

(11) Número de Publicação: **PT 1682111 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 31/167 (2007.10) **A61P 9/10** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2004.10.22	(73) Titular(es): SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH BRÜNINGSTRASSE 50 65929 FRANKFURT AM MAIN DE
(30) Prioridade(s): 2003.11.06 EP 03025512	
(43) Data de publicação do pedido: 2006.07.26	(72) Inventor(es): ANDREAS ZEIHNER DE STEFANIE DIMMELER DE CHRISTOPHER HEESCHEN DE HARTMUT RUETTEN DE
(45) Data e BPI da concessão: 2010.01.06 028/2010	(74) Mandatário: ELSA MARIA MARTINS BARREIROS AMARAL CANHÃO RUA DO PATROCÍNIO 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **POTENCIADORES DA TRANSCRIÇÃO DA ENOS PARA UTILIZAÇÃO NA TERAPIA CELULAR DE DOENÇAS CARDÍACAS ISQUÉMICAS**

(57) Resumo:

RESUMO

"POTENCIADORES DA TRANSCRIÇÃO DE ENOS PARA UTILIZAÇÃO NA TERAPIA CELULAR DE DOENÇAS CARDÍACAS ISQUÉMICAS"

A presente invenção refere-se à utilização de compostos que potenciam a transcrição da sintase do óxido nítrico (eNOS), para o tratamento de células estaminais e progenitoras, na terapia celular de doentes com doenças cardíacas isquémicas, tais como doença cardíaca coronária ou cardiomiopatia isquémica. O tratamento de tais células que são isoladas da medula óssea, por exemplo, com um potenciador da transcrição de eNOS antes da sua administração, melhora a sua actividade funcional e melhora a neovascularização do coração e regeneração cardíaca.

DESCRIÇÃO

"POTENCIADORES DA TRANSCRIÇÃO DA ENOS PARA UTILIZAÇÃO NA TERAPIA CELULAR DE DOENÇAS CARDÍACAS ISQUÉMICAS"

A presente invenção refere-se à utilização de compostos que potenciam a transcrição da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS), para o tratamento de células estaminais e progenitoras na terapia celular de doentes com doenças isquémicas cardíacas, tais como doença cardíaca coronária ou cardiomiopatia isquémica. O tratamento de tais células que, por exemplo, podem ser isoladas da medula óssea, com um potenciador da transcrição da eNOS antes da sua administração, melhora a sua actividade funcional e melhora a neovascularização do coração e regeneração cardíaca.

A insuficiência cardíaca pós-enfarte permanece uma causa principal da morbidade e mortalidade em doentes com uma doença cardíaca isquémica, tais como doença cardíaca coronária ou cardiomiopatia isquémica. Embora a reperfusão imediata da artéria obstruída tenha reduzido significativamente as taxas de mortalidade prematura, os processos de remodelação ventricular, caracterizados pela expansão progressiva da área do enfarte e dilatação da cavidade ventricular esquerda, resulta, muitas vezes, no desenvolvimento de insuficiência cardíaca em doentes que sobrevivem a um enfarte agudo do miocárdio. O objectivo principal da remodelação reversa seria a estimulação da neovascularização, bem como o aumento da regeneração dos miócitos cardíacos dentro da área do enfarte.

Os resultados de pesquisas recentes estabeleceram uma função fundamental para células estaminais e progenitoras endoteliais na neovascularização pós-natal e regeneração cardíaca. A melhoria da neovascularização após isquemia crítica é uma opção terapêutica importante após acontecimentos, tais como, por exemplo, enfarte do miocárdio ou isquemia dos membros. Até recentemente, acreditava-se que a neovascularização do tecido isquémico no adulto estava restrita à migração e proliferação de células endoteliais maduras, um processo denominado angiogénese. Entretanto, provas crescentes sugerem que as células progenitoras endoteliais em circulação (EPC) se alojam em locais de isquemia e contribuem para a formação de novos vasos sanguíneos (C. Kalka *et al.*, Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 2000, 97:3422-7). Em analogia ao desenvolvimento embrionário dos vasos sanguíneos de progenitores endoteliais primitivos (angioblastos), este processo é referido como vasculogénese.

A importância das células progenitoras em circulação é demonstrada pelo facto de que a inibição genética do seu recrutamento inibe a angiogénese tumoral. As EPC podem ser mobilizadas da medula óssea para a circulação através do factor de crescimento endotelial (VEGF) ou factor derivado de células estromais (SDF)-1. Tanto o VEGF como o SDF-1 são profundamente regulados positivamente nos tecidos hipóxicos, sugerindo que o VEGF e o SDF-1 constituem sinais de orientação para recrutar células progenitoras em circulação para potenciar os mecanismos de reparação endógenos após isquemia crítica (S. H. Lee *et al.*, Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction, N. Engl. J. Med. 2000, 342:626-33).

Estudos experimentais recentes suportam que as células progenitoras, obtidas da medula óssea ou sangue, contribuem para a regeneração do miocárdio após enfarte e potenciam a neovascularização do miocárdio isquémico (A. A. Kocher *et al.*, Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function, *Nat. Med.* 2001, 7:430-6; D. Orlic *et al.*, Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium, *Nature* 2001, 410:701-5; S. Fuchs *et al.*, Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study, *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003, 41:1721-4). Além disso, a infusão intravenosa ou injeção intramiocárdial das células progenitoras adultas resultou na melhoria sustentada da função cardíaca, após enfarte do miocárdio induzido experimentalmente e em doentes com doença cardíaca isquémica crónica. Foi demonstrado clinicamente que a infusão intracoronária de células estaminais e progenitoras adultas é possível e segura tanto em doentes com enfarte agudo do miocárdio como em doentes com cardiomiopatia isquémica crónica (B. Assmus *et al.*, Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI), *Circulation* 2002, 106:3009-17; B. E. Strauer *et al.*, Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans, *Circulation* 2002, 106:1913-8). Tal terapia celular, que num doente é efectuada como uma terapia celular autóloga, está associada com melhorias significativas na função global e regional do ventrículo esquerdo.

Um pré-requisito para o sucesso da terapia celular em doentes com uma doença cardíaca isquémica é a orientação e, deste modo, enxerto das células transplantadas na área alvo no coração, especialmente se é escolhida uma via intravascular de administração. Embora o número de células estaminais e progenitoras da medula óssea de vários tipos, tais como células estaminais e progenitoras mesenquimais e hematopoiéticas, seja semelhante em doentes com uma doença cardíaca isquémica e em controlos saudáveis, infelizmente a actividade funcional das células estaminais e progenitoras de doentes com uma doença cardíaca isquémica é reduzida e a sua capacidade de orientação diminuída. Esta insuficiência funcional das células estaminais e progenitoras de doentes com doença cardíaca coronária limita o seu potencial terapêutico para a terapia celular clínica. Isto aplica-se especialmente quando é utilizada uma via de administração intravascular que requer que as células progenitoras extravasem contra um gradiente quimioatractivo, de modo a invadir e alojarem-se no tecido isquémico. A actividade funcional e capacidade de orientação de células estaminais e progenitoras podem ser avaliadas por determinação da sua actividade formadora de colónias ou actividade migratória, por exemplo, em resposta ao VEGF ou SDF-1. A monitorização da migração ou actividade formadora de colónia das células estaminais e progenitoras antes da terapia celular, pode servir como um teste complementar para identificar doentes que podem obter um benefício superior com a terapia celular. Por outro lado, foi descrito recentemente que as EPC derivadas de medula óssea totalmente funcionais de murganhos doadores saudáveis restauram a angiogénese cardíaca do hospedeiro senescente num modelo de neovascularização insuficiente em murganho (J. M. Edelberg et al., Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic

function, *Circ. Res.* 2002, 90:e89-e93). Assim, será vantajoso se, através de meios adequados, por exemplo, através da manipulação farmacológica ou genética antes da administração, a actividade das células estaminais e progenitoras funcionalmente insuficiente de doentes com doenças cardíacas isquémicas pudesse ser restaurada e, deste modo, o benefício terapêutico da terapia celular em doentes poderia ser aumentado.

De um modo surpreendente, verificou-se que a função insuficiente das células estaminais e progenitoras de doentes com uma doença cardíaca isquémica pode ser consideravelmente melhorada por incubação com um potenciador da transcrição da sintase do óxido nítrico endotelial. A expressão aumentada da sintase do óxido nítrico endotelial, produzida por tratamento *ex vivo* das células do doente com uma transcrição de eNOS aumentada antes da sua administração, melhora ou restaura a actividade funcional destas células, como tem sido demonstrado *in vitro*, utilizando um ensaio de transmigração e *in vivo*, num modelo de isquemia nos membros posteriores em murganhos, como apresentado abaixo. Neste último modelo, a neovascularização após ligação da artéria femoral é determinada via determinação do fluxo sanguíneo e tem-se verificado que o efeito benéfico das células estaminais e progenitoras administradas, de doentes com doença cardíaca isquémica, é substancialmente aumentado após pré-tratamento com potenciador da transcrição de eNOS. Que o efeito observado é, de facto, provocado pela actividade aumentada da sintase NO endotelial e formação de NO, tem sido provado pelo efeito de extinção causado pela N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), que é conhecida como sendo um inibidor da eNOS e da formação de NO. A incubação das células estaminais e progenitoras de doentes com uma doença cardíaca isquémica na

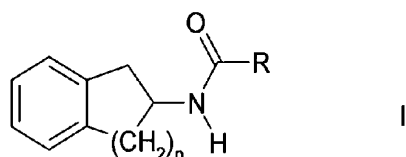
presença de ambos, um potenciador da transcrição da eNOS e L-NMMA, não traz uma melhoria da actividade funcional.

Assim, um objectivo da presente invenção é um potenciador da transcrição da sintase do óxido nítrico endotelial para utilização no tratamento *ex vivo* de células estaminais e/ou progenitoras, na terapia celular de um doente com uma doença cardíaca isquémica, bem como a utilização de um potenciador da transcrição da sintase do óxido nítrico endotelial para a produção de um medicamento para o tratamento *ex vivo* das células estaminais e/ou progenitoras, na terapia celular de um doente com uma doença cardíaca isquémica e um processo para produzir um medicamento para o tratamento *ex vivo* de células estaminais e/ou progenitoras, na terapia celular de um doente com uma doença cardíaca isquémica, compreendendo empregar um potenciador da transcrição da sintase do óxido nítrico endotelial.

A sintase de NO endotelial (eNOS, NOS-III) pertence a um grupo de três isoenzimas que produzem a molécula mensageira óxido nítrico (monóxido de azoto; NO) por oxidação da arginina. O NO derivado do endotélio é de importância central em vários mecanismos cardiovasculares chave. Tem um efeito vasodilatador e inibe a agregação das plaquetas, a adesão dos leucócitos ao endotélio e a proliferação das células do músculo liso íntimo. A sintase de NO endotelial está sujeita a regulação fisiológica e patofisiológica, ao nível transcripcional e pós-transcripcional. A regulação positiva da eNOS em células endoteliais é um meio eficaz de tratamento e prevenção de várias patologias, incluindo doenças cardiovasculares, tais como doença cardíaca coronária e aterogénese. Os compostos que potenciam a transcrição da eNOS são descritos, por exemplo, nos documentos WO 02/064146, WO 02/064545, WO 02/064546 e WO 02/064565. O efeito benéfico na

capacidade funcional das células estaminais e progenitoras, produzido pelo tratamento *ex vivo* de tais células, na terapia celular dos doentes com doenças cardíacas isquémicas não está descrito nestas referências. Foi descrita recentemente a importância da eNOS para a mobilização das células estaminais e progenitoras da medula óssea para o sistema circulatório (A. Aicher *et al.*, Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells, *Nat. Med.* 2003; 9: 1370-1376).

Numa forma de realização preferida da presente invenção, são utilizados os potenciadores da transcrição da eNOS que são divulgados nos documentos WO 02/064146, WO 02/064545, WO 02/064546 e WO 02/064565 e documentos de patente correspondente, tais como US 2003/0008915, US 2003/0022935, US 2003/0022939 e US 2003/0055093. Numa forma de realização mais preferida da presente invenção, é utilizado um potenciador da transcrição da eNOS de fórmula I,



na qual

n é 1, 2 ou 3;

R é fenilo ou o grupo Hetar, os quais são não substituídos ou suportam um, dois, três ou quatro substituintes idênticos ou diferentes, seleccionados do grupo consistindo de F; Cl; Br; alquilo-C₁-C₃; alcoxiC₁-C₃-metilo; 2-amino-

3,3,3-trifluoropropil-; CF_3 ; alcanodi C_3-C_5 -ilo; fenilo;
heteroarilo; benzilo; heteroaril-metil-; OH;
alcoxilo- C_1-C_3 ; fenoxilo; trifluorometoxilo;
2,2,2-trifluoroetoxilo; (alquil- C_1-C_4)COO; (alquil-
 C_1-C_3)mercapto; fenilmercapto; (alquil- C_1-C_3)sulfonilo;
fenilsulfonilo; NH_2 ; (alquil- C_1-C_4)amino; di(alquil-
 C_1-C_4)amino; (alquilo- C_1-C_3)-CONH-; (alquilo- C_1-C_3)- SO_2NH -;
(alquilo- C_1-C_3)-CO; fenil-CO; $-OCH_2O-$; $-OCF_2O-$; $-CH_2CH_2O-$;
COO(alquilo- C_1-C_4); $-CONH_2$; $-CONH$ (alquil- C_1-C_4);
 $-CON$ (di(alquil- C_1-C_4)); CN; $-SO_2NH_2$; $-SO_2NH$ (alquil- C_1-C_4);
 $-SO_2N$ (di(alquil- C_1-C_4)); pirrolidinilo; piperidinilo;
morfolinilo; e tiomorfolinilo; em que todos os grupos
heteroarilo, fenilo, contendo heteroarilo e contendo
fenilo, que estão opcionalmente presentes nos referidos
substituintes do referido fenilo ou no referido grupo
Hetar, são não substituídos ou substituídos por um, dois,
três ou quatro substituintes idênticos ou diferentes,
seleccionados do grupo consistindo de F, Cl, Br, CN,
alquilo- C_1-C_3 , OH, alcoxilo- C_1-C_3 e CF_3 ;

heteroarilo e o grupo Hetar, independentemente um do outro,
são um heterociclo monocíclico ou bicíclico, aromático com
5 membros a 10 membros, contendo um, dois, três ou quatro
heteroátomos idênticos ou diferentes seleccionados do grupo
consistindo de N, O e S;

em qualquer uma das suas formas estereoisoméricas ou uma
sua mistura em qualquer proporção ou um seu sal
farmaceuticamente aceitável.

Se nos compostos de fórmula I, os grupos ou substituintes
tais como, por exemplo, fenilo, heteroarilo, alquilo etc., podem

estar presentes várias vezes, todos eles, independentemente uns dos outros, têm os significados indicados e podem, assim, em cada caso, ser idênticos ou diferentes uns dos outros. Um exemplo é o grupo di(alquil-C₁-C₄)amino, no qual os substituintes alquilo podem ser idênticos ou diferentes.

Os resíduos alquilo podem ser lineares ou ramificados, acíclicos ou cíclicos. Isto aplica-se também quando eles são parte de outros grupos, por exemplo, grupos alcoxilo, grupos alcoxycarbonilo ou grupos amino, ou quando são substituídos.

Exemplos de grupos alquilo são metilo, etilo, propilo, butilo, os n isómeros destes resíduos, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo. O termo alquilo aqui, também inclui expressamente, resíduos cicloalquilo e resíduos cicloalquilalquil- (alquilo substituído por cicloalquilo), contendo, pelo menos, três átomos de carbono. Exemplos para tais resíduos cicloalquilo são ciclopropilo e ciclobutilo. Os grupos cicloalquilo podem ser substituídos com um ou mais resíduos alquilo-(C₁-C₄) idênticos ou diferentes, em particular por metilo. Além disso, a não ser que seja referido o contrário, o termo alquilo aqui, inclui também resíduos alquilo não substituídos, bem como resíduos alquilo que são substituídos por um ou mais, por exemplo, um, dois, três ou quatro resíduos idênticos ou diferentes, por exemplo, grupos fenilo. Nos resíduos alquilo substituídos, por exemplo, fenilalquilo, os substituintes podem estar presentes em qualquer posição desejada.

Exemplos de alcanodiC₃-C₅-ilo são os grupos -CH₂CH₂CH₂-, -CH₂-CH(CH₃)-, -CH₂CH₂CH₂CH₂- e -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-.

Se não for referido o contrário, os resíduos fenilo e os resíduos heterocíclicos mencionados acima incluindo resíduos heteroarilo, podem ser não substituídos ou podem suportar um, dois, três ou quatro dos substituintes indicados na definição acima que podem estar presentes em qualquer posição desejada. Nos resíduos fenilo mono-substituídos, os substituintes podem estar na posição 2, na posição 3 ou na posição 4, nos resíduos fenilo di-substituídos, os substituintes podem estar na posição 2,3, posição 2,4, posição 2,5, posição 2,6, posição 3,4 ou posição 3,5. Nos resíduos fenilo tri-substituídos, os substituintes podem estar na posição 2,3,4, na posição 2,3,5, na posição 2,3,6, na posição 2,4,5, na posição 2,4,6 ou na posição 3,4,5. Nos resíduos fenilo substituídos quatro vezes, os substituintes podem estar na posição 2,3,4,5, na posição 2,3,4,6 ou na posição 2,3,5,6.

A não ser que seja referido o contrário, os resíduos heteroarilo e resíduos heterocíclicos, tais como o grupo Hetar são, de um modo preferido, derivados de heterociclos que contêm um, dois ou três heteroátomos idênticos ou diferentes, de um modo mais preferido, de heterociclos que contêm um ou dois heteroátomos idênticos ou diferentes. Os anéis nos grupos heterocíclicos são, de um modo preferido, anéis com 5 membros, anéis com 6 membros ou anéis com 7 membros, de um modo mais preferido, anéis com 5 membros ou anéis com 6 membros. Exemplos de sistemas heterocíclicos, monocíclicos e bicíclicos, a partir dos quais podem derivar os resíduos que ocorrem nos compostos de fórmula I, são pirrole, furano, tiofeno, imidazole, pirazole, 1,2,3-triazole, 1,2,4-triazole, 1,3-dioxole, 1,3-oxazole (= oxazole), 1,2-oxazole (= isoxazole), 1,3-tiazole (= tiazole), 1,2-tiazole (= isotiazole), tetrazole, piridina, piridazina, pirimidina, pirazina, pirano, tiopirano, 1,4-dioxina,

1,2-oxazina, 1,3-oxazina, 1,4-oxazina, 1,2-tiazina, 1,3-tiazina, 1,4-tiazina, 1,2,3-triazina, 1,2,4-triazina, 1,3,5-triazina, 1,2,4,5-tetrazina, azepina, 1,2-diazepina, 1,3-diazepina, 1,4-diazepina, 1,3-oxazepina, 1,3-tiazepina, indole, benzotiofeno, benzofurano, benzotiazole, benzoimidazole, benzodioxole, quinolina, isoquinolina, cinolina, quinazolina, quinoxalina, ftalazina, tienotiofenos, 1,8-naftiridina e outras naftiridinas, pteridina ou fenotiazina, cada uma delas na forma saturada (forma per-hidro) ou na forma parcialmente insaturada (por exemplo, na forma di-hidro ou na forma tetra-hidro) ou na forma maximamente saturada, no caso das respectivas formas serem conhecidas e estáveis e compreendidas pela definição dos compostos. O termo heteroarilo, como aqui utilizado, compreende resíduos bicíclicos nos quais ambos os ciclos são aromáticos, bem como resíduos bicíclicos nos quais apenas um ciclo é aromático. Independentemente, o mesmo se aplica ao grupo Hetar. Os heterociclos adequados incluem, por exemplo, os heterociclos saturados pirrolidina, piperidina, morfolina e tiomorfolina. Os heterociclos insaturados podem conter, por exemplo, uma, duas ou três duplas ligações dentro do sistema de anel. Os anéis com membros 5 e 6 membros podem, em particular, ser também aromáticos.

Os substituintes que podem derivar destes heterociclos podem ser ligados via qualquer átomo de carbono adequado. Os resíduos derivados de heterociclos de azoto que suportam um átomo de hidrogénio ou um substituinte num átomo de azoto no anel, por exemplo, pirrole, imidazole, pirrolidina, morfolina, piperazina, podem também ser ligados via um átomo de azoto no anel, em particular, se o respectivo resíduo heterocíclico está ligado a um átomo de carbono. Por exemplo, um resíduo tienilo pode estar presente como resíduo 2-tienilo ou resíduo 3-tienilo, um resíduo

furilo como o resíduo 2-furilo ou resíduo 3-furilo, um resíduo piridilo como o resíduo 2-piridilo, resíduo 3-piridilo ou resíduo 4-piridilo, um resíduo piperidinilo como o resíduo 1-piperidinilo (= resíduo piperidino), resíduo 2-piperidinilo, resíduo 3-piperidinilo ou resíduo 4-piperidinilo, um resíduo (tio)morfolinilo como o resíduo 2-(tio)morfolinilo, resíduo 3-(tio)morfolinilo ou resíduo 4-(tio)morfolinilo (= resíduo tiomorfolino). Um resíduo derivado de 1,3-tiazole ou imidazole, que está ligado via um átomo de carbono, pode estar ligado via a posição 2, posição 4 ou posição 5.

No caso de um grupo heterocíclico ser substituído, pode suportar um, dois, três ou quatro substituintes idênticos ou diferentes. Os substituintes nos heterociclos podem estar presentes em quaisquer posições desejadas, por exemplo, num resíduo 2-tienilo ou resíduo 2-furilo, na posição 3 e/ou na posição 4 e/ou na posição 5, num resíduo 3-tienilo ou resíduo 3-furilo na posição 2 e/ou na posição 4 e/ou na posição 5, num resíduo 2-piridilo na posição 3 e/ou na posição 4 e/ou na posição 5 e/ou na posição 6, num resíduo 3-piridilo na posição 2 e/ou na posição 4 e/ou na posição 5 e/ou na posição 6, num resíduo 4-piridilo na posição 2 e/ou na posição 3 e/ou na posição 5 e/ou na posição 6. Os heterociclos de azoto adequados podem também estar presentes como N-óxidos ou como sais quaternários contendo um contra-íão que é derivado de um ácido farmacologicamente aceitável. Os resíduos piridilo, por exemplo, podem estar presentes como piridina-N-óxidos.

A presente invenção inclui todas as formas estereoisoméricas dos compostos da fórmula I. Os centros de assimetria que estão presentes nos compostos de fórmula I, todos independentemente uns dos outros, podem ter uma configuração S ou configuração R.

A invenção inclui todos os enantiómeros e diastereómeros possíveis e misturas de dois ou mais estereoisómeros, por exemplo, misturas de enantiómeros e/ou diastereómeros, em todas as proporções. Assim, os compostos utilizados de acordo com a presente invenção, que podem existir como enantiómeros, podem estar presentes na forma enantiomericamente pura, como antipodas levorrotatórios e dextrorrotatórios, na forma de racematos e na forma de misturas de dois enantiómeros em todas as proporções. No caso de um isomerismo cis/trans, a invenção inclui as formas cis e as formas trans, bem como as misturas destas formas em todas as proporções. Todas estas formas estão englobadas na presente invenção. A preparação dos estereoisómeros individuais pode ser efectuada, se desejado, por separação de uma mistura através de métodos convencionais, por exemplo, por cromatografia ou cristalização, através da utilização de materiais de partida estereoquimicamente uniformes para a síntese ou por síntese estereosselectiva. Opcionalmente, pode ser efectuada uma derivatização antes de uma separação de estereoisómeros. A separação de uma mistura de estereoisómeros pode ser efectuada na fase dos compostos da fórmula I ou na fase de um intermediário durante a síntese. A presente invenção inclui também todas as formas tautoméricas dos compostos de fórmula I.

No caso dos compostos de acordo com a fórmula I conterem um ou mais grupos acídicos ou básicos, a invenção compreende também os seus sais farmacologicamente ou toxicologicamente aceitáveis correspondentes, em particular os seus sais farmacologicamente utilizáveis. Assim, os compostos de fórmula I que contêm grupos acídicos podem estar presentes nestes grupos e podem ser utilizados de acordo com a invenção, por exemplo, como sais de metais alcalinos, sais de metais alcalino terrosos ou como sais de amónio. Exemplos mais específicos de tais sais incluem sais

de sódio, sais de potássio, sais de cálcio, sais de magnésio ou sais com amónia ou aminas orgânicas, tais como, por exemplo, etilamina, etanolamina, trietanolamina ou aminoácidos. Os compostos de fórmula I que contêm um ou mais grupos básicos, *i. e.*, grupos que podem ser protonados, podem estar presentes e podem ser utilizados de acordo com a invenção na forma dos seus sais de adição com ácidos orgânicos ou inorgânicos. Exemplos de ácidos adequados incluem cloreto de hidrogénio, brometo de hidrogénio, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanossulfónico, ácido p-toluenossulfónico, ácidos naftalenodissulfónicos, ácido oxálico, ácido acético, ácido tartárico, ácido láctico, ácido salicílico, ácido benzóico, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido piválico, ácido dietilacético, ácido malónico, ácido succínico, ácido pimélico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido málico, ácido sulfamínico, ácido fenilpropiónico, ácido glucónico, ácido ascórbico, ácido isonicotínico, ácido cítrico, ácido adípico e outros ácidos conhecidos pelos especialistas na técnica. Se os compostos de fórmula I contêm, simultaneamente, grupos acídicos e básicos na molécula, a invenção inclui também, além das formas de sais mencionadas, sais internos ou betaínas (zwitteriões). Os respectivos sais podem ser obtidos a partir dos compostos de fórmula I através de métodos convencionais que são conhecidos pelos especialistas na técnica como, por exemplo, colocando em contacto estes com um ácido ou base orgânico ou inorgânico num solvente ou dispersante, ou por permuta aniónica ou permuta catiónica com outros sais.

Além disso, a presente invenção inclui a utilização de solvatos dos compostos da fórmula I, por exemplo, hidratos ou aductos com álcoois e metabolitos activos dos compostos de fórmula I e de derivados e profármacos dos compostos da

fórmula I que contém grupos fisiologicamente toleráveis e passíveis de clivagem, por exemplo, ésteres, amidas e compostos nos quais o grupo N-H representado na fórmula I é substituído com um grupo N-alquilo, tal como N-metilo ou com um grupo N-acilo, tal como N-acetilo ou N-argininilo, incluindo sais farmacologicamente aceitáveis formados nos grupos funcionais presentes no grupo N-acilo, desde que exibam a actividade desejada quando utilizados de acordo com a presente invenção sob condições adequadas para o tratamento *ex vivo* de células estaminais e progenitoras.

Os compostos particularmente preferidos da fórmula I são utilizados de acordo com a presente invenção, nos quais uma ou mais das suas variáveis têm os significados preferidos apresentados abaixo, com todas as combinações dos significados preferidos sendo um tema da presente invenção. Relativamente a todos os compostos preferidos da fórmula I, a presente invenção inclui também a utilização de todas as formas estereoisoméricas e suas misturas em todas as proporções e dos seus sais farmacologicamente aceitáveis.

O n , *i. e.*, o número de grupos CH_2 na cadeia de polimetileno $(\text{CH}_2)_n$ é, de um modo preferido, 1 ou 3. Numa forma de realização da invenção, é utilizado um composto da fórmula I no qual n é 1, *i. e.*, a indan-2-ilamida de um ácido da fórmula R-COOH . Noutra forma de realização da invenção, é utilizado um composto da fórmula, no qual n é 3, *i. e.*, a 6,7,8,9-tetra-hidro-5H-benzociclo-hepten-6-ilamida de um ácido da fórmula R-COOH .

O R é, de um modo preferido, seleccionado de 4-fluorofenilo, 4-clorofenilo, 4-bromofenilo, 4-(C_1 - C_3 -alcoxi)fenilo, 4-trifluorometoxifenilo, 2-bromo-4-fluorofenilo, 2-cloro-4-fluorofenilo, 3,4-dimetilfenilo, 2,4-dimetilfenilo,

4-cloro-2-metilfenilo, 2-hidroxi-4-metilfenilo,
2-hidroxi-4-etoxifenilo, 2-metoxi-4-metilfenilo, 4-fenoxifenilo,
3-fluoro-4-metilfenilo, benzo[1,3]dioxol-5-ilo,
2,2-difluorobenzo[1,3]dioxol-5-ilo, 2,3-di-hidrobenzofuran-5-
ilo, 1-(4-clorofenil)-5-trifluorometil-1H-pirazole-4-ilo,
1-(4-fluorofenil)-3,5-dimetil-1H-pirazole-4-ilo,
1H-benzotriazole-5-ilo, 1H-indole-4-ilo, 1H-indole-6-ilo,
1-isopropil-2-trifluorometil-1H-benzoimidazole-5-ilo,
1-metil-3-oxo-1,2,3,4-tetra-hidro-quinoxalina-6-ilo,
1-fenil-5-trifluorometil-1H-pirazole-4-ilo, 2-(2-hidropiridin-4-
il)-1H-benzoimidazole-5-ilo, 2-(4-cianofenil)-1H-benzoimidazole-
5-ilo, 2,4-dimetiloxazole-5-ilo, 2,4-dimetilpirimidina-5-ilo,
2,4-dimetiltiazole-5-ilo, 2,5-dimetil-1H-pirrole-3-ilo,
2,5-dimetil-1-fenil-1H-pirrole-3-ilo, 2,5-dimetil-1-piridin-4-
ilmetil-1H-pirrolilo, 2,5-dimetil-2H-pirazole-3-ilo,
2,6-dicloropirid-3-ilo, 2,6-dimetoxipirid-3-ilo,
2,6-dimetilpirid-3-ilo, 2-amino-4,6-dimetilpirid-3-ilo, 2-amino-
6-cloropirid-3-ilo, 2-amino-pirid-3-ilo, 2-cloro-6-metilpirid-3-
ilo, 2-cloropirid-4-ilo, 2-ciclopropil-4-metil-tiazole-5-ilo,
2-dimetilamino-4-metiltiazole-5-ilo, 2-dimetilaminopirid-4-ilo,
2-etil-5-metil-2H-pirazole-3-ilo, 2-hidroxi-6-metilpirid-3-ilo,
2-metil-1H-benzoimidazole-5-ilo, 2-metil-3H-benzoimidazole-5-
ilo, 2-metilpirid-3-ilo, 2-metil-6-trifluorometilpirid-3-ilo,
2-metiltiazole-5-ilo, 2-(morfolin-4-il)piridin-4-ilo,
2-(morfolin-4-il)pirimidina-5-ilo, 2-(pirrolidina-1-il)piridin-
4-ilo, 3,5-dimetil-1H-pirazole-4-ilo, 3-amino-5,6-
dimetilpirazina-2-ilo, 3-amino-5-metilpirazina-2-ilo,
3-aminopirazina-2-ilo, 3-dimetilamino-4-metilfenilo,
3-dimetilaminofenilo, 3H-benzoimidazole-5-ilo,
1H-benzoimidazole-5-ilo, 3-metanossulfonilamino-2-metilfenilo,
3-metanossulfonilaminofenilo, 3-metil-isoxazole-4-ilo,
3-(morfolin-4-il)fenilo, 3-(piperidin-1-il)fenilo,

3-(pirrolidin-1-il)fenilo, 4-(2,2,2-trifluoroetoxi)fenilo,
4,6-dimetilpirid-3-ilo, 4-amino-2-etilsulfanilpirimidina-5-ilo,
4-amino-2-metilpirimidina-5-ilo,
4-cloro-3-metanossulfonilamino-fenilo,
4-cloro-3-sulfamoilfenilo, 4-metil-3-metilaminofenilo,
4-metiltiazole-5-ilo, pirid-2-ilo, 5,6,7,8-tetra-hidroquinolina-
3-ilo, 5-amino-1-fenil-1H-pirazole-4-ilo, 5-metanossulfonil-2-
metilfenilo, 5-metil-1-fenilo-1H-pirazole-4-ilo,
5-metilisoxazole-3-ilo, 5-metilpirid-3-ilo, 5-metilpirazina-2-
ilo, 6-cloropirid-3-ilo, 6-cianopirid-3-ilo,
6-dimetilaminopirid-3-ilo, 6-etinilpirid-3-ilo,
6-metoximetilpirid-3-ilo, 6-metoxipirid-3-ilo,
6-metil-2-metilaminopirid-3-ilo, 6-metilaminopirazina-2-ilo,
6-metilpirid-3-ilo, 6-(morfolino-4-il)pirid-3-ilo,
6-(pirrolidina-1-il)pirid-3-ilo, imidazo[1,2-a]piridina-2-ilo,
6-trifluorometilpirid-3-ilo, e pirimidina-4-ilo.

O heteroarilo é, de um modo preferido, um heterociclo monocíclico ou bicíclico, aromático, com 5 membros a 10 membros, contendo um, dois ou três, de um modo mais preferido, um ou dois heteroátomos idênticos ou diferentes, seleccionados do grupos consistindo de N, O e S. O heteroarilo é, de um modo muito preferido, seleccionado do grupo consistindo de furilo, pirrolilo, tienilo, tiazolilo, isotiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, pirazolilo, imidazolilo, piridazinilo, pirazinilo, piridilo, pirimidinilo, benzodioxolilo, benzoimidazolilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, quinoxalinilo, quinazolilo, indolilo, benzofuranilo, benzotiofenilo e indazolilo.

O grupo Hetar é, de um modo preferido, um heterociclo monocíclico ou bicíclico, aromático, com 5 membros a 10 membros,

contendo um, dois ou três, de um modo mais preferido, um ou dois, heteroátomos idênticos ou diferentes, seleccionados do grupo consistindo de N, O e S. O grupo Hetar é, de um modo muito preferido, seleccionado do grupo consistindo de furilo, pirrolilo, tienilo, tiazolilo, isotiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, pirazolilo, imidazolilo, piridazinilo, pirazinilo, piridilo, pirimidinilo, benzodioxolilo, benzoimidazolilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, quinoxalinilo, quinazolilo, indolilo, benzofuranilo, benzotiofenilo e indazolilo.

Numa forma de realização especialmente preferida da presente invenção, é utilizado um composto de fórmula I no qual o número n é 1 e o grupo R tem um dos significados indicados acima, dos quais R é, de um modo preferido, seleccionado, em qualquer uma das suas formas estereoisoméricas ou uma sua mistura em qualquer proporção, ou um seu sal farmaceuticamente aceitável. Noutra forma de realização especialmente preferida da presente invenção, é utilizado um composto de fórmula I no qual o número n é 3 e o grupo R tem um dos significados referidos acima dos quais R é, de um modo preferido, seleccionado, em qualquer uma das suas formas estereoisoméricas ou uma sua mistura em qualquer proporção ou um seu sal farmaceuticamente aceitável. Exemplos de tais compostos especialmente preferidos de fórmula I são 4-fluoro-N-(indan-2-il)benzamida e indan-2-ilamida do ácido 2,2-difluorobenzo[1,3]dioxol-5-carboxílico.

Os compostos utilizados de acordo com a presente invenção, especificamente os compostos da fórmula I e seus precursores podem ser sintetizados de acordo com métodos descritos na literatura ou métodos análogos conhecidos pelo especialista na técnica. Os compostos da fórmula I podem ser sintetizados, por

exemplo, a partir do ácido respectivo da fórmula $R-COOH$ ou um seu derivado e a amina respectiva, por formação de uma ligação amida. Para esta finalidade, a amina respectiva pode ser dissolvida num solvente inerte como, por exemplo, água, isopropanol, diclorometano, tetra-hidrofurano, tolueno ou dioxano e feita reagir na presença de base como, por exemplo, trietilamina ou hidróxido de sódio, com um derivado de ácido carboxílico apropriado, por exemplo, um cloreto de ácido carboxílico, por exemplo, à temperatura ambiente. Os compostos de acordo com a fórmula I podem também ser obtidos através de uma reacção de junção da amina respectiva com o ácido respectivo na presença de uma base como, por exemplo, diisopropiletilamina, e um reagente de junção como, por exemplo, uma carbodiimida, tais como díciclo-hexilcarbodiimida ou TOTU, num solvente inerte como, por exemplo, tetra-hidrofurano, dioxano ou dimetilformamida, por exemplo, à temperatura ambiente. Se desejado, a acilamina obtida pode depois ser tornada funcional para obter outros compostos. Todas as reacções para a síntese dos compostos da fórmula I são bem conhecidas *per se* pelo especialista na técnica e podem ser efectuadas sob condições convencionais, de acordo com ou de um modo análogo aos processos descritos na literatura, por exemplo em Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie (Methods of Organic Chemistry), Thieme-Verlag, Estugarda ou Organic Reactions, John Wiley & Sons, Nova Iorque. Dependendo das circunstâncias do caso individual, de modo a evitar as reacções secundárias durante a síntese de um composto da fórmula I, pode ser necessário ou vantajoso para bloquear temporariamente os grupos funcionais por introdução de grupos protectores e desprotege-los numa fase posterior da síntese ou introdução de grupos funcionais na forma de grupos precursores, por exemplo, um grupo nitro que é um precursor de um grupo amino, que num passo reaccional posterior

são convertidos nos grupos funcionais desejados. Tais estratégias de síntese e grupos de protecção e grupos precursores que são adequados num caso individual são conhecidos pelo especialista na técnica. Se desejado, os compostos da fórmula I podem ser purificados por processos de purificação convencionais, por exemplo, por recristalização ou cromatografia. Os compostos de partida para a preparação dos compostos da fórmula I estão disponíveis comercialmente ou podem ser preparados de acordo com ou analogamente a processos da literatura.

O isolamento e posterior manuseamento das células estaminais e progenitoras adultas que são tratadas com um potenciador da transcrição de eNOS de acordo com a presente invenção, podem ser efectuados de acordo com métodos convencionais que estão descritos na literatura ou analogamente a métodos descritos na literatura e são bem conhecidos pelos especialistas na técnica. As células utilizadas podem ser obtidas a partir da medula óssea do doente que é obtida pelo processo de aspiração convencional e, podem, assim ser células estaminais e progenitoras da medula óssea ou células estaminais e progenitoras derivadas da medula óssea. A medula óssea é processada através do processo convencional que pode incluir um fraccionamento por centrifugação por gradiente de densidade para isolar as células mononucleares. Após lavagem, as células são suspensas num meio de cultura celular convencional, por exemplo, um meio X-Vivo disponível comercialmente (Cambrex, East Rutherford, Nova Jersey, EUA) que é um meio livre de soro e é adequado para aplicação em humanos. Como outro meio de cultura celular no qual as células podem ser suspensas para posterior manuseamento, que é adequado para investigação experimental, pode ser mencionado o meio RPMI 1640, disponível comercialmente (Sigma, St. Louis,

Missouri, EUA). Geralmente, a suspensão celular obtida consiste em populações celulares heterogéneas, incluindo células progenitoras hematopoiéticas. A suspensão celular obtida pode ser caracterizada e, por exemplo, as populações de células estaminais e progenitoras hematopoiéticas e mesenquimais identificadas por técnicas convencionais, tal como análises por citometria de fluxo utilizando anticorpos convencionais. A actividade funcional das células pode ser avaliada por exemplo, num ensaio de unidades formadoras de colónia ou por determinação da sua capacidade de migração em resposta ao VEGF ou SDF-1, como mencionado acima e descrito em maior detalhe abaixo. A suspensão celular contém células que são ou que podem desenvolver-se em células progenitoras endoteliais que, por sua vez, podem desenvolver-se em células endoteliais e estimular a formação de novos vasos sanguíneos, *i. e.*, promover a neovascularização da área do enfarte. Além da medula óssea, as células progenitoras utilizadas de acordo com a presente invenção podem também ser obtidas, por exemplo, a partir de tecido adiposo ou de sangue em circulação do doente, através de processos semelhantes, para proporcionar células progenitoras derivadas de tecido adiposo ou células progenitoras derivadas de sangue em circulação, respectivamente. As populações celulares obtidas do sangue são, normalmente cultivadas *ex vivo* durante vários dias antes da administração. Como células progenitoras endoteliais presentes na circulação sistémica são derivadas das células de medula óssea, um termo como "derivado de medula óssea" pode ser utilizado adequadamente para se referir a células obtidas a partir da medula óssea do doente, bem como a células obtidas a partir de sangue recolhido.

O tratamento *ex vivo* da suspensão obtida de células estaminais e progenitoras de doentes com doenças cardíacas

isquémicas para melhorar a sua actividade funcional insuficiente e capacidade de orientação e, assim, a neovascularização, após a sua re-administração, pode ser efectuado sob condições convencionais para cultura de células. A concentração das células na suspensão, que pode ser uma suspensão num meio adequado, tal como X-Vivo, por exemplo, que uma formulação completa e não requer a adição de outras substâncias, pode estar na gama de cerca de 100000 por mL a cerca de 5000000 por mL, por exemplo, cerca de 1000000 por mL. O pH do meio utilizado para o tratamento com o potenciador da expressão da eNOS está, geralmente, na gama de cerca de 6,5 a cerca de 7,5, em particular, de cerca de 6,8 a cerca de 7,3, uma vez que é o seu pH durante o manuseamento das células. A suspensão celular é misturada com uma solução de potenciador da transcrição da eNOS num solvente farmacologicamente aceitável adequado, por exemplo, água ou um solvente orgânico, tal como um álcool como o etanol ou um poliglicol como o polipropilenoglicol ou dimetilsulfóxido ou uma mistura de tais solventes. A solução do potenciador da transcrição de eNOS pode conter também auxiliares farmacologicamente aceitáveis, tais como sais, substâncias tamponantes ou solubilizadores. A concentração do potenciador da transcrição de eNOS na mistura resultante é, geralmente, de cerca de 1 nM a cerca de 1 mM, em particular de cerca de 0,1 μ M a cerca de 100 μ M, por exemplo, de cerca de 1 μ M a cerca de 10 μ M, tal como cerca de 5 μ M. A mistura é depois incubada sob condições estéreis a uma temperatura que, normalmente, é de cerca de 37 °C, numa atmosfera húmida que pode consistir em ar contendo cerca de 5% de dióxido de carbono, por exemplo. O período de incubação depende das circunstâncias do caso individual, por exemplo, da eficácia do potenciador da transcrição de eNOS empregue. Geralmente, é de cerca desde 6 horas a cerca de 48 horas, por exemplo, de cerca de 12 horas

até cerca de 24 horas, tal como cerca de 18 horas. Se as células progenitoras obtidas a partir de sangue em circulação são utilizadas de acordo com a invenção, a incubação com o potenciador da transcrição de eNOS pode ocorrer durante o cultivo mencionado acima que é normalmente efectuado com tais células. A mistura obtida pode ser administrada directamente ao doente sem processamento, uma vez que o potenciador de transcrição de eNOS é uma substância de fármaco que também exerce efeitos favoráveis no organismo. Alternativamente, as células tratadas podem ser inicialmente separadas da mistura obtida por centrifugação, lavadas, por exemplo, com solução tampão, ressuspensas de novo, por exemplo, num meio, tal como X-Vivo, e esta suspensão administrada ao doente.

Um outro tema da presente invenção é o processo descrito acima para a produção de células estaminais e/ou progenitoras com actividade funcional melhorada por tratamento com um potenciador da transcrição de eNOS, *i. e.*, um processo para a produção de células estaminais e/ou progenitoras com actividade funcional melhorada, compreendendo o tratamento *ex vivo* de células estaminais e/ou progenitoras de um doente com uma doença cardíaca isquémica com um potenciador da transcrição da sintase óxido nítrico endotelial. Os temas da presente invenção são também um medicamento (ou composição farmacêutica ou preparação farmacêutica) que compreende um potenciador da transcrição de eNOS, por exemplo, um composto de fórmula I e/ou um seu sal farmacêuticamente aceitável e, opcionalmente, um ou mais auxiliares, tais como sais ou substâncias tampão ou solubilizadores, para utilização no tratamento *ex vivo* de células estaminais e progenitoras na terapia celular de um doente com uma doença cardíaca isquémica, bem como um kit ou embalagem, para utilização em tal tratamento, que contém tal

medicamento em conjunto com outros itens para tal utilização, por exemplo, um solvente ou meio adequado para dissolver um potenciador de transcrição de eNOS sólido e instruções para utilização. O medicamento pode, por exemplo, compreender um potenciador de transcrição de eNOS sólido contido num frasco, numa ampola ou num recipiente que é depois dissolvido antes da adição do potenciador da transcrição de eNOS à suspensão celular ou uma solução de um potenciador de transcrição de eNOS que pode ser adicionado directamente à suspensão celular.

A suspensão de células estaminais e/ou progenitoras, obtida após tratamento com o potenciador da transcrição de eNOS, pode ser administrada ao doente sistemicamente, por injeção ou infusão intravenosa, ou directamente no coração ou vasos sanguíneos, perto do coração por injeção intramiocárdial ou injeção ou infusão intracoronária, por exemplo. A administração directamente no miocárdio enfartado ou nos vasos sanguíneos coronários pode ocorrer durante a cirurgia ou via um processo de cateterização como explicado abaixo em maior detalhe. Os processos de administração adequados são estabelecidos na técnica e bem conhecidos pelo especialista na técnica.

O termo doença cardíaca isquémica como aqui utilizado é para ser entendido como compreendendo qualquer doença cardíaca na qual ocorre ou ocorreu um fornecimento de sangue insuficiente a uma ou mais regiões do miocárdio ou na qual é desejada uma melhoria da neovascularização ou neoangiogénese pelo médico e inclui doenças tais como, por exemplo, doença cardíaca coronária, doença arterial coronária, síndrome coronária aguda, angina de peito, enfarte do miocárdio, cardiomiopatia isquémica e insuficiência cardíaca congestiva cuja última doença pode ser devida a uma isquemia. Uma doença cardíaca isquémica que pode

ser tratada de acordo com a presente invenção pode ser uma doença aguda ou crónica.

Exemplos

Síntese de potenciadores da transcrição de eNOS

4-fluoro-N-(indan-2-il)benzamida

Foram adicionadas 43,70 g (258 mmol) de cloridrato de 2-aminoindano e 53,43 g (528 mmol) de trietilamina a 250 mL de tetra-hidrofurano, foram adicionadas 42,89 g (270 mmol) de cloreto de 4-fluorobenzoílo e a mistura foi agitada durante 2 horas à temperatura ambiente. A mistura resultante foi depois vertida numa mistura de gelo/HCl, o precipitado obtido foi filtrado, lavado com uma solução de NaHCO₃ e água e foi seco *in vacuo*. O produto em bruto foi cristalizado a partir de metanol. Rendimento: 47,8 g (73%) de um produto cristalino branco.

Ponto de Fusão: 167 °C

Espectro de Massa: 256,1 [M+H⁺]

Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, d₆-DMSO): 2,96 (dd, 2H, H1/3), 3,25 (dd, 2H, H3/1), 4,70 (sexteto, 1H, H2), 7,12-7,19 (m, 2H, H4,7/5,6), 7,20-7,28 (m, 2H, H5,6/4,7), 7,30 (t, 2H, H3', 5'), 7,95 (dd, 2H, H2',6'), 8,68 (d, 1H, NH).

Foram sintetizados outros compostos da fórmula I de acordo com processos, tais como os seguintes exemplos de processos A, B e C.

Processo A

Foram dissolvidas 0,5 mmol (96 mg) de cloridrato de 1-etil-3-(3-(dimetilamino)propil)carbodiimida e 0,5 mmol (87 µL) de diisopropiletilamina (DIPEA) em 2,5 mL de diclorometano (DCM), adicionadas a uma solução de 0,5 mmol do respectivo ácido em 2,5 mL de DCM e agitadas durante 10 minutos à temperatura ambiente. Depois foram adicionadas 0,7 mmol da respectiva amina e a agitação foi continuada de um dia para o outro. A solução resultante foi depois lavada 2 vezes com HCl 2 N e uma vez com uma solução saturada de KHCO₃, seca sob MgSO₄ e filtrada. O resíduo obtido após evaporação até à secura foi cristalizado a partir de acetato de etilo/hexano ou uma mistura de metanol/éter dietílico ou purificado por HPLC.

Processo B

A 0,75 mmol do ácido respectivo e 271 µL (1,575 mmol) de DIPEA em 5 mL de tetra-hidrofurano, foram adicionadas 271 mg (0,825 mmol) de tetrafluoroborato de O-[(ciano-etoxicarbonilmetileno)amino]-N,N,N',N'-tetrametilurónio (TOTU) (dissolvidas em 1 mL de dimetilformamida (DMF)). Após 15 minutos de agitação à temperatura ambiente, foi adicionada uma mistura de 0,9 mmol do cloridrato de amina respectivo e 172 µL (1 mmol) de DIPEA em 1 mL de DMF. Após agitação durante 6 horas, a mistura foi filtrada e evaporada. O

resíduo foi recolhido em acetato de etilo e lavado sucessivamente com 20 mL de HCl 1 N e 20 mL de solução de hidrogenocarbonato de sódio a 5%. A fase orgânica resultante foi evaporada e purificada por HPLC preparativa (RP 18, acetonitrilo/água).

Processo C

Foram misturadas 2,5 mmol da amina respectiva com 550 mg de trietilamina e 5 mL de dioxano, depois foram adicionadas 2,5 mmol do cloreto do ácido carboxílico respectivo e a mistura agitada à temperatura ambiente durante um período de 2 horas. A mistura resultante foi depois vertida numa mistura de gelo/HCl, o precipitado obtido foi extraído com acetato de etilo, seco com sulfato de sódio e concentrado. O resíduo assim obtido foi fraccionado por HPLC preparativa.

Como um exemplo dos compostos preparados, é mencionado o seguinte.

Indan-2-ilamida do ácido 2,2-difluorobenzo[1,3]dioxol-5-carboxílico

Ponto de fusão: 147,5 °C

Espectro de massa: 318,2 [M+H⁺]

Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, d₆-DMSO): 2,91-2,99 (m, 2H, H-1/H-3), 3,22-3,30 (m, 2H, H-3/H-1), 4,69 (sext., 1H, H-2), 7,13-7,19 (m, 2H, H-4, H-7 ou H-5, H-6), 7,21-7,28 (m, 2H,

H-4,H-7 ou H-5, H-6), 7,50 (d, 1H, H-6'/H7'), 7,80 (d, 1H, H-7'/H6), 7,88 (s, 1H, H4'), 8,71 (d, 1H, NH).

Medição da activação da transcrição de eNOS

A activação da transcrição de eNOS foi medida como descrito em detalhe em Li *et al.*, Activation of protein kinase C alpha and/or epsilon enhances transcription of the human endothelial nitric oxide synthase gene, *Mol. Pharmacol.* 1998, 53:630-637. Resumidamente, um fragmento 5' longo de 3,5 kB do codão de partida do gene de eNOS foi clonado, sequenciado e clonado em plasmídeos de expressão de luciferase de pirilampo para monitorizar a activação do promotor de eNOS por actividade do gene repórter. Foi utilizada uma linha celular endotelial humana transfectada de modo estável e expressando esta construção repórter-promotor para o teste dos compostos. As células foram incubadas durante 18 horas com os compostos. Todos os compostos foram dissolvidos antes em dimetilsulfóxido estéril (DMSO). Foi permitida uma concentração final de DMSO a 0,5% em meio completo. A indução da expressão do gene repórter nestas células foi medida utilizando um sistema de ensaio de luciferase convencional (Promega, Madison, Wisconsin, USA; Cat. N° E150) de acordo com as instruções do fabricante. A indução da luciferase em células incubadas com os compostos foi comparada à das células incubadas apenas com solvente. A proporção de ambas as actividades (proporção da indução da transcrição, TIR) foi representada graficamente em função da concentração do composto. Tipicamente, os valores de TIR começaram a concentrações baixas a uma proporção de 1, indicando ausência do efeito do composto e estende-se até ao valor de TIR máximo, TIR(Máx.) que indica o aumento da transcrição de eNOS. Foram determinados graficamente

os valores de EC₅₀ das proporções de indução da transcrição em função da concentração do composto.

Isolamento de células da medula óssea

Os aspirados da medula óssea foram recolhidos de um total de 9 controlos saudáveis e 25 doentes com doença cardíaca coronária estável e um historial de enfarte do miocárdio com idades entre 18 e 75 anos. Os doentes apresentaram anormalidades no movimento parietal regional, um vaso nativo patente, enxerto de *bypass* de artéria coronária ou artéria colateral. Uma vez que a isquemia do miocárdio é conhecida como mobilizadora de células progenitoras derivadas da medula óssea, foram excluídos os doentes com evidência para isquemia do miocárdio passível de indução ou de repouso durante as últimas 4 semanas. Outros critérios de exclusão foram a presença de infecção activa ou crónica, operações ou trauma, pelo menos, nos últimos dois meses, evidência de doenças malignas, hemorragia gastrointestinal activa, hipertensão descontrolada acima de 160/100 mm de Hg, acidente vascular cerebral no período dos últimos dois anos, aneurisma AV, insuficiência renal ou hepática, trombocitopenia com contagem de plaquetas <100000/ μ L, anemia com hemoglobina < 8,5 g/dL, atraso mental, participação noutro ensaio clínico ou indisponibilidade para participar. Foram também excluídas as grávidas e mulheres em pré-menopausa. O comité de ética do Hospital de Johann Wolfgang Goethe University of Frankfurt, Alemanha, aprovou o protocolo e o estudo foi efectuado de acordo com a Declaração de Helsínquia. Foi obtido de cada doente uma declaração de consentimento escrita.

Foram obtidos um total de 50 mL de aspirado de medula óssea de cada participante. As células estaminais e progenitoras de medula óssea foram isoladas por centrifugação em gradiente de densidade. Após dois passos de lavagem, as células foram ressuspensas em 10 mL de meio X-vivo 10 (sem gentamicina e vermelho de fenol; Cambrex, East Rutherford, Nova Jersey, EUA). A suspensão celular consiste em populações celulares heterogêneas, incluindo células progenitoras hematopoiéticas.

As células estaminais e progenitoras de medula óssea foram analisadas por meio de citometria de fluxo. Para a identificação de populações de células estaminais e progenitoras hematopoiéticas e mesenquimais, foram utilizados anticorpos conjugados directamente contra CD45 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA), CD34 (marcado com FITC; BD Pharmingen, San Diego, Califórnia, EUA), CD133 (marcado com APC; BD Pharmingen), CD14 (marcado com FITC; BD Pharmingen), CXCR4 (marcado com APC, BD Pharmingen) e CD49d (marcado com APC; BD Pharmingen) humanos. O painel de linhagem foi obtido de BD Pharmingen (contendo CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, e CD56 marcado com FITC) e foi completado por utilização adicional de anticorpos conjugados com FITC directamente contra CD15 e glicoforina A (ambas da BD Pharmingen).

Tratamento de células de medula óssea com potenciadores da transcrição de eNOS

Para incubação com o potenciador da transcrição de eNOS, 4-fluoro-N-(indan-2-il)benzamida, foi misturado 1 mL de uma suspensão de 1000000 células estaminais e progenitoras em 1 mL de meio de cultura de células X-Vivo 10 com 1 µL de uma solução

de 4-fluoro-N-(indan-2-il)benzamida em dimetilsulfóxido (DMSO) que foi preparada por dissolução de 1,275 mg de 4-fluoro-N-(indan-2-il)benzamida em 1 mL de DMSO. A concentração de 4-fluoro-N-(indan-2-il)benzamida na mistura resultante foi de 5 μ M. Para incubação com o potenciador de transcrição de eNOS 4-fluoro-N-(indan-2-il)benzamida e com o inibidor de eNOS N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), além da 4-fluoro-N-(indan-2-il)benzamida foi adicionada L-NMMA (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) à suspensão celular para dar uma mistura resultante com uma concentração de 4-fluoro-N-(indan-2-il)benzamida de 5 μ M e uma concentração de L-NMMA de 1 mM. A incubação foi efectuada durante 18 horas a uma temperatura de 37 °C sob uma atmosfera de ar contendo 5% de dióxido de carbono. As células foram isoladas por centrifugação, lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em X-Vivo 10.

Determinação da actividade funcional das células da medula óssea

Para avaliar a actividade de formação de colónias, as células estaminais e progenitoras de medula óssea (1×10^5 por placa) foram semeadas em placas de metilcelulose (Methocult GF H4535, incluindo factor de células estaminais, factor de estimulação de colónias de granulócitos, factor de estimulação de colónias de granulócitos-macrófagos, interleucina-3, interleucina-6; CellSystems, St. Katharinen, Alemanha). As placas foram estudadas sob microscopia de contraste de fase e as unidades formadoras de colónias granulócitos-macrófagos (CFU-GM; colónias > 50 células) foram contadas após 14 dias de incubação.

Para avaliar a capacidade migratória das células estaminais e progenitoras de medula óssea, foi ressuspenso um total de 1×10^6 células estaminais e progenitoras de medula óssea em 250 μ L de X-Vivo 10 e colocadas na câmara superior de uma câmara de Boyden modificada cheia com matrigel (ensaio de invasão de BioCoat, tamanho do poro de 8 μ m, Becton Dickinson Labware, Two Oak Park, Bedford, Massachusetts, EUA). Depois, a câmara foi colocada numa placa de cultura de 24 poços contendo 500 μ L de meio básico endotelial (EBM) suplementado com solução salina tamponada com fosfatos (PBS), 50 ng/mL de VEGF ou 100 ng/mL de SDF-1. Após 24 horas de incubação a 37 °C, foram contadas as células transmigradas.

Modelo *in vivo* de isquemia em membros posteriores em murganhos

A capacidade de neovascularização das células estaminais e progenitoras de medula óssea foi investigada num modelo de isquemia dos membros posteriores em murganhos, através da utilização de murganhos nude NMRI atímicos com 8 a 10 semanas (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, EUA) pesando 18 a 22 g. A porção proximal da artéria femoral, incluindo o ramo superficial e profundo, bem como a porção distal da artéria safena foram ligados com sutura de seda 7-0. Todos os ramos arteriais entre a ligação foram obliterados utilizando um coagulador eléctrico. A pele subjacente foi fechada utilizando três agrafos cirúrgicos. Após 24 horas, foi injectada intravenosamente uma suspensão de células estaminais e progenitoras de medula óssea em X-Vivo 10 (5×10^4 , 5×10^5 ou 5×10^6 células/murganho; n = 5 por grupo). Após duas semanas, foi medida a perfusão do membro. Especificamente, foi

determinada a proporção de fluxo de sangue no membro isquémico (direito)/membro normal (esquerdo), utilizando um doseador de fluxo sanguíneo laser Doppler (Laser Doppler Perfusion Imager System, MoorLDI-Mark 2, Moor Instruments, Wilmington, Delaware, EUA). Antes de iniciar o exame, os murganhos foram colocados numa placa de aquecimento a 37 °C para minimizar as variações na temperatura. Após dois registos de imagens a cores do laser Doppler, foram calculadas as perfusões médias do membro isquémico e não isquémico com base no histograma de píxeis coloridos. Para minimizar as variáveis, incluindo temperatura e luz ambiente, a perfusão calculada foi expressa como a proporção de perfusão dos membros posteriores isquémico e não isquémico.

Para avaliação histológica, foi determinada a vascularização do tecido em secções congeladas de 5 µm do músculo aductor e semi-membranoso do membro isquémico e não isquémico. As células endoteliais foram coradas com anticorpo monoclonal marcado com FITC direccionado contra CD146 (Chemicon, Temecula, Califórnia, EUA). A densidade capilar foi expressa como o número de capilares/miócito. As células estaminais e progenitoras de medula óssea humanas foram identificadas por co-coloração com anticorpos marcados com HLA-DR-APC (BD Pharmingen, San Diego, Califórnia, EUA) e anticorpos marcados com CD146-FITC.

Administração de células de medula óssea a doentes

A administração de células de medula óssea tratadas com um potenciador de transcrição de eNOS a um doente pode ser realizada pelo seguinte processo de cateterização para o transplante de células progenitoras. É introduzido um cateter-balão através da técnica "over-the-wire" dilatado 0,5 mm num

stent previamente implantado. Para permitir a adesão e potencial trans-migração das células infundidas através do endotélio, o balão é insuflado com pressão baixa para bloquear completamente o fluxo sanguíneo durante 3 minutos, enquanto são infundidos distalmente 3,3 mL de suspensão de células progenitoras no balão de oclusão através da porta central do cateter de balão. Este processo é repetido 3 vezes para acomodar um total de 10 mL de infusão de suspensão de células progenitoras, interrompido durante 3 minutos de refluxo por esvaziamento do balão para minimizar uma isquemia muito extensa. Após conclusão do transplante de células intracoronariamente, a angiografia coronária é repetida para garantir a potência do vaso e fluxo desimpedido do material de contraste.

Foi efectuada a análise estatística através de métodos convencionais. Se não for referido o contrário, os resultados para as variáveis contínuas são expressos como médias \pm desvio padrão. Foram analisadas comparações entre os grupos através do teste de t (duas variáveis) ou ANOVA para experiências com mais de dois subgrupos. Foram efectuados os testes de gama pos hoc e comparações múltiplas par-a-par com o teste de t (duas variáveis) com ajuste de Bonferroni. A comparação das variáveis categóricas foi gerada pelo teste de Pearson χ^2 . Após a avaliação cega das características *in vitro* das células estaminais e progenitoras de medula óssea, os resultados dos testes foram agrupados com os resultados dos estudos *in vivo*. Para identificar determinantes *in vitro* das células estaminais e progenitoras da medula óssea para a sua capacidade de neovascularização *in vivo*, foi efectuada uma análise de regressão linear multivariada. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises

foram efectuadas com o SPSS 11,5 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA).

Foram obtidos os seguintes resultados.

Medição da activação da transcrição de eNOS

O composto 4-fluoro-N-(indan-2-il)benzamida exibiu, no ensaio de luciferase para activação da transcrição de eNOS, um valor de EC₅₀ de 0,8 µM e um valor de TIR(máx) de 4,10.

O composto indan-2-ilamida do ácido 2,2-difluorobenzo[1,3]dioxol-5-carboxílico exibiu, no ensaio de luciferase para a activação de transcrição de eNOS, um valor de EC₅₀ de 0,14 µM e um valor de TIR(máx) de 2,7.

Medição da actividade funcional das células de medula óssea

A actividade de formação de colónias das células estaminais e progenitoras de medula óssea dos doentes foi de 37,3 ± 25,0 CFU-GM/placa versus 113,8 ± 70,4 CFU-GM/placa para as células dos controlos saudáveis (P = 0,009).

A resposta migratória ao VEGF das células estaminais e progenitoras da medula óssea dos doentes foi de 34,0 ± 24,2 x 1000 células migradas versus 54,8 ± 29,3 x 1000 células migradas relativamente às células dos controlos saudáveis (P = 0,027).

A resposta migratória ao SDF-1 das células estaminais e progenitoras da medula óssea dos doentes foi de $46,3 \pm 26,2 \times 1000$ células migradas versus $108,6 \pm 40,4 \times 1000$ células migradas relativamente às células dos controlos saudáveis ($P < 0,001$).

A resposta migratória ao SDF-1 das células estaminais e progenitoras da medula óssea dos controlos saudáveis, após 18 horas do tratamento com PBS, foi de $126,5, 3 \pm 41,7 \times 1000$ de células migradas versus $111,2 \pm 38,5 \times 1000$ células migradas relativamente às células de controlos saudáveis após 18 horas de tratamento com 4-fluoro-N-(indan-2-il)benzamida ($5 \mu\text{M}$) ($P < 0,01$).

A resposta migratória ao SDF-1 das células estaminais e progenitoras de medula óssea de doentes, após 18 horas de tratamento com PBS foi de $38,0 \pm 13,7 \times 1000$ células migradas versus $74,0 \pm 20,7 \times 1000$ células migradas para as células dos doentes após 18 horas de tratamento com 4-fluoro-N-(indan-2-il)benzamida ($5 \mu\text{M}$) ($P < 0,01$).

A resposta migratória de SDF-1 das células estaminais e progenitoras de medula óssea dos doentes, após 18 horas de tratamento com 4-fluoro-N-(indan-2-il)benzamida ($5 \mu\text{M}$) e N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) (1 mM), foi de $23,9 \pm 7,4 \times 1000$ células migradas versus $74,3 \pm 21,5 \times 1000$ células migradas para as células dos controlos saudáveis após 18 horas de tratamento com 4-fluoro-(N-indan-2-il)benzamida ($5 \mu\text{M}$) ($P < 0,01$).

Modelo *in vivo* de isquemia nos membros posteriores em murganhos

Foi efectuada a comparação do efeito das células estaminais e progenitoras a uma concentração celular de 5×10^5 células/murganho à qual foi alcançado o efeito terapêutico máximo com células estaminais e progenitoras de medula óssea de controlos saudáveis.

Nos vários grupos de teste, foram determinados os seguintes valores de fluxo sanguíneo derivados de laser Doppler (proporção de fluxo de sangue no membro isquémico (direito)/membro normal (esquerdo) em percentagem) após administração das células estaminais e progenitoras de medula óssea, como especificado.

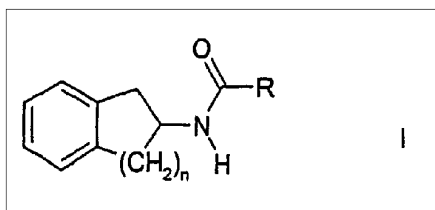
Sem células	$21,9 \pm 10,8\%$	n = 11
Células dos controlos saudáveis	$72,7 \pm 18,7\%$	n = 24
Células de doentes, não tratadas	$40,7 \pm 12,2\%$	n = 24
Células de doentes, tratadas durante 18 horas com 4-fluoro-N-(indan-2-il)benzamida 5 μ M	$59,1 \pm 11,6\%*$	n = 24
Células de doentes, tratadas durante 18 horas com 4-fluoro-N-(indan-2-il)benzamida 5 μ M e L-NMMA 1 mM	$39,7 \pm 10,3\%$	n = 18

* P < 0,001 versus Células de doentes, não tratadas

Lisboa, 3 de Fevereiro de 2010

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um potenciador de transcrição da sintase do óxido nítrico endotelial para a produção de um medicamento para o tratamento *ex vivo* de células estaminais e/ou progenitoras na terapia celular de um doente com uma doença cardíaca isquémica.
2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, no qual o potenciador de transcrição da sintase do óxido nítrico endotelial é um composto de fórmula I



na qual

n é 1, 2 ou 3;

R é fenilo ou o grupo Hetar, os quais são não substituídos ou suportam um, dois, três ou quatro substituintes idênticos ou diferentes, seleccionados do grupo consistindo de F; Cl; Br; alquilo-C₁-C₃; alcoxiC₁-C₃-metil-; 2-amino-3,3,3-trifluoropropil-; CF₃; alcanodiC₃-C₅-ilo; fenilo; heteroarilo; benzilo; heteroaril-metil-; OH; alcoxilo-C₁-C₃; fenoxilo; trifluorometoxilo; 2,2,2-trifluoroetoxilo; (alquil-C₁-C₄)COO; (alquil-C₁-C₃)mercapto; fenilmercapto;

(alquil-C₁-C₃) sulfonilo; fenilsulfonilo; NH₂;
(alquil-C₁-C₄) amino; di(alquil-C₁-C₄) amino;
(alquil-C₁-C₃)-CONH-; (alquil-C₁-C₃)-SO₂NH-;
(alquil-C₁-C₃)-CO; fenil-CO; -OCH₂O-; -OCF₂O-; -CH₂CH₂O-;
COO(alquilo-C₁-C₄); -CONH₂; -CONH(alquilo-C₁-C₄);
-CON(di(alquilo-C₁-C₄)); CN; -SO₂NH₂; -SO₂NH(alquilo-C₁-C₄);
-SO₂N(di(alquilo-C₁-C₄)); pirrolidinilo; piperidinilo;
morfolinilo; e tiomorfolinilo; em que todos os
heteroarilo, fenilo, grupos contendo heteroarilo e
contendo fenilo, que estão opcionalmente presentes nos
referidos substituintes do referido fenilo ou no referido
grupo Hetar, são não substituídos ou substituídos por um,
dois, três ou quatro substituintes idênticos ou
diferentes, seleccionados do grupo consistindo de F, Cl,
Br, CN, alquilo-C₁-C₃, OH, alcóxilo-C₁-C₃ e CF₃;

heteroarilo e o grupo Hetar, independentemente um do
outro, são um heterociclo monocíclico ou bicíclico,
aromático com 5 membros a 10 membros, contendo um, dois,
três ou quatro heteroátomos idênticos ou diferentes
seleccionados do grupo consistindo de N, O e S;

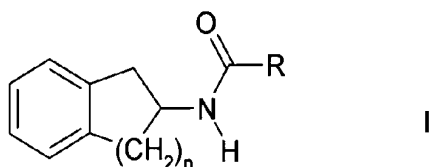
em qualquer uma das suas formas estereoisoméricas ou uma
sua mistura em qualquer proporção ou um seu sal
farmaceuticamente aceitável.

3. Utilização de acordo com a reivindicação 1 e/ou
reivindicação 2, na qual o potenciador de transcrição da
sintase do óxido nítrico endotelial é seleccionado de
4-fluoro-N-(indan-2-il)benzamida e indan-2-ilamida do ácido
2,2-difluorobenzo[1,3]dioxol-5-carboxílico.

4. Utilização de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 3, nas quais as células estaminais e/ou progenitoras são obtidas da medula óssea do doente.
5. Utilização de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 4, nas quais as células estaminais e/ou progenitoras são incubadas com um potenciador da transcrição da sintase do óxido nítrico endotelial durante um período de 6 horas a 48 horas.
6. Utilização de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 5, na qual a doença cardíaca isquémica é uma doença cardíaca coronária, doença da artéria coronária, síndrome coronário agudo, angina de peito, enfarte do miocárdio, cardiomiopatia isquémica ou insuficiência cardíaca congestiva.
7. Utilização de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 6, nas quais as células estaminais e/ou progenitoras tratadas são administradas ao doente por injeção intravenosa, intracoronária ou intramiocardial ou infusão.
8. Processo para produzir um medicamento para o tratamento *ex vivo* de células estaminais e/ou progenitoras na terapia celular de um doente com uma doença cardíaca isquémica, compreendendo empregar um potenciador de transcrição da sintase do óxido nítrico endotelial.
9. Processo para produzir células estaminais e/ou progenitoras com actividade funcional melhorada, compreendendo o tratamento *ex vivo* de células estaminais e/ou progenitoras de um doente com uma doença cardíaca isquémica com um

potenciador da transcrição da sintase do óxido nítrico endotelial.

10. Composição farmacêutica para utilização no tratamento *ex vivo* de células estaminais e/ou progenitoras, na terapia celular de um doente com uma doença cardíaca isquêmica, compreendendo um potenciador da transcrição da sintase do óxido nítrico endotelial.
11. Composição farmacêutica para utilizar no tratamento *ex vivo* de células estaminais e/ou progenitoras, na terapia celular de um doente com uma doença cardíaca isquêmica, compreendendo um potenciador da transcrição da sintase do óxido nítrico endotelial, como definido na reivindicação 2 e/ou reivindicação 3.
12. Potenciador de transcrição de sintase de óxido nítrico endotelial para utilização no tratamento *ex vivo* de células estaminais e/ou progenitoras, na terapia celular de um doente com uma doença cardíaca isquêmica.
13. Potenciador da transcrição da sintase do óxido nítrico endotelial da fórmula I



na qual

n é 1, 2 ou 3;

R é fenilo ou o grupo Hetar, os quais são não substituídos ou suportam um, dois, três ou quatro substituintes idênticos ou diferentes, seleccionados do grupo consistindo de F; Cl; Br; alquilo-C₁-C₃; alcoxiC₁-C₃-metilo; 2-amino-3,3,3-trifluoropropil-; CF₃; alcanodiC₃-C₅-ilo; fenilo; heteroarilo; benzilo; heteroaril-metil-; OH; alcoxilo-C₁-C₃; fenoxilo; trifluorometoxilo; 2,2,2-trifluoroetoxilo; (alquil-C₁-C₄)COO; (alquil-C₁-C₃)mercapto; fenilmercapto; (alquil-C₁-C₃)sulfonilo; fenilsulfonilo; NH₂; (alquil-C₁-C₄)amino; di(alquil-C₁-C₄)amino; (alquil-C₁-C₃)-CONH-; (alquil-C₁-C₃)-SO₂NH-; (alquil-C₁-C₃)-CO; fenil-CO; -OCH₂O-; -OCF₂O-; -CH₂CH₂O-; COO(alquilo-C₁-C₄); -CONH₂; -CONH(alquilo-C₁-C₄); -CON(di(alquilo-C₁-C₄)); CN; -SO₂NH₂; -SO₂NH(alquilo-C₁-C₄); -SO₂N(di(alquilo-C₁-C₄)); pirrolidinilo; piperidinilo; morfolinilo; e tiomorfolinilo; em que todos os heteroarilo, fenilo, grupos contendo heteroarilo e contendo fenilo, que estão opcionalmente presentes nos referidos substituintes do referido fenilo ou no referido grupo Hetar, são não substituídos ou substituídos por um, dois, três ou quatro substituintes idênticos ou diferentes, seleccionados do grupo consistindo de F, Cl, Br, CN, alquilo-C₁-C₃, OH, alcoxilo-C₁-C₃ e CF₃;

heteroarilo e o grupo Hetar, independentemente um do outro, são um heterociclo monocíclico ou bicíclico, aromático com 5 membros a 10 membros, contendo um, dois, três ou quatro heteroátomos idênticos ou diferentes seleccionados do grupo consistindo de N, O e S;

em qualquer uma das suas formas estereoisoméricas, uma sua mistura em qualquer proporção ou um seu sal farmacologicamente aceitável;

para utilização no tratamento *ex vivo* de células estaminais e/ou progenitoras, na terapia celular de um doente com uma doença cardíaca isquémica.

14. Potenciador da transcrição da sintase de óxido nítrico endotelial para utilização no tratamento *ex vivo* de células estaminais e/ou progenitoras, na terapia celular de um doente com uma doença cardíaca isquémica, que é a 4-fluoro-N-(indan-2-il)benzamida.

15. Potenciador da transcrição da sintase do óxido nítrico endotelial para utilização no tratamento *ex vivo* de células estaminais e/ou progenitoras, na terapia celular de um doente com uma doença cardíaca isquémica, que é a indan-2-ilamida do ácido 2,2-difluorobenzo[1,3]dioxol-5-carboxílico.

Lisboa, 3 de Fevereiro de 2010