de Patente CN - CN 1384090A, Exemplo 1), 280 g de extrato de Radix Notoginseng (Exemplo 1 da invenção), 17 g de extrato de Radix Austragali

(Exemplo 1 da invenção, Extração: Yu Hao et al., *West China Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1993, 8 (3): 163); Refinamento: Teng Xing Long et al., *Hei Long Jiang Medical Journal*, 2002, 15 (5): 340), e 16 g de óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae foram suficientemente misturados com 700 g de polietileno glicol - 6000, e fundidos. Foram então despejados em parafina líquida em baixa temperatura, as pílulas selecionadas e removidas da parafina líquida em baixa temperatura.

Experimento 1- Efeitos das Composições Farmacêuticas presentes sobre Isquemia Cerebral Localizada em Ratos

1. Materiais:

a. Animais: ratos machos Sprague- Dawley (SD), pesando 180 -200 gramas, número de certificado de Controle de Qualidade SCXK (Beijing) 2002 - 0003, provido por Beijing Weitong Lihua Experimental Animal Technology Co., Limited.

b. Drogas testadas e agentes químicos:

Drogas testadas: a composição obtida no Exemplo 1 e Exemplo 2 presentes; o extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae no Exemplo 1 presente; o extrato de Radix Notoginseng no Exemplo 1 presente; o extrato de Radix Astragali no Exemplo 1 presente; óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae e Borneol. XUESAITONG (Marca Registrada) foi adquirido do mercado, produzido por Qunming Pharmaceutical Co., Limited, número do lote 200 20 922. 03.

Agente Químico: Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), pó amarelado claro, produto de Beijing Mashi Fine Chemical Co., Limited, número do lote 011102.

c. Instrumentos Experimentais: Microscópio estereoscópico XTT, produto de Yunnan Optical Instrument Factory; Modelo AEG-220 Electronic Analytical Scale, produto de Japan Shimadzu Corporation; 307- 6 Desktop Dental Instrument Cart, produto de Shangai Dental Medical

Instrument Factory; HZQ- C de Air Bath Vibrator, produto de Harbin Dongming Medical Instrument Factory.

2. Métodos e Resultados:

a. Grupo e administração de produtos investigados: os animais
5 foram agrupados aleatoriamente por peso. Aos animais em todos os grupos foram administrados os produtos investigados testados através de veia sublingual, 30 minutos após a operação. Os produtos investigados testados foram também introduzidos através de injeção por via intraperitoneal em 2 horas e em 23 horas após a operação. Todos os produtos foram diluídos com
10 solução salina fisiológica à concentração desejada. A quantidade de injeção foi de 0,4 ml por 100 g de peso corpóreo.

b. O modelo de embolismo da artéria cerebral média: os ratos foram anestesiados por meio de solução de hidrato cloral a 10% (350 mg/ kg), administrada através de via intraperitoneal e foram fixados na posição lateral
15 direita. Uma incisão curva de 1,5 cm de comprimento foi executada a partir do ponto médio entre o canto externo do olho esquerdo e o canal auditivo externo esquerdo. Corte e extirpação do músculo temporal, exposição do osso temporal, e sob microscópio estereoscópico, abertura de uma janela no osso de 2,5 mm de diâmetro, na posição que está na junta do osso zigomático e o
20 osso temporal esquamosal e que está apenas a 1 mm da terminação da boca da junta. Limpeza dos resíduos e exposição da artéria cerebral mediana (que estava localizada entre o feixe olfativo e a veia cerebral inferior); colocação de uma pequena peça de filme plástico para proteger a área circundante do vaso sanguíneo. Colocação de uma pequena peça de papel de filtro
25 quantitativo embebida com 10 µl de cloreto de ferro (III) a 50% sobre este segmento da artéria cerebral mediana; 30 minutos após, remover o papel de filtro e lavar os tecidos tópicos com solução salina fisiológica, e suturar a incisão nas camadas. Colocar os ratos de volta na gaiola e recuperá-los à sua condição de vida normal. A temperatura ambiente estava controlada a 24°C.

c. Critérios de Classificação de Sintomas Neurológicos

As avaliações comportamentais foram conduzidas em 24 horas após a operação. Os critérios de classificação foram os que se seguem: (1). Observação da condição de flexão dos membros dianteiros após levantamento dos ratos através de suas caudas; seria registrado como 0 pontos se ambos os membros dianteiros fossem estendidos para a frente de modo simétrico; 1 ponto se houvesse flexão dos ombros, flexão dos cotovelos, e /ou entorse dos ombros sobre os membros anteriores no lado oposto da operação. (2). Colocar o rato sobre uma superfície plana, empurrar ambos os ombros em direção a lados opostos e verificação da resistência. Seria registrado como 0 pontos se a resistência fosse igual ou forte em ambos os lados; 1 ponto se a resistência no lado oposto à operação diminuísse. (3) Colocar os membros dianteiros do rato sobre uma malha metálica e observar a tensão muscular. Seria registrado como 0 pontos se a tensão muscular em ambos os lados fosse igual e forte; 1 ponto se a tensão muscular do membro dianteiro no lado oposto da operação diminuísse. (4) Seria registrado como 1 ponto se o rato girasse continuamente em direção ao lado oposto da operação após ter sido levantado pela sua cauda. Com base nos critérios de classificação acima, a pontuação total é de 4 pontos. Quanto mais alta for a pontuação, mais severa é a incapacidade comportamental.

d. A determinação da extensão do enfarte cerebral

Os ratos foram decapitados após as avaliações comportamentais terem sido completadas. Os cérebros foram coletados. Foram descartados o bulbo olfativo, o cerebelo e a haste cerebral inferior, o resto do cérebro tendo sido cortado, de modo sagital, em 5 fatias. As 5 fatias do cérebro foram imersas em solução de corante TTC (cada 5 ml de solução contém 4% de TTC 1,5 ml, K_2HPO_4 0, 1 ml, então adicionados à água destilada até a marca), incubados a 37°C no escuro durante 30 minutos, as fatias do cérebro deslocadas para solução de Formaldeído a 10% e

armazenadas durante 24 horas no escuro. Através de tingidura, a área não-isquêmica estava em rosa- avermelhado, mas a área isquêmica estava em branco. Tecidos brancos a partir das fatias de cérebro foram cuidadosamente cortados e pesados. O percentual em peso de tecidos de enfarte no cérebro total e o lado danificado do cérebro foram considerados como a extensão do enfarte cerebral.

e. Resultados:

Tabela 1: Os Efeitos dos Presentes Extratos e Composições

Farmacêuticas sobre Sintomas Neurológicos em Ratos (MCAO) ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosagem (mg/ kg de peso corpóreo)	Número de animais	Classificação de sintomas neurológicos após 6 horas	Classificação de sintomas neurológicos após 24 horas
Composição farmacêutica no presente Exemplo 1:				
(Extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae + Extrato de Radix Notoginseng + Extrato de Radix Astragali + Borneol)	5+10+5+2	10	1,22±0,41**##&&@	1,07±0,59**##&&@
Composição Farmacêutica no Exemplo 2:				
(Extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae + Extrato de Radix Notoginseng + Extrato de Radix Astragali + Óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae)	5+10+5+2	10	1,32±0,45**##&&@	1,13±0,56**##&&@
Ácidos Salvinólicos + Saponinas de Radix Notoginseng + Borneol	6+12+2	10	1,68±0,43**##&	1,61±0,63**##&
Ácidos Salvinólicos + Saponinas de Radix Notoginseng	6,7+13,3	10	2,14±0,60** #	2,14±0,59** #
Ácidos Salvinólicos	20	10	2,95±0,67*	2,57±0,42*
Saponinas de Radix Notoginseng	20	10	2,65±0,32*	2,52±0,51
XUESAITONG	20	10	2,65±0,37*	2,56±0,54*
Grupo de Controle		10	3,22±0,42	3,04±0,53

10 Nota: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, em comparação com o grupo de controle; # $P < 0,05$, # $P < 0,01$ em comparação com o grupo de Ácidos Salvinólicos ou o grupo de Saponinas de Radix Notoginseng; &P $< 0,05$, &&P $< 0,01$, em comparação com Ácidos Salvinólicos + grupo de Saponinas de Radix

Notoginseng; α $P < 0,05$ em comparação com Ácidos Salvinólicos + Saponinas de Radix Notoginseng + grupo Borneol.

MCAO - Oclusão Arterial Cerebral Mediana

Tabela 2: Os Efeitos dos Presentes Extratos e Composições Farmacêuticas

5 **sobre a Área de Enfarte Cerebral em Ratos (MCAO) ($\bar{x} \pm s$)**

Grupos	Dosagem (mg/ kg de peso corpóreo)	Número de animais	Enfarte Cerebral/ cérebro total (%)	Enfarte Cerebral/ Lado Danificado do Cérebro (%)
Composição farmacêutica no presente Exemplo 1:				
(Extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae + Extrato de Radix Notoginseng + Extrato de Radix Astragali + Borneol)	5+10+5+2	10	1,28±0,74***&&@	2,57±1,41***&&@
Composição Farmacêutica no Exemplo 2:				
(Extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae + Extrato de Radix Notoginseng + Extrato de Radix Astragali + Óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae)	5+10+5+2	10	1,34±0,69***&&@	2,61±1,50***&&@
Ácidos Salvinólicos + Saponinas de Radix Notoginseng + Borneol	6+12+2	10	1,66±0,69***&	3,37±1,30***&
Ácidos Salvinólicos + Saponinas de Radix Notoginseng	6,7+13,3	10	2,32±0,84** #	4,61±1,80** #
Ácidos Salvinólicos	20	10	3,21±0,86*	6,41±1,76*
Saponinas de Radix Notoginseng	20	10	3,02±1,21*	5,99±2,33*
XUESAITONG	20	10	2,99±1,11*	5,98±2,23*
Grupo de Controle		10	4,33±0,81	8,69±1,59

Nota: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, em comparação com o grupo de controle; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, em comparação com o grupo Ácidos Salvinólicos ou com o grupo Saponinas de Radix Notoginseng; & $P < 0,05$, && $P < 0,01$, em comparação com o grupo Ácidos Salvinólicos + Saponinas de Radix Notoginseng; $\alpha P < 0,01$, em comparação com o grupo Ácidos Salvinólicos + Saponinas de Radix Notoginseng; $\alpha P < 0,05$ em comparação com o grupo Ácidos Salvinólicos + Saponinas de Radix Notoginseng + grupo Borneol.

Os resultados nas Tabelas 1 e 2 mostram que todas as drogas

testadas apresentaram efeitos significativos de isquemia anticerebral. De todas as drogas, a composição no presente Exemplo 1 (Extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae, Extrato de Radix Notoginseng, Extrato de Radix Astragali e Broneol) e a composição no presente Exemplo 2 (Extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae, Extrato de Radix Notoginseng, Extrato de Radix Astragali e 5 óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae) alcançam os efeitos terapêuticos significativos. Apenas a administração de ácidos salvinólicos ou de saponinas de Radix Notoginseng apresenta os efeitos similares com a administração de XUESAITONG (Marca Registrada, droga de controle positivo). Os efeitos 10 terapêuticos da administração da combinação de ácidos salvinólicos acrescidos de saponinas de Radix Notoginseng além de Broneol é superior àquele da administração de ácidos salvinólicos acrescidos de saponinas de Radix Notoginseng ou apenas de ácidos salvinólicos ou apenas de saponinas de Radix Notoginseng ou de XUESAITONG (Marca Registrada), mas é pior 15 do que aquele da composição farmacêutica no presente Exemplo 1 e da composição farmacêutica no presente Exemplo 2.

Através do uso do modelo de enfarte cardíaco experimental em ratos e no método de perfusão extracorpórea, a presente invenção compara os efeitos de isquemia antimiocárdica da composição farmacêutica da presente 20 invenção, de ácidos salvinólicos acrescidos de saponinas de Radix Notoginseng acrescidos de Broneol ou do óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae, ácidos salvinólicos acrescidos de saponinas de Radix Notoginseng, ácidos salvianólicos e saponinas de Radix Notoginseng. Os resultados mostram que a composição farmacêutica da presente invenção 25 apresenta efeitos de isquemia antimiocárdica significativos. Os seus efeitos terapêuticos são melhores do que aqueles de aplicação apenas de ácidos salvinólicos ou saponinas de Radix Notoginseng, mais fortes do que aqueles de administração de ácidos salvinólicos acrescidos de saponinas de Radix Notoginseng, e melhores do que aqueles de ácidos salvianólicos acrescidos de

saponinas de Radix Notoginseng acrescidas de Broneol ou óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae. Os resultados indicam que a composição farmacêutica da presente invenção, isto é, Extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae acrescido de Extrato de Radix Notoginseng acrescido de Extrato de Radix Astragali e

5 Broneol, ou extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae acrescido de Extrato de Radix Notoginseng acrescido de Extrato de Radix Astragali e de óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae, todos os quatro apresentando fortes ações sinérgicas.

Experimento 2: Os estudos sobre os efeitos de isquemia

10 antimiocárdica das presentes composições.

1. Grupo e administração de produtos investigados: 70 ratos machos Wistar, peso $250,8 \pm 24,6$ gramas, foram aleatoriamente divididos em sete grupos pelo seu peso: solução salina fisiológica como controle, XUESAITONG, ácidos salvinólicos, saponinas de Radix Notoginseng, ácidos

15 salvinólicos acrescidos de saponinas de Radix Notoginseng, as composições farmacêuticas no presente Exemplo 1 e as composições farmacêuticas no presente Exemplo 2. Todas as drogas testadas são diluídas com solução salina fisiológica às concentrações desejadas; as drogas testadas foram administradas a 4 ml/kg através de injeção na veia caudal.

20 2. Método:

a. Modelo de enfarte do miocárdio experimental em ratos: Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (45 mg/ kg) através de injeção intraperitonal, fixados em uma posição deitado de costas, e foi-lhes inserido um tubo na traquéia, uma incisão longitudinal de 2 cm sendo feita ao

25 longo do lado esquerdo do esterno. Após a abertura da cavidade torácica, corte da terceira e da quarta costela sobre a sua seção de cartilagem fechada para o externo, a respiração foi mantida em um aparelho de respiração artificial (volume de ventilação 2 ml/ 100 g, 50 vezes / minuto). A membrana do pericárdio foi aberta e o coração exposto, foi colocado o cordão sob a

artéria coronária descendente esquerda do coração para a ligação, e foi registrado o eletrocardiograma de conduta padrão II. Foi então estabilizado durante 20 minutos, sendo então ligada a artéria coronária descendente esquerda e a cavidade torácica fechada. Foram então sugadas as substâncias secretadas na laringe com uma seringa e foi efetuado o retorno dos ratos à respiração própria. 15 minutos após a ligação da artéria coronária, as drogas testadas são fornecidas através da veia. O coração foi obtido 4 horas após a ligação da artéria coronária, e foi extirpada a seção do coração abaixo do cordão de ligação de cortada em 5 fatias, as fatias do coração foram tingidas com tetrazólio nitroazul (NBT). Foi calculado o percentual de miocárdio em relação à área dos ventrículos, assim como a todo o coração e analisado com o método estatístico (teste T).

b. Experimento de Coração com Perfusão Isolada (Langendorf): Referido em “Experimental Methodology of Pharmacology” (editado por Shuyun Xu, etc., People Health Press, terceira edição, Janeiro de 2002).

3. Resultados:

a. O efeito sobre a área do enfarte do miocárdio em ratos, vide Tabela 3.

20 **Tabela 3: Os Efeitos dos Presentes Extratos e Composições Farmacêuticas sobre a Área de Enfarte do Miocárdio em Ratos (MCAO) ($x \pm s$)**

Grupos	Dosagem (mg/ kg de peso corpóreo)	Número de animais	Área de enfarte/ área de ventrículo (%)	Área de enfarte / Coração Total (%)
Composição farmacêutica no presente Exemplo 1:				
(Extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae + Extrato de Radix Notoginseng + Extrato de Radix Astragali + Borneol)	5+10+5+2	10	12,53±4,57***##&@	10,96±3,35***##&@
Composição Farmacêutica no Exemplo 2:				
(Extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae + Extrato de Radix Notoginseng +	5+10+5+2	10	12,62±4,49***##&@	11,01±3,42***##&@

Extrato de Radix Astragali + Óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae)				
Ácidos Salvinólicos + Saponinas de Radix Notoginseng + Borneol	6+12+2	10	16,72±6,43***#&	13,15±4,16***#&
Ácidos Salvinólicos + Saponinas de Radix Notoginseng	6,7+13,3	10	20,51±6,58** #	14,03±5,18** #
Ácidos Salvinólicos	20	10	24,08±8,56*	18,11±4,49*
Saponinas de Radix Notoginseng	20	10	25,97±4,65*	21,03±3,82*
XUESAITONG	20	10	25,02±5,72*	19,64±4,71*
Grupo de Controle		10	33,67±7,85	26,48±5,11

Nota: * P < 0,05, ** P < 0,01, em comparação com grupo de controle; # P < 0,05, ## P < 0,01, em comparação com o grupo Ácidos Salvinólicos ou grupo de Saponinas de Radix Notoginseng; &P < 0,05, &&P < 0,01, em comparação com Ácidos Salvinólicos + grupo de Saponinas de Radix Notoginseng; @P < 0, 05 em comparação com Ácidos Salvinólicos + Saponinas de Radix Notoginseng + grupo Borneol.

B. Efeito sobre o volume de fluxo na artéria coronária e taxa cardíaca sobre coração isolado de porquinho-da-Índia, vide Tabela 4.

Tabela 4: Os Efeitos dos Presentes Extratos e Composições Farmacêuticas sobre o Volume de Fluxo na Artéria Coronária e Taxa Cardíaca sobre

Coração Isolado de Porquinho-da-Índia (x ± s)

Grupos	Dosagem (mg/ kg de peso corpóreo)	Número de animais	Valor Crescente do Volume de Fluxo da Artéria Coronária (ml/ min)	Valor Decrescente da Taxa Cardíaca (batimento/ minuto)
Composição farmacêutica no presente Exemplo 1:				
(Extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae + Extrato de Radix Notoginseng + Extrato de Radix Astragali + Borneol)	5+10+5+2	10	16,67±1,74***#&@	40±14***#&@
Composição Farmacêutica no Exemplo 2:				
(Extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae + Extrato de Radix Notoginseng + Extrato de Radix Astragali + Óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae)	5+10+5+2	10	16,76±1,68***#&@	41±15***#&@
Ácidos Salvinólicos +	6+12+2	10	14,85±1,76***#&	32±12***#&

Saponinas de Radix Notoginseng + Borneol				
Ácidos Salvinólicos + Saponinas de Radix Notoginseng	6,7±13,3	10	11,34±2,24** #	21#9*
Ácidos Salvinólicos	20	10	7,91±1,36	9±4
Saponinas de Radix Notoginseng	20	10	8,88±1,51*	10±5
XUESAITONG	20	10	8,82±1,11*	10±,4

Nota: *P < 0,05, ** P < 0,01, em comparação com o grupo de controle; grupo Ácidos Salvinólicos ou grupo Saponinas de Radix Notoginseng ou XUESAITONG; &P < 0,05, &&P < 0,01, em comparação com Ácidos Salvinólicos + grupo de Saponinas de Radix Notoginseng; #P < 0,05, em comparação com Ácidos Salvinólicos + Saponinas de Radix Notoginseng + grupo Borneol.

Os resultados a partir das Tabelas 3 e 4 mostram que todas as drogas testadas possuem efeitos significativos de isquemia antimiocárdica. De todas as drogas, a composição do presente Exemplo 1 (Extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae, Extrato de Radix Notoginseng, Extrato de Radix Astragali e Broneol) e a composição farmacêutica no presente Exemplo 2 (Extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae, Extrato de Radix Notoginseng, Extrato de Radix Astragali e óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae) demonstraram os melhores efeitos terapêuticos. Apenas a administração de ácidos salvinólicos ou de saponinas de Radix Notoginseng apresenta efeitos similares com a administração de XUESAITONG (droga de controle positivo); Os efeitos terapêuticos da administração da combinação de ácidos salvinólicos, acrescidos de saponinas de Radix Notoginseng, acrescidos de Broneol, é melhor do que aquele da administração de ácidos salvinólicos, acrescidos de saponinas de Radix Notoginseng, ou apenas de ácidos salvinólicos ou apenas de saponinas de Radix Notoginseng ou apenas de XUESAITONG, mas é pior do que aquele da composição farmacêutica no presente Exemplo 1 e na composição farmacêutica no presente Exemplo 2.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica para o tratamento de doença vascular e cerebrovascular , caracterizada pelo fato de que consiste em:

20,0% a 30,0% de Extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae;

30,0% a 55,0% de Extrato de Radix Notoginseng;

18,5% a 30,0% de Extrato de Radix Astragali; e

4,0% a 10,0% de Borneol ou óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae;

em que o referido Extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae compreende de 45% a 70% de ácido salvianólico B, 2% - 10% de ácido salvianólico E, 4% a 20% de ácido rosmarínico, 1% a 10% de ácido litospérmico, e mais do que 70% de ácidos salvinólicos; em que o referido Extrato de Radix Notoginseng compreende de 2% a 10% de notoginsenosídeo R1, 2% a 6% de ginsenosídeo Re, 15% a 40% de ginsenosídeo Rg1, 15% a 40% de ginsenosídeo Rb1, 5% a 12% de ginsenosídeo Rd, e mais do que 70% de saponinas de Radix Notoginseng; e o referido extrato de Radix Astragali compreende de 5% a 15% de astragalosídeo I e mais do que 70% de saponinas de Radix Astragali.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que consiste em:

23% de Extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae;

45,0% de Extrato de Radix Notoginseng;

23% de Extrato de Radix Astragali; e

9% de Borneol ou óleo de Lignum Dalbergiae Odoriferae.

3. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o referido Extrato de Radix Salviae Miltiorrhizae compreende mais do que 80% de ácidos salvinólicos; o referido Extrato de Radix Notoginseng compreende mais do que 80% de saponinas de Radix

Notoginseng; e o referido Extrato de Radix Astragali compreende mais do que 80% de saponinas de Radix Astragali.

4. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que ela está sob a forma de injeção, comprimidos, comprimidos de liberação sustentada, pastilhas, grânulos, pó para injeção, cápsulas ou microgrânulos.

5. Composição de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que ela está sob a forma de injeção ou de pó para a injeção.

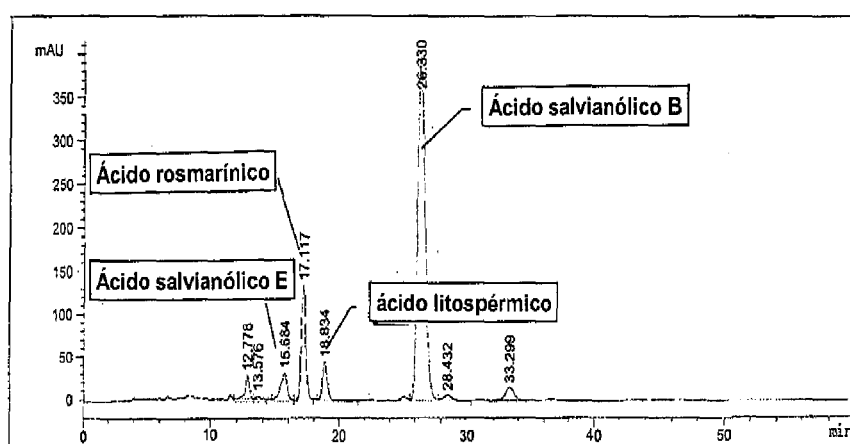


Figura 1

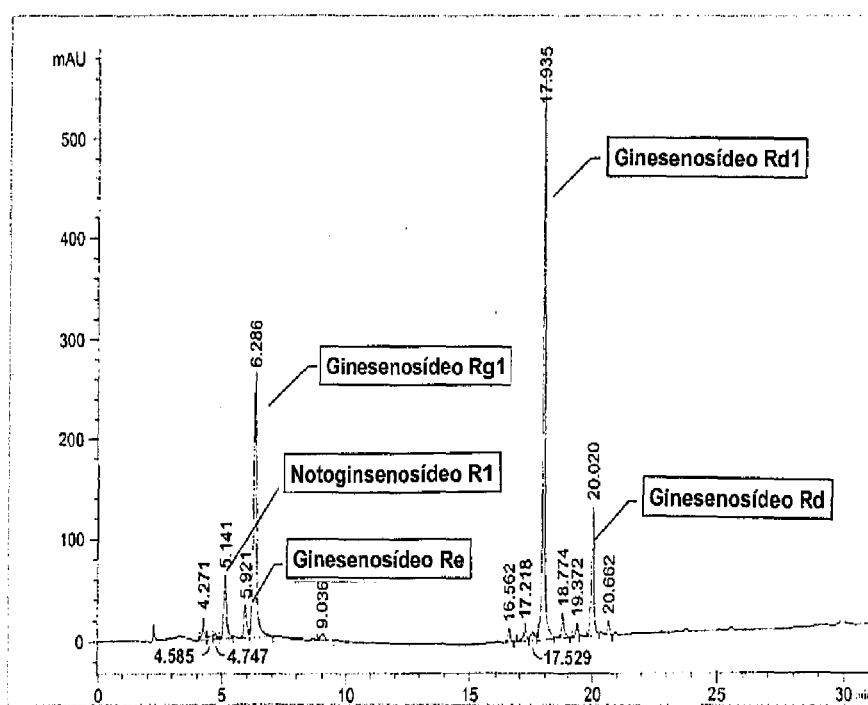


Figura 2