



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0900983-3 B1



(22) Data do Depósito: 31/03/2009

(45) Data de Concessão: 28/01/2020

(54) **Título:** COMPOSTO DE DIOMETINA, PROCESSO PARA A SÍNTESE DO MESMO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E SEU USO

(51) **Int.Cl.:** C07D 311/00; A61K 31/352; A61P 7/02; A61P 9/12; A61P 9/14.

(30) **Prioridade Unionista:** 01/04/2008 FR 08 01779.

(73) **Titular(es):** LES LABORATOIRES SERVIER.

(72) **Inventor(es):** MICHEL WIERZBICKI; MARIE-FRANÇOISE BOUSSARD; TONY VERBEUREN; PATRICIA SANSILVESTRI-MOREL; ALAIN RUPIN; JÉRÔME PAYSANT; FRANÇOIS LEFOULON.

(57) **Resumo:** COMPOSTOS DE DIOMETINA, PROCESSO PARA SUA PREPARAÇÃO E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO OS MESMOS. Compostos de fórmula (1): em que R~ 1~, R~ 2~ e R~ 3~, que podem ser iguais ou diferentes, representam, cada um, um átomo de hidrogênio ou o grupo de fórmula (A): Medicamentos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSTO DE DIOMETINA, PROCESSO PARA A SÍNTESE DO MESMO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E SEU USO**".

[001] A presente invenção refere-se a novos compostos de diosmetina, a um processo para sua preparação e a composições farmacêuticas contendo os mesmos.

[002] Compostos de diosmetina e sua atividade no tratamento de insuficiência venosa têm sido descritos no relatório descritivo da patente EP 0 709 383.

[003] Os compostos da invenção são inibidores de moléculas de adesão, inibidores de NADPH oxidase e agentes de agregação antiplaquetária.

[004] As propriedades de inibição de adesão de leucócitos e inibição de NADPH oxidase são importantes no tratamento de doença venosa crônica em consideração ao fato que, nesta patologia, a inflamação da rede microcirculatória dos membros inferiores que envolvem infiltrações de leucócitos tem sido amplamente descrita (Verbeuren TJ, Bouskela E, Cohen RA *et al.*, *Regulation of adhesion molecules: a new target for the treatment of chronic venous insufficiency*, 2000, *Microcirculation*, 7, S41-S48).

[005] A propriedade de inibição de agregação plaquetária demonstra o potencial antitrombótico dos compostos da invenção, não somente na prevenção e no tratamento de trombozes venosas e arteriais, como também no tratamento de doença venosa crônica, em que as plaquetas podem ser ativadas por mediadores inflamatórios, ou em pacientes que têm síndrome pós-trombótica.

[006] A presença de microangiopatia capilar/venular tem sido demonstrada em doenças venosas crônicas. Essa microangiopatia é a consequência de hipertensão venosa e causa problemas com filtração capilar/venular (hiperpermeabilidade) e, portanto, microedemas (Bar-

bier *et al.*, *Microcirculation and rheology*, 1994, *Presse med.* 23, 213-224). Numerosos estudos mostraram o envolvimento de ativação celular endotelial em hipertensão venosa associada a um aumento nos níveis circulantes de moléculas de adesão (Saharay M, Shields DA, Georgiannos SN *et al.*, *Endothelial activation in patients with chronic venous disease*, 1998, *Eur J Vasc Surg*, 15, 342-349; Verbeuren TJ, Bouskela E, Cohen RA *et al.*, *Regulation of adhesion molecules: a new target for the treatment of chronic venous insufficiency*, 2000, *Microcirculation*, 7, S41-S48). Os compostos da presente invenção não somente têm atividade anti-inflamatória, mas também atividade anti-hiperpermeabilidade.

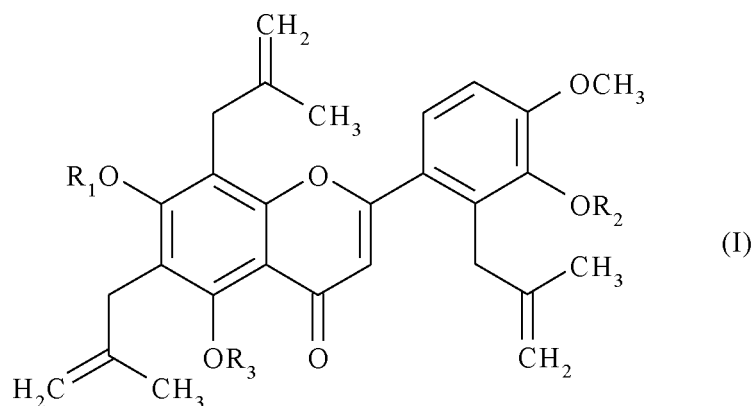
[007] Além disso, um aumento dos radicais livres e, portanto, a ativação da NADPH oxidase foi demonstrada nas doenças venosas crônicas. Acredita-se que esse estresse oxidativo está ligado à ativação celular endotelial e à infiltração de leucócitos (Glowinski J e Glowinski S, *Generation of reactive oxygen metabolites by the varicose vein wall*, 2002, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 23, 5550-555).

[008] Infiltração de células endoteliais e indução de moléculas de adesão e de NADPH oxidase têm sido demonstradas em numerosas patologias vasculares (Bedard K e Krause KH, *The NOX family of ROS-generating oxidases: Physiology and pathophysiology*, 2007, *Physiol. Rev.* 87, 245-313).

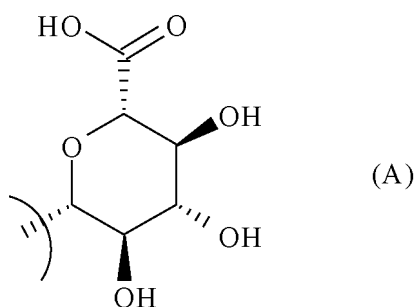
[009] Por conseguinte, os compostos da presente invenção podem ser usados na prevenção ou no tratamento de doenças venosas, especialmente doença venosa crônica em todos os seus estágios (dor, telangiectasia, veias varicosas, edemas, distúrbios tróficos, úlceras) e também na prevenção ou no tratamento da síndrome pós-trombótica, complicações vasculares associadas ao diabetes, hipertensão, aterosclerose, inflamação, síndrome metabólica associada à obesidade, complicações vasculares associadas à obesidade, angina de peito,

arterite dos membros inferiores ou acidentes vasculares cerebrais, cura de ferimentos crônicos incluindo, principalmente, úlceras venosas ou úlceras de perna mistas e pé diabético, no tratamento ou na prevenção de ataques de hemorróidas, no tratamento ou na prevenção de úlceras de pressão e no tratamento da esclerose múltipla.

[0010] Mais especificamente, a presente invenção refere-se aos compostos de fórmula (I):

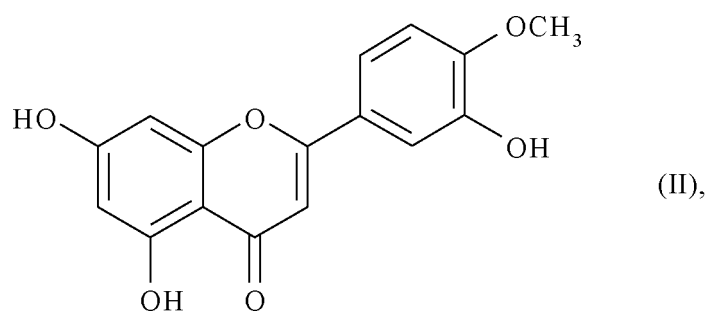


em que R_1 , R_2 e R_3 , que podem ser iguais ou diferentes, representam, cada um, um átomo de hidrogênio ou o grupo de fórmula (A):

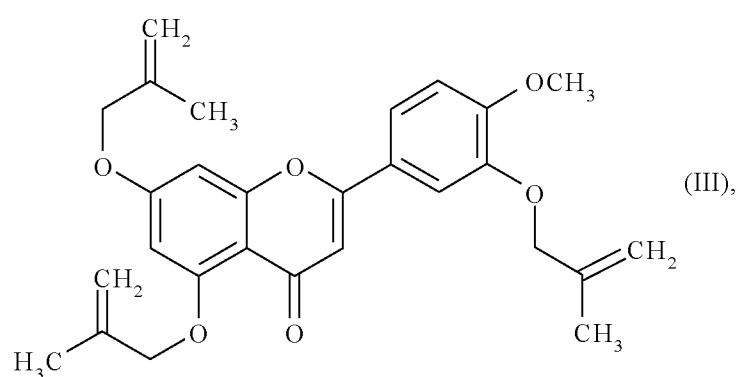


[0011] Compostos em que pelo menos um de R_1 , R_2 e R_3 representam um grupo (A) são metabólitos do composto de fórmula (Ia), em que R_1 , R_2 e R_3 , representam, cada um, um átomo de hidrogênio.

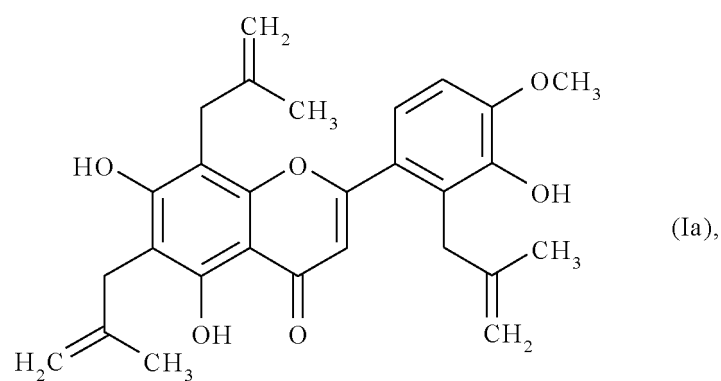
[0012] A presente invenção refere-se também a um processo para a preparação dos compostos de fórmula (I), partindo da diosmetina de fórmula (II):



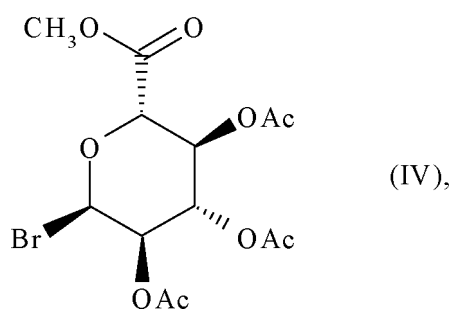
que é reagida com brometo de metalila para produzir o composto de fórmula (III):



que é aquecido para produzir o composto de fórmula (Ia), um caso particular dos compostos de fórmula (I), em que R₁, R₂ e R₃ representam, cada um, um átomo de hidrogênio:



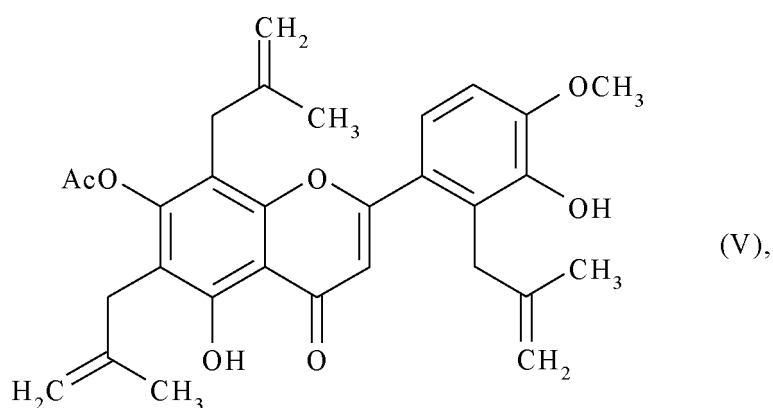
que, quando se deseja obter outros compostos de fórmula (I), é reagido com o composto de fórmula (IV):



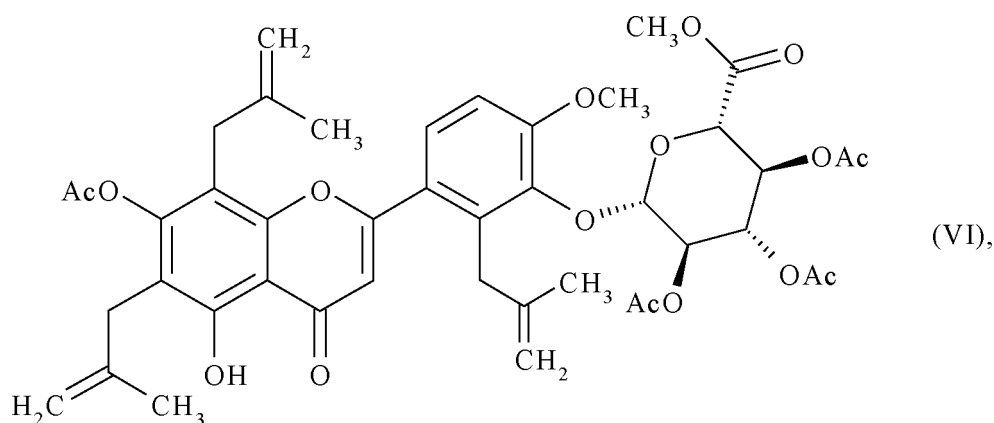
em que Ac representa o grupo acetila,
para produzir, depois das desproteção de a função ácido e as funções
álcool do grupo (A), os compostos de fórmula (I), em que pelo menos
um de R_1 , R_2 e R_3 é diferente de H.

[0013] Quando os compostos de fórmula (I) são obtidos em uma
mistura, eles podem ser separados, por exemplo, por cromatografia de
HPLC preparativa.

[0014] O composto de fórmula (Ib), em que R_1 e R_3 representam,
cada um, um átomo de hidrogênio e R_2 representa um grupo de fórmu-
la (A), pode ser também obtido por acetilação do composto de fórmula
(Ia) para dar o composto de fórmula (V):



em que Ac representa o grupo acetila,
que é reagido com o composto de fórmula (IV) para produzir o com-
posto de fórmula (VI):



em que Ac representa o grupo acetila,

a função ácido e funções álcool e fenol deste são desprotegidas para produzir o composto de fórmula (Ib).

[0015] Os compostos da invenção são inibidores de molécula de adesão e de NADPH oxidase e agentes de agregação antiplaquetária.

[0016] Em virtude desses, eles são úteis na prevenção ou no tratamento de doenças venosas, especialmente doença venosa crônica em todos os seus estágios (dor, telangiectasia, veias varicosas, edemas, distúrbios tróficos, úlceras) e também na prevenção ou no tratamento da síndrome pós-trombótica, complicações vasculares associadas ao diabetes, hipertensão, aterosclerose, inflamação, síndrome metabólica associada à obesidade, complicações vasculares associadas à obesidade, angina de peito, arterite dos membros inferiores ou acidentes vasculares cerebrais, cura de ferimentos crônicos incluindo, principalmente, úlceras venosas ou úlceras de perna mistas e pé diabético, no tratamento ou na prevenção de ataques de hemorróidas, no tratamento ou na prevenção de úlceras de pressão e no tratamento da esclerose múltipla.

[0017] A presente invenção refere-se também a composições farmacêuticas que compreendem como ingrediente ativo um composto de fórmula (I), em combinação com um ou mais veículos ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis, atóxicos, inertes.

[0018] Dentre as composições farmacêuticas, de acordo com a

invenção, podem ser mencionadas especialmente aquelas que são adequadas para administração oral, parenteral (intravenosa, intramuscular ou subcutânea), per- ou transcutânea, nasal, retal, perlingual, ocular ou respiratória e, especialmente, comprimidos ou drágeas, comprimidos sublinguais, cápsulas de gelatina dura, cápsulas, supositórios, cremes, unguentos, géis dermatológicos, preparações injetáveis ou bebíveis, aerossóis, colírios e gotas nasais.

[0019] Além do composto de fórmula (I), as composições farmacêuticas de acordo com a invenção compreendem um ou mais excipientes ou veículos tais como diluentes, lubrificantes, ligantes, agentes desintegradores, absorventes, corantes, e adoçantes.

[0020] A título de exemplo de excipientes ou veículos, podem ser mencionados:

como diluentes: lactose, dextrose, sacarose, manitol, sorbitol, celulose e glicerol;

como lubrificantes: sílica, talco, ácido esteárico e seus sais de magnésio e de cálcio, polietileno glicol;

como ligantes: silicato de alumínio, silicato de magnésio, amido, gelatina, tragacanto, metilcelulose, carboximetilcelulose sódica e polivinil pirrolidona,

como agentes desintegradores: ágar, ácido algínico e seu sal de sódio, e misturas efervescentes.

[0021] A percentagem do ingrediente ativo de fórmula (I) na composição farmacêutica é preferivelmente de 5% a 50% em peso.

[0022] A dosagem útil varia de acordo com a idade e o peso do paciente, a via de administração, a natureza e a gravidade do distúrbio, e a administração de quaisquer tratamentos associados e varia de 0,5 mg a 1.000 mg por dia em uma ou mais administrações.

[0023] Os Exemplos a seguir ilustram a presente invenção. As estruturas dos compostos descritos nos Exemplos foram determinadas

de acordo com técnicas espectrofotométricas rotineiras (infravermelho, ressonância magnética nuclear, espectrometria de massa).

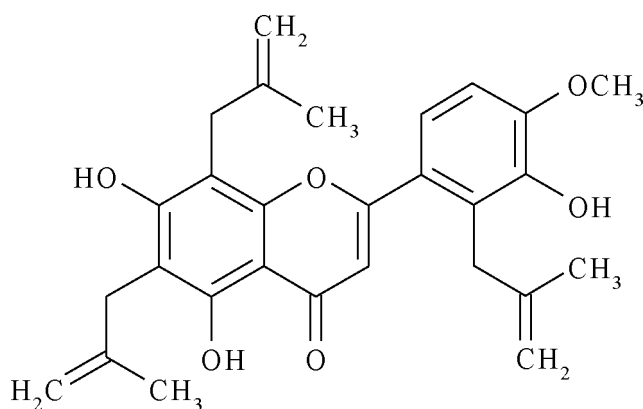
ABREVIACÕES

[0024] DMSO: sulfóxido de dimetila

[0025] NADPH: forma reduzida de Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

[0026] HPLC: Cromatografia Líquida de Alto Desempenho

EXEMPLO 1: 6,8,2'-Tris(isobut-2-en-1-il)diosmetina



Etapa A: 2-{4-Metóxi-3-[(isobut-2-en-1-il)óxi]fenil}-5,7-bis[(isobut-2-en-1-il)óxi]-4H-cromen-4-ona

[0027] A 30 g de diosmetina são adicionados 69,3 g de carbonato de potássio e 450 ml de acetona. A mistura é aquecida sob refluxo por 4 horas e 30 minutos e então levada para a temperatura ambiente; 54 g de brometo de metalila são então adicionados. A mistura reacional é então aquecida sob refluxo durante a noite e então retornada para a temperatura ambiente e filtrada. A torta de filtro é rinsada com acetona e o filtrado é então evaporado para produzir um resíduo que é recristalizado de tolueno para produzir o composto do título.

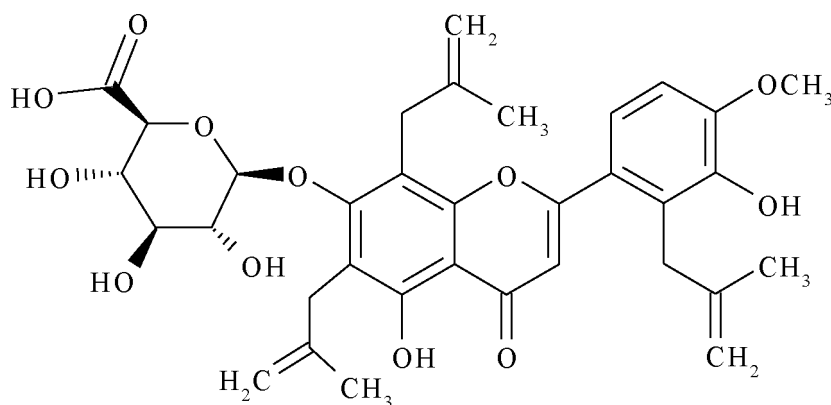
Etapa B: 6,8,2'-Tris(isobut-2-en-1-il)diosmetina

[0028] A 10 g do composto obtido na Etapa anterior são adicionados 120 ml de N,N-dimetilanilina; a mistura é então aquecida sob refluxo por uma hora. O solvente é então evaporado sob pressão reduzida e o resíduo obtido é recristalizado de isopropanol para produzir o

composto to título.

Ponto de fusão: 141°C.

EXEMPLO 2: Ácido (5-hidróxi-2-[3-hidróxi-4-metóxi-2-(isobut-2-en-1-il)fenil]-6,8-bis(isobut-2-en-1-il)-4-oxo-4H-cromen-7-il)-beta-D-glucurônico



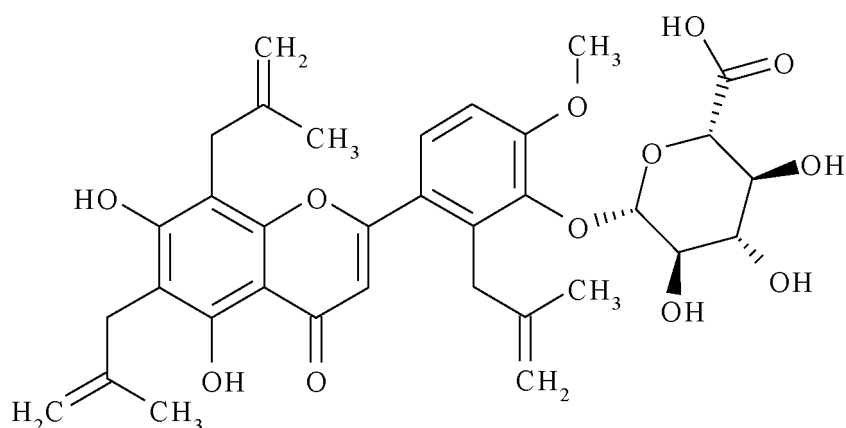
Etapa A: 5-Hidróxi-2-[3-hidróxi-4-metóxi-2-(isobut-2-en-1-il)fenil]-6,8-bis(isobut-2-en-1-il)-4-oxo-4H-cromen-7-il-2,3,4-tris-O-acetil-beta-D-glucoronato de metila

[0029] O composto do título é obtido por reação do composto do Exemplo 1 (250 mg) com o composto de fórmula (IV) (429 mg), por catálise de transferência de fase, de acordo com o procedimento descrito na publicação *Synth Commun* **1999**, 29(16), 2775-2781.

Etapa B: Ácido de (5-hidróxi-2-[3-hidróxi-4-metóxi-2-(isobut-2-en-1-il)fenil]-6,8-bis(isobut-2-en-1-il)-4-oxo-4H-cromen-7-il)-beta-D-glucurônico

[0030] O composto obtido da Etapa A é dissolvido em metanol, e então hidróxido de sódio é adicionado. A mistura é refluxada por uma hora e 30 minutos e então neutralizada com uma solução de ácido clorídrico a 2N antes de ser evaporada à securo para produzir o composto do título.

EXEMPLO 3: Ácido 3-[5,7-di-hidróxi-6,8-bis(isobut-2-en-1-il)-4-oxo-4H-cromen-2-il]-6-metóxi-2-(isobut-2-en-1-il)fenil]-beta-D-glucurônico



Etapa A: Acetato de 5-hidróxi-2-[3-hidróxi-4-metóxi-2-(isobut-2-en-1-il)fenil]-6,8-bis(isobut-2-en-1-il)-4-oxo-4H-cromen-7-ila

[0031] O composto do Exemplo 1 (3 g) é dissolvido em piridina, e então anidrido acético (0,61 ml) é adicionado, na temperatura ambiente. A mistura reacional é então agitada por 16 horas e subsequentemente evaporada à securo. O resíduo é absorvido em água gelada e então extraído com diclorometano, secado, filtrado e evaporado. O produto bruto assim obtido é purificado em sílica-gel e então HPLC preparativa de fase reversa para produzir o composto do título.

Etapa B: 3-[7-(Acetilóxi)-5-hidróxi-6,8-bis(isobut-2-en-1-il)-4-oxo-4H-cromen-2-il]-6-metóxi-2-(isobut-2-en-1-il)fenil-2,3,4-tris-O-acetil-beta-D-glucoronato de metila

[0032] A partir do composto obtido na Etapa anterior, o composto do título é obtido de acordo com o procedimento da Etapa A do Exemplo 2.

Etapa C: Ácido 3-[5,7-di-hidróxi-6,8-bis(isobut-2-en-1-il)-4-oxo-4H-cromen-2-il]-6-metóxi-2-(isobut-2-en-1-il)fenil-beta-D-glucorônico

[0033] A partir do composto obtido na Etapa anterior, o composto do título é obtido de acordo com o procedimento da Etapa B do Exemplo 2.

Estudo Farmacológico

[0034] Nos Exemplos a seguir o termo “composto de referência” refere-se ao Exemplo 69 da EP 0 709 383.

EXEMPLO 4: Inibição *in vitro* de agregação plaquetária

[0035] Uma amostra de sangue é retirada de coelhos da Nova Zelândia anestesiados, da artéria carótida, em citrato a 0,109M. O plasma rico em plaquetas é obtido por centrifugação. As plaquetas são então lavadas por centrifugação.

[0036] As plaquetas lavadas são ressuspensas em um tampão de Tyrode. A suspensão de plaquetas é colocada em uma célula e então em um agregômetro a 37°C, com agitação, em presença do composto do Exemplo 1 (30µM) ou do composto de referência (30µM), cada um diluído no mesmo solvente (DMSO a 0,1%). Depois de 2 minutos, a agregação é produzida usando colágeno (4 µg/ml); a resposta é então registrada por 6 minutos.

[0037] A agregação plaquetária é quantificada por meio de turbidimetria, ou seja, a percentagem de luz que é transmitida através da suspensão de plaquetas com respeito a uma célula contendo Tyrode e uma célula contendo o solvente (DMSO a 0,1%).

[0038] A eficácia antiagregação dos compostos de diosmetina de acordo com a invenção e, especialmente, do composto do Exemplo 1, e do composto de referência é avaliada como uma função da inibição em percentagem da agregação plaquetária, quanto maior a percentagem de inibição maior a atividade. O composto do Exemplo 1 (30µM) causa inibição de 36,6±9,9%, ao passo que o composto de referência não causa um efeito significativo (4,1±1,8%); (P<0,01 do composto do Exemplo 1 em relação ao composto de referência, teste t de Student, n=7).

[0039] Esse teste demonstra a atividade de agregação antiplaquetária e, portanto, o potencial antitrombótico do composto do Exemplo 1.

EXEMPLO 5: Inibição *in vivo* de adesão de leucócitos

[0040] Três grupos de 3 hamsters, pesando de 90 a 110 g, são

usados neste estudo. Trinta minutos antes da anestesia, os hamsters são tratados oralmente com uma dose única de placebo (goma arábica a 10%) do composto do Exemplo 1 (3 mg/kg) ou do composto de referência (3 mg/kg). Os animais são anestesiados com pentobarbital, 50 mg/kg por administração intraperitoneal. Os hamsters são colocados em um microscópio, e a bolsa da bochecha é isolada e imersa em um solução de perfusão (NaCl a 110,0mM, KCl a 4,7mM, CaCl₂ a 2,0mM, MgSO₄ a 1,2mM, NaHCO₃ a 18,0mM, HEPES a 15,39mM e HEPES Na⁺-sal a 14,61mM), (Duling, *The preparation and use of the hamster cheek pouch for studies of the microcirculation*, 1973, *Microvasc. Res.* 5: 423-429; Svensjö *et al.*, *The hamster cheek pouch preparation as a model for studies of macromolecular permeability of the microvasculature*, 1978, *Uppsala J. Med. Sci.* 83 : 71-79).

[0041] Isquemia local é produzida com a ajuda de um tubo de látex colocado na entrada da bolsa da bochecha. A pressão intratubular do tubo é aumentada para 220-220 mm Hg com a ajuda de uma seringa calibrada. Essa oclusão total é efetuada durante 30 minutos e então a reperfusão é realizada durante 45 minutos. A adesão de leucócitos às células endoteliais nas vênulas pós-capilares é quantificada em um campo de 6 mm², imediatamente após o início da isquemia (definida como 100%) e então em tempos diferentes depois da reperfusão (0, 15, 30 e 45 minutos).

[0042] O modelo de adesão de leucócitos, produzido pela reperfusão da isquemia na bolsa da bochecha do hamster, possibilita confirmar a eficácia dos compostos de diosmetina de acordo com a invenção como agentes antiadesão, especialmente o composto do Exemplo 1 e o composto de referência.

[0043] A atividade do composto do Exemplo 1 e do composto de referência é avaliada como uma função do número de leucócitos que aderem às células endoteliais por um campo de 6 mm² depois da is-

quemia/reperfusão, quanto maior esta atividade menor o número de leucócitos e, portanto, menor a percentagem de leucócitos aderentes em relação ao número dos leucócitos aderentes depois da isquemia.

| Tempo depois da reperfusão (minutos) | Placebo | Composto do Exemplo 1 | Composto de referência |
|--------------------------------------|-------------|-----------------------|------------------------|
| 0 | 165,8±12,8% | 81,7±19,1% ** | 129,3±10,9% |
| 15 | 211,8±11,6% | 100±13,7% *** | 138,0±14,4% ** |
| 30 | 210,5±16,6% | 91,0±18,7% *** | 121,0±18,0% ** |
| 45 | 166,3±11,1% | 109,3±23,0% | 133,7±42,4% |

Tabela 1: O efeito do tratamento oral de hamsters com o composto do Exemplo 1 ou com o composto de referência sobre o número de leucócitos que aderem às células endoteliais em vênulas pós-capilares da bolsa da bochecha, depois da isquemia (número de leucócitos considerado como 100%) e depois de 0, 15, 30 e 45 minutos da reperfusão. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ em relação ao tratamento com placebo, fator 2 (tempo e tratamento), ANOVA, seguido por um teste de Bonferroni ($n=3$).

[0044] O composto do Exemplo 1 possibilita reduzir clara e significativamente o número de leucócitos que aderem às células endoteliais depois da isquemia/reperfusão em relação ao placebo. A atividade do composto do Exemplo 1 é mais potente que aquele do composto de referência.

[0045] Esse teste demonstra a atividade inibidora, na adesão de leucócitos, do composto do Exemplo 1 e, portanto, o potencial para o tratamento de doença venosa e também de doenças vasculares arteriais, tais como aterosclerose ou complicações vasculares associadas ao diabetes.

EXEMPLO 6: Inibição *in vivo* da expressão da Molécula 1 de Adesão

Celular Vascular (VCAM-1)

[0046] Quatro grupos de 8 camundongos deficientes em apolipoproteína E (ApoE^{-/-}, desenvolvendo espontaneamente placas de ateroma em suas aortas) são usados neste estudo. Com 9 semanas de idade, os camundongos foram tornados diabéticos através de 5 injeções peritoneais de 100 mg/kg de estreptozotocina por 5 dias. Na décima semana, os animais são divididos em quatro grupos: grupo de controle do composto do Exemplo 1, grupo de tratamento do composto do Exemplo 1 (130 mg/kg/dia na ração por 6 semanas), grupo de controle do composto de referência, grupo de tratamento do composto de referência (130 mg/kg/dia na ração por 6 semanas). Os camundongos são sacrificados na décima quinta semana depois da anestesia com isoflurano. As aortas são removidas, dissecadas e congeladas em nitrogênio líquido.

[0047] As aortas são criotrituradas, e o RNA total é extraído usando o microkit RNeasy[®] (Qiagen). Transcrição reversa é então realizada em 1 µg do RNA total usando o kit de síntese de cDNA de primeira fita Superscript[®] III (Invitrogen). A expressão de VCAM-1 é quantificada por PCR em tempo real e normalizada com respeito a 3 genes de referência: β-actina, hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HPRT) e fosfato de gliceraldeído desidrogenase (GAPDH). O kit de supermistura Green IQ[®] SYBR[®] (Biorad) é usado, com 2 µL de cDNA e 150nM de cada iniciador. As amostras são desnaturadas por 5 minutos a 95°C e amplificadas por 40 ciclos de acordo com o seguinte protocolo: desnaturação por 20 segundos a 95°C e hibridização e alongamento por 1 minuto a 54°C para VCAM-1, β-actina e HPRT, e a 56°C para GAPDH. O ciclo-limite (definido como o ciclo para o qual a fluorescência é considerada como sendo significativamente maior que o ruído residual) para VCAM-1 dos animais não-tratados é normalizado com respeito aos genes de referência (e considerado como sendo 100%) e então

comparado com o dos animais tratados.

[0048] Os iniciadores específicos são como a seguir:

[0049] VCAM-1: 5'-AGA GCA GAC TTT CTA TTT CAC-3' (sentido) e 5'-CCA TCT TCA CAG GCA TTT C-3' (antissentido); β -actina: 5'-AAG ACC TCT ATG CCA ACA CAG-3' (sentido) e 5'-AGC CAC CGA TCC ACA CAG-3' (antissentido); HPRT: 5'-AGC TAC TGT AAT GAT CAG TCA ACG-3' (antissentido); GAPDH: 5'-GCC TTC CGT GTT CCT ACC C-3' (sentido) e 5'-TGC CTG CTT CAC CAC CTT-3' (antissentido).

[0050] O modelo de causar diabetes em camundongos que são deficientes em ApoE torna possível confirmar a eficácia dos compostos de diosmetina, de acordo com a invenção, como agentes antiadesão.

[0051] A atividade do composto do Exemplo 1 e do composto de referência é avaliada como uma função do nível da expressão de VCAM-1 na aorta, em comparação com os animais não-tratados, em que esta atividade é maior quanto menor for o nível da expressão de VCAM-1. Os camundongos tratados com o composto do Exemplo 1 têm um nível de expressão de VCAM-1 de $65,9 \pm 10,1\%$ em relação aos camundongos não-tratados ($P < 0,01$, teste t de Student, $n=8$), ao passo que aqueles tratados com o composto de referência têm um nível de expressão de VCAM-1 de $83,0 \pm 6,6\%$ ($P < 0,05$, teste t de Student, $n=8$).

[0052] O composto do Exemplo 1 torna possível reduzir clara e significativamente a expressão de VCAM-1 na aorta de camundongos ApoE^{-/-} diabéticos em relação ao grupo não-tratado. A atividade do composto do Exemplo 1 é mais potente que aquela do composto de referência.

[0053] Esse teste demonstra as atividades inibidoras, na expressão das moléculas de adesão, do composto do Exemplo 1 e, portanto, o potencial para o tratamento de doença venosa e também nas pato-

logias arteriais, tais como complicações vasculares associadas ao diabetes, hipertensão, aterosclerose, inflamação, síndrome metabólica associada à obesidade, complicações vasculares associadas à obesidade, angina de peito, arterite dos membros inferiores e acidentes vasculares cerebrais.

EXEMPLO 7: Inibição *in vitro* da atividade da NADPH oxidase

[0054] O estudo é efetuado em células endoteliais humanas HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, Clonetics Co). As células são cultivadas em um meio EBM2 (Endothelial Basal Medium, Clonetics Co) suplementado com 2% de FCS (Fetal Calf Serum) e EGM2 (Endothelial Growth Medium, Clonetics Co).

[0055] As células são incubadas em presença de solvente (0,1% de DMSO, composto do controle do Exemplo 1), EBM2 (composto do controle do Exemplo 2 e composto do controle do Exemplo 3), composto do Exemplo 1 (100 μ M), composto do Exemplo 2 (100 μ M) ou composto do Exemplo 3 (100 μ M) por 15 minutos e então ativadas com angiotensina II (1 μ M) por 30 minutos para ativar a NADPH oxidase. As células são lavadas com EBM2, e então o substrato de NADPH oxidase (NADPH, 200 μ M) e lucigenina (25 μ M) são adicionados. A redução em lucigenina pelos ânions superóxido produzidos pela NADPH oxidase é quantificada usando um luminômetro. O número de contagens por segundo (cps) dos grupos de controle é comparado com os grupos de tratamento. As cps obtidas com os grupos de controle são consideradas como 100% de atividade de NADPH oxidase.

[0056] O modelo de medição da atividade da NADPH endotelial produzida por angiotensina II possibilita confirmar a eficácia dos compostos de diosmetina de acordo com a invenção como agentes que são inibidores da atividade da NADPH oxidase.

[0057] A atividade dos compostos dos Exemplos 1, 2 e 3 é avaliada como uma função do número de cps obtido, em que quanto maior a

atividade menor o número de cps.

| Grupo | Atividade da NADPH oxidase(% / grupo controle) |
|--|--|
| Composto do grupo de controle do Exemplo 1 | 100% |
| Composto do grupo de tratamento do Exemplo 1 (100µM) | 38,16±3,13% *** |
| Composto do grupo de controle do Exemplo 2 & 3 | 100% |
| Composto do grupo de tratamento do Exemplo 2 (100µM) | 30,60±4,83% *** |
| Composto do grupo de tratamento do Exemplo 3 (100µM) | 18,45±4,08% *** |

Tabela 3: O efeito do tratamento das células endoteliais humanas com os compostos dos Exemplos 1, 2 e 3 sobre a atividade da NADPH oxidase depois da indução usando angiotensina II (atividade do grupo de controle [sem composto] é considerada como sendo 100%).

[0058] ***: $p < 0,01$ em relação ao composto do grupo de controle do Exemplo 1 ou do composto do grupo de controle do Exemplo 2 & 3, teste t de Student (n=3).

[0059] Os compostos dos Exemplos 1, 2 e 3 tornam possível reduzir clara e significativamente a atividade da NADPH oxidase em células endoteliais humanas.

[0060] Esse teste demonstra que as atividades inibidoras, sobre a atividade da NADPH oxidase vascular, dos compostos dos Exemplos 1, 2 e 3 e, portanto, o potencial para inibir radicais livres na doença venosa e também em patologias arteriais tais como aterosclerose, hipertensão, complicações vasculares associadas ao diabetes e às doenças isquêmicas.

EXEMPLO 8: Composição farmacêutica

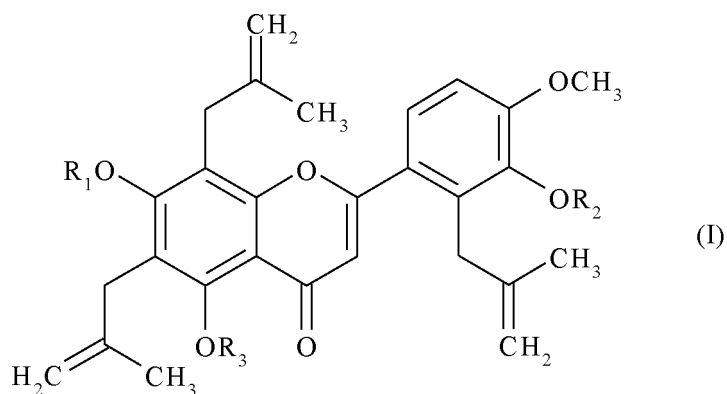
[0061] Fórmula para a preparação de 1.000 comprimidos, cada um contendo 10 mg do ingrediente ativo

Composto do Exemplo 1 10 g
Hidroxipropilcelulose..... 2 g

| | |
|----------------------------|-------|
| Amido de trigo..... | 10 g |
| Lactose | 100 g |
| Estearato de magnésio..... | 3 g |
| Talco | 3 g |

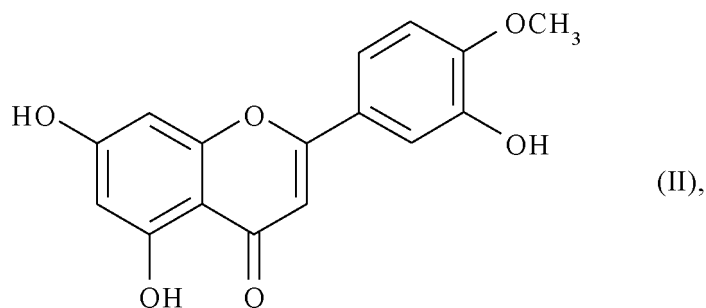
REIVINDICAÇÕES

1. Composto, caracterizado pelo fato de que apresenta a fórmula (I), denominado 6,8,2'-tris(isobut-2-en-1-il)diosmetina:

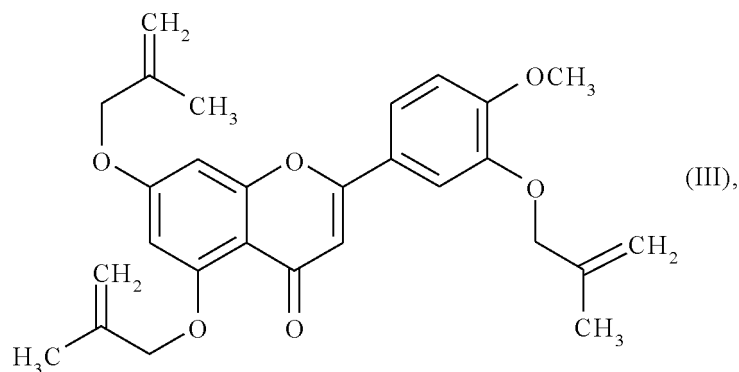


em que R₁, R₂ e R₃ representam, cada um, um átomo de hidrogênio.

2. Processo para a síntese do composto de fórmula (I) como definido na reivindicação 1, partindo da diosmetina de fórmula (II):



caracterizado pelo fato de que compreende reagir a diosmetina de fórmula (II) com brometo de metalila para produzir o composto de fórmula (III):



que é aquecido para produzir o composto de fórmula (I).

3. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende, como ingrediente ativo, o composto de fórmula (I) como definido na reivindicação 1 em combinação com um ou mais veículos ou excipientes farmacologicamente aceitáveis, atóxicos e inertes.

4. Uso do composto como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de medicamentos que são úteis na prevenção ou no tratamento de doenças venosas, na prevenção ou no tratamento da síndrome pós-trombótica, complicações vasculares associadas ao diabetes, hipertensão, aterosclerose, inflamação, síndrome metabólica associada à obesidade, complicações vasculares associadas à obesidade, angina de peito, arterite dos membros inferiores ou acidentes vasculares cerebrais, na cura de ferimentos crônicos incluindo, principalmente, úlceras venosas ou úlceras de perna mistas e pé diabético, no tratamento ou na prevenção de ataques de hemorróidas, no tratamento ou na prevenção de úlceras de pressão e no tratamento da esclerose múltipla.

5. Uso do composto como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de medicamentos que são úteis na prevenção ou no tratamento de doença venosa crônica.