

(11) Número de Publicação: **PT 2229172 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 31/519 (2014.01) **A61P 9/00** (2014.01)
A61P 9/10 (2014.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2008.12.02	(73) Titular(es): ASTRAZENECA AB 151 85 SÖDERTÄLJE	SE
(30) Prioridade(s): 2007.12.03 EP 07301616		
(43) Data de publicação do pedido: 2010.09.22	(72) Inventor(es): JEAN-BAPTISTE MICHEL	FR
(45) Data e BPI da concessão: 2014.09.10 211/2014	(74) Mandatário: NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **TICAGRELOR PARA TRATAMENTO DE ANEURISMAS AÓRTICOS ABDOMINAIS**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO PROPORCIONA COMPOSTOS DE TRIAZOLO[4,5-D]PIRIMIDINA, ATUANDO COMO ANTAGONISTAS DO RECEPTOR P2T(P2Y12). OS COMPOSTOS SÃO ÚTEIS PARA O TRATAMENTO OU PREVENÇÃO DE ANEURISMAS AÓRTICOS ABDOMINAIS.

RESUMO

“TICAGRELOR PARA TRATAMENTO DE ANEURISMAS AÓRTICOS ABDOMINAIS”

A invenção proporciona compostos de triazolo[4,5-d]pirimidina, atuando como antagonistas do recetor P_{2T} ($P2Y_{12}$). Os compostos são úteis para o tratamento ou prevenção de aneurismas aórticos abdominais.

DESCRIÇÃO
"TICAGRELOR PARA TRATAMENTO DE ANEURISMAS AÓRTICOS
ABDOMINAIS"

Área da invenção

A presente invenção está dirigida ao uso de um antagonista do recetor P₂Y₁₂ (também conhecido como P_{2T}, P_{2Y}_{ADP} ou P_{2T}_{AC}) no tratamento de aneurismas aórticos abdominais.

Antecedentes da invenção

O aneurisma aórtico abdominal (AAA) é uma forma frequente de doença aterotrombótica que está altamente relacionada com a idade e género (Bengtsson H *et al.* (1996), *Ann N Y Acad Sci* 800:1-24). A patofisiologia da AAA envolve proteólise da matriz extracelular (Michel JB (2001), *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1389-1392), desaparecimento das células dos músculos lisos (SMC) (Michel JB (2003), *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:2146-2154), infiltração das células inflamatórias, e uma ausência de colonização e cura de células (Fontaine V *et al.* (2004), *Am J Pathol* 164:2077-2087). Foi recentemente mostrado que a biologia dinâmica do trombo mural, incluindo fibrinogénese luminal (Touat Z *et al.* (2006), *Am J Pathol* 168:1022-1030) e fibrinólise abluminal (Carrell TW *et al.* (2006), *Vascular* 14:9-16; Fontaine V *et al.* (2002), *Am J Pathol* 161:1701-1710), desempenha um papel significativo no progresso da AAA. Neste contexto, a interação entre agregados de plaquetas ativadas e recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (PMN) (Sarda-Mantel L *et al.* (2006), *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2153-2159; Touat *et al.*, 2006) desempenha um grande papel na ausência de cura das células (Fontaine V *et al.* (2004), *Am J Pathol* 164:2077-2087).

São conhecidos estudos mostrando que as plaquetas se acumulam na AAA e apoiando o efeito de fármacos antiplaquetários na gestão desta condição (Etani H *et al.*, *The Japanese Journal of Nuclear medicine* (1992) 29(4): 651-657). O uso de agentes antiplaquetários em pacientes com AAA é relatado em Lloyd GM *et al.* (2004), *Journal of Vascular surgery* 40(1): 691-697. Terapias comuns da AAA são revistas por exemplo em Diehm N *et al.* (2005), *Vasa-Journal of Vascular Diseases* 34(4): 217-223.

Descobriu-se que a adenosina 5'-difosfato (ADP) atua como um mediador chave da trombose. A agregação de plaquetas induzida por ADP é mediada pelo subtipo de recetor P2Y₁₂ localizado na membrana das plaquetas. O recetor P2Y₁₂ (também conhecido como P_{2T}, P2Y_{ADP} ou P2T_{AC}) é um recetor acoplado à proteína G envolvido principalmente na mediação da ativação/agregação de plaquetas. As características farmacológicas deste recetor foram descritas, por exemplo, nas referências por Humphries *et al.* (1994), *Br. J. Pharmacology*, 113, 1057-1063, e Fagura *et al.* (1998), *Br. J. Pharmacology*, 124, 157-164. Foi mostrado que os antagonistas neste recetor oferecem melhorias significativas em relação a outros agentes antitrombóticos (ver *J. Med. Chem.* (1999) 42, 213).

O Pedido de Patente Internacional WO 99/05143 divulga genericamente uma série de compostos de triazolo[4,5-d]pirimidina tendo atividade como antagonistas de P_{2T} (também conhecido como P2Y₁₂, P2Y_{ADP} ou P2T_{AC}). Recentemente, foi descrita uma nova classe de antagonistas diretos do recetor P_{2T} (não pró-fármacos) que oferecem melhorias significativas em relação a outros agentes antitrombóticos. O Pedido de Patente Internacional WO 00/34283 divulga novos

antagonistas "diretos" do recetor P_{2T} , incluindo compostos da fórmula (I). Formas cristalinas e amorfas de um composto de triazolo(4,5-d)pirimidina são divulgadas em W001/92262.

O uso de $\{1S-[1\alpha,2\alpha,3\beta(1S^*,2R^*),5\beta]\}-3-(7-\{[2-(3,4\text{-difluorofenil)ciclopropil]amino}\}-5-(\text{propiltio})-3H-1,2,3\text{-triazolo}[4,5-d]pirimidin-3-il)-5-(2\text{-hidroxietoxi)ciclopentano-1,2-diol}$ como agente terapêutico antiplaquetário, a sua ação como antagonista de $P_{2Y_{12}}$ (P_{2T}) e estudos pré-clínicos e clínicos estão revistos em Owen RT *et al.* (2007), *Drugs of the Future* 32(10): 845-853. A EP 1 493 745 A1 divulga o uso deste composto como agente antiplaquetário para uso no tratamento de complicação trombótica arterial.

Breve descrição das figuras

Fig. 1. Prevenção da expansão de aneurismas por tratamento com Composto (A). Medição do diâmetro externo dos aneurismas após indução dos aneurismas ao Dia 10 (a) e Dia 42 (b). O diâmetro externo foi similar em ratos de controlo (quadrado aberto) e tratados com Composto (A) (quadrado sólido) após 10 dias (a), mas foi significativamente menor no grupo com Composto (A) após 42 dias de tratamento (b). (c) O aumento no diâmetro dos aneurismas foi similar para os dois grupos ao Dia 10 mas foi significativamente reduzido nos ratos tratados com Composto (A) (barras sólidas) ao Dia 42. De facto, não foi observado nenhum aumento no diâmetro dos aneurismas entre os Dias 10 e 42 para ratos tratados com Composto (A). **, $P < 0,001$.

Fig. 2. Inibição do desenvolvimento de trombo mural por tratamento com Composto (A). (a) Coloração por vermelho de picrosírius de aneurismas representativos de ratos de

controle (esquerda) e tratados com Composto (A) (direita) ao Dia 42. O diâmetro aórtico e a área do trombo (**T**) foram maiores em aneurismas de ratos de controle em comparação com os tratados com Composto (A). Note-se que a deposição de colagénio (coloração vermelha) dentro do trombo é somente observada no grupo com Composto (A). (b) A área do trombo/área da parede aumentou entre os Dias 10 e 42 em ambos os grupos de ratos mas foi significativamente reduzida por tratamento com Composto (A) (barras sólidas) em ambos os Dias 10 e 42. (c) A análise intragrupal mostrou que o diâmetro maior dos aneurismas ao Dia 42 estava associado a uma área de trombo maior ($R^2 = 0,13$ e $R^2 = 0,40$ para ratos de controle (círculos abertos) e tratados com Composto (A) (círculos sólidos), respetivamente, $P < 0,05$). (d) Imunocoloração de CD41 (integrina α_{IIb} , um marcador de plaquetas) dentro do trombo mural de aneurismas de ratos de controle (esquerda) e tratados com Composto (A) (direita) ao Dia 42. **L**: lúmen aórtico. A quantificação da coloração mostra que o tratamento durante 42 dias com Composto (A) diminui significativamente o tamanho relativo da área positiva quanto a CD41 dentro do trombo mural em comparação com aquela vista no grupo de controle. Ampliações originais, x200. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

Fig. 3. Inibição da infiltração inflamatória por tratamento com Composto (A). (a) Imunocoloração de PMNs dentro do trombo mural de aneurismas de ratos de controle (esquerda) e tratados com Composto (A) (direita) ao Dia 42. Quantificação da infiltração de PMN dentro do trombo mural e da parede ao Dia 10 (painel do meio) e 42 (painel inferior). Após 10 e 42 dias, os PMNs foram encontrados maioritariamente dentro do trombo mural de aneurismas de

controle (barras abertas). O tratamento com Composto (A) (barras sólidas) inibiu a infiltração de PMNs no trombo em ambos os momentos. (b) Imunocoloração de macrófagos dentro do trombo mural de aneurismas de ratos de controle (esquerda) e tratados com Composto (A) (direita) ao Dia 42. Quantificação da infiltração de macrófagos dentro do trombo mural e da parede ao Dia 10 (painel do meio) e 42 (painel inferior). Os macrófagos foram encontrados dentro do trombo mural bem como na parede de aneurismas de controle (barras abertas). Após 42 dias, mais macrófagos estavam presentes dentro da parede do que no trombo. O tratamento com Composto (A) (barras sólidas) inibiu a infiltração de macrófagos dentro do trombo em ambos os momentos. A diminuição no conteúdo de macrófagos dentro da parede após 10 ou 42 dias de tratamento com Composto (A) não alcançou significância estatística. **L**: lúmen aórtico. Ampliações originais, x200. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

Fig. 4. Expressão diminuída de MMP-9 com tratamento com Composto (A). (a) Imunocoloração de MMP-9 dentro do trombo mural de aneurismas de ratos de controle (esquerda) e tratados com Composto (A) (direita) ao Dia 42. A quantificação da coloração de MMP-9 ao Dia 42 mostrou que a área ocupada por coloração de MMP-9 em relação à área da parede era maior dentro do trombo do que dentro da parede em aneurismas de controle (barras abertas). O tratamento com Composto (A) reduziu fortemente o tamanho da área positiva quanto a MMP-9 tanto dentro do trombo como da parede (barras sólidas). **L**: lúmen aórtico. Ampliações originais, x200. **, $P < 0,001$; ***, $P < 0,0001$. (b) Existiu uma correlação positiva entre o tamanho da área positiva quanto a MMP-9 dentro do trombo e a área total de trombo ao Dia 42

quando eram considerados todos os ratos (controles, círculos abertos; tratados com Composto (A), círculos sólidos, $R^2 = 0,79$, $P < 0,0001$).

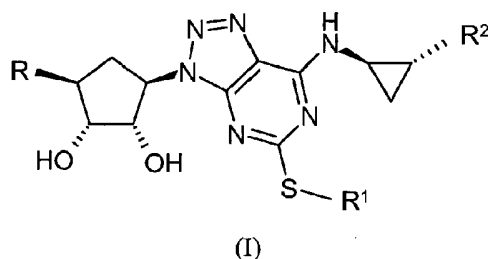
Fig. 5. Colonização de SMC do trombo mural e conservação de lamelas elásticas dentro da parede dos aneurismas com tratamento com Composto (A). (a) Coloração com orceína de aneurismas de ratos de controlo (esquerda) e tratados com Composto (A) (direita) ao Dia 42. As setas indicam as lamelas elásticas. A quantificação da área das lamelas elásticas mostrou o efeito benéfico do tratamento com Composto (A) (barras sólidas) a ambos os Dias 10 e 42. (b) Imunocoloração de SMCs dentro do trombo mural de aneurismas de ratos de controlo (esquerda) e tratados com Composto (A) (direita) ao Dia 42. A seta indica SMCs dentro do trombo. A densidade de SMCs dentro do trombo mural e da parede ao Dia 10 (painel do meio) e 42 (painel inferior) aumentou entre os Dias 10 e 42 em ambos os grupos. O tratamento com Composto (A) (barras sólidas) melhorou a colonização do trombo por SMCs após 42 dias em comparação com controlos (barras abertas), ao passo que não pôde ser observado nenhum efeito do Composto (A) dentro da parede. **L:** lúmen; **M:** meio; **A:** adventícia. Ampliações originais, x100. **, $P < 0,001$.

Perfil da invenção

A presente invenção está dirigida ao uso do composto {1S-[1 α ,2 α ,3 β (1S*,2R*),5 β]-3-(7-{[2-(3,4-difluorofenil)ciclopropil]amino}-5-(propiltio)-3H-1,2,3-triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il)-5-(2-hidroxietoxi)ciclopentano-1,2-diol para o fabrico de um medicamento para o tratamento de aneurismas aórticos abdominais.

A presente invenção está dirigida ao composto {1*S*-[1 α ,2 α ,3 β (1*S**,2*R**),5 β]}-3-(7-{[2-(3,4-difluorofenil)ciclopropil]amino}-5-(propiltio)-3*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*d*]pirimidin-3-il)-5-(2-hidroxietoxi)ciclopentano-1,2-diol para uso no tratamento de aneurismas aórticos abdominais.

É descrito aqui o uso de um composto da fórmula (I):



em que:

R é CH₂OH ou O(CH₂)₂OH;

R¹ é alquilo C₃₋₄ opcionalmente substituído por três átomos de halogênio;

R² é fenilo ou 3,4-difluorofenilo;

ou um seu derivado farmacologicamente aceitável, para o tratamento ou prevenção de aneurismas aórticos abdominais.

Derivados farmacologicamente aceitáveis de um composto da fórmula (I) incluem sais (p.ex., sais de adição de ácidos orgânicos ou inorgânicos não tóxicos farmacologicamente aceitáveis, tais como um sal do ácido clorídrico, bromídrico, nítrico, sulfúrico ou acético), solvatos e solvatos de sais.

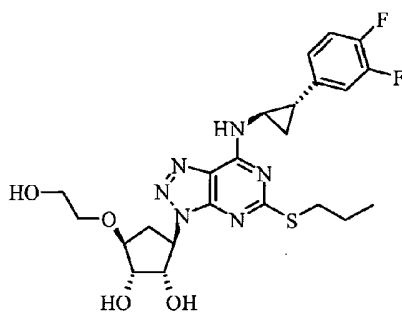
É descrito aqui um composto da fórmula (I) para o tratamento ou prevenção de aneurismas aórticos abdominais.

É descrito aqui o uso de um composto da fórmula (I) para o fabrico de um medicamento para o tratamento ou prevenção de aneurismas aórticos abdominais.

É descrito aqui o uso de um composto da fórmula (I) num método para o tratamento ou prevenção de aneurismas aórticos abdominais, em que uma quantidade farmacologicamente e farmacologicamente eficaz do composto da fórmula (I) é administrada a um sujeito com sua necessidade.

É descrito aqui o uso de um composto da fórmula (I) num método para o tratamento ou prevenção de aneurismas aórticos abdominais em que o composto da fórmula (I) é administrado a um sujeito com necessidade de tal tratamento ou prevenção.

R^1 pode ser *n*-propilo, 3,3,3-trifluoropropilo ou *n*-butilo. Numa forma de realização, R^2 pode ser 3,4-difluorofenilo. Numa forma de realização, o composto da fórmula (I) é o composto (A):



(A)

O composto (A) acima é convencionalmente nomeado {1S-[1 α ,2 α ,3 β (1S*,2R*),5 β]}-3-(7-{[2-(3,4-difluorofenil)ciclopropil]amino}-5-(propiltio)-3H-1,2,3-triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il)-5-(2-hidroxietoxi)ciclopentano-1,2-diol.

Formulações adequadas para administração de um composto da fórmula (I) são conhecidas na técnica, e incluem aquelas conhecidas de WO00/34283, WO2008/024044 e WO2008/024045. Uma formulação farmacêutica do composto (I) pode, e de facto irá usualmente, conter vários outros ingredientes conhecidos na técnica, por exemplo conservantes, agentes estabilizantes, agentes reguladores da viscosidade, agentes emulsificantes ou agentes tamponantes. Assim sendo, a formulação farmacêutica do composto (I) compreenderá tipicamente uma quantidade total do composto da fórmula (I) na gama de 0,05 a 99% por peso (percentagem por peso), tal como na gama de 0,10 a 70% por peso, ou na gama de 0,10 a 50% por peso, sendo todas as percentagens por peso baseadas na formulação total.

Doses adequadas do composto da fórmula (I) podem ser determinadas pelo médico ou outra pessoa perita, e dependerão da gravidade da condição, e da pessoa a ser tratada, bem como do(s) composto(s) que é/são empregue(s). Doses adequadas de composto ativo no tratamento terapêutico e/ou profilático de pacientes mamíferos, especialmente humanos, incluem aquelas que dão uma concentração média no plasma de até 10 $\mu\text{mol/L}$, por exemplo na gama 0,001 a 10 $\mu\text{mol/L}$ ao longo do curso de tratamento da condição relevante. Em qualquer um dos casos, o médico, ou a pessoa perita, será capaz de determinar a dosagem real que será a mais adequada para uma pessoa individual, que é provável

que varie com a condição que é para ser tratada, bem como a idade, peso, sexo e resposta da pessoa particular a ser tratada. As dosagens acima mencionadas são exemplares do caso médio. Podem, obviamente, existir casos individuais onde gamas de dosagens maiores ou menores são merecidas, e tais estão dentro do âmbito desta invenção.

Para evitar dúvidas, o termo "tratamento" inclui tratamento terapêutico e/ou profilático.

Avaliação biológica

Agregação de Plaquetas

Ratos de Lewis machos saudáveis (Iffa Credo, Lyon, França) receberam uma única dose oral do Composto (A) (10 mg/kg de peso corporal). Sangue venoso fresco de dois ratos foi amostrado antes da, e às 2, 10, e 24 h após a, administração do Composto (A), e centrifugado a 250 g durante 3 min à temperatura ambiente. Plasma rico em plaquetas foi preparado como previamente descrito (Eckly *et al.*, 2001). Uma suspensão de plaquetas de 450 μ L foi agitada a 1100 rpm e ativada pela adição de ADP a 5 μ M (Sigma, Saint Quentin-Fallavier, França) num volume final de 500 μ L. A agregação foi medida à temperatura ambiente por um método turbidimétrico num agregómetro de canal duplo (Chrono-Log, West Havertown, PA, EUA). A extensão da agregação foi estimada por medição da altura da curva máxima acima da linha de base.

Modelo de AAA

Aneurismas aórticos experimentais foram induzidos por implante de um segmento de aorta de porquinho-da-índia descelularizada por dodecil sulfato (matriz xenogénica) em aortas de rato (Allaire E. *et al.* (1994), *J Vasc Surg*

19:446-456). Este modelo de AAA é caracterizado por lesão imunoinflamatória da matriz extracelular xenogênea (Allaire E *et al.* (1997), *Surgery* 122:73-81; Allaire E *et al.* (1996), *Transplantation* 62:794-803). Brevemente, 46 ratos de Lewis machos (250 g) e 46 porquinhos-da-índia (280 g) (Iffa Credo, Lyon, França) foram alojados de acordo com os princípios do Cuidado de Animais Laboratoriais formulados pela União Europeia. Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de pentobarbital (5 mg/100 g de peso corporal). As aortas infrarrenais dos porquinhos-da-índia (1,5 cm) foram amostradas e descelularizadas por tratamento com dodecil sulfato de sódio para obter tubos de matriz extracelular intacta, que foram ortotopicamente transplantados na aorta de ratos de Lewis com suturas interrompidas com náilon 10/0 (xenoenxerto) (Allaire *et al.*, 1997; Allaire *et al.*, 1996). O diâmetro inicial do enxerto foi medido *in situ*, imediatamente após despinçamento, sob um microscópio binocular. Após 24 h, os ratos foram aleatoriamente atribuídos a dois grupos iguais, tratados com Composto (A) (10 mg/kg de peso corporal duas vezes diariamente por administração oral) ou com o diluente do Composto (A) (carboximetilcelulose a 0,1%/Tween-80 a 0,1% em água) durante 10 dias (D 10, *n* = 9 para cada grupo) ou 6 semanas (D42, *n* = 14 para cada grupo). Aquando do sacrifício, os ratos foram profundamente anestesiados, o diâmetro do enxerto foi medido novamente, e a aorta foi dissecada e fixa em paraformaldeído a 4%. As amostras aórticas foram embebidas em parafina e cortadas a 5 µm.

Análise Histológica e Imunohistoquímica

As secções foram coradas com vermelho de picrossírius para visualizar o colagénio e a fibrina e com orceína para visualizar a elastina. Foi realizada imunohistoquímica

usando α -actina anti-humana (diluição 1:500, Dako, Trappes, França), anti-CD68 (macrófagos, diluição 1:1000, Serotec, Cergy Saint-Christophe, França), leucócitos polimorfonucleares antirrato (diluição 1:3000, Cedarlane, Ontário, Canadá), anti-CD41 (integrina α_{IIb} , plaquetas, diluição 1:50, Santa Cruz Biotechnologies) e anti-MMP-9 (diluição 1:50, Calbiochem, Darmstadt, Alemanha) como anticorpos primários e um conjunto de peroxidase Vector ABC para detecção (Vector Labs, Burlingame, CA, EUA). As células foram contadas com uma grelha na ocular do microscópio e foi calculada a sua média em 4 campos simétricos na mesma lâmina. A dimensão das áreas representadas por trombo, fibra de elastina, parede de AAA, e coloração positiva quanto a MMP-9 e CD41 foi medido por análise morfométrica usando software Histolab (Microvision Instruments, Evly, França). As áreas do trombo foram determinadas em lâminas com vermelho de Sírius. A área ocupada por coloração positiva foi quantificada pelo modo de detecção da cor do programa de computador no trombo interior e parede exterior.

Análise Estatística

Os resultados são expressos como médias \pm S.D. A percentagem de aumento do diâmetro foi calculada como se segue: (diâmetro na colheita - diâmetro na enxertia) \times 100 / diâmetro na enxertia. As comparações entre os dois grupos foram feitas usando teste U de Mann-Whitney não paramétrico (Statview, versão 4.5). A frequência de aneurismas de grande diâmetro nos 2 diferentes grupos foi analisada por teste χ^2 . Análise de regressão simples foi usada para testar correlações entre vários parâmetros. $P < 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados

Diâmetro dos Aneurismas

Os xenoenxertos com matriz celular descelularizada desenvolveram-se em aneurismas, como mostrado pelo aumento no diâmetro externo dos aneurismas observado em ratos de controlo não tratados 10 dias ($204,6 \pm 71,2\%$, $n = 9$) e 42 dias ($359,1 \pm 113,3\%$, $n = 14$) após enxertia (Fig. 1). O tratamento com Composto (A) durante 10 dias não modificou o aumento no diâmetro externo dos aneurismas ($197,3 \pm 52,8\%$, $n = 9$), em comparação com ratos não tratados; o diâmetro externo médio dos aneurismas foi similar entre os dois grupos ($2,22 \pm 0,56$ mm vs. $2,22 \pm 0,70$ mm, em ratos de controlo e tratados com Composto (A), respetivamente) (Fig. 1a,c). No entanto, após 42 dias de tratamento, o diâmetro externo médio dos aneurismas era significativamente menor no grupo tratado com Composto (A) ($3,61 \pm 1,46$ mm, $n = 14$ vs. $5,21 \pm 1,22$ mm, $n = 14$, em ratos tratados com Composto (A) e de controlo, respetivamente), e o aumento percentual no diâmetro externo foi significativamente reduzido (Fig. 1b,c). O tratamento com Composto (A) preveniu assim a expansão dos aneurismas, como mostrado pela diferença no aumento percentual no diâmetro aórtico observado em ratos de controlo entre os Dias 10 e 42, que foi reduzido no grupo com Composto (A) (Fig. 1c). Adicionalmente, a incidência de aneurismas maiores ao Dia 42 (diâmetro > 4 mm) predominou no grupo de controlo, em comparação com o grupo tratado com Composto (A) ($X^2 = 11,6$, $P < 0,001$).

Formação de Trombos Murais

Os aneurismas experimentais que se desenvolvem a partir de xenoenxertos com matriz extracelular descelularizada são caracterizados pela presença de um trombo mural, como

previamente descrito (Touat et al., 2006) (Fig. 2a). No grupo de controlo, as taxas de área do trombo/área da parede representaram $0,22 \pm 0,14$ ao Dia 10 e aumentaram para $0,78 \pm 0,89$ pelo Dia 42 (Fig. 2b). O tratamento com Composto (A) reduziu significativamente a área de trombo/paredes, em ambos os Dias 10 e 42 ($0,07 \pm 0,05$ e $0,35 \pm 0,44$, respetivamente) (Fig. 2b). Esta redução relativa na área do trombo esteve associada a uma diminuição significativa na área positiva quanto a CD41 (integrina α_{IIb} , um marcador de plaquetas) dentro do trombo aos 42 dias ($0,13 \pm 0,16$ e $0,68 \pm 1,36$ para ratos tratados com Composto (A) e do grupo de controlo, respetivamente, $P = 0,005$) (Fig. 2c). Finalmente, existiu uma correlação significativa entre a área do trombo e o diâmetro do trombo ao Dia 42 quando todos os ratos foram considerados ($R^2 = 0,25$, $P = 0,0003$). A análise intragrupal mostrou que o tratamento com Composto (A) reduziu significativamente o(s) declive(s) da correlação em comparação com o grupo de controlo (Composto (A): $s = 0,17$, $R^2 = 0,40$; controlo: $s = 0,30$, $R^2 = 0,13$) (Fig. 2c), proporcionando evidência de que essa inibição da ativação de plaquetas pelo Composto (A) limitará o progresso da AAA experimental.

Infiltração Inflamatória

O desenvolvimento de aneurismas está associado a um processo inflamatório que envolve leucócitos polimorfonucleares (PMN) e macrófagos. Ambas as células inflamatórias estavam presentes dentro do trombo mural e da parede dos aneurismas (Fig. 3). No entanto, os PMNs foram maioritariamente encontrados dentro do trombo mural onde representavam o principal tipo de célula inflamatória. Em contraste, os macrófagos predominavam dentro da parede. Ao passo que a densidade de PMN diminuiu entre os Dias 10 e 42, a densidade de macrófagos aumentou (Fig. 3). O

tratamento com Composto (A) inibiu significativamente a infiltração de PMNs e macrófagos no trombo mural aos Dias 10 e 42 (Fig. 3). Não existiu nenhuma mudança na infiltração de macrófagos na parede dos aneurismas.

Expressão de MMP-9 nos Aneurismas e Fibras Elásticas Conservadas no Meio

A expressão de MMP-9, relevada por imunocoloração, foi detetada em ratos de controlo tanto no trombo como na parede dos aneurismas (Fig. 4a). A área positiva quanto a MMP-9 foi maior dentro do trombo do que na parede ao Dia 42. O tratamento com Composto (A) reduziu marcadamente a área positiva quanto a MMP-9, tanto no trombo como na parede (Fig. 4a). Adicionalmente, existiu uma correlação positiva significativa entre a área do trombo e a expressão de MMP-9 dentro do trombo ao Dia 42 quando todos os ratos foram considerados ($R^2 = 0,79$, $P < 0,0001$) (Fig. 4b). Refletindo a expressão diminuída de MMP-9, foi observada conservação significativa das fibras elásticas do meio com tratamento com Composto (A) em ambos os momentos (Fig. 5a). Embora a área relativa ocupada pelas fibras elásticas tenha permanecido constante em ratos de controlo entre o Dia 10 e o Dia 42, a área de fibras elásticas aumentou fortemente em ratos tratados com Composto (A) (Fig. 5a).

Colonização de VSMC do Trombo Mural

As SMCs colonizaram o enxerto descelularizado e a parte do trombo mural que se desenvolveu perto da parede, como revelado pela coloração positiva quanto a α -actina dentro da parede e do trombo (Fig. 5b). Além do mais, a densidade de SMCs aumentou do Dia 10 para o Dia 42, tanto dentro da parede como do trombo, proporcionando evidência da tendência do modelo de iniciar um processo de cura espontânea com o tempo. Ao passo que o tratamento com

Composto (A) durante 10 dias não modificou a densidade de SMCs dentro do trombo em comparação com controlos, o tratamento durante 42 dias melhorou significativamente a colonização de SMC do trombo (Fig. 5b). Isto esteve associado a uma deposição de colagénio, como mostrado por coloração com vermelho de sÍrius (Fig. 2a). Em contraste, o tratamento com Composto (A) não afetou a colonização de SMC da parede após 10 ou 42 dias (Fig. 5b).

Conclusão

A prevenção da formação de trombo mural da AAA através da inibição da ativação de plaquetas pelo Composto (A) limitou o progresso da AAA experimental. Por bloqueio da ativação de plaquetas e redução da formação de trombo mural, o Composto (A) diminuiu o recrutamento de leucócitos no trombo e o seu enriquecimento subsequente com proteases, levando à conservação da integridade da parede e ao início da cura como revelado pela intensificação da colonização de células mesenquimatosas.

Lisboa, 24 de Outubro de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Uso do composto $\{1S-[1\alpha, 2\alpha, 3\beta(1S^*, 2R^*), 5\beta]\}-3-(7-\{[2-(3,4\text{-difluorofenil)ciclopropil]amino}\}-5-(\text{propiltio})-3H-1,2,3\text{-triazolo}[4,5-d]\text{pirimidin-3-il})-5-(2\text{-hidroxietoxi})\text{ciclopentano-1,2-diol}$ para o fabrico de um medicamento para o tratamento de aneurismas aórticos abdominais.
2. O composto $\{1S-[1\alpha, 2\alpha, 3\beta(1S^*, 2R^*), 5\beta]\}-3-(7-\{[2-(3,4\text{-difluorofenil)ciclopropil]amino}\}-5-(\text{propiltio})-3H-1,2,3\text{-triazolo}[4,5-d]\text{pirimidin-3-il})-5-(2\text{-hidroxietoxi})\text{ciclopentano-1,2-diol}$ para uso no tratamento de aneurismas aórticos abdominais.

Lisboa, 24 de Outubro de 2014

Fig.1A

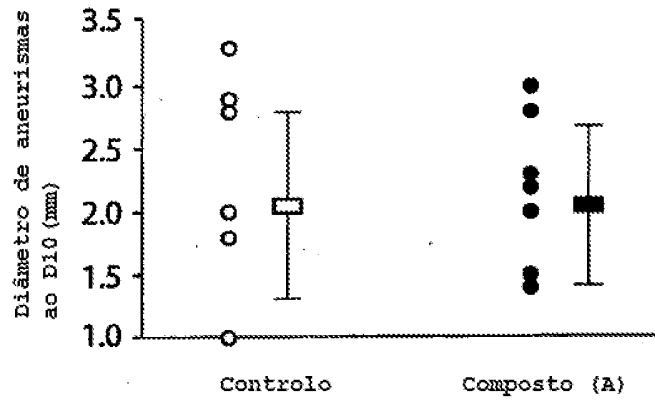


Fig.1B

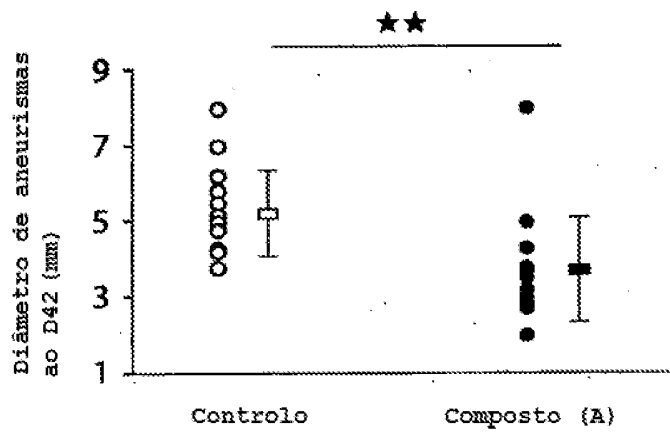


Fig.1C

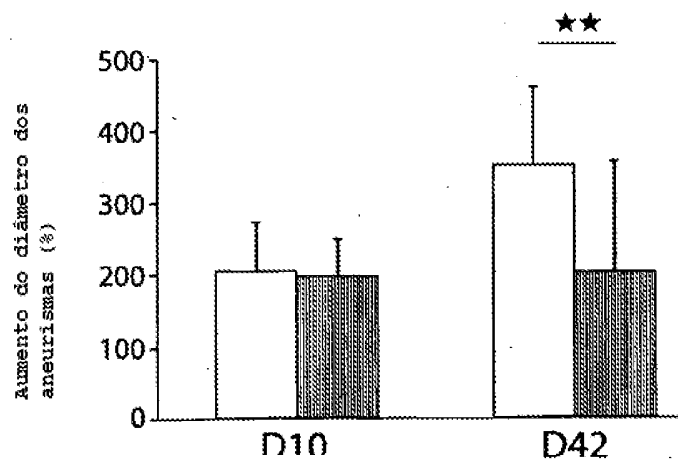


Fig.2A

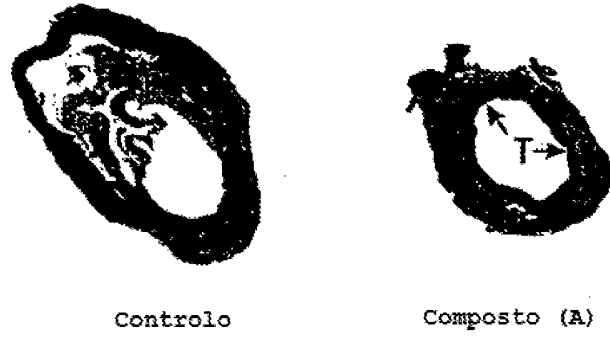


Fig.2B

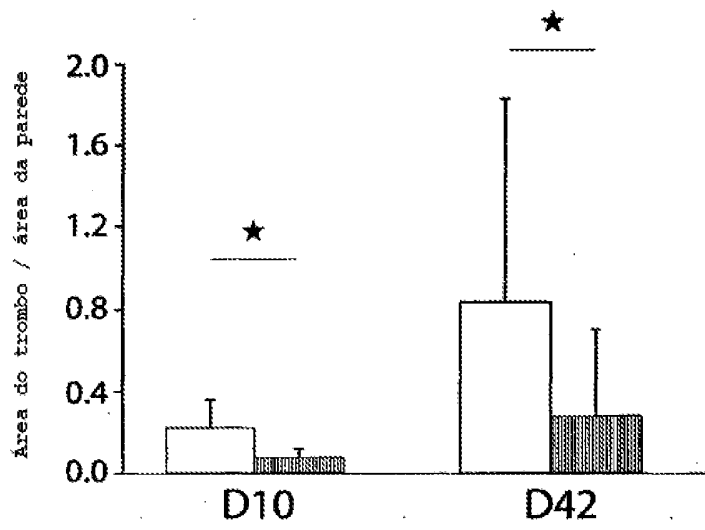


Fig.2C

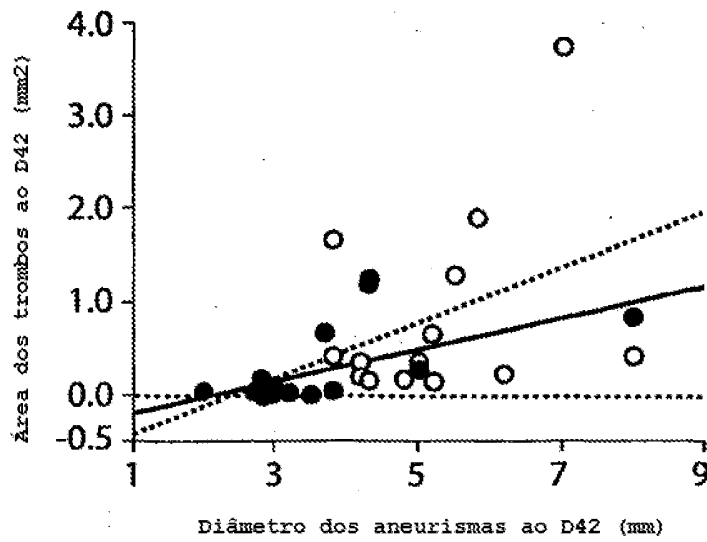
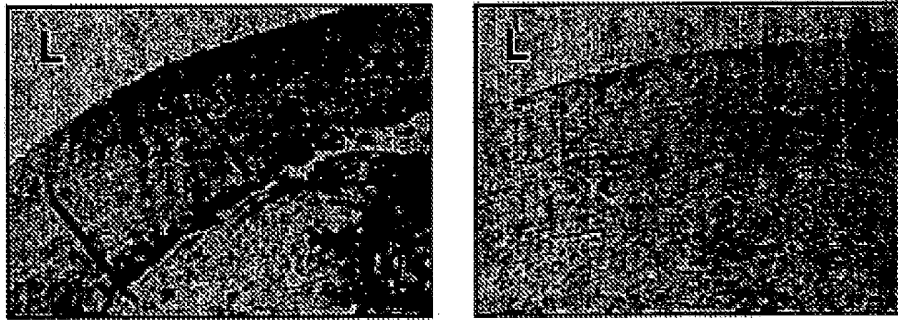


Fig.2D



Área positiva quanto a CD41 dos
trombos / área da parede ao D42

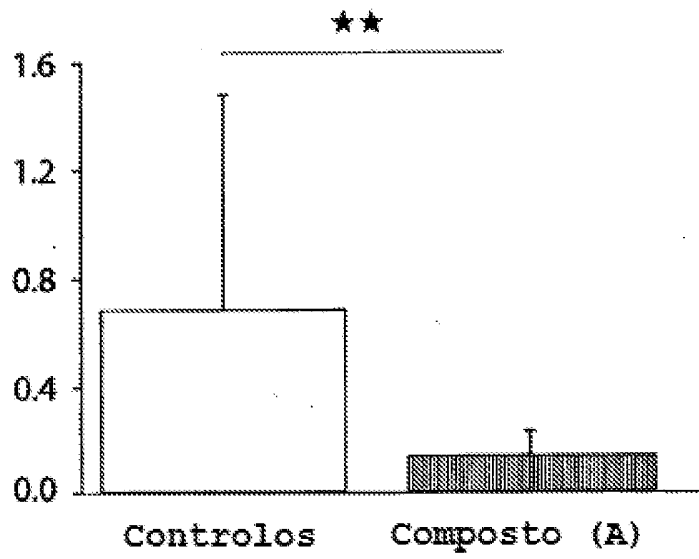


Fig.3A

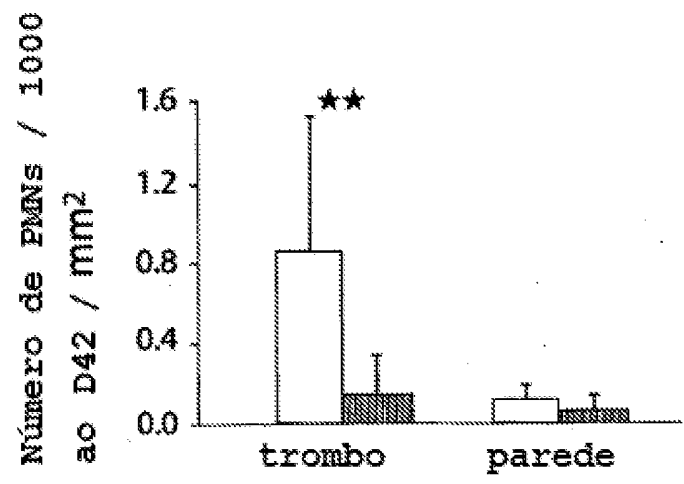
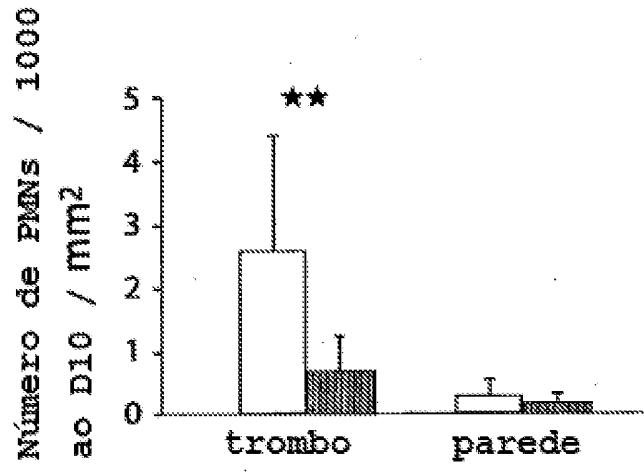
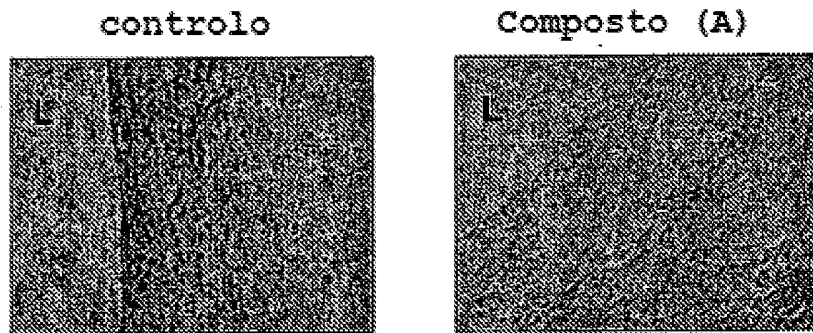
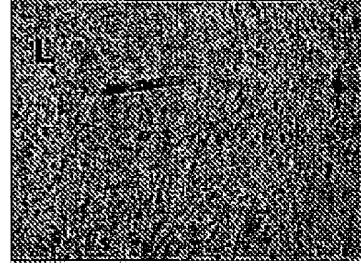
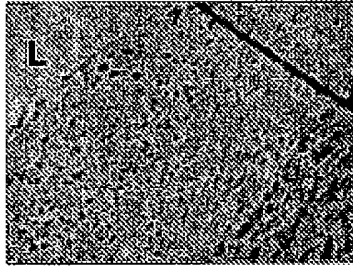


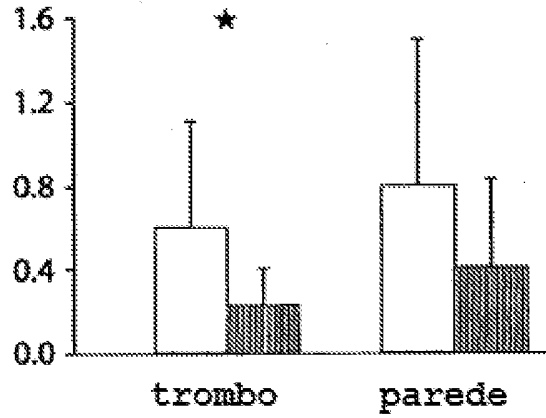
Fig.3B

controle

Composto (A)



Número de macrófagos / 1000 ao D10 / mm²



Número de macrófagos / 1000 ao D42 / mm²

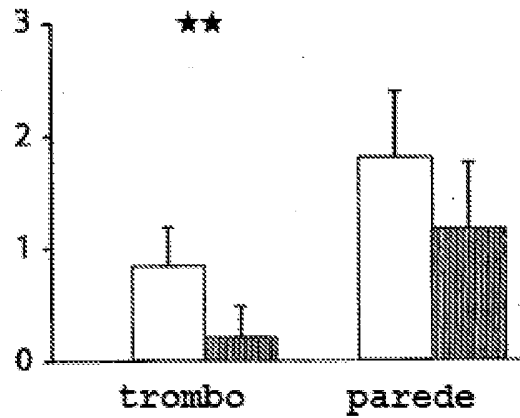


Fig.4A

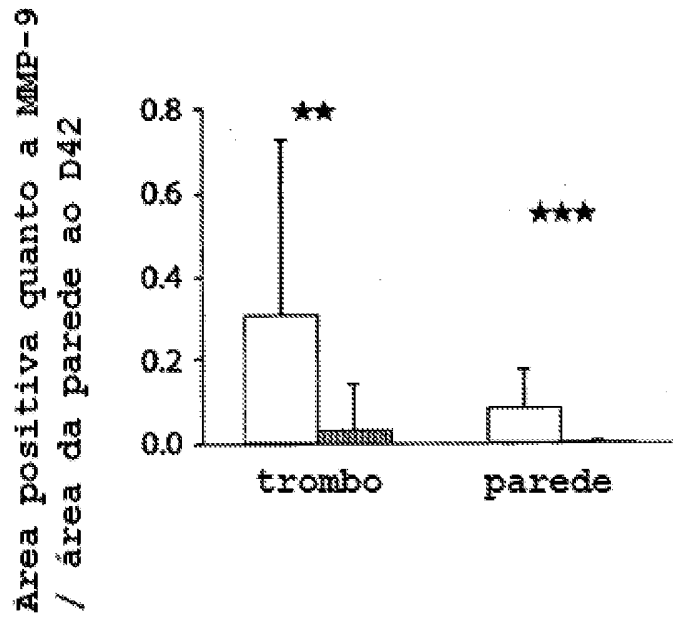
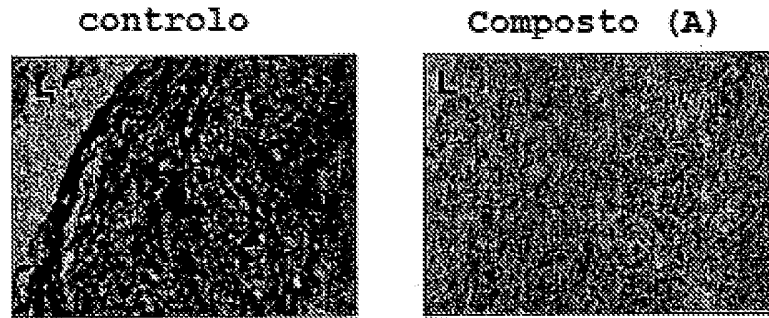


Fig.4B

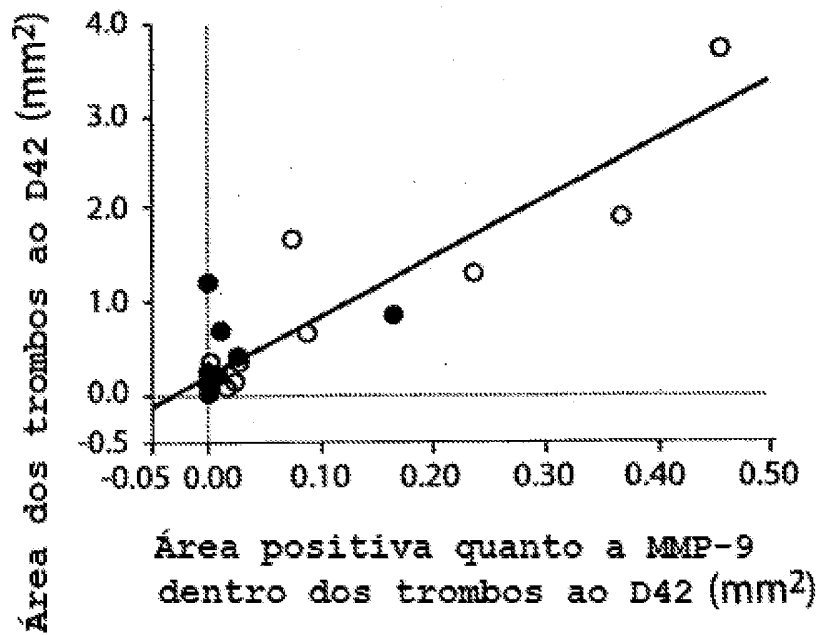


Fig.5A

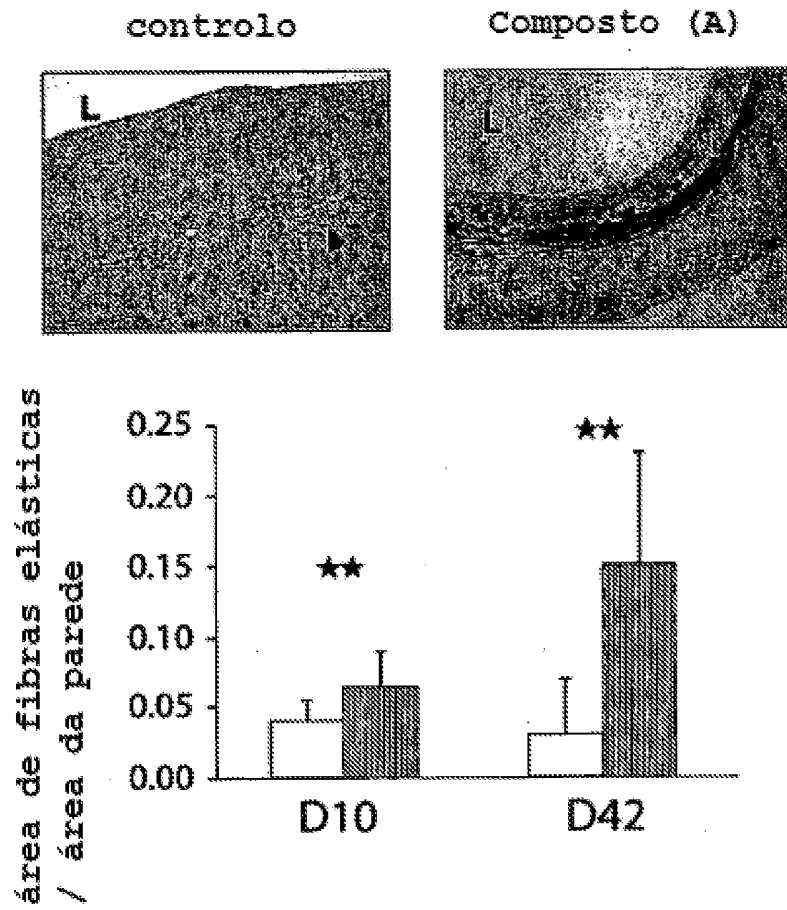
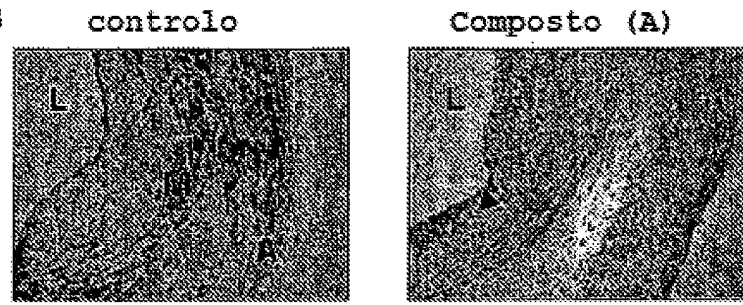
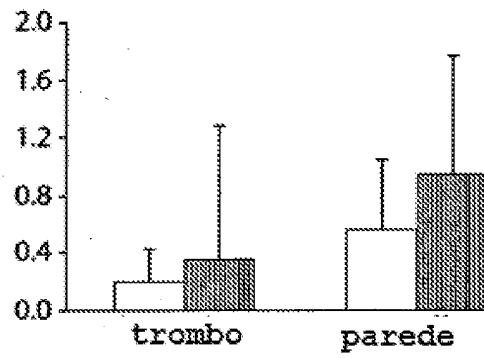


Fig.5B



células positivas quanto a α -actina x 1000 ao D10 / mm²



células positivas quanto a α -actina x 1000 ao D42 / mm²

