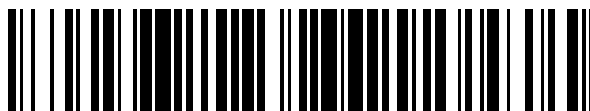


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 896**

51 Int. Cl.:
A61K 31/4704 (2006.01)
A61K 31/095 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06810355 .5**
96 Fecha de presentación: **14.09.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1942895**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2008**

54 Título: **Combinación de fármacos que contiene Probutol y un derivado de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo con efectos inhibidores del superóxido**

30 Prioridad:
15.09.2005 US 716954 P
25.01.2006 US 761775 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.04.2012

73 Titular/es:
OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.
9, KANDATSUKASA-CHO 2-CHOME CHIYODA-KU
TOKYO 101-8535, JP

72 Inventor/es:
HONG, Ki Whan y
YOSHIKAWA, Tomohiro

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 378 896 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

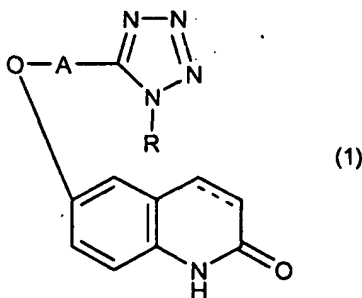
Combinación de fármacos que contiene Probucol y un derivado de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo con efectos inhibidores del superóxido

5

Campo técnico

La invención se refiere a una combinación de fármacos para su uso en el tratamiento y la prevención del infarto cerebral, la arteriosclerosis, las enfermedades renales o la diabetes, que comprende una combinación de al menos uno de los derivados de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo de fórmula:

10



en la que R es un grupo cicloalquilo, A es un grupo alquileo (C₁-C₆) y el enlace entre las posiciones 3 y 4 del núcleo de carbostirilo significa un enlace simple o un enlace doble, o una de sus sales, y Probucol.

15

La combinación de fármacos de la presente invención es eficaz contra el infarto cerebral, la arteriosclerosis, enfermedades renales o la diabetes debido a la actividad inhibidora del superóxido, que se basa en los efectos sinérgicos producidos por la combinación del derivado de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo (1) anterior y el Probucol (= 4,4'-isopropilidendiobis[2,6-di-*terc*-butil-fenol]).

20

Antecedentes de la técnica

El infarto cerebral, incluyendo el infarto cerebral agudo y el infarto cerebral crónico, también conocido como accidente cerebrovascular o como cerebromalacia, está provocado por la interrupción del riego sanguíneo hacia una parte del cerebro debido a la oclusión o coartación de la arteria y/o la vena cerebral, produciendo necrosis de los tejidos y de las células cerebrales. Los factores de riesgo más importantes del mismo son la hipertensión, la enfermedad cardíaca, la diabetes y el tabaquismo. Para remediar el infarto cerebral, es importante inhibir el desarrollo de la necrosis debida a la expansión cerebral y de los radicales libres, y se han usado anticoagulantes, agentes trombolíticos, tales como uroquinasa, activador del plasminógeno tisular (APt).

25

La arteriosclerosis, término que a menudo se usa indistintamente junto con el de aterosclerosis, es una afección que consiste en el engrosamiento y endurecimiento de las paredes arteriales, restringiendo el riego sanguíneo hacia los órganos y tejidos. Aunque se desconoce su causa, se sospecha que comienza con un daño o lesión de la capa interna de una arteria, y este daño puede estar provocado por diversos factores, incluyendo presión sanguínea elevada, colesterol elevado, un irritante (p.ej., nicotina) y ciertas enfermedades tales como la diabetes. Para remediar la arteriosclerosis, se han usado diversos fármacos, por ejemplo, agentes contra el colesterol (p. ej., Probucol, estatinas, colifibratos), agentes antiplaquetarios (p. ej., aspirina), agentes anticoagulantes (p. ej., heparina, warfarina), agentes controladores de la presión sanguínea (p. ej., inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), bloqueadores del canal del calcio).

35

Las enfermedades renales, incluyendo la nefropatía diabética, la insuficiencia renal y la nefritis se caracterizan por cambios funcionales tales como el exceso de filtración glomerular y la albuminuria, y cambios histológicos tales como esclerosis glomerular debida al aumento de las proteínas de la matriz extracelular. Se considera que las enfermedades renales están provocadas por un alto nivel sostenido de azúcar en sangre, alternaciones del metabolismo intracelular (p. ej., aumento de la vía del poli-ol y de la vía de la hexosamina, y activación de proteínas quinasas C (PKC)) debido a hiperglucemia, acumulación de productos finales de la glucación avanzada (AGE), sobrecarga de presión debida a la hipertensión glomerular o aumento del estrés oxidativo; que las génesis más importantes de las enfermedades renales son el aumento del estrés oxidativo, así como la hiperglucemia a la luz de los informes que describen que el oxígeno activo aumenta en el metabolismo anómalo intracelular o en el proceso de formación de AGE (cf. *Nature*, 414, pp. 813-820, 2001); y que tanto el aumento de la ruta de la hexosamina, la activación de las PKC y el aumento de los AGE se inhiben mediante la inhibición del exceso de producción de superóxido en las mitocondrias (cf. *Nature*, 404, pp. 787-790, 2000).

45

50

55

Se sabe que el agravamiento de la resistencia a la insulina es un factor importante en la aparición de la diabetes, pero el agravamiento de la resistencia a la insulina no sólo se convierte en la patogénesis del síndrome metabólico, tal como la diabetes, sino que también promueve la aparición y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y enfermedades renales (cf. *Arterioscler. Thromb. Vase. Bio.*, 24, pp. 816-823, 2004), y de ahí que se haya considerado que la mejora de la resistencia a la insulina sea útil para el tratamiento de la diabetes y la complicación diabética. También se ha publicado que el aumento del estrés oxidativo puede ser un importante factor de inducción de la resistencia a la insulina (cf. *Nature*, 440, pp. 944-948, 2006) y, por tanto, los inhibidores del estrés oxidativo pueden ser útiles para la prevención y el tratamiento de la diabetes, y de la aparición y el desarrollo de enfermedades renales en vista de mejorar la actividad de la resistencia a la insulina.

Aunque la población de los pacientes diabéticos con enfermedad renal crece año tras año, nunca se ha encontrado una terapia adecuada para tratar las enfermedades renales.

A propósito, se ha descubierto que el oxígeno es esencial para que los organismos vivos se puedan mantener con vida, por ejemplo, puedan mantener una producción de energía y de metabolismo normales. El oxígeno se puede convertir en el denominado oxígeno activo en el organismo vivo. El oxígeno activo incluye oxígeno con radicales y oxígeno sin radicales. Entre el oxígeno activo, incluyendo en un sentido general los materiales relacionados con lípidos, el oxígeno con radicales incluye un radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), un radical alcoxilo, un radical peroxilo, un radical hidroperoxilo, un monóxido de nitrógeno, un dióxido de nitrógeno, superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), etc. El grupo de oxígeno sin radicales incluye un oxígeno singlete a' , ozono, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), un hidroperóxido de lípido, etc.

Como oxígeno activo que puede ser eficaz en células titulares, hay oxígenos con radicales de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y OH , y oxígeno sin radicales de H_2O_2 (cf. *YAKUGAKU ZASSH* 1122(3), pp.203-218 (2002)). El $\text{O}_2^{\cdot-}$ produce oxígeno y peróxido de hidrógeno mediante la acción de la superóxido dismutasa (SOD) en el organismo vivo. El peróxido de hidrógeno cambia a $\cdot\text{OH}$ mediante acción catalítica de ión hierro, ión cobre incluidos en las células. El radical hidroxilo ataca directamente el ADN y las proteínas del organismo vivo. Por otro lado, el radical hidroxilo reacciona con los lípidos, convirtiéndose así en radical lipídico, y produciendo después hidroperóxido de lípido.

Así pues, estos oxígenos activos, tales como $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 , que están relacionados con graves enfermedades, proceden principalmente de $\text{O}_2^{\cdot-}$, y de ahí que exista la necesidad de buscar una sustancia que sea capaz de inhibir a $\text{O}_2^{\cdot-}$.

Por otro lado, se sabe que los derivados de carbostirilo tienen actividades farmacéuticas, tales como acción inhibidora de la agregación plaquetaria, acción antiinflamatoria, acción contra las úlceras, acción vasodilatadora y acción inhibidora de la fosfodiesterasa (cf. US 4.277.479). Sin embargo, también se sabe que los compuestos de carbostirilo (así como el Probulcol) tienen actividad inhibidora del oxígeno (cf. US 2004/082608, WO 99/24400 y US 2002/115728). Además, Sekiya, M. *et al.*, *Am. J. Cardiol.* 82(2): 144-147 (1998) revelan una composición que comprende Cilostazol (un derivado de carbostirilo) y Probulcol para el tratamiento de la restenosis.

Revelación de la invención

Los presentes inventores han estudiado exhaustivamente las actividades farmacológicas de la combinación del derivado de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo (1), que se sabe que tiene una actividad inhibidora del oxígeno activo, con un agente antihiperlipidémico conocido, el Probulcol, y han descubierto que la combinación presenta una excelente actividad antioxidante sinérgica, así como una excelente actividad sinérgica para inhibir el superóxido que provoca infarto cerebral, arteriosclerosis y enfermedades renales, y que además presenta una mejora significativa de la resistencia a la insulina y disminuye notablemente la excreción urinaria de glucosa, que es uno de los índices de las disfunciones renales; así que han descubierto que la combinación de derivado de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo (1) y el Probulcol es eficaz para la prevención y/o el tratamiento del infarto cerebral, la arteriosclerosis, las enfermedades renales (p.ej., nefropatía diabética, insuficiencia renal, nefritis) o la diabetes debido a su excelente actividad inhibidora del superóxido.

Así pues, un objeto de la invención consiste en proporcionar una combinación de fármacos para su uso en la prevención y el tratamiento del infarto cerebral que comprende un derivado de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo (1) y Probulcol.

Otro objeto de la invención consiste en proporcionar una combinación de fármacos para su uso en la prevención y el tratamiento de la arteriosclerosis que comprende un derivado de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo (1) y Probulcol.

Otro objeto más de la invención consiste en proporcionar una combinación de fármacos para su uso en la prevención y el tratamiento de enfermedades renales que comprende un derivado de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo (1) y Probulcol.

Otro objeto más de la invención consiste en proporcionar una combinación de fármacos para su uso en la prevención y el tratamiento de la diabetes que comprende un derivado de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo (1) y Probulcol.

E incluso otro objeto más de la invención consiste en proporcionar un mejor inhibidor del superóxido que comprende

una combinación del derivado de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo (1) y Probuco.

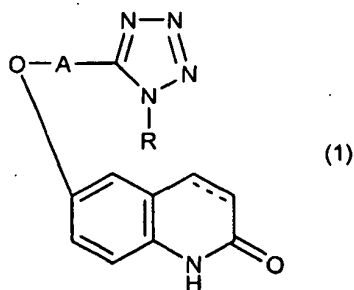
Breve descripción de las figuras

- 5 La Fig. 1 es una gráfica que muestra la correlación que existe entre la concentración de Cilostazol y la producción de O_2^- dependiente de NAD(P)H en la inhibición de la producción de O_2^- dependiente de NAD(P)H realizada por Cilostazol solo o por una combinación de Cilostazol y Probuco.
- 10 La Fig. 2 es una gráfica que muestra los efectos inhibidores del Cilostazol al 0,3% solo, el Probuco al 0,1% solo o una combinación del Cilostazol al 0,3% y el Probuco al 0,1% sobre la lesión arteriosclerótica en ratones con el receptor de lipoproteínas de baja densidad desactivado alimentados con una dieta rica en colesterol.
- 15 La Fig. 3 es una gráfica que muestra los efectos inhibidores del Cilostazol al 0,3% solo, el Probuco al 0,5% solo o una combinación del Cilostazol al 0,3% y el Probuco al 0,5% sobre la lesión arteriosclerótica en ratones con el receptor de lipoproteínas de baja densidad desactivado alimentados con una dieta rica en colesterol.
- La Fig. 4 es una gráfica que muestra los efectos del Probuco y del Cilostazol solos y una combinación de Probuco y Cilostazol contra la lesión isquémica cerebral focal en ratas.
- La Fig. 5 es una gráfica que muestra los efectos del Probuco y del Cilostazol solos y una combinación de Probuco y Cilostazol contra la excreción urinaria de glucosa en ratas.
- 20 La Fig. 6 es una gráfica que muestra los efectos del Probuco y del Cilostazol solos y una combinación de Probuco y Cilostazol contra la resistencia a la insulina en ratas.

Descripción detallada de la invención

El derivado de carbostirilo que se incluye como uno de los componentes de la combinación de fármacos de la presente invención es un derivado de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo de fórmula:

25



30 en la que R es un grupo cicloalquilo, A es un grupo alquileo (C_1-C_6) y el enlace entre las posiciones 3 y 4 del núcleo de carbostirilo significa un enlace simple o un enlace doble, o una de sus sales.

30

En la fórmula (1) anterior, el grupo cicloalquilo incluye grupos cicloalquilo (C_3-C_8), tal como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo. El preferido es el ciclohexilo. Los grupos alquileo (C_1-C_6) incluyen metileno, etileno, propileno, tetrametileno, butileno y pentileno, entre los que el preferido es tetrametileno.

35

El derivado de carbostirilo preferible es 6-[4-(1-ciclohexil-1H-tetrazol-5-il)butoxi]-3,4-dihidrocarbostirilo, que se comercializa con el nombre comercial Cilostazol como agente antiplaquetario.

40

Estos derivados de carbostirilo (1) y sus sales, así como un procedimiento de preparación de los mismos se revela en la patente estadounidense n.º 4.277.479. En la patente estadounidense n.º 6.743.806 también se revela que los derivados de carbostirilo (1) tienen actividad inhibidora del oxígeno activo.

45

Otro ingrediente activo, el Probuco, es un compuesto que tiene el nombre químico de 4,4'-isopropilidendiobis[2,6-di-*tert*-butilfenol], y ya se comercializa como un agente anti-hiperlipidémico. También se sabe que este compuesto tiene una actividad inhibidora de la producción de LBD oxidada (lipoproteína de baja densidad) (cf. *J. Clin. Invest.*, 77, p. 641, 1986).

50

Estos ingredientes activos, un derivado de carbostirilo (1) y el Probuco, se pueden administrar conjuntamente o por separado, al mismo tiempo o en momentos diferentes. Estos ingredientes se pueden usar habitualmente en una formulación farmacéutica convencional. Por tanto, es posible preparar estos ingredientes en la formulación farmacéutica en una sola forma de dosificación o en formas de dosificación separadas.

55

No se especifican las formas de dosificación, pero pueden ser cualquier formulación farmacéutica convencional, por ejemplo, preparaciones para una administración oral, tales como comprimidos, cápsulas, gránulos, diversas preparaciones líquidas adecuadas para una administración oral o preparaciones para una administración parenteral, tales como inyecciones, supositorios.

- La dosis de estos ingredientes activos no se limitan a un intervalo específico. Los derivados de carbostirilo (1) o una de sus sales se pueden usar en una cantidad de 50 a 200 mg/día en adulto (50 kg de peso corporal), que se administran una vez al día o dividiéndolos en dos a varias veces al día. El ProbucoI se puede usar en una cantidad de 100 a 1.000 mg/día en adulto (50 kg de peso corporal), que se puede administrar en una vez, pero que preferentemente se puede administrar dividiendo la dosis diaria en dos a varias veces al día. Cuando estos ingredientes se preparan en una sola forma de dosificación, se incorporan en una proporción de 0,25 a 10 partes en peso de ProbucoI por 1 parte en peso del derivado de carbostirilo (1) o una de sus sales.
- Las preparaciones se pueden elaborar principalmente en forma de comprimidos, cápsulas, líquido para una administración oral mediante un procedimiento convencional. Los comprimidos se pueden preparar mezclando el/los ingrediente/s activo/s con vehículos farmacéuticos convencionales, tales como gelatina, almidones, lactosa, estearato de magnesio, talco, goma arábiga y similares. Las cápsulas se pueden preparar mezclándolas con cargas o diluyentes farmacéuticos inertes y llenando una cápsula de gelatina dura o una cápsula de blanda. Las preparaciones líquidas orales, tales como jarabes o elixires, se preparan mezclando el/los ingrediente/s activo/s y agentes edulcorantes (p. ej., sacarosa), conservantes (p. ej., metilparabeno, propilparabeno), colorantes, aromatizantes y similares. Las preparaciones para una administración parenteral también se pueden elaborar mediante un procedimiento convencional, por ejemplo, disolviendo el/los ingrediente/s activo/s de la presente invención en un vehículo acuoso esterilizado, preferentemente, en agua o una solución salina. La preparación líquida preferida adecuada para una administración parenteral se elabora disolviendo la dosis diaria de los ingredientes activos según lo mencionado anteriormente en agua y un disolvente orgánico y, además, en un polietilenglicol que tenga un peso molecular de 300 a 5.000, que se incorpore preferentemente con un lubricante, tal como carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, polivinilpirrolidona y alcohol polivinílico. Además, las preparaciones líquidas anteriores se pueden incorporar con un desinfectante (p.ej., alcohol bencílico, fenol, timerosal), un fungicida y también, opcionalmente, con un agente isotónico (p. ej., sacarosa, cloruro de sodio), un anestésico tópico, un estabilizador, un tampón y similares. Con el fin de mantener la estabilidad, la preparación para una administración parenteral se puede introducir en una cápsula, tras lo que se elimina el medio acuoso mediante una técnica de liofilización convencional y se recupera en una preparación líquida mediante la disolución en un medio acuoso cuando se usa.
- Según la presente invención, si se combina el derivado de carbostirilo (1), particularmente, 6-[4-(1-ciclohexil-1H-tetrazol-5-il)butoxi]-3,4-dihidrocarbostirilo o una de sus sales con ProbucoI, son eficaces sobre el infarto cerebral, la arteriosclerosis, las enfermedades renales (p. ej., nefropatía diabética, insuficiencia renal, nefritis) o diabetes.
- Uno de los mecanismos de presentación de esos efectos se puede deber a la excelente actividad inhibidora del superóxido, es decir, a que presentan una excelente actividad antioxidante sinérgica y efectos sinérgicos inhibidores del superóxido, mediante los cuales se eliminan eficazmente las células tisulares que afectan al superóxido. Además de esto, mediante la inhibición del superóxido, también se genera la inhibición de la producción de $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 procedentes del superóxido. La combinación de fármacos de la presente invención también puede inhibir la producción de oxígenos activos, tales como $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 , que son los principales causantes de graves enfermedades. Se sabe que el superóxido provoca infarto cerebral (p.ej., infarto cerebral agudo, infarto cerebral crónico), arteriosclerosis, enfermedades renales (p. ej., nefropatía diabética, insuficiencia renal, nefritis) (cf. Antioxidants & Redox Signaling, 5,2003, pp. 597-607, que reveló la participación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en el infarto cerebral; *Circ. Res.*, 86, 2000, pp. 494-501, que revela que la NAD(P)H oxidasa produce $\text{O}_2^{\cdot-}$ y participa en enfermedades del sistema circulatorio, tales como la arteriosclerosis; *Eur. J. Pharmacol.*, 450, 2002, pp. 67-76, que revela la participación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en enfermedades renales).
- Así pues, mediante los efectos sinérgicos inhibidores del superóxido, la combinación del derivado de carbostirilo (1) y el ProbucoI de la presente invención puede presentar los efectos deseados para prevenir y tratar el infarto cerebral, la arteriosclerosis, enfermedades renales (p. ej., nefropatía diabética, insuficiencia renal, nefritis) o la diabetes.

Ejemplos

- La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos preparativos y experimentos de la actividad inhibidora del superóxido del agente de la presente invención, pero no se han de interpretar como restrictivos de la misma.

Preparación 1

Preparación de comprimidos:

Componentes	Cantidad (g)
6-[4-(1 -Ciclohexil-1H-tetrazol-5-il)butoxi]-3,4-dihidrocarbostirilo	100
Probucof	250
Lactosa (farmacopea japonesa)	40
Almidón de maíz (farmacopea japonesa)	40
Celulosa cristalina (farmacopea japonesa)	20
Hidroxipropilcelulosa (farmacopea japonesa)	4
Estearato de magnesio (farmacopea japonesa)	2

Se mezclan bien los ingredientes activos anteriores de la presente invención, la lactosa, el almidón de maíz y la celulosa cristalina, se granula la mezcla con solución acuosa al 5% de hidroxipropilcelulosa, se tamiza la mezcla granulada con una criba de malla 200 para secar los gránulos cuidadosamente y luego se comprimen los gránulos mediante un procedimiento convencional, dando comprimidos (1.000 comprimidos).

Experimentos farmacológicosExperimento 1

Inhibición sinérgica de la producción de $O_2^{\cdot-}$ dependiente de NAD(P)H en células endoteliales vasculares humanas mediante la combinación de Cilostazol y Probucof

(1) Materiales y procedimientos:

Cultivos celulares: se cultivaron CEACH (células endoteliales de arteria coronaria humana) en el medio básico de células endoteliales 2 (EGM-2). Kit de Bullet. Se dejaron crecer las células hasta que confluyeron a 37°C en CO_2 al 5% y se usaron para experimentos no más allá del paso 6.

Los materiales de análisis fueron (1) Cilostazol solo (n = 4); (2) Probucof solo (n = 4); (3) una mezcla de Cilostazol con Probucof (n = 4), siendo las concentraciones finales del Cilostazol 0,3; 1,0 y 3,0 μM y de Probucof de 0,01; 0,03 y 0,1 μM , correspondientes a la proporción de Cilostazol y Probucof de entre 3:1 y 300:1 en peso molecular.

(2) Medición del superóxido:

Se disolvieron Cilostazol y Probucof en dimetilsulfóxido en forma de soluciones madre 10mM. Inmediatamente después de la adición del Cilostazol y/o el Probucof a las concentraciones finales de 0; 0,3; 1,0; 3,0 μM y 0; 0,01; 0,03; 0,1 μM , respectivamente, en el medio de cultivo, se añadió FNT- α (50 ng/ml) y se incubaron las CEACH durante 4 horas. Una vez expuestas las células al FNT- α , se colocaron los homogenizados endoteliales en el luminómetro (Microumat LB96P, EG &G Berthold). Inmediatamente antes de registrar la quimioluminiscencia, se añadieron NADH y NADPH (concentración final de 100 μM cada una) y se añadió lucigenina adaptada a la oscuridad (nitrato de bis-N-metilacridinio, 5 μM) mediante un autodispensador. Se registró la intensidad de la quimioluminiscencia cada 30 segundos durante 15 minutos y se sustrajo el respectivo fondo. La quimioluminiscencia se expresó como recuentos por segundo por miligramo de proteína.

El análisis estadístico se realizó de la siguiente manera:

- 1) Se compararon los efectos del Cilostazol solo o del Probucof solo con los efectos de su combinación mediante la prueba de Dunnett.
- 2) Para evaluar los efectos sinérgicos de su combinación, se llevó a cabo un análisis de dos factores de la varianza (ANOVA de dos factores) entre el control, el Cilostazol solo, el Probucof solo y la combinación. Todas las pruebas se realizaron mediante una prueba bilateral con un nivel de significancia del 5% mediante el programa informático SAS (SAS Institute Japan, R8.1).

(3) Resultados:

En la Fig. 1 anexa, se muestran los resultados. En la Fig. 1, el eje longitudinal significa producción de $O_2^{\cdot-}$ dependiente de NAD(P)H (% de control) y el eje de abscisas significa la concentración de Cilostazol (μM), y la línea marcada con rombos significa los datos del Cilostazol solo, i.e., sin Probucof (P0), la línea marcada con cuadrados significa los datos de una mezcla de Cilostazol con Probucof en una cantidad de 0,01 μM , la línea marcada con triángulos significa los datos de una mezcla de Cilostazol con Probucof en una cantidad de 0,03 μM y la línea marcada con "x" significa los

datos de una mezcla de Cilostazol con Probuco en una cantidad de 0,1µM.

Como se observa en la Fig. 1, cuando se usó el Cilostazol en combinación con Probuco, se inhibió significativamente la producción de O₂⁻ en comparación con el Cilostazol solo. Además, el efecto inhibitor se potenció significativamente mediante la combinación de Cilostazol 3µM y Probuco 0,1µM (p = 0,03222 mediante un ANOVA de dos factores).

Experimento 2

Efectos del Cilostazol y el Probuco solos y en combinación sobre la arteriosclerosis en ratones con el receptor de las lipoproteínas de baja densidad desactivado alimentados con una dieta rica en colesterol

(1) Materiales y procedimientos:

Se usaron ratones con el receptor de las lipoproteínas de baja densidad desactivado (LDLR-KO) (*J. Clin. Invest.* 1993; 92: 883-893) (machos, de 9 semanas de vida que se prepararon y mantuvieron en Otsuka Pharmaceutical Co, Ltd.) Los animales se trataron agrupándoles en los seis siguientes grupos.

- 1) Grupo control (n = 13).
- 2) Grupo al que se administra Cilostazol al 0,3% (n = 14)
- 3) Grupo al que se administra Probuco al 0,1% (n = 14)
- 4) Grupo al que se administra Probuco al 0,5% (n = 14)
- 5) Grupo al que se administra Cilostazol al 0,3% + Probuco al 0,1% (n = 14)
- 6) Grupo al que se administra Cilostazol al 0,3% + Probuco al 0,15% (n = 14)

Antes de iniciar el experimento, se midieron el peso corporal de los animales y el colesterol total, y en base a ambos datos, se dividieron los animales en seis grupos aleatoriamente mediante el procedimiento de aleatorización estratificada (Programa informático SAS, R8.1). Se determinaron las dosis de Probuco y Cilostazol en base a los informes (*Horm. Metab. Res.* 2001; 33: 472-479 y *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005; 313: 502-509), respectivamente. En el grupo control, los ratones recibieron una dieta rica en grasas [i.e., una alimentación convencional (CRF-1, elaborada por Oriental Yeast Industries Co., LTD.) complementada con colesterol (1,25%), colato de sodio (0,5%) y mantequilla de cacao (15%)] y en el grupo que recibió el material de prueba, los ratones recibieron una dieta rica en grasas combinada con Cilostazol (0,3%) y/o Probuco (0,1% ó 0,5%). Se administró la dieta rica en grasas a los ratones LDLR-KO (a partir de 9 semanas de vida) para inducir la arteriosclerosis (en el grupo control). En los grupos a los que se administró material de prueba, los ratones (a partir de 9 semanas de vida) recibieron la dieta rica en grasas mezclada con el material de prueba. Los ratones de ambos grupos fueron diseccionados a la octava semana de haberse iniciado la administración de la dieta. Se evaluó la lesión arteriosclerótica levantando toda la aorta bajo anestesia con éter, exponiendo la cara interna de la aorta y tiñendo las grasas con Sudan IV. Se estimó la superficie de la lesión arteriosclerótica (que contenía grasas/lípidos) de toda la aorta mediante un análisis de imágenes de la superficie teñida y de toda la superficie de la aorta.

El análisis estadístico se realizó de la siguiente manera:

- 1) Para confirmar los efectos sinérgicos de la combinación de Cilostazol y Probuco, se llevó a cabo un ANOVA de dos factores entre el grupo control y el grupo al que se había administrado Cilostazol, así como entre el grupo al que se había administrado Probuco y el grupo al que se había administrado los dos agentes, y así se observó la interacción.
- 2) Se compararon los efectos del grupo al que se había administrado Cilostazol y Probuco con los efectos provocados en el grupo control mediante el test de Dunnett. Además, se compararon los efectos del grupo al que se había administrado Cilostazol y Probuco con los efectos provocados en el grupo al que se había administrado Cilostazol + Probuco mediante el test de Dunnett.

Todas las pruebas se realizaron mediante una prueba bilateral con un nivel de significancia del 5% mediante el programa informático SAS (SAS Institute Japan, R8.1).

(2) Resultados:

Se calculó la superficie de la lesión arteriosclerótica como la proporción (%) entre la superficie teñida con Sudan IV y la superficie de toda la aorta. Los valores medios ± la desviación estándar fueron 10,1 ± 4,7% en el grupo control, 6,6 ± 2,6% en los grupos a los que se había administrado Cilostazol, 6,2 ± 2,6% en el grupo al que se había administrado Probuco al 0,1%, 4,7 ± 1,2% en el grupo al que se había administrado Probuco al 0,5%, 3,8 ± 1,2% en el grupo al que se había administrado Cilostazol + Probuco al 0,1% y 2,9 ± 1,5% en el grupo al que se había administrado Cilostazol + Probuco al 0,5%.

Como se observa en las Fig. 2 y Fig. 3 anexas, Cilostazol (0,3%) y Probuco (0,1 y 0,5%) inhibieron significativamente la lesión arteriosclerótica en ratones LDLR-KO. Además, cuando se administraron las combinaciones de los dos agentes, la arteriosclerosis resultó ser más potencialmente inhibida en cada combinación con las dosis de Probuco.

Experimento 3

Efectos del Probuco y el Cilostazol solos, y en combinación contra la lesión isquémica cerebral focal en ratas

5

(1) Materiales y procedimientos

Se anestesiaron ratas Sprague-Dawley macho que pesaban 280-320 g con pentobarbital sódico (20 mg/kg, i.p.) y se colocaron en un lecho corto de calentamiento (Homeothermic Blanket System, Harvard Apparatus, South Natick, MA) para mantener una temperatura rectal constante ($37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$). Se midieron la presión sanguínea arterial sistémica, el gas sanguíneo arterial y el pH antes, durante la isquémica y tras una reperusión de 22 h.

10

Se indujo una isquemia cerebral focal mediante oclusión transitoria de la arteria cerebral media izquierda (ACM) según lo descrito con anterioridad (Stroke 1989; 20:84-91). Se cosió con hilo de sutura de nailon quirúrgico (tamaño 3-0) de punta redonda desde la arteria carótida externa hacia el lumen de la arteria carótida interna hasta bloquear el riego de la ACM. Dos horas después de la oclusión de la ACM, se permitió una reperusión retirando el hilo de sutura hasta que la punta desobstruyó la arteria carótida interna.

15

Para analizar el infarto cerebral, a las 22 h de la reperusión, tras 2 h de oclusión de la ACM izquierda, se administró a las ratas una sobredosis de tiopental sódico y se las decapitó. Luego se extirpó rápidamente el cerebro y se congeló mediante suspensión sobre nitrógeno líquido. Se cortó el cerebro en un bloque coronal de 2 mm de espesor. Se sumergieron las rodajas cerebrales en una solución al 2% de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) en solución salina normal a 37°C durante 30 min y luego se fijaron en formalina tamponada con fosfato al 10% a 4°C . Se fotografiaron las rodajas cerebrales teñidas con TTC usando una cámara de video CCD y se calculó el tamaño del infarto con un sistema de análisis de imágenes (Image-Pro Plus, Media Cybernetics, Maryland), que se expresó como el porcentaje del tejido de infarto con respecto al hemisferio ipsilateral.

20

Se disolvieron el Cilostazol y el Probuco en dimetil-sulfóxido (DMSO) en forma de una solución madre de 30 mg/ml y se diluyeron hasta 10 mg/ml con solución salina tamponada con fosfato, respectivamente. En un grupo, las ratas recibieron oralmente 20 mg/kg de Cilostazol dos veces a los 5 min y transcurridas 4 h de la finalización de la oclusión de la ACM, respectivamente. En otro grupo, las ratas recibieron oralmente 30 mg/kg de Probuco dos veces a los 5 min y transcurridas 4 h de la finalización de la oclusión de la ACM, respectivamente. Se trataron las ratas del grupo de combinación con 20 mg/kg de Cilostazol más 30 mg/kg de Probuco oralmente dos veces, respectivamente. El grupo de vehículo recibió solución de DMSO al 30% (300 μl) oralmente sin Cilostazol/Probuco.

25

El análisis estadístico se realizó de la siguiente manera. Se expresaron los datos como la media \pm EEM. Se analizaron la comparación de los resultados de las superficies del infarto hemisférico entre los grupos mediante análisis de la varianza de medidas repetidas seguido de las pruebas de múltiples comparaciones de Tukey, a modo de comparación post hoc. Las diferencias se consideraron estadísticamente relevantes a $P < 0,05$.

30

(2) Resultado

Se identificó consecuentemente la zona isquémica cerebral de la corteza y del estrato del hemisferio cerebral izquierdo como una superficie diferenciada teñida de color pálido en las ratas sometidas a una isquemia de 2 h/reperusión de 22 h. Como se muestra en la Fig. 4 anexa, se redujo ligeramente la superficie del infarto cuando los animales recibieron oralmente 20 mg/kg de Cilostazol dos veces a los 5 min y a las 4 h de haber finalizado la isquemia de 2 h, mientras que los 30 mg/kg de Probuco no tuvieron efecto. El tratamiento con Cilostazol (20 mg/kg) y Probuco (30 mg/kg) en combinación redujo significativamente la superficie del infarto cerebral hemisférico en comparación con la del vehículo, lo que indica un posible efecto sinérgico de la terapia de combinación.

35

Experimento 4

Efectos del Probuco y del Cilostazol solos, y en combinación frente a la secreción urinaria de glucosa y resistencia a la insulina en ratas

40

(1) Materiales y procedimientos

Se dividieron aleatoriamente ratas macho Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) (6 semanas de vida) en los cuatro siguientes grupos en función del peso corporal mediante el procedimiento aleatorizado estratificado (usando el programa informático SAS, R8.1):

45

- | | |
|---|--------|
| i) Grupo control: | n = 10 |
| ii) Grupo al que se administra Cilostazol al 0,3% | n = 10 |
| iii) Grupo al que se administra Probuco al 0,5% | n = 10 |
| iv) Grupo al que se administra Cilostazol al 0,3% + Probuco al 0,5% | n = 9 |

50

Inmediatamente después de la agrupación aleatorizada, se administró una dieta rica en grasas (alimentación CRF-1 comercialmente disponible fabricada por Oriental Yeast Industries Co., LTD.) complementada con colesterol (1,25%), colato de sodio (0,5%) y mantequilla de cacao (15%) a los ratones de cada grupo para inducir la aparición de la enfermedad renal. En los grupos a los que se había administrado el material de prueba, cada ratón recibió una dieta rica en grasas combinada con el material de prueba inmediatamente después del agrupamiento.

A la décimo primera semana de haberse iniciado la alimentación, se sangraron los ratones en la vena de la cola sin anestesia, y se midieron la glucosa en plasma y el nivel de insulina en plasma. Por separado, se tomó orina y se midió la glucosa urinaria. Se midió la glucosa mediante un procedimiento enzimático usando un kit comercialmente disponible para medir la glucosa, y la insulina, con un kit de ELISA comercialmente disponible.

El análisis estadístico se realizó de la siguiente manera:

1) Para confirmar los efectos sinérgicos de la combinación de Cilostazol y Probuco, se llevó a cabo un ANOVA de dos factores entre el grupo control y el grupo al que se había administrado Cilostazol, así como entre el grupo al que se había administrado Probuco y el grupo al que se había administrado los dos agentes, y así se observó la interacción.

2) Se compararon los efectos del grupo al que se había administrado Cilostazol y Probuco con los efectos provocados en el grupo control mediante el test de Dunnett. Además, se compararon los efectos del grupo al que se había administrado Cilostazol y Probuco con los efectos provocados en el grupo al que se había administrado Cilostazol + Probuco mediante el test de Dunnett.

Todas las pruebas se realizaron mediante una prueba bilateral con un nivel de significancia del 5% mediante el programa informático SAS (SAS Institute Japan, R8.1). Los datos se mostraron mediante la media \pm DE (n).

(2) Resultados:

1) Los efectos de la combinación de los dos agentes sobre la glucosa en orina:

El grupo control mostró un nivel de glucosa en orina de 186 ± 171 mg/dl (n = 10) que era mucho más elevado que los datos en ratas normales (menos de 10 mg/dl). En los grupos que habían recibido Cilostazol solo y Probuco solo, se inhibió significativamente la glucosa en orina, siendo la de cada rata de 11 ± 2 mg/dl (n = 10) y 11 ± 3 mg/dl (n = 10), respectivamente, pero en el grupo que había recibido la combinación de los dos agentes, la glucosa en orina se inhibió más significativamente, en 8 ± 1 mg/dl (n = 9). Estos resultados se muestran en la Fig. 5 anexa.

2) Los efectos de la combinación de los dos agentes sobre la resistencia a la insulina:

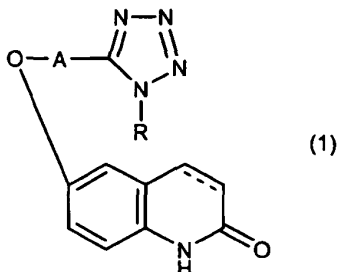
El grupo control mostró un nivel de glucosa en plasma normal de 162 ± 16 mg/dl, pero un nivel de insulina en plasma superior, de $9,9 \pm 5,0$ ng/ml (n = 10) en comparación con los datos de las ratas normales. Aunque ni el Cilostazol ni el Probuco mostraron ningún efecto sobre la glucosa en plasma, la combinación de Cilostazol y Probuco mostró efectos significativamente inhibidores del nivel de insulina en plasma en comparación con la administración de Cilostazol o de Probuco solos. En la Fig. 6 anexa, se muestran los resultados.

Así pues, la combinación de los fármacos de Cilostazol y Probuco mostró excelentes efectos de mejora sobre la resistencia a la insulina.

REIVINDICACIONES

1. Un agente para su uso en la prevención y el tratamiento del infarto cerebral que comprende una combinación de al menos uno de los derivados de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo de la fórmula:

5



en la que R es un grupo cicloalquilo, A es un grupo alquileo (C_1-C_6) y el enlace entre las posiciones 3 y 4 del núcleo de carbostirilo significa un enlace simple o un enlace doble, o una de sus sales y Probucof.

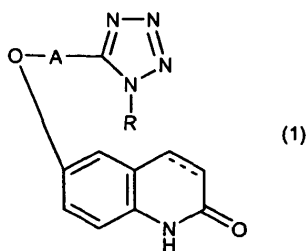
10 2. Un agente para su uso en la prevención y el tratamiento de la arteriosclerosis que comprende una combinación de al menos uno de los derivados de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo (1) según lo expuesto en la reivindicación 1 y Probucof.

15 3. Un agente para su uso en la prevención y el tratamiento de enfermedades renales que comprende una combinación de al menos uno de los derivados de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo (1) según lo expuesto en la reivindicación 1 y Probucof.

20 4. Un agente para su uso en la prevención y el tratamiento de la diabetes que comprende una combinación de al menos uno de los derivados de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo (1) según lo expuesto en la reivindicación 1 y Probucof.

5. Una combinación de al menos uno de los derivados de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo (1) según lo expuesto en la reivindicación 1 y Probucof para su uso en la inhibición del superóxido.

25 6. Un agente para su uso en la prevención y el tratamiento del infarto cerebral que comprende un inhibidor del superóxido que comprende una combinación de al menos uno de los derivados de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo de la fórmula:



30

en la que R es un grupo cicloalquilo, A es un grupo alquileo (C_1-C_6) y el enlace entre las posiciones 3 y 4 del núcleo de carbostirilo significa un enlace simple o un enlace doble, o una de sus sales y Probucof.

35 7. Un agente para su uso en la prevención y el tratamiento de la arteriosclerosis que comprende un inhibidor del superóxido que comprende una combinación de al menos uno de los derivados de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo (1) según lo expuesto en la reivindicación 6 y Probucof.

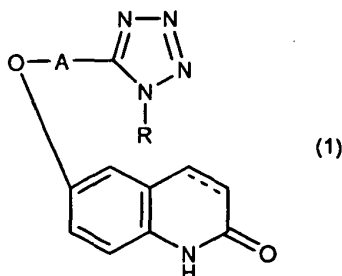
40 8. Un agente para su uso en la prevención y el tratamiento de enfermedades renales que comprende un inhibidor del superóxido que comprende una combinación de al menos uno de los derivados de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo (1) según lo expuesto en la reivindicación 6 y Probucof.

45 9. Un agente para su uso en la prevención y el tratamiento de la diabetes que comprende un inhibidor del superóxido que comprende una combinación de al menos uno de los derivados de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo (1) según lo expuesto en la reivindicación 6 y Probucof.

10. El agente para su uso en el tratamiento y la prevención de infarto cerebral, arteriosclerosis, enfermedades renales, diabetes e inhibición del superóxido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el derivado de

tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo es 6-[4-(1-ciclohexil-1H-tetrazol-5-il)butoxi]-3,4-dihidrocarbostirilo o una sal del mismo.

11. Un uso de una combinación de al menos uno de los derivados de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo de la fórmula:



5 en la que R es un grupo cicloalquilo, A es un grupo alquileo (C_1-C_6) y el enlace entre las posiciones 3 y 4 del núcleo de carbostirilo significa un enlace simple o un enlace doble, o una de sus sales, y Probucof, para la preparación de un fármaco para la prevención y el tratamiento del infarto cerebral.

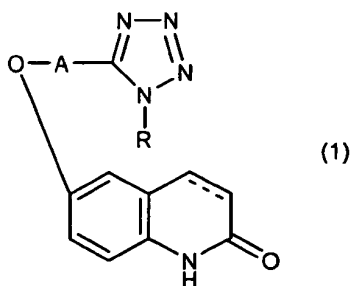
10 12. Un uso de una combinación de al menos uno de los derivados de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo (1) según lo expuesto en la reivindicación 11 y Probucof para la preparación de un fármaco para prevenir y tratar la arteriosclerosis.

15 13. Un uso de una combinación de al menos uno de los derivados de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo (1) según lo expuesto en la reivindicación 11 y Probucof para la preparación de un fármaco para prevenir y tratar enfermedades renales.

20 14. Un uso de una combinación de al menos uno de los derivados de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo (1) según lo expuesto en la reivindicación 11 y Probucof para la preparación de un fármaco para prevenir y tratar la diabetes.

15 15. Un uso de una combinación de al menos uno de los derivados de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo (1) según lo expuesto en la reivindicación 11 y Probucof para la preparación de un fármaco para inhibir el superóxido.

25 16. Un uso de un inhibidor del superóxido que comprende una combinación de al menos uno de los derivados de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo de la fórmula:



30 en la que R es un grupo cicloalquilo, A es un grupo alquileo (C_1-C_6) y el enlace entre las posiciones 3 y 4 del núcleo de carbostirilo significa un enlace simple o un enlace doble, o una de sus sales, y Probucof para la preparación de un fármaco para la prevención y el tratamiento del infarto cerebral.

35 17. Un uso de un inhibidor del superóxido que comprende una combinación de al menos uno de los derivados de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo (1) según lo expuesto en la reivindicación 16 y Probucof para la preparación de un fármaco para prevenir y tratar la arteriosclerosis.

40 18. Un uso de un inhibidor del superóxido que comprende una combinación de al menos uno de los derivados de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo (1) según lo expuesto en la reivindicación 16 y Probucof para la preparación de un fármaco para prevenir y tratar enfermedades renales.

45 19. Un uso de un inhibidor del superóxido que comprende una combinación de al menos uno de los derivados de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo (1) según lo expuesto en la reivindicación 16 y Probucof para la preparación de un fármaco para prevenir y tratar la diabetes.

20. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19, en el que el derivado de tetrazolilalcoxi-dihidrocarbostirilo (1) es 6-[4-(1-ciclohexil-1H-tetrazol-5-il)butoxi]-3,4-dihidrocarbostirilo o una de sus sales.

Fig. 1

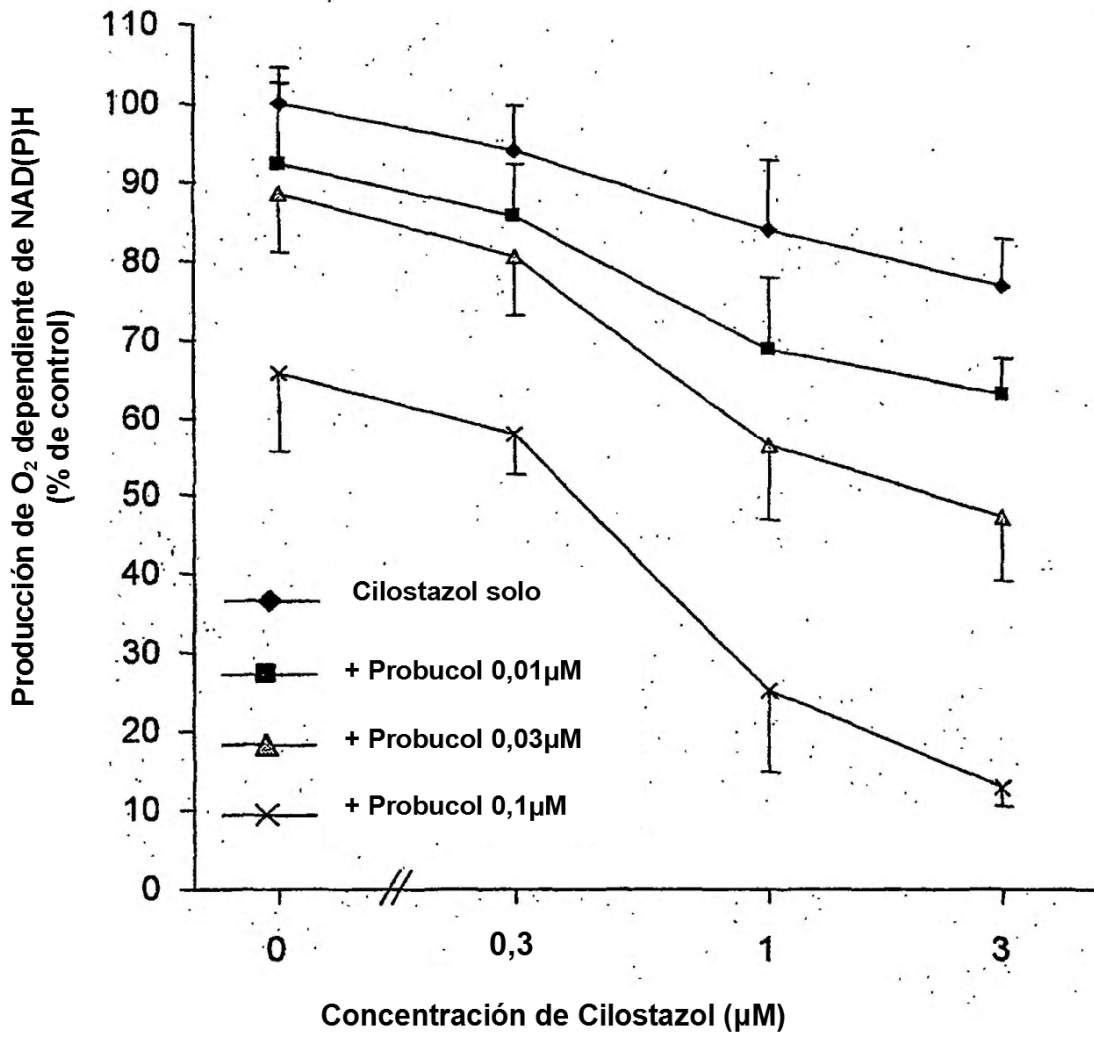


Fig. 2

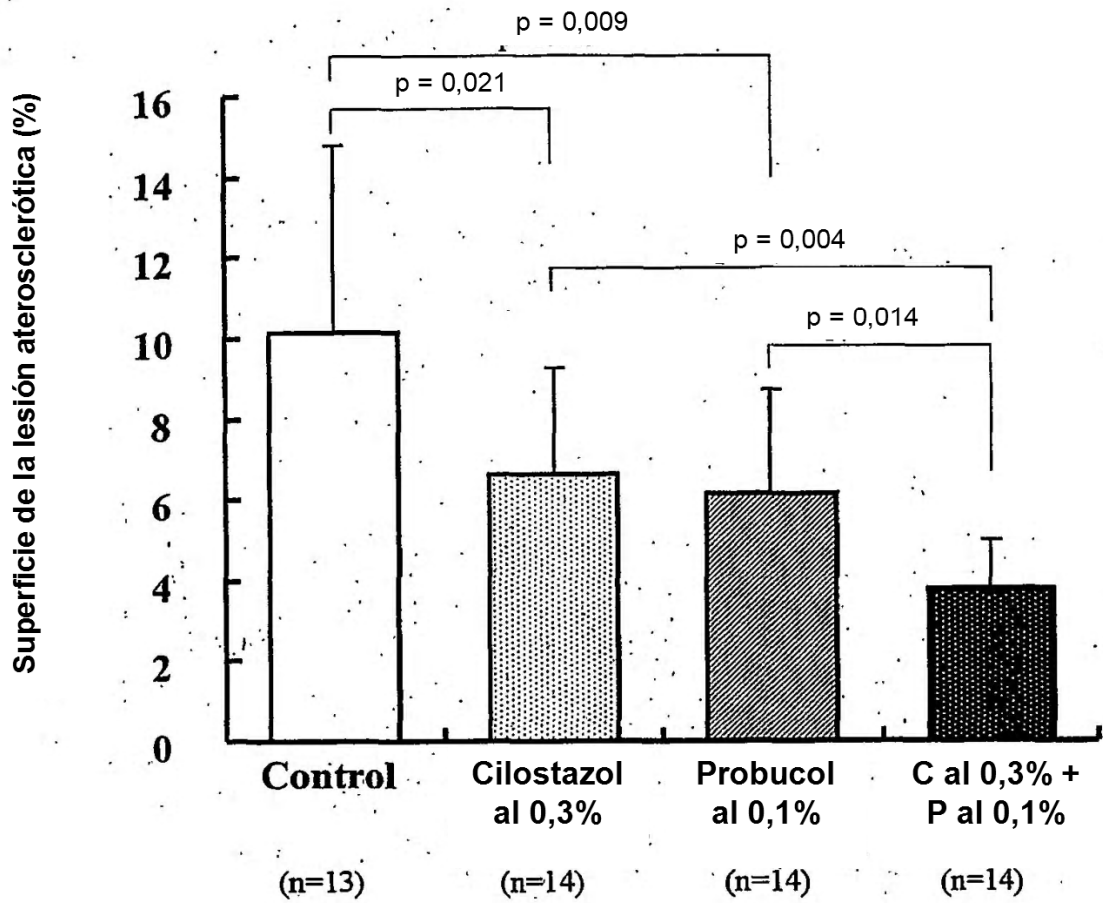


Fig. 3

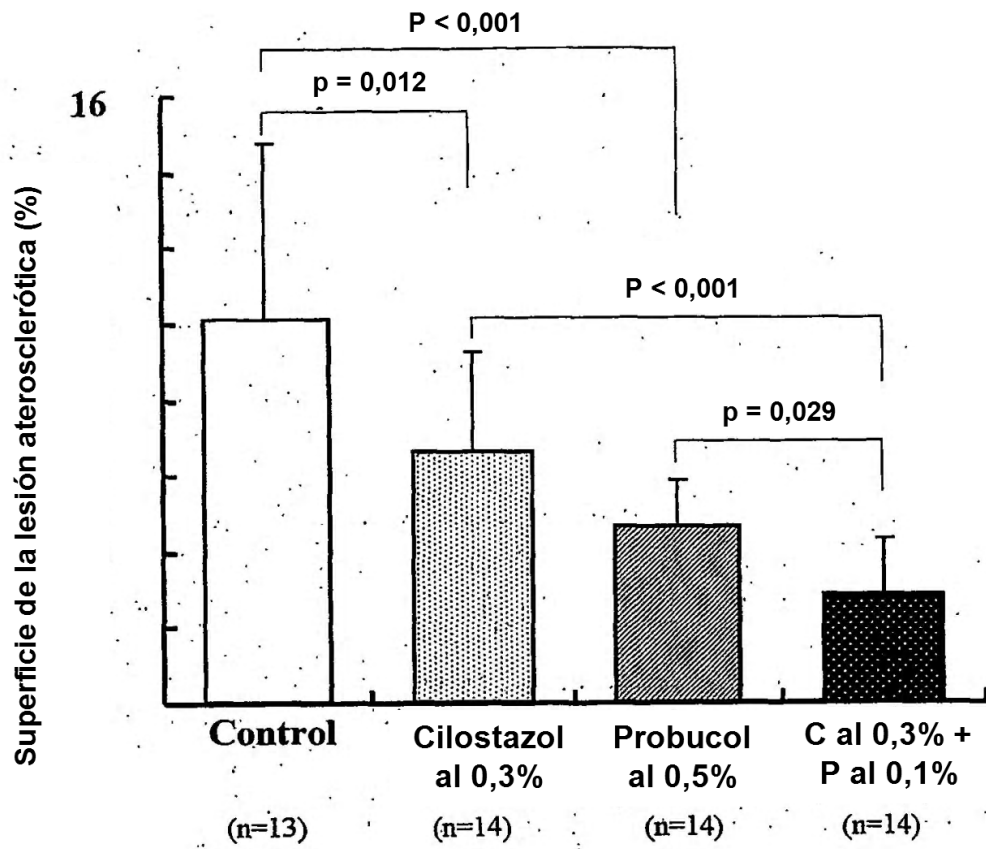
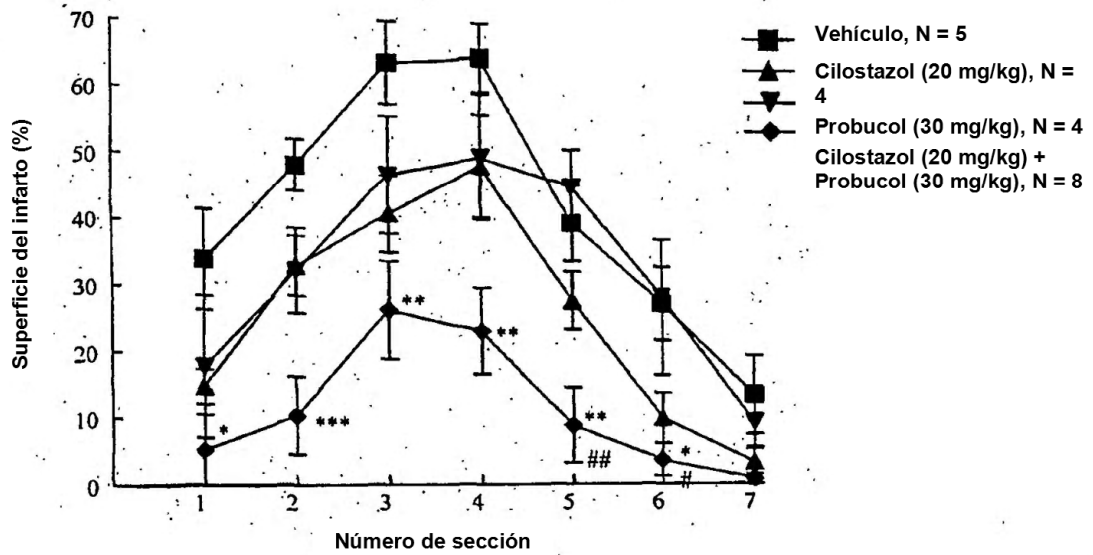


Fig. 4.



*P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 frente a vehículo; # P < 0,05; ## P < 0,01 frente al grupo de Probucol (30 mg/kg)

Fig. 5

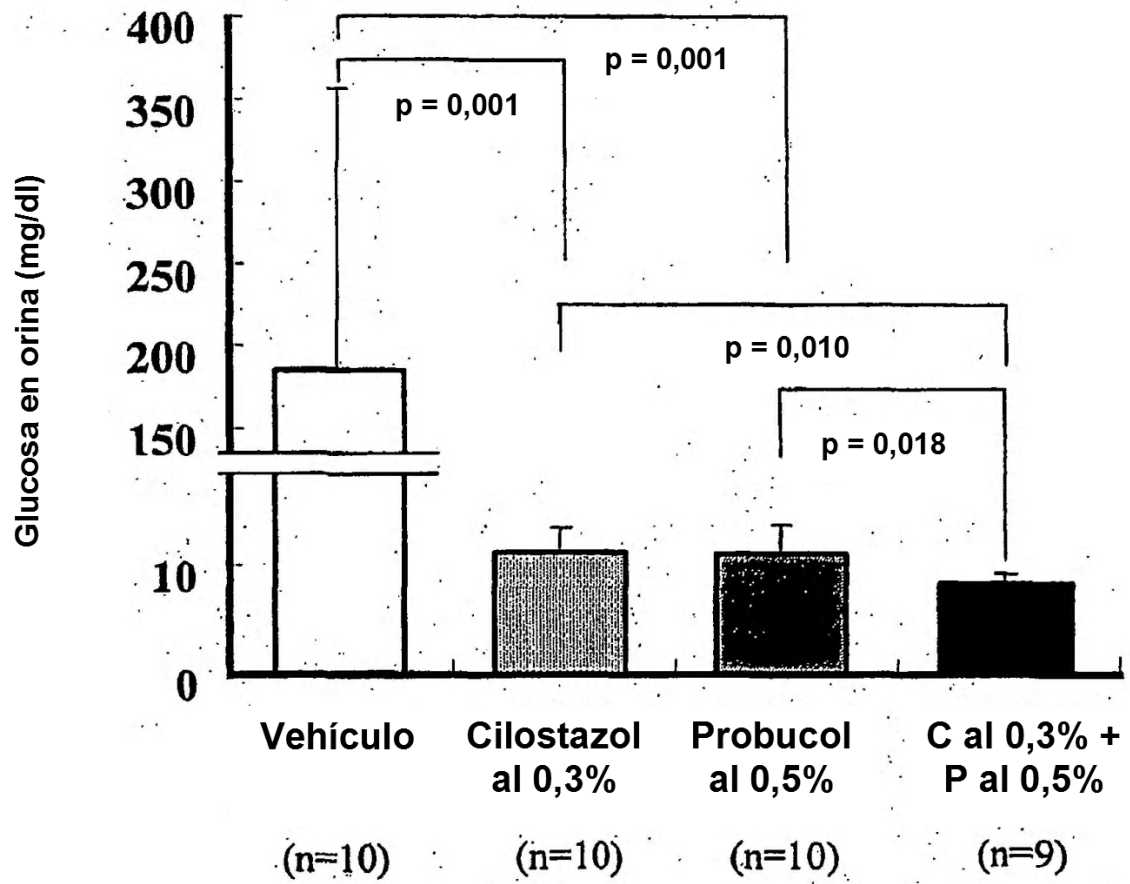


Fig. 6.

