

(11) Número de Publicação: **PT 1942895 E**

(51) Classificação Internacional:

**A61K 31/4704** (2011.01) **A61K 31/95**

(2011.01)

**A61P 3/00** (2011.01) **A61P 7/00** (2011.01)

**A61P 9/00** (2011.01)

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

(22) Data de pedido: **2006.09.14**

(30) Prioridade(s): **2005.09.15 US 716954 P**  
**2006.01.25 US 761775 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2008.07.16**

(45) Data e BPI da concessão: **2012.02.01**  
**063/2012**

(73) Titular(es):

**OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.**  
**9, KANDATSUKASA-CHO 2-CHOME CHIYODA-**  
**KU TOKYO 101-8535** KR

(72) Inventor(es):

**WHAN HONG KI** KR  
**TOMOHIRO YOSHIKAWA** JP

(74) Mandatário:

**ELSA MARIA MARTINS BARREIROS AMARAL CANHÃO**  
**RUA DO PATROCÍNIO 94 1399-019 LISBOA** PT

(54) Epígrafe: **FÁRMACO DE COMBINAÇÃO CONTENDO PROBUCOL E UM DERIVADO DE TETRAZOLILALCOXI-DI-HIDROCARBOESTIRILO COM EFEITOS SUPPRESSORES DE SUPERÓXIDO**

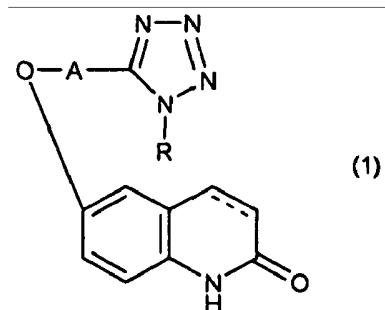
(57) Resumo:

ESTA INVENÇÃO REFERE-SE A UM FÁRMACO DE COMBINAÇÃO COMPREENDENDO UMA COMBINAÇÃO DE UM DERIVADO DE TETRAZOLILALCOXIDI- HIDROCARBOESTIRILO DA FÓRMULA: EM QUE R É CICLOALQUILO, A É ALQUILENO INFERIOR E A LIGAÇÃO ENTRE AS POSIÇÕES 3- E 4- DE NÚCLEO DE CARBOESTIRILO É LIGAÇÃO SIMPLES OU LIGAÇÃO DUPLA, OU UM SEU SAL, E PROBUCOL, QUE É ÚTIL PARA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE ENFARTE CEREBRAL INCLUINDO ENFARTE CEREBRAL AGUDO E ENFARTE CEREBRAL CRÓNICO, ARTERIOSCLEROSE, DOENÇAS RENAIAS (E. G. NEFROPATIA DIABÉTICA, INSUFICIÊNCIA RENAL, NEFRITE) E DIABETES DEVIDO AOS EFEITOS SUPPRESSORES DE SUPERÓXIDO SINERGÍSTICOS DA COMBINAÇÃO.

**RESUMO**

**"FÁRMACO DE COMBINAÇÃO CONTENDO PROBUCOL E UM DERIVADO DE  
TETRAZOLILALCOXI-DI-HIDROCARBOESTIRILO COM EFEITOS SUPPRESSORES  
DE SUPERÓXIDO"**

Esta invenção refere-se a um fármaco de combinação compreendendo uma combinação de um derivado de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo da fórmula:



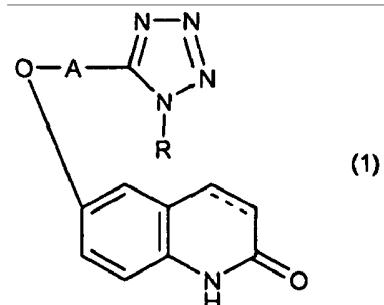
em que R é cicloalquilo, A é alquíleno inferior e a ligação entre as posições 3- e 4- de núcleo de carboestirilo é ligação simples ou ligação dupla, ou um seu sal, e Probucol, que é útil para prevenção e tratamento de enfarte cerebral incluindo enfarte cerebral agudo e enfarte cerebral crónico, arteriosclerose, doenças renais (e. g. nefropatia diabética, insuficiência renal, nefrite) e diabetes devido aos efeitos supressores de superóxido sinergísticos da combinação.

## DESCRIÇÃO

### "FÁRMACO DE COMBINAÇÃO CONTENDO PROBUCOL E UM DERIVADO DE TETRAZOLILALCOXI-DI-HIDROCARBOESTIRILO COM EFEITOS SUPPRESSORES DE SUPERÓXIDO"

#### CAMPO TÉCNICO

Esta invenção refere-se a um fármaco de combinação para utilização no tratamento e prevenção de enfarte cerebral, arteriosclerose, doenças renais ou diabetes, que compreende uma combinação de, pelo menos um, de derivados de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo da fórmula:



em que R é um grupo cicloalquilo, A é um grupo alquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> e a ligação entre as posições 3- e 4- do núcleo de carboestirilo significa uma ligação simples ou uma ligação dupla, ou um seu sal, e Probucol.

O fármaco de combinação da presente invenção é eficaz no enfarte cerebral, arteriosclerose, doenças renais ou diabetes, devido à actividade supressora de superóxido com base nos

efeitos sinérgicos, por combinação do derivado de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo (1) acima e Probucol (= 4,4'-isopropilidenoditiobis[2,6-di-terc-butilfenol]).

#### ANTECEDENTES TÉCNICOS

O enfarte cerebral incluindo enfarte cerebral agudo e enfarte cerebral crónico, também conhecido como acidente vascular cerebral ou também como cerebromalacia, é provocado por interrupção do fornecimento de sangue a uma parte do cérebro devido a oclusão ou coarcação da artéria e/ou veia cerebral, para resultar em necrose das células ou tecido cerebrais. Os seus factores de risco mais importantes são hipertensão, doença cardíaca, diabetes e fumo de cigarros. Para remédio do enfarte cerebral, é importante inibir o desenvolvimento de necrose devido a radicais livres e expansão cerebral e utilizam-se anticoagulantes, agentes trombolíticos, tais como urocinase e activador do plasminogénio tecidual (tPA).

A arteriosclerose, cujo termo é, frequentemente, utilizado em troca com aterosclerose, está nas condições que as paredes das artérias se tornam finas e rígidas e o fluxo sanguíneo para órgãos e tecidos é restrito. Embora a causa seja desconhecida, presume-se que comece com dano ou lesão na camada interna de uma artéria e o dano pode ser provocado por vários factores, incluindo pressão sanguínea elevada, colesterol elevado, um irritante (e. g. nicotina) e determinadas doenças, tais como diabetes. Para o remédio de arteriosclerose, utilizam-se vários fármacos, por exemplo, agentes anticolesterol (e. g. probucol, estatinas, clofibratos), agentes anti-agregantes plaquetários (e. g. aspirina), agentes anti-coagulantes (e. g. heparina,

cumafeno), agentes controladores de pressão sanguínea (e. g. inibidores de enzima conversora de angiotensina (ACE), bloqueadores de canal de cálcio).

As doenças renais, incluindo nefropatia diabética, insuficiência renal e nefrite, são características das alterações funcionais, tais como excesso de filtração glomerular e albuminúria, e das alterações histológicas, tais como esclerose glomerular, devido ao aumento de proteína de matriz extracelular. Considera-se que as doenças renais são provocadas por glicemia elevada constante, metabolismo intracelular anormal, (e. g. aumento da via de poliol e da via de hexosamina e activação de proteína cinase C (PKC)) devido a hiperglicemia, acumulação de produtos finais de glicação avançada (AGE), sobrecarga de pressão devido a hipertensão glomerular ou stress oxidativo aumentado e que as origens mais importantes de doenças renais são stress oxidativo aumentado assim como hiperglicemia, à luz de relatórios em que o oxigénio activo aumenta no metabolismo intracelular anormal ou no processo de formação de AGE (cf. *Nature*, 414, pp. 813-820, 2001) e que todos os aumentos da via de hexosamina, a activação de PKC e aumento dos AGE são inibidos por inibição de excesso de produção de superóxido na mitocôndria (cf. *Nature*, 404, pp. 787-790, 2000).

Sabe-se que a exacerbação de resistência a insulina é um factor importante do início de diabetes, mas a exacerbação de resistência a insulina torna-se não apenas patogénese de sindroma metabólico, tal como diabetes, mas promove também o início e desenvolvimento de doenças cardiovasculares e de doenças renais (cf. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Bio.*, 24, pp. 816-823, 2004) e, assim, considera-se que a melhoria de resistência a insulina é útil para tratamento de diabetes e

complicação diabética. Refere-se também que o stress oxidativo aumentado pode ser um factor importante na indução de resistência a insulina (cf. *Nature*, 440, pp. 944-948, 2006) e, assim, um inibidor de stress oxidativo pode ser útil para a prevenção e tratamento de diabetes e de início e desenvolvimento de doenças renais à luz da actividade de melhoria de resistência a insulina.

Embora a população de doentes diabéticos com doença renal aumente a cada ano, nunca se encontrou uma terapia adequada para tratamento de doenças renais.

Deste modo, sabe-se que o oxigénio é essencial para um organismo vivo de modo a manter a vida, por exemplo, para manter a produção normal de energia e o metabolismo. O oxigénio pode ser alterado para, o assim designado, oxigénio activo no organismo vivo. O oxigénio activo inclui oxigénio radical e oxigénio não radical. Entre o oxigénio activo, num sentido vasto incluindo materiais relacionados com lípidos, o primeiro oxigénio radical inclui um radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), um radical alcoxilo, um radical peroxilo, um radical hidroperoxilo, um monóxido de azoto, um dióxido de azoto, superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), etc. O último grupo de oxigénio não radical inclui um oxigénio singuleto, ozono, peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), um hidroperóxido lipídico, etc.

Como um oxigénio activo que pode ser eficaz em células tecidulares, existem oxigénios radicais de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\cdot\text{OH}$ , e oxigénio não radical de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (cf. *YAKUGAKU ZASSHI* 122(3), pp. 203-218 (2002)). O  $\text{O}_2^{\cdot-}$  produz oxigénio e peróxido de hidrogénio pela acção da superóxido dismutase (SOD) no organismo vivo. O peróxido de hidrogénio é alterado para  $\cdot\text{OH}$  por acção catalítica

de ião ferro, ião cobre incluído nas células. O radical hidroxilo ataca directamente o ADN, proteínas no organismo vivo. Por outro lado, o radical hidroxilo reage com lípidos e é, deste modo, convertido em radical lipídico e produz, então, hidroperóxido lipídico.

Deste modo, estes oxigénios activos, tais como  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que estão relacionados com doenças graves, são provocados, principalmente, por  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e, assim, tem-se procurado encontrar uma substância que seja capaz de suprimir o  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .

Por outro lado, os derivados de carboestirilo são conhecidos por possuírem actividades farmacêuticas, tais como acção inibidora de agregação de plaquetas, acção anti-inflamatória, acção anti-úlcera, acção vasodilatadora e acção inibidora de fosfodiesterase (cf. documento US 4277479). No entanto, os compostos de carboestirilo (assim como Probucol) são também conhecidos por possuírem actividade supressora de oxigénio (cf. documentos US 2004/082608, WO 99/24400 e US 2002/115728). Além disso, Sekiya, M. et al., Am. J. Cardiol. 82(2): 144-147 (1998) divulgam uma composição compreendendo Cilostazol (um derivado de carboestirilo) e Probucol para o tratamento de restenose.

## **DIVULGAÇÃO DA INVENÇÃO**

A presente requerente estudou, intensamente, as actividades farmacológicas de combinação do derivado de tetrazolilalcoxido-hidrocarboestirilo (1), que é conhecido por possuir uma actividade supressora de oxigénio activo, com um agente anti-hiperlipémico conhecido, Probucol, e verificou que a

combinação apresenta excelente actividade antioxidante sinérgica, assim como excelente actividade sinérgica para suprimir o superóxido que provoca enfarte cerebral, arteriosclerose e doenças renais, e apresenta, ainda, melhoria significativa de resistência a insulina e diminui, notavelmente, a excreção urinária de glucose que é um dos indícios para disfunções renais e, depois, verificou que a combinação do derivado de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo (1) e Probucol é eficaz para a prevenção e/ou tratamento de enfarte cerebral, arteriosclerose, doenças renais (e. g. nefropatia diabética, insuficiência renal, nefrite) ou diabetes devido à excelente actividade supressora de superóxido.

Deste modo, um objectivo da invenção é proporcionar um fármaco de combinação, para utilização na prevenção e tratamento de enfarte cerebral, compreendendo um derivado de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo (1) e Probucol.

Outro objectivo da invenção é proporcionar um fármaco de combinação, para utilização na prevenção e tratamento de arteriosclerose, compreendendo um derivado de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo (1) e Probucol.

Um objectivo adicional da invenção é proporcionar um fármaco de combinação, para utilização na prevenção e tratamento de doenças renais, compreendendo um derivado de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo (1) e Probucol.

Um objectivo adicional da invenção é proporcionar um fármaco de combinação, para utilização na prevenção e tratamento de diabetes, compreendendo um derivado de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo (1) e Probucol.

Outro objectivo adicional da invenção é proporcionar um supressor de superóxido melhorado compreendendo uma combinação de um derivado de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo (1) e Probucol.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

A Fig. 1 é um gráfico que mostra a correlação entre a concentração de Cilostazol e a produção de  $O_2^{•-}$  dependente de NAD(P)H na inibição por Cilostazol isolado ou numa combinação de Cilostazol e Probucol na produção de  $O_2^{•-}$  dependente de NAD(P)H.

A Fig. 2 é um gráfico que mostra efeitos inibidores de Cilostazol a 0,3%, isolado, Probucol a 0,1%, isolado ou uma combinação de Cilostazol a 0,3% e Probucol a 0,1% na lesão aterosclerótica em murganhos com receptor de lipoproteína de baixa densidade inactivado, alimentados com colesterol elevado.

A Fig. 3 é um gráfico que mostra efeitos inibidores de Cilostazol a 0,3%, isolado, Probucol a 0,5%, isolado ou uma combinação de Cilostazol a 0,3% e Probucol a 0,5 % na lesão aterosclerótica, em murganhos com receptor de lipoproteína de baixa densidade inactivado, alimentados com colesterol elevado.

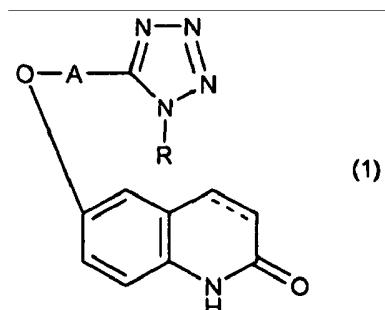
A Fig. 4 é um gráfico que mostra os efeitos de Probucol e Cilostazol isolados e de uma combinação de Probucol e Cilostazol contra a lesão isquémica cerebral focal em ratos.

A Fig. 5 é um gráfico que mostra os efeitos de Probucol e Cilostazol isolados e de uma combinação de Probucol e Cilostazol contra a excreção urinária de glucose em ratos.

A Fig. 6 é um gráfico que mostra os efeitos de Probucol e Cilostazol isolados e de uma combinação de Probucol e Cilostazol contra a resistência a insulina em ratos.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O derivado de carboestirilo a incluir como um componente do fármaco de combinação da presente invenção são derivados de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo da fórmula:



em que R é um grupo cicloalquilo, A é um grupo alquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> e a ligação entre as posições 3- e 4- do núcleo de carboestirilo significa uma ligação simples ou uma ligação dupla, ou um seu sal.

Na fórmula (1) acima, o grupo cicloalquilo inclui grupos cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, tais como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclo-hexilo, ciclo-heptilo e ciclo-octilo. Um preferido é ciclo-hexilo. Os grupos alquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> incluem

metileno, etileno, propileno, tetrametileno, butireno e pentileno, entre os quais um preferido é o tetrametileno.

O derivado de carboestirilo preferido é 6-[4-(1-ciclohexil-1H-tetrazol-5-il)butoxi]-3,4-di-hidrocarboestirilo, que foi colocado no mercado com a marca Cilostazol como um agente anti-agregante plaquetário.

Estes derivados de carboestirilo (1) e seus sais, e um processo para a sua preparação são divulgados na Patente U.S. 4277479. É também divulgado na Patente U.S. 6743806 que os derivados de carboestirilo (1) possuem uma actividade supressora de oxigénio activo.

Outro ingrediente activo, Probucol, é um composto possuindo um nome químico de 4,4'-isopropilidenoditiobis[2,6-di-terc-butilfenol] e foi também colocado no mercado como um agente anti-hiperlipidémico. Sabe-se também que este composto possui uma actividade inibidora de produção de LDL (lipoproteína de baixa densidade) oxidada (cf. J. Clin. Invest., 77, p.641, 1986)

Estes ingredientes activos, um derivado de carboestirilo (1) e Probucol, podem ser administrados em conjunto ou separadamente, ao mesmo tempo ou em tempos diferentes. Estes ingredientes podem, normalmente, ser utilizados numa formulação farmacêutica convencional. Depois, estes ingredientes podem ser preparados na formulação farmacêutica numa forma de dosagem única ou em formas de dosagem separadas.

As formas de dosagem não são especificadas mas podem ser quaisquer formulações farmacêuticas convencionais, por exemplo,

preparações para administração oral, tais como comprimidos, cápsulas, grânulos, várias preparações líquidas adequadas para administração oral ou preparações para administração parentérica, tais como injecções, supositórios.

A dose destes ingredientes activos não está limitada a uma gama específica. Os derivados de carboestirilo (1) ou um seu sal, podem ser utilizados numa quantidade de 50 a 200 mg/dia em adulto (50 kg de peso corporal), que é administrada uma vez por dia ou dividindo em duas ou várias vezes por dia. O probucol pode ser utilizado numa quantidade de 100 a 1000 mg/dia em adulto (50 kg de peso corporal), que pode ser administrado numa vez mas pode, de um modo preferido, ser administrado dividindo a dose diária em duas ou várias vezes por dia. Quando estes ingredientes são preparados numa forma de dosagem única, são incorporados numa razão de 0,25 a 10 partes em peso de Probucol por 1 parte em peso do derivado de carboestirilo (1) ou um seu sal.

As preparações, tais como comprimidos, cápsulas, líquido para administração oral, podem ser preparados por um método convencional. Os comprimidos podem ser preparados misturando o(s) ingrediente(s) activo(s) com veículos farmacêuticos convencionais, tais como gelatina, amidos, lactose, estearato de magnésio, talco, goma arábica e semelhantes. As cápsulas podem ser preparadas misturando com enchimentos ou diluentes farmacêuticos inertes numa cápsula dura de gelatina ou numa cápsula mole. As preparações líquidas orais, tais como xaropes ou elixires, são preparadas misturando o(s) ingrediente(s) activo(s) e edulcorantes (e. g. sacarose), conservantes (e. g. metilparabeno, propilparabeno), corantes, aromatizantes e semelhantes. As preparações para administração parentérica podem

também ser preparadas por um método convencional, por exemplo, dissolvendo o(s) ingrediente(s) activo(s) da presente invenção num veículo aquoso esterilizado, de um modo preferido, água ou uma solução salina. A preparação líquida preferida adequada para administração parentérica é preparada dissolvendo a dose diária dos ingredientes activos, como acima mencionados, em água e num solvente orgânico e ainda num polietilenoglicol possuindo um peso molecular de 300 a 5000, que é, de um modo preferido, incorporado com um lubrificante, tal como carboximetilcelulose sódica, metilcelulose, polivinilpirrolidona e álcool polivinílico. As preparações líquidas acima podem, de um modo preferido, ser ainda incorporadas com um desinfectante (e. g. álcool benzílico, fenol, timerosal), um fungicida e ainda, opcionalmente, com um agente isotónico (e. g. sacarose, cloreto de sódio), um anestésico tópico, um estabilizante, um tampão e semelhantes. De modo a manter a estabilidade, a preparação para administração parentérica pode ser cheia numa cápsula, seguida por remoção do meio aquoso por uma técnica de liofilização convencional e, quando utilizada, é recuperada numa preparação líquida dissolvendo-se num meio aquoso.

De acordo com a presente invenção, combinando o derivado de carboestirilo (1), particularmente 6-[4-(1-ciclo-hexil-1H-tetrazol-5-il)butoxi]-3,4-di-hidrocarboestirilo ou um seu sal, com Probucol, estes são eficazes em enfarte cerebral, arteriosclerose, doenças renais (e. g. nefropatia diabética, insuficiência renal, nefrite) ou diabetes.

Um dos mecanismos de exibir esses efeitos pode dever-se à excelente actividade supressora de superóxido, isto é, estes apresentam excelente actividade antioxidante sinérgica e efeitos supressores de superóxido sinergísticos, pelos quais as células

tecidulares afectadas por superóxido são eficazmente removidas. Além disso, suprimindo o superóxido, resulta também na inibição de produção de  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que são derivados do superóxido. O fármaco de combinação da presente invenção pode também inibir a produção de oxigénios activos, tais como  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que são a principal causa de doenças graves. Sabe-se que o superóxido provoca enfarte cerebral (e. g. enfarte cerebral agudo, enfarte cerebral crónico), arteriosclerose, doenças renais (e. g. nefropatia diabética, insuficiência renal, nefrite) (cf. *Antioxidants & Redox Signaling*, 5, 2003, pp. 597-607, que divulga a participação de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  em enfarte cerebral; *Circ. Res.*, 86, 2000, pp. 494-501, que divulga que a NAD(P)H oxidase produz  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e participa em doenças do sistema circulatório, tal como arteriosclerose; *Eur. J. Pharmacol.*, 450, 2002, pp. 67-76, que divulga a participação de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  em doenças renais).

Deste modo, por efeitos supressores de superóxido sinergísticos, a combinação do derivado de carboestirilo (1) e de Probucol da presente invenção pode apresentar os efeitos pretendidos para prevenção e tratamento de enfarte cerebral, arteriosclerose, doenças renais (e. g. nefropatia diabética, insuficiência renal, nefrite) ou diabetes.

## **EXEMPLOS**

A presente invenção é ilustrada pelos seguintes exemplos de preparação e experiências de actividade supressora de superóxido do agente da presente invenção, mas não deve ser interpretada para ser limitada a estes.

## Preparação 1

Preparação de comprimidos:

<u>Componentes</u>	<u>Quantidade (g)</u>
6-[4-(1-Ciclo-hexil-1H-tetrazol-5-il)butoxi]-3,4-di-hidrocarboestirilo	100
Probucol	250
Lactose (Farmacopeia Japonesa)	40
Amido de milho (Farmacopeia Japonesa)	40
Celulose cristalina (Farmacopeia Japonesa)	20
Hidroxipropilcelulose (Farmacopeia Japonesa)	4
Estearato de magnésio (Farmacopeia Japonesa)	2

Os ingredientes activos acima, da presente invenção, lactose, amido de milho e celulose cristalina são bem misturados e a mistura é granulada com solução aquosa de hidroxipropilcelulose a 5%, e a mistura granulada é peneirada com um crivo de 200 mesh para secar, cuidadosamente, os grânulos e, em seguida, os grânulos formam comprimidos por um método convencional para obter comprimidos (1000 comprimidos).

## Experiências Farmacológicas

### Experiência 1

Inibição Sinérgica por Combinação de Cilostazol e Probucol na produção de  $O_2^{•-}$  dependente de NAD(P)H a partir de Células Endoteliais Vasculares Humanas

(1) Materiais e Métodos:

Culturas celulares: cultivaram-se HCAEC (Células endoteliais de artéria coronária humana) na célula endotelial basal média-2 (EGM-2). Kit Bullet. Cresceram-se células para confluírem a 37 °C em CO<sub>2</sub> a 5% e utilizaram-se para experiências em não mais do que 6 passagens.

Os materiais de teste foram (1) Cilostazol isolado (n=4), (2) Probucol isolado (n=4), (3) uma mistura de Cilostazol com Probucol (n=4): as concentrações finais para Cilostazol foram 0,3, 1,0 e 3,0 µM e Probucol 0,01, 0,03 e 0,1 µM, que foram correspondentes à razão de Cilostazol e Probucol entre 3:1 e 300:1, em peso molecular.

(2) Medição de Superóxido:

Dissolveram-se Cilostazol e Probucol em dimetilsulfóxido como soluções stock 10 mM. Imediatamente após a adição de Cilostazol e/ou Probucol nas concentrações finais de 0, 0,3, 1,0, 3,0 µM e 0, 0,01, 0,03, 0,1 µM, respectivamente, no meio de cultura, adicionou-se TNF-α (50 ng/mL) e incubaram-se as HCAEC durante 4 horas. Após as células serem expostas ao TNF-α, colocaram-se homogenatos endoteliais no luminômetro (Microlumat LB96P, EG & G Berthold). Imediatamente antes de registrar a quimioluminescência, adicionaram-se NADH e NADPH (concentração final, 100 µM, cada) e adicionou-se lucigenina adaptada ao escuro (nitrato de bis-N-metilacridinio, 5 µM) através de um autodispensador. Registrou-se a intensidade de quimioluminescência a cada 30 segundos durante 15 minutos e subtraiu-se o respectivo ruído de fundo. A quimioluminescência

foi expressa como contagens por segundo por miligrama de proteína.

A análise estatística foi feita do seguinte modo.

1) Os efeitos em Cilostazol isolado ou Probucol isolado foram comparados com os efeitos da sua combinação pelo teste de Dunnett.

2) De modo a avaliar os efeitos sinérgicos da sua combinação, realizou-se análise de variância com dois factores (ANOVA com dois factores) entre o Controlo, Cilostazol isolado, Probucol isolado e a combinação.

Todos os testes foram feitos por teste bilateral com nível de significância de 5%, por meio de Software SAS (SAS Institute Japan, R8.1).

### (3) Resultados:

Os resultados são mostrados na Fig. 1 anexa. Na Fig. 1, o eixo longitudinal significa produção de  $O_2^-$  dependente de NAD(P)H (% de Controlo) e o eixo das abcissas significa concentração de Cilostazol ( $\mu M$ ) e a linha com uma marca de losango significa os dados de Cilostazol isolado, i. e. no Probucol (P0), a linha com uma marca de quadrado significa os dados de uma mistura de Cilostazol com Probucol numa quantidade de 0,01  $\mu M$ , a linha com uma marca de triângulo significa os dados de uma mistura de Cilostazol com Probucol numa quantidade de 0,03  $\mu M$  e a linha com uma marca "x" significa os dados de uma mistura de Cilostazol com Probucol numa quantidade de 0,1  $\mu M$ .

Como se observa na Fig. 1, quando se utilizou Cilostazol em combinação com Probucol, a produção de  $O_2^{•-}$  foi significativamente inibida em comparação com o Cilostazol isolado. Além disso, o efeito supressor foi significativamente potenciado pela combinação de Cilostazol 3  $\mu M$  e Probucol 0,1  $\mu M$  ( $p=0,0322$  por ANOVA com dois factores).

## Experiência 2

Efeitos de Cilostazol e Probucol Isolado e em Combinação na Aterosclerose em Murganhos com Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade Inactivado, Alimentados com Colesterol Elevado.

### (1) Materiais e Métodos:

Utilizaram-se murganhos (J. Clin. Invest. 1993; 92: 883-893) (machos, 9 semanas de idade, que foram preparados e mantidos por Otsuka Pharmaceutical Co, Ltd.) com receptor de lipoproteína de baixa densidade inactivado (LDLR-KO). Os animais foram tratados agrupando-os nos seis grupos seguintes.

- 1) Grupo de controlo (n=13)
- 2) Grupo administrado com Cilostazol a 0,3% (n=14)
- 3) Grupo administrado com Probucol a 0,1% (n= 14)
- 4) Grupo administrado com Probucol a 0,5% (n=14)
- 5) Grupo administrado com Cilostazol a 0,3% + Probucol a 0,1% (n=14)
- 6) Grupo administrado com Cilostazol a 0,3% + Probucol a 0,5% (n=14)

Antes de iniciar a experiência, mediram-se o peso corporal dos animais e o colesterol total e, como base em ambos os dados, dividiram-se os animais em seis grupos aleatórios por métodos de randomização estratificada (Software SAS, R8.1). As doses de Probucol e Cilostazol foram determinadas com base nos relatórios (Horm. Metab. Res. 2001; 33: 472-479 e J. Pharmacol. Exp. Ther. 2005; 313: 502-509), respectivamente. No grupo de controlo, os murganhos foram administrados com uma dieta rica em gordura [*i. e.* uma ração convencional (CRF-1, fabricada por Oriental Yeast Industries Co., LTD.) suplementada com colesterol (1,25%), colato sódico (0,5%) e manteiga de cacau (15%)] e, no grupo administrado com material de teste, os murganhos foram administrados com a dieta rica em gordura combinada com Cilostazol (0,3%) e/ou Probucol (0,1% ou 0,5%). A dieta rica em gordura foi administrada aos murganhos LDLR-KO (desde as 9 semanas de idade) de modo a induzir aterosclerose (no grupo de controlo). Nos grupos de administração com material de teste, a dieta rica em gordura misturada com material de teste foi administrada aos murganhos (desde as 9 semanas de idade). Os murganhos, em ambos os grupos, foram dissecados às oito semanas após o início da administração da dieta. A lesão aterosclerótica foi avaliada recolhendo toda a aorta sob anestesia com éter, expondo a face interna da aorta e corando as gorduras com Sudão IV. A área da lesão aterosclerótica (contendo gorduras/lípidos) em toda a aorta foi contada por análise de imagem da área corada e de toda a área da aorta.

A análise estatística foi feita do seguinte modo.

- 1) De modo a confirmar os efeitos sinérgicos da combinação de Cilostazol e Probucol, realizou-se uma ANOVA com

dois factores entre o grupo de controlo e o grupo administrado com Cilostazol, assim como, entre o grupo administrado com Probucol e o grupo administrado com dois agentes e, deste modo, observou-se a interacção.

2) Os efeitos no grupo administrado com Cilostazol e Probucol foram comparados com os efeitos no grupo de controlo pelo teste de Dunnett. Além disso, os efeitos no grupo administrado com Cilostazol e Probucol foram comparados com os efeitos no grupo administrado com Cilostazol + Probucol pelo teste de Dunnett.

Todos os testes foram feitos por teste bilateral com nível de significância de 5%, por meio de Software SAS (SAS Institute Japan, R8.1).

## (2) Resultados:

A área de lesão aterosclerótica foi calculada como a razão (%) da área corada por Sudão IV em relação à área de aorta total. Os valores médios  $\pm$  desvio padrão foram  $10,1 \pm 4,7\%$  no Grupo de Controlo,  $6,6 \pm 2,6\%$  no grupo administrado com Cilostazol,  $6,2 \pm 2,6\%$  no grupo administrado com Probucol a  $0,1\%$ ,  $4,7 \pm 1,2\%$  no grupo administrado com Probucol a  $0,5\%$ ,  $3,8 \pm 1,2\%$  no grupo administrado com Cilostazol + Probucol a  $0,1\%$  e  $2,9 \pm 1,5\%$  no grupo administrado com Cilostazol + Probucol a  $0,5\%$ .

Como mostrado na Fig. 2 e Fig. 3 anexas, o Cilostazol (0,3%) e Probucol (0,1 e 0,5%) inibiram, significativamente, a lesão aterosclerótica em murganhos LDLR-KO. Além disso, quando

foram administradas combinações de dois agentes, a arterioscleroze foi mais potencialmente inibida em cada combinação com as doses de Probucol.

### Experiência 3

#### Efeitos de Probucol e Cilostazol isolado e em Combinação contra Lesão Isquémica Cerebral Focal em Ratos

##### (1) Materiais e Métodos

Anestesiaram-se ratos macho Sprague-Dawley, pesando 280 - 320 g, com pentobarbital sódico (20 mg/kg, i.p.) e colocaram-se numa compressa de aquecimento (Homeothermic Blanket System, Harvard Apparatus, South Natick, MA) para manter uma temperatura rectal constante ( $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ). Mediram-se a tensão arterial sistémica, gás sanguíneo arterial e pH antes, durante a isquémia e após 22h de reperfusão.

A isquémia cerebral focal foi induzida por oclusão transiente da artéria cerebral central (MCA) esquerda, como anteriormente descrito (Stroke 1989; 20:84-91). O fio de sutura de nylon, cirúrgico, (3-0 em tamanho) com a ponta redonda foi avançado a partir da artéria carótida externa para o lúmen da artéria carótida interna até bloquear o fluxo da MCA. Duas horas após a oclusão de MCA, permitiu-se a reperfusão por remoção do fio de sutura até a ponta desobstruir a artéria carótida interna.

Para análise de enfarte cerebral, às 22-h de reperfusão após passadas 2h de oclusão de MCA, deu-se aos ratos uma sobredose de tiopental sódico e decapitaram-se, e, em seguida, o cérebro foi rapidamente removido e congelado por suspensão sobre azoto líquido. O cérebro foi cortado em blocos coronários de 2 mm de espessura. As fatias de cérebro foram imersas numa solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a 2% em solução salina normal, a 37 °C, durante 30 min e, em seguida, fixa em formalina tamponada com fosfato a 10%, a 4°C. As fatias de cérebro coradas com TTC foram fotografadas utilizando uma câmara de vídeo CCD e calculou-se o tamanho de um enfarte com sistema de análise de imagem (Image-Pro Plus, Media Cybernetics, Maryland) e expressou-se como a percentagem de tecido enfartado relativamente ao hemisfério ipsilateral.

Dissolveram-se cilostazol e probucol em dimetilsulfóxido (DMSO) como uma solução stock de 30 mg/mL e diluída a 10 mg/mL com solução salina tamponada com fosfato, respectivamente. Num grupo, os ratos receberam, oralmente, 20 mg/kg de cilostazol, duas vezes, aos 5 min e 4h após a oclusão completa de MCA, respectivamente. O outro grupo de ratos recebeu, oralmente, 30 mg/kg de probucol, duas vezes, aos 5 min e 4 h após a oclusão completa de MCA, respectivamente. Os ratos do grupo de combinação foram tratados, oralmente, com 20 mg/kg de cilostazol mais 30 mg/kg de probucol, duas vezes, respectivamente. O grupo veículo recebeu, oralmente, solução de DMSO a 30% (300 µL) sem cilostazol/probucol.

A análise estatística foi feita do seguinte modo. Os dados foram expressos como média ± E.P.M.. A comparação dos resultados de áreas de enfarte hemisféricas entre grupos analisou-se por análise de medidas repetidas de variância seguida pelo teste de

comparação múltipla de Tukey como uma comparação post hoc. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas a  $P < 0,05$ .

## (2) Resultados

A zona isquémica cerebral foi consistentemente identificada no córtex e estriado do hemisfério cerebral esquerdo como uma área corada pálida distinta nos ratos submetidos a 2 h de isquémia/22 h de reperfusão. Como mostrado na Fig. 4 anexa, a área de enfarte foi ligeiramente reduzida quando os animais receberam, oralmente, 20 mg/kg de cilostazol, duas vezes, aos 5 min e 4 h após 2 h de isquémia completa, enquanto 30 mg/kg de probucol não teve efeito. O tratamento com cilostazol (20 mg/kg) e probucol (30 mg/kg) em combinação reduz, significativamente, a área de enfarte cerebral hemisférica quando comparada com a do veículo, indicativa de um potente efeito sinergístico de terapia de combinação.

## Experiência 4

Efeitos de Probucol e Cilostazol isolado e em Combinação contra Excreção Urinária de Glucose e Resistência a Insulina em Ratos

## (1) Materiais e Métodos

Dividiram-se, aleatoriamente, ratos macho (6 semanas de idade) Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) nos quatro

grupos seguintes, dependendo dos pesos corporais por método de randomização estratificada (utilizando Software SAS, R8.1):

- |  |        |
|--|--------|
| i) Grupo de controlo:  | n = 10 |
| ii) Grupo administrado com Cilostazol a 0,3%                   | n = 10 |
| iii) Grupo administrado com Probucol a 0,5%                    | n = 10 |
| iv) Grupo administrado com Cirostazol a 0,3% + Probucol a 0,5% | n = 9  |

Imediatamente após o agrupamento aleatório, administrou-se a dieta rica em gordura (ração comercialmente disponível (CRF-1, fabricada por Oriental Yeast Industries Co., LTD.) suplementada com colesterol (1,25%), colato sódico (0,5%) e manteiga de cacau (15%)) aos murganhos em cada grupo de modo a promover o início da doença renal. Nos grupos administrados com material de teste, administrou-se a dieta rica em gordura combinada com o material de teste a cada murganho, imediatamente após agrupamento.

Na semana onze, após iniciação da alimentação, os murganhos foram sangrados a partir da veia da cauda, sem anestesia, e mediu-se o nível de glucose e insulina plasmática no plasma. Separadamente, recolheu-se a urina e mediu-se a glucose de urina. A glucose foi medida por um método enzimático utilizando um kit comercialmente disponível para medir glucose e a insulina foi medida por um kit ELISA comercialmente disponível.

A análise estatística foi feita do seguinte modo.

1) De modo a confirmar os efeitos sinérgicos da combinação de Cilostazol e Probucol, realizou-se ANOVA com dois factores entre o grupo de controlo e o grupo administrado com Cilostazol, assim como entre o grupo administrado com Probucol e

o grupo administrado com dois agentes e, deste modo, observou-se a interacção.

2) Os efeitos no grupo administrado com Cilostazol e Probucol foram comparados com os efeitos no grupo de controlo pelo teste de Dunnett. Além disso, os efeitos no grupo administrado com Cilostazol e Probucol foram comparados com os efeitos no grupo administrado com Cilostazol + Probucol pelo teste de Dunnett.

Todos os testes foram feitos por teste bilateral com nível de significância de 5%, por meio de Software SAS (SAS Institute Japan, R8.1). Os dados foram mostrados por média  $\pm$  DP (n).

## (2) Resultados:

1) Os efeitos de combinação de dois agentes em glucose de urina:

O grupo de controlo mostrou um nível de glucose de urina de  $186 \pm 171$  mg/dL (n=10) que foi muito superior aos dados em ratos normais (inferior a 10 mg/dL). Nos grupos administrados com Cilostazol e Probucol, cada, isolado, a glucose urinária foi significativamente inibida, sendo cada dado  $11 \pm 2$  mg/dL (n=10) e  $11 \pm 3$  mg/dL (n=10), respectivamente, mas no grupo administrado com a combinação de dois agentes, a glucose de urina foi inibida mais significativamente, como  $8 \pm 1$  mg/dL (n=9). Estes resultados são mostrados na Fig. 5 anexa.

2) Os efeitos de combinação de dois agentes em resistência a insulina:

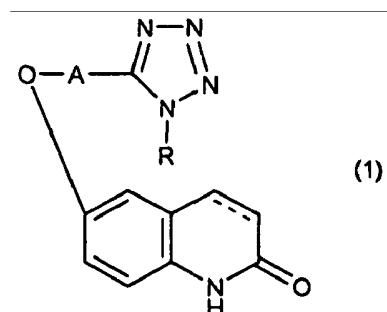
O grupo de controlo mostrou um nível de glucose plasmática normal de  $162 \pm 16$  mg/dL mas mostrou um nível de insulina plasmática superior de  $9,9 \pm 5,0$  ng/mL ( $n=10$ ) em comparação com os dados em ratos normais. Embora nem o Cilostazol nem o Probucol mostrassem qualquer efeito na glucose plasmática, a combinação de Cilostazol e Probucol mostrou, significativamente, efeitos inibidores no nível de insulina plasmática comparado com a administração de Cilostazol ou Probucol isolado. Os resultados são mostrados na Fig. 6 anexa.

Deste modo, o fármaco de combinação de Cilostazol e Probucol mostrou excelentes efeitos de melhoria em resistência a insulina.

Lisboa, 16 de Março de 2012

## REIVINDICAÇÕES

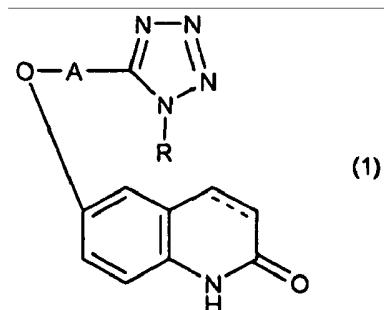
1. Agente para utilização na prevenção e tratamento de enfarte cerebral que compreende uma combinação de, pelo menos, um de derivados de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo da fórmula:



em que R é um grupo cicloalquilo, A é um grupo alquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> e a ligação entre as posições 3- e 4- do núcleo de carboestirilo significa uma ligação simples ou uma ligação dupla, ou um seu sal, e Probucol.

2. Agente para utilização na prevenção e tratamento de arteriosclerose, que compreende uma combinação de, pelo menos, um de derivados de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo (1), como exposto na reivindicação 1, e Probucol.
3. Agente para utilização na prevenção e tratamento de doenças renais, que compreende uma combinação de, pelo menos, um de derivados de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo (1), como exposto na reivindicação 1, e Probucol.

4. Agente para utilização na prevenção e tratamento de diabetes, que compreende uma combinação de, pelo menos, um de derivados de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo (1), como exposto na reivindicação 1, e Probucol.
5. Combinação de, pelo menos, um de derivados de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo (1), como exposto na reivindicação 1, e Probucol para utilização na supressão de superóxido.
6. Agente para utilização na prevenção e tratamento de enfarte cerebral que compreende um supressor de superóxido compreendendo uma combinação de, pelo menos, um de derivados de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo da fórmula:

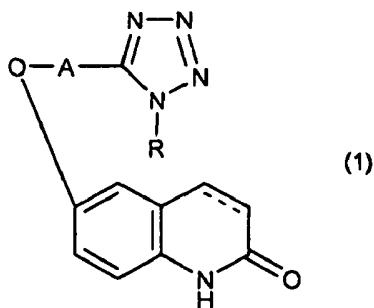


em que R é um grupo cicloalquilo, A é um grupo alquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> e a ligação entre as posições 3- e 4- do núcleo de carboestirilo significa uma ligação simples ou uma ligação dupla, ou um seu sal, e Probucol.

7. Agente para utilização na prevenção e tratamento de arteriosclerose, que compreende um supressor de superóxido compreendendo uma combinação de, pelo menos, um de

derivados de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo (1), como exposto na reivindicação 6, e Probucol.

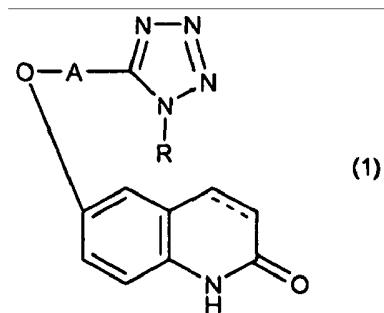
8. Agente para utilização na prevenção e tratamento de doenças renais, que compreende um supressor de superóxido compreendendo uma combinação de, pelo menos, um de derivados de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo (1), como exposto na reivindicação 6, e Probucol.
9. Agente para utilização na prevenção e tratamento de diabetes, que compreende um supressor de superóxido compreendendo uma combinação de, pelo menos, um de derivados de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo (1), como exposto na reivindicação 6, e Probucol.
10. Agente para utilização no tratamento e prevenção de enfarte cerebral, arteriosclerose, doenças renais, diabetes e supressão de superóxido, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que o derivado de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo é 6-[4-(1-ciclohexil-1H-tetrazol-5-il)butoxi]-3,4-di-hidrocarboestirilo ou um seu sal.
11. Utilização de uma combinação de, pelo menos, um de derivados de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo da fórmula:



em que  $\text{R}$  é um grupo cicloalquilo,  $\text{A}$  é um grupo alquíleno  $\text{C}_1\text{-C}_6$  e a ligação entre as posições 3- e 4- do núcleo de carboestirilo significa uma ligação simples ou uma ligação dupla, ou um seu sal, e Probucol, para a preparação de um fármaco para prevenção e tratamento de enfarte cerebral.

12. Utilização de uma combinação de, pelo menos, um de derivados de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo (1), como exposto na reivindicação 11, e Probucol, para a preparação de um fármaco para prevenção e tratamento de arteriosclerose.
13. Utilização de uma combinação de, pelo menos, um de derivados de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo (1), como exposto na reivindicação 11, e Probucol, para a preparação de um fármaco para prevenção e tratamento de doenças renais.
14. Utilização de uma combinação de, pelo menos, um de derivados de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo (1), como exposto na reivindicação 11, e Probucol, para a preparação de um fármaco para prevenção e tratamento de diabetes.

15. Utilização de uma combinação de, pelo menos, um de derivados de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo (1), como exposto na reivindicação 11, e Probucol, para a preparação de um fármaco para supressão de superóxido.
16. Utilização de um supressor de superóxido compreendendo uma combinação de, pelo menos, um de derivados de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo da fórmula:



em que R é um grupo cicloalquilo, A é um grupo alquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> e a ligação entre as posições 3- e 4- do núcleo de carboestirilo significa uma ligação simples ou uma ligação dupla, ou um seu sal, e Probucol, na preparação de um fármaco para prevenção e tratamento de enfarte cerebral.

17. Utilização de um supressor de superóxido compreendendo uma combinação de, pelo menos, um de derivados de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo (1), como exposto na reivindicação 16, e Probucol, para a preparação de um fármaco para prevenção e tratamento de arteriosclerose.
18. Utilização de um supressor de superóxido compreendendo uma combinação de, pelo menos, um de derivados de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo (1), como exposto na

reivindicação 16, e Probucol, para a preparação de um fármaco para prevenção e tratamento de doenças renais.

19. Utilização de um supressor de superóxido compreendendo uma combinação de, pelo menos, um de derivados de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo (1), como exposto na reivindicação 16, e Probucol, para a preparação de um fármaco para prevenção e tratamento de diabetes.
20. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 19, em que o derivado de tetrazolilalcoxi-di-hidrocarboestirilo (1) é 6-[4-(1-ciclo-hexil-1H-tetrazol-5-il)butoxi]-3,4-di-hidrocarboestirilo ou um seu sal.

Lisboa, 16 de Março de 2012

Fig. 1

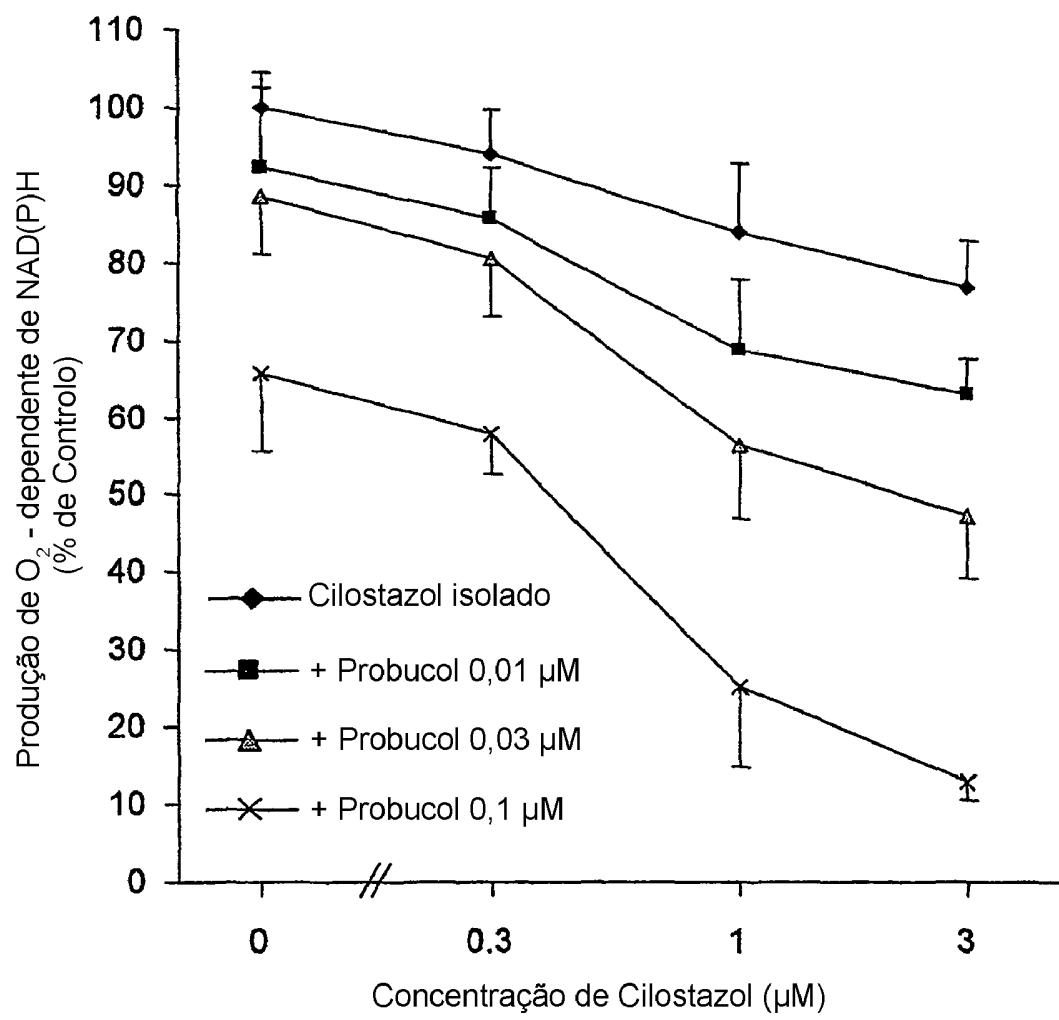


Fig. 2

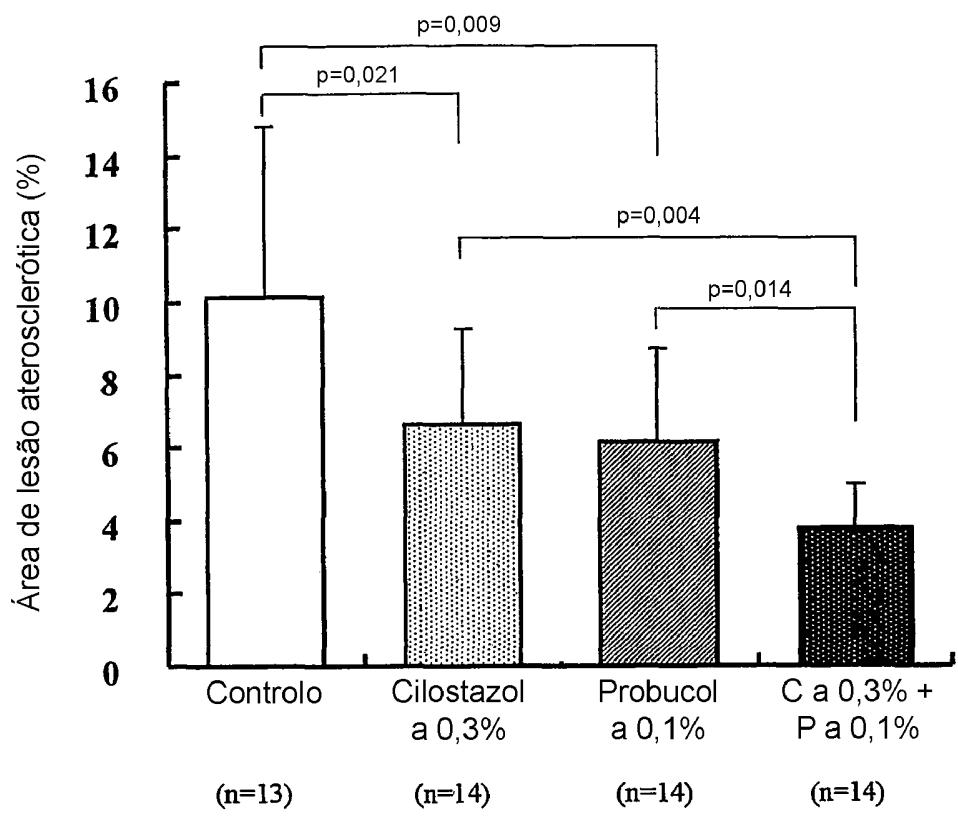


Fig. 3

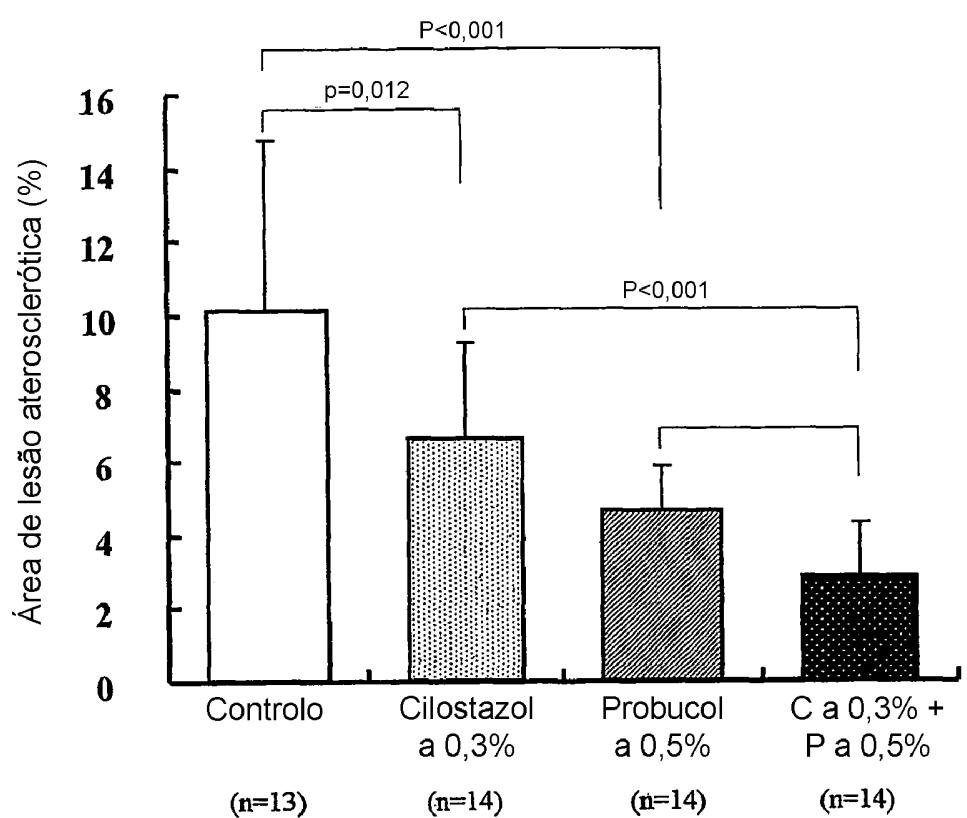
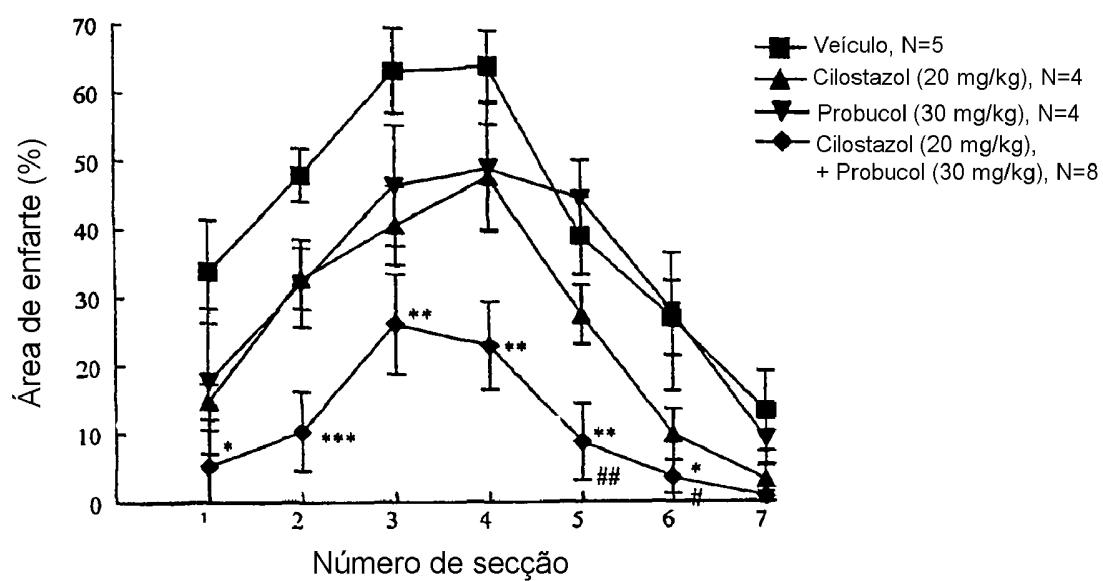


Fig. 4



<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001 vs veículo; # P<0,05; ## P<0,01 vs grupo de probucol (30 mg/kg)

Fig. 5

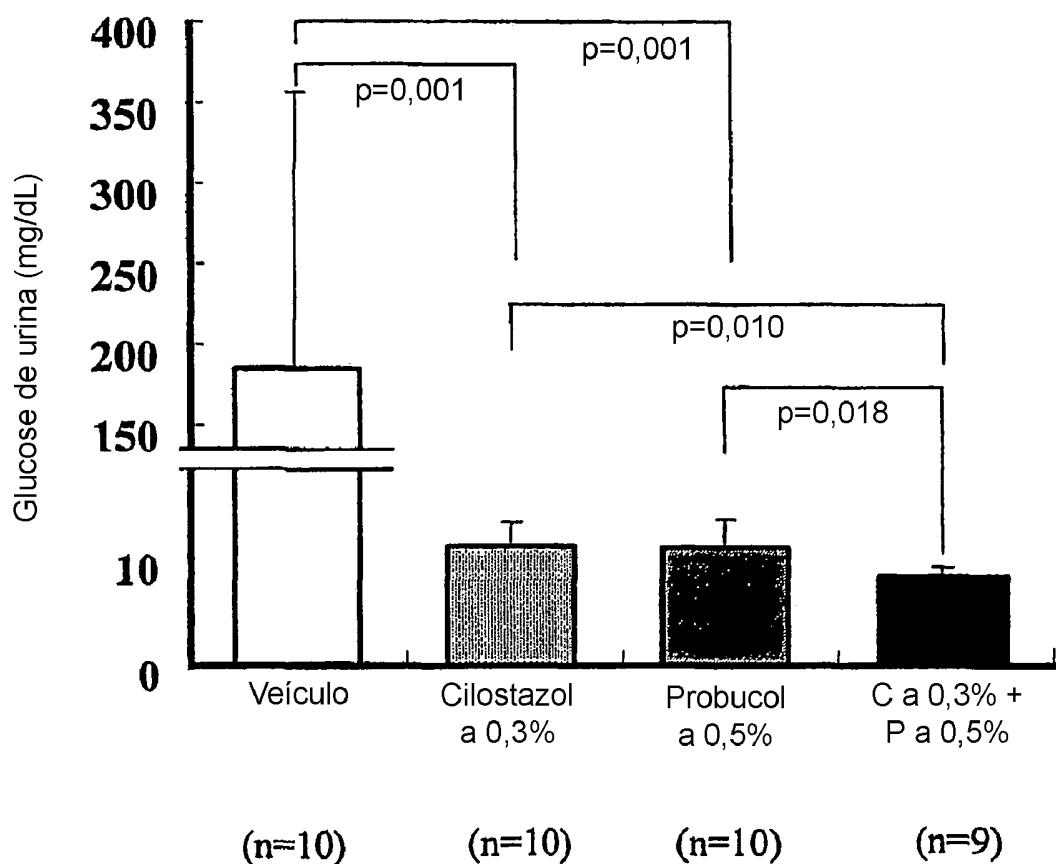


Fig. 6

