



(19)

INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 778820 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)

C07C057/03 A A61K031/19 B

C07C057/18 B C07C053/128 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1995.08.25	(73) <i>Titular(es):</i> UNIVERSITY COLLEGE DUBLIN BELFIELD DUBLIN 4 IE
(30) <i>Prioridade:</i> 1994.08.30 US 298108 1995.05.22 US 446481	AMERICAN BIOGENETIC SCIENCES, INC. 1375 AKRON STREET COPIAGUE, NY 11726 US
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1997.06.18	(72) <i>Inventor(es):</i> HEINZ NAU CIARAN M. REGAN DE IE
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2001.05.02	(74) <i>Mandatário(s):</i> JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO RUA DO SALITRE, 195 R/C DTO 1250 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* COMPOSTOS NEURITRÓFICOS E ANTIPROLIFERATIVOS*****

(57) *Resumo:*

COMPOSTOS NEUROTRÓFICOS E ANTIPROLIFERATIVOS

Descrição

“Compostos neurotróficos e antiproliferativos”

REFERÊNCIA A PATENTES DE INVENÇÃO AFINS

O presente pedido de patente de invenção é uma continuação parcial do pedido de patente de invenção norte-americana com o nº de série 08/298 108 depositado a 30 de Agosto de 1994 que aqui se considera incorporado por referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona métodos e composições úteis para a prevenção e/ou para o tratamento de doenças neurodegenerativas e proliferativas. As composições da invenção favorecem a maturação das células neuronais e retardam a sua proliferação. Em particular, a presente invenção diz respeito a moléculas neurotróficas não proteínicas capazes de passarem a barreira sangue-cérebro para proporcionarem efeitos terapêuticos.

ANTECEDENTES

O funcionamento adequado do sistema nervoso exige a maturação e a manutenção de células neuronais. Além disso, o estabelecimento de ligações sinápticas adequadas permite a comunicação entre neurónios diferentes. As insuficiências de sobrevivência de neurónios ou da capacidade para a manutenção de ligações sinápticas estão associadas a doenças neurodegenerativas entre as quais se inclui a doença de Alzheimer, a doença de Huntington, a esclerose lateral amiotrófica (ELA), a doença de Parkinson, o colapso e a degeneração de neurónios devido a neuropatias diabéticas e traumas.

Muitas das doenças neurodegenerativas estão associadas à perda ou à degeneração de uma classe particular de células neuronais. Por exemplo, na doença de Parkinson são os neurónios dopaminérgicos da substância negra que degeneram. A ELA está associada à perda de neurónios motores. A síndrome de Wernicke-Korsakoff, vulgarmente associada a ao alcoolismo crónico, provoca amnésia devido à lesão dos corpos mamilares e do núcleo dorsal mediano do tálamo. Butters N., Seminar Neurol. (1984) 4:226-244. Pressupõe-se que a doença de Alzheimer esteja associada à degeneração de determinados neurónios colinérgicos. A ruptura de axónios em consequência de traumas pode originar a degeneração retrógrada e a morte neuronal.

A associação entre a neurodegeneração e o desenvolvimento de doenças estimulou a pesquisa de agentes neurotróficos capazes de retardar, evitar ou inverter uma neurodegeneração. Até ao momento presente muitos esforços têm sido desenvolvidos neste domínio para a identificação e caracterização de polipeptidos neurotróficos. Por exemplo, têm sido objecto de especial estudo os efeitos do factor de crescimento dos nervos (FCN), do factor neurotrófico ciliar (FNTC), do factor neurotrófico de comando cerebral (FNCC, em inglês BDNF) e outros. O efeito neurotrófico geral do FNTC, e em particular a sua acção trófica sobre os neurónios motores, levou à sua investigação como agente útil para o tratamento da ELA e de outras doenças neurodegenerativas. Ver, por exemplo, Collins *et al.* na patente de invenção norte-americana nº 5 141 856 e Masiakowski no documento WO 91/04316 que aqui se consideram incorporados por referência. Foi já admitido que o FCN, para o qual se demonstrou que favorece o desenvolvimento neuronal a partir dos neurónios colinérgicos centrais, constitui um agente útil para o tratamento da doença de Alzheimer. A maior parte dos polipeptidos neurotróficos identificados até ao momento presente são activos sobre populações relativamente

restritas de células neuronais. Outros factores, tais como o FNTC, são activos num número maior de tipos de células neuronais.

De um modo geral observou-se que os agentes que induzem a maturação ou a diferenciação de células neuronais em cultura também inibem a sua proliferação. Os precursores embrionicos proliferativos normais dos neurónios do sistema simpático e sensoriais são induzidos a amadurecerem e a interromperem a divisão na presença de determinados factores de crescimento, tais como o FCN. A associação entre a maturação ou a diferenciação neuronais e a acção antimitótica também foi observada em determinadas células neoplásicas que são responsivas aos factores neurotróficos. Por exemplo, as células PC12 do feocromocitoma do rato, na presença de FCN, desenvolvem neuritos compridos e interrompem a divisão. Ver Green LA e Tischler AS, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1976) 72:2424-2428. Foram observados efeitos semelhantes noutras células neuronais.

As células no sistema nervoso dão origem a um conjunto de doenças neoplásicas potencialmente fatais. Por exemplo, admite-se que os neuroblastomas e os feocromocitomas advenham de células com uma origem na crista neural. As células não neuronais do sistema nervoso, incluindo as células gliais, os astrócitos e as células de Schwann, também dão origem a diferentes tipos de tumores. Muitos dos agentes presentemente utilizados em quimioterapia, envolvendo células neuronais, são citotóxicos e possuem uma especificidade e uma penetabilidade relativamente fracas. O tratamento de doenças neoplásicas por meio de agentes que provoquem a maturação tem sido o objectivo há muito procurado. Aaronson, S.A. Science (1991) 254:1146-1153.

Embora os polipeptidos neurotróficos possam eventualmente vir a ser úteis para o tratamento de determinadas doenças neurodegenerativas e proliferativas, caracterizam-se por uma fraca biodisponibilidade resultante do seu tamanho relativamente grande, o que faz com

que haja resistência à sua passagem através da barreira sangue-cérebro. Esta fraca penetração nos tecidos destinatários relevantes cria dificuldades importantes na sua utilização para o tratamento de doenças neurodegenerativas e de doenças neoplásicas do sistema nervoso central.

O valproato de sódio anticonvulsivo (VPA) é um ácido carboxílico de cadeia ramificada eficaz no tratamento de ataques apopléticos primários generalizados, em especial os de tipo ausência. Pinder, R.M. *et al.*, Drugs (1977) 13:81-123. Recentemente foi verificado que o composto VPA é um agente teratogénico e foi sugerido que é potencialmente causador de defeitos dos tubos neurais em 1% a 2% dos fetos expostos (Robert E. e Rosa F.W., "Maternal valproic acid and neural tubes defects", Lancet (1982) 2:937). Além disso, há também muitos outros defeitos que são induzidos pelo tratamento com ácido valpróico durante a gravidez (Bau *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. (1981) 219:768-777). A espina bífida aberta (*spina bifida aperta*), que é um defeito de nascença muito grave, pode agora ser induzida também pelo ácido valpróico num modelo com animais (Ehlers *et al.*, 1992 a,b). Tal como sucede com os polipeptídeos neurotróficos, também o ácido valpróico manifesta uma capacidade de transferência muito limitada para o sistema nervoso central dos seres humanos (Löscher *et al.*, Epilepsia (1988) 29:311-316). Para o estudo de teratogénese clínica e experimental provocada pelo ácido valpróico ver Nau *et al.*, Pharmacol. Toxicol. (1991) 69:310-321; Nau, CIBA Foundation Symposium 181, págs. 615-664; Marcel Dekker, 1993.

Estudos efectuados *in vitro* demonstraram que o valproato inibe potencialmente a velocidade de proliferação de células de origem neural em concentrações ao seu nível terapêutico no plasma (Regan, C., Brain Res. (1985) 347:394-398). A acção antiproliferativa do valproato fica restringida a um ponto definido na fase G₁ do ciclo celular. Martin M. e Regan C., Brain Res. (1991) 554:223-228. Na presença de valproato, as células assumem um fenótipo diferenciado, conforme se conclui pela morfologia, pelo aumento da adesão ao

substrato celular e por uma diminuição da afinidade para com as superfícies recobertas com concanavalina A-lectina (Martin *et al.*, Toxic. in Vitro (1988) 2:43-48; Martin *et al.*, Brain Res. (1988) 459:131-137; Maguire and Regan, Int. J. Devl. Neurosci. (1991) 9:581-586; Regan C., Brain Res. (1985) 347:394-398. É provável que estas acções do valproato fiquem restringidas às células do tubo neural em desenvolvimento, uma vez que se demonstrou, em modelos experimentais *in vivo*, que o valproato aumenta a incidência de defeitos nos tubos neurais com sequestro especificamente dentro do neuroepitélio onde gera um desordenamento celular (Dencker *et al.*, Teratology 81990) 41:699-706; Ehlers *et al.*, Teratology (1992) 45:145-151; Ehlers *et al.*, Teratology (1992) 46:117-130; Kao *et al.*, Teratogen. Mutagen. Carcinogen. (1981) 1:367-382; Turner *et al.*, Teratology (1990) 41-421-442).

A hipertermia, que induz defeitos nos tubos neurais (Chernoff e Golden, Teratology (1988) 37:37-42; Edwards, Teratogen. Mutagen. Carcinogen. (1986) 6:563-582; Shioea, Am. J. Med. Genet. (1982) 12:281-288; Finnell *et al.*, Teratology (1986) 33:247-252) também paralisa as células neurais na fase G₁ do ciclo celular, tanto *in vivo* como *in vitro* (Martin *et al.*, Brain Res. (1991) 554:223-228; Walsh e Morris, Teratology (1989) 40:583-592), e produz efeitos prodiferenciadores semelhantes aos observados com o valproato (Martin e Regan, Brain Res. (1988) 459:131-137). Assim, uma acção coincidente antiproliferativa e prodiferenciadora pode identificar agentes capazes de induzirem defeitos nos tubos neurais e pode constituir também uma base para o desenvolvimento de compostos úteis para o tratamento ou de doenças neurodegenerativas ou para as evitar.

Os estudos sobre a relação entre estrutura e actividade dos compostos teratogénicos congéneres do valproato sugerem a existência de uma necessidade estrutural estrita para a potência teratogénica elevada. Nau, H. *et al.*, Pharmacol. & Toxicol. 81991) 69:310-321. Foi possível efectuar estudos das relações entre estrutura e actividade graças a trabalhos prévios

em que se demonstrou que a molécula do fármaco original - pelo menos no caso do ácido valpróico - e não os seus metabolitos, era responsável pela acção teratogénica (Nau, Fundam. Appl. Toxicol. (1986) 6:662-668). Confirmou-se que as moléculas que são altamente teratogénicas necessitam de um átomo de hidrogénio α , uma função carboxilo livre e a ramificação no átomo de carbono 2 com duas cadeias contendo cada uma delas 3 átomos de carbono para que haja uma actividade teratogénica máxima. (Nau e Löscher, 1986; Nau e Scott, 1986). As substâncias que não satisfaçam estas exigências estruturais estritas possuem uma actividade teratogénica muito fraca ou desprezável, mas continuam a revelar uma boa actividade anticonvulsiva em diversos modelos experimentais. Por tal motivo estes compostos podem ser agentes antiepilépticos valiosos (Nau *et al.*, Neurology (1984) 34:400-402; Löscher e Nau, Neuropharmacol. (1985) 24:427-435; Wegner e Nau, Neurology (1992) 42 (sup. 5):17-24; Elmazar *et al.*, J. Pharm. Sci. (1993) 82:1255-1258. Demonstrou-se também que a actividade teratogénica está associada a preferências estereoisoméricas, sugerindo tal facto uma interacção estereosselectiva entre os fármacos e uma estrutura específica dentro do embrião.

No caso do composto 4-eno-VPA (ácido 2-n-propil-4-pentenóico) (Hauck e Nau, Toxicol. Lett. (1989) 49:41-48) e do composto 4-ino-VPA (ácido 2-n-propil-4-pentinóico) (Hauck e Nau, Pharm. Res. (1992) 9:850-855), comprovou-se que os enantiómeros S eram agentes teratogénicos mais poderosos do que os correspondentes enantiómeros R. Esta teratogenicidade estereosselectiva deve-se a diferentes potências teratogénicas intrínsecas dos enantiómeros e não a diferenças da sua farmacocinética, na medida em que ambos os enantiómeros de um determinado par chegam ao tecido destinatário com a mesma intensidade, mas um deles foi mais potente do que o outro (Hauck *et al.*, Toxicol. Lett. (1992) 60:145-153). Há outros exemplos que permitiram fundamentar a estereosselectividade pronunciada do efeito teratogénico, mas não dos efeitos anticonvulsivos e sedativos (Hauck *et al.*, Life

Sci. (1990) 46:513-518; Nau *et al.*, Pharmacol. & Toxicol. (1991) 69:310-321). As cadeias de carbono ligadas ao átomo de carbono 2 do valproato que eram inferiores ou superiores a 3 átomos de carbono reduziram a actividade teratogénica. Nau *et al.*, *Id.* Foi já aventada a hipótese de a actividade antimitótica do valproato estar associada ao seu potencial teratogénico e não a uma qualidade terapêutica potencial, uma vez que o análogo de valpromida não teratogénico não é antiproliferativo. (Regan *et al.*, Toxic. in vitro (1991) 5:77-82). Até ao momento presente foram sintetizados análogos teratogénicos de valproato, com o intuito de se produzir agentes antiepilépticos mais desejáveis que tenham menos ou mesmo nenhuns efeitos secundários e nunca foi afirmado que fossem úteis por si próprios para outros fins terapêuticos.

O pedido de patente de invenção alemã DE-A-42 31 085 diz respeito ao desenvolvimento de compostos que possuem uma fraca actividade teratogénica e que podem ser úteis como fármacos anticonvulsivos seguros, tal como o valproato. Neste pedido de patente de invenção nada se diz sobre a eventualidade de algum dos compostos possuir qualquer actividade neurotrófica ou antimitótica ou que possa eventualmente ser útil para o tratamento de doenças neurodegenerativas. Além disso, os atributos que favorecem a actividade neurotrófica e antimitótica são aqueles que é necessário evitar para se reduzir a teratogenicidade. Os compostos neurotróficos da presente invenção são inovadores, comparativamente com os compostos anticonvulsivos da técnica anterior citados no pedido de patente de invenção alemã DE-A-42 31 085. Os preceitos exarados no pedido de patente de invenção alemã conduzem-nos para longe de qualquer desenvolvimento de tais compostos teratogénicos. Tais peculiaridades teratogénicas têm de ser evitadas para se desenvolver os compostos anticonvulsivos mais seguros revelados no documento DE-A-42 31 085.

O presente pedido de patente de invenção também refere que o enantiómero S dos compostos de fórmula estrutural (I) é preferível e que as cadeias mais compridas favorecem a

actividade teratogénica. Posto isto, com base nestas particularidades descritas, qualquer especialista na matéria pode antever que os compostos contidos no âmbito da invenção possam ter graus diferentes de actividade, dependendo disso da combinação dos factores que favorecem a actividade neurotrófica.

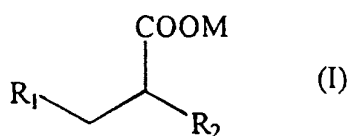
Apesar de esforços denodados para a identificação de compostos úteis para o tratamento de doenças neurodegenerativas e proliferativas, continua a ser altamente necessário que haja compostos úteis, com maior eficácia e potência.

DESCRIÇÃO ABREVIADA DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona compostos e métodos para a preparação de compostos úteis para favorecer a actividade neuronal e para inibir a mitose celular.

Em especial, a presente invenção proporciona o composto ácido 2-n-pentil-4-pentinóico e os seus enantiómeros, em particular o enantiómero S e os seus sais aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico.

Os compostos da presente invenção são enantiómeros S que satisfazem à fórmula estrutural (I)



em que

o símbolo R^1 representa $-C\equiv CH$,

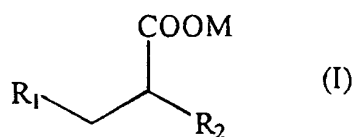
o símbolo R^2 representa um grupo alquilo (C_1 - C_{30}) saturado ou insaturado, ramificado ou não ramificado, o qual é facultativamente substituído com um grupo ciclo-hidrocarbonado ou heterocíclico (C_3 - C_8), alifático ou aromático, que compreenda 3 a 9 átomos; e

o símbolo M representa um átomo de hidrogénio ou um átomo de um metal; e seus sais farmacêuticamente aceitáveis; desde que a fórmula estrutural (I) não represente o ácido 2-n-propil-4-pentinóico (4-ino-VPA) ou o ácido 2-n-propil-4-pentenóico (4-eno-VPA) no caso de o símbolo R^1 representar $-\text{CH}_2\text{-CH}_3$ e o substituinte R^2 possuir 5 a 30 átomos de carbono.

De acordo com uma variante preferencial, o símbolo R^2 representa $-(\text{CH}_2)_{3-6}\text{-CH}_3$.

De acordo com outra variante preferencial da invenção o símbolo R^2 representa um grupo $-(\text{CH}_2)_{4-5}\text{-CH}_3$.

A presente invenção também proporciona um método para a preparação de compostos da invenção que satisfaçam à fórmula estrutural (I)



em que

o símbolo R^1 representa $-\text{C}\equiv\text{CH}$,

o símbolo R^2 representa um grupo alquilo C_5 saturado e não ramificado e

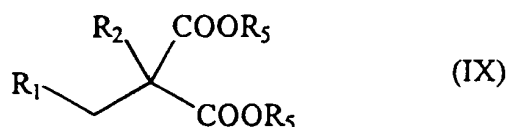
o símbolo M representa um átomo de hidrogénio ou um átomo de um metal, o qual consiste em combinar um diéster de ácido malónico com um primeiro halogeneto de fórmula geral (VII)



em que o símbolo R^2 possui as significações definidas antes, para formar um diéster do ácido 2-pentil-malónico, e em combinar depois o diéster do ácido 2-pentil-malónico com um segundo halogeneto de fórmula geral (VIII)



em que o símbolo R^1 possui as significações definidas antes, ou então combinando o diéster do ácido malónico com o segundo halogeneto de fórmula geral (VIII) para formar um diéster do ácido 2-pentil-malónico e combinando o primeiro halogeneto de fórmula geral (VII) para formar um composto de fórmula estrutural (IX):



em que o símbolo R^5 representa um grupo alquilo; e em efectuar a hidrólise e a descarboxilação do composto de fórmula estrutural (IX) para formar um composto de fórmula estrutural (I); e converter facultativamente o composto de fórmula estrutural (I) num sal.

Os compostos da presente invenção, que são neurotróficos, podem ser utilizados para favorecer a sobrevivência e a actividade de neurónios que de outro modo teriam uma actividade diminuída, poderiam degenerar ou mesmo morrer. Em consequência, para além de serem utilizados para tratar pacientes aos quais foi diagnosticada uma doença neurodegenerativa, os compostos da presente invenção também podem ser utilizados profilacticamente para evitar ou retardar o início do desenvolvimento das doenças neurodegenerativas em pacientes identificados como estando em risco de desenvolverem tais doenças.

Os compostos da presente invenção, úteis para o tratamento de doenças neurodegenerativas, também podem ser utilizados para tratar doenças proliferativas. A actividade antiproliferativa dos compostos pode ser utilizada para evitar ou retardar a formação de uma grande variedade de tumores, administrando-se os compostos a um paciente que necessite de tratamento. Este tratamento é especialmente útil para tumores de origem neuronal ou glial, visto que estes compostos penetram no SNC.

Constitui outro objecto da presente invenção proporcionar compostos neurotróficos úteis para aumentar a sobrevivência dos neurónios e das células gliais.

Constitui ainda outro objecto da presente invenção proporcionar compostos úteis para favorecer a expressão de características associadas ao funcionamento das células neuronais ou gliais maduras.

Ao favorecer a sobrevivência e a actividade das células neuronais ou gliais, constitui um objecto da presente invenção proporcionar compostos úteis para a prevenção e/ou para o tratamento de diversas doenças neurodegenerativas.

Constitui outro objecto da presente invenção proporcionar compostos úteis para inibir a proliferação patológica de células neuronais, gliais ou células congéneres.

DESCRIÇÃO ABREVIADA DAS FIGURAS

Figura 1: relação de tipo dose-resposta do efeito antiproliferativo do ácido 2-n-butil-4-pentinóico e do ácido 2-n-pentil-4-pentinóico. Criou-se em cultura células do neuroblastoma neuro-2a em balões de 25 cm² durante 48 horas na presença do meio testado. Ao fim de 48 horas efectuou-se uma observação das células que foram fotografadas e colhidas com tripsina para contagem utilizando um hemocitómetro. O número de células está expresso em termos de valor percentual médio $\pm$ d.p. (n = 3) relativamente aos valores de contraprova.

Figura 2: indução do desenvolvimento de neuritos de células do neuroblastoma neuro-2a. Criou-se em cultura células de neuroblastoma na presença de ácido 2-n-butil-4-pentinóico (1,0 mM, 2 mM) e de ácido 2-n-pentil-4-pentinóico (0,3 mM, 0,5 mM). Adicionou-se às células o meio de teste ao fim de 24 horas em cultura e manteve-se como meio de teste durante 48 horas, após o que foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% e tampão de fosfato de sódio 0,5 M de um dia para o outro a 4°C. Depois efectuou-se a pós-fixação

das células com tetróxido de ósmio e fez-se a sua preparação para microscopia de varrimento, conforme descrito. As células estabilizadas e contrastadas foram observadas num microscópio de varrimento electrónico a trabalhar com uma tensão de aceleração de 15 kV.

Figura 3: imunofluorescência da Molécula de Adesão às Células Neurais (MACN, em inglês NCAM) em células do neuroblastoma neuro-2a. Painel A. As células que cresceram na presença de ácido 2-n-pentil-pentinóico (1,0 mM) revelaram um aumento da imunofluorescência dirigida contra a MACN, comparativamente com as células de contraprova. Painel B. Foram criadas em cultura células de neuroblastoma durante 48 horas na presença de concentrações cada vez maiores de ácido 2-n-butil-4-pentinóico e do ácido 2-n-pentil-4-pentinóico. As células foram depois fixadas e preparadas para contrastação com anticorpo anti-MACN de coelho. Com as células foi incubado um segundo anticorpo anti-MACN de coelho conjugado com rodamina, para se detectar o anticorpo ligado anti-MACN. As células foram observadas com um microscópio de fluorescência a trabalhar com um comprimento de onda de excitação de 535 nm. Exprime-se a imunofluorescência pelo valor médio $\pm$ d.p..

Figura 4: inversão da amnésia induzida pela escopolamina de forma dependente da dose de ácido 2-n-pentil-4-pentinóico. Administrou-se o ácido 2-n-pentil-4-pentinóico e a escopolamina nos instantes correspondentes a 3 horas e 6 horas pós-adestramento, respectivamente, conforme indicado. Os animais foram sujeitos a um teste de repetição ao fim de 24 horas e aplicou-se como critério um período de 300 segundos. Os resultados estão expressos em termos de valores médios e acumulações interquartis.

Figura 5: atenuação do declínio dependente da idade no que diz respeito à frequência de neurónios polissialilados da molécula de adesão das células neurais no giro dentado do hipocampo e no córtex rinal por acção do ácido 2-n-pentil-4-pentinóico. Administrou-se o ácido 2-n-pentil-4-pentinóico cronicamente durante 40 dias nas doses indicadas. Os animais de

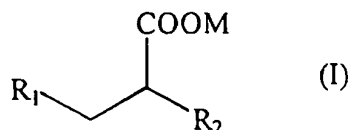
contraprova receberam ácido 2-(2-metilpropil)-4-pentinóico. A administração crónica destes compostos não teve nenhum efeito sobre o ganho de peso dos animais. Os resultados estão expressos em termos de valores médios $\pm$ d.p. ($n = 6$).

Figura 6: distribuição de ácido 2-n-pentil-4-pentinóico em regiões individualizadas do cérebro e nos rins e no fígado. Administrou-se o ácido 2-n-pentil-4-pentinóico por via intravenosa (84 mg/kg) uma vez por dia durante 10 dias. Os animais foram sacrificados 30 minutos a seguir à última administração de fármaco. Determinou-se as concentrações de ácido 2-n-pentil-4-pentinóico nos tecidos por espectometria de massa com monitorização iónica selectiva cromatográfica em fase gasosa. Os resultados traduzem uma experiência com um único animal.

DESCRIÇÃO MINUCIOSA DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a derivados do ácido valpróico e aos métodos para a sua preparação. A actividade antimetabólica dos compostos da invenção é útil para sustentar células numa fase específica do ciclo celular e para evitar e tratar doenças neoplásicas. Os objectivos da presente invenção são atingidos ao proporcionar análogos teratogénicos potentes do ácido valpróico que penetram no SNC, enquanto agentes neurotróficos/neuroprotectores capazes de tratar e retardar o início das doenças neurodegenerativas. Os compostos da presente invenção também são úteis para regular a velocidade proliferativa das células e o potencial metastático das células neoplásicas ou potencialmente neoplásicas.

Em consequência, os compostos da presente invenção são enantiómeros S que satisfazem à fórmula estrutural (I)



em que

o símbolo R^1 representa $-C\equiv CH$,

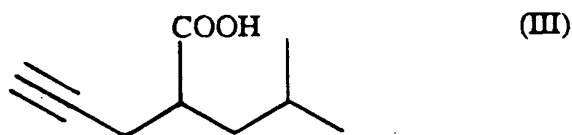
o símbolo R^2 representa um grupo alquilo(C_1 - C_{30}) saturado ou insaturado que possua pelo menos uma ligação dupla ou tripla, ramificado ou não ramificado, o qual é facultativamente substituído com um grupo ciclo-hidrocarbonado ou heterocíclico (C_3 - C_8), alifático ou aromático, que compreenda 3 a 9 átomos; desde que no caso de o símbolo R^1 representar $-CH_2-CH_3$, então o substituinte R^2 possua 5 a 30 átomos de carbono e a fórmula estrutural (I) não represente o ácido 2-n-propil-4-pentinóico (4-ino-VPA) ou o ácido 2-n-propil-4-pentenóico (4-eno-VPA), e os seus sais farmaceuticamente aceitáveis.

O símbolo M representa um átomo de hidrogénio ou um átomo de um metal.

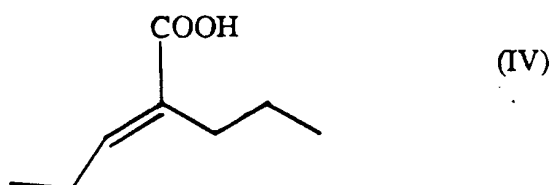
De preferência o símbolo R^1 representa $-C\equiv CH$ e o símbolo R^2 representa um grupo alquilo(C_2 - C_{10}) saturado e não ramificado. Mais preferencialmente, o símbolo R^2 representa um grupo alquilo(C_4 - C_6) saturado e não ramificado. Como exemplos de substituintes R^2 preferidos refere-se os grupos $-(CH_2)_{1-9}-CH_3$ e mais preferencialmente grupos $-(CH_2)_{3-6}-CH_3$, sendo mais preferenciais os grupos $-(CH_2)_{4-5}-CH_3$. Os compostos mais preferidos são o ácido 2-n-butil-pentinóico ($R^1 = -C\equiv H$; $R^2 = -(CH_2)_3-CH_3$), o ácido 2-n-pentil-pentinóico ($R^1 = -C\equiv H$; $R^2 = -(CH_2)_4-CH_3$) e o ácido 2-n-hexil-pentinóico ($R^1 = -C\equiv H$; $R^2 = -(CH_2)_5-CH_3$). Além disso, tanto os seus enantiómeros como as suas misturas racémicas são considerados como pertencentes ao âmbito da presente invenção, sendo preferida a forma enantiomérica S. Como átomos de metais preferidos refere-se o átomo de sódio ou de outros metais alcalinos e bem assim de metais alcalino-terrosos tais como, por exemplo, o cálcio ou o magnésio.

As potências teratogénica, antiproliferativa e prodiferenciadora dos compostos preferidos são muito mais elevadas do que as do fármaco antiepiléptico considerado, o ácido valpróico.

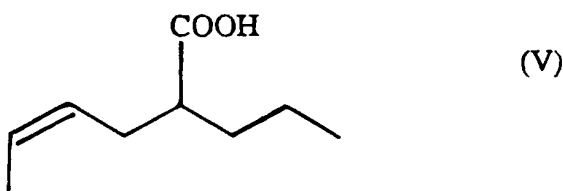
Uma maior ramificação dos substituintes R^1 ou R^2 reduz a potência dos compostos correspondentes. Isto é demonstrado pela fraca potência teratogénica, antiproliferativa e pro-diferenciadora do composto a seguir apresentado.



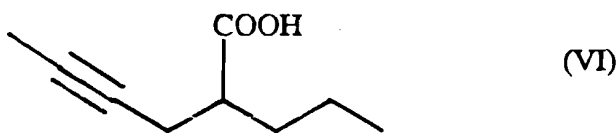
A insaturação entre o átomo de carbono 2 e o átomo de carbono 3 (IV) e ainda a metilação do átomo de carbono 5 (V, VI) também reduzem, mas não eliminam, as actividades celulares neurotrófica e antiproliferativa referidas *supra*



ácido 2-n-propil-2-pentenóico



ácido 2-n-propil-4-hexenóico



ácido 2-n-propil-4-hexinóico

Em conformidade com as nossa hipóteses fundamentais, os compostos de fórmula estrutural IV (Nau *et al.*, Neurology (1984) 34:400-402; Nau e Löscher, Fundam. Appl. Toxicol. (1986) 6:669-676M Nau e Scott, Nature (1986) 323:276-278; Vorhees *et al.*, Teratology (1991) 43:583-590; Ehlers *et al.*, Devel. Pharmacol. Ther. (1992) 19:196-204) e de fórmula

estrutural VI (Nau *et al.*, Pharmacol. & Toxicol. (1991) 69:310-321; Elmazar *et al.*, J. Pharm. Sci. (1993) 82:1255-1258) possuem actividades teratogénicas muito fracas ou mesmo indetectáveis, mas demonstraram possuir boas propriedades anticonvulsivas em modelos experimentais.

Os compostos e as composições da invenção constituem análogos teratogénicos do valproato mais potentes e exibem melhores actividades antiproliferativa e neurotrófica/neuroprotectora, comparativamente com o composto original. Em contraste com os análogos saturados de valproato (em que ambas as cadeias devem conter 3 átomos de carbono cada uma para se conseguir uma actividade máxima), uma ligação dupla ou tripla na posição ω de uma das cadeias é responsável por actividades mais elevadas quando a outra cadeia contém entre 4 e 10 átomos de carbono. Como exemplos dos compostos teratogénicos mais potentes já sintetizados, congéneres do valproato, refere-se os seleccionados entre ácido 2-n-propil-4-pentinóico, ácido 2-n-butil-4-pentinóico, ácido 2-n-pentil-4-pentinóico, ácido 2-n-hexil-4-pentinóico, ácido 2-n-hepta-4-pentinóico e ácido 2-n-octa-4-pentinóico. São mais preferíveis os ácidos 2-n-butil-4-pentinóico, 2-n-pentil-4-pentinóico, 2-n-hexil-4-pentinóico, 2-n-hepta-4-pentinóico e 2-n-octa-4-pentinóico. Os mais preferenciais entre todos são o ácido 2-n-pentil-4-pentinóico e o ácido 2-n-hexil-4-pentinóico.

Os compostos preferidos utilizáveis na presente invenção possuem um átomo de carbono α quiral. Como resultado da quiralidade, a eficácia e a potência das diversas formas enantioméricas podem ser diferentes. Por exemplo, o ácido S-2-n-propil-4-pentinóico possui um potencial teratogénico significativamente superior ao da forma enantiomérica R. Hauck e Nau, Pharm. Res. (1992) 9:850-855; Hauck *et al.*, Toxicol. Lett. (1992) 60:145-153. Ver Nau *et al.* em Pharmacol. Toxicology (1991) 69:310-321, obra esta que aqui se considera

incorporada por referência. Embora não haja uma regra geral para os compostos anteriormente identificados, a forma enantiomérica S é preferencial.

Os compostos da presente invenção são preparados fazendo reagir um éster dietílico de ácido malónico, adequadamente substituído, com um agente de alquilação insaturado adequado, tal como um halogeneto de alquilo de cadeia linear. O produto é então hidrolisado e descarboxilado.

Esta reacção também pode ser efectuada de um modo recíproco, em que se faz reagir um éster dietílico de ácido malónico, substituído com uma função insaturada, com um halogeneto de alquilo adequado. A esta reacção também se seguem as operações de hidrólise e descarboxilação.

Os novos compostos da presente invenção podem ser produzidos em conformidade com o método da presente invenção. De acordo com uma variante, o método para sintetizar os compostos consiste em combinar um diéster do ácido malónico com um primeiro halogeneto de fórmula geral

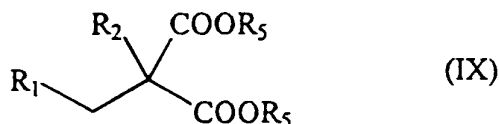


em que o símbolo R^2 representa um grupo alquilo em C_5 , saturado e não ramificado, e o símbolo X representa um halogeneto. Esta primeira reacção proporciona um diéster do ácido 2-pentil-malónico.

Depois combina-se o diéster do ácido 2-pentil-malónico com um segundo halogeneto de fórmula geral



em que o símbolo R^1 representa um grupo $-C\equiv CH$, para se obter compostos de fórmula estrutural (IX)

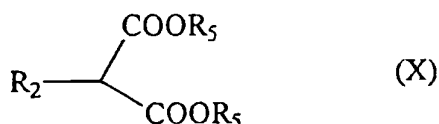


em que o símbolo R^5 representa um grupo alquilo.

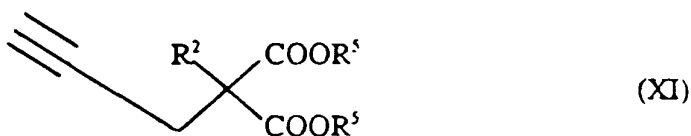
Os diésteres resultantes são então hidrolisados, descarboxilados e facultativamente convertidos num sal.

De acordo com uma variante alternativa, inverte-se a ordem segundo a qual se efectua a reacção, de tal modo que se combina o composto de fórmula geral $\text{R}^1\text{-CH}_2\text{-X}$ com o diéster do ácido malónico, seguindo-se a reacção com o composto $\text{R}^2\text{-X}$.

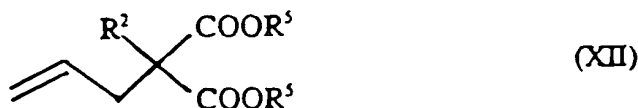
De acordo com um método preferível para a preparação dos compostos da presente invenção, efectua-se o tratamento do éster dietílico do ácido malónico com uma base, por exemplo, etilato de sódio, para desprotonar o átomo de carbono 2. O subsequente tratamento do éster desprotonado resultante com um agente de alquilação sob a forma de um halogeneto de pentilo proporciona um éster dietílico do ácido 2-n-pentil-malónico.



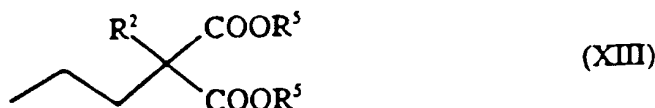
Este produto é depois submetido a uma alquilação com etilato de sódio e com um halogeneto de 2-propino para se obter um composto de fórmula estrutural XI



ou então com um halogeneto de 2-propeno para se obter um composto de fórmula estrutural XII



ou então com um halogeneto de 2-propilo para se obter um composto de fórmula estrutural XIII



Os diésteres de fórmulas estruturais (XI), (XII) e (XIII) são hidrolisados e descarboxilados com hidróxido de potássio em etanol/água com tratamento térmico.

Para além dos compostos referidos antes, a propósito da fórmula estrutural I, há outros compostos que são úteis para favorecer a actividade neuronal e a inibição da mitose celular, os quais se encontram descritos por Nau *et al.* no pedido de patente de invenção da PCT com o nº PCT/DE93/00861 publicado como WO94/06743, e que aqui se considera incorporado por referência.

Os compostos preferidos, úteis para favorecer a actividade neuronal, compreendem, por exemplo, a forma S do ácido 2-n-propil-4-pentinóico ($R^3 = -CH_2-C\equiv CH$; $R^4 = -(CH_2)_2-CH_3$); o ácido valpróico ($R^3 = R^4 = -(CH_2)_2-CH_3$); o ácido 2-propil-hexanóico ($R^3 = -(CH_2)_3-CH_3$; $R^4 = -(CH_2)_2-CH_3$) e o ácido 2-n-butil-hexanóico ($R^3 = R^4 = -(CH_2)_3-CH_3$).

O favorecimento da actividade neuronal é particularmente útil para prevenir e tratar doenças neurodegenerativas. Por doenças neurodegenerativas entende-se todas as doenças que resultem numa degeneração neuronal que reaja pelo menos a um dos análogos do valproato ou ao próprio valproato.

A actividade neurotrófica associada ao valproato e aos seus análogos pode ser determinada com base em índices de diferenciação *in vitro*, incluindo a inibição da mitose, o

aumento do desenvolvimento dos neuritos e a expressão das MACN. Por exemplo, a capacidade para favorecer o desenvolvimento dos neuritos está correlacionada com a maior sobrevivência de determinadas células neurais criadas em cultura, incluindo os neurónios sensoriais e do sistema simpático do embrião. Os neuroblastos imaturos proliferativos têm, *in vitro*, uma forma arredondada e aderem esparsamente às superfícies da cultura. Na presença de um factor neurotrófico, estas células passam a ficar mais aderentes e fazem aparecer formações conhecidas na especialidade pela designação de neuritos. Assim sendo, o desenvolvimento de neuritos *in vitro* pode ser utilizado como um ensaio para a determinação das concentrações do composto em contacto com as células destinatárias para as quais se pretendia obter efeitos neuroprotectores desejáveis.

Os métodos de avaliação do desenvolvimento de neuritos *in vitro* são bem conhecidos na especialidade e podem ser avaliados, por exemplo, por inspecção visual microscópica directa ou mediante a utilização de um processo de formação de imagens auxiliado por computador.

Outra característica dos factores neurotróficos, que pode ser utilizada para avaliar a acção neuroprotectora dos composto e composições da presente invenção, é a sua capacidade para favorecerem a sobrevivência de determinados tipos específicos de células. Por exemplo, o FCN é necessário *in vitro* para a sobrevivência de determinados tipos específicos de células que morrem na ausência do FCN. Essas células dependentes do FCN incluem os neurónios dos gânglios dorsais do rato embrionário no período que medeia entre os dias E5 e E8.

A microscopia de varrimento electrónico ilustra a capacidade das células para aumentarem a aderência ao substrato celular. As células eliminam o crescimento arredondado e aglomerado, típico das células tumorais, e induzem um aplanamento e uma maior interacção

com o substrato (figura 2). Geralmente admite-se que estes neuritos, *in vivo*, se diferenciam ainda mais em axónios e dendritos e que formam sinapses com outros neurónios. Durante as doenças associadas à neurodegeneração, pode haver eventualmente uma perda de sinapses e a degeneração de axónios e dendritos, daí resultando uma insuficiência da actividade neuronal.

Um outro índice de diferenciação, resultante da actividade neurotrófica dos análogos de valproato, é um aumento da expressão da MACN. Além disso, o aumento da prevalência da MACN reforça o desenvolvimento de neuritos. Doherty *et al.*, Nature 81990) 343:464-466. Foi já assinalado que a MACN desempenha um papel fundamental na formação da memória, uma vez que a infusão intraventricular de uma substância anti-MACN durante a consolidação de um evento de aprendizagem recente induz uma amnésia. Doyle *et al.*, J. Neurochem. (1992) 59:1570-1573, obra que aqui se considera incorporada por referência. Foi assinalada uma endocitose rápida do homólogo de MACN 'Aplysia' a seguir a uma modificação da estrutura das sinapses induzida pela serotonina *in vitro*. Bailey *et al.*, Science (1992) 256:645-649.

Durante o desenvolvimento de regiões individualizadas do cérebro, ou em adultos que revelem uma neurogénese progressiva, a MACN aumenta momentaneamente o seu estado de sialilação. Para um estudo leia-se a obra de Regan 'Int. J. Biochem.' (1991) 23: 513-523, que aqui se considera incorporada por referência, e a obra de Rougon (1993) 'Eur. J. Cell Biol.' 61:197-207. A isoforma de MACN específica das sinapses (MACN 180, em inglês NCAM 180), que está associada a neurónios diferenciados, faz aumentar o seu estado de sialilação durante as últimas fases do desenvolvimento, até ficar completo o período de sinaptogénese. Breen *et al.*, J. Neurochem. (1988) 50:712-716. Há uma sialilação da MACN 180, específica de uma isoforma semelhante, que ocorre durante a consolidação de uma resposta de coibição passiva. Doyle *et al.*, J. Neurosci. Res. (1992) 31:513-523.

Observámos a capacidade destes compostos e destas composições para exercerem *in vivo* uma acção neurotrófica em estudos de fases agudas e crónicas em que foram utilizados ratos (machos) adultos da estirpe Wistar. Os estudos das fases agudas determinaram a sua capacidade para inverterem o efeito amnésico de uma lesão com escopolamina 6 horas após o adestramento no modelo experimental de coibição passiva, do mesmo tipo utilizado para outros agentes neuroprotectores (Doyle *et al.*, J. Neurochem. 1993 61:266-272; Doyle e Regan, J. Neural Transm. 1993 92:33-49).

Assim sendo, os métodos para o tratamento e para a prevenção de doenças neurodegenerativas assentam na capacidade do valproato e dos seus análogos possuírem actividade neurotrófica, por exemplo, poderem favorecer o desenvolvimento de neuritos e a sobrevivência das células neuronais e a expressão da MACN.

Considera-se também que os métodos de tratamento podem proporcionar benefícios a pessoas com neurodegeneração a partir de doenças entre as quais estão incluídas, sem que isso constitua qualquer limitação, a ELA, a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, a doença de Huntington, a neuropatia diabética e os ataques súbitos. Além disso, a actividade dos compostos e composições aqui descritos, favorecedora dos neuritos, também poderia proporcionar benefícios a indivíduos com lesões nervosas traumáticas.

A prevenção da mitose por esta forma é útil para aumentar a expressão de proteínas específicas associadas ao fenótipo diferenciado. Esta expressão reforçada facilita a purificação de tais proteínas. Além disso, a interrupção ou o retardamento da mitose é útil para o tratamento de doenças proliferativas, mediante a administração, aos indivíduos que necessitem de tratamento, de valproato e/ou outro dos seus análogos antimitóticos.

Observámos sensibilidade ao valproato ou aos seus análogos antimitóticos em todas as células testadas. Esses tipos de células compreendem: astrócitos primários, astrocitomas

humanos e as dos sistemas cardíaco, renal e imunitário. Em consequência, a acção anti-proliferativa do valproato e dos seus outros análogos aqui descritos deve ter uma ampla aplicabilidade para um grande conjunto de tumores resultantes de diversos tipos de células e em particular nos casos mencionados anteriormente.

As quantidades eficazes de valproato e de seus análogos activos, eficazes sob o ponto de vista neurotrófico e/ou antimitótico, podem ser determinadas recorrendo a curvas convencionais de tipo dose-resposta. Assim sendo, é possível criar em cultura *in vitro* células representativas na presença de concentrações variáveis do composto testado. No momento conveniente, as células em condições diferentes são examinadas para se pesquisar o parâmetro adequado (por exemplo, o número de células para a actividade antimitótica ou o desenvolvimento de neuritos para a actividade neurotrófica) e é possível determinar o valor DE_{50} .

Os compostos preferidos da presente invenção exercem uma acção antiproliferativa muito poderosa com valores DE_{50} bastante inferiores ($< 0,5$ mM) aos observados com o valproato (figura 1). Assim, é de admitir que os compostos actuem com concentrações que não irão ter os efeitos secundários sedativos e hepatotóxicos do valproato. Os compostos preferidos também exercem a acção prodiferenciadora observada com o valproato. Na linhagem de células do neuroblastoma neuro-2a induzem uma nítida resposta neuritogénica que está correlacionada com o seu potencial antiproliferativo (figura 2).

Além disso, os mais potentes destes compostos aumentam a prevalência da molécula de adesão das células neurais (MACN) (figura 3). Este sistema de reconhecimento celular regula a plasticidade neural durante o desenvolvimento e posteriormente durante a armazenagem de informação no animal adulto, mediante a alteração da sua prevalência e do seu estado de glicosilação (Doyle *et al.*, J. Neurosci. Res. (1992) 31:513-523). Admite-se que os fármacos que invertem a amnésia induzida pela escopolamina, tais como os compostos congéneres do

piracetam, actuam através de um mecanismo neuroprotector que está associado a um aumento não específico da prevalência e/ou da glicosilação da MACN (Doyle *et al.*, J. Neurosci. Res. (1993) 61:266-272). Em consequência, antevê-se que os agentes que possam induzir a expressão da MACN possuam potencial neuroprotector.

Os compostos da invenção são úteis para o tratamento de doenças neurodegenerativas ou proliferativas, sendo seleccionados entre os compostos da fórmula estrutural I descrita antes. Para além dos compostos de fórmula estrutural I, a composição farmacêutica utilizada também pode conter substâncias adjuvantes e veículos. As composições podem assumir a forma de comprimidos, cápsulas, pós, grânulos, pastilhas, supositórios, pós reconstituíveis ou podem ser apresentadas como preparações líquidas, tais como as soluções ou suspensões estéreis para administração oral ou parentérica.

Para que a administração seja realizada de uma forma consistente, é preferível que a composição da invenção se encontre sob a forma de uma dose unitária.

As formas de apresentação de doses unitárias para a administração oral podem ser os comprimidos e as cápsulas e podem conter excipientes convencionais, tais como os agentes aglutinantes, por exemplo, xaropes, goma de acácia, gelatina, sorbitol, alcatira ou polivinil-pirrolidona; cargas, por exemplo, lactose, açúcar, amido de milho, fosfato de cálcio, sorbitol ou glicina; agentes desintegradores, por exemplo, amido, polivinil-pirrolidona, glicolato do amido de sódio ou celulose microcristalina; ou agentes humectantes farmacêuticamente aceitáveis, tais como o lauril-sulfato de sódio.

As composições no estado sólido para administração oral podem ser preparadas por métodos convencionais de mistura, enchimento, produção de comprimidos e outros que tais. É possível repetir as operações de mistura para se distribuir o agente activo homogeneamente nessas composições utilizando grandes quantidades de cargas. Estas operações são perfeitamente

conhecidas na especialidade. Os comprimidos podem ser recobertos de acordo com métodos bem conhecidos na prática farmacêutica normal, em particular com um revestimento entérico.

As preparações líquidas para administração oral podem ser apresentadas, por exemplo, sob a forma de emulsões, xaropes ou elixires, ou podem ser apresentadas sob a forma de um produto seco para reconstituição com água ou com outro veículo adequado, antes da sua utilização. Tais preparações líquidas podem conter aditivos convencionais, tais como agentes de suspensão, por exemplo, xarope de sorbitol, metil-celulose, gelatina, hidroxietil-celulose, carboximetil-celulose, gel de estearato de alumínio, gorduras edíveis hidrogenadas; agentes emulsionantes, por exemplo, lecitina, monooleato de sorbitano ou goma de acácia; veículos de tipo não aquoso (os quais podem ser óleos edíveis), por exemplo, óleo de amêndoas, óleo de coco fraccionado, ésteres oleosos, tais como os ésteres de glicerina, propileno-glicol ou álcool etílico; agentes conservantes, por exemplo, p-hidroxibenzoato de metilo ou de propilo ou ácido sórbico; e eventualmente, se desejado, agentes convencionais aromatizantes ou corantes.

Para a administração parentérica efectua-se a preparação das formas de dosagem unitária fluídas, utilizando o composto e um veículo estéril, podendo o composto, consoante a concentração utilizada, ficar em suspensão ou ser dissolvido no veículo. Para a preparação de soluções é possível dissolver o composto em água para injeção e efectua-se uma filtração esterilizada antes de se realizar o enchimento e a vedação estanque de frascos ou ampolas convenientes. De forma vantajosa, é possível dissolver no veículo adjuvantes, tais como um agente anestésico local, um agente conservante e agentes de tamponamento. Para aumentar a estabilidade é possível congelar a composição depois do enchimento dos frascos, sendo então a água removida *in vacuo*. As suspensões para administração parentérica são preparadas de um modo praticamente idêntico, com a excepção de se colocar o composto em suspensão no

veículo, em vez de o dissolver no veículo, e neste caso a esterilização não pode ser obtida por filtração. O composto pode ser esterilizado por exposição ao óxido de etileno, antes de ser colocado em suspensão num veículo estéril. De forma vantajosa, incorpora-se na composição um agente tensioactivo ou um agente humectante para facilitar a distribuição uniforme do composto.

A dose do composto utilizado para o tratamento das doenças referidas irá variar, como é habitual, em função da gravidade das doenças em causa, do peso do paciente e da eficácia relativa do composto.

As acções antiproliferativas e neuroprotectoras devem ser suficientes para se conseguir a inibição desejada da mitose ou a neuroprotecção, sem que haja efeitos secundários hepatotóxicos graves. As concentrações plásmicas que irão ser alcançadas devem ser suficientes para se conseguir as concentrações terapêuticamente eficazes do composto em contacto com as células destinatárias. É possível recorrer a técnicas clínicas convencionais para se determinar a quantidade eficaz de composto que irá ser administrado para se conseguir o efeito terapêutico desejado. As curvas de tipo dose-resposta podem ser determinadas em primeiro lugar *in vitro* num modelo animal relevante, para assim se definir os intervalos previsíveis de concentrações terapêuticas para os seres humanos. Por exemplo, a mitose das células do neuroblastoma neuro-2a dos murganhos é inibida pelo valproato para um valor DE_{50} compreendido entre 1,0 mM e 1,3 mM. Para a avaliação da actividade também é possível utilizar outras linhagens celulares, incluindo as de origem humana.

Exemplo 1

Num balão através do qual se fez passar árgon anidro foram colocados 0,1 mol de éster dietílico do ácido n-butil-malónico e 0,1 mol de 3-bromo-1-propino e depois aqueceu-se para 60°C. A esta mistura adicionou-se 1,0 mol de etanolato de sódio (preparado a partir de 0,1 mol de sódio e 50 mol de etanol anidro), gota a gota, por forma a manter a mistura em

ebulição. Depois de se completar a adição, aqueceu-se a mistura até a análise por CCF (folhas de sílica 'alu', hexano/acetato de etilo a 7,5/1) revelar a ausência de material de partida (normalmente 1-2 horas). Evaporou-se o etanol sob pressão reduzida, dissolveu-se em água os sais restantes e extraiu-se o produto três vezes com CH_2Cl_2 . Secou-se a fase orgânica sobres sulfato de sódio e depois evaporou-se. Por destilação sob pressão reduzida obteve-se o éster dietílico do ácido malónico assimetricamente substituído.

p.e._{0,3 mbar} = 78°C-82°C.

Aqueceu-se os ésteres malónicos dialquilados numa solução constituída por 20,3 (0,35 mol) de hidróxido de potássio, 50 mL de água e 100 mL de etanol. Depois de se completar a saponificação, evaporou-se o etanol sob pressão reduzida. Diluiu-se com água o resíduo restante e lavou-se com éter. Acidificou-se a camada aquosa com HCl concentrado (pH < 2) e extraiu-se com éter. A secagem sobre sulfato de sódio anidro e a concentração sob pressão reduzida proporcionaram o ácido dialquil-malónico impuro. Efectuou-se a descarboxilação por aquecimento do produto impuro (120°C-180°C). Destilou-se duas vezes o resíduo escuro *in vacuo* para se obter os produtos desejados.

Rendimento global: 18%

p.e._{0,1 mbar} = 75°C-78°C.

RMN-¹H (CDCl_3): 0,94 (3H, t, CH_3), 1,34 (4H, m, 2 x CH_2), 1,72 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-CHRCOOH}$), 2,04 (1H, t, $\text{C}\equiv\text{C-H}$), 2,36-2,68 (3H, m, $\text{CHRCOOH-CH}_2\text{-C}\equiv\text{C}$), 11,88 (1H, s, largo, COOH).

Exemplo 2

Conforme descrito no exemplo 1, fez-se reagir 0,1 mol de éster dietílico do ácido n-pentil-malónico com 0,1 mol de 3-bromo-1-propino.

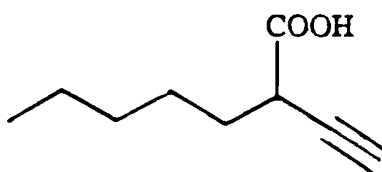
Rendimento global: 14%

p.e. 15 mbar = 135°C.

RMN-¹H (CDCl₃): 0,92 (3H, t, CH₃), 1,32 (6H, m, 3 x CH₂), 1,72 (2H, m, CH₂-CHRCOOH), 2,04 (1H, t, C≡C-H), 2,40-2,72 (3H, m, CHRCOOH-CH₂-C≡C), 11,32 (1H, s, largo, COOH).

Exemplo 3

Ácido (+)-2-(2-propinil)-octanóico (hexil-4-ino)



Síntese pelo método do dianião (Petragnani. Synthesis 521, 1982).

Todo o material feito de vidro foi seco em estufa e através do reactor fez-se passar árgon no decurso de toda a operação.

Preparou-se 0,2 mol de dianião de lítio por adição de 0,2 mol de n-butil-lítio a uma solução de 0,2 mol de diisopropilamina recentemente destilada e 130 mL de tetra-hidrofurano anidro a 0°C. Adicionou-se 0,1 mol de ácido octanóico, seguindo-se 19 de triamida do ácido hexametilfosfórico para se obter a solução do dianião. Agitou-se a mistura resultante à temperatura ambiente durante 30 minutos, depois arrefeceu-se para -60°C e adicionou-se rapidamente 0,1 mol de 3-bromo-1-propino, com o auxílio de uma seringa. A temperatura aumentou instantaneamente. Depois de se arrefecer novamente para -60°C, agitou-se a mistura de reacção e monitorizou-se por CCF (hexano:acetato de etilo = 7.5:1 mais 5% de ácido acético) até a reacção estar completa (cerca de 1,5 horas). Removeu-se o sistema de arrefecimento e acrescentou-se 200 mL de HCl a 10%. Separou-se as fases e extraiu-se a fase aquosa duas vezes com éter. Lavou-se as fases orgânicas combinadas, utilizando para o

efeito uma solução de NaCl a 50%, e secou-se sobre Na₂SO₄. A evaporação do solvente proporcionou um óleo amarelo. Por destilação obteve-se um líquido incolor (p.e. 82°C-84°C; 0,1 mbar).

RMN-¹H (CDCl₃): 0,88 (3H, t, CH₃), 1,40 (8H, mc, CH₂), 1,90 (2H, mc, CH₂), 2,04 (1H, t, ≡H), 2,32-2,68 (3H, m, CH₂, H_α), 12,04 (1H, s, largo, COOH).

Exemplo 4

Os exemplos preferidos não limitativos a seguir apresentados são compostos pertencentes ao âmbito da presente invenção:

ácido 2-n-prop-1¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-prop-2¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-i-propil-4-pentinóico

ácido 2-i-propenil-4-pentinóico

ácido 2-n-butil-4-pentinóico

ácido 2-n-but-1¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-but-2¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-but-3¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-prop-1¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilprop-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilprop-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilpropil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilprop-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilprop-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-terc-butil-4-pentinóico

ácido 2-n-pentil-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹-metilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹-dimetilpropil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,2¹-dimetilpropil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,2¹-dimetilpropil)-4-pentinóico

ácido 2-n-hexil-4-pentinóico

ácido 2-n-hex-1¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-hex-2¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-hex-3¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-hex-4¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-hex-5¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilpent-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilpent-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilpent-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilpent-4¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilpent-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilpent-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilpent-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilpent-4¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹-metilpentil)-4-pentinóico
ácido 2-(3¹-metilpent-1¹-enil)-4-pentinóico
ácido 2-(3¹-metilpent-2¹-enil)-4-pentinóico
ácido 2-(3¹-metilpent-3¹-enil)-4-pentinóico
ácido 2-(3¹-metilpent-4¹-enil)-4-pentinóico
ácido 2-(4¹-metilpentil)-4-pentinóico
ácido 2-(4¹-metilpent-1¹-enil)-4-pentinóico
ácido 2-(4¹-metilpent-2¹-enil)-4-pentinóico
ácido 2-(4¹-metilpent-3¹-enil)-4-pentinóico
ácido 2-(4¹-metilpent-4¹-enil)-4-pentinóico
ácido 2-(1¹,1¹-dimetilbutil)-4-pentinóico
ácido 2-(1¹,1¹-dimetilbut-2¹-enil)-4-pentinóico
ácido 2-(1¹,1¹-dimetilbut-3¹-enil)-4-pentinóico
ácido 2-(1¹,2¹-dimetilbutil)-4-pentinóico
ácido 2-(1¹,2¹-dimetilbut-1¹-enil)-4-pentinóico
ácido 2-(1¹,2¹-dimetilbut-2¹-enil)-4-pentinóico
ácido 2-(1¹,2¹-dimetilbut-3¹-enil)-4-pentinóico
ácido 2-(1¹,3¹-dimetilbutil)-4-pentinóico
ácido 2-(1¹,3¹-dimetilbut-1¹-enil)-4-pentinóico
ácido 2-(1¹,3¹-dimetilbut-2¹-enil)-4-pentinóico
ácido 2-(1¹,3¹-dimetilbut-3¹-enil)-4-pentinóico
ácido 2-(2¹,2¹-dimetilbutil)-4-pentinóico
ácido 2-(2¹,2¹-dimetilbut-3¹-enil)-4-pentinóico
ácido 2-(2¹,3¹-dimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,3¹-dimetilbut-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,3¹-dimetilbut-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,3¹-dimetilbut-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹,3¹-dimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹,3¹-dimetilbut-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹,2¹-trimetilpropil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹,2¹-trimetilprop-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,2¹,2¹-trimetilpropil)-4-pentinóico

ácido 2-n-heptil-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metil-hexil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metil-hexil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹-metil-hexil)-4-pentinóico

ácido 2-(4¹-metil-hexil)-4-pentinóico

ácido 2-(5¹-metil-hexil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,2¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,3¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,4¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,2¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,3¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,4¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹,3¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹,4¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(4¹,4¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹,2¹-trimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹,3¹-trimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,2¹,3¹-trimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,2¹,3¹-trimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,3¹,3¹-trimetilbutil)-4-pentinóico.

Exemplo 5

Como manter as linhagens celulares

Criou-se em cultura a linhagem de células do neuroblastoma neuro-2a do murganho (Klebe e Ruddle, 1969, J. Cell Biol., 43:69A) em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (MEMD, em inglês DMEM; Flow Laboratories) enriquecido com 10% de soro fetal de bovino (Tissue Culture Services), glutamina 200 mM e gentamicina na concentração de 100 µg/mL e ainda os antibióticos penicilina/estreptomicina na concentração de 100 unidades/mL e 100 µg/mL (Sigma Chemicals). As células foram mantidas em atmosfera contendo 9% de CO₂ a 37°C e humidificada com água. Efectuou-se o tratamento das células com tripsina a 0,025% (Gibco) em MEMD, tendo sido depois utilizados como inóculo segundo uma densidade de 1×10^4 células/cm².

Ensaio antiproliferativo

Foram introduzidos inóculos de células do neuroblastoma neuro-2a em balões de 25 cm² (Costar) segundo uma densidade de 1×10^4 células/cm². A seguir a um período de recuperação de 24 horas acrescentou-se às células o agente que se pretendia estudar, num veículo de dimetil-sulfóxido (DMSO), cujo volume era de 0,2% do volume total do meio de imersão das células. Como contraprova utilizou-se um balão que continha apenas o veículo

DMSO. A seguir a um período de incubação de 48 horas efectuou-se o exame das células recorrendo a um microscópio de contraste de fase invertida (Leitz Diavert) e fotografou-se (película Ilford de 50 ASA). Depois as células foram colhidas por tripsinização e foram contadas utilizando um hemocitómetro (modelo aperfeiçoado da Neubauer).

A figura 1 ilustra a diminuição resultante da proliferação celular.

Microscopia por varrimento electrónico

As células destinadas a serem examinadas por microscopia por varrimento electrónico cresceram conforme anteriormente descrito em balões de 25 cm². A seguir a 48 horas de exposição ao agente efectuou-se a fixação das células numa solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão de fosfato de sódio 0,1 M a pH 7,4 de um dia para o outro a 4°C. Depois efectuou-se a pós-fixação das células em tetróxido de ósmio a 1% tamponado com fosfato durante 1 hora à temperatura ambiente, efectuou-se a sua lavagem e a subsequente desidratação gradual durante 1 hora utilizando uma sequência de concentrações etanólicas variando escalonadamente segundo os valores de 20, 40, 60, 80, até uma concentração final de 100%.

As secções da base do balão da cultura de tecidos foram removidas e foram secas até ao ponto crítico para se minimizar os fenómenos de contractura e fractura. Isto foi conseguido colocando as amostras num secador de ponto crítico de modelo 'Polaron' e limpando a câmara várias vezes com CO₂ para se remover todos os vestígios de etanol. Decorrida 1 hora aumentou-se os valores de temperatura e pressão respectivamente para 40°C e 1200 libras/polegada², tendo nesta altura sido atingido o ponto crítico para o dióxido de carbono e ficando a secagem completa.

A seguir os espécimes foram retirados da câmara, montados em peças adequadas para a microscopia por varrimento electrónico, utilizando para tal cola de carbono condutora

(Neubauer), e foram polvilhados com ouro *in vacuo* (5×10^{-2} torr) na presença de árgon e sob a acção de uma corrente eléctrica de 20 mA durante 3 minutos (Polaron E5100). A seguir à cobertura feita com ouro efectuou-se o exame das amostras no microscópio de varrimento electrónico (JEOL 35C) a trabalhar com uma tensão eléctrica aceleradora de 15 kV. As imagens ficaram registadas numa película fotográfica (película Kodak Plus-X Pan 120), conforme ilustrado na figura 2.

Microscopia por fluorescência

Foram aplicados inóculos de células em placas de 24 cavidades, segundo uma densidade de 1×10^4 células/cm². Após um período de recuperação de 24 horas foram expostas durante mais 48 horas à acção do fármaco que se pretendia investigar. As células foram fixadas progressivamente por meio de 6 incubações de 10 minutos com meio MEMD que continha concentrações cada vez maiores de formalina tamponada a valores neutros, aumentando as concentrações escalonadamente segundo os valores 10, 30, 50, 70, 90, até uma concentração final de 100%. Depois de a fixação estar completa efectuou-se a lavagem das células três vezes com soluto salino tamponado com fosfato a pH 7,4 durante um período de 30 minutos. Depois as células foram incubadas com anticorpo de coelho anti-MACN diluído à razão de 1 para 50 (Plipphys *et al.*, J. Neuropsychiatr. 2:413-417, 1990) em soluto salino tamponado com fosfato contendo albumina de soro de bovino a 1% (p/v) durante 1 hora à temperatura ambiente (TA) e foram lavadas três vezes com soluto salino tamponado com fosfato a pH 7,4 durante 30 minutos. As células assim lavadas foram então incubadas durante 1 hora à TA com o anticorpo anti-MACN secundário do coelho, diluído à razão de 1 para 50 em soluto salino tamponado com fosfato contendo 1% (p/v) de albumina do soro de bovino (Sigma) que se conjugou com rodamina. As células foram novamente lavadas três vezes com soluto

salino tamponado com fosfato a pH 7,4 e foram montadas depois utilizando 'Citifluor' (Agar Scientific) contendo um intensificador da fluorescência. A fluorescência da rodamina foi visualizada utilizando um comprimento de onda excitador de 535 nm (bloco de filtros N2.1 da Leica) num microscópio de fluorescência de modelo 'Leitz DMRB'. Examinou-se a intensidade da fluorescência nos pontos de contacto célula a célula, utilizando para tal o sistema de análise de imagens 'Quantimet 500'. Expressou-se a intensidade da fluorescência por níveis de cinzento nos pontos de contacto das células, comparativamente com os valores observados na contraprova. A figura 3 ilustra o aumento da imunofluorescência da MACN.

Exemplo 6

Estudos de fases agudas e crónicas *in vivo*

Investigou-se a capacidade dos compostos e das composições da presente invenção para exercerem uma acção neurotrófica *in vivo* em estudos de fases agudas e crónicas, utilizando para tal ratos (machos) adultos da estirpe Wistar. Os estudos da fase aguda permitiram determinar a sua capacidade para inverterem o efeito amnésico de uma lesão com escopolamina 6 horas após o adestramento num modelo experimental de coibição passiva, do mesmo tipo utilizado para os outros agentes neuroprotectores (Doyle *et al.*, J. Neurochem. 1993 61:266-272; Doyle e Regan, J. Neural Transm. 1993 92:33-39).

O ácido 2-n-pentil-4-pentinóico foi administrado nas 3 horas imediatamente a seguir ao período de pós-adestramento, seguindo-se a administração de escopolamina no momento correspondente às 6 horas pós-adestramento. As administrações foram efectuadas por via intraperitoneal nos momentos indicados pós-adestramento. Além disso, a outros 3 grupos, cada um deles constituído pelo menos por 3 animais, administrou-se o ácido 2-n-pentil-4-pentinóico decorridas 3 horas e o veículo decorridas 6 horas para se avaliar e controlar todos os efeitos

indesejados que o composto pudesse ter neste modelo experimental. Os dados são apresentados em gráficos com barras que indicam as variações médias e interquartis, tendo a significância estatística sido definida pelo teste U de Mann-Whitney para dados não paramétricos.

Todos os animais que receberam apenas veículo manifestaram uma boa recordação com um valor médio de latência de 300 segundos, até entrarem no escuro no compartimento de choque, indicando isso uma boa aprendizagem da lição de coibição (figura 4). A escopolamina administrada 6 horas após o adestramento atenuou a recordação às 24 horas, originando um valor médio de latência de 65 segundos. Isto demonstra a eficácia deste fármaco como agente amnésico potente neste modelo de adestramento. Para se avaliar a capacidade destes compostos neurotróficos para bloquearem ou para reduzirem estas insuficiências de adestramento, administrou-se o ácido 2-n-pentil-4-pentinóico por via intraperitoneal 3 horas após o adestramento e administrou-se escopolamina 6 horas após o adestramento, tal como antes. Verificou-se que o ácido 2-n-pentil-4-pentinóico reduzia, de uma forma dependente da dose, as insuficiências de memória induzidas pela escopolamina, observadas às 24 horas após o adestramento (figura 4). A reversão da amnésia induzida pela escopolamina foi conseguida por meio de doses de ácido 2-n-pentil-4-pentinóico variáveis no intervalo entre 50,4 mg/kg e 134 mg/kg, tendo sido observada uma reversão fortemente significativa com a dose de 84 mg/kg. Não foram observados nenhuns efeitos adversos com esta dose. Ao ser administrada a dose de 134,0 mg/kg, a atenuação da amnésia induzida pela escopolamina foi maior mas mais variável. Nos três grupos restantes, aos quais foram administradas doses de ácido 2-n-pentil-4-pentinóico e apenas veículo, o efeito anti-amnésico estabilizou apenas ao valor mais elevado da concentração testada (134 mg/kg). Isto ficou a dever-se à variação da capacidade de recordação dos animais, sugerindo isso um possível efeito de tipo dose-resposta em curva com forma de sino, uma vez que não foi observada nenhuma variação da actividade locomotora.

Os estudos de fase crónica permitiram avaliar a capacidade destes compostos e composições para evitar um declínio dependente da idade numa população de neurónios polissialilados da molécula de adesão às células neurais localizados no rebordo hilar/camada de células de grânulos do giro dentado do hipocampo. A frequência de neurónios polissialilados activados nesta região aumenta extraordinariamente durante a formação da memória e inversamente diminui com o envelhecimento, quando passam a ser mais evidentes as faltas de memória (Fox e Regan, *Neurochem. Res.* 1995 20:521-526). Em consequência, podem ser considerados como um índice de potencial neoplásico associado à memória. A administração crónica por via intraperitoneal de ácido 2-n-pentil-4-pentinóico nas doses de 16,8 mg/kg e 50,4 mg/kg durante o período pós-natal que medeia entre o 40º e o 80º dias, na altura em que se observa um declínio natural aproximado de 70% no número de neurónios polissialilados, produziu uma redução significativa comparativamente com os animais de contraprova aos quais se administrou o ácido 2-(2-metilpropil)-4-pentinóico numa dose de 16,8 mg/kg, que não tem o efeito antiproliferativo e prodiferenciador observado com o ácido 2-n-pentil-4-pentinóico (figura 5). Esta redução chegou até aproximadamente 25% para a dose de 50,4 mg/kg, a dose mais alta estudada, que representa aproximadamente 2,5 anos em termos humanos. Além disso, foram observados neurónios polissialilados no córtex entorrinal que se prolongavam, como uma banda única, através do córtex perirrinal até ao nível do córtex de piriforma. Esta população de células corticais manifestou uma redução e/ou uma activação aproximadamente para o dobro a seguir à exposição ao ácido 2-n-pentil-4-pentinóico na dose de 50,4 mg/kg durante o período pós-natal que medeia entre o 40º e o 80º dias, comparativamente com os animais de contraprova aos quais se administrou o ácido 2-(2-metilpropil)-4-pentinóico numa dose de 16,8 mg/kg (figura 5).

A redução e/ou a activação extraordinárias dos neurónios polissialilados no córtex rinal podem estar relacionadas com a distribuição diferencial do ácido 2-n-pentil-4-pentinóico dentro do córtex, em contraposição às outras regiões cerebrais. Numa experiência feita com um só animal, a administração intravenosa com um *bolus* de ácido 2-n-pentil-4-pentinóico (84 mg/kg) revelou uma distribuição no córtex 2 a 4 vezes superior comparativamente com as outras regiões do cérebro examinadas (figura 6). Esta penetração cortical foi equivalente à observada nos rins. Além disso, a análise do plasma indicou que a concentração de ácido 2-n-pentil-4-pentinóico livre era aproximadamente de 60 $\mu\text{g/g}$, correspondendo a uma fracção não ligada de 20%.

Não foram observados nenhuns efeitos adversos com nenhuma das doses, conforme se conclui por um aumento de peso invariante entre os grupos de animais (figura 5) e pela ausência de qualquer comportamento anormal nas observações sem restrições.

Adestramento de coibição passiva

Desenvolveu-se um modelo de tipo tentativa única, acção directa e luz-escuridão e validou-se para estudos de aprendizagem/memória. O dispositivo concebido era constituído por uma caixa que media 300 mm de comprimento x 260 mm de largura x 270 mm de altura. As partes da frente e de cima eram transparentes, o que permitiu ao experimentador observar o comportamento do animal dentro do dispositivo. Dividiu-se a caixa em dois compartimentos separados por uma persiana central onde havia uma pequena abertura com 50 mm de largura e 70 mm de altura. O mais pequeno dos compartimentos tinha uma largura de 90 mm e nele havia uma fonte de iluminação de baixa tensão (6 V) - o compartimento iluminado. O compartimento maior tinha uma largura de 210 mm e não estava iluminado.

O chão deste compartimento escuro era constituído por uma grelha com 16 barras horizontais de aço inoxidável com um diâmetro de 5 mm cada uma e afastadas entre si 12,5 mm.

Utilizou-se um gerador de corrente para injectar na grelha do chão uma corrente de 0,75 mA comutada uma vez em cada 0,5 segundos através das 16 barras. Calculou-se para um determinado grupo de ratos (250-350 g) uma resistência compreendida entre 40 e 60 k Ω e calibrou-se o dispositivo de acordo com estes parâmetros. Por meio de um circuito electrónico de detecção da resistência do animal garantiu-se uma injeção exacta de corrente eléctrica por variação automática da tensão com variação da resistência.

Introduziu-se os animais na sala onde iria decorrer o teste 3 dias antes do início de todos os estudos para lhes permitir ajustarem-se ao novo ambiente. No final deste período os animais foram manipulados por períodos de 2 minutos durante 3 dias sob uma iluminação com luz vermelha de fraca intensidade. Após cada sessão de manuseamento pesou-se cada animal e colocou-se na arena ao ar livre onde se avaliou a sua deambulação e o comportamento geral. Ao 4º dia - dia de adestramento - manuseou-se cada rato, pesou-se e avaliou-se na arena ao ar livre, conforme se havia feito antes. No entanto, a seguir à avaliação comportamental, colocou-se o animal dentro do compartimento pequeno iluminado do dispositivo de adestramento de coibição passiva, de modo a ficar voltado para a parede posterior. Fechou-se a porta rápida e cuidadosamente.

Logo que o rato se voltou para ficar de frente para o painel anterior do compartimento (após um período de adaptação normalmente inferior a 30 segundos) iniciou-se uma contagem cronometrada e registou-se a latência até entrar no compartimento escuro maior. Este período foi normalmente inferior a 20 segundos. Logo que o animal penetrou no compartimento escuro, com as 4 patas assentes no chão feito de grelha de aço, aplicou-se às barras do chão, por comando remoto, uma corrente de 0,75 mA. Regulou-se para 5 segundos o período máximo de choque e verificou-se que o animal quase sempre regressava ao compartimento iluminado seguro num período inferior a este, conhecido pela designação de latência de fuga.

Registou-se para cada rato a latência de fuga e recolocou-se o animal imediatamente na sua gaiola de habitação. Houve um grupo de animais de contraprova que não receberam choques nas patas, mas aos quais se permitiu explorar o dispositivo durante um período idêntico ao concedido a um dos animais tratados com os choques. Entre sessões consecutivas de adestramento, ambos os compartimentos foram rigorosamente limpos para se reduzir a possibilidade de haver confusão de sinais olfactivos.

Submeteu-se os animais a testes de memória - ou de capacidade para se lembrarem para não entrarem no compartimento escuro - às 24 horas após o adestramento. Os animais foram manuseados e pesados e foi feita uma avaliação, tal como se disse antes, e mais uma vez foram recolocados no compartimento seguro. Uma vez colocado o animal voltado para o painel anterior, teve início uma contagem cronometrada e registou-se a latência até entrarem no compartimento escuro, primeiro só com a cabeça, depois com as duas patas dianteiras e finalmente com as quatro patas. Não se aplicou nenhuma corrente eléctrica às barras e deixou-se decorrer um período crítico de 5 minutos antes de se retirar cada animal e de o recolocar na sua gaiola de habitação. Utilizou-se o tempo necessário para que as quatro patas do animal entrassem no compartimento escuro como medida básica de avaliação da capacidade do animal para se recordar e foram utilizados pelo menos 6 animais por grupo para se obter os valores medianos e percentis. Por meio de um teste U de Mann-Whitney para dados não paramétricos estimou-se a significância entre grupos.

Comportamentos em espaço aberto

Foram realizados estudos em espaço aberto como parte essencial do adestramento de coibição passiva. O dispositivo de adestramento em espaço aberto foi construído com madeira pintada de preto formando uma caixa com 620 mm de comprimento x 620 mm de largura x

150 mm de altura. O chão do dispositivo, pintado de branco, foi dividido de lado a lado em cada 77 mm com régua que o dividiram num conjunto de caixas de 77 mm x 77 mm. Colocou-se cada animal no centro da arena e permitiu-se-lhe que se deslocasse para o lado do dispositivo, momento em que se ligou um cronómetro. Como medida da actividade locomotora efectuou-se a contagem do número de linhas atravessadas nos 5 minutos subsequentes.

Num outro estudo comportamental avaliou-se o empinamento, o asseio, a piloerecção, a defecação e a postura - sendo tudo isto um bom sinal do estado de saúde do animal. Anotou-se o peso corporal como parâmetro de rotina. Todas as observações foram efectuadas no compartimento seguro sob uma iluminação de fraca intensidade entre as 08H00 e as 14H00 para se minimizar a influência circadiana. Esta avaliação comportamental foi inapreciável para a detecção de animais não responsivos ao programa de adestramento ou a efeitos interventivos indesejados que pudessem confundir os resultados do teste.

Imunoistoquímica

A frequência de neurónios polissialilados da molécula de adesão das células neurais na região hilar/camada de células de grânulos do giro dentado do hipocampo foi definida por técnicas de imunoistoquímica. Os cérebros recém-dissecados foram recobertos imediatamente num composto à temperatura óptima de corte (Gurr, U.K.), congelados instantaneamente em n-hexano arrefecido com azoto líquido e guardados a -80°C, até virem a ser necessários para posterior estudo. A partir dos tecidos congelados foram cortadas secções criostáticas horizontais de 12 µm utilizando para tal um criostato de modelo 'MICROM' (série 500). Foram obtidas secções sequenciais para análise a partir do mesmo ponto que se encontrava a meio caminho para baixo do eixo septotemporal (equivalente a -5,6 mm a partir da bregma para análise das células dentadas e -8,10 mm a partir da bregma para análise das células

corticais (Paxinos e Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, 1986)) e foram montadas ainda congeladas sobre lamelas de vidro recobertas com poli-1-lisina a 0,1% (p/v). As secções foram fixadas em etanol a 70% (v/v) durante 30 minutos, foram lavadas duas vezes durante 10 minutos com tampão de lavagem constituído por soluto salino a 0,9% tamponado com fosfato 0,1 M a pH 7,4 (STP) e foram incubadas de um dia para o outro (20 horas) numa câmara humidificada à temperatura ambiente conjuntamente com anti-MACN-PSA (Rougon *et al.*, J. Cell Biol. 1986 103:2429-2437) diluído a 1:500 num tampão de incubação constituído por STP contendo albumina de soro de bovino a 1% (p/v) (Sigma Chemical Co., U.K.) e soro normal de caprino a 1% (v/v) (DAKO, Dinamarca) para se eliminar a contrastação não específica. Efectuou-se a lavagem das secções outra vez, tendo sido depois expostas durante 3 horas a anti-IgM de murganho conjugado na cabra, com fluoresceína (Calbiochem, U.K.), diluído a 1:100 com tampão de incubação. Foi feita uma lavagem final de secções antes de serem montadas em 'Citifluor®' (Agar, U.K.) que é um meio para reforçar a fluorescência. Observou-se o padrão de contrastação com um microscópio de fluorescência de modelo 'Letiz DM RB', utilizando um comprimento de onda de excitação de 495 nm e um comprimento de onda de emissão de 525 nm. A contrastação de imuno-fluorescência era específica uma vez que foi totalmente eliminada por omissão quer do anti-corpo primário quer do anticorpo secundário e por pré-absorção do anti-MACN-PSA com ácido colomínico (1 mg/mL; Sigma Chemical Co., U.K.), o qual contém os homopolímeros α 2,8 do ácido siálico. Sempre que relevante, as secções foram recontrastadas mediante uma breve exposição (60 segundos) a iodeto de propídio (40 ng/mL de STP) que foi detectado utilizando um comprimento de onda de excitação de 552 nm e um comprimento de onda de emissão de 570 nm.

Efectuou-se a contagem do número total de neurónios imunorreactivos a MACN-PSA na camada de células dos grânulos dentados e no rebordo hilar em 10 secções alternadas de 12 μm para se evitar a dupla contagem das pericárias de 5-10 μm , divididas pela área total da camada de células de grânulos, ficando assim incluídas todas as células marcadas com o iodeto de propídio, e multiplicado pela área média das células de grânulos que era de $0,15 \text{ mm}^2 + 0,01 \text{ mm}^2$ a este nível, e calculou-se para cada grupo de animais a média $\pm$ d.p.. Estas médias foram utilizadas para se definir a média $\pm$ d.p. para cada grupo de animais. As medições das áreas foram feitas utilizando um sistema de análise de imagens de modelo 'Quantimet 500'. Para a análise estatística utilizou-se o teste t de Student.

Análise do ácido 2-n-pentil-4-pentinóico por EM-CG

Introduziu-se uma cânula residente (com um diâmetro interno de 0,5 mm) dentro da veia jugular esquerda sob anestesia com pentobarbitona sódica (60 mg/kg) 4 dias antes da administração do fármaco. Manteve-se a cânula desobstruída com polivinil-pirrolidona a 20% contendo heparina na concentração de 50 unidades/mL e com limpeza duas vezes por dia. Administrou-se um *bolus* de ácido 2-n-pentil-4-pentinóico (84 mg/kg) uma vez por dia durante 10 dias. Sacrificou-se o animal 30 minutos a seguir à última administração do fármaco, removeu-se-lhe o cérebro, dissecou-se em regiões individuais, colocou-se em frascos previamente pesados e guardou-se num estado congelado a -80°C até vir a ser necessário. O fígado e os rins foram tratados de modo idêntico. O sangue foi obtido por punção cardíaca, recolhido para dentro de tubos heparinizados e o plasma foi preparado por centrifugação a 1500 r.p.m. durante 10 minutos. Dividiu-se o sobrenadante em aliquotas que foram guardadas num estado congelado em frascos previamente pesados.

Para se extrair o ácido 2-n-pentil-4-pentinóico, homogeneizou-se o tecido por tratamento com ultra-sons em 2-10 volumes de H_2O . Foram extraídas aliquotas de 100-200 μL mediante a adição de 50 μL de tampão de NaH_2PO_4 0,1 N (pH 5,0) e de 1 mL de acetato de etilo contendo ácido 2-metil-2-etil-hexanóico na concentração de 1 $\mu g/mL$, como padrão interno. Agitou-se a mistura durante 15 minutos, centrifugou-se durante 1 minuto e concentrou-se o sobrenadante até ao volume aproximado de 200 μL por meio de uma corrente de azoto a 20°C e acrescentou-se uma aliquota de 100 μL de acetonitrilo. Repetiu-se a extracção apenas com acetato de etilo e efectuou-se a evaporação dos extractos combinados até se obter um volume final de 10-20 μL . Realizou-se a trimetilsililação por adição de 30 μL de piridina e 30 μL de N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida à temperatura ambiente durante 30 minutos pelo menos e efectuou-se a injeção de aliquotas de 1 mL no espectrómetro de massa por cromatografia em gás (EM-CG). Mediu-se o ácido 2-n-pentil-4-pentinóico não ligado após a ultrafiltração de aliquotas de soro com o dispositivo de ultrafiltração de modelo 'Amicon MPS-1' (membrana de YMT com um valor crítico de corte de 30 kDa). Efectuou-se a análise por EM-CG utilizando um aparelho 'perkin-Elmer F22-9-C' acoplado por meio de um separador 'Jet' a um espectrómetro de massa de modelo 'Finnigan MAT CH-7-A' comandado por um dispositivo '2100D Superincos'. Utilizou-se uma coluna de sílica fundida 'Megabore' (30 mm x 0,53 mm de diâmetro interno, espessura da película igual a 1 μm) recoberta com 'DB1701'. Manteve-se a temperatura do injector a 220°C. A temperatura inicial era de 80°C. Após a injeção, manteve-se a temperatura a 80°C durante 1 minuto, aumentou-se rapidamente até 120°C e depois aumentou-se até 190°C à razão de 4°C/minuto. A detecção teve lugar no modo selectivo de verificação de iões com os seguintes iões: o ião de m/z igual a 225 para o ácido 2-n-pentil-4-pentinóico e o ião de m/z igual a 215 para o ácido 2-metil-2-

-etil-hexanóico como padrão interno. Foram utilizados gráficos de calibração linear para se determinar as concentrações teciduais individuais.

Exemplo 7

Teratogenicidade do ácido valpróico e dos ácidos carboxílicos congêneres do ácido valpróico

Determinou-se a teratogenicidade do ácido valpróico e dos ácidos carboxílicos congêneres do ácido valpróico com variações no comprimento de uma cadeia lateral nos murganhos NMRI. Os quadros 1 e 2 agrupam os resultados para os compostos seguintes: VPA (ácido valpróico), etil-4-in-VPA (ácido 2-n-etil-4-pentinóico), 4-in-VPA (ácido 2-n-propil-4-pentinóico), butil-4-in-VPA (ácido 2-n-butil-4-pentinóico), pentil-4-in-VPA (ácido 2-n-pentil-4-pentinóico) e hexil-4-in-VPA (ácido 2-n-hexil-4-pentinóico). Administrou-se cada composto de ácido carboxílico em doses milimolares (mmol) de sal sódico/kg. Os valores da letalidade embrionária reflectem a percentagem de implantes totais e os valores da exencefalia reflectem a percentagem de fetos vivos. O número de fetos afectados está indicado entre parêntesis. Determinou-se o efeito teratogénico dos ácidos carboxílicos, de acordo com a presente invenção, recorrendo ao modelo de exencefalia de murganho descrito por Nau em Toxicol. Appl. Pharmacol. 80, 243-250 (1985) e na patente de invenção norte-americana com o número de série 08/344 810, depositada a 23 de Novembro de 1994, que aqui se considera incorporada por referência. Foram acasaladas fêmeas de murganhos MMRI com machos de murganhos MMRI entre as 6H00 e as 9H00. Tomou-se as primeiras 24 horas após a concepção como o dia 0 de gestação. As soluções dos sais sódicos dos ácidos carboxílicos foram injectadas por via intraperitoneal nos murganhos na manhã do 8º dia de gestação. Ao 18º dia de gestação, entre as 9H00 e as 12H00, os animais foram anestesiados

com éter dietílico e a seguir foram-lhes removidos os respectivos úteros. Determinou-se o número de locais de implantação, de ressorções e de fetos mortos (letalidade embrionária). Pesou-se cada feto vivo e examinou-se para pesquisa de exencefalia.

QUADRO 1

Ácido carboxílico	Dose ¹ (mmol/kg)	Nº de animais da ninhada	Nº de fetos vivos	Peso fetal (média ± d.p.) (g)	Letalidade embrionária ² (%)	Exencefalia ³ (%)
VPA	3,0	8	60	1,07 ± 0,10	49	42
Etil-4-in-VPA	1,85	6	73	1,12 ± 0,09	5	0
4-in-VPA	1,85	7	21	0,92 ± 0,12	76	81(17)
	1,23	13	89	1,03 ± 0,13	16	12
Butil-4-in-VPA	1,85	8	27	0,88 ± 0,06	69	96(26)
	1,25	9	63	0,99 ± 0,09	45	71(45)
Pentil-4-in-VPA	1,85	9	26	0,84 ± 0,11	78	81(21)
	1,25	6	44	1,02 ± 0,09	40	60(26)
Hexil-4-in-VPA	1,85	3	0	-	100	-
	1,5	6	12	0,86 ± 0,07	84	100(12)
	1,25	7	29	0,96 ± 0,06	67	79(23)
	1,0	7	37	1,03 ± 0,05	54	70(26)
	0,5	13	165	1,25 ± 0,10	18	7(9)
Contraprovas		14	152	1,19 ± 0,12	11	0

¹ As doses são em milimoles (mmol) de sal sódico para cada ácido carboxílico/kg. Todas as substâncias foram injectadas por via intraperitoneal na manhã do 8º dia de gestação.

² % de implantes totais

³ % de fetos vivos. O número de fetos afectados está indicado entre parêntesis.

QUADRO 2

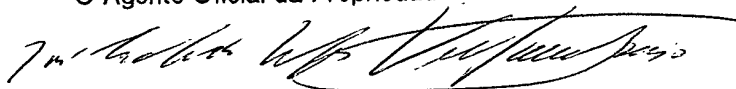
Substância ¹	Nº de animais da ninhada	Letalidade embrionária	Nº de fetos vivos	Peso fetal (média ± d.p.) (g)	Exencefalia (%)
4-in-VPA	13	16	89	1,03 ± 0,13	12
Butil-4-in-VPA	9	45	63	0,99 ± 0,09	71 (45)
Pentil-4-in-VPA	6	40	44	1,02 ± 0,09	60 (26)
Hexil-4-in-VPA	7	67	29	0,96 ± 0,06	79 (23)

¹ Administrou-se 1,25 nmol de sal sódico de cada ácido carboxílico por kg de peso corporal na manhã do 8º dia de gestação.

Embora se tenha descrito até aqui diversas variantes da presente invenção, é evidente que as concepções básicas podem ser alteradas para se obter outros casos em que sejam utilizados os métodos da presente invenção. Assim sendo, faz-se observar que o âmbito da presente invenção fica definido pelas reivindicações anexas e não pelas variantes específicas que foram aqui apresentadas a título exemplificativo.

Lisboa, 25 de Julho de 2001

O Agente Oficial da Propriedade Industrial



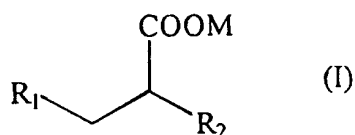
JOSÉ DE SAMPAIO

A.O.P.I.

Rua do Salitre, 195, r/c-Drt.
1269-063 LISBOA

Reivindicações

1. Ácido 2-n-pentil-4-pentinóico e os seus enantiómeros e os seus sais aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico.
2. Enantiómero S do composto da reivindicação 1.
3. Método para preparar compostos que satisfazem à fórmula estrutural (I)



em que

o símbolo R^1 representa $-\text{C}\equiv\text{CH}$,

o símbolo R^2 representa um grupo alquilo C_5 saturado e não ramificado e

o símbolo M representa um átomo de hidrogénio ou um átomo de um metal, o qual consiste em combinar um diéster de ácido malónico com um primeiro halogeneto de fórmula geral (VII)

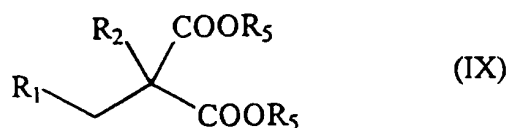


em que o símbolo R^2 possui as significações definidas antes, para formar um diéster do ácido 2-pentil-malónico, e em combinar depois o diéster do ácido 2-pentil-malónico com um segundo halogeneto de fórmula geral (VIII)



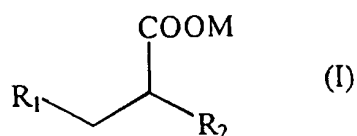
em que o símbolo R^1 possui as significações definidas antes, ou então combinando o diéster do ácido malónico com o segundo halogeneto de fórmula geral (VIII) para formar

um diéster do ácido 2-pentil-malónico e combinando o primeiro halogeneto de fórmula geral (VII) para formar um composto de fórmula estrutural (IX):



em que o símbolo R^5 representa um grupo alquilo; e em efectuar a hidrólise e a decarboxilação do composto de fórmula estrutural (IX) para formar um composto de fórmula estrutural (I); e converter facultativamente o composto de fórmula estrutural (I) num sal.

4. Enantiómero S dos compostos de fórmula estrutural (I)



em que

o símbolo R^1 representa $-\text{C}\equiv\text{CH}$,

o símbolo R^2 representa um grupo alquilo (C_1 - C_{30}) saturado ou insaturado, ramificado ou não ramificado, o qual é facultativamente substituído com um grupo ciclo-hidrocarbonado ou heterocíclico (C_3 - C_8), alifático ou aromático, que compreenda 3 a 9 átomos; e

o símbolo M representa um átomo de hidrogénio ou um átomo de um metal; e

seus sais farmacologicamente aceitáveis; desde que o composto de fórmula estrutural (I) não seja o ácido 2-n-propil-4-pentinóico.

5. Compostos de acordo com a reivindicação 4, em que o símbolo R^2 representa um grupo $-(\text{CH}_2)_{3-6}-\text{CH}_3$.

6. Compostos de acordo com a reivindicação 4, em que o símbolo R^2 representa um grupo $-(CH_2)_{4-5}-CH_3$.

7. Compostos de acordo com a reivindicação 4, seleccionados entre o conjunto constituído por:

ácido 2-n-prop-1¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-prop-2¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-i-propil-4-pentinóico

ácido 2-i-propenil-4-pentinóico

ácido 2-n-butil-4-pentinóico

ácido 2-n-but-1¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-but-2¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-but-3¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-prop-1¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilprop-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilprop-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilpropil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilprop-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilprop-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-terc-butil-4-pentinóico

ácido 2-n-pentil-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹-metilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹-dimetilpropil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,2¹-dimetilpropil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,2¹-dimetilpropil)-4-pentinóico

ácido 2-n-hexil-4-pentinóico

ácido 2-n-hex-1¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-hex-2¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-hex-3¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-hex-4¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-hex-5¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilpent-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilpent-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilpent-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilpent-4¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilpent-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilpent-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilpent-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilpent-4¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹-metilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹-metilpent-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹-metilpent-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹-metilpent-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹-metilpent-4¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(4¹-metilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(4¹-metilpent-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(4¹-metilpent-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(4¹-metilpent-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(4¹-metilpent-4¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹-dimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹-dimetilbut-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹-dimetilbut-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,2¹-dimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,2¹-dimetilbut-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,2¹-dimetilbut-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,2¹-dimetilbut-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,3¹-dimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,3¹-dimetilbut-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,3¹-dimetilbut-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,3¹-dimetilbut-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,2¹-dimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,2¹-dimetilbut-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,3¹-dimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,3¹-dimetilbut-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,3¹-dimetilbut-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,3¹-dimetilbut-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹,3¹-dimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹,3¹-dimetilbut-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹,2¹-trimetilpropil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹,2¹-trimetilprop-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,2¹,2¹-trimetilpropil)-4-pentinóico

ácido 2-n-heptil-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metil-hexil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metil-hexil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹-metil-hexil)-4-pentinóico

ácido 2-(4¹-metil-hexil)-4-pentinóico

ácido 2-(5¹-metil-hexil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,2¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,3¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,4¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,2¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,3¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,4¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹,3¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹,4¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(4¹,4¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹,2¹-trimetilbutil)-4-pentinóico

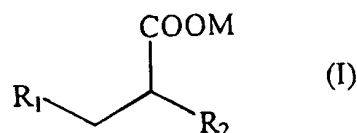
ácido 2-(1¹,1¹,3¹-trimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,2¹,3¹-trimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,2¹,3¹-trimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,3¹,3¹-trimetilbutil)-4-pentinóico.

8. Compostos de acordo com a reivindicação 7, seleccionados entre o conjunto constituído por ácido 2-n-butil-4-pentinóico, ácido 2-n-pentil-4-pentinóico, ácido 2-n-hexil-4-pentinóico, ácido 2-n-heptil-4-pentinóico e ácido 2-n-octil-4-pentinóico.
9. Compostos de acordo com a reivindicação 8, os quais são seleccionados entre o conjunto constituído por ácido 2-n-pentil-4-pentinóico e ácido 2-n-hexil-4-pentinóico.
10. Utilização dos compostos de fórmula estrutural (I)



para a preparação de um medicamento para o tratamento de células neuronais,

em que

o símbolo R¹ representa -C≡CH,

o símbolo R² representa um grupo alquilo(C₁-C₃₀) saturado ou insaturado, ramificado ou não ramificado, o qual é facultativamente substituído com um grupo ciclo-hidrocarbonado

ou heterocíclico (C₃-C₈), alifático ou aromático, que compreenda 3 a 9 átomos; e

o símbolo M representa um átomo de hidrogénio ou um átomo de um metal;

e os seus sais farmaceuticamente aceitáveis.

11. Utilização dos compostos de acordo com a reivindicação 10, em que o símbolo R^1 representa $-C\equiv CH$ e o símbolo R^2 representa um grupo $-(CH_2)_4-CH_3$ ou $-(CH_2)_5-CH_3$.

12. Utilização dos compostos de acordo com a reivindicação 10, em que os compostos administrados às células neuronais são seleccionados entre o conjunto constituído por:

ácido 2-n-prop-1¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-prop-2¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-i-propil-4-pentinóico

ácido 2-i-propenil-4-pentinóico

ácido 2-n-butil-4-pentinóico

ácido 2-n-but-1¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-but-2¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-but-3¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-prop-1¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilprop-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilprop-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilpropil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilprop-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilprop-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-terc-butil-4-pentinóico

ácido 2-n-pentil-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹-metilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹-dimetilpropil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,2¹-dimetilpropil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,2¹-dimetilpropil)-4-pentinóico

ácido 2-n-hexil-4-pentinóico

ácido 2-n-hex-1¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-hex-2¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-hex-3¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-hex-4¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-hex-5¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilpent-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilpent-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilpent-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilpent-4¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilpent-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilpent-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilpent-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilpent-4¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹-metilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹-metilpent-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹-metilpent-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹-metilpent-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹-metilpent-4¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(4¹-metilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(4¹-metilpent-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(4¹-metilpent-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(4¹-metilpent-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(4¹-metilpent-4¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹-dimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹-dimetilbut-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹-dimetilbut-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,2¹-dimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,2¹-dimetilbut-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,2¹-dimetilbut-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,2¹-dimetilbut-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,3¹-dimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,3¹-dimetilbut-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,3¹-dimetilbut-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,3¹-dimetilbut-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,2¹-dimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,2¹-dimetilbut-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,3¹-dimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,3¹-dimetilbut-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,3¹-dimetilbut-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,3¹-dimetilbut-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹,3¹-dimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹,3¹-dimetilbut-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹,2¹-trimetilpropil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹,2¹-trimetilprop-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,2¹,2¹-trimetilpropil)-4-pentinóico

ácido 2-n-heptil-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metil-hexil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metil-hexil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹-metil-hexil)-4-pentinóico

ácido 2-(4¹-metil-hexil)-4-pentinóico

ácido 2-(5¹-metil-hexil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,2¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,3¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,4¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,2¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,3¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,4¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹,3¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹,4¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(4¹,4¹-dimetilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹,2¹-trimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹,3¹-trimetilbutil)-4-pentinóico

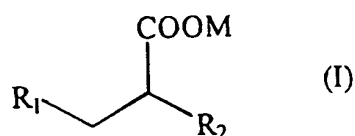
ácido 2-(1¹,2¹,3¹-trimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,2¹,3¹-trimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,3¹,3¹-trimetilbutil)-4-pentinóico.

13. Utilização dos compostos de acordo com a reivindicação 12, em que os compostos administrados às células neuronais são seleccionados entre o conjunto constituído por ácido 2-n-butil-4-pentinóico, ácido 2-n-pentil-4-pentinóico e ácido 2-n-hexil-4-pentinóico.
14. Utilização dos compostos de acordo com a reivindicação 13, em que o composto administrado às células neuronais é o ácido ácido 2-n-pentil-4-pentinóico.
15. Utilização dos compostos de acordo com a reivindicação 10 para a preparação de um medicamento para a prevenção ou para o tratamento de uma doença neurodegenerativa seleccionada entre o conjunto constituído por doença de Alzheimer, doença de Huntington, ELA, doença de Huntington, ataque súbito, neuropatia diabética e trauma.
16. Utilização dos compostos de acordo com a reivindicação 15, em que o símbolo R¹ representa -C≡CH e o símbolo R² representa um grupo -(CH₂)₁₋₉-CH₃.
17. Utilização dos compostos de acordo com a reivindicação 16, em que o símbolo R¹ representa -C≡CH e o símbolo R² representa um grupo -(CH₂)₃₋₅-CH₃.

18. Utilização dos compostos de fórmula estrutural (I)



para a preparação de um medicamento para a inibição da mitose celular,

em que

o símbolo R^1 representa $-\text{C}\equiv\text{CH}$,

o símbolo R^2 representa um grupo alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_{30}$) saturado ou insaturado, ramificado ou não ramificado, o qual é facultativamente substituído com um grupo ciclo-hidrocarbonado ou heterocíclico ($\text{C}_3\text{-C}_8$), alifático ou aromático, que compreenda 3 a 9 átomos; e

o símbolo M representa um átomo de hidrogénio ou um átomo de um metal;

e os seus sais farmacêuticamente aceitáveis.

19. Utilização dos compostos de acordo com a reivindicação 18, em que o símbolo R^1 representa $-\text{C}\equiv\text{CH}$ e o símbolo R^2 representa um grupo $-(\text{CH}_2)_{1-9}\text{-CH}_3$.

20. Utilização dos compostos de acordo com a reivindicação 19, em que o símbolo R^1 representa $-\text{C}\equiv\text{CH}$ e o símbolo R^2 representa um grupo $-(\text{CH}_2)_{3-5}\text{-CH}_3$.

21. Utilização dos compostos de acordo com a reivindicação 18, em que os compostos administrados às células proliferativas são seleccionados entre o conjunto constituído por:

ácido 2-n-prop-1¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-prop-2¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-i-propil-4-pentinóico

ácido 2-i-propenil-4-pentinóico

ácido 2-n-butil-4-pentinóico

ácido 2-n-but-1¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-but-2¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-but-3¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-prop-1¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilprop-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilprop-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilpropil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilprop-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilprop-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-terc-butil-4-pentinóico

ácido 2-n-pentil-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹-metilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹-dimetilpropil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,2¹-dimetilpropil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,2¹-dimetilpropil)-4-pentinóico

ácido 2-n-hexil-4-pentinóico

ácido 2-n-hex-1¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-hex-2¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-hex-3¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-hex-4¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-n-hex-5¹-enil-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilpent-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilpent-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilpent-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metilpent-4¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilpent-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilpent-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilpent-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metilpent-4¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹-metilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹-metilpent-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹-metilpent-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹-metilpent-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹-metilpent-4¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(4¹-metilpentil)-4-pentinóico

ácido 2-(4¹-metilpent-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(4¹-metilpent-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(4¹-metilpent-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(4¹-metilpent-4¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹-dimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹-dimetilbut-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹-dimetilbut-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,2¹-dimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,2¹-dimetilbut-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,2¹-dimetilbut-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,2¹-dimetilbut-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,3¹-dimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,3¹-dimetilbut-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,3¹-dimetilbut-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,3¹-dimetilbut-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,2¹-dimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,2¹-dimetilbut-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,3¹-dimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,3¹-dimetilbut-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,3¹-dimetilbut-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹,3¹-dimetilbut-3¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹,3¹-dimetilbutil)-4-pentinóico

ácido 2-(3¹,3¹-dimetilbut-1¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹,2¹-trimetilpropil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,1¹,2¹-trimetilprop-2¹-enil)-4-pentinóico

ácido 2-(1¹,2¹,2¹-trimetilpropil)-4-pentinóico

ácido 2-n-heptil-4-pentinóico

ácido 2-(1¹-metil-hexil)-4-pentinóico

ácido 2-(2¹-metil-hexil)-4-pentinóico
 ácido 2-(3¹-metil-hexil)-4-pentinóico
 ácido 2-(4¹-metil-hexil)-4-pentinóico
 ácido 2-(5¹-metil-hexil)-4-pentinóico
 ácido 2-(1¹,1¹-dimetilpentil)-4-pentinóico
 ácido 2-(1¹,2¹-dimetilpentil)-4-pentinóico
 ácido 2-(1¹,3¹-dimetilpentil)-4-pentinóico
 ácido 2-(1¹,4¹-dimetilpentil)-4-pentinóico
 ácido 2-(2¹,2¹-dimetilpentil)-4-pentinóico
 ácido 2-(2¹,3¹-dimetilpentil)-4-pentinóico
 ácido 2-(2¹,4¹-dimetilpentil)-4-pentinóico
 ácido 2-(3¹,3¹-dimetilpentil)-4-pentinóico
 ácido 2-(3¹,4¹-dimetilpentil)-4-pentinóico
 ácido 2-(4¹,4¹-dimetilpentil)-4-pentinóico
 ácido 2-(1¹,1¹,2¹-trimetilbutil)-4-pentinóico
 ácido 2-(1¹,1¹,3¹-trimetilbutil)-4-pentinóico
 ácido 2-(1¹,2¹,3¹-trimetilbutil)-4-pentinóico
 ácido 2-(2¹,2¹,3¹-trimetilbutil)-4-pentinóico
 ácido 2-(2¹,3¹,3¹-trimetilbutil)-4-pentinóico.

22. Compostos de acordo com a reivindicação 21, os quais são seleccionados entre o conjunto constituído por ácido 2-n-butil-4-pentinóico, ácido 2-n-pentil-4-pentinóico e ácido 2-n-hexil-4-pentinóico.

23. Compostos de acordo com a reivindicação 22, em que o composto administrado às células proliferativas é o ácido 2-n-pentil-4-pentinóico.
24. Utilização dos compostos de acordo com a reivindicação 19, em que as células mitóticas derivam da crista neural.
25. Utilização dos compostos de acordo com a reivindicação 19, em que as células mitóticas se encontram presentes no sistema nervoso central.

Lisboa, 25 de Julho de 2001

O Agente Oficial da Propriedade Industrial



JOSÉ DE SAMPAIO
A.O.P.I.
Rua do Salitre, 195, r/c-Drt.
1269-063 LISBOA

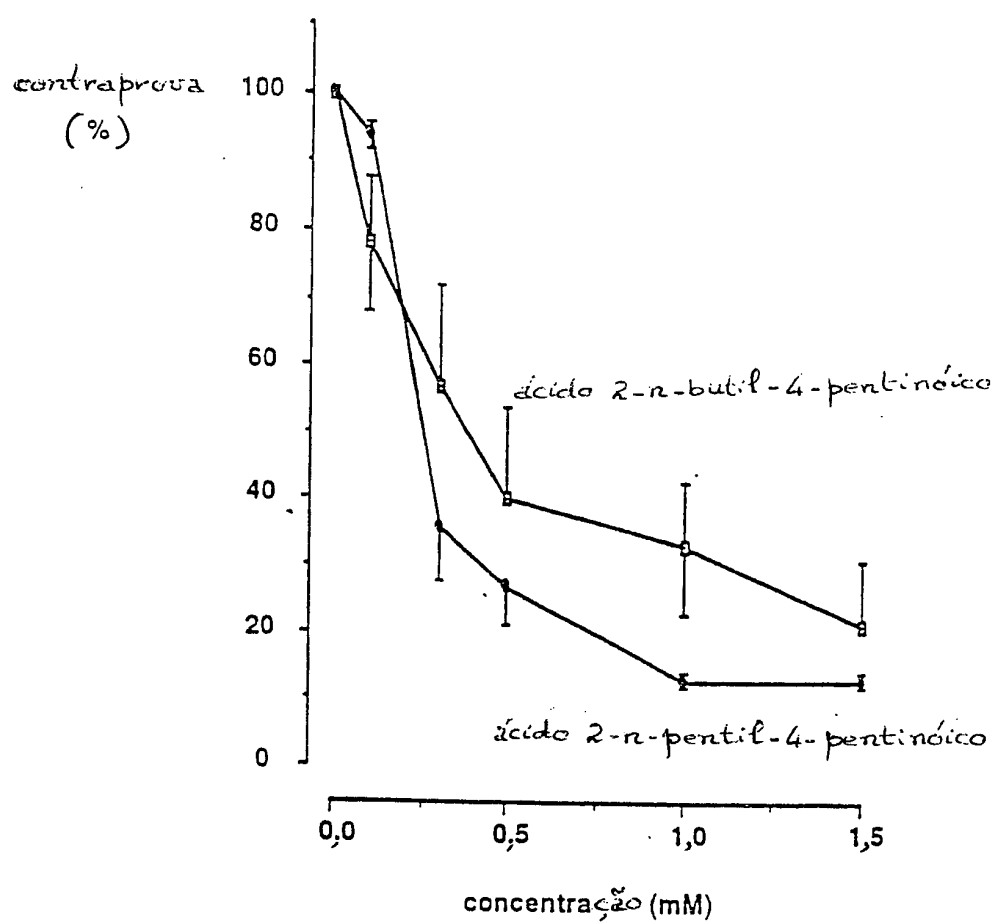


FIG. 1

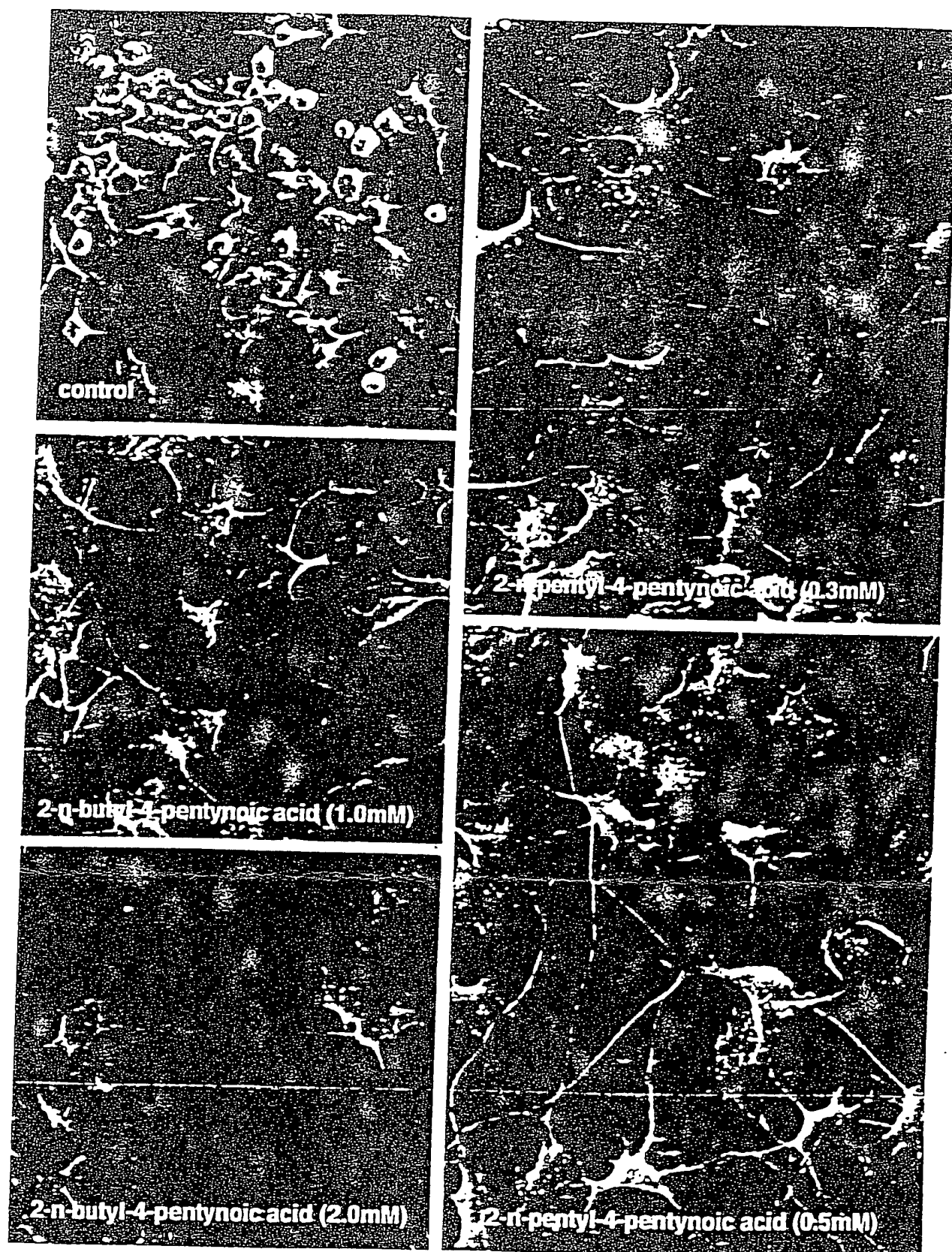
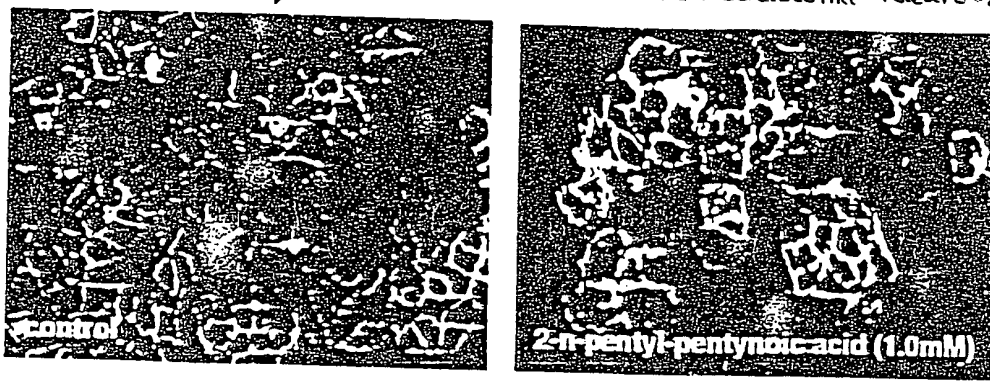


FIG. 2

3A

Panel A: Imunofluorescência das células do neuroblastoma Neuro-2a



3B

Panel B: Intensidade da Fluorescência das Células do Neuroblastoma Neuro-2a

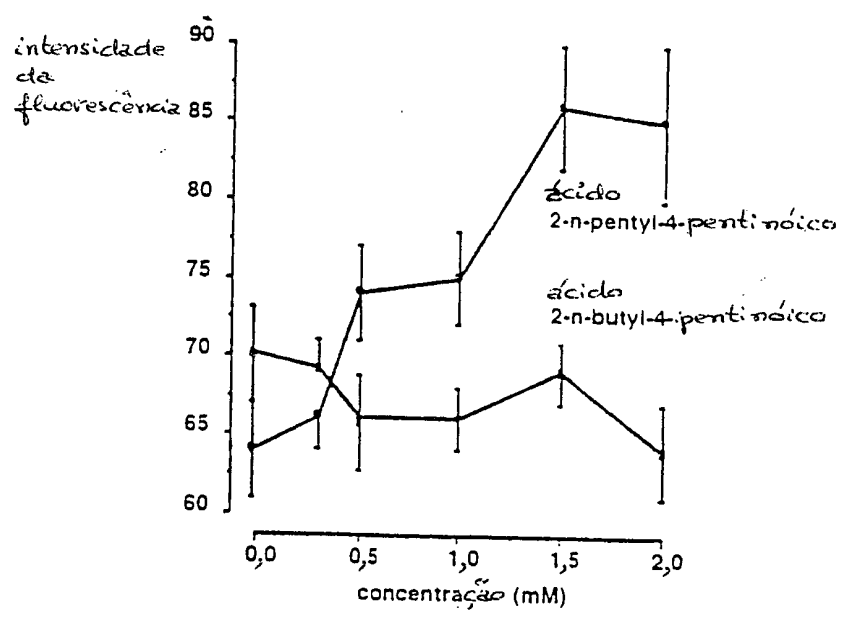
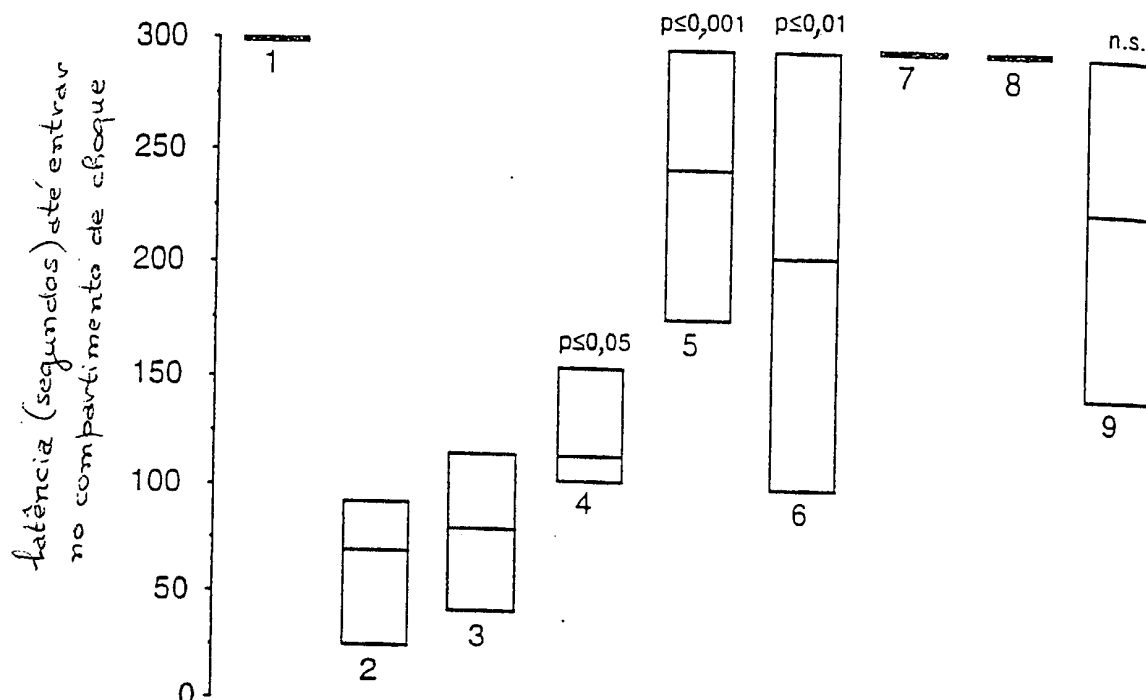


FIG. 3



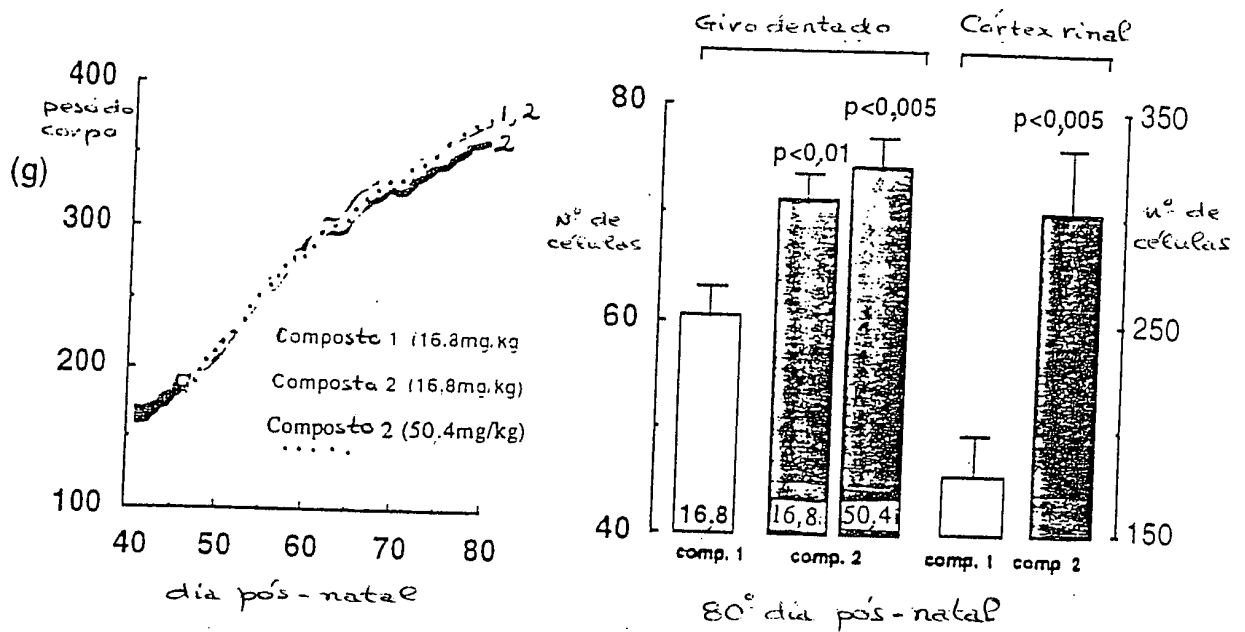
Tratamento

- 1 veículo: 0,5 ml de soluto salino 0,9% (p/v)
- 2 veículo: 0,5 ml de fármaco salino 0,9% (p/v); escopolamina 0,8 mg/kg ip
- 3 fármaco: ABS-205 16,8 mg/kg ip
fármaco: escopolamina 0,8 mg/kg ip
- 4 fármaco: ABS-205 50,4 mg/kg ip
fármaco: escopolamina 0,8 mg/kg ip
- 5 fármaco: ABS-205 84,0 mg/kg ip
fármaco: escopolamina 0,8 mg/kg ip
- 6 fármaco: ABS-205 134,0 mg/kg ip
fármaco: escopolamina 0,8 mg/kg ip
- 7 fármaco: ABS-205 50,4 mg/kg ip
veículo: 0,5 ml de soluto salino 0,9% (p/v)
- 8 fármaco: ABS-205 84,0 mg/kg ip
veículo: 0,5 ml de soluto salino 0,9% (p/v)
- 9 fármaco: ABS-205 134,0 mg/kg ip
veículo: 0,5 ml de soluto salino 0,9% (p/v)

Protocolo

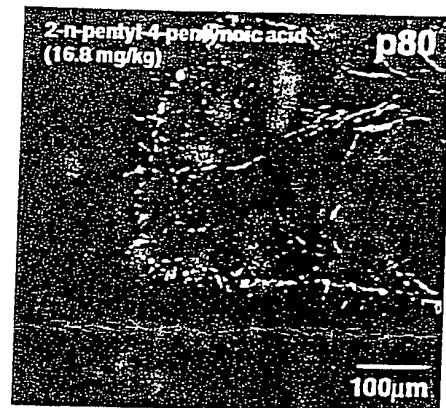
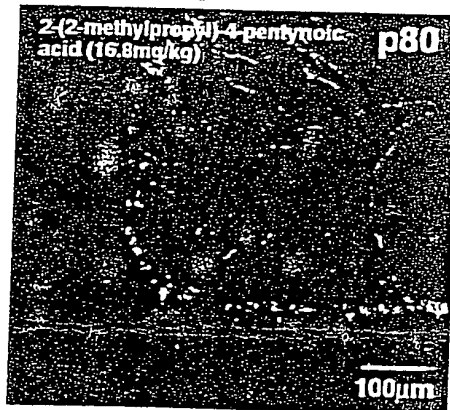
- veículo 3hr + veículo 6hr (n=7)
- veículo 3hr + escopolamina 6hr (n=8)
- ABS-205 3hr + escopolamina 6hr (n=5)
- ABS-205 3hr + escopolamina 6hr (n=6)
- ABS-205 3hr + escopolamina 6hr (n=6)
- ABS-205 3hr + escopolamina 6hr (n=6)
- ABS-205 3hr + veículo 6hr (n=3)
- ABS-205 3hr + veículo 6hr (n=3)
- ABS-205 3hr + veículo 6hr (n=4)

FIG. 4



Composto 1: ácido 2-(2-metilpropil)-4-pentinoico
Composto 2: ácido 2-n-pentil-4-pentinoico

Giro dentado



Córtex rinal

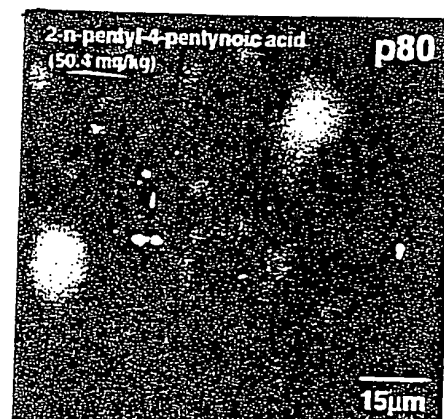
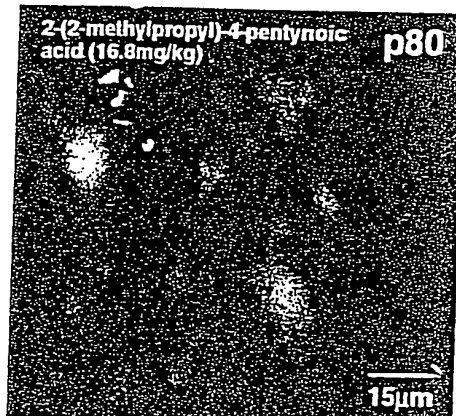


FIG. 5

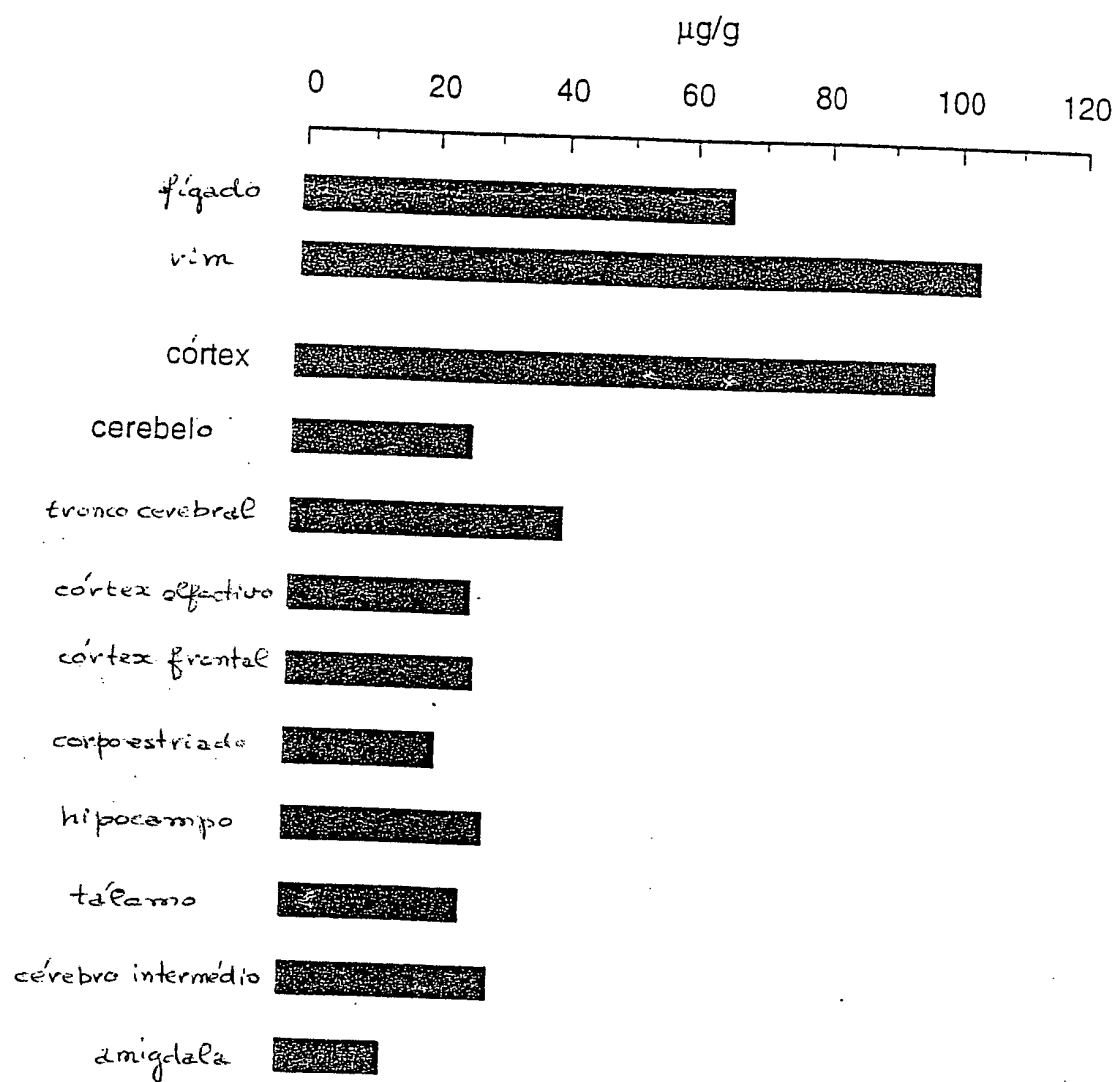


FIG. 6