

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

(22) Data de pedido: 2003.06.13	(73) Titular(es): SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH BRÜNINGSTRASSE 50 65929 FRANKFURT AM MAIN DE
(30) Prioridade(s): 2002.06.28 DE 10229180	
(43) Data de publicação do pedido: 2005.04.06	
(45) Data e BPI da concessão: 2012.03.07 098/2012	(72) Inventor(es): WOLFGANG LINZ DE STEFAN SCHÄFER DE MARKUS BLEICH DE JOCHEN HUBER DE
	(74) Mandatário: ELSA MARIA MARTINS BARREIROS AMARAL CANHÃO RUA DO PATROCÍNIO 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **UTILIZAÇÃO DE INIBIDORES DA VASOPEPTIDASE NO TRATAMENTO DE UMA NEFROPATIA**

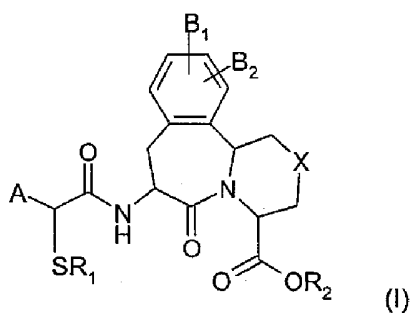
(57) Resumo:

A INVENÇÃO DESCREVE A UTILIZAÇÃO DE INIBIDORES DA VASOPEPTIDASE DA FÓRMULA (I) PARA O TRATAMENTO E/OU PROFILAXIA DE NEFROPATIA EM DOENTES DIABÉTICOS OU NÃO DIABÉTICOS, INCLUINDO NEFROPATIA DIABÉTICA OU NÃO DIABÉTICA, GLOMERULONEFRITE, ESCLEROSE GLOMERULAR, SÍNDROME NEFRÓTICO, NEFROESCLEROSE HIPERTENSIVA, MICROALBUMINÚRIA E DOENÇAS RENAIIS DE FASE TERMINAL OU RESISTÊNCIA À INSULINA, OU DOENÇAS METABÓLICAS ASSOCIADAS COM PRODUTOS FINAIS DA GLICAÇÃO AVANÇADA, TAIS COMO COMPLICAÇÕES DIABÉTICAS, NEUROPATIA DIABÉTICA, NEFROPATIA DIABÉTICA, RETINOPATIA DIABÉTICA, CATARATAS, ENFARTE DO MIOCÁRDIO E/OU CARDIOMIOPATIA DIABÉTICA OU ATEROESCLEROSE OU DISFUNÇÃO ENDOTELIAL.

RESUMO

"UTILIZAÇÃO DE INIBIDORES DA VASOPEPTIDASE NO TRATAMENTO DE UMA NEFROPATIA"

A invenção descreve a utilização de inibidores da vasopectidade da fórmula (I) para o tratamento e/ou profilaxia de nefropatia em doentes diabéticos ou não diabéticos, incluindo nefropatia diabética ou não diabética, glomerulonefrite, esclerose glomerular, síndrome nefrótico, nefroesclerose hipertensiva, microalbuminúria e doenças renais de fase terminal ou resistência à insulina, ou doenças metabólicas associadas com produtos finais da glicação avançada, tais como complicações diabéticas, neuropatia diabética, nefropatia diabética, retinopatia diabética, cataratas, enfarte do miocárdio e/ou cardiomiopatia diabética ou aterosclerose ou disfunção endotelial.



DESCRIÇÃO

"UTILIZAÇÃO DE INIBIDORES DA VASOPEPTIDASE NO TRATAMENTO DE UMA NEFROPATIA"

Utilização de inibidores da vasopectidase no tratamento de doenças metabólicas, nefropatia e doenças associadas com AGE.

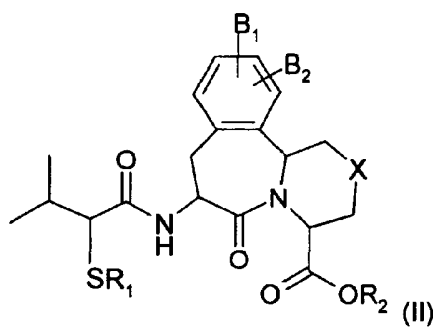
A Enzima de Conversão da Angiotensina (ACE) é uma peptidil dipeptidase que catalisa a conversão da angiotensina I em angiotensina II. A angiotensina II é um vasoconstritor que estimula, também, a secreção de aldosterona pelo córtex adrenal. A inibição da ACE previne a conversão da Angiotensina I em angiotensina II e o metabolismo da brandicinina, resultando em concentrações de angiotensina II em circulação diminuídas, aldoesterona e brandicinina em circulação aumentadas. Além destas alterações neuro-hormonais, foram observadas diminuições na resistência periférica e pressão sanguínea, particularmente em indivíduos com renina em circulação elevada. Outros efeitos farmacológicos associados com a inibição da ACE incluem a regressão da hipertrofia ventricular esquerda, melhoria nos sinais clínicos da insuficiência cardíaca e redução na mortalidade em doentes com insuficiência cardíaca congestiva (CHF) ou disfunção ventricular esquerda após enfarte do miocárdio.

A endopeptidase neutra (NEP) é uma enzima responsável pelo metabolismo do péptido natriurético atrial (ANP). A inibição da NEP resulta em concentrações de ANP aumentadas que, por sua vez, conduzem a natriurese, diurese e diminuições no volume

intravascular, retorno venoso e pressão sanguínea. O ANP é libertado pelos miócitos atriais em resposta ao alongamento atrial ou volume intravascular aumentado. Foi demonstrado que concentrações plasmáticas elevadas de ANP têm um mecanismo compensatório potencial em vários estados da doença, incluindo insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência renal, hipertensão essencial e cirrose.

A secreção de ANP pelos miócitos atriais provoca vasodilatação, diurese, natriurese e a inibição da libertação da renina e secreção de aldosterona. Pelo contrário, a angiotensina II resulta em vasoconstrição, reabsorção de sódio e água e produção de aldosterona. Estes dois sistemas hormonais interagem de um modo recíproco, ou de contrabalanço, para manter as respostas, vascular fisiológica e hemodinâmica, normais. A patente U.S. 5430145, Patente Europeia EP 481522 e pedido de patente WO PCT/EP 02/03668 (publicada como documento WO 02/08 3671) divulgam derivados de mercaptoacetilamida tricíclicos de fórmula (I) úteis) como inibidores de ACE e NEP, *i. e.*, para o tratamento e/ou prevenção da insuficiência cardíaca e hipertensão.

Esta invenção é direccionada à utilização de um composto de fórmula (II)

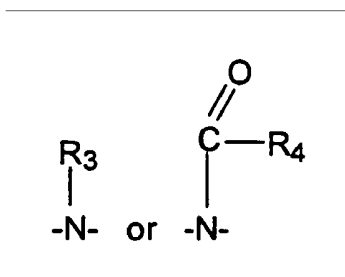


em que

R_1 é hidrogénio, $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ou um grupo acilo;

R_2 é hidrogénio; $-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_3$; um alquilo- C_1-C_4 ; arilo, $-(\text{alquil}-\text{C}_1-\text{C}_4)\text{-arilo}$; ou difenilmetilo;

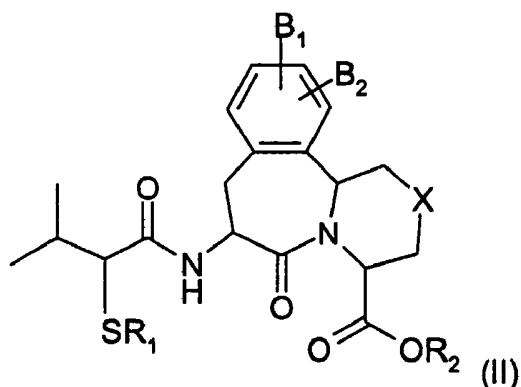
X é $-(\text{CH}_2)_n$ em que n é um número inteiro 0 ou 1, $-\text{S}-$, $-\text{O}-$,



em que R_3 é hidrogénio, um alquilo- C_1-C_4 , arilo ou arilo- $(\text{alquil}-\text{C}_1-\text{C}_4)$ e R_4 é $-\text{CF}_3$, alquilo- C_1-C_{10} , arilo ou aril- $(\text{alquil}-\text{C}_1-\text{C}_4)$;

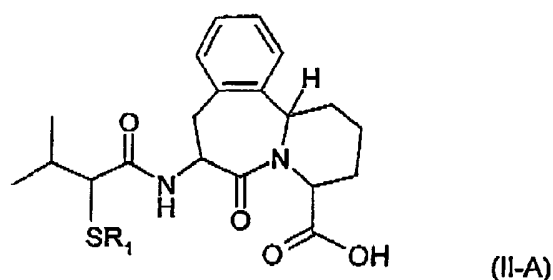
B_1 e B_2 são, cada, independentemente, hidrogénio, hidroxilo, $-\text{OR}_5$, em que R_5 é alquilo- C_1-C_4 , arilo ou $-(\text{alquil}-\text{C}_1-\text{C}_4)\text{-arilo}$ ou, onde B_1 e B_2 estão ligados aos átomos de carbono adjacentes, B_1 e B_2 podem ser considerados em conjunto com os referidos átomos de carbono adjacentes para formar um anel benzeno ou metilenodioxilo, para o tratamento e/ou profilaxia da nefropatia em doentes diabéticos, incluindo glomerulonefrite, esclerose glomerular, síndrome nefrótico, nefroesclerose hipertensiva, microalbuminúria ou doença renal em fase terminal.

Numa forma de realização, a presente invenção proporciona as utilizações acima de um composto de fórmula (II)



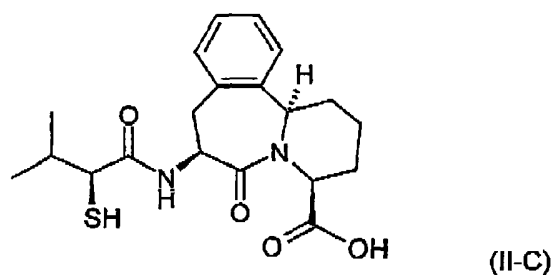
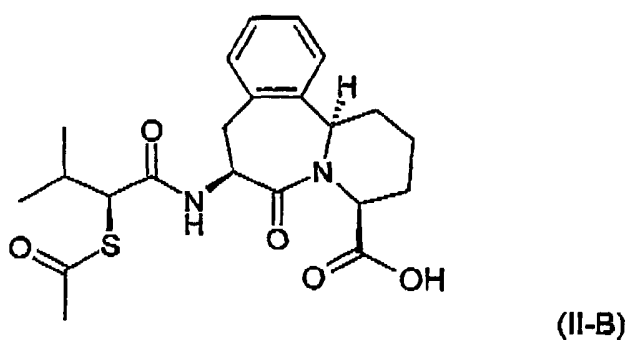
em que R_1 é acetilo. Noutra forma de realização, a presente invenção proporciona as utilizações acima de um composto de fórmula (II), em que R_1 é hidrogénio. Noutra forma de realização, a presente invenção proporciona as utilizações acima de um composto da fórmula (II), em que R_2 é hidrogénio. Noutra forma de realização, a presente invenção proporciona as utilizações acima de um composto de fórmula (II) em que B_1 e/ou B_2 são hidrogénio. Ainda noutra forma de realização, a presente invenção proporciona as utilizações acima de um composto de fórmula (II) em que X é $-CH_2$.

Noutra forma de realização, a presente invenção proporciona as utilizações acima de um composto da fórmula (II), caracterizadas por um composto de fórmula (II-A):



em que R_1 é acetilo ou hidrogénio.

A estrutura dos compostos preferidos das fórmulas (II-A) é da fórmula (II-B), também referido como composto (II-B) ou cpt. (II-B) e da fórmula (II-C) abaixo:



Como aqui utilizado, o termo “alquilo- C_1-C_4 ” refere-se a uma cadeia de hidrocarboneto monovalente linear ou ramificada saturada com um, dois, três ou quatro átomos de carbono e inclui metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, butilo terciário e grupos semelhantes. O termo “alquilo- C_1-C_{10} ”

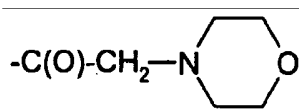
refere-se a uma cadeia de hidrocarboneto monovalente linear ou ramificada saturada, com um a dez átomos de carbono e inclui metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, butilo terciário, pentilo, isopentilo, hexilo, 2,3-dimetil-2-butilo, heptilo, 2,2-dimetil-3-pentilo, 2-metil-2-hexilo, octilo, 4-metil-3-heptilo e grupos semelhantes.

Como aqui utilizado, "alcoxilo-C₁-C₄" refere-se a um substituinte monovalente que consiste numa cadeia alquilo linear ou ramificada com 1 a 4 átomos de carbono ligados através de um átomo de oxigénio e com a sua ligação de valência livre do éter de oxigénio e inclui metoxilo, etoxilo, propoxilo, isopropoxilo, butoxilo, sec-butoxilo, terc-butoxilo e grupos semelhantes.

Como aqui utilizado, "arilo" refere-se a um grupo fenilo ou naftilo não substituído ou substituído, com um a três substituintes seleccionados do grupo consistindo de metilenodioxilo, hidroxilo, alcoxilo-C₁-C₄, fluoro e cloro. Estão incluídos no âmbito do termo "-(alquil-C₁-C₄)-arilo", fenilmetilo (benzilo), feniletilo, p-metoxibenzilo, p-fluorobenzilo e p-clorobenzilo.

Como aqui utilizado, "halogéneo" ou "Hal" refere-se a um membro da família do flúor, cloro, bromo ou iodo.

Como aqui utilizado, "grupo acilo" refere-se a grupos acilo alifático e aromático e àqueles derivados dos compostos heterocíclicos. Por exemplo, o grupo acilo pode ser um grupo alcanoílo(C₁-C₄) ou inferior, tal como formilo ou acetilo, um grupo aroílo, tal como benzoílo ou um grupo acilo heterocíclico compreendendo um ou mais dos heteroátomos O, N e S, tal como o grupo



Como aqui utilizado, “estereoisómero” é um termo geral utilizado para todos os isómeros de moléculas individuais que diferem apenas na orientação dos seus átomos no espaço. O termo estereoisómero inclui isómeros de imagens ao espelho (enantiómeros), isómeros geométricos (cis/trans ou E/Z) e isómeros de compostos com mais do que um centro quiral que não são imagens ao espelho um do outro (diastereoisómeros).

Como aqui utilizado, “R” e “S” são utilizados como normalmente utilizados na química orgânica para denominar a configuração específica de um centro quiral. O termo “R” (*rectus*) refere-se a essa configuração de um centro quiral com uma relação no sentido dos ponteiros do relógio de prioridades do grupo (do mais elevado ao segundo mais baixo) quando observado ao longo da ligação em direcção ao grupo de prioridade mais baixa. O termo “S” (*sinister*) refere-se à configuração de um centro quiral com uma relação no sentido contrário dos ponteiros do relógio das prioridades do grupo (do mais elevado para o segundo mais baixo) quando observado ao longo da ligação em direcção ao grupo com prioridade mais baixa. A prioridade dos grupos baseia-se em regras de sequência em que a prioridade é baseada, inicialmente, no número atómico (na ordem de diminuição do número atómico). Em *Stereochemistry of Organic Compounds*, Ernest L. Eliel, Samuel H. Wilen e Lewis N. Mander, editores, Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, 1994, está contida uma lista e discussão de prioridades.

Além do sistema (R)-(S), o sistema D-L mais antigo pode também ser utilizado aqui para identificar a configuração absoluta, especialmente com referência a aminoácidos. Neste sistema, uma fórmula de projecção de Fischer está orientada de modo a que o carbono número 1 da cadeia de aminoácidos esteja no topo. O prefixo "D" é utilizado para representar a configuração absoluta do isómero no qual o grupo funcional (determinado) está no lado direito do carbono no centro quiral e 'L', do isómero no qual está à esquerda.

Como aqui utilizado, "tratar" ou "tratamento" significa qualquer tratamento, incluindo, mas não limitado a, alívio dos sintomas, eliminação da causa dos sintomas, quer numa base temporária ou permanente ou na prevenção ou diminuição do surgimento dos sintomas e progressão da doença, distúrbio ou patologia em causa.

Como aqui descrito, o termo "doente" refere-se a um animal de sangue quente, tal como um mamífero que sofre com uma doença, distúrbio ou patologia em particular. É entendido claramente que cobaias, cães, gatos, ratos, murganhos, cavalos, gado, ovelhas e humanos são exemplos de animais incluídos no âmbito do significado do termo.

Como aqui utilizado, a expressão "sal farmaceuticamente aceitável" entende-se como sendo aplicado a qualquer sal, previamente conhecido ou futuramente descoberto, que é utilizado pelos especialistas, que é um sal de adição orgânico ou inorgânico não tóxico que é adequado para utilização como um fármaco. As bases ilustrativas que formam sais adequados incluem hidróxidos de metais alcalinos ou metais alcalinos-terrosos, tais como hidróxidos de sódio, potássio, cálcio ou magnésio;

amónia e aminas alifáticas, cíclicas ou aromáticas, tais como metilamina, dimetilamina, trietilamina, dietilamina, isopropildietilamina, piridina e picolina. Os ácidos ilustrativos que formam sais adequados incluem ácidos inorgânicos, tais como, por exemplo, ácido clorídrico, bromídrico, sulfúrico, fosfórico e semelhantes, e ácidos carboxílicos orgânicos, tais como, por exemplo, ácido acético, propiónico, glicólico, láctico, pirúvico, malónico, succínico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, maleico, hidroximaleico e di-hidroximaleico, benzóico, fenilacético, 4-aminobenzóico, 4-hidroxibenzóico, antranílico, cinâmico, salicílico, 4-aminosalicílico, 2-fenoxibenzóico, 2-acetoxibenzóico, mandélico e ácidos semelhantes e ácidos sulfónicos orgânicos, tais como ácidos metanossulfónico e p-toluenossulfónico.

Como aqui utilizado, "veículo farmacêutico" refere-se a excipientes farmacêuticos conhecidos, úteis na formulação de compostos farmaceuticamente activos para administração e que são substancialmente não tóxicos e não sensibilizadores sob as condições de utilização. A proporção exacta destes excipientes é determinada através da solubilidade e propriedades químicas do composto activo, a via de administração escolhida, bem como da prática farmacêutica convencional.

As composições do composto de fórmula (II) desta invenção podem ser administradas a um indivíduo com necessidade de tratamento através de várias vias de administração convencionais, incluindo oralmente, topicamente, parentericamente, e. g., intravenosamente, subcutaneamente ou intramedularmente. Além disso, as composições activas desta invenção podem ser administradas intranasalmente, como um

supositório rectal ou utilizando uma formulação “flash”, *i. e.*, permitindo que a medicação se dissolva na boca sem a necessidade de utilizar água.

As composições activas desta invenção podem ser administradas individualmente ou em combinação com transportadores, veículos ou diluentes farmacêuticamente aceitáveis, quer em doses individuais ou múltiplas. Os transportadores, veículos e diluentes farmacêuticamente aceitáveis incluem diluentes ou enchimentos sólidos inertes, soluções aquosas estéreis e vários solventes orgânicos. As composições farmacêuticas formadas pela combinação das composições activas desta invenção e os transportadores, veículos ou diluentes farmacêuticamente aceitáveis são, depois, rapidamente administrados através de várias formas de dosagem, tais como comprimidos, pós, pastilhas, xaropes, soluções injectáveis e semelhantes. Estas composições farmacêuticas podem, se desejado, conter ingredientes adicionais, tais como aromatizantes, ligandos, excipientes e semelhantes. Assim, para os objectivos de administração oral, os comprimidos contendo vários excipientes, tais como citrato de sódio, carbonato de cálcio e fosfato de cálcio podem ser empregues em simultâneo com vários desintegrantes, tais como amido, ácido algínico e certos silicatos complexos, em conjunto com agentes ligantes, tais como polivinilpirrolidona, sacarose, gelatina e acácia. Adicionalmente, os agentes lubrificantes, tais como o estearato de magnésio, laurilsulfato de sódio e talco são muitas vezes úteis para os objectivos da preparação de comprimidos. As composições sólidas de um tipo semelhante podem também ser empregues como enchimentos em cápsulas de gelatina mole e dura de enchimento. Os materiais preferidos para estes incluem lactose ou açúcar de leite e polietilenoglicóis de elevado peso

molecular. Quando as suspensões aquosas ou elixires são desejados para administração oral, o ingrediente activo essencial aqui pode ser combinado com vários agentes adoçantes ou aromatizantes, pigmentos ou corantes e, se desejado, emulsionantes ou agentes de suspensão, em conjunto com diluentes tais como água, etanol, propilenoglicol, glicerol e suas combinações.

Para administração parentérica, podem ser empregues soluções das composições activas desta invenção em óleo de sésamo ou amendoim, propilenoglicol aquoso ou em soluções aquosas estéreis. Tais soluções aquosas deverão ser adequadamente tamponadas se necessário e o diluente líquido proporcionando, inicialmente, soluções isotónicas com solução salina suficiente ou glucose. Estas soluções aquosas particulares são especialmente adequadas para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea e intraperitoneal. Neste seguimento, os meios aquosos estéreis empregues estão todos rapidamente disponíveis através de técnicas convencionais conhecidas pelos especialistas na técnica.

Geralmente, uma composição desta invenção é administrada oralmente, parentericamente (e. g., intravenosa, intramuscular, subcutânea ou intramedular) ou topicamente. Para administração intranasal ou administração por inalação, um ou mais compostos da invenção são distribuídos de um modo conveniente na forma de uma solução ou suspensão a partir de um recipiente vaporizador de bomba, que é apertado ou bombeado pelo doente ou com uma apresentação em vaporizador de aerossol a partir de um recipiente pressurizado ou um nebulizador, com a utilização de um propelente adequado, e. g., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de

carbono ou outro gás adequado. No caso de um aerossol pressurizado, a unidade de dosagem pode ser determinada proporcionando uma válvula para distribuir uma quantidade doseada. O recipiente pressurizado ou nebulizador pode conter uma solução ou suspensão do composto activo. As cápsulas e cartuchos (preparados, por exemplo, a partir de gelatina) para utilização num inalador ou insuflador podem ser formuladas contendo uma mistura em pó de um composto da invenção e uma base de pó adequada, tal como lactose ou amido. Para objectivos de administração transdérmica (e. g., tópica), são preparadas soluções aquosas ou parcialmente aquosas estéreis diluídas (normalmente numa concentração de cerca de 0,1% a 5%), de outro modo semelhantes às soluções parentéricas acima. São conhecidos métodos de preparação de várias composições com uma certa quantidade de ingrediente activo ou serão evidentes à luz desta divulgação, para os especialistas na técnica. Para ver exemplos de métodos de preparações de composições farmacêuticas, ver Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 19^a Edição (1995).

NEFROPATIA:

A nefropatia é uma doença crónica que é definida como uma anormalidade na excreção da albumina pela urina em doentes diabéticos ou não diabéticos. As taxas de excreção da albumina pela urina são inferiores a ou iguais a 40 mg/24 Horas em humanos saudáveis. As fases clínicas da nefropatia são a microalbuminúria, nefropatia clínica (albuminúria) e doença renal de fase termina (ESRD).

Uma forma comum de nefropatia é a nefropatia diabética. A nefropatia diabética desenvolve-se em 35 a 40% de doentes com diabetes *mellitus* do tipo 1 e em 10 a 60% dos doentes com diabetes *mellitus* do tipo 2, dependendo do conjunto étnico a ser estudado e é a causa mais comum da doença renal em fase terminal nos Estados Unidos. É aceite que a nefropatia diabética é o resultado de hiperglicemia, quer individualmente ou em combinação com outros factores, tais como hipertensão e susceptibilidade genética a doença renal. A terapia anti-hipertensiva apropriada tem demonstrado reduzir, significativamente, a mortalidade renal e, possivelmente, a cardiovascular em doentes com diabetes *mellitus* do tipo 1 proteinúricos, bem como retardar a taxa de declínio da taxa de filtração glomerular em alguns doentes com função renal insuficiente (Lewis *et al.*, N. Engl. J. Med. 1993, 329, 1456-1462). Assim, o cuidado convencional para doentes com nefropatia diabética é o controlo glicémico intensivo e normalização da pressão sanguínea, utilizando, inicialmente, inibidores da enzima de conversão da angiotensina (ACE), tais como o ramipril.

Alguns inibidores da vasopectidase demonstraram exibir um efeito neuroprotector superior aos inibidores da ACE isolados (Molinaro *et al.*, Curr. Opin. Pharmacol. 2002, 2, 131-141), tal como o omapatrilat, como um dos inibidores da vasopectidase desenvolvidos mais recentemente e mais exaustivamente estudados. Chen *et al.* (Hypertension 2001, 38, 187-191) definiram a acção renal do tratamento agudo com omapatrilat e o inibidor de ACE fosinoprilat, em que o omapatrilat tem uma resposta natriurética superior ao inibidor de ACE. Noutro estudo, o inibidor da vasopectidase CGS 30440 (Novartis, Suíça) tem um efeito

protector renal superior ao inibidor de ACE, benazepril (Cohen *et al.*, J. Cardiovasc. Pharmacol. 1998, 32, 87-95).

Foi agora demonstrado que os inibidores da vasopectidase de fórmula (I) têm um efeito neuroprotector superior na taxa de excreção da albumina e são, deste modo, úteis para o tratamento e/ou prevenção da nefropatia em doentes diabéticos e não diabéticos, incluindo nefropatia diabética, glomerulonefrite, esclerose glomerular, síndrome nefrótica, nefroesclerose hipertensiva, microalbuminúria e doença renal em fase terminal.

O efeito do composto (II-B) é 6-8 vezes superior ao observado com o inibidor de ACE ramipril.

Exemplo 1: Diminuição da proteinúria através do tratamento com um composto de fórmula (II-B)

Foi determinada a excreção da proteína e creatinina na urina de Ratos ZDF machos (ZDF Gmi fa/fa) e animais de controlo heterozigóticos (ZDF Gmi -/+) com 10, 17, 27 e 37 semanas de idade. Em grupos posteriores, foi administrado cronicamente aos ratos diabéticos quer ramipril (1 mg/kg/dia, água para beber) ou um composto de fórmula (II-B) (30 mg/kg/dia, alimentado) durante um período de 10 a 37 semanas. Os animais foram sacrificados após 37 semanas e os seus rins foram examinados histologicamente.

Tabela 1: Excreção urinária de albumina e creatinina em ratos obesos, magros, tratados com ramipril e com um composto de fórmula (II-B)

	Albumina				Albumina/Creatinina			
Excreção urinária	mg/kg/h				Mg/mmol			
Semanas	0	7	17	27	0	7	17	27
Grupo 1 Obeso								
Média	0,35	1,78	9,24	14,23	55,27	404,78	975,60	1543,25
S	0,24	1,09	6,70	7,69	41,58	349,65	714,38	819,04
SEM	0,06	0,28	2,02	2,32	10,74	90,28	215,40	246,95
N	15	15	11	11	15	15	11	11
Grupo 2 Magro								
Média	0,121	0,090	0,070	0,079	12,828	9,573	5,754	7,313
S	0,041	0,069	0,033	0,051	4,206	6,010	2,772	4,541
SEM	0,009	0,015	0,008	0,014	0,940	1,344	0,693	1,260
N	20	20	16	13	20	20	16	13
Teste t	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Grupo 4 Ramipril								
Média	0,24	1,36	6,26	10,11	37,31	207,35	694,20	1077,88
s	0,12	1,28	4,71	7,20	17,20	198,42	510,20	742,86
SEM	0,03	0,33	1,42	2,17	4,44	51,23	153,83	223,98
N	15	15	11	11	15	15	11	11
Teste t	0,122	0,338	0,242	0,209	0,133	0,067	0,300	0,178
Grupo 7 Cpt (II-B)								
Média	0,27	0,09	0,41	1,39	48,56	14,30	44,63	152,71
s	0,18	0,04	0,18	1,67	28,69	5,38	16,47	174,93
SEM	0,05	0,01	0,05	0,50	7,41	1,39	4,97	52,74
N	15	15	11	11	15	15	11	11
Teste t	0,293	0,000	0,000	0,000	0,611	0,000	0,000	0,000

Resultados histológicos:

Nas tabelas anexas é apresentado um sumário das observações nos rins após um período de tratamento de 6 meses.

Os grupos examinados foram:

C1:	Controlo	ratos ZDF magros	
C2:	Controlo	ratos ZDF obesos	
D1:	Ramipril	ratos ZDF obesos	1,0 mg/kg
D4:	cpd. (II-B)	ratos ZDF obesos	30 mg/kg

Observações histopatológicas apresentadas aqui:

-Células Armanni-Ebstein nos túbulos renais indicando uma patologia metabólica diabética.

-Glomeruloesclerose indicando uma lesão crónica nos rins devido a um estado metabólico diabético.

-Atrofia: túbulos lesão degenerativa espontânea comum nos rins.

-Cálculos: túbulos lesão espontânea comum nos rins.

-Dilatação: pélvis lesão espontânea comum nos rins. considerada como sendo uma anomalia do desenvolvimento herdada.

As células Armanni-Ebstein não estavam presentes nos ratos ZDF magros de controlo mas sim em todos os grupos de ratos ZDF obesos tratados.

Não foi observada glomeruloesclerose nos ratos ZDF magros de controlo e também não estavam presentes nos animais tratados com composto (II-B). De modo correspondente, foram observadas lesões degenerativas, atrofia dos túbulos e cálculos tubulares com baixa incidência nestes animais.

Comparando os controlos ZDF obesos em ratos tratados com Ramipril ou MDL 100.240, não se verificaram diferenças na incidência da glomeruloesclerose ou lesões degenerativas associadas. Estes resultados indicam que o tratamento com o composto (II-B) pode prevenir o desenvolvimento de glomeruloesclerose “diabética” e lesões degenerativas associadas. As lesões nos ratos ZDF obesos de controlo foram de gravidade particularmente baixa.

Além disso, verificou-se uma elevada incidência de dilatação pélvica em animais tratados com composto (II-B).

EXPLICAÇÃO DOS CÓDIGOS E SÍMBOLOS

CÓDIGOS E SÍMBOLOS UTILIZADOS AO NÍVEL ANIMAL:

K0 = Grupo de sacrifício terminal

Tabela 2: Observações histológicas:				
NÚMERO DE ANIMAIS COM OBSERVAÇÕES MICROSCÓPICAS POR ÓRGÃO/GRUPO/SEXO				
Estado de Necrópsia: GRUPO DE SACRIFÍCIO TERMINAL (KO)				
SEXO	Machos			
Grupo de Dose	C1	C2	D1	D4
Nº DE ANIMAIS POR GRUPO DE DOSE	12	6	9	9
Rins N° Avaliado	12	6	9	8
- Células Armanni-Ebstein	-	6	7	8
- Glomeruloesclerose	-	6	6	1
- Atrofia: túbulos renais	-	6	9	2
- Cálculos: túbulos renais	1	6	8	3
- Dilatação: pélvis	3	2	5	7
INCIDÊNCIA SUMÁRIA DE CLASSIFICAÇÕES POR ÓRGÃO/GRUPO/SEXO				
Estado de Necrópsia: GRUPO TERMINAL DE SACRIFÍCIO (KO)				
SEXO	Machos			
Grupo De Dose	C1	C2	D1	D4
N° de ANIMAIS POR GRUPO DE DOSE	12	6	9	9
Rins N° Examinado	12	6	9	8
- Células Armanni-Ebstein GRAU 1	-	2	1	
GRAU 2	-	3	6	5
GRAU 3	-	1		3
TOTAL AFECTADO	-	6	7	8
GRAVIDADE MÉDIA	-	1,8	1,9	2,4

(Continuação)

INCIDÊNCIA SUMÁRIA DE CLASSIFICAÇÕES POR ÓRGÃO/GRUPO/SEXO					
Estado de Necrópsia: GRUPO TERMINAL DE SACRIFÍCIO (KO)					
SEXO		Machos			
Grupo De Dose		C1	C2	D1	D4
Nº de ANIMAIS POR GRUPO DE DOSE		12	6	9	9
- Glomeruloesclerose	GRAU 1	-	1	-	1
	GRAU 2	-	3	4	-
	GRAU 3	-	2	2	1
	TOTAL	-	6	6	1
	AFECTADO	-			
	GRAVIDADE	-	2,2	2,3	1,0
	MÉDIA	-			
- Atrofia: túbulos renais	GRAU 1	-	2	4	1
	GRAU 2	-	2	4	-
	GRAU 3	-	1	1	1
	GRAU 4	-	1	-	-
	TOTAL	-	6	9	2
	AFECTADO	-			
	GRAVIDADE	-	2,2	1,7	2,0
	MÉDIA	-			
Cálculos: túbulos renais	GRAU 1	1	1	1	2
	GRAU 2	-	4	7	1
	GRAU 3	-	1	-	-
	TOTAL	1	6	8	3
	AFECTADO	1			
	GRAVIDADE	1,0	2,0	1,9	1,3
	MÉDIA	1,0	2,0	1,9	1,3

(Continuação)

INCIDÊNCIA SUMÁRIA DE CLASSIFICAÇÕES POR ÓRGÃO/GRUPO/SEXO					
Estado de Necrópsia: GRUPO TERMINAL DE SACRIFÍCIO (KO)					
SEXO		Machos			
Grupo De Dose		C1	C2	D1	D4
Nº de ANIMAIS POR GRUPO DE DOSE		12	6	9	9
Dilatação: pélvis	GRAU 2	3	–	1	1
	GRAU 3		1	2	5
	GRAU 4		1	2	1
	TOTAL				
	AFECTADO	3	2	5	7
	GRAVIDADE MÉDIA	2,0	3,5	3,2	3,0

Tabela 3: Excreção urinária da albumina e creatinina em ratos Obesos Diabéticos Zucker (ZDF), tratados com ramipril e ratos tratados com um composto de fórmula (II-B) começando por um animal com 6 meses. Os ratos ZDF são um modelo para a diabetes do Tipo II.

	Albumina/Creatinina		
	Albumina/Creatinina		
	Basal mg/mmol	6 semanas de tratamento	12 semanas de tratamento
Ratos ZDF Placebo			
média	1330,99	1068,25	1193,47
s	797,55	778,81	633,10
SEM	230,23	224,82	182,76
N	12	12	12

(Continuação)

	Albumina/Creatinina		
	Albumina/Creatinina		
	Basal mg/mmol	6 semanas de tratamento	12 semanas de tratamento
Ratos ZDF com Cpt. (II-B)			
Média	1330,99	135,08	100,86
S	797,55	40,28	59,27
SEM	230,23	11,63	17,11
N	12	12	12
Ratos ZDF com Ramipril			
Média	1330,99	1249,59	841,69
s	797,55	1036,03	1124,24
SEM	230,23	299,07	324,54
N	12	12	12

Exemplo 2:

Foi determinada a excreção de albumina e creatinina em ratos Goto-Kakizaki (GK). Os ratos GK são um modelo para a diabetes do Tipo II. Um grupo foi deixado sem tratamento, um foi tratado com inibidor ACE/NEP da fórmula (II-B) e um grupo foi tratado com inibidor ACE ramipril.

Tabela 4: Excreção urinária de albumina e creatinina em ratos GK, tratados com ramipril e ratos tratados com um composto da fórmula (II-B), começando num animal com 6 meses:

	Albumina/Creatinina			
	mg/mmol			
	Basal	6 semanas de tratamento	12 semanas de tratamento	
Ratos GK placebo				
Média	103,95	329,37	1183,19	
S	71,42	230,17	637,71	
SEM	20,62	66,44	184,09	
N	12	12	12	
Ratos GK com Cpt. (II-B)				
Média	103,95	17,70	24,28	
s	71,42	6,01	14,41	
SEM	20,62	1,74	4,16	
N	12	12	12	
Ratos GK com Ramipril				
Média		103,95	161,71	244,89
S		71,42	112,42	146,00
SEM		20,62	32,5	44,0
N		12	12	11

Exemplo 3:

Foi determinada a excreção de albumina e creatinina em ratos Wistar. Um grupo foi deixado não tratado, um foi tratado com o

inibidor de ACE/NEP da fórmula (II-B) e um grupo foi tratado com inibidor de ACE ramipril. Os ratos Wistar são não-diabéticos e desenvolvem proteinúria e lesões estruturais nos rins durante a vida adulta. Os ratos Wistar são, deste modo, um modelo para a nefropatia não diabética.

A Figura 1 mostra a nefropatia não diabética relacionada com a idade em ratos Wistar tratados com placebo (rim de um rato placebo com lesões túbulo-intersticiais moderadas (cálculos proteínicos nos túbulos, infiltração de células inflamatórias, túbulos basofílicos)).

Tabela 5: Excreção urinária de albumina e creatinina em ratos Wistar, ratos tratados com ramipril e tratados com um composto da fórmula (II-B), começando num animal com 6 meses de idade:

	Albumina/Creatinina		
	mg/mmol		
	Basal	6 semanas de tratamento	12 semanas de tratamento
Ratos Wistar com Placebo			
Média	130,45	149,82	290,10
S	285,53	231,12	265,69
SEM	90,29	64,10	73,69
N	10	13	13

(Continuação)

	Albumina/Creatinina		
	mg/mmol		
	Basal	6 semanas de tratamento	12 semanas de tratamento
Ratos Wistar com Cpt. (II-B)			
Média	130,45	18,07	21,21
S	285,53	17,64	29,49
SEM	90,29	4,89	8,18
N	10	13	13
Ratos Wistar com Ramipril			
Média	130,45	184,27	188,40
S	285,53	171,87	146,47
SEM	90,29	49,62	42,28
N	10	12	12

No modelo não diabético, o composto da fórmula (II-B) mostra um efeito nefroprotector significativamente superior ao ramipril, como determinado pela extensão da proteinúria.

DOENÇAS RELACIONADAS COM AGE

A incubação de proteínas ou lípidos com açúcares aldose resulta em glicação não enzimática e oxidação de grupo amino em proteínas para formar aductos *Amadori*. Ao longo do tempo, os aductos sofrem rearranjos adicionais, desidratação e reticulação com outras proteínas para formar complexos conhecidos como

Produtos Finais da Glicosilação Avançada (AGE). A formação de AGE pode também ser descrita como reacções de Maillard. Os factores que promovem a formação de AGE incluem a modificação de proteínas retardada (e. g., como em amiloidoses), acumulação de macromoléculas com um elevado conteúdo em lisina e níveis de glucose no sangue elevados (e. g., como na diabetes) (Hori *et al.*, J. Biol. Chem. 270: 25752-761, (1995)). As AGE têm sido implicadas em vários distúrbios, incluindo complicações associadas com diabetes e envelhecimento normal.

As AGE apresentam ligações específicas e passíveis de saturação aos receptores de superfície celular nas células endoteliais da microvasculatura, monócitos e macrófagos, células do músculo liso, células mesengiais e neurónios. O Receptor para Produtos Finais Glicados Avançados (RAGE) é um membro da superfamília da imunoglobulina das moléculas da superfície das células.

São encontrados níveis aumentados de RAGE em tecidos envelhecidos (Schleicher *et al.*, J. Clin. Invest. 1997, 99, 457-468) e a retina diabética, vasculatura e rim (Schmidt *et al.*, Nature Med. 1995, 1002-1004). A activação de RAGE nos diferentes tecidos e órgãos conduz a várias consequências patofisiológicas. Os RAGE têm sido implicados em várias condições incluindo: inflamação aguda e crónica (Hofmann *et al.*, Cell 1999, 97, 889-901), desenvolvimento de complicações tardias diabéticas, tais como permeabilidade vascular aumentada, nefropatia, aterosclerose e retinopatia por acumulação de AGE nos rins e outros tecidos (Singh *et al.*, Diabetologia 2001, 44, 129-146), bem como na doença de Alzheimer (Yan *et al.*, Nature 1996, 382, 685-691), disfunção eréctil, invasão tumoral e metastases (Taguchi *et al.*, Nature 2000, 405, 354-357).

O inibidor de ACE ramipril é conhecido por influenciar os níveis de soro dos produtos finais da glicação avançada em doentes com risco elevado de doença da artéria coronária: resultados de um estudo de HOPE (B. Kihovd, E.M. Hjerkin, I. Seljeflot, T.J. Berg, A.A. Reikvam).

Foi agora verificado que os compostos de fórmula (I) reduzem significativamente, a acumulação de AGE nos rins e no coração. Deste modo, os compostos da fórmula (I) são úteis para a prevenção e/ou tratamento de doenças metabólicas associadas com produtos finais da glicação avançados, especialmente complicações diabéticas, tais como neuropatia diabética, nefropatia diabética, retinopatia diabética, enfarte do miocárdio, cataratas e cardiomiopatia diabética.

Os valores de AGE no rim foram determinados por análise de transferência por gota (Stracke et al., Exp. Clin. Endocrinol. Diabets 2002, 109, 330-336) e cromatografia líquida de elevado desempenho de fase reversa ou RP-HPLC (Drusch et al., Food Chem. 1999, 65, 547-553).

O tratamento de ratos diabéticos com um composto da fórmula (II-B) normaliza os valores de AGE nos rins (CML), o tratamento com M100.240 diminui o valor de CML significativamente.

Exemplo 4: Análise transferência por gota

As amostras de rins para a análise dot blot foram obtidas de ratos ZDF machos com 17 semanas de idade, ratos de controlo e ratos ZDF tratados durante sete semanas com 30 mg/kg/d de

composto (II-B) e 35 mg/kg/d de MDL 100.240. Foram sacrificados três animais de cada grupo, os rins foram removidos e imediatamente congelados em azoto líquido. Foi efectuada a trituração dos rins em azoto líquido utilizando um moinho criogénico (Freezer 6750, C3 Analysetechnik GmbH). Foram dissolvidas 10 mg de amostra de rim em 1 mL de solução salina tamponada com fosfatos (PBS contendo Tween 20 a 0,5 g/L, PMSF a 0,5 mM, 1 µg/mL). A solução foi tratada duas vezes durante cinco segundos com um disruptor de células ultrassónico (45% de potência, Bandolin Sonoplus HD 2070), centrifugada durante 20 minutos a 4000 rpm e o sobrenadante foi utilizado para a análise transferência por gota. A membrana de nitrocelulose foi colocada no dispositivo de transferência por gota e lavada duas vezes com 100 µL de TBS/poço. Para cada amostra, foram diluídas 10 µg de proteína (a concentração proteica das amostras foi determinada com o Ensaio Proteico DC, Bio Rad), em 100 µL de TBS e foram carregadas na membrana de nitrocelulose (Amersham). A membrana foi incubada de um dia para o outro em TBST (Tris a 20 mM, NaCl a 137 mM, Tween 20 a 0,05% v/v) com leite em pó magro a 5%, a 4 °C, e incubado durante 1 hora à temperatura ambiente utilizando a seguinte concentração de anticorpo: 0,25 µg/mL de anti-CML 011 (Biologo), 0,25 µg/mL de anti-CEL (Biologo) e 0,25 µg/mL de anti-pentosidina 012 (Biologo). Após lavagem extensiva em TBST com leite em pó magro a 5%, as membranas foram expostas a anticorpos anti-IgG de murganho marcados com anti-peroxidase alcalina (Dianova), durante uma hora, à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas de novo e expostas ao sistema de detecção de quimiofluorescência melhorado (Amersham), de acordo com instruções do fabricante. A fluorescência relativa foi determinada com o Fluor-Imager 595 (Molecular Dynamics) e quantificada utilizando o software Image

Quant. Os resultados foram expressos em fluorescência relativa (rf) vezes 10^5 .

Tabela 6: Valores de CML do subtipo AGE em rins de ratos ZDF com 17 semanas de idade, ratos de controlo e ratos ZDF tratados com composto (II-B) ou MDL 100.240.

rins de ratos com 17 semanas de idade com anti-CML 011	n	Média de rf * 10^5	SEM de rf * 10^5	Teste de t	sign .
Controlo magro	3	32,20	1,22		
Ratos ZDF	3	45,14	3,23	0,0199	*
ZDF com cpt. (II-B)	3	32,62	0,34	0,0182	*
ZDF com MDL 100.240	3	38,67	1,38	0,1389	

Tabela 7: Valores de CEL do subtipo AGE nos rins de ratos ZDF com 17 semanas de idade, ratos de controlo e ratos ZDF tratados com um composto de fórmula (II-B) ou MDL 100.240.

rins de ratos com 17 semanas de idade com anti-CEL	n	Média de rf * 10^5	SEM de rf * 10^5
Controlo magro	3	54,49	2,55
Ratos ZDF	3	61,30	1,12
ZDF com cpt. (II-B)	3	50,24	0,46
ZDF com MPL 100.240	3	52,60	1,16

Tabela 8 Valores da pentosidina do subtipo AGE no rim de Ratos ZDF com 17 semanas de idade, ratos de controlo e Ratos ZDF tratados com composto (II-B) ou MDL 100.240.

rins de ratos com 17 semanas de idade com anti-pentosidina 012	n	Média de rf * 10 ⁵	SEM de rf * 10 ⁵
Controlo magro	3	52,78	1,65
Ratos ZDF	3	56,01	1,24
ZDF com cpt. (II-B)	3	44,99	1,61
ZDF com MDL 100.240	3	40,70	2,75

Os valores de CML do subtipo AGE são significativamente superiores nos rins de Ratos ZDF comparativamente com ratos de controlo ($P < 0,05$). Não poderão ser apresentadas diferenças significativas entre os ratos ZDF e de controlo para CEL subtipo AGE e pentosidina. Os ratos ZDF tratados com um composto de fórmula (II-B) mostraram valores de AGE significativamente inferiores para CML do subtipo AGE, CEL e pentosidina ($P < 0,05$) comparativamente aos ratos ZDF não tratados. Podem também ser determinados valores de AGE inferiores para os subtipos CEL e pentosidina nos ratos ZDF tratados com MDL 100.240 ($P < 0,01$).

Exemplo 5: Cromatografia líquida de elevado desempenho de fase reversa (RP-HPLC)

As amostras de rins e corações para as análises de RP-HPLC foram obtidas de ratos ZDF machos com 17 semanas de idade, ratos de controlo e ratos ZDF tratados durante sete semanas com 30 mg/kg/d de composto da fórmula (II-B) e 35 mg/kg/d de MDL 100.240. Foram analisados dois animais de cada grupo. Foi efectuada a trituração dos rins e corações em azoto líquido

utilizando um moinho criogénico (Freezer 6750, C3 Analysetechnik GmbH). Foi efectuada a hidrólise das amostras dos órgãos com ácido clorídrico 6 M (HCl), a 110 °C, durante 12 horas. Foi efectuada a derivatização da amostra com o-Ftaldialdeído (OPA) e foram submetidas a RP-HPLC, como descrito em Drusch *et al.*, Food Chem. 1999, 65, 547-553.

Tabela 9: Valores de CML do subtipo AGE nos rins de ratos ZDF com 17 semanas de idade, ratos de controlo e ou ratos ZDF tratados com um composto da fórmula (II-B) com MDL 100.240.

rins de ratos com 17 semanas de idade submetidos a RP-HPLC	n [animais]	Média conc. de CML [%]	SEM [%]
ZDF Placebo	2	100	0,27
Controlo magro	2	84	1,19
Cpt. (II-B)	2	55	3,83
MDL 100.240	2	60	10,15

Tabela 10: Valores de CML do subtipo AGE no rim de ratos ZDF com 37 semanas de idade, ratos de controlo e ratos ZDF tratados com um composto da fórmula (II-B) ou MDL 100.240. Valores com $P < 0,05$ foram considerados significativos (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

rins de ratos com 37 semanas de idade submetidos a RP-HPLC	n [animais]	Média conc. de CML [%]	SEM [%]	Teste de t	sign.
ZDF Placebo	2	100	2,00	0,010	*
Controlo magro	2	79	0,17		
ZDF com cpt. (II-B)	2	58	4,46	0,014	*
ZDF com MDL 100.240	2	93	4,77	0,298	

Tabela 11: Valores de CML do subtipo AGE no coração de ratos ZDF com 17 semanas de idade, ratos de controlo e ratos ZDF tratados com um composto da fórmula (II-B) ou MDL 100.240. Os valores com $P < 0,05$ foram considerados significativos (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

corações de ratos ZDF com 17 semanas de idade submetidos a RP-HPLC	n [animais]	Média conc. de CML [%]	SEM [%]	teste de t	sign.
ZDF Placebo	2	100	3,74	0,015	*
Controlo magro	2	32	7,28		
ZDF com cpt. (II-B)	2	26	10,95	0,025	*
ZDF com MDL 100.240	2	66	3,29	0,022	*

Os ratos ZDF apresentaram uma concentração de CML significativamente superior nos rins de ratos com 17 e 37 semanas de idade e nos corações de ratos com 17 semanas de idade comparativamente aos ratos de controlo ($P < 0,05$). O tratamento com um composto da fórmula (II-B) reduz a concentração de CML nos rins de ratos ZDF com 17 e 37 semanas de idade, bem como a concentração de CML nos corações de ratos ZDF com 17 semanas de idade. O MDL 100.240 reduz, também, a concentração de CML nos rins e corações de ratos ZDF com 17 semanas de idade, mas não nos rins de ratos ZDF com 37 semanas de idade.

RESISTÊNCIA À INSULINA

Os compostos da fórmula (I) apresentaram também actividade de sensibilidade à insulina. A acção profiláctica dos compostos

da fórmula (I) após nefropatia é também indicativa que se pode esperar que um agente de sensibilidade à insulina previna, reverta, estabilize ou retarde a progressão da microalbuminúria em albuminúria. Isto é porque a microalbuminúria é considerada como uma previsão de futura nefropatia, especialmente em doentes com evidência clínica de síndrome de resistência à insulina pré-diabética, alternativamente referida como Síndrome X.

A utilização de ACE ou inibidores da vasopectidase para o tratamento da resistência à insulina não foi avaliada até agora.

Verificou-se agora que os compostos de fórmula (I) diminuem significativamente as concentrações de glucose no sangue e os valores de HbA_{1c} e, deste modo, reduzem a resistência à insulina. O HbA_{1c} é uma medida para valores de glucose ao longo do tempo. O HbA_{1c} glicatado é um AGE inicial, denominado um produto *Amadori*.

O efeito de um composto da fórmula (II-B) sobre o valor de HbA_{1c} e glucose no sangue é semelhante ao M100.240 e ambos os compostos mostram valores baixos relativamente ao inibidor de ACE ramipril.

Exemplo 6: Análise de glucose no sangue e HbA_{1c} em ratos ZDF

Foi determinada a glucose no sangue e HbA_{1c} em ratos obesos diabéticos Zucker machos com dez e dezassete semanas de idade (Genetic Model Inc.), ratos de controlo (Genetic Model Inc.) e ratos ZDF machos tratados durante sete semanas com 30 mg/kg/d de composto da fórmula (II-B), 35 mg/kg/d de MDL 100.240 e

1 mg/kg/d de Ramipril. Foram analisados quinze animais em cada grupo.

As amostras de sangue para a determinação da glucose foram obtidas de ratos ZDF, utilizando tubos de amostra convencionais. Após 30 minutos da recolha, as células das amostras foram separadas por centrifugação. Foi efectuada a determinação quantitativa da glucose no soro do sangue com um teste enzimático *in vitro* da Roche Diagnostics GmbH (Gluco-quant, Roche Diagnostics GmbH), utilizando o analisador automatizado de química clínica da Boehringer Mannheim/Hitachi 912.

Para obter as amostras de sangue para a determinação de HbA_{1c}, foram utilizados tubos de capilaridade descartáveis. Os valores de HbA_{1c} foram obtidos de amostras de sangue total hemolizado com um imunoensaio de inibição turbidimétrico (Tina-quant, Roche Diagnostics GmbH) e as concentrações de hemoglobina foram determinadas num segundo canal num analisador automatizado de química clínica (Boehringer Mannheim/Hitachi 912). A concentração de HbA_{1c} em percentagem foi calculada de HbA_{1c} até à hemoglobina total.

Tabela 12: Concentração de glucose no sangue em ratos ZDF com 10 e 17 semanas de idade, ratos de controlo e ratos ZDF tratados com composto (II-B), MDL 100.240 e Ramipril.

sangue Glucose no sangue	ratos ZDF		controle		ZDF com Cpt. (II-B)		ZDF com Ramipril		ZDF com MDL100.240	
idade [semanas]	10	17	10	17	10	17	10	17	10	17
média [mM]	11,92	29,68	7,32	8,04	10,67	21,09	11,74	27,33	10,37	19,74
SEM [mM]	1,74	1,32	0,15	0,34	1,49	2,78	1,48	1,75	1,40	2,10
n [animais]	15	15	20	20	15	15	15	15	15	15

Tabela 13: Valores de HbA_{1c} em ratos ZDF com 10 e 17 semanas de idade, ratos de controle e ratos ZDF tratados com composto (II-B), com MDL 100.240 e Ramipril.

HbA _{1c}	Ratos ZDF		controle		ZDF com Cpt. (II-B)		ZDF com Ramipril		ZDF com MDL 100.240	
idade [semanas]	10	17	10	17	10	17	10	17	10	17
média [%]	6,14	9,96	4,49	4,62	5,69	8,24	5,66	9,48	5,60	7,19
SD [%]	0,22	0,42	0,02	0,02	0,16	0,71	0,14	0,52	0,15	0,46
n [animais]	15	15	20	20	14	15	15	15	15	15

A concentração de glucose no sangue e valores de HbA_{1c} são significativamente inferiores nos animais de controle comparativamente aos ratos ZDF ($P < 0,01$). Os ratos ZDF machos com 17 semanas de idade tratados com MDL 100.240 ou composto (II-B), apresentaram, também, uma concentração de glucose e valores de HbA_{1c} no sangue significativamente inferiores, comparativamente aos ratos ZDF não tratados. Não pode ser observada diferença significativa para a glucose ou HbA_{1c} no sangue em ratos ZDF com

17 semanas de idade tratados com Ramipril comparativamente aos ratos ZDF não tratados.

DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E PLACAS ATEROESCLERÓTICAS

No modelo com coelho aterogénico (os coelhos brancos da Nova Zelândia foram alimentados com colesterol a 0,25% mais óleo de coco a 3%), foi demonstrado que mesmo durante um pequeno período de 6 semanas com dieta aterogénica conduziu a disfunção endotelial sustida, embora, depois, os animais tenham recebido, durante 3 meses, uma dieta normal. Em todas as experiências já conhecidas, os animais foram alimentados durante todo o período de tempo com uma dieta aterogénica e tinham níveis de colesterol extremamente elevados não fisiológicos, não comparáveis com a situação em humanos.

A disfunção endotelial, bem como as alterações aterogénicas nos vasos sanguíneos, foram ambas prevenidas e revertidas pelo tratamento com o inibidor de ACE/NEP do composto da fórmula (II-B), investigado pela primeira vez e demonstrado em comparação directa com o inibidor de ACE ramipril. Como determinado para a disfunção endotelial, serviu o relaxamento dependente do endotélio em anéis aórticos isolados em coelhos, bem como o óxido nítrico e libertação da superóxido das células endoteliais.

Exemplo 7: Efeitos do tratamento de longo termo com o inibidor de ACE/NEP do composto da fórmula (II-B) na disfunção endotelial e placas ateroscleróticas em coelhos alimentados com uma dieta aterogénica.

Grupos:

Padrão: 18 semanas de dieta normal

Aterogénica: 18 semanas de dieta aterogénica (óleo de coco a 3% + Colesterol a 0,25%)

Dieta variada (Var.): 6 semanas de dieta aterogénica + 12 semanas de dieta normal

Dieta variada + Ramipril: 6 semanas de dieta aterogénica + 12 semanas de dieta normal + Ramipril

Dieta variada + composto (II-B): 6 semanas de dieta aterogénica + 12 semanas de dieta normal + cpt. (II-B)

Tabela 14: Relaxamento dos anéis aórticos pela acetilcolina (ACh) em 4 incrementos na concentração (10^{-8} mol/L, 10^{-7} mol/L, 10^{-6} mol/L e 10^{-5} mol/L) após estimulação precedente pela fenilefrina (10^{-7} mol/L) (dados em % $\bar{x} \pm \text{SEM}$)

Grupos ACh	10^{-8} mol/L	10^{-7} mol/L	10^{-6} mol/L	10^{-5} mol/L
Dieta Normal	11,65 ± 1,55	52,68 ± 3,06	75,64 ± 2,83	83,81 ± 3,3
Dieta Aterogénica	2,18 ± 1,23	7,07 ± 2,76	11,82 ± 3,88	12,49 ± 4,1
		* # °†	* # °†	* # °†
Dieta Var.	10,76 ± 2,29	43,33 ± 3,57	63,48 ± 2,89	69,41 ± 2,82
		t	† # °	† # °
Var. + Ramipril	13,08 ± 2,22	51,86 ± 4,43	77,34 ± 3,7	83,73 ± 4,03
Var. + cpt. (II-B)	19,9 ± 3,48	59,62 ± 6,43	76,4 ± 6,38	80,89 ± 6,82

*:p<0,05 vs. Dieta variada;

#:p<0,05 vs. Dieta normal;

°: p<0,05 vs. Var.+ Ram.

t: p<0,05 vs. Var.+ cpt. (II-B)

Tabela 15: Dados de NO⁻ e Superóxido (O₂⁻) (em nmol/L; $\bar{x} \pm \text{SEM}$)

Grupos	NO (nM)	O ₂ ⁻ (nM)
Dieta Normal	306,71 ± 36,16 *	29,41 ± 5,89
D. Aterogénica	167,77 ± 30,65	52,12 ± 7,06 #
Dieta Var.	174,39 ± 25,44	35,86 ± 7,49
Var. + Ramipril	368,31 ± 42,25 *	48,09 ± 7,91 #
Var + cpt. (II-B)	329,19 ± 30,10 *	30,18 ± 6,00

*:p<0,05 vs. Dieta variada, vs. dieta aterogénica;

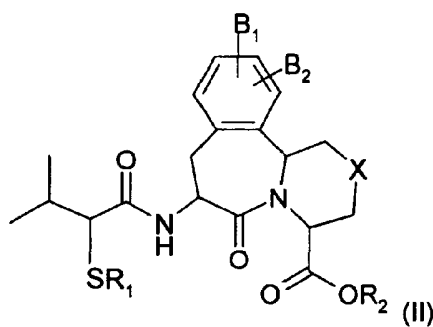
#:p<0,05 vs. Dieta variada, vs. Dieta normal, vs. Dieta variada + cpt. (II-B))

NO e O₂⁻ são marcadores para a função endotelial: relaxamento aumentado e níveis de NO são benéficos, embora a formação de O₂⁻ aumentada iniba os efeitos benéficos do NO.

Lisboa, 9 de Maio de 2012

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um composto de fórmula (II)

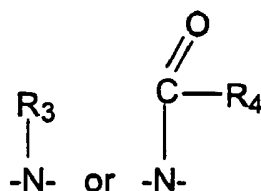


em que

R_1 é hidrogénio, $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ou um grupo acilo;

R_2 é hidrogénio; $-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_3$; um alquilo- $\text{C}_1\text{-C}_4$; arilo, $-(\text{alquil-}\text{C}_1\text{-C}_4)\text{-arilo}$; ou difenilmetilo;

X é $-(\text{CH}_2)_n$ em que n é um número inteiro 0 ou 1, $-\text{S}-$, $-\text{O}-$,

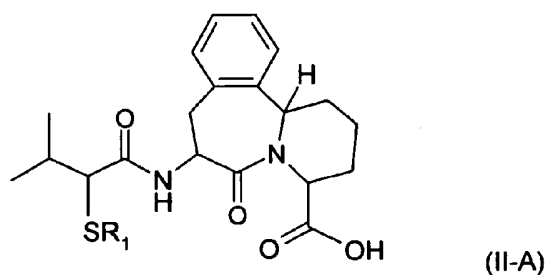


em que R_3 é hidrogénio, um alquilo- $\text{C}_1\text{-C}_4$, arilo ou arilo- $(\text{alquil-}\text{C}_1\text{-C}_4)$ e R_4 é $-\text{CF}_3$, alquilo- $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, arilo ou aril- $(\text{alquil-}\text{C}_1\text{-C}_4)$;

B_1 e B_2 são, cada, independentemente, hidrogénio, hidroxilo, $-OR_5$, em que R_5 é alquilo- C_1-C_4 , arilo ou $-(alquil-C_1-C_4)-arilo$ ou, onde B_1 e B_2 estão ligados aos átomos de carbono adjacentes, B_1 e B_2 podem ser considerados em conjunto com os referidos átomos de carbono adjacentes para formar um anel benzeno ou metilenodioxilo,

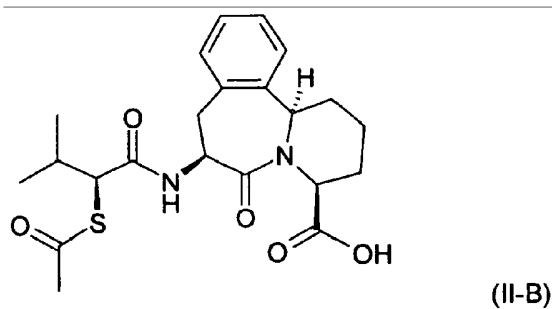
para a preparação de um medicamento para o tratamento e/ou profilaxia da nefropatia em doentes diabéticos.

2. Utilização de um composto de acordo com a reivindicação 1, em que R_1 é acetilo.
3. Utilização de um composto de acordo com a reivindicação 1, em que R_1 é hidrogénio.
4. Utilização de um composto de acordo com a reivindicação 1, em que B_1 e/ou B_2 são hidrogénio.
5. Utilização de um composto de acordo com a reivindicação 1, em que X é $-CH_2$.
6. Utilização de um composto de acordo com a reivindicação 1, em que o composto da fórmula (II) é caracterizado por um composto da fórmula (II-A):

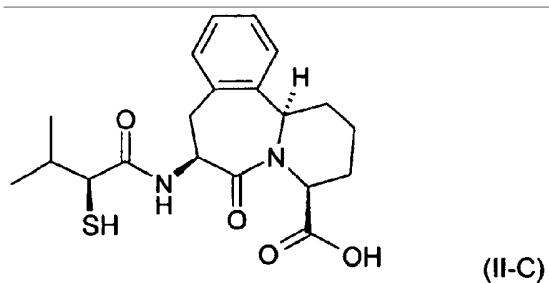


em que R_1 é acetilo ou hidrogénio.

7. Utilização de um composto de acordo com a reivindicação 1, em que o composto da fórmula (II) é caracterizado por um composto da fórmula (II-B)

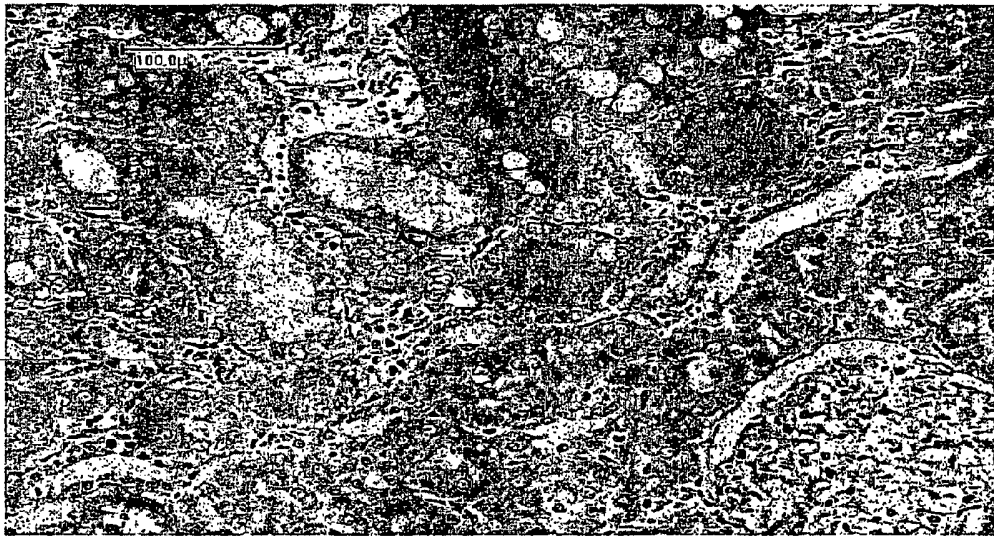


8. Utilização de um composto de acordo com a reivindicação 1, em que o composto de fórmula (II) é caracterizado por um composto de fórmula (II-C)



Lisboa, 9 de Maio de 2012

Figura 1:



Rim de um rato placebo apresentando lesões túbulo-intersticiais moderadas (cálculos proteínicos nos túbulos, infiltração de células inflamatórias, túbulos basofílicos; magn. orig. x 100