

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(51) Classificação Internacional:

C07D 333/70 (2007.10) **C07D 307/54** (2007.10)
C07D 333/38 (2007.10) **C07D 307/68** (2007.10)
C07D 209/18 (2007.10) **C07D 279/16** (2007.10)
C07D 215/50 (2007.10) **C07D 209/80** (2007.10)
C07D 405/12 (2007.10) **A61K 31/47** (2007.10)
A61K 31/40 (2007.10) **A61K 31/54** (2007.10)
A61K 31/335 (2007.10) **A61K 31/38** (2007.10)
C07C 251/00 (2007.10)

(22) Data de pedido: **2005.01.31**

(30) Prioridade(s): **2004.01.30 FR 0400913**

(43) Data de publicação do pedido: **2006.10.11**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.10.07**
008/2010

(73) Titular(es):

CLINIGENETICS
1105 AVENUE PIERRE MENDES-FRANCE 30000
NÎMES FR

(72) Inventor(es):

GÉRARD MARGUERIE FR
ERIC RÉSIDENCE LE MARC-AURÈLE MALAUD FR

(74) Mandatário:

JOSÉ RAUL DE MAGALHÃES SIMÕES
AV. ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 131, 7º - C 1700-173
LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSTOS DO TIPO HIDRAZIDA E SUA UTILIZAÇÃO EM COMPOSIÇÕES FARMACÉUTICAS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

COMPOSTOS DO TIPO HIDRAZIDA E SUA UTILIZAÇÃO EM COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES

A presente invenção refere-se a novos compostos do tipo hidrazina que são utilizados como agentes activos em composições farmacêuticas destinadas, em particular, ao tratamento de doenças cardiovasculares.

Apesar de uma farmacologia de investigação muito activa e de grandes avanços no domínio cirúrgico, as doenças cardiovasculares, acidentes coronários e isquemias cerebrais são a causa principal de morte e invalidez no mundo industrial. A diabetes do tipo II e a síndrome metabólica associada a esta, a hipercolesterolemia, a obesidade definida como um aumento da massa gorda, a hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e a dislipidemia aterogénica caracterizada por perfis complexos de lipoproteínas, são os factores de risco conhecidos das doenças cardiovasculares.

Estas patologias têm em comum um distúrbio do metabolismo das lipoproteínas. A dislipidemia aterogénica da diabetes do tipo II e da síndrome metabólica, por exemplo, caracteriza-se por uma taxa elevada de triglicéridos (superior a 150 mg/dl), uma taxa de colesterol associado a lipoproteína de densidade elevada, baixa (HDLc inferior a 40 mg/dl), uma taxa de lipoproteína de baixa densidade (LDLc) variável (inferior ou superior a 100 mg/dl). Na hipercolesterolemia, a taxa circulante de

colesterol LDL é superior a 130 mg/dl, a taxa de triglicéridos está pouco modificada em relação ao normal. A hipertrigliceridemia muitas vezes associada à obesidade caracteriza-se por um aumento muito acentuado dos triglicéridos (superior a 200 mg/dl) que entram na estrutura das lipoproteínas.

A complicação mais grave de todas estas síndromes é a aterotrombose. A aterotrombose é uma patologia complexa associada a estes distúrbios metabólicos e cujo desenvolvimento é silencioso, progressivo e pode desenvolver-se muito cedo na vida, implicando várias fases sucessivas.

A formação de uma placa arterial rica em lípidos é um processo lento que se desenvolve em geral ao longo de várias décadas. Trata-se de uma acumulação progressiva de lipoproteínas, de macrófagos espumosos e de cálcio ao nível da parede arterial. As placas afectam a maioria dos indivíduos sujeitos a um regime rico em gorduras animais, habitual nos países ocidentais industrializadas, mas há uma grande variabilidade inter-individual na velocidade de progressão e na extensão das placas que é devida, em parte, a características genéticas.

A presença de vários macrófagos espumosos na placa torna-a vulnerável e ocasiona episódios de ruptura. A ruptura da placa de aterosclerose e a formação de um trombo plaquetário são os processos responsáveis pelas complicações graves da doença: o enfarte coronário e cerebral e a morte súbita. A gravidade da doença depende,

assim, em grande parte do tamanho da placa, da sua estabilidade e da maneira como o trombo se forma por ruptura desta placa. Este fenómeno é mal conhecido e implica muitas vezes um estado inflamatório crónico e uma resposta imunológica. Hoje em dia, estão disponíveis diferentes opções terapêuticas para o tratamento destas doenças.

Os agentes hipolipémicos, como as estatinas ou o ezetimibe, têm uma eficácia reconhecida. As estatinas são inibidores da 3-hidroxiacetilglutaril coenzima A reductase que está directamente implicada na síntese do colesterol. As estatinas reduzem eficazmente a taxa de colesterol e muito modestamente a taxa de triglicéridos. O ezetimibe inibe a absorção intestinal do colesterol. Está assim prevista a utilização destas moléculas na prevenção primária e secundária para a maioria dos pacientes em que a taxa de LDLc está elevada. Os ensaios clínicos demonstraram, entretanto, que o benefício médico dos agentes hipolipémicos em relação ao risco cardiovascular é de apenas 30 a 35%. A sua utilização acompanha-se por vezes de efeitos secundários não desejáveis que obrigam a parar o tratamento. Em muitos casos, observam-se miopatias, toxicidade hepática e fenómenos de intolerância.

Está igualmente previsto que os fibratos ou derivados de ácido fíbrico sejam utilizados no tratamento de dislipidemias aterogénicas. As dislipidemias atingem pacientes diferentes, com perfis lipídicos complexos: baixa taxa de colesterol, taxa elevada de triglicéridos, baixa taxa de HDLc. A utilização de fibratos reduz o risco de

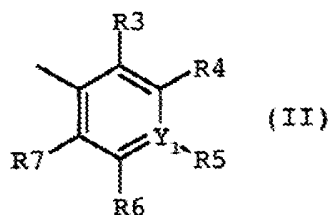
na qual:

- R1 e R2, idênticos ou diferentes, são seleccionados de entre um átomo de hidrogénio, um radical alquilo inferior linear ou ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, um radical fluoroalquilo de 1 a 6 átomos de carbono e de 3 a 7 átomos de flúor,
- A representa um grupo aromático de um ou mais ciclos que compreendem eventualmente um ou mais heteroátomos,
- B representa um grupo fenilo eventualmente substituído ou um grupo piridina eventualmente substituído.

Devido à função hidrazida ao nível da ligação dupla N=C e do significado dos grupos B e R2, os compostos de fórmula (I) podem apresentar-se nas formas geométricas (E) ou (Z) que existem quer em equilíbrio, quer numa forma única, preferencialmente (E):

- forma (E) na qual os grupos ACONR1 e B estão do outro lado da função imina N=C, designada por forma *trans*, ou
- forma (Z) na qual os grupos ACONR1 e B estão de um mesmo lado da função imina N=C, designada por forma *cis*.

Os compostos preferidos de fórmula (I) são aqueles em que B representa um grupo de fórmula (II) seguinte:

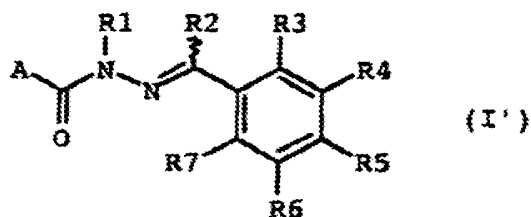


em que Y_1 é um átomo de carbono para formar um anel fenilo, ou um átomo de azoto para formar um anel piridina e em que R_3 , R_4 , R_5 , R_6 e R_7 , idênticos ou diferentes, são seleccionados de entre: um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e mais em particular, flúor, cloro e bromo, um grupo de fórmula $-OH$, $-OR_8$ ou

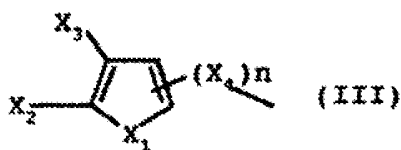
- $OCOR_9$, em que R_8 e R_9 representam um radical alquilo inferior linear ou ramificado de 1 a 6 carbonos, um grupo amino $-NH_2$ ou $-N(r,r')$ em que r e r' , idênticos ou diferentes representam um radical alquilo inferior linear, um radical arilo, ou um heterociclo em que r e r' em conjunto formam um heterociclo de tamanho variável, de preferência em posição *para*.

Os compostos preferidos são os de fórmula (I) em que R_3 é um grupo de fórmula $-OR_8$ e pelo menos dois dos substituintes R_4 , R_5 , R_6 e R_7 representam um átomo de hidrogénio. De entre estes, prefere-se igualmente, muito em particular, os compostos de fórmula (I) em que Y_1 é um átomo de carbono.

Outros compostos preferidos são os de fórmula (I) na qual B tem a fórmula (II) na qual Y_1 é um átomo de carbono, de acordo com a fórmula (I') seguinte:



A invenção refere-se a compostos de fórmula (I) na qual A representa um grupo de fórmula (III) seguinte:



em que:

- X_1 é seleccionado de entre:

- um átomo de oxigénio e no caso em que o grupo de fórmula (III) é um anel 2-furanilo ou 3-furanilo em função da posição da cadeia $-(X_4)_n$ - acil-hidrazida nos carbonos α ou β deste heterociclo,
- um átomo de enxofre e no caso em que o grupo de fórmula (III) é um anel 2-tiofeno ou 3-tiofeno em função da posição da cadeia $-(X_4)_n$ - acil-hidrazida nos carbonos α ou β , podendo o átomo de enxofre

transportar um átomo de oxigénio para formar um sulfóxido, ou dois átomos de oxigénio para formar uma sulfona,

- um átomo de azoto e no caso do grupo de fórmula (III) é um anel 2-pirrolo ou 3-pirrolo em função da posição da cadeia acil-hidrazida nos carbonos α ou β deste heterociclo, este átomo de azoto pode transportar um átomo de hidrogénio, um radical alquilo inferior de 1 a 6 átomos de carbono, um radical fluoroalquilo que possui de 1 a 6 átomos de carbono e de 3 a 7 átomos de flúor, um radical acilo -COR₁₀, no qual R₁₀ representa uma cadeia alquilo linear ou ramificada de 1 a 6 carbonos, ou um radical arilo ou aralquilo,
- X₂ e X₃, idênticos ou diferentes, são seleccionados de entre:
- um átomo de hidrogénio, uma cadeia alquilo inferior linear ou ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, um radical fluoroalquilo com 1 a 6 átomos de carbono e de 3 a 7 átomos de flúor,
 - um átomo de halogéneo, de preferência um átomo de flúor, de cloro ou de bromo,
 - um grupo nitro -NO₂, um grupo amino -NH₂ ou um grupo -N(r, r'), em que r e r' idênticos ou diferentes representam um radical alquilo inferior, linear ou ramificado, um radical arilo, ou um heterociclo, em

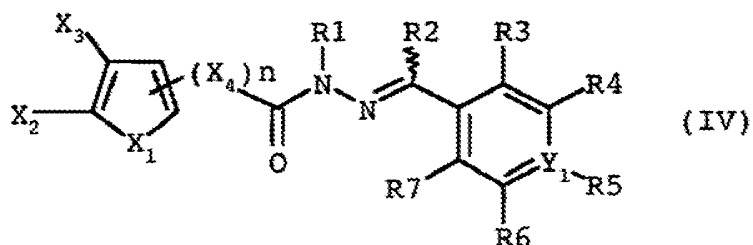
que r e r' em conjunto formam um heterociclo de tamanho variável,

ou ainda X_2 e X_3 estão incluídos num anel aromático do tipo benzénico ou aza-benzénico se este ciclo contém um átomo de azoto, para formar um heterociclo aromático do tipo benzofurano, quando X_1 é um átomo de oxigénio, um anel benzopirrolo quando X_1 é um átomo de azoto livre ou substituído como acima, um anel benzotiofeno quando X_1 é um átomo de enxofre livre ou substituído como acima, ou ainda um anel do tipo piridino se estiver presente um átomo de azoto intracíclico,

- n é 0 ou 1,

- X_4 , se presente, representa um grupo $-CH_2-$, OCH_2- , ou $-CH=CH-$.

Os compostos de fórmula (I) em que B é um grupo de fórmula (II) e A um grupo de fórmula (III) têm a fórmula (IV) seguinte :



em que Y_1 , X_1 , X_2 , X_3 , R_1 e R_2 têm o mesmo significado que anteriormente e R_3 a R_7 idênticos ou diferentes, são seleccionados de entre: um átomo de hidrogénio, um átomo de

halogéneo e mais em particular, flúor, cloro e bromo, um grupo de fórmula -OH, -OR₈ ou

- OCOR₉, em que R₈ e R₉ representam um radical alquilo inferior, linear ou ramificado, de 1 a 6 carbonos, um grupo amino -NH₂ ou -N(r,r') em que r e r' idênticos ou diferentes representam um radical alquilo inferior linear ou ramificado, um radical arilo, ou um heterociclo em que r e r' em conjunto formam um heterociclo de tamanho variável, de preferência em posição para,

- n é 0 ou 1,

- X₄, se presente, representa um grupo -CH₂-, -OCH₂-, ou -CH=CH-.

Os compostos preferidos são os de fórmula (IV) em que R₃ é um grupo de fórmula -OR₈ e pelo menos dois dos substituintes R₄, R₅, R₆ e R₇ representam um átomo de hidrogénio. De entre estes, preferem-se igualmente, muito em particular, os compostos de fórmula (IV) em que Y₁ é um átomo de carbono.

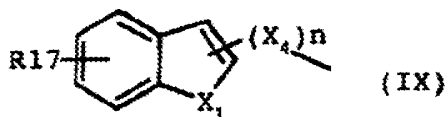
De entre os compostos de fórmula (IV), a invenção refere-se mais em particular aos compostos seguintes:

- N'-[(1E)-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)metileno]-1-benzotiofeno-2-carbohidrazida (designado por CGP02-01),

- (2Z)-3-(2-furil)-N'-[(1E)-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)metileno] acrilohidrazida (designado por CGP02-02),
- N'-[(1E)-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)metileno]-5-metiltiofeno-2-carbohidrazida (designado CGP02-03),
- Ácido 2-furanocarboxílico (2-hidroxi-4,6-dimetoxi-benzilideno)-hidrazida (designado por CGP02-07),
- Ácido (1H-indol-3-il) acético(2-hidroxi-4,6-dimetoxibenzilideno)-hidrazida (designado por CGP02-08),
- Ácido benzo[b]tiofeno-2-carboxílico (3,5-dibromo-2-hidroxi-benzilideno)-hidrazida (designado por CGP02-18).

Destes, prefere-se em particular o N'-[(1E)-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)metileno]-1-benzotiofeno-2-carbohidrazida (CGP02-01).

Uma outra forma de realização da invenção refere-se a compostos de fórmula (I) na qual A representa um grupo de fórmula (IX) seguinte:



em que:

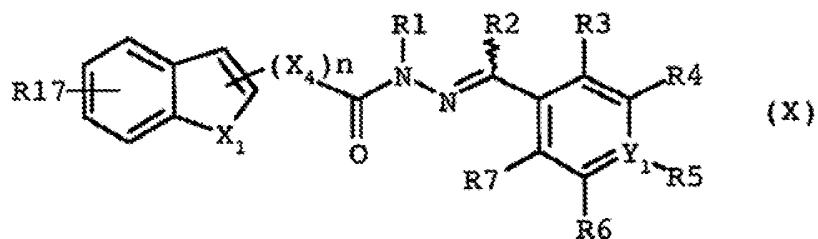
- X_1 e X_4 têm o significado anterior,

- n é 0 ou 1,

- R_{17} é seleccionado de entre:

- um átomo de hidrogénio, um radical alquilo inferior linear ou ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, um radical fluoroalquilo de 1 a 6 átomos de carbono e de 3 a 7 átomos de flúor,
- um átomo de halogéneo, de preferência um átomo de flúor, de cloro ou de bromo,
- um grupo OR' em que R' inferior linear ou ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, um radical fluoroalquilo de 1 a 6 átomos de carbono e de 3 a 7 átomos de flúor.

Compostos de fórmula (I) em que B é um grupo de fórmula (II) e A é um grupo de fórmula (IX) que correspondem à fórmula (X) seguinte:



em que Y_1 , R_1 , R_2 , R_{17} , X_1 , X_4 e n têm o significado anterior e R_3 , R_4 , R_5 , R_6 e R_7 idênticos ou diferentes, são

seleccionados de entre: um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e mais em particular de flúor, cloro e bromo, um grupo de fórmula $-OH$, $-OR_8$ ou $-OCOR_9$, em que R_8 e R_9 representam um radical alquilo inferior linear ou ramificado de 1 a 6 carbonos, um grupo amino $-NH_2$ ou $-N(r,r')$ em que r e r' idênticos ou diferentes representam um radical alquilo inferior, linear ou ramificado, um radical arilo, ou um heterociclo em que r e r' em conjunto formam um heterociclo de tamanho variável, de preferência em posição para.

Os compostos preferidos são os de fórmula (X) em que R_3 é um grupo de fórmula $-OR_8$ e pelo menos dois dos substituintes R_4 , R_5 , R_6 e R_7 representam um átomo de hidrogénio. De entre estes, preferem-se muito em particular os compostos de fórmula (X) em que Y_1 é um átomo de carbono.

A invenção refere-se também, quando é possível, aos sais dos compostos acima com ácidos do tipo farmacêutico, tolerados fisiologicamente.

A título de exemplo, como sais farmacêuticos fisiologicamente aceitáveis podem referir-se de forma não limitativa, os sais de ácido acético, clorídrico, cinâmico, cítrico, bromídrico, iodídrico, fluorídrico, malónico, metanossulfónico, oxálico, pícrico, maleico, láctico, nicotínico, fenilacético, fosfórico, succínico, tartárico, os sais de amónio, de dietilamina, de piperazina, de nicotinamida, de ureia, de sódio, de potássio, de cálcio, de magnésio, de zinco, de lítio, de metilamino, de

dimetilamino, de trimetilamino, de tris(hidroximetil)aminometano.

A invenção refere-se a composições farmacêuticas para o homem ou animal, compreendendo como agente activo, pelo menos um dos compostos descritos acima, ou o seu sal farmacêuticamente aceitável.

De facto, estes compostos são utilizados para o tratamento da aterosclerose e da restenose arterial. Eles têm a propriedade de diminuir o aumento de peso devido a uma acumulação de gordura abdominal, de diminuir o aumento da taxa de colesterol total e do colesterol livre e o depósito de triglicéridos ao nível da parede arterial e de reduzir a acumulação de macrófagos ao nível das placas ateromatosas. Estes compostos têm, em particular, a propriedade de inibir a formação de células de macrófagos espumosos, inibindo a acumulação de vesículas lipídicas intracelulares. Deste modo, estas moléculas são assim capazes de tratar a obesidade, a diabetes do tipo II, a isquemia cerebral e as esteatoses hepáticas, bloqueando a acumulação de vesículas lipídicas em células, como o hepatócito, a célula de músculo liso, o adipócito e a célula endotelial.

Estes compostos são assim úteis como agentes activos em métodos ou composições farmacêuticas para o tratamento de, e eventualmente prevenção de todas as doenças associadas a distúrbios do metabolismo de lípidos. A este nível podem-se citar, entre outros, a hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, a dislipoproteinemia, a

quilomicronemia, a lipodistrofia, a hiperglicemia, bem como as patologias associadas a estas disfunções: aterosclerose, obesidade, diabetes tipo II, e resistência à insulina, insuficiência cardíaca e isquemia cerebral (avc).

Além disso, os compostos com a propriedade de reduzir o estreitamento da parede arterial são úteis como agentes activos em métodos ou composições farmacêuticas para o tratamento e eventualmente para a prevenção da restenose.

As composições farmacêuticas de acordo com a invenção compreendem quantidades suficientes de pelo menos um composto anteriormente descrito.

Com base nos resultados obtidos *in vivo* e apresentados na parte experimental a seguir, as composições da invenção podem ser administradas no quadro de um tratamento e em várias doses de 0,01 a 500 miligramas por quilograma de peso corporal, por dia, de um ou mais compostos da invenção.

A formulação das composições farmacêuticas de acordo com a invenção é do tipo geralmente utilizado no domínio farmacêutico.

A título de exemplo, pode tratar-se de vectores farmacêuticos tais com, por exemplo, os sais ou os electrólitos, sais de ácido ascórbico, água ou soluções tamponadas, soluções coloidais, substâncias à base de celulose, polietilenoglicol, poliacrilatos, ceras, proteínas, ou qualquer outra substância capaz de dissolver

ou tornar o composto activo disponível para uma acção terapêutica.

As composições da presente invenção podem ser administradas na forma injectável, ou por via oral, parentérica, nasal sob a forma de spray, rectal ou vaginal, por implantação de reservatório ou dispensadores, ou sob qualquer outra forma galénica utilizada no domínio farmacêutico.

As formas injectáveis destas composições podem ser suspensões aquosas ou oleaginosas. Estas suspensões podem ser formuladas de acordo com qualquer dos processos utilizados neste domínio, utilizando solventes ou diluentes não tóxicos, como por exemplo, o 1,3-butanodiol. De entre os solventes aceitáveis, é possível utilizar água, soluções tamponadas, soluções de Ringer, ou soluções de sais isotónicas. Outros diluentes aceitáveis podem ser constituídos por mono ou diglicéridos sintéticos, álcoois de cadeia longa, ou dispersantes, tais como a carboximetilcelulose ou qualquer outro diluente ou emulsionante utilizados na formulação da suspensão farmacêutica.

As composições farmacêuticas da presente invenção administradas por via oral, podem ser na forma de cápsula, de hóstia ou de suspensões aquosas, ou na forma de emulsão. Estas formulações podem eventualmente conter compostos químicos destinados a adoçar ou melhorar o sabor.

As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser administradas na forma de supositório, misturando o produto com um excipiente não irritante, não alérgico, sólido à temperatura ambiente e líquido à temperatura rectal, de forma a libertar o composto activo. Estas formulações podem utilizar, por exemplo, a cera de abelha, os polietilenoglicóis, ou a manteiga de cacau.

Estas composições farmacêuticas podem igualmente compreender uma combinação de vários compostos da invenção com uma ou mais outras moléculas terapêuticas. Estas moléculas podem ser, por exemplo, agentes hipolipémicos que reduzem a síntese do colesterol, tais como as "estatinas", inibidores da enzima de conversão da angiotensina II, como por exemplo o Losartan, anti-cálcicos, os antitrombóticos, os beta-bloqueadores, os inibidores dos membros da família dos receptores activos dos proliferadores de peroxisoma (família dos PPAR), inibidores da síntese ou do metabolismo dos triglicéridos, como o fenofibrato, agentes capazes de aumentar a resistência à insulina, como o Troglitazone ou Pioglitazone e, de um modo geral, qualquer outra molécula capaz de melhorar as performances farmacológicas dos compostos descritos na presente invenção.

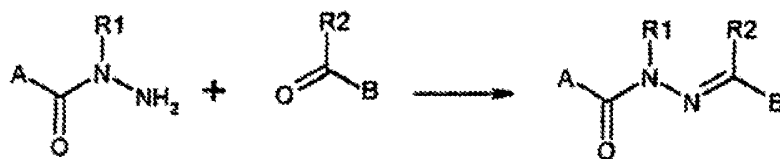
A invenção refere-se igualmente à utilização de um composto de acordo com a invenção para a preparação de uma composição terapêutica de acordo com a invenção.

A invenção refere-se igualmente à utilização de um composto de acordo com a invenção para o fabrico de um medicamento.

Descreve-se igualmente a preparação de compostos de fórmula (I) e de composições farmacêuticas que contêm como princípio activo pelo menos um dos referidos compostos.

Os compostos de fórmula (I) podem ser preparados de acordo com técnicas conhecidas do perito na arte. A presente invenção descreve, a este respeito, uma via de síntese geral que está ilustrada no esquema a seguir e no exemplo de modo operacional que se segue, em que os compostos de partida são obtidos comercialmente ou podem ser sintetizados de acordo com processos habituais conhecidos do perito na arte e descritos em livros clássicos de química orgânica ("Advanced Organic Chemistry" de M. B. Smith & J. March, Ed. John Wiley & Sons, "Handbook of Heterocyclic Chemistry" de A. R. Katritzky, Ed. Pergamon, et "Heterocyclic Chemistry" de J. A. Joule et K. Mills, Ed. Blackwell Science).

Entende-se que a descrição não se limite a uma via de síntese particular e deve entender-se que há outros processos que permitam produzir compostos de fórmula (I). A título de exemplo, os compostos de fórmula (I) podem assim ser preparados quer em fase líquida, quer numa fase paralela sobre um suporte sólido. Os métodos acima são dados a título não limitativo e quaisquer outros processos que permitam criar ligações duplas do tipo iminas $N=C$ substituídas podem ser utilizados para preparar os compostos da invenção.



No esquema acima, R1, R2, A e B têm o mesmo significado que anteriormente descrito.

De acordo com o esquema acima, os compostos de fórmula (I) são directamente preparados por uma reacção de condensação entre uma parte da matéria prima designada por carbo-hidrazida, representada pela fórmula A-CO-NR1-NH2 e um aldeído ou uma cetona representado pela fórmula R2-COB, para a qual os grupos A e R1 por um lado e B e R2 por outro lado têm respectivamente os significados descritos para as fórmulas (II) a (IV). Estas matérias primas utilizadas são comercializadas e podem ser adquiridas de sociedades de química, como Maybridge (Grã-Bretanha) ou Pfaltz-Bauer (USA), não sendo esta escolha das sociedades exclusiva.

Estareacção de condensação é realizada de preferência em atmosfera inerte, entre 0°C e 50°C, de preferência à temperatura ambiente, na presença de uma base orgânica amina terciária, de preferência a base de Hünig diisopropiletilamina DIEA, num solvente dipolar aprótico, de preferência dimetilformamida DMF anidra, ou em etanol, ou ao refluxo, durante 6 a 8 horas. A monitorização do avanço da reacção é realizada por análise HPLC que permite controlar o tempo de reacção, de preferência inferior a 24 horas.

Outras vantagens e características da invenção serão evidentes a partir dos exemplos que se seguem e nos quais será feita referência às figuras anexas em que:

- A figura 1 representa os efeitos de doses crescentes do composto CGP02-01 sobre a acumulação de vesículas lipídicas numa célula de macrófago cultivada na presença de lipoproteínas marcadas com o auxílio do agente fluorescente Cianina 3. A curva dose-resposta indica uma IC50 de 5×10^{-7} M.
- A figura 2 mostra a redução do aumento de peso por redução da massa gorda abdominal no murganho ApoE negativo, após tratamento pelo composto CGP02-01. Os murganhos foram tratados durante 41 dias com uma dose de 20µg do composto CGP02-01 por dia. Os murganhos controlo e os murganhos tratados foram alimentados com um regime normal, sem sobrecarga em colesterol.
- A figura 3 representa o efeito do CGP02-01 no aumento da taxa de colesterol livre no plasma, no murganho ApoE negativo. Os murganhos foram tratados de um modo idêntico ao descrito na figura 2.
- A figura 4 mostra a variação da taxa de colesterol total num murganho ApoE negativo, tratado ou não tratado com o composto CGP02-01.
- A figura 5 mostra a variação da taxa de triglicéridos presente na aorta de murganhos ApoE negativo tratados ou não tratados com o composto CGP02-01.

- A figura 6 mostra a modificação da placa de ateroma nos murganhos ApoE negativo tratados ou não tratados com o composto CGP02-01. Note-se a presença de uma situação inflamatória e vários macrófagos espumosos na lesão de murganhos não tratados e a redução significativa destes macrófagos, bem como a ausência de reacção inflamatória na aorta de murganhos tratados.

- A figura 7 mostra a inibição da formação de células espumosas pelos compostos CGP 02-02 e CGP 02-03. As células THP1 diferenciadas são cultivadas em presença de lipoproteínas oxidadas (3 µg/ml oxLDL), marcadas por cianina 3 durante 24 horas, a 37°C. As células são tratadas com os compostos CGP 02-02 e CGP 02-03 a diferentes concentrações. As condições são idênticas às da Figura 1.

- A figura 8 representa o efeito do composto CGP 02-01 administrado por via oral (50 mg/kg) na taxa plasmática de colesterol total (g/L) após 3 semanas de tratamento de um modelo de rato (n=12), submetido a um regime rico em frutose (10 %). A metformina foi injectada na mesma dose para servir de padrão neste modelo animal.

- A figura 9 ilustra as variações da taxa plasmática de triglicéridos (g/L) num murganho ApoE -/submetido a um regime rico em colesterol e tratado durante 3 meses com o composto CGP 02-01.

- A figura 10 mostra o efeito do composto CGP 02-01 administrado por via oral (50 mg/kg) na taxa plasmática de triglicéridos (g/L) após 3 semanas de tratamento num modelo de rato (n=12), submetido a um regime rico em frutose (10 %). Os ratos são alimentados diariamente com um regime que contém 10% de frutose, durante 3 semanas. O regime é em seguida mantido juntando o composto CGP 02-01 durante 3 semanas. Cada rato é analisado separadamente. A metformina foi administrada na mesma dose para servir de padrão neste modelo animal.

- A figura 11 representa o efeito do composto CGP 02-01 injectado por via IP na taxa plasmática de insulina (ng/mL) de ratos ApoE -/- submetidos a um regime rico em colesterol. Os ratos são tratados durante 3 meses.

- A figura 12 mostra o efeito do composto CGP 02-01 administrado por via oral (50 mg/kg) na taxa plasmática de insulina (ng/mL) após 3 semanas de tratamento num modelo de rato (n=12), submetido a um regime rico em frutose (10 %). Os ratos foram alimentados diariamente com um regime que contém 10% de frutose, durante 3 semanas. O regime é em seguida mantido ajustando o composto CGP 02-01 durante 3 semanas. Cada rato é analisado em separado. A metformina foi administrada na mesma dose para servir de padrão neste modelo animal.

- A figura 13 mostra o efeito do composto CGP 02-01 injectado por via IP a diferentes doses, na obesidade

abdominal de murganhos ApoE -/- submetidos a um regime rico em colesterol. Os murganhos são tratados durante 3 meses.

- A figura 14 mostra o efeito do composto CGP 02-01 injectado por via IP a diferentes doses, no depósito de triglicéridos na parede aórtica de murganhos ApoE - / submetidos a um regime rico em colesterol. Os murganhos são tratados durante 3 meses.
- A figura 15 mostra que quando os murganhos ApoE -/ são submetidos a um regime normal ou rico em colesterol, eles desenvolvem uma isquemia coronária ilustrada pela presença de um microembolismo coronário de microvasos coronários (figura A). Quando o composto CGP 02-01 é injectado nestes murganhos, estas lesões cardíacas são consideravelmente reduzidas (figura B).
- A figura 16 ilustra o efeito da dose do composto CGP 02-01 nas lesões coronárias de murganhos ApoE -/ submetidos a um regime normal (figura A) e a um regime rico em colesterol (figura B).
- A figura 17 ilustra o efeito do CGP 02-01 sobre o aumento da glicemia nos ratos submetidos a um regime rico em frutose (10%). O regime é mantido durante 21 dias. O composto é administrado por via oral a seguir ao período de dieta de frutose. A figura ilustra o efeito estabilizador do composto.

- A figura 18 ilustra o efeito benéfico do composto CGP 02-01 sobre a tolerância à glucose nos ratos submetidos a um regime rico em frutose (10%). O composto é administrado por via oral, ao fim do 14º dia administra-se uma dose única suplementar de 2 g/kg de glucose. A glicemia é medida a 30, 60 e 120 minutos após o choque glicémico.

Exemplo 1 Síntese de CGP02-01.

Num balão de três tubuladuras, seco equipado com agitação magnética, introduzem-se 510,08 mg de ácido [benzo(b)tiofeno]-2-carboxílico hidrazida comercial dissolvido em 28 ml de DMF anidro. Após adição de 256 µl de DIEA (dietilisopropilamina), a solução é agitada à temperatura ambiente durante 5 min. A esta solução ligeiramente corada de amarelo adicionam-se 538,27 mg de 4,6-dimetosisalicil-aldeído, o meio é agitado à temperatura ambiente durante 24h. O progresso da reacção é seguido por análise HPLC até ao consumo completo da matéria prima. Após evaporação do solvente, o resíduo sólido obtido é recristalizado em CH₃CN, em seguida lavado com éter etílico. O produto purificado obtido N'-[(1E)-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)metileno]-1-benzotiofeno-2-carbohidrazida é um sólido amarelo (743,6 mg, rdt = 71%).

Dados físico-químicos:

Massa molecular: 356,40 g/mol

Ponto de fusão: 205,4°C

Pureza LC-MS: 100% (M+1 = 357,33)

Pureza HPLC: 95,8% (tempo de retenção: 20 min, detecção UV : 200-400 nm)

RMN ¹H (DMSO-*d*₆; 400MHz): δ (ppm) 3,799 (s, 3H, OCH₃), 3,862 (s, 3H, OCH₃), 6,16 (s, 1H, Ar), 6,17 (s, 1H, Ar), 7,495 (m, 2H, Ar), 8,02 (dd, 1H J=7,2 Hz et 1,3 Hz), 8,07 (dd, 1H, Ar, J=7,2 Hz et 1,4 Hz), 8,231 (s, 1H, CH=C), 8,861 (s, 1H, CH=N), 12,26 (s, 1H, OH), 12,348 (s, 1H, N-NH-CO).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 400 MHz) : δ (ppm) 55,438 (OCH₃), 55,948 (OCH₃), 90,524 (CH, Ar), 93,843 (CH, Ar), 122,846 (CH, Ar), 125,097 (CH, Ar), 124,439 (2CH, Ar), 125,684 (CH=C), 126,577 (CH=N), 145,980 (CO-NH=N).

IR-FT (KBr 0,05%): 3445,66 (Ar-OH), 1630,21 (-CO-NH=N), 1600,27 (-NH-N=C-) cm⁻¹.

Análise elementar : C₁₈H₁₆N₂O₄S+0, 5 H₂O

	%C	% H	% N	% S
Teórico	59,17	4,69	7,67	8,77
Encontrado	59,40	4,66	7,83	8,79

Exemplo 2 : Culturas celulares.

Podem-se utilizar várias linhas celulares permanentes para demonstrar o efeito de moléculas da família a que pertence a molécula CGP02-01 na fixação e acumulação de lípidos em vesículas intracelulares. As células podem incorporar lipoproteínas modificadas, por exemplo oxidadas ou acetiladas, triglicéridos, ou quilomicrons. Estas células têm a capacidade de se transforma em células espumosas e podem assim apresentar um fenótipo aterogénico.

É possível utilizar, a título de exemplo, as células THP1, U937, KG1, ou qualquer outra célula pode ser activada e diferenciada em macrófago, célula endotelial, hepatócito ou adipócito e em seguida cultivada na presença de meio contendo as lipoproteínas.

Outros tipos de células que foram geneticamente modificadas para expressar os receptores membranares específicos da captação de lipoproteínas ou de ácidos gordos podem igualmente ser utilizados. Estes receptores membranares podem ser parte da família de moléculas "removedoras" que contêm proteínas como SRAI, SRAII, SRBI, CD36 ou membros da família dos receptores de ácidos gordos (FABP) por exemplo.

A título de exemplo, podem-se citar mais em particular as células do tipo das células THP1 diferenciadas sobre a acção de 12-miristato-13-acetato de forbol (PMA) a uma concentração de 10^{-7} M, foram utilizadas para medir a formação e acumulação de vesículas lipídicas observadas durante a formação de macrófagos espumosos na presença ou ausência do composto CGP02-01.

As células são cultivadas em placas de 96 poços, a uma densidade de 1, 2 ou 5×10^5 células por ml em meio RPMI-1640, ou em meio MEM contendo 1%, 2%, 5 % ou 10% de soro fetal de vitela (SVF), 100 Unidades / ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 200 mM de L-Glutamina a 37°C num incubador de CO₂. O meio de cultura pode ser substituído a cada dois dias.

No presente exemplo, a acumulação de vesículas lipídicas no seio da célula foi medida utilizando células THP1, após fixação por formaldeído em meio PBS com o auxílio de uma solução que contém um marcador fluorescente do tipo Oil Red O para visualizar as vesículas. A imagem das células ricas em vesículas foi analisada com o auxílio de um microscópio equipado com uma câmara CCD e programas necessários à análise.

As células THP-1 (5×10^5 células/ml) (ECACC) foram mantidas e cultivadas em meio RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal de vitela (FBS), 200 mM de L-Glutamina, 100 Unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (Invitrogen-Life Technologies) a 37°C, num incubador a 5% de CO₂. O meio foi substituído a cada 2-3 dias.

Para induzir a diferenciação de THP-1, depositaram-se $1,25 \times 10^5$ células/poço nos poços de uma placa de cultura de 96 poços, no seu meio de cultura contendo 10^{-7} M de forbol 12-miristato-13-acetato (Sigma), durante 24 horas, a 37°C, 5% de CO₂. Os THP-1 diferenciados foram em seguida incubados com LDLox acoplados a cianina-3 (1,5 µg/ml), na presença ou ausência da molécula CGP02-01 (concentrações compreendidas entre 10^{-5} M e $3,16 \times 10^{-10}$ M) durante 24 horas, a 37°C, 5% de CO₂. Após fixação das células em paraformaldeído a 4%, os anéis foram marcados com Hoechst 33342 (10 µg/ml) durante 20 minutos, à temperatura ambiente. Após duas lavagens, recolheram-se 16 imagens/poço do sinal ligado à cianina-3 e a Hoechst 33342, utilizando um microscópio de fluorescência acoplado a uma câmara CCD.

Cada imagem foi analisada e quantificada com o programa MetaMorph (Universal Imaging).

O quadro 1 a seguir mostra a percentagem observada para a inibição da captação e acumulação sob a forma de vesículas lipídicas, lipoproteínas marcadas com cianina 3, por células que expressam o "removedor" CD36. As células foram incubadas na presença de cada uma das moléculas que constituem esta família e são representadas pela molécula CGP02-01 a uma concentração final e idêntica para cada molécula de 2,5 μ M.

Quadro 1

Moléculas	Inibição da acumulação de LDL ox em (%)
CGP02-01	76
CGP02-02	64
CGP02-03	82
CGP02-07	63
CGP02-08	58
CGP02-18	78

O quadro do anexo 1 apresenta as estruturas dos compostos da invenção, bem como o seu código para referência no quadro 1 acima, bem como a sua percentagem de inibição a uma concentração de 25 μ M nas células THP1, durante 24 horas.

Um dos compostos preferidos desta família é o composto CGP 02-01. Quando as células macrófagos do tipo THP1

diferenciadas são cultivadas na presença deste composto a uma concentração de 1 μM , observa-se uma forte inibição da acumulação de vesículas lipídicas (figura 1). Este efeito inibidor depende da concentração de produto CGP 02-01 (figura 1).

Se bem que o composto CGP 02-01 tenha sido seleccionado como produto de referência, outros compostos da mesma família mostram a mesma actividade e são capazes de bloquear a acumulação de lípidos intracelulares. A figura 7 ilustra a actividade inibidora dos compostos CGP 02-02 e CGP 02-03 que fazem parte da mesma família de moléculas.

Exemplo 3: Tratamento de murganhos ateromatosos

Podem-se utilizar diferentes tipos de animais para estudar as modificações do metabolismo dos lípidos, a formação de lesões arteriais e a progressão de uma placa de ateroma. Estes animais estão disponíveis comercialmente. É possível utilizar murganhos, coelhos hiperlipémicos (HWWL), ou animais mais importantes, como o porco ou o macaco. Os animais geneticamente modificados também podem ser utilizados, como por exemplo os murganhos ApoE $-/-$, LDL-R $-/-$, ApoAI $-/-$.

Foram utilizados dois tipos de modelos animais.

Em primeiro lugar, utilizaram-se murganhos desprovidos do gene que codifica para a Apo lipoproteína E (ApoE $-/-$). Os murganhos representam um modelo de escolha para o estudo

da aterosclerose precoce e o desenvolvimento de uma placa rica em macrófagos espumosos. Os murganhos macho C57BL/6J homozigóticos para a eliminação do gene ApoE foram submetidos a um regime normal, até à idade de oito semanas. Estes murganhos (n=8 por grupo) receberam em seguida, *ad libitum* e durante 12 semanas, quer um regime não enriquecido em colesterol ou em gordura, quer um regime enriquecido contendo 1,5 g/kg de colesterol e 200 g/kg de gordura de origem láctea. Os murganhos não tratados receberam injeções diárias intraperitoneais de uma solução que contém DMSO a 10%. Os murganhos tratados receberam por injeção intraperitoneal a mesma solução, contendo 2 ou 20 µg (quer, 0,1 mg/kg/dia, quer 1 mg/kg/dia) do composto CGP 02-01. Após recolha de sangue para análise bioquímica, os murganhos foram eutanizados.

Em segundo lugar, analisou-se a actividade do composto CGP 02-01 utilizando um modelo de rato-frutose de referência. Submeteram-se grupos de ratos (n=12) Wistar, a um regime contendo 10% de frutose, durante 3 semanas. Nestas condições, os ratos desenvolvem uma síndrome metabólica que comporta uma hiperglicemia, uma hiperinsulinemia, uma hipercolesterolemia e uma hipertrigliceridemia. Grupos de ratos receberam em seguida por alimentação entérica 50 mg/kg do composto CGP 02-01 dissolvido numa solução de tween 80 a 2% e formulada em metilcelulose. As recolhas de sangue para análise bioquímica foram realizadas a 1, 2 e 3 semanas. Trataram-se grupos independentes de ratos nas mesmas condições, com cloridrato de metformina, a uma dose de 50 mg/kg. A

metformina serviu de referência neste modelo de síndrome metabólica.

Exemplo 4: Medição do colesterol livre no plasma.

A medição do colesterol livre pode ser feita por um método enzimático. O colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase em Delta 4 colesteno e produz simultaneamente peróxido de hidrogénio. O peróxido de hidrogénio permite em seguida a condensação oxidativa da DHESA e da aminoantipirina, produzindo uma coloração azul. A quantidade de colesterol livre é em seguida medida pela absorvência da cor azul. As amostras podem ser recuperadas num tampão citrato contendo EDTA e heparina. Este ensaio pode ser obtido comercialmente, na forma de um kit.

Quando os murganhos ApoE^{-/-} são submetidos a um regime normal não enriquecido e tratados com o composto CGP 02-01 (1 mg/kg), a taxa plasmática de colesterol não esterificado diminui de forma significativa. A variação observada nos animais não tratados durante um período de 3 meses é em média de 136 ± 19 g/L. A variação observada para os animais tratados durante o mesmo período é de 105 ± 6 g/L, ou seja, um efeito de 22,7 % ($p < 0,05$).

Exemplo 5: Medição do colesterol total no plasma.

O colesterol total circulante pode ser medido por um doseamento enzimático com o auxílio de um kit. Este doseamento pode, por exemplo, utilizar uma sequência enzimática do tipo colesterol-esterase/ colesteroloxidase /

peroxidase cromogénio. Em resumo, o colesterol esterificado total é transformado em colesterol livre e ácido gordo por acção da colesterol esterase. O colesterol não esterificado é em seguida medido pela formação de quinoneimina na presença de colesterol oxidase e de peroxidase. A intensidade da coloração de quinoneimina é proporcional à quantidade de colesterol presente na amostra.

O quadro 2 acima mostra as variações nas taxas plasmáticas de HDL e do colesterol total num murgancho ApoE^{-/-} submetido a um regime rico em colesterol e tratado com o composto CGP 02-01. Quando os murganchos ApoE^{-/-} são tratados com CGP 02-01 (1 mg/kg) durante 3 meses, a taxa plasmática de colesterol total diminui de forma mais significativa do que nos animais não tratados. Quando os murganchos são submetidos a um regime rico em colesterol, a taxa de colesterol total passa de um valor de 7,27 ± 0,55 g/L para um valor de 6,86 ± 0,65 g/L, ou seja uma variação de 5,6%. Este efeito observado depende da dose de CGP 02-01.

Quadro 2

	Taxa plasmática de HDL (g/L)	Taxa plasmática de colesterol total (g/L)
Não tratados	0,11 ± 0,05	7,27 ± 0,55
0,1 mg/Kg	0,15 ± 0,06	8,08 ± 0,62
1 mg/Kg	0,15 ± 0,05	6,86 ± 0,65

No modelo de rato submetido a um regime rico em frutose, tratado por via oral (50 mg/kg), o composto CGP 02-01 produz uma redução muito significativa ($p < 0,01$) da

taxa de colesterol que passa de um valor de $0,79 \pm 0,05$ g/L a um valor de $0,36 \pm 0,03$ g/L, ou seja uma redução de 54,5 % ($p < 0,01$) após 3 semanas de tratamento. A metformina administrada por via oral nas mesmas condições (50 mg/kg), produz uma redução do colesterol total de 16%, com um valor médio de $0,66 \pm 0,02$ g/L (Figura 12).

Exemplo 6: Medição dos triglicéridos circulantes.

A dosagem dos triglicéridos séricos pode ser realizada por via enzimática com o auxílio de um kit comercializado. Podem-se utilizar, por exemplo, kits da Biomerieux (ref. 61.238). Em resumo, os triglicéridos são tratados por uma lipase para produzir glicerol e ácidos gordos. Na presença de ATP, o glicerol é transformado em glicerol 3 fosfato pela gliceroquinase. O glicerol 3 fosfato é em seguida transformado em di-hidroxiacetona, produzindo água oxigenada (H₂O₂) que pode ser detectada por formação de quinoneimina na presença de paraclorofenol, amino-4-antipirina e peroxidase. A intensidade de coloração com quinoneimina é em seguida medida a 505 nm. Esta coloração é proporcional à quantidade de triglicéridos presentes na amostra.

Quando os murganhos ApoE^{-/-} são submetidos a um regime rico em colesterol e em gordura e são tratados durante 3 meses com o composto CGP 02-01 (1mg/kg), a sua taxa de triglicéridos plasmáticos varia e esta variação é 2 vezes mais importante para os murganhos tratados do que para os murganhos não tratados. Esta variação passa de $-0,67 \pm 0,54$

g/L para os murganhos não tratados, a $- 1,49 \pm 0,57$ g/L ($p < 0,01$) para os murganhos tratados (figura 9).

Quando o composto CGP 02-01 é administrado por via oral a ratos sob o regime rico em frutose, a sua taxa de triglicéridos plasmáticos passa de $1,39 \pm 0,13$ g/L a $0,47 \pm 0,07$ g/L, ou seja uma variação de 66,2% ($p < 0,01$). Nas mesmas condições, a metformina não tem efeito, com um valor médio de $1,21 \pm 0,08$ g/L (figura 10).

Exemplo 7: Medição de insulina no plasma

O doseamento de insulina no plasma pode ser realizado por dosagem radioimunológica com o auxílio de kits comerciais que compreendem anticorpos específicos anti-insulina, de murganho ou de rato. Pode-se utilizar, por exemplo, kits ELISA rato/murganho, Linco research (ref EZRMI-13K).

Quando os murganhos ApoE^{-/-} submetidos a um regime rico em colesterol são tratados com o composto CGP 02-01 nas doses de 0,1 ou 1 mg/kg, observa-se uma redução significativa ($p < 0,01$) da taxa plasmática de insulina, que passa de um valor de $1,17 \pm 0,2$ ng/mL para um valor de $0,95 \pm 0,16$, ou seja uma variação de 18,8% (figura 11).

De modo idêntico, o composto CGP02-01 faz passar a taxa de insulina de ratos submetidos a um regime rico em frutose do valor de $1,85 \pm 0,04$ para um valor de $1,64 \pm 0,03$, ou seja uma variação de 11,3%. Nas mesmas condições,

a metformina produz uma redução da taxa de insulina de 16,2%, (figura 12).

Exemplo 8: Medição da taxa de HDL no plasma

A taxa de HDL plasmático é medida por métodos comerciais aprovados que utilizam reagentes de separação de lipoproteínas de alta densidade e por medição da taxa de colesterol associada a estas lipoproteínas de alto peso molecular (kit da Biomérieux ref 61533, por exemplo)

Quando os murganhos submetidos a um regime rico em colesterol e em ácidos gordos são tratados com o composto CGP 02-01, a sua taxa de HDL plasmática passa de $0,11 \pm 0,005$ g/L a $0,15 \pm 0,005$ g/L, ou seja uma variação de 38,2%.

Exemplo 9: Medição da massa gorda abdominal

OS murganhos ApoE submetidos a um regime rico em colesterol e em gorduras foram sacrificados após 3 meses de tratamento com o composto CGP 02-01, nas doses de 0,1mg/kg e de 1 mg/kg. A massa gorda abdominal foi recuperada por dissecação, seca e expressa em peso seco.

O composto CGP 02-01 produz uma redução significativa ($p < 0,01$) da massa de gordura abdominal com ganho de peso constante. Esta massa abdominal passa de um valor de 760 ± 231 mg para um valor de 393 ± 78 mg quando os murganhos são tratados com 1 mg/kg, ou seja uma redução de 48,3% (figura 13). Este efeito depende da dose de CGP 02-01.

Exemplo 10: Depósito de triglicéridos nas aortas

Os triglicéridos que se acumulam ao nível da parede aórtica foram medidos da seguinte forma: as aortas dos animais são lavadas com soro fisiológico após dissecação. A massa lipídica é eliminada por dissecação, e a íntima média é desidratada. A taxa de triglicéridos é medida e expressa em peso de triglicéridos por peso seco de tecido.

Quando os murganhos ApoE ^{-/-} são tratados com o composto CGP 02-01 durante três meses a uma dose de 1 mg/kg o depósito de triglicéridos na parede aórtica passa de um valor média (n=8) de 185 ± 33 µg/mg (peso seco) a um valor de 131 ± 42 µg/mg (peso seco). Este efeito depende da dose injectada. Uma injeção de 0,1 mg/kg produz uma variação intermédia de 156 ± 31 µg/mg. A figura 14 ilustra este resultado.

Exemplo 11: Análise das lesões aórticas

As aortas de murganhos foram fixadas com paraformaldeído e dissecadas em secções de 10µm para análise histológica das lesões (figura 6).

Exemplo 12: Análise de isquemias coronárias

Após eutanásia de murganhos ApoE ^{-/-} submetidos a um regime normal, ou um regime rico em colesterol, os corações destes animais são observados macroscopicamente. A taxa de lesões isquémicas é observada (figura 15) e quantificada pela presença ou ausência de lesões (figura 16).

Exemplo 13: Medição da taxa plasmática de glucose num modelo de rato diabético


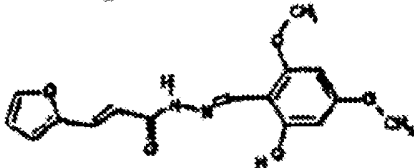
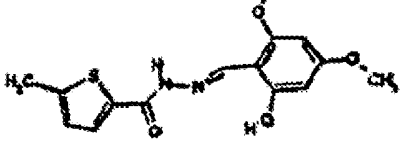
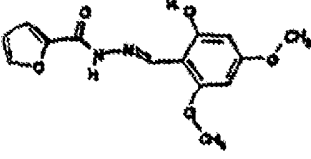
A glicemia é medida pelo método da hexoquinase com o auxílio de kits comerciais. Pode-se utilizar, por exemplo, o kit da Biomérieux (ref :61 269/61 270).

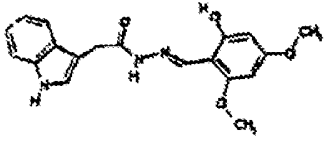
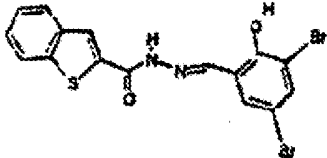
Quando os ratos são submetidos a um regime rico em frutose, a sua glicemia aumenta em função do tempo e passa de um valor médio (n=12) de $6,4 \pm 0,15$ mmole / L para um valor médio de $10,65 \pm 0,24$ mmole /L (figura 14). O composto CGP 02-01 estabiliza este aumento da glicemia após 21 dias de tratamento por via oral (figura 17).

Exemplo 14: Medição do efeito protector aquando de uma prova de hiperglicemia

Os ratos (n=12) foram submetidos a um regime rico em frutose (10%) durante 21 dias. No final do 14º dia provoca-se um choque hiperglicémico por uma administração de 2 g/kg de glucose na presença ou ausência do composto CGP 02-01 administrado por via oral. A taxa plasmática de glucose é medida em seguida. A figura 18 ilustra o efeito protector do produto sobre a hiperglicemia provocada.

Estrutura	Compostos	Inibição a 2.5 μM nas células THP 1 (24 horas)
------------------	------------------	--

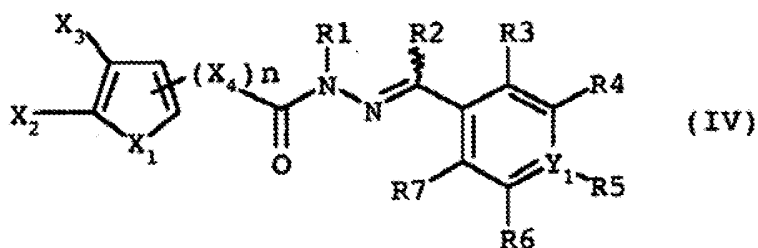
 <p>Ácido Benzo[b]tiofeno-2-carboxílico (2-hidroxi-4,6-dimetoxi-benzilideno)-hidrazida</p>	CGP02-01	76%
 <p>(2Z)-3-(2-furil)-N'-[(1E)-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)metileno]acrilohidrazida</p>	CGP02-02	64%
 <p>N'-[(1E)-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)metileno]-5-metiltiofeno-2-carbohidrazida</p>	CGP02-03	82%
 <p>Ácido 2-furanocarboxílico (2-hidroxi-4,6-dimetoxi-benzilideno)-hidrazida</p>	CGP02-07	63%

 <p>Ácido (1H-indol-3-yl)acético (2-hidroxi-4,6-dimetoxibenzilideno)-hidrazida</p>	CGP02-08	58%
 <p>Ácido benzo[b]tiofeno-2-carboxílico (3,5-dibromo-2-hidroxi-benzilideno)-hidrazida</p>	CGP02-18	78%

Lisboa 6 de Janeiro de 2010

REIVINDICAÇÕES

1. Composto de fórmula geral (IV) seguinte :

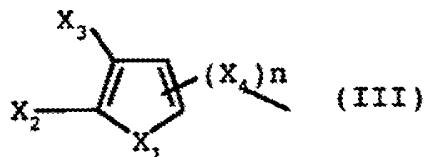


em que:

- R1 e R2, idênticos ou diferentes, são seleccionados de entre um átomo de hidrogénio, um radical alquilo inferior linear ou ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, um radical fluoroalquilo de 1 a 6 átomos de carbono e de 3 a 7 átomos de flúor,
- R3, R4, R5, R6 e R7, idênticos ou diferentes, são seleccionados de entre: um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo, um grupo de fórmula -OH, -OR8, em que R8 e R9 representam um radical alquilo inferior linear ou ramificado de 1 a 6 carbonos, um grupo amino -NH₂ ou -N(r, r') em que r e r', idênticos ou diferentes representam um radical alquilo inferior linear, um radical arilo, ou um heterociclo em que r e r' em conjunto formam um heterociclo de tamanho variável, de preferência em posição *para*.
- Y₁ é um átomo de carbono para formar um anel fenilo ou um átomo de azoto, para formar um anel piridina,

- X_1 é seleccionado de entre:

- um átomo de oxigénio e no caso em que o grupo de fórmula (III) a seguir:



é um anel 2-furanilo ou 3-furanilo em função da posição da cadeia $-(X_4)_n$ - acil-hidrazida nos carbonos α ou β deste heterociclo,

- um átomo de enxofre e no caso em que o grupo de fórmula (III) é um anel 2-tiofeno ou 3-tiofeno em função da posição da cadeia $-(X_4)_n$ - acil-hidrazida nos carbonos α ou β , podendo o átomo de enxofre transportar um átomo de oxigénio para formar um sulfóxido, ou dois átomos de oxigénio para formar uma sulfona,
- um átomo de azoto e no caso do grupo de fórmula (III) é um anel 2-pirrolo ou 3-pirrolo em função da posição da cadeia acil-hidrazida nos carbonos α ou β deste heterociclo, este átomo de azoto pode transportar um átomo de hidrogénio, um radical alquilo inferior, de 1 a 6 átomos de carbono, um radical fluoroalquilo que possui de 1 a 6 átomos de carbono e de 3 a 7 átomos de flúor, um radical acilo $-COR_{10}$, no qual R_{10} representa

uma cadeia alquilo linear ou ramificada de 1 a 6 carbonos, ou um radical arilo ou aralquilo,

- X_2 e X_3 , idênticos ou diferentes, são seleccionados de entre:

- um átomo de hidrogénio, um grupo alquilo inferior linear ou ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, um radical fluoroalquilo com 1 a 6 átomos de carbono e de 3 a 7 átomos de flúor,
- um átomo de halogéneo,
- um grupo nitro $-NO_2$, um grupo amina $-NH_2$ ou um grupo $-N(r, r')$, em que r e r' idênticos ou diferentes representam um radical alquilo inferior, linear ou ramificado, um radical arilo, ou um heterociclo, em que r e r' em conjunto formam um heterociclo de tamanho variável,

ou ainda, X_2 e X_3 estão incluídos num anel aromático do tipo benzénico ou aza-benzénico se este ciclo contém um átomo de azoto, para formar um heterociclo aromático do tipo benzofurano, quando X_1 é um átomo de oxigénio, um anel benzopirrolo, quando X_1 é um átomo de azoto livre ou substituído como a seguir, um anel benzotiofeno quando X_1 é um átomo de enxofre livre ou substituído como a seguir, ou ainda um anel do tipo piridino se estiver presente um átomo de azoto intracíclico,

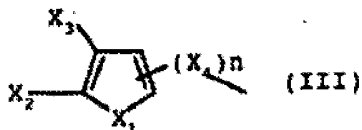
- n é 0 ou 1,

- X_4 , se presente, representa um grupo $-CH_2-$, OCH_2- , ou $-CH=CH-$.

2. Composto de fórmula (IV) de acordo com a reivindicação 1, em que R_3 é um grupo de fórmula $-OR_8$ e pelo menos dois dos substituintes R_4 , R_5 , R_6 e R_7 representam um átomo de hidrogénio.

3. Composto de fórmula (IV) de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 2, em que Y_1 é um átomo de carbono.

4. Composto de fórmula (IV) de acordo com a reivindicação 1, em que X_1 é um átomo de enxofre e, neste caso, o grupo de fórmula (III)



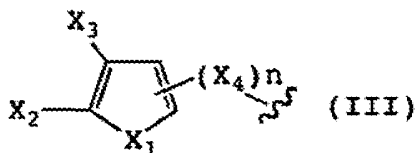
é um anel 2-tiofeno ou 3-tiofeno em função da posição da cadeia $-(X_4)_n-$ acil-hidrazida nos carbonos α ou β , podendo o átomo de enxofre transportar um átomo de oxigénio para formar um sulfóxido, ou dois átomos de oxigénio para formar uma sulfona.

5. Composto de acordo com a reivindicação 1, seleccionado do grupo constituído por:

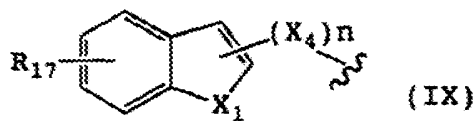
- N'-[(1E)-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)metileno]-1-benzotiofeno-2-carbohidrazida
- (2Z)-3-(2-furil)-N'-[(1E)-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)metileno] acrilohidrazida
- N'-[(1E)-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)metileno]-5-metiltiofene-2-carbohidrazida,
- Ácido 2-furanocarboxílico (2-hidroxi-4,6-dimetoxi-benzilideno)-hidrazida,
- Ácido (1H-indol-3-il) acético (2-hidroxi-4,6-dimetoxibenzilideno)-hidrazida,
- Ácido benzo[b]tiofeno-2-carboxílico (3,5-dibromo-2-hidroxi-benzilideno)-hidrazida.

6. N'-[(1E)-(2-Hidroxi-4,6-dimetoxifenil)metileno]-1-benzotiofeno-2-carbohidrazida.

7. Composto de fórmula (IV) de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o grupo de fórmula (III):



representa um grupo de fórmula (IX) a seguir:



em que:

- X_1 e X_4 têm o significado anterior,
 - n é 0 ou 1,
 - R_{17} é seleccionado de entre :
 - um átomo de hidrogénio, um radical alquilo inferior linear ou ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, um radical fluoroalquilo de 1 a 6 átomos de carbono e de 3 a 7 átomos de flúor,
 - um átomo de halogéneo,
 - um grupo OR' em que R' inferior linear ou ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, um radical fluoroalquilo de 1 a 6 átomos de carbono e de 3 a 7 átomos de flúor.
- 8.** Sal de um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores com um ácido farmacêuticamente aceitável.
- 9.** Composição farmacêutica que compreende, como agente activo, pelo menos um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8.

10. Composição de acordo com a reivindicação 9, que se destina ao tratamento e/ou prevenção de doenças associadas a distúrbios do metabolismo das gorduras.

11. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 e 10, que se destina ao tratamento e/ou prevenção de doenças cardiovasculares.

12. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 11, que se destina ao tratamento e/ou prevenção de doenças seleccionadas do grupo que compreende aterosclerose, restenose arterial, obesidade, diabetes do tipo II, isquemia cerebral, esteatose hepática, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, dislipoproteinemia, quilomicronemia, lipodistrofia e hipoglicemia.

13. Utilização de um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, para o fabrico de um medicamento.

Lisboa 6 de Janeiro de 2010

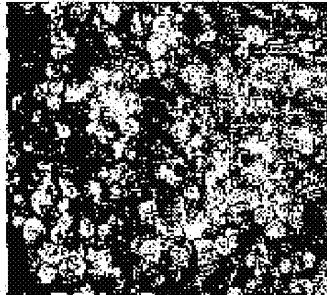
RESUMO**COMPOSTOS DO TIPO HIDRAZIDA E SUA UTILIZAÇÃO EM COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES**

Os derivados de hidrazida (I) e seus sais de adição de ácido são novos. - R1, R2 = H, 1-6C alquilo ou 1-6C tri- a hepta-fluoroalquilo; - A = arilo ou heteroarilo mono- ou policíclico; - B = fenilo opcionalmente substituído. -
ACTIVIDADE - Antilipémico; Antiarterioesclerótico; vasotrópico; anorético; antidiabético; cerebroprotector; hepatotrópico. Ácido 2-Ciclopropil-4-quinolinocarboxílico (2-hidroxi-4,6-dimetoxibenzilideno)hidrazida (Ia) resultou em 81% de inibição de acumulação de lipoproteína (LDL_{ox}; não definido) em células THP1, a uma concentração de 2,5 μ M. - MECANISMO DE ACÇÃO - Não fornecido.

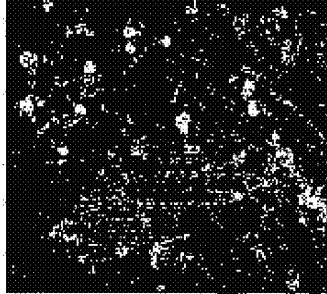
1/18

Células THP1 diferenciadas e cultivadas na presença de lipoproteínas oxidadas
marcadas com cianina 3

Células não tratadas com CGP 02-01



Células tratadas com CGP 02-01



Efeito da dose de CGP 02-01 na acumulação
de vesículas lipídicas

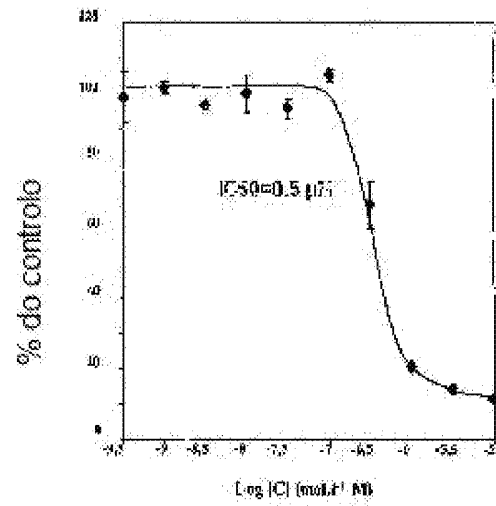


Figura 1

2/18

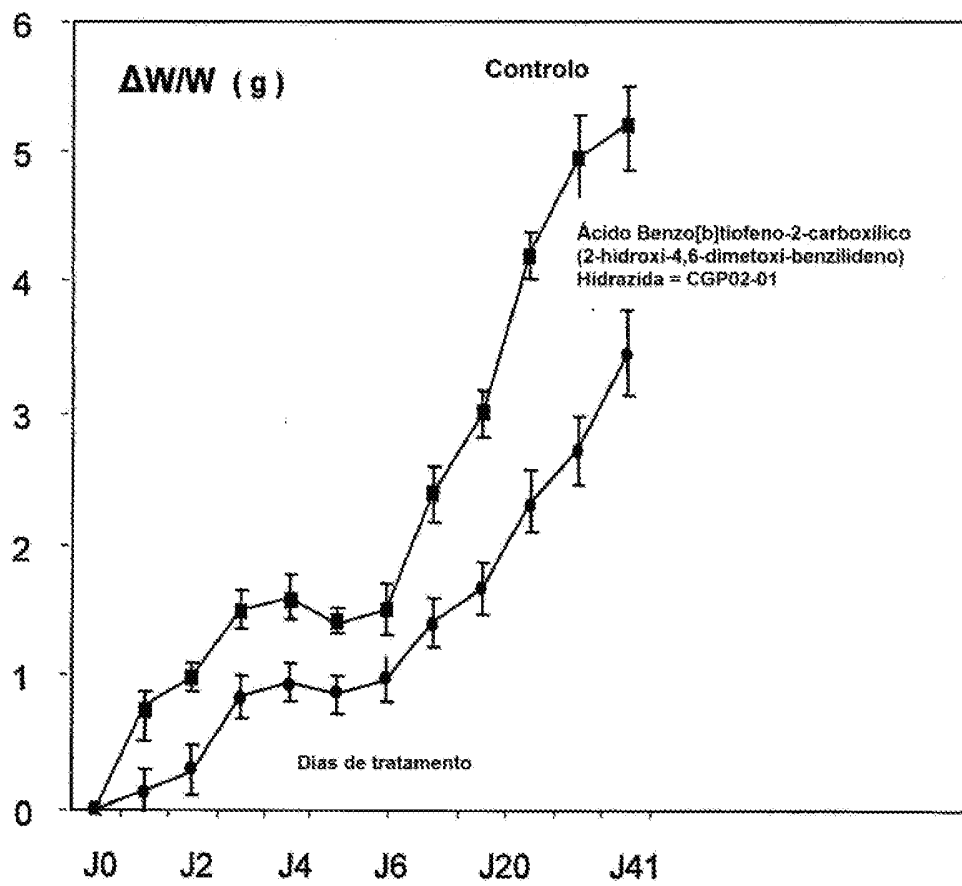


Figura 2

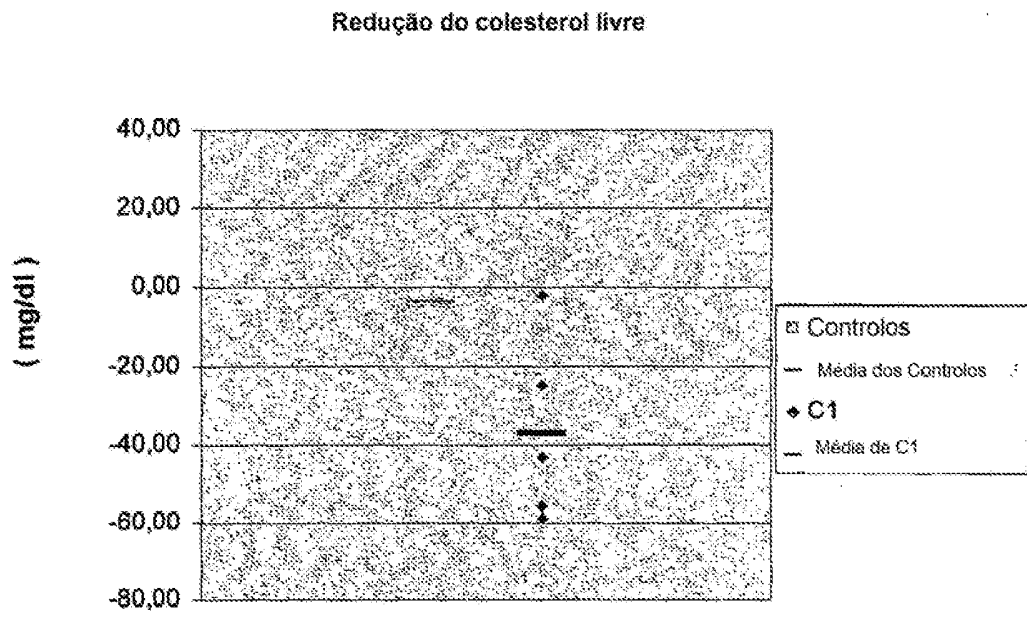


Figura 3

Redução do colesterol total

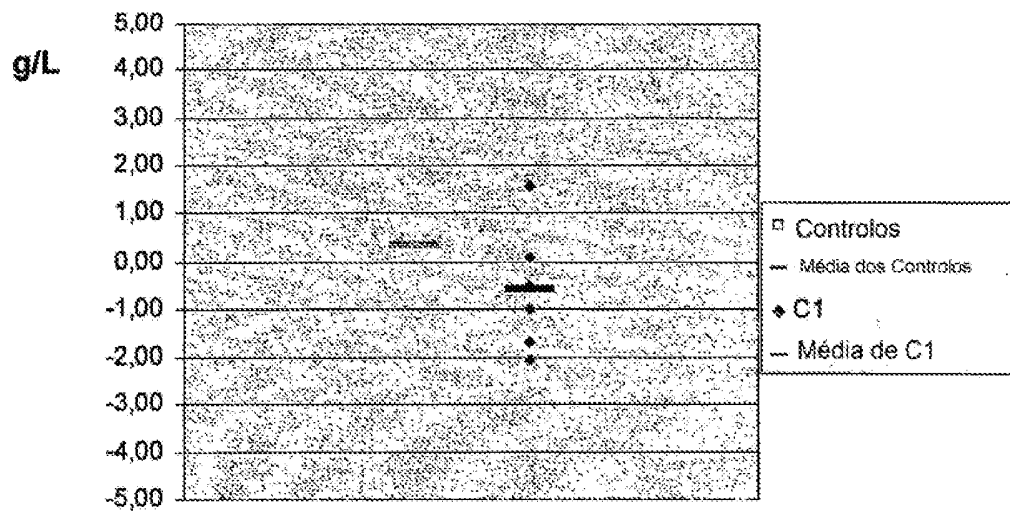


Figura 4

5/18

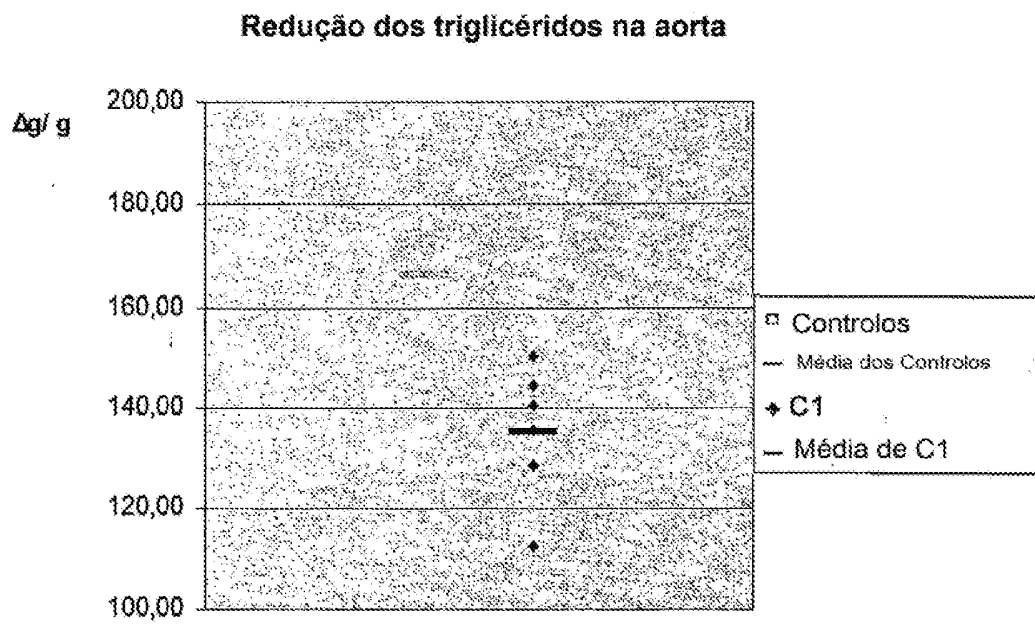


Figura 5

Aorta de murganho controlo

Aorta de murganho tratado

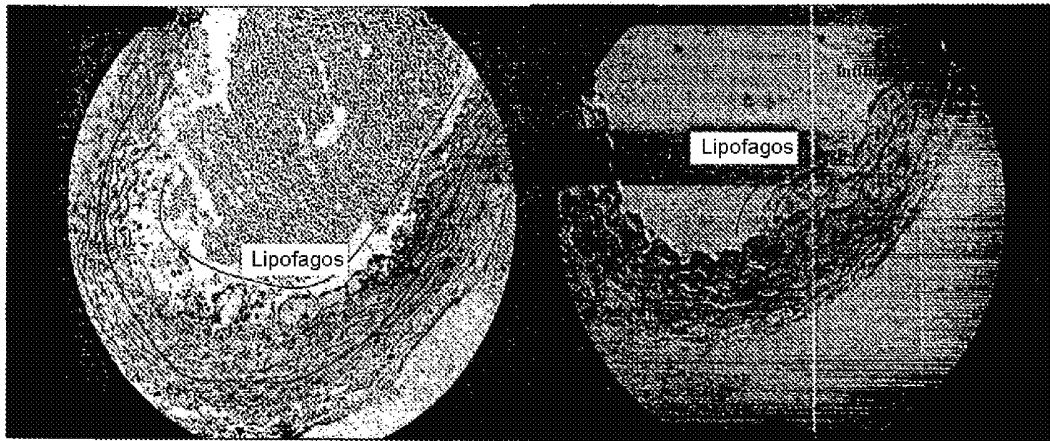


Figura 6

7/18

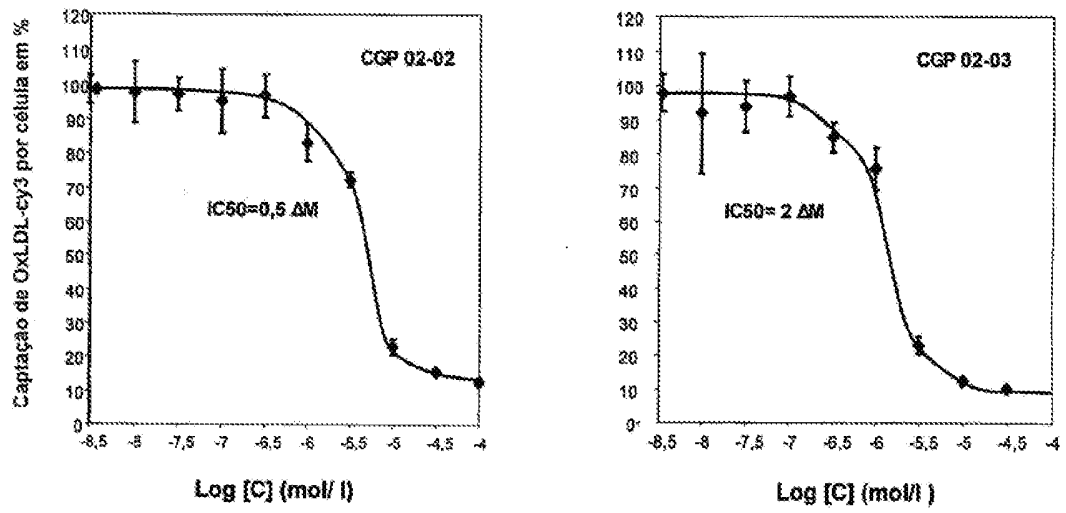


Figura 7

8/18

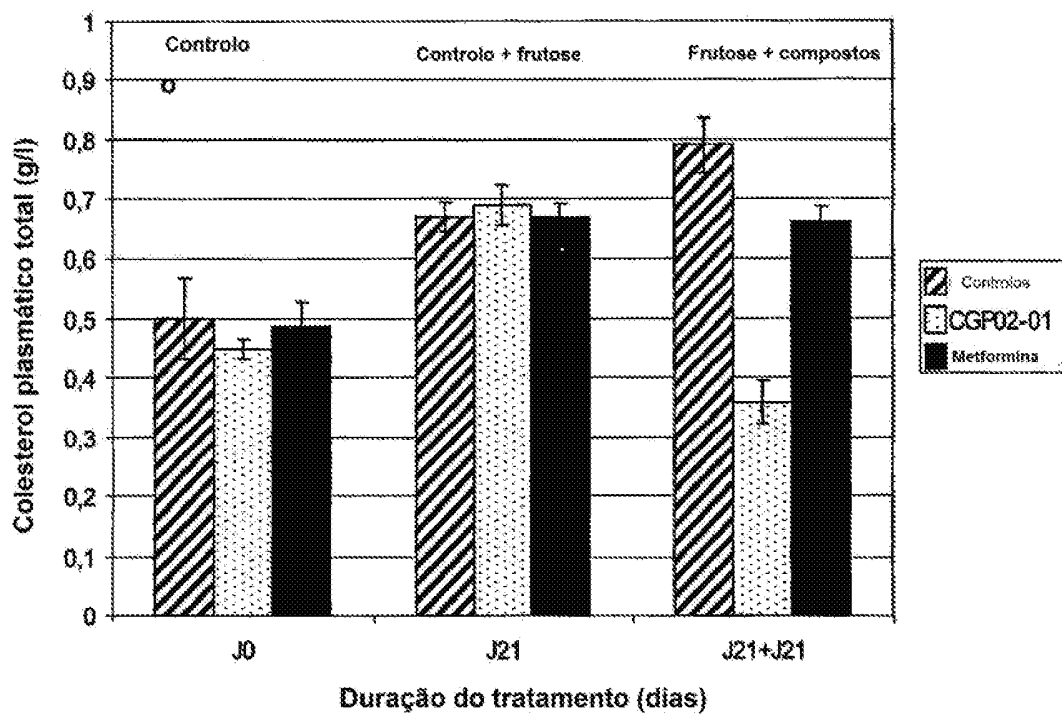


Figura 8

9/18

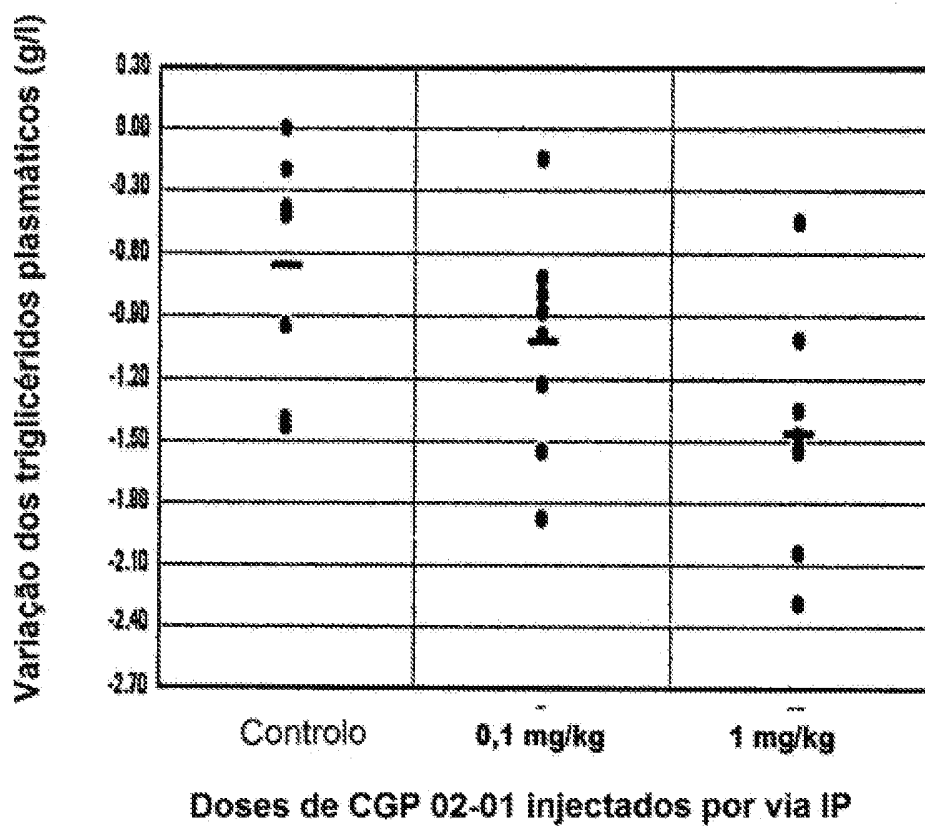


Figura 9

10/18

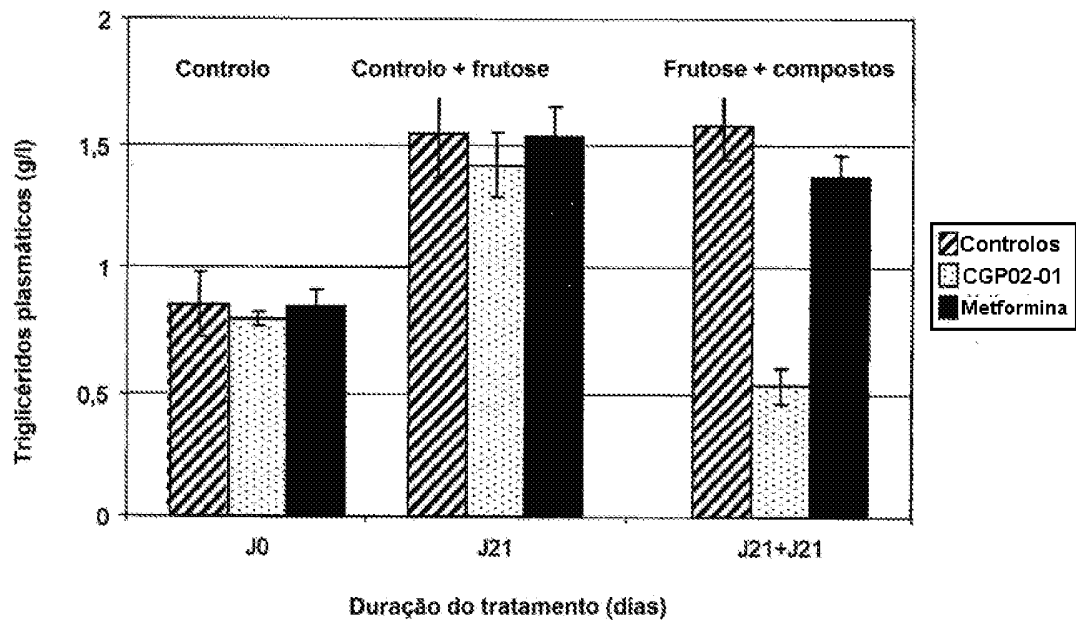


Figura 10

11/18

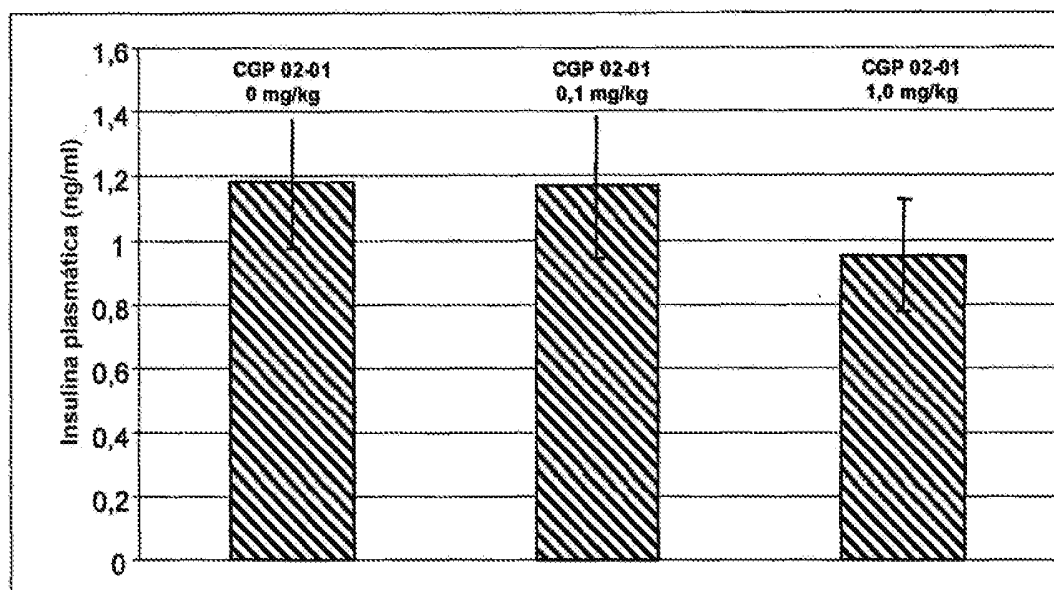


Figura 11

12/18

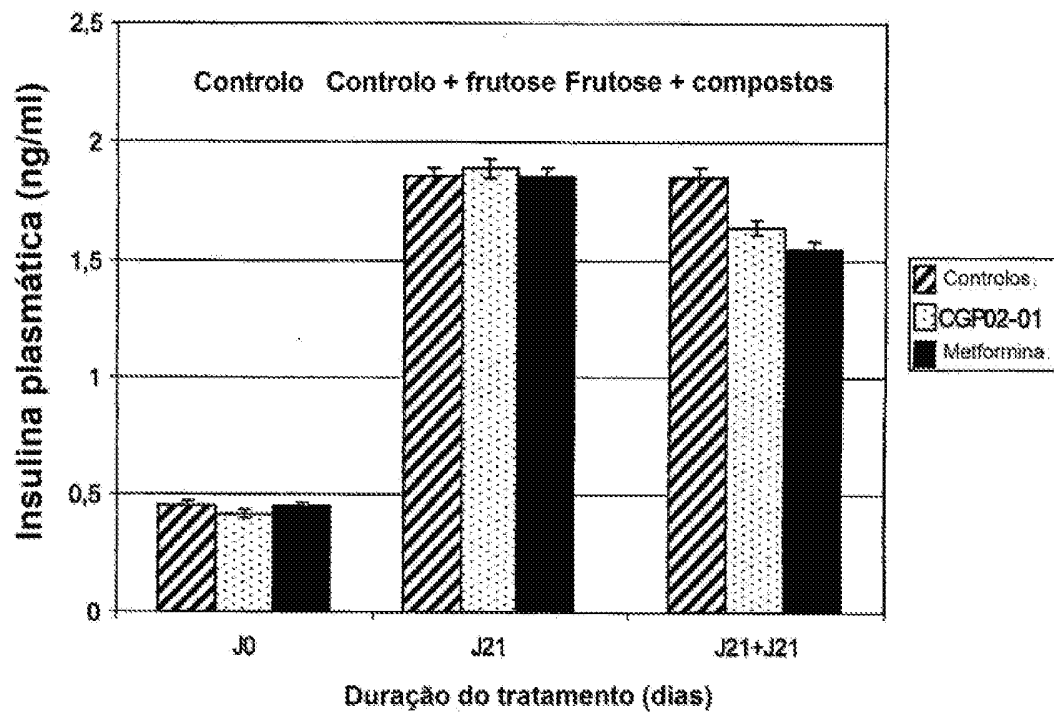
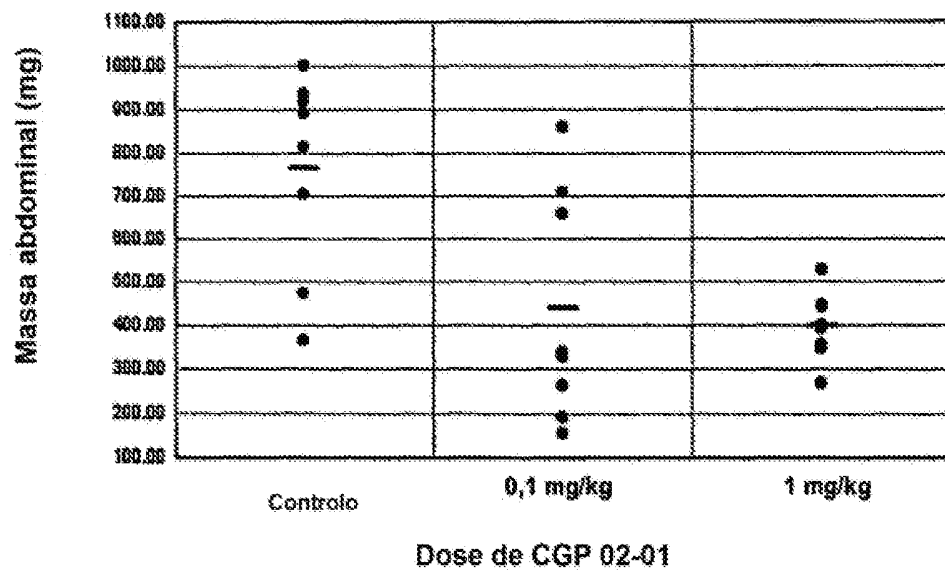


Figura 12

13/18



Ganho em peso (g)	9,2 ± 2,1	9,5 ± 1,7	9,7 ± 1,9
Massa gorda (mg)	760 ± 231	435 ± 266	393 ± 78

Figura 13

14/18

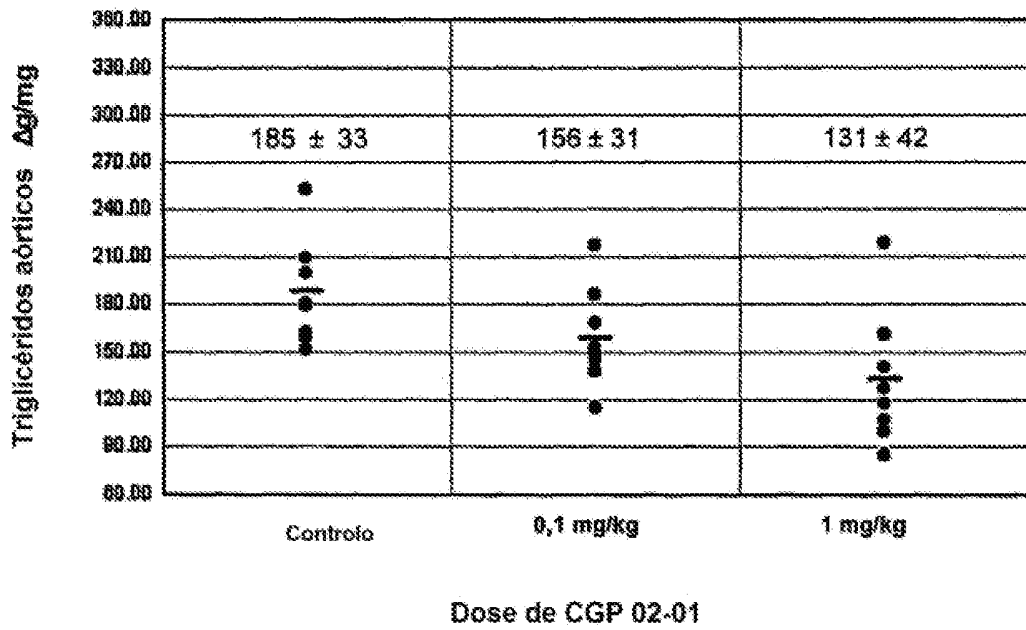


Figura 14

15/18

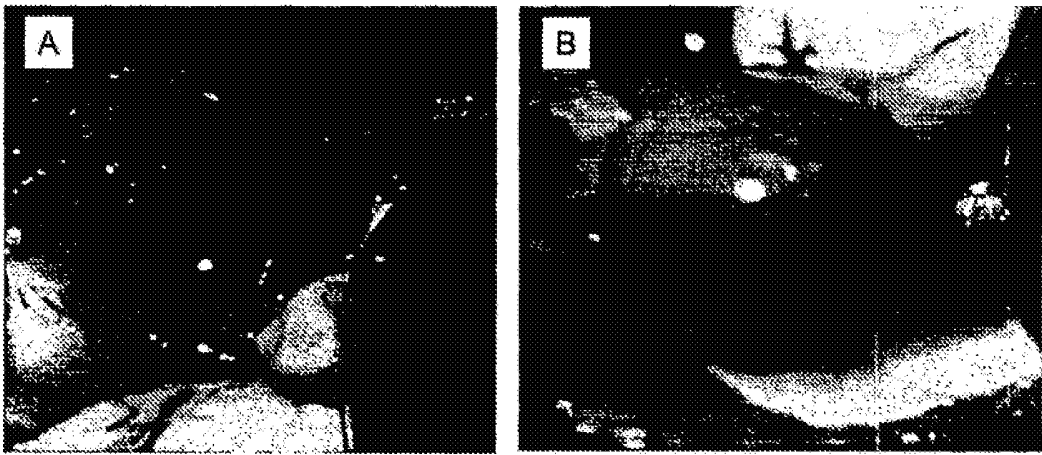


Figura 15

16/18

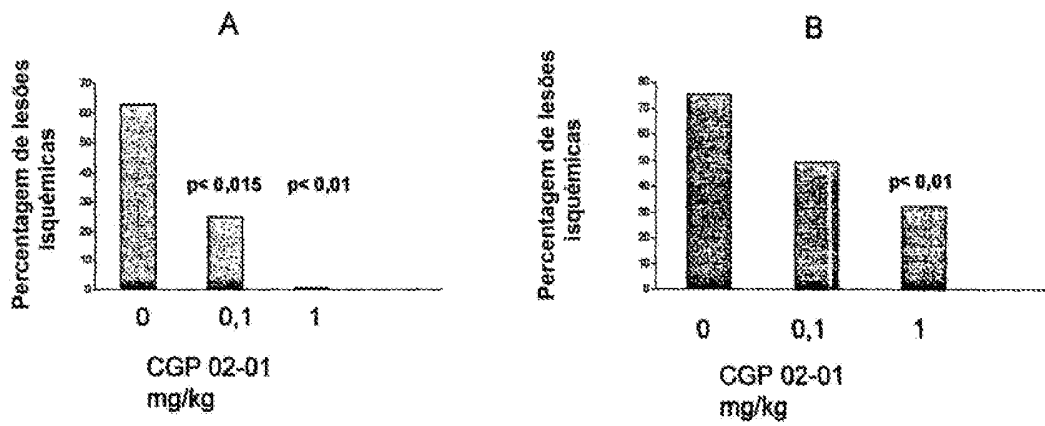


Figura 16

17/18

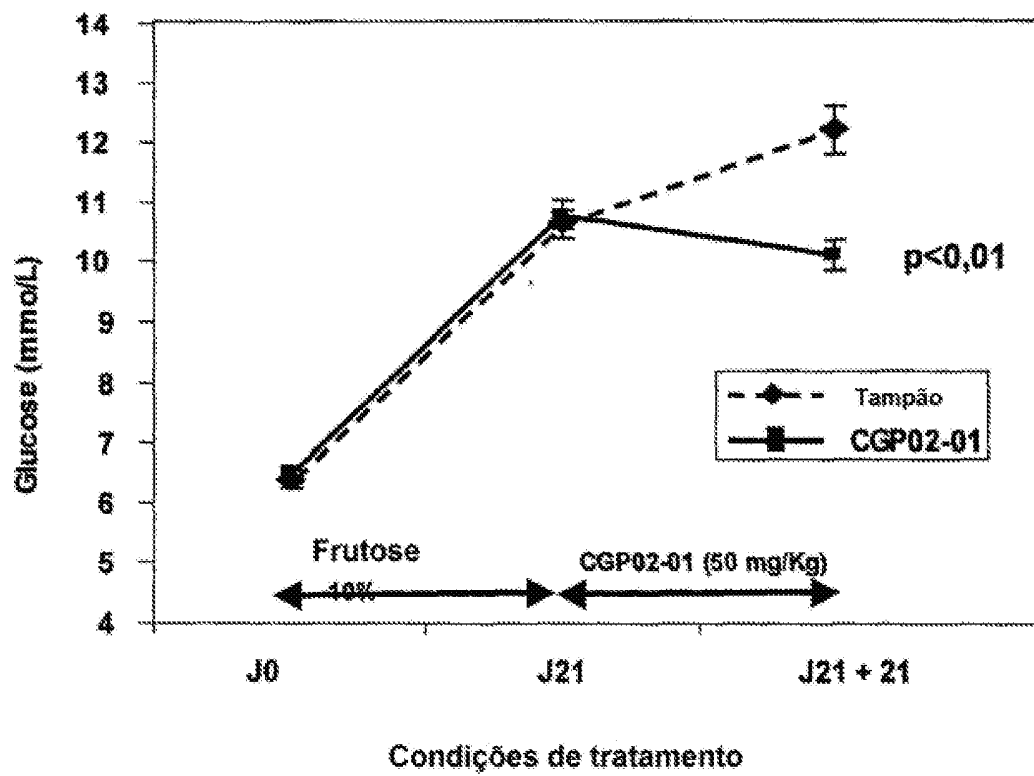


Figura 17

18/18

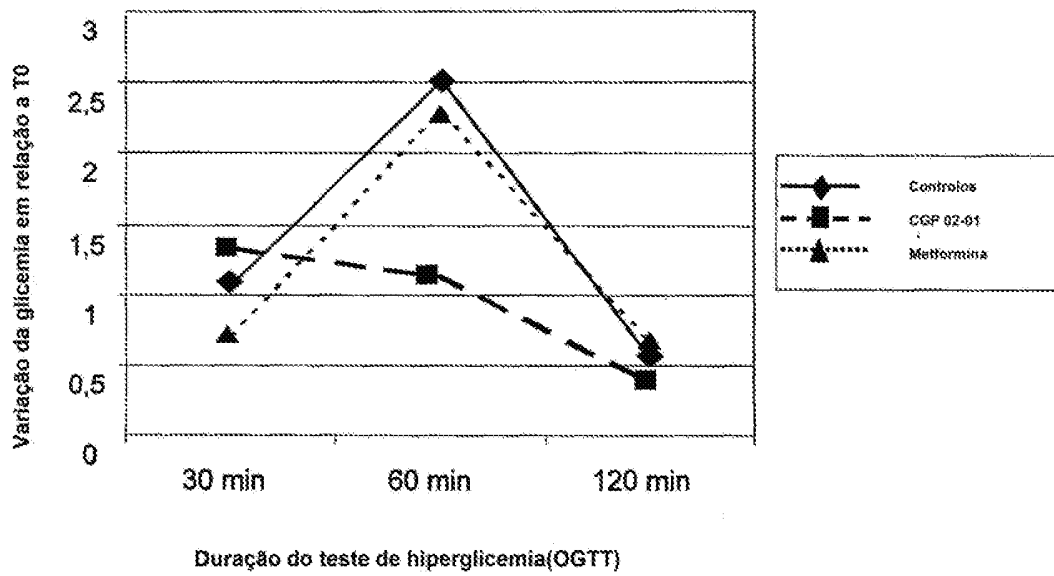


Figura 18