

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2007.09.14	(73) Titular(es): NATUREWISE BIOTECH & MEDICALS CORPORATION 6F, NO. 36, SEC. 3, BADE RD. TAIPEI CITY TW
(30) Prioridade(s):	
(43) Data de publicação do pedido: 2009.04.08	(72) Inventor(es): CHUNG-YANG HUANG TW CHIA-NAN CHEN TW WEI-JAN HUANG TW CHIH-HSIANG HUANG TW LI-LING CHI TW
(45) Data e BPI da concessão: 2015.04.08 111/2015	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

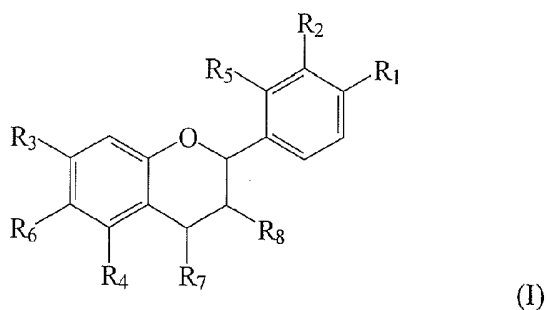
(54) Epígrafe: **COMPOSTOS PARA A INIBIÇÃO DA HISTONA-DESACETILASE**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE A UM COMPOSTO REPRESENTADO PELA SEGUINTE FÓRMULA (I): E SEUS SAIS, ESTEREOISÓMEROS, ENANTIÓMEROS, PRÓ-FÁRMACOS E SOLVATOS FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEIS. OS COMPOSTOS SÃO ÚTEIS COMO UM AGENTE PARA A INTENSIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO DE NEURITES E A PREVENÇÃO OU TRATAMENTO DE DOENÇAS ASSOCIADAS COM HDAC EM PARTICULAR DOENÇAS TUMORAIS OU PROLIFERATIVAS CELULARES. EM PARTICULAR, OS COMPOSTOS DA INVENÇÃO PODEM SER UTILIZADOS COMO UM AGENTE CONTRA DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS E ATROFIA MUSCULAR ESPINHAL (AME) HUMANA.

RESUMO**"COMPOSTOS PARA A INIBIÇÃO DA HISTONA-DESACETILASE"**

A invenção refere-se a um composto representado pela seguinte fórmula (I):



e seus sais, estereoisômeros, enantiômeros, pró-fármacos e solvatos farmaceuticamente aceitáveis. Os compostos são úteis como um agente para a intensificação do crescimento de neurites e a prevenção ou tratamento de doenças associadas com HDAC em particular doenças tumorais ou proliferativas celulares. Em particular, os compostos da invenção podem ser utilizados como um agente contra doenças neurodegenerativas e atrofia muscular espinhal (AME) humana.

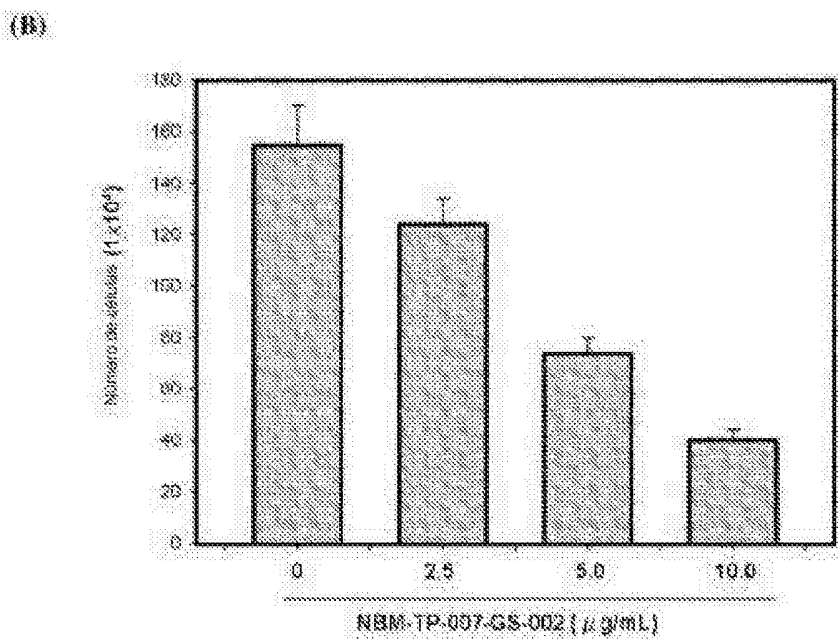
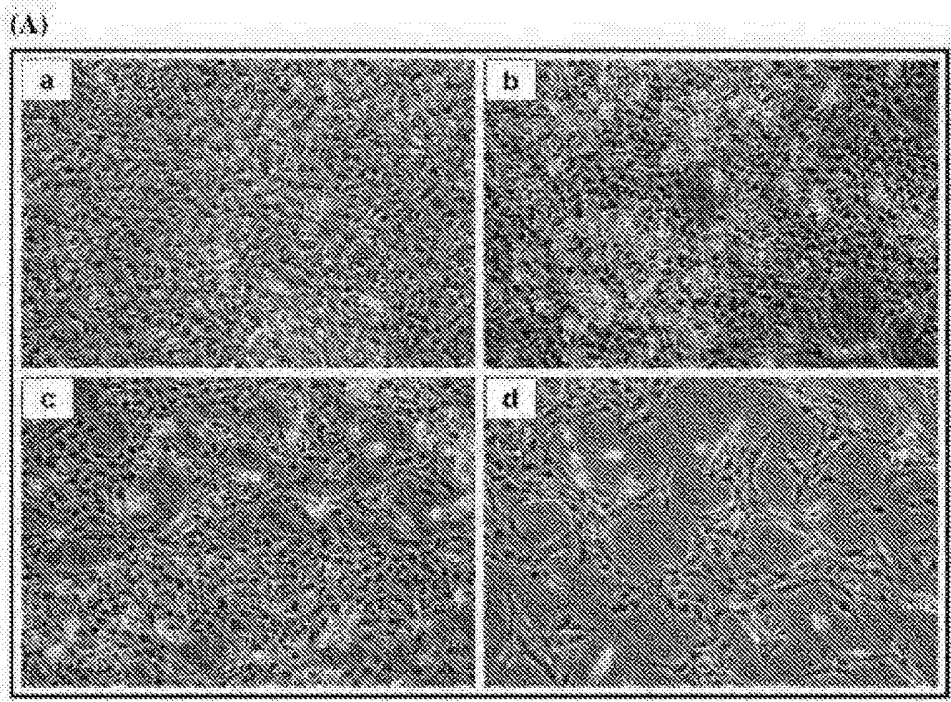


FIG. 1

DESCRIÇÃO

"COMPOSTOS PARA A INIBIÇÃO DA HISTONA-DESACETILASE"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a novos compostos que são úteis como agentes para a prevenção ou tratamento de doenças associadas com a histona-desacetilase (HDAC), em particular, doenças tumorais ou proliferativas celulares. Eles também podem ser utilizados como agentes para intensificar o crescimento de neurites. Em particular, os compostos da invenção podem ser usados como agentes contra doenças neurodegenerativas e atrofia muscular espinhal humana (SMA).

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O DNA eucariótico está altamente organizado e embalado no núcleo. A organização e embalagem são atingidos por meio da adição de proteínas, incluindo histonas nucleares H2A, H2B, H3 e H4, que formam uma estrutura complexa, a cromatina, conjuntamente com o DNA. A modificação de histonas nucleares é de importância fundamental para mudanças conformacionais da cromatina. O nível de acetilação está relacionado com a atividade de transcrição, e em seguida a acetilação induz uma conformação aberta da cromatina, que permite o acesso da maquinaria de transcrição a promotores. A histona-desacetilase (HDAC) e a histona-acetiltransferase

(HAT) são enzimas que influenciam a transcrição de modo seletivo da desacetilação ou acetilação dos grupos ϵ -amino de lisina localizados perto dos terminais amino de proteínas histonas nucleares. HDAC é uma família de 11 enzimas (isoformas) que podem atuar como reguladores-mestres de muitas doenças, incluindo cancro, porque elas estão envolvidas no controlo da expressão do gene. A rutura de HDACs tem sido associada a uma grande variedade de cancros humanos. As enzimas HDAC ou isoformas parecem estar envolvidas em muitos tipos diferentes de cancro.

O inibidores de histona-desacetilase (HDAC) estão a emergir como uma nova classe excitante de agentes anticancerígenos potenciais para o tratamento de malignidades sólidas e hematológicas. Nos últimos anos, foi identificado um número crescente de inibidores de HDAC estruturalmente diversos; eles inibem a proliferação e induzem a diferenciação e/ou apoptose de células tumorais em cultura e em modelos animais. A inibição de HDAC é causa das histonas nucleares acetiladas se acumularem não só em tecidos tumorais mas também em normais, proporcionando um marcador substituto para a atividade biológica de inibidores de HDAC *in vivo*. Os efeitos de inibidores de HDAC na expressão do gene são altamente seletivos, conduzindo à ativação transcricional de certos genes tais como o inibidor de cinase dependente de ciclina p21WAF1/CIP1 mas à repressão de outros. A inibição de HDAC não só resulta na acetilação de histonas, mas também de fatores de transcrição tais como p53, GATA-1 e recetor alfa de estrogénio. O significado

funcional da acetilação de proteínas não-histonas e os mecanismos precisos por meio dos quais os inibidores de HDAC induzem a paragem do crescimento de células tumorais, a diferenciação e/ou apoptose são atualmente o foco de investigação intensiva. Os inibidores de HDAC atualmente em ensaios clínicos têm mostrado atividade e representam uma classe de agentes antitumorais molecularmente marcados com potencial de eficácia com base num novo mecanismo de ação.

Um artigo de revisão publicado em *Medicinal Research Reviews*, **26(4)** (2006) 397-413, indicou que têm sido relatadas quatro classes de inibidores de HDAC, ácidos gordos de cadeia curta, ácidos hidroxâmicos, benzamidas e péptidos cíclicos. Compostos polares híbridos (HPCs) à base de ácido hidroxâmico são inibidores de HDAC, os quais induzem a diferenciação em concentrações micromolares ou inferiores (*Journal of the National Cancer Institute*, **92 (15)** (2-agosto-2000) 1210-1216). Pat. E.U.A. N° 6 174 905, EP 0847992, JP 258863/96 e Pedido Japonês N° 10138957 revelam derivados de benzamida que induzem a diferenciação celular e inibem a HDAC. WO 01/38322 revela compostos adicionais que servem como inibidores de HDAC. Foi relatado em *Hum. Genet.*, **120** (2006) 101-110, que a benzamida M344 regula em alta a expressão da proteína SMN2 em células de fibroblasto derivadas de pacientes de AME até 7 vezes após 64 horas de tratamento. Foi relatado que o butirato de sódio melhora a expressão fenotípica num modelo de ratinho transgénico de atrofia muscular espinhal e bulbar (*Human Molecular Genetics*, **13(11)** (2004) 1183-1192). Verificou-se

que a tricostatina A, um inibidor de histona-desacetilase, induz a degradação da ciclina D1 dependente de ubiquitina em células de cancro da mama MCF-7 (*Molecular Cancer*, **5:8** (2006); este artigo está disponível em: <http://www.molecular-cancer.com/content/5/1/8>). A Pat. dos E.U.A. N° 7 169 801 revelou compostos que podem ser usados para inibir a histona-desacetilase tendo a fórmula Z-Q-L-M ou Z-L-M. A Pat. dos E.U.A. N° 6 888 027 abrange uma família de inibidores de HDAC de sulfonamida incluindo PDX101. A Patente Europeia N° EP 1 301 184 abrange a utilização de ácido valproico e seus derivados como inibidores de HDAC no tratamento de tumores sólidos. EP-A-1 640 371 revela na página 6 o composto Nymphaeol-C, o qual é também conhecido por Propolina G. Contudo, os substituintes nas posições R₁ e R₂ da Propolina G são OH.

C.-N. Chen *et al.*, "COMPARISON OF RADICAL SCAVENGING ACTIVITY, CYTOTOXIC EFFECTS AND APOPTOSIS INDUCTION IN HUMAN, MELANOMA CELLS BY TAIWANESE PROPOLIS FROM DIFFERENT SOURCES" EVIDENCE-BASED COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE", XX, XX, vol. 1, n° 2, 18 de agosto de 2004 (2004-08-18), páginas 175185, XP009069460 revela sete composto de ocorrência natural, nomeadamente, Propolinas A a F, os quais podem ser isolados a partir de própolis.

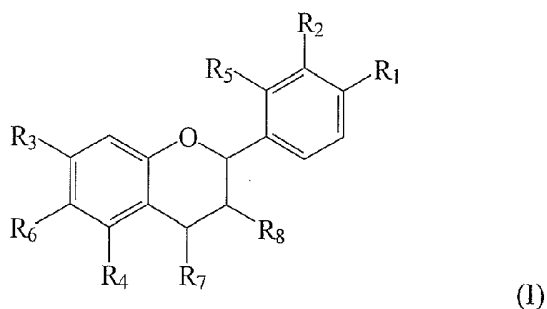
T. Fukai *et al.*, "CYTOTOXIC ACTIVITY OF LOW MOLECULAR WEIGHT POLYPHENOLS AGAINST HUMAN ORAL TUMOR CELL LINES", *Anticancer Research*, Hellenic Anticancer Institute, Atenas, **20 (4)** (1 de janeiro de 2000, 2000-01-01) 2525-2536, XP001 016407 ISSN: 0250-7005 revela a atividade citológica contra tumor normal e células infetadas por VIH

de 150 polifenóis naturais e sintéticos. Contudo, este documento nunca ensina nem sugere que estes polifenóis são eficazes como inibidores de HDAC.

Para além disso, ainda existe uma necessidade de desenvolver uma nova classe de inibidores de HDAC para prevenir ou tratar cancros.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

O objetivo da invenção é proporcionar um grupo de compostos representados pela seguinte fórmula (I):



e seus sais, estereoisómeros, enantiómeros e solvatos farmaceuticamente aceitáveis, os quais são compostos úteis como um agente para a intensificação do crescimento de neurites e prevenção ou tratamento de doenças associadas com HDAC, em particular doenças tumorais ou proliferativas de células. Em particular, os compostos da invenção podem ser usados como agentes contra doenças neurodegenerativas e atrofia muscular espinhal (AME) humana.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Fig. 1 - mostra as fotografias ao microscópio das células C6 de glioma de rato tratadas com diferentes concentrações de NBM-HD-1.

Fig. 2 - mostra o conteúdo de DNA das células C6 de glioma de rato analisadas por citometria de FACS.

Fig. 3 - mostra o gráfico de electroforese dos genes do ciclo celular das células C6 de glioma de rato tratadas com diferentes doses de NBM-HD-1.

Fig. 4 - mostra as fotografias de coloração imunofluorescente e dados de RT-PCR de células C6 de glioma de rato tratadas com NBM-HD-1.

Fig. 5 - mostra a representação do exame de Western Blot das células C6 de glioma de rato tratadas com NBM-HD-1 e butirato de sódio.

Fig. 6 - mostra a atividade relativa da inibição de HDAC em células C6 de glioma de rato tratadas com NBM-HD-1 e butirato de sódio.

Fig. 7 - mostra as fotografias ao microscópio das células de cancro DBTRG-05MG de glioblastoma humano tratadas com doses diferentes de NBM-HD-1.

Fig. 8 - mostra as fotografias ao microscópio das células MCF-7 de cancro da mama humano tratadas com diferentes doses de NBM-HD-1.

Fig. 9 - mostra que NBM-HD-1 inibiu marcadamente o crescimento de células MCF-7 através da modulação do ciclo celular parado na fase G0/G1 de uma forma dependente da dose.

Fig. 10 - mostra que NBM-HD-1 aumentou marcadamente a expressão do gene p21^{WAF1/CIP1} de uma forma dependente da dose.

Fig. 11 - mostra a representação do exame de Western Blot das células MCF-7 tratadas com NBM-HD-1.

Fig. 12 - mostra as fotografias do crescimento de neurites dos neurónios corticais tratados com NBM-HD-1.

Fig. 13 - mostra as fotografias ao microscópio das células MCF-7 de cancro da mama humano tratadas com concentrações diferentes de NBM-HD-2.

Fig. 14 - mostra as fotografias ao microscópio das células MCF-7 de cancro da mama humano tratadas com concentrações diferentes de NBM-HD-3.

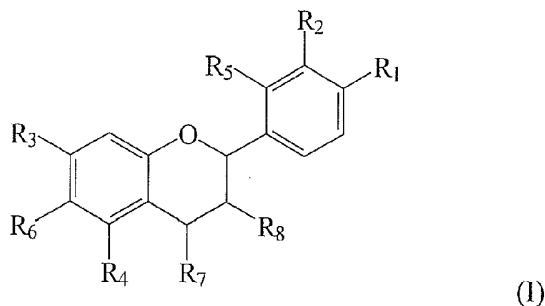
DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a novos compos-

tos derivados de propolinas, que são úteis como agentes para a intensificação do crescimento de neurites e a prevenção ou tratamento de doenças associadas com HDAC em particular doenças tumorais ou proliferativas celulares. Os compostos da invenção são potentes na inibição do crescimento em células de cancro via diferenciação. Em particular, eles podem ser usados como agentes contra doenças neurodegenerativas e atrofia muscular espinhal humana (AME).

COMPOSTOS DA INVENÇÃO

De acordo com o precedente, a presente invenção diz respeito a compostos representados pela seguinte fórmula (I):



em que

R₁ e R₂ são, cada um independentemente, O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo, O-alcenilo, S-alcenilo, NH-alcenilo, O-alcinilo, S-alcinilo, NH-alcinilo, O-cicloalquilo C₃-C₈, S-cicloalquilo C₃-C₈, NH-cicloalquilo C₃-C₈, O-anel monocíclico ou bicíclico de 5 a 10 membros insaturado, O-benzilo, S-anel monocíclico ou bicíclico de 5 a 10 membros insaturado, NH-anel monocíclico ou bicíclico de 5 a 10 membros insaturado, alquilo, alcenilo, alcinilo, cicloalquilo C₃-C₈, um anel monocíclico ou bicíclico de 5 a 10 membros insatu-

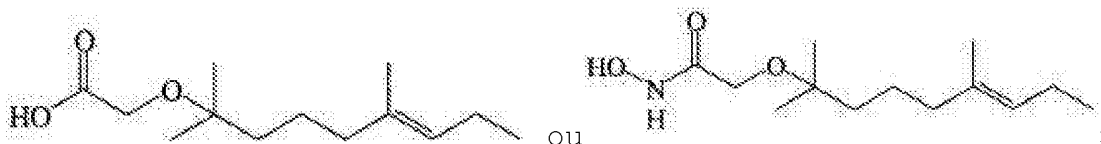
rado, ou um anel heterocíclico de 5 a 10 membros saturado ou insaturado compreendendo pelo menos um heteroátomo no anel selecionado a partir do grupo constituído por N, O e S; ou

R₁ e R₂ podem em conjunto formar dioxolano;

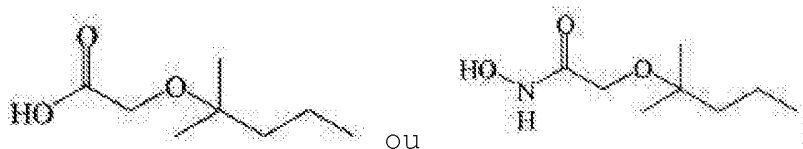
R₃ é O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo, O-alcenilo, S-alcenilo, NH-alcenilo, O-alcinilo, S-alcinilo, NN-alcinilo, O-cicloalquilo C₃-C₈, S-cicloalquilo C₃-C₈, NH-cicloalquilo C₃-C₈, O-anel monocíclico ou bicíclico de 5 a 10 membros insaturado, O-benzilo, S-anel monocíclico ou bicíclico de 5 a 10 membros insaturado, NH-anel monocíclico ou bicíclico de 5 a 10 membros insaturado, alquilo, alcenilo, alcinilo, cicloalquilo C₃-C₈, um anel monocíclico ou bicíclico de 5 a 10 membros insaturado, ou um anel heterocíclico de 5 a 10 membros saturado ou insaturado compreendendo pelo menos um heteroátomo no anel selecionado a partir do grupo constituído por N, O e S;

R₄ é OH, OC(=O)alquilo, O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo, O-alcenilo, S-alcenilo, NH-alcenilo, O-alcinilo, S-alcinilo, NH-alcinilo, O-cicloalquilo C₃-C₈, S-cicloalquilo C₃-C₈, NH-cicloalquilo C₃-C₈, O-anel monocíclico ou bicíclico de 5 a 10 membros insaturado, O-benzilo, S-anel monocíclico ou bicíclico de 5 a 10 membros insaturado, NH-anel monocíclico ou bicíclico de 5 a 10 membros insaturado, alquilo, alcenilo, alcinilo, cicloalquilo C₃-C₈, um anel monocíclico ou bicíclico de 5 a 10 membros insaturado, ou um anel heterocíclico de 5 a 10 membros saturado ou insaturado compreendendo pelo menos um heteroátomo no anel selecionado a partir do grupo constituído por N, O e S;

R_5 é alquilo C_4-C_{16} ou alcenilo C_4-C_{16} não substituído ou substituído com um ou mais alquilo C_1-C_6 , OH, halogéneo, CN, NO, N_3 , NH_2 , CHO, OR_9 , SR_9 , NR_9 , $COOR_9$,



R_6 é alquilo C_2-C_{12} ou alcenilo C_2-C_{12} não substituído ou substituído com um ou mais alquilo C_1-C_6 , OH, halogéneo, CN, NO, N_3 , NH_2 , CHO, OR_9 , SR_9 , NR_9 ,



R_7 é hidrogénio, halogéneo, OH, NH_2 , COOH, CHO, CN, NO, ou R_7 e R_8 podem em conjunto formar uma ligação dupla, um cicloalquilo C_3-C_6 , ou um anel heterocíclico de 5 a 10 membros compreendendo pelo menos um heteroátomo selecionado a partir do grupo constituído por N, O e S;

R_8 é hidrogénio, halogéneo, OH, NH_2 , COOH, CHO, CN ou NO;

R_9 é fenilo, $C(=O)R^{10}$ ou $C(=O)OR^{10}$; e

R^{10} é OH, NHOH ou NH_2 ;

em que ambos R_5 e R_6 não são simultaneamente alquilo ou alcenilo não substituído;

ou seus sais, estereoisómeros, enantiómeros e solvatos farmacêuticamente aceitáveis.

No contexto da presente especificação, o termo "alquilo" significa cadeias de hidrocarboneto lineares ou ramificadas. O grupo alquilo é preferivelmente alquilo C₁-C₁₀. Preferivelmente, o número de átomos de carbono do alquilo é selecionado a partir do grupo constituído por 1 a 8; mais preferivelmente, é alquilo C₁-C₆ ou alquilo C₁-C₄. Exemplos de grupos alquilo incluem metilo (-CH₃), etilo (-CH₂CH₃), propilo (-CH₂CH₂CH₃), isopropilo (CH₃)₂CH e butilo (-C₄H₉).

No contexto da presente especificação, o termo "alcenilo" significa grupos hidrocarbonetos insaturados de cadeia não só linear mas também ramificada, em que a insaturação está presente apenas como ligações duplas. De acordo com a invenção, o alcenilo inclui uma ou mais ligações duplas. O alcenilo é preferivelmente alcenilo C₂-C₁₆. Mais preferivelmente, o número de átomos de carbono do alcenilo é selecionado a partir do grupo constituído por 2 a 12. Exemplos de grupos alcenilo incluem etenilo (-CH=CH₂), propenilo (-CH=CHCH₃ ou -CH₂CH=CH₂), butenilo (-CH₂CH=CHCH₃ ou -CH=CHCH₂CH₃ ou -CH₂CH₂CH=CH₂), -CH₂CH=C(CH₃)CH₃, -CH₂-CH=CH-CH₂CH₂-CH=CH-CH₃ e -CH₂CH=C(CH₃)-CH₂CH₂-CH=C(CH₃)-CH₃.

No contexto da presente especificação, o termo "alcinilo" significa grupos hidrocarbonetos insaturados não só de cadeia linear mas também ramificada, em que a insaturação está presente somente como ligações triplas. Preferivelmente, o número de átomos de carbono de alcinilo é selecionado a partir do grupo constituído por 2 a 8. Mais pre-

ferivelmente, alcinilo é alcinilo C₂-C₆ ou alcinilo C₂-C₄. Exemplos de grupos alcinilo incluem propinilo (por exemplo, -CH₂C=CH).

No contexto da presente especificação, o termo "cicloalquilo" significa um anel alifático (anel carbocíclico saturado). Preferivelmente, o número de átomos de carbono do cicloalquilo é selecionado do grupo constituído por 3 a 8. Exemplos de grupos cicloalquilo incluem ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo e ciclo-hexilo.

No contexto da presente especificação, o termo "anel monocíclico ou bicíclico de 5 a 10 membros insaturado" significa sistema de anel monocíclico ou bicíclico (fundido ou de outra forma) de 5 a 10 membros insaturado, exemplos dos quais incluem fenilo e naftilo.

No contexto da presente especificação, o termo "anel heterocíclico de 5 a 10 membros saturado ou insaturado compreendendo pelo menos um heteroátomo no anel selecionado a partir do grupo constituído por N, O e S" significa um sistema de anel heterocíclico de 5 a 10 membros saturado ou insaturado compreendendo pelo menos um heteroátomo no anel selecionado a partir de azoto, oxigénio e enxofre, estando cada grupo facultativamente substituído por pelo menos um substituinte selecionado a partir de nitro, hidroxilo, oxo, halogénio, carboxilo, alquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, alquil C₁-C₆-tio, alquil C₁-C₆-carbonilo, alcoxi C₁-C₆-carbonilo e fenilo. Exemplos do anel heterocíclico

incluem piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tienilo, furanilo, quinolinilo, isoquinolinilo, e outros semelhantes.

No contexto da presente especificação, o termo "halogéneo" significa flúor, cloro, bromo e iodo.

No contexto da presente especificação, o termo "sal farmacologicamente aceitável" inclui aqueles formados com ácidos e bases não só orgânicos mas também inorgânicos. Os sais de adição de ácido farmacologicamente aceitáveis incluem aqueles formados a partir de ácidos minerais tais como: ácidos clorídrico, bromídrico, sulfúrico e fosfórico; e ácidos orgânicos tais como: ácidos cítrico, tartárico, láctico, pirúvico, acético, trifluoroacético, succínico, oxálico, fórmico, fumárico, maleico, oxaloacético, metanosulfónico, etanossulfónico, p-toluenossulfónico, benzenossulfónico e isetiónico. Os sais de base farmacologicamente aceitáveis incluem sais de amónio, sais de metais alcalinos tais como os de sódio e potássio, sais de metais alcalino-terrosos tais como os de cálcio e magnésio e sais com bases orgânicas, incluindo sais de aminas primárias, secundárias e terciárias.

No contexto da presente especificação, o termo "pró-fármaco" significa um composto que é convertido no interior do corpo, por exemplo, por hidrólise no sangue, na sua forma ativa que tem efeitos médicos.

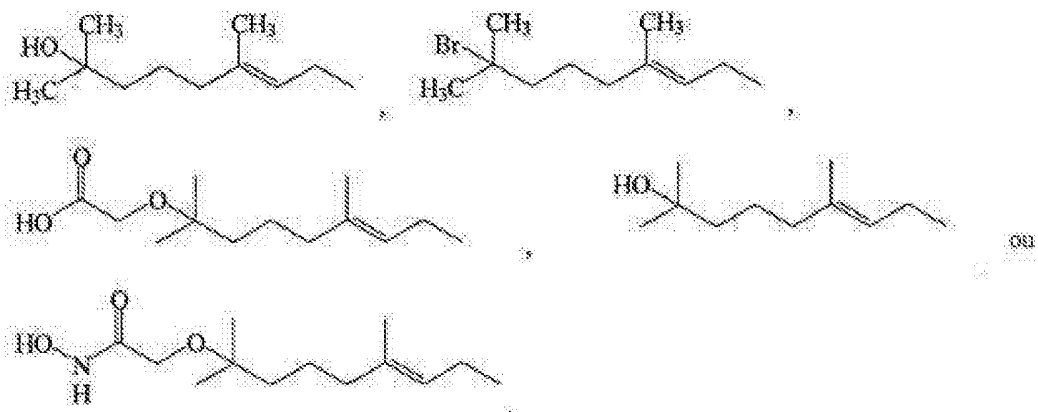
No contexto da presente especificação, o termo "solvato" significa um complexo que compreende o composto da invenção e um solvente no qual eles vão reagir ou a partir do qual eles são precipitados ou cristalizados.

No contexto da presente especificação, o termo "estereoisómeros" significa moléculas isoméricas cuja conectividade atômica é a mesma, mas cujo arranjo atômico no espaço é diferente.

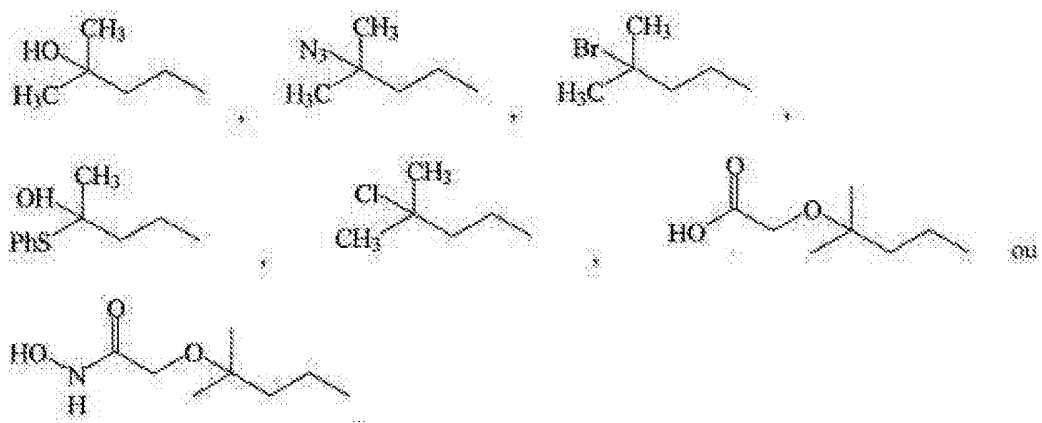
No contexto da presente especificação, o termo "enantiómeros" significa estereoisómeros que são imagens de espelho completas não sobreponíveis um do outro, tanto quanto as mãos direita e esquerda de uma pessoa são "o mesmo", mas opostas.

De acordo com uma forma de realização dos compostos de fórmula (I) da invenção, preferivelmente, R_1 e R_2 são cada um independentemente O-alquilo C_1-C_6 , O-fenilo ou O-benzilo ou R_1 e R_2 em conjunto formam dioxaleno. Mais preferivelmente, R_1 e R_2 são cada um independentemente OCH_3 , OCH_2CH_3 , $OCH_2CH_2CH_3$, O-fenilo ou O-benzilo.

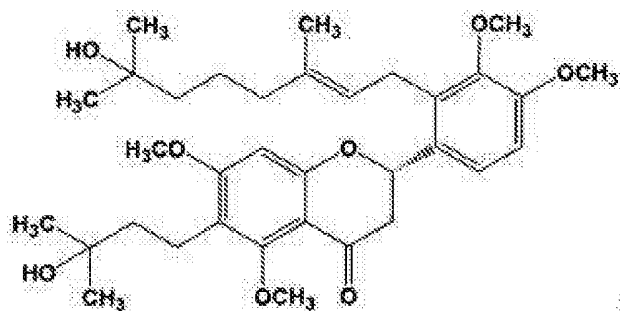
De acordo com uma forma de realização dos compostos de fórmula (I) da invenção, preferivelmente, R_5 é

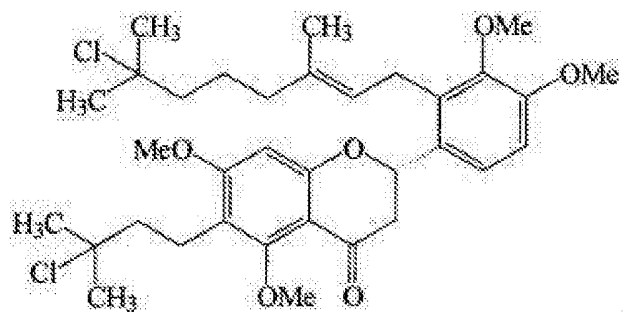
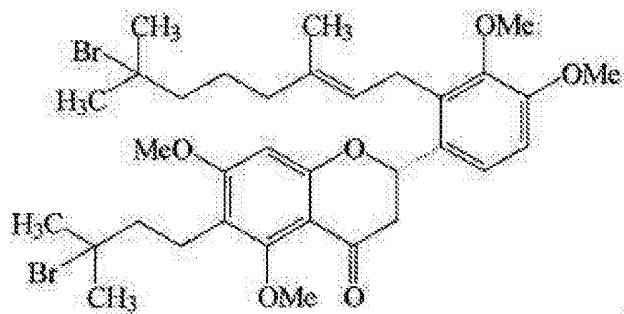
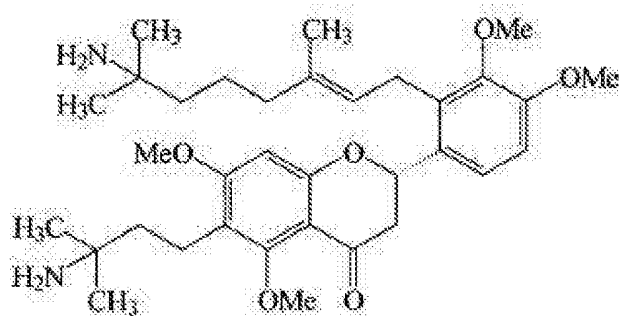
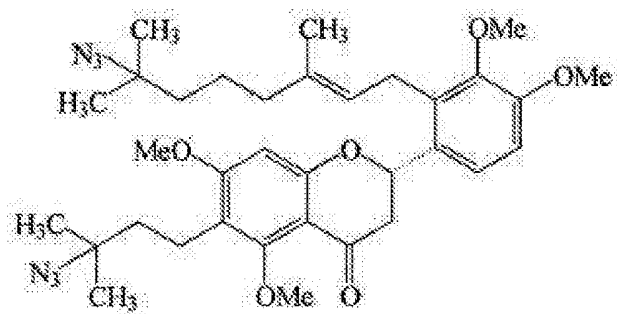


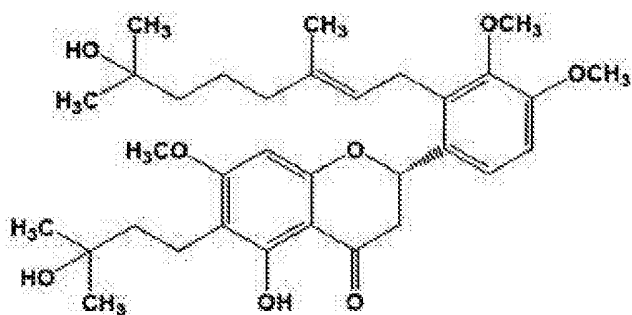
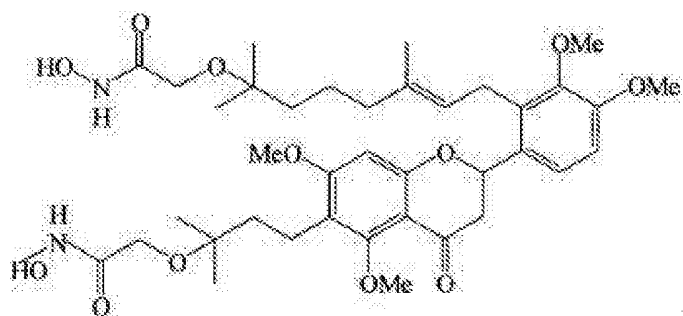
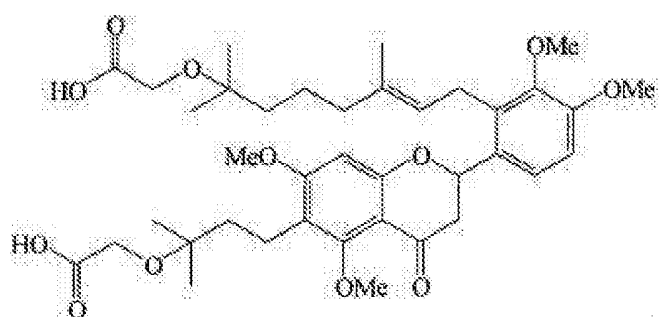
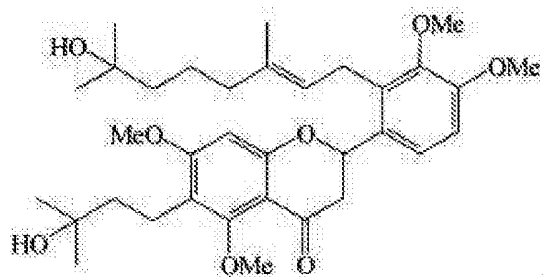
De acordo com uma forma de realização dos compostos de fórmula (I) da invenção, preferivelmente, R₆ é

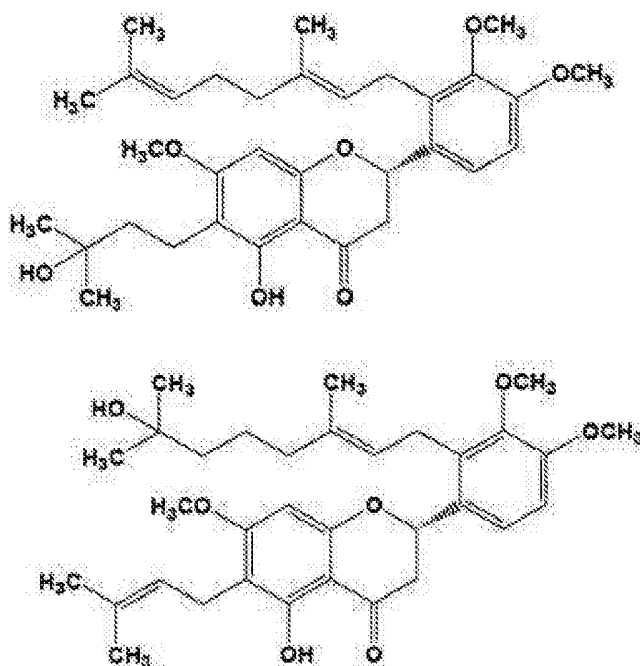


De acordo com a invenção, o composto de fórmula (I) preferido da invenção é selecionado a partir do grupo constituído por:

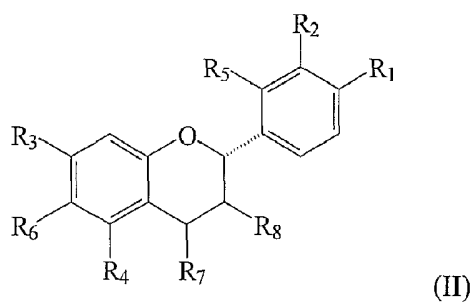






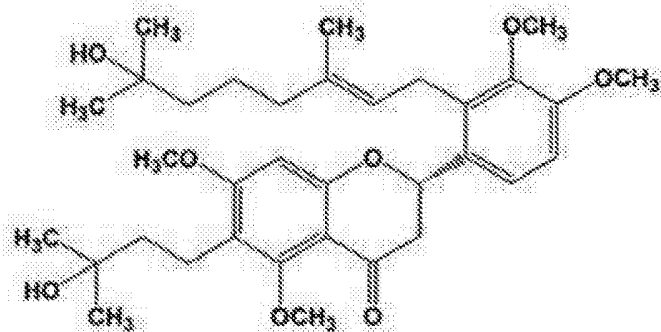


A presente invenção também diz respeito a um estereoisômero de acordo com o composto de fórmula (I), e é representado pela seguinte fórmula (II):

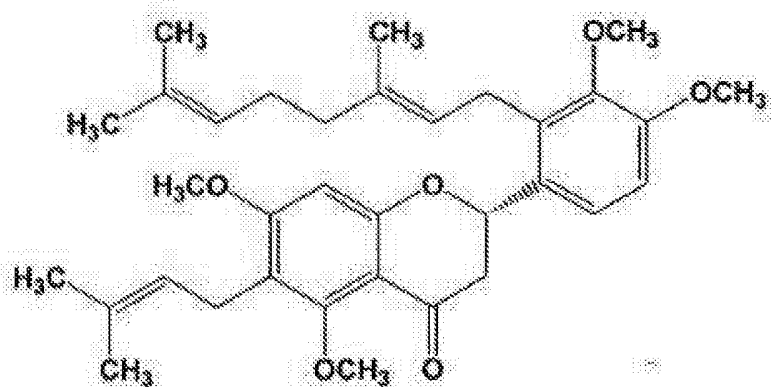


em que R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 e R_8 são definidos como os da fórmula (I).

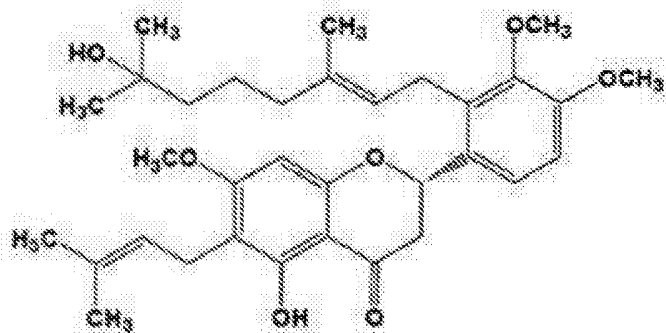
De acordo com uma forma de realização mais preferida da invenção, o composto de fórmula (I) é aquele que tem a seguinte fórmula (III), (IV), (V) ou (VI):



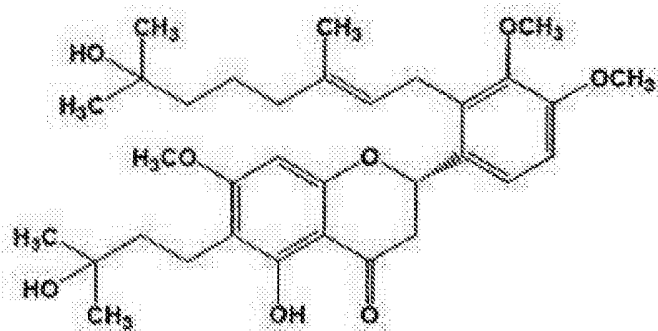
(III)



(IV)



(V)



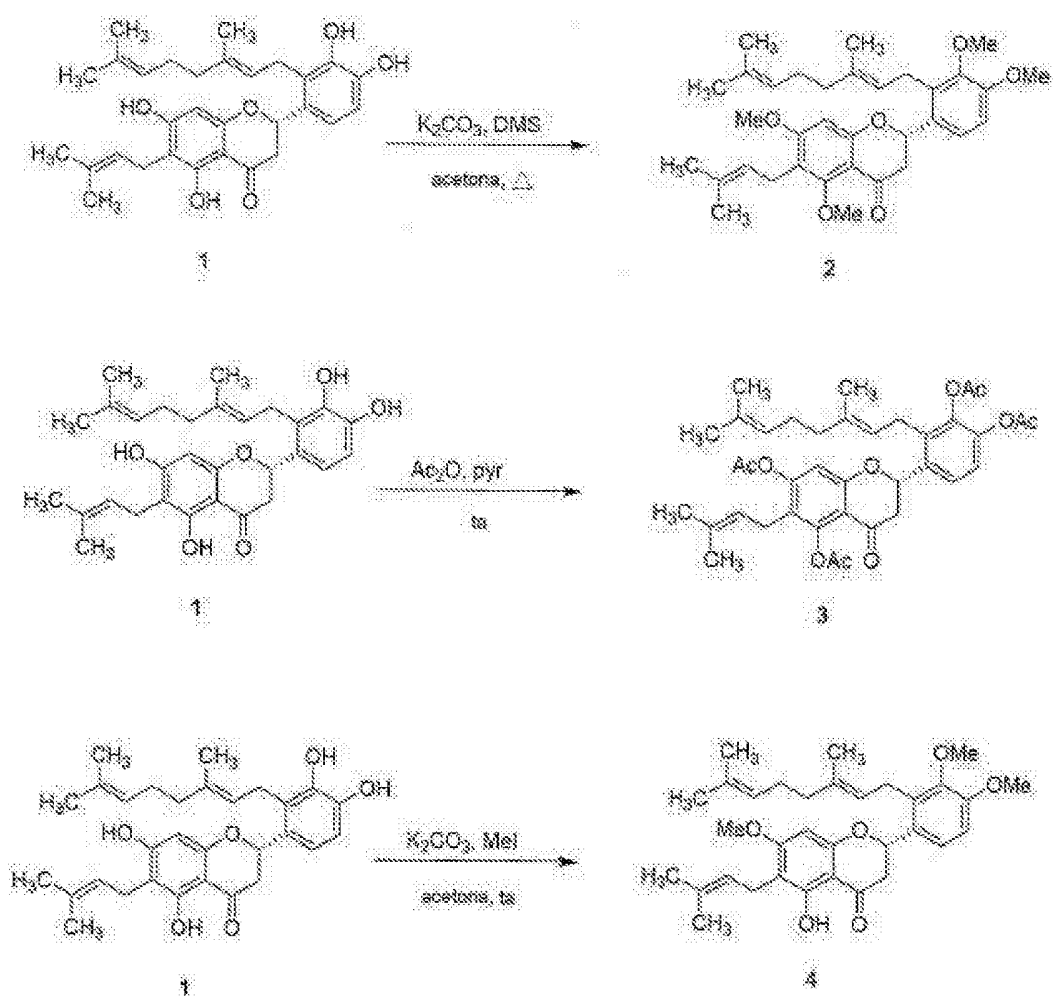
(VI)

De acordo com a invenção, os compostos de fórmula (I) da invenção podem inibir a HDAC e por conseguinte podem ser usados como agentes para a prevenção ou tratamento de doenças associadas com a histona-desacetilase (HDAC). Além disso, os compostos da invenção inibem significativamente o crescimento de múltiplas linhas celulares de cancro, incluindo as células C6 de glioma de rato, glioblastoma humano, células de cancro da mama humano, células de leucemia humana, e as células de melanoma humano. O mecanismo para a inibição do crescimento de células de cancro pode ser pela via da diferenciação, em especial via diferenciação induzida e expressão do gene regulador do ciclo celular regulado, incluindo os de p21 e ciclina B1. Além disso, os compostos de fórmula (I) da invenção podem mediar a diferenciação neuronal de células-tronco neurais e por conseguinte podem ser usados como agentes contra doenças neurodegenerativas.

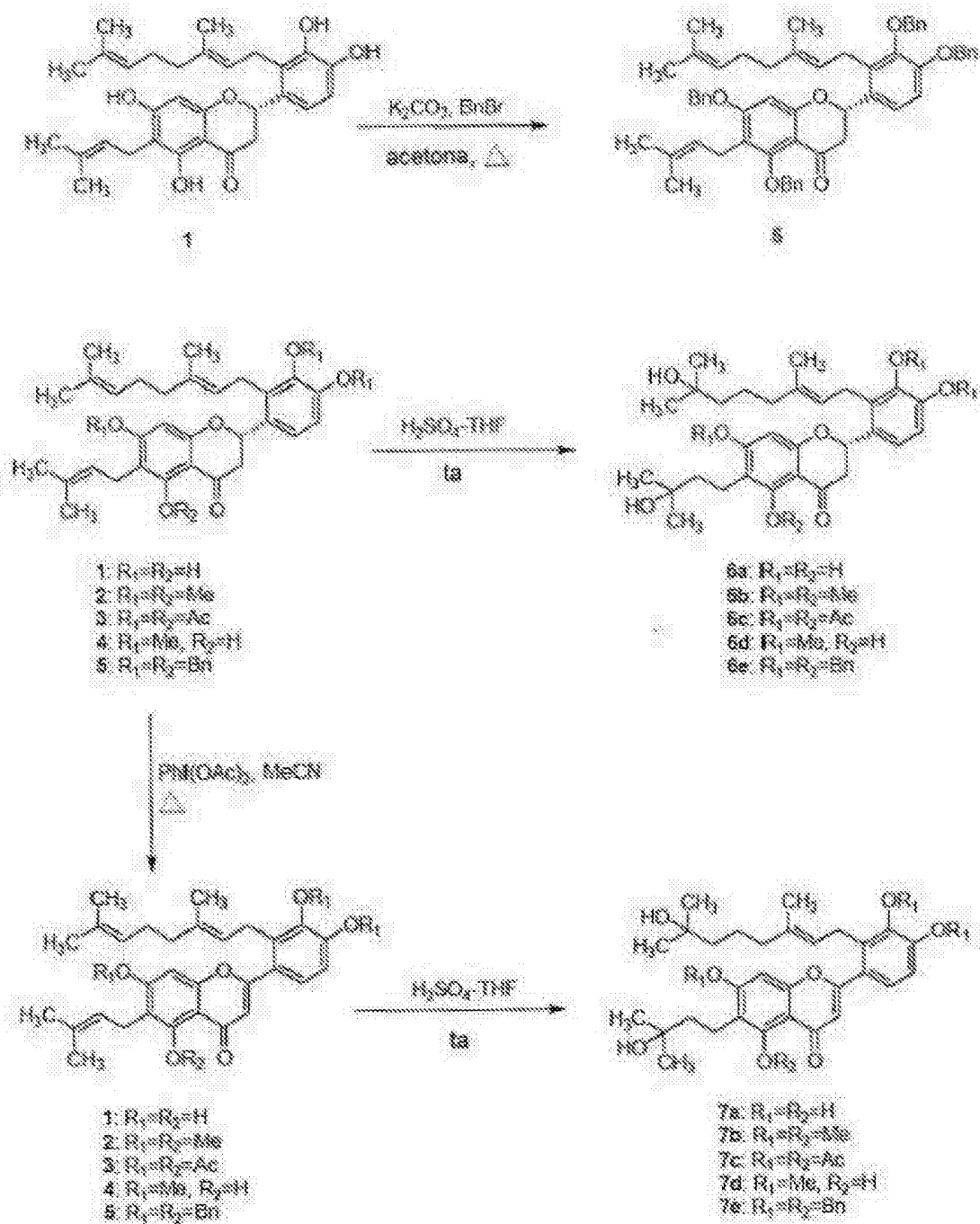
Para os usos terapêuticas dos compostos da invenção, a dosagem administrada irá, evidentemente, variar com o composto empregue, o modo de administração, o tratamento desejado e a desordem indicada. A dosagem diária do composto de fórmula (I) pode estar no intervalo desde 1 mg/kg até 40 mg/kg. A invenção proporciona métodos de inibição de HDAC, tratamento de tumor ou de doença proliferativa celular, doenças neurodegenerativas e atrofia muscular espinhal humana, e intensificação do crescimento de neurites num indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo duma quantidade terapeuticamente eficaz dos compostos da invenção, respetivamente.

SÍNTESE GERAL DOS COMPOSTOS DE FÓRMULA I DA INVENÇÃO

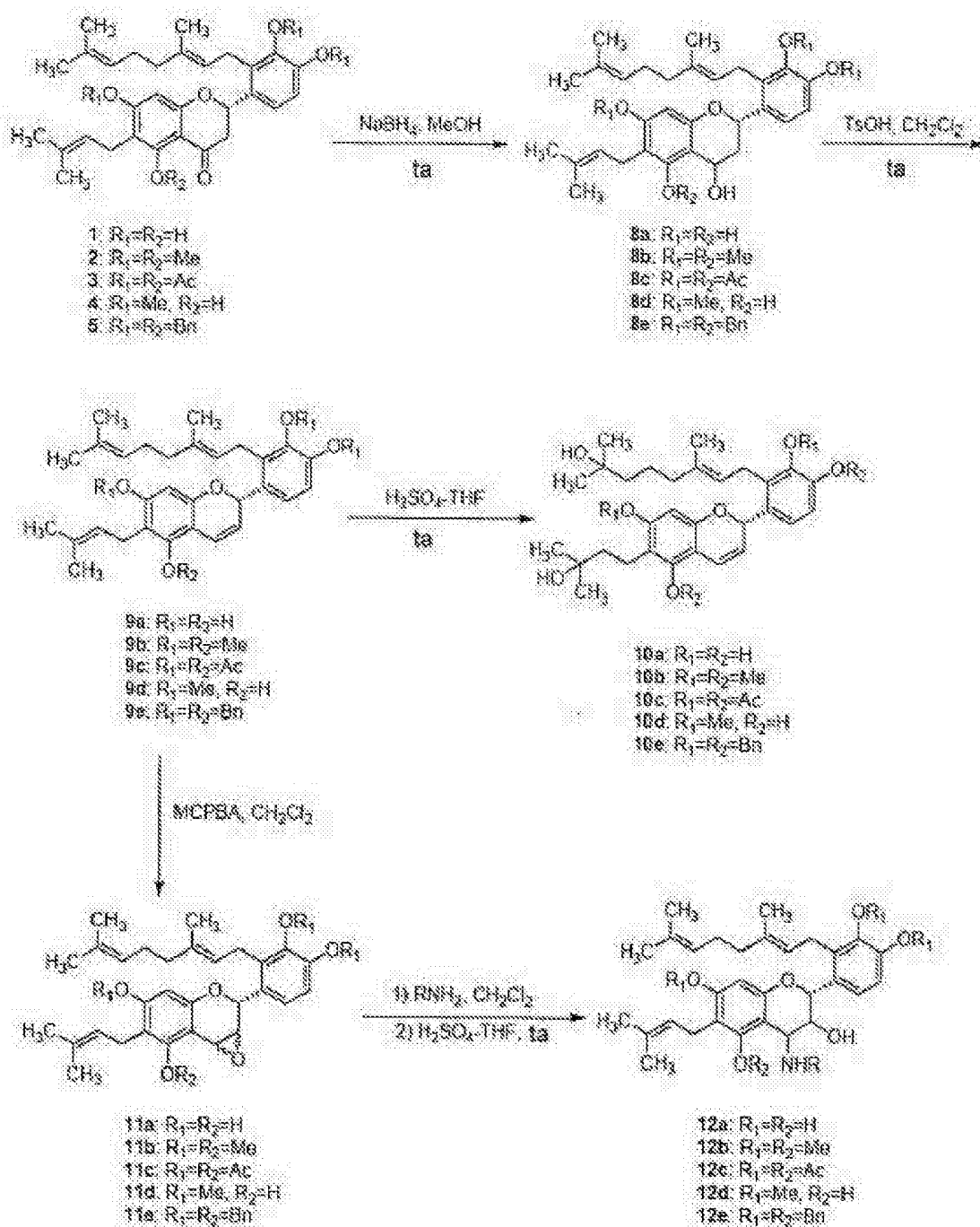
Os compostos da presente invenção podem ser preparados por quaisquer meios convencionais. Os processos adequados para a síntese destes compostos são proporcionados nos exemplos. Geralmente, os compostos de fórmula I podem ser preparados de acordo com um dos esquemas de síntese descritos abaixo:

Esquema 1

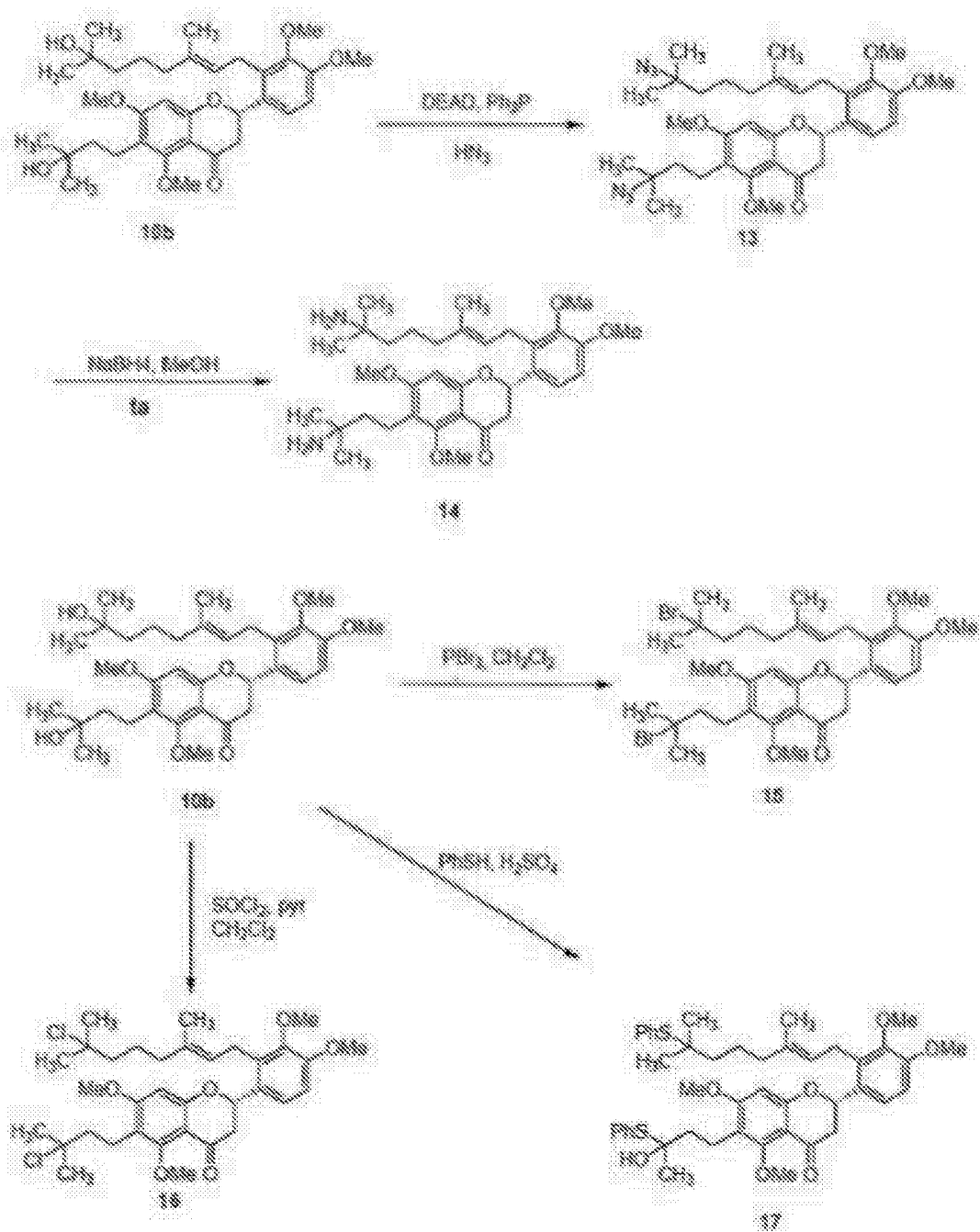
Esquema 2

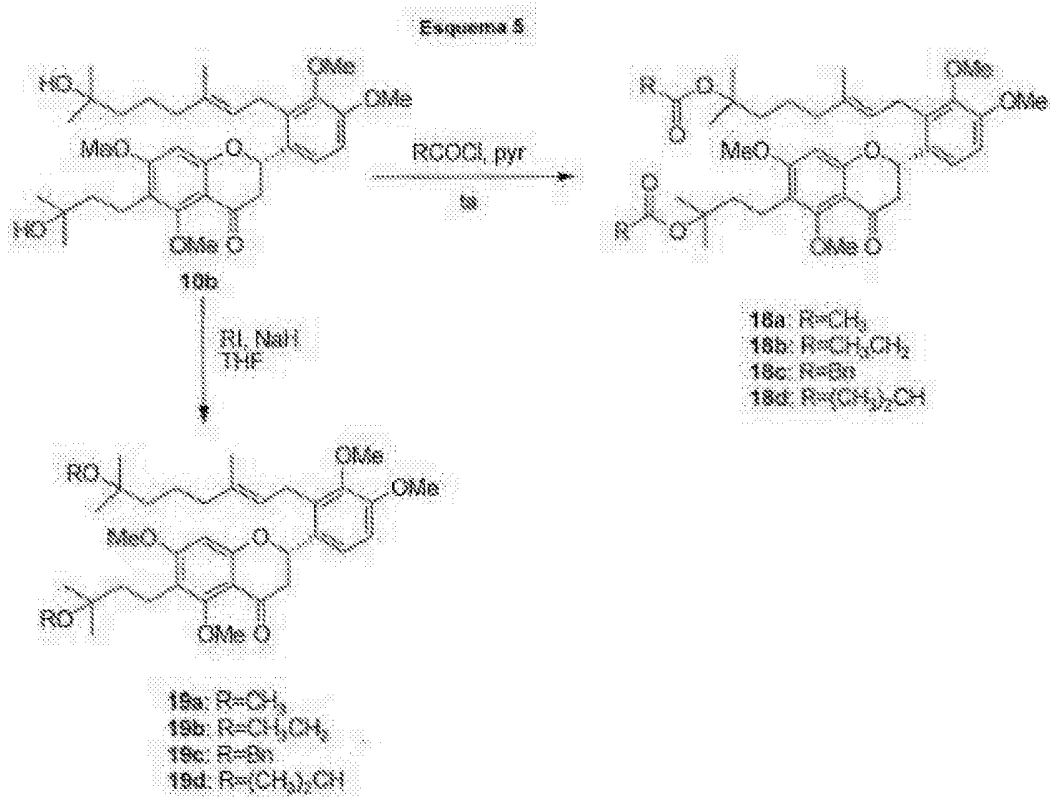


Esquema 3

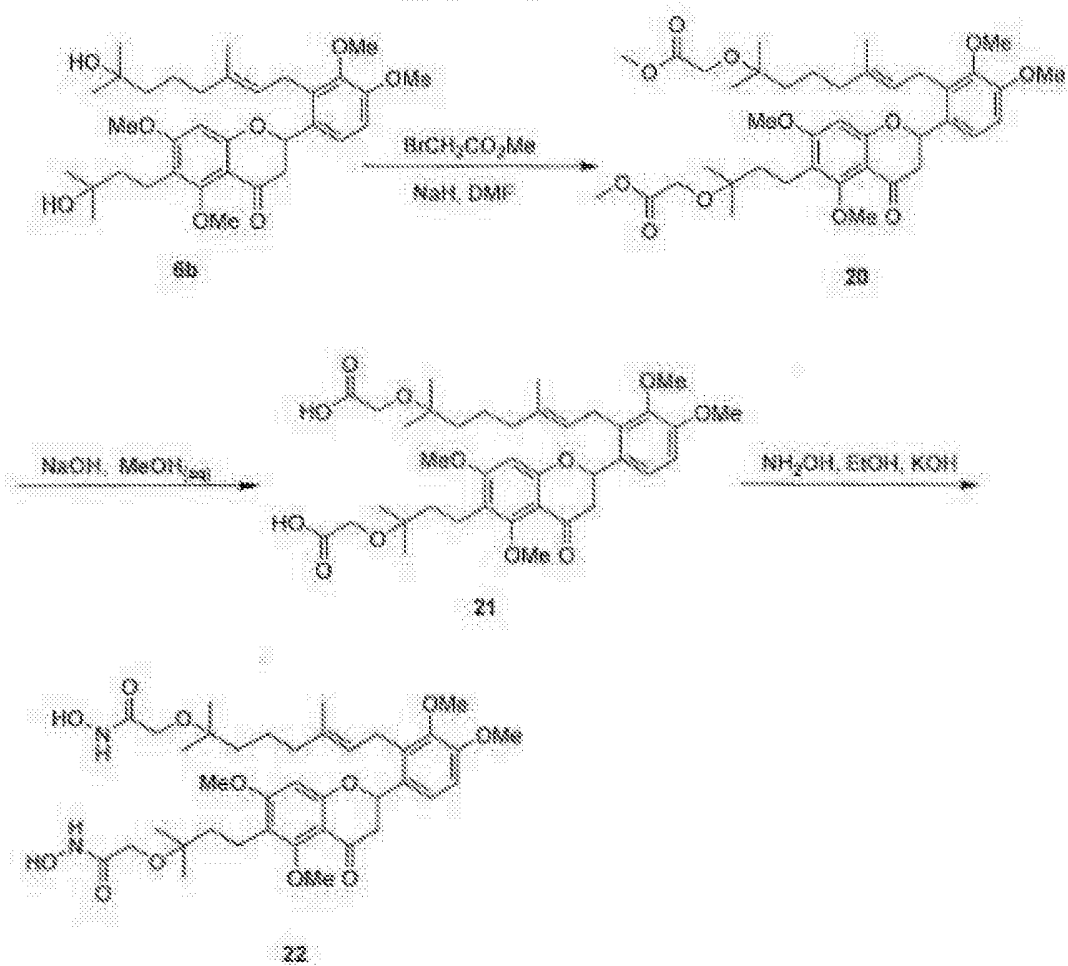


Esquema 4

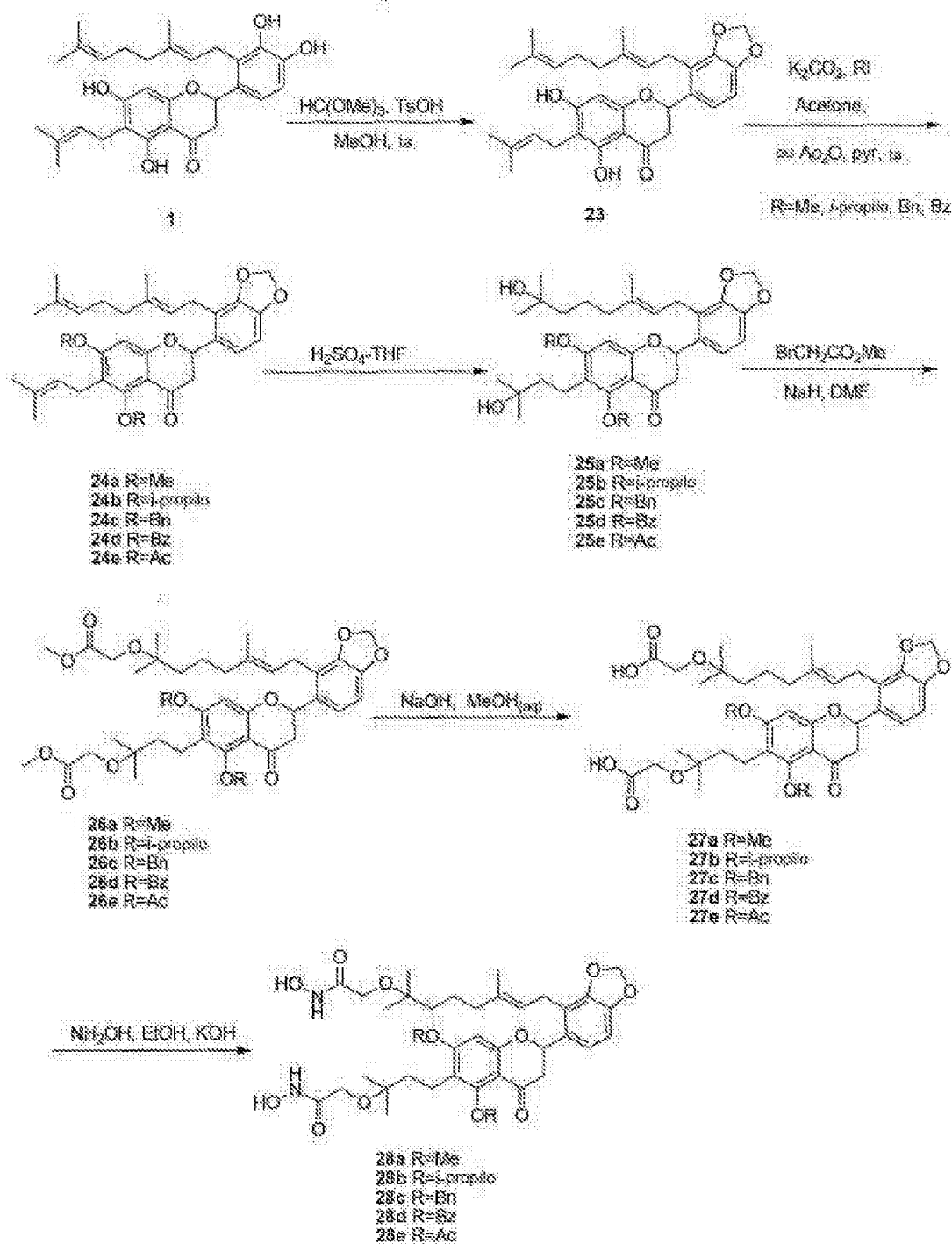




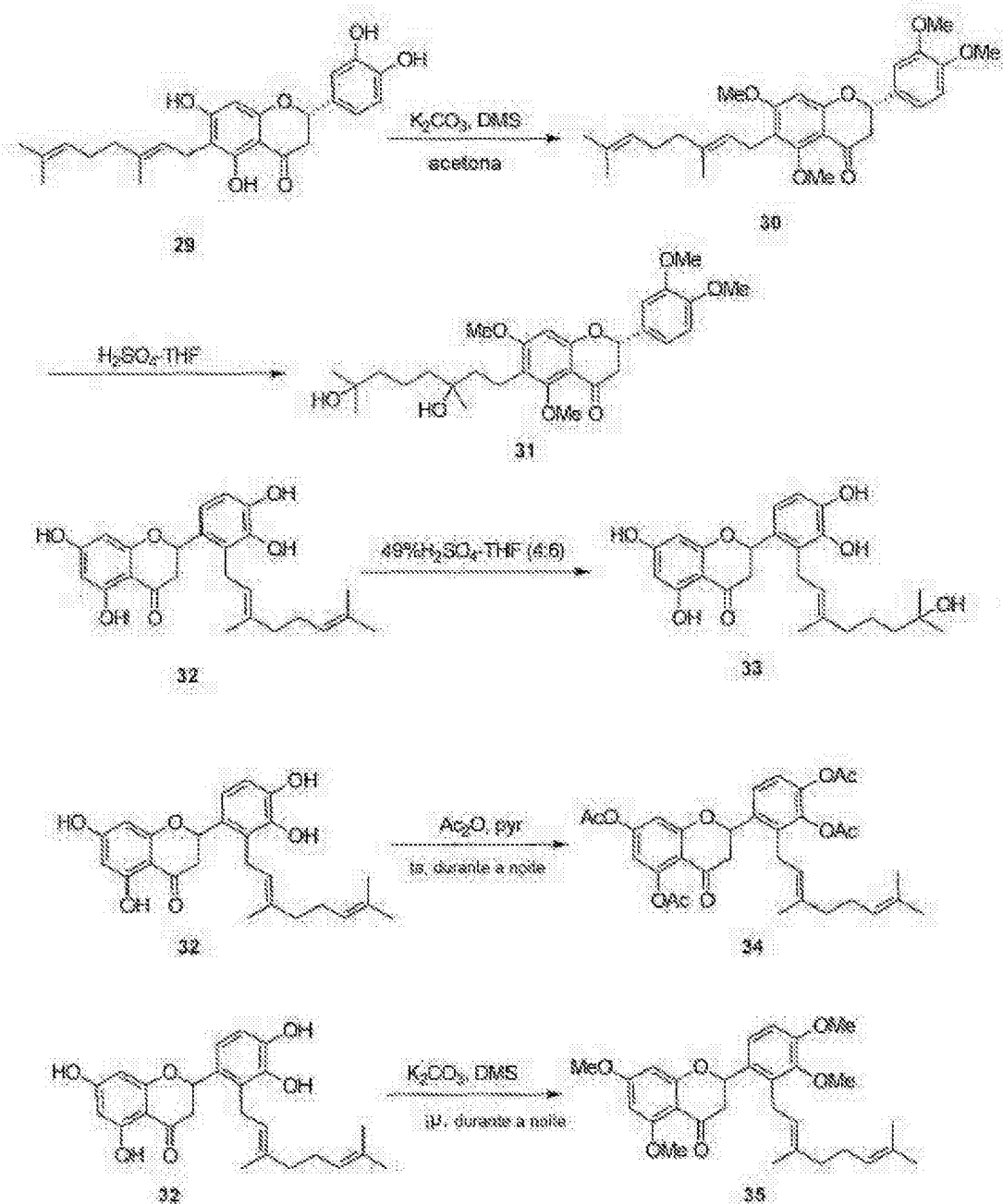
Esquema 6



Esquema 7



Esquema 8



A metilação de R_1 , R_2 , R_3 e R_4 dos compostos de fórmula (I) pode ser feita pelo seguinte procedimento: mistura do reagente, K_2CO_3 e acetona com Me_2SO_4 e aquecimento e agitação da solução; o refluxo da solução resultante sob

uma atmosfera controlada (por exemplo, sob N₂) Durante um período; após a remoção do solvente orgânico, dissolução do resíduo numa determinada solução orgânica e lavagem com água; secagem da camada orgânica por evaporação sob pressão reduzida e purificação do produto por uma coluna de gel de sílica (EtOAc:n-hexano = 1:4).

A adição de OH a uma ligação dupla em R₅ ou R₆ pode ser feita pelo seguinte procedimento: adição da solução de reagente em THF a H₂SO₄ num banho de gelo; após a adição, agitação da solução durante um período e em seguida diluição com água; extração da mistura com uma solução orgânica adequada, por exemplo, CH₂Cl₂; secagem das camadas orgânicas combinadas por evaporação sob pressão reduzida para dar um resíduo, e purificação do resíduo por uma coluna de gel de sílica (MeOH 0-3%/CH₂Cl₂).

A preparação de compostos **6a-e** e **7a-e** foi mostrada nos Esquemas 1 e 2 descritos. A Propolina G, que é um derivado de propolina conhecido na técnica, foi metilada, acetilada, regiosseletivamente metilada e benzilada com as condições de reação correspondentes para se produzirem os compostos **2-5**, e seguido por hidratação ácida de compostos **1-5** proporcionou as di-hidroflavonas alvo **6a-e**, respectivamente. A oxidação com diacetato de iodobenzeno seguida por hidratação ácida de compostos **1-5** produziu as correspondentes flavonas **7a-e**.

Os compostos **10a-e** e **12a-e** foram preparados con-

forme delineado no Esquema 3. A redução com tetra-hidreto-borato de sódio seguida por desidratação de compostos **1-5** deu os correspondentes compostos **9a-e**. A hidratação ácida de **9a-e** produziu os compostos alvo **10a-e**, respetivamente. A epoxidação com MCPBA de compostos **9a-e** proporcionou os epóxidos **11a-e**, e a subsequente reação nucleofílica com aminas correspondentes tais como metilamina, etilamina e benzilamina produziu compostos alvo **12a-e**, respetivamente.

Os compostos **14-17** foram sintetizados conforme descrito no Esquema 4. A reação de Mitsunobu de **10b** deu a azida desejada **13** e a subsequente reação com sódio converteu a azida à amina terciária **14**. A bromação com tribrometo de fósforo, tiolação com tiofenol (PhSH) e a cloração com cloreto de tionilo do composto **10b** produziram o brometo **15**, tioléter **17** e cloreto **16**, respetivamente.

Os compostos **18a-d** e **19a-d** foram preparados conforme descrito no Esquema 5. A acilação do composto **10b** com cloretos de acilo correspondentes tais como de acetilo, propionilo, benzoílo e isobutirilo deu os compostos **18a-d**, respetivamente. A alquilação do composto **10b** com os correspondentes iodetos de alquilo tais como iodetos de metilo, etilo, benzilo e isopropilo proporcionou os compostos **19a-d**, respetivamente.

O composto **22** foi sintetizado conforme mostrado no Esquema 6. A reação do álcool terciário do composto **6b** com bromoacetato de etilo, sob condição de hidreto de

sódio, deu o composto **20**. A hidrólise básica do composto **20** produziu o composto **21** e a reação seguinte com hidroxilamina produziu o ácido hidroxâmico **22**.

Os ácidos hidroxâmicos **28a-e** foram preparados conforme descrito no Esquema 7. A reação do composto **1** com ortoformato de trimetilo sob condições ácidas deu o acetônimo **23** e a alquilação subsequente com iodetos de alquilo, tais como de metilo, isopropilo e benzilo, ou acilação com cloreto de benzoílo e anidrido acético proporcionou os compostos **24a-e**, respetivamente. A hidratação acídica de duas olefinas terminais de compostos **24a-e** proporcionou os compostos **25a-e** e a reação subsequente com bromoacetato de etilo deu os compostos **26a-e**. A hidrólise básica de compostos **26a-e** produziu os compostos **27a-e** e a reação subsequente com hidroxilamina produziu os ácidos hidroxâmicos **28a-e**, respetivamente.

COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DA INVENÇÃO

Os compostos de fórmula (I) e seus sais, estereoisómeros, enantiómeros e solvatos farmacêuticamente aceitáveis podem ser usados por si sós mas geralmente serão administrados na forma de uma composição farmacêutica na qual o composto/sal/solvato de fórmula (I) (ingrediente ativo) está em associação com um adjuvante, diluente ou agente de suporte farmacêuticamente aceitável. Dependendo do modo de administração, a composição farmacêutica compreenderá preferivelmente de 10 a 30% *m/m* (por cento em massa), mais preferivelmente de 30 a 50% *m/m*, ainda mais preferivelmente

de 50 a 70% *m/m*, e ainda mais preferivelmente de 70 a 100% *m/m*, do ingrediente ativo, estando todas as percentagens em massa baseadas na composição total. Além disso, a composição farmacêutica da invenção pode ainda compreender outros agentes para a prevenção ou tratamento de doenças associadas com a histona-desacetilase (HDAC).

As composições farmacêuticas podem ser administradas sistemicamente, por exemplo, por administração oral na forma de comprimidos, cápsulas, xaropes, pós ou grânulos; ou por administração parentérica na forma de soluções ou suspensões; ou por administração subcutânea; ou por administração retal na forma de supositórios; ou por via transdérmica.

Os compostos e composições farmacêuticas da invenção são um inibidor de HDAC e podem ser retidos por muito tempo nas células e induzir continuamente a acetilação da histona H4. Eles são inibidores de HDAC que induz a diferenciação de células e de células-tronco neurais. Além disso, os compostos da invenção inibem significativamente a atividade de HDAC. Os compostos da invenção diminuem significativamente as fases não só S mas também G2/M das células de uma forma dependente da dose e alteram a morfologia das células cancerosas. Por conseguinte, os compostos da invenção podem tratar doenças tumorais e proliferativas celulares. Além disso, os compostos da invenção podem intensificar o crescimento de neurites e tratar doenças neurodegenerativas e atrofia muscular espinhal humana (AME).

EXEMPLOS

Os exemplos seguintes ilustram os métodos preferidos para a síntese e a utilização dos compostos:

EXEMPLO 1**Preparação de 3',4',5,7-tetrametil-propolina G (2)**

A uma mistura de Propolina L (1,5 g, 10,16 mmol), K_2CO_3 (16,27 g, 117,89 mmol) e acetona (280 mL) foi adicionado Me_2SO_4 (15,76 mL, 126 mmol) e a solução resultante foi aquecida em refluxo sob azoto durante 24 h. Após remoção do solvente orgânico, o resíduo foi dissolvido em CH_2Cl_2 (80 mL) e lavado com H_2O (40 mL x 3). As camadas de CH_2Cl_2 foram secas sobre Na_2SO_4 e evaporadas sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por uma coluna de gel de sílica ($EtOAc:n$ -hexano = 1:6) para dar o composto **2** (4,00 g, 72%): 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,26 (1H, d, J = 8,6 Hz), 6,86 (1H, d, J = 8,6 Hz), 6,27 (1H, s), 5,50 (1H, dd, J = 2,5, 13,5 Hz), 5,14-5,11 (1H, m), 5,11-5,10 (1H, m), 5,02-4,99 (1H, m), 3,87 (3H, s), 3,83 (3H, s), 3,79 (6H, s), 3,50 (1H, dd, J = 6,6, 15,2 Hz), 3,43 (1H, dd, J = 5,8, 15,2 Hz), 3,00 (1H, dd, J = 13,5, 16,7 Hz), 2,68 (1H, dd, J = 2,6, 16,7 Hz), 2,00-1,92 (2H, m), 1,75 (3H, s), 1,70 (3H, s), 1,65 (3H, s), 1,60 (3H, s), 1,52 (3H, s); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 189,4 (s), 164,0 (s), 163,3 (s), 159,6 (s), 153,0 (s), 147,2 (s), 135,6 (s), 134,2 (s), 131,5 (s), 131,3 (s), 129,8 (s), 124,1 (d), 122,8 (d), 122,7 (d), 122,1 (d), 118,2 (s), 110,3 (d), 108,7 (s), 95,6 (d), 75,9 (d), 61,8 (q), 60,7 (q), 55,7 (q), 55,7 (q), 45,1

(t), 39,6 (t), 26,6 (t), 25,7 (q), 25,6 (q), 24,9 (t), 22,0 (t), 17,7 (q), 17,6 (q), 16,3 (q); HRESIMS: calculado para $C_{34}H_{44}O_6$ 548,3142, encontrado 548,3140.

EXEMPLO 2

Preparação de 6-(2-hidroxi-2-metilbutil)-2'-(7-hidroxi-3,7-dimetiloct-2-enil)-3',4',5,7-tetrametoxiflavanona (6b)

A uma solução do composto **2** (7 g, 12,77 mmol) em THF (170 mL), H_2SO_4 49% (140 mL) foi adicionado num banho de gelo. Após adição completa, a mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante 8 h e, em seguida, diluída com H_2O . A mistura de reação foi extraída com CH_2Cl_2 (100 mL x 3). As camadas orgânicas combinadas foram secas sobre Na_2SO_4 e evaporadas sob pressão reduzida para darem um resíduo, o qual foi purificado por uma coluna de gel de sílica (n -hexano:EtAcO = 1:1~1:3) para dar o óleo puro **6b** (2,30 g, 34%). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,27 (1H, d, J = 8,6 Hz), 6,87 (1H, d, J = 8,6 Hz), 6,28 (1H, d, J = 2,6 Hz), 5,49 (1H, dd, J = 2,4, 13,6 Hz), 5,05 (1H, t, J = 6,0 Hz), 3,87 (3H, s), 3,84 (3H, s), 3,79 (6H, s), 3,52 (1H, dd, J = 5,5, 15,2 Hz), 3,43 (1H, dd, J = 7,6, 15,2 Hz), 2,97 (1H, dd, J = 8,0, 16,7 Hz), 2,70-2,59 (3H, m), 1,93-1,92 (2H, t, J = 6,4 Hz), 1,65 (3H, s), 1,64-1,60 (2H, m), 1,41-1,32 (4H, m), 1,25 (6H, s), 1,15 (3H, s), 1,14 (3H, s); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) 189,4 (s), 164,0 (s), 163,3 (s), 159,6 (s), 153,0 (s), 147,2 (s), 135,6 (s), 134,2 (s), 131,5 (s), 131,3 (s), 129,8 (s), 124,1 (d), 122,8 (d), 122,7 (d), 122,1 (d), 118,2 (s), 110,3 (d), 108,7 (s), 95,6

(d), 75,9 (d), 61,8 (q), 60,7 (q), 55,7 (q), 55,7 (q), 45,1 (t), 39,6 (t), 26,6 (t), 25,7 (q), 25,6 (q), 24,9 (t), 22,0 (t), 17,7 (q), 17,6 (q), 16,3 (q); HRESIMS: calculado para $C_{34}H_{48}O_8$ (M) 584,3338, encontrado 584,3344.

EXEMPLO 3

Preparação de 6-geranil-3',4',5,7-tetrametoxiflavanona (30)

À mistura de **29** (Propolina C, 128 mg, 0,31 mmol), K_2CO_3 (431 mg, 3,1 mmol) e acetona (15 mL) foi adicionado Me_2SO_4 (0,25 mL, 2,48 mmol) e a solução resultante foi aquecida em refluxo sob azoto durante 24 h. Após remoção do solvente orgânico, o resíduo foi dissolvido em CH_2Cl_2 (50 mL) e lavado com H_2O (50 mL x 3). A camada orgânica foi seca sobre Na_2SO_4 e evaporada sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por uma coluna de gel de sílica (EtOAc:n-hexano =1:4) para dar o composto **33** (107 mg, 72%). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 6,99-6,97 (2H, m), 6,88 (1H, d, J = 8,8 Hz), 6,31 (1H, s), 5,33 (1H, dd, J = 2,8, 13,3 Hz), 5,11 (1H, td, J = 1, 6,9 Hz), 5,04 (1H, td, J = 1,3, 5,5 Hz), 3,90 (3H, s, OMe), 3,88 (3H, s, OMe), 3,81 (3H, s, OMe), 3,80 (3H, s, OMe), 3,34 (1H, dd, J = 7,2, 14,1 Hz), 3,26 (1H, dd, J = 7,2, 14,1 Hz), 3,02 (1H, dd, J = 13,3, 16,7 Hz), 2,74 (1H, dd, J = 2,8, 16,7 Hz), 2,04-2,00 (2H, m), 1,96-1,92 (2H, m), 1,74 (3H, s), 1,62 (3H, s), 1,55 (3H, s); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) 189,1 (s), 164,1 (s), 163,0 (s), 159,4 (s), 149,5 (s), 149,4 (s), 131,3, 131,2 (s), 124,4 (d), 122,9 (d), 118,9 (d), 109,5 (d), 108,9 (s), 95,7 (d), 79,2 (q), 61,9 (q), 56,1 (q), 56,0 (q), 55,9

(q), 45,6 (t), 39,8 (t), 26,7 (t), 25,7 (s), 22,0 (t), 17,7 (q), 16,1 (q); HRESIMS: calculado para $C_{29}H_{36}O_6$ (M) 480,2510, encontrado 480,2511.

EXEMPLO 4

Preparação de 6-(2,6-di-hidroxi-2,6-dimetil-octil)- -3',4',5,7-tetrametoxiflavanona (31)

A uma solução do composto **30** (80 mg, 0,17 mmol) em THF (6 mL), H_2SO_4 49% foi adicionado num banho de gelo. Após adição completa, a mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante 8 h e, em seguida, diluída com H_2O . A mistura de reação foi extraída com CH_2Cl_2 (50 mL x 3). As camadas orgânicas combinadas foram secas sobre Na_2SO_4 e evaporadas sob pressão reduzida para darem um resíduo, o qual foi purificado por uma coluna de gel de sílica (MeOH 0-3%/ CH_2Cl_2) para dar o óleo puro **31** (44 mg, 50%). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6,99-6,97 (2H, m), 6,88 (1H, d, $J = 8,8$ Hz), 6,31 (1H, s), 5,33 (1H, dd, $J = 2,8, 13,3$ Hz), 3,90 (3H, s, OMe), 3,88 (3H, s, OMe), 3,84 (3H, s, OMe), 3,82 (3H, s, OMe), 3,02 (1H, dd, $J = 13,3, 16$ Hz), 2,75 (1H, dd, $J = 2,8, 16$ Hz), 2,62-2,58 (2H, m), 1,63-1,59 (7H, m), 1,49-1,48 (2H, m), 1,23 (3H, s), 1,22 (3H, s), 1,21 (3H, s); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) 189,1 (s), 164,1 (s), 163,0 (s), 159,4 (s), 149,5 (s), 149,4 (s), 131,2 (s), 119,0 (d), 118,9 (d), 111,3 (d), 109,5 (d), 108,9 (s), 95,8 (d), 72,9 (s), 71,1 (s), 62,1 (q), 56,0 (q), 55,9 (q), 45,5 (t), 44,5 (t), 42,3 (t), 42,1 (t), 41,5 (t), 29,4 (q), 29,3

(q), 26,9 (q), 26,8 (q), 18,8 (t), 17,5 (t); HRESIMS calculado para (M-18) 498,2602, encontrado 498,2610.

EXEMPLO 5

Preparação de Propolina A (33)

A uma solução de Propolina D (Composto 32, 100 mg, 0,24 mmol) em THF (6 mL), H₂SO₄ 49% foi adicionado num banho de gelo. Após adição completa, a mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante 8 h e em seguida diluída com H₂O. A mistura de reação foi extraída com CH₂Cl₂ (50 mL x 3). As camadas orgânicas combinadas foram secas sobre Na₂SO₄ e evaporadas sob pressão reduzida para dar um resíduo, o qual foi purificado por uma coluna de gel de sílica (MeOH 0-3%/CH₂Cl₂) para dar o óleo puro 33 (42 mg, 40%). ¹H-NMR (400 MHz, MeOD) 6,87 (1H, d, *J* = 8,4 Hz), 6,71 (1H, d, *J* = 8,4 Hz), 5,88 (2H, dd, *J* = 1,9, 3,3 Hz), 5,47 (1H, dd, *J* = 2,6, 13 Hz), 5,12 (1H, dd, *J* = 5,7, 6,7 Hz), 3,47 (2H, d, *J* = 6,6 Hz), 3,10 (1H, dd, *J* = 13,4, 17 Hz), 2,60 (1H, dd, *J* = 2,7, 17,1 Hz), 1,94 (1H, dd, *J* = 6,6, 13,4 Hz), 1,64 (1H, d, *J* = 0,5 Hz), 1,43-1,41 (2H, m), 1,37-1,34 (2H, m), 1,13 (3H, s), 1,12 (3H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) 198,2 (s), 168,5 (s), 168,4 (s), 165,5 (s), 165,4 (s), 165,2 (s), 146,5 (s), 144,5 (s), 135,8 (s), 129,7 (s), 128,2 (s), 124,7 (d), 118,7 (d), 113,6 (d), 103,2 (s), 97,1 (d), 96,2 (d), 77,8 (d), 71,5 (s), 44,3 (t), 43,7 (t), 41,2 (t), 29,2 (q), 29,1 (q), 25,4 (t), 23,7 (t), 16,2 (t).

EXEMPLO 6**3',4',5,7-Tetra-acetil-propolina D (34)**

A uma solução de Propolina D (Composto **32**, 124 mg, 0,29 mmol) em piridina (4 mL) foi adicionado anidrido acético (2 mL) e a mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante 6 h. EtOAc (25 mL) foi adicionado à mistura de reação e a mistura foi lavada com HCl 0,1 N (10 mL x 3). A camada orgânica foi seca sobre Na₂SO₄ e evaporada sob pressão reduzida para dar um resíduo. O resíduo foi purificado através de uma coluna de gel de sílica (CH₂Cl₂) para se obter o óleo **34** puro (139 mg, 80%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 7,49 (1H, d, *J* = 8,6 Hz), 7,18 (1H, d, *J* = 8,6 Hz), 6,72 (1H, d, *J* = 2,2 Hz), 6,53 (1H, d, *J* = 2,2 Hz), 5,60 (1H, dd, *J* = 2,5, 13,8 Hz), 5,01 (1H, td, *J* = 5,3, 4,6 Hz), 4,94 (1H, td, *J* = 1,0, 5,8 Hz), 3,35 (1H, dd, *J* = 7,1, 15,7 Hz), 3,26 (1H, dd, *J* = 5,3, 15,5 Hz), 2,98 (1H, dd, *J* = 13,8, 16,8 Hz), 2,36 (3H, s), 2,27 (6H, s), 2,26 (s, 3H), 2,02-1,91 (5H, m), 1,64 (3H, s), 1,62 (3H, s), 1,55 (3H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) 188,8 (s), 169,2 (s), 168,1 (s), 168,0 (s), 167,9 (s), 163,2 (s), 155,9 (s), 151,3 (s), 142,8 (s), 140,9 (s), 137,0 (s), 135,2 (s), 133,5 (s), 131,6 (s), 124,5 (d), 123,9 (d), 121,6 (d), 120,7 (d), 111,6 (s), 110,7 (d), 109,0 (d), 76,1 (d), 44,8 (t), 39,4 (t), 26,5 (t), 25,6 (t), 25,5 (q), 21,1 (q), 21,0 (q), 20,7 (q), 20,3 (q), 17,7 (q), 16,3 (q).

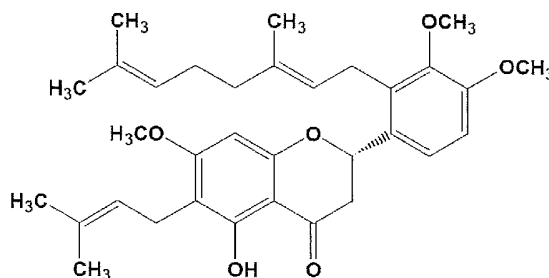
EXEMPLO 7**3',4',5,7-Tetrametil-propolina D (35)**

À mistura de **32** (128 mg, 0,31 mmol), K₂CO₃

(431 mg, 3,1 mmol) e acetona (15 mL) foi adicionado Me_2SO_4 (0,25 mL, 2,48 mmol) e a solução resultante foi aquecida em refluxo sob azoto durante 24 h. Após remoção do solvente orgânico, o resíduo foi dissolvido em CH_2Cl_2 (50 mL) e lavado com H_2O (50 mL 3). A camada orgânica foi seca sobre Na_2SO_4 e evaporada sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por uma coluna de gel de sílica ($\text{EtOAc}:\text{n-hexano}=1:4$) para dar o composto **35** (107 mg, 72%). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 7,26 (1H, d, $J = 8,6$ Hz), 6,85 (1H, d, $J = 8,6$ Hz), 6,10 (1H, d, $J = 2,3$ Hz), 6,07 (1H, d, $J = 2,3$ Hz), 5,34 (1H, dd, $J = 2,6, 13,5$ Hz), 5,04 (1H, td, $J = 5,3, 4,6$ Hz), 4,99 (1H, td, $J = 1,0, 5,8$ Hz), 3,88 (3H, s), 3,86 (3H, s), 3,80 (3H, s), 3,74 (3H, s), 3,46 (1H, dd, $J = 6,6, 15,2$ Hz), 3,44 (1H, dd, $J = 5,8, 15,2$ Hz), 3,02 (1H, dd, $J = 13,5, 16,5$ Hz), 2,69 (1H, dd, $J = 2,6, 16,5$ Hz), 2,00-1,97 (2H, m), 1,94-1,92 (2H, m), 1,65 (3H, s), 1,60 (3H, s), 1,52 (3H, s).

EXEMPLO 8

3',4', 7-O-Trimetilpropolina G (4)

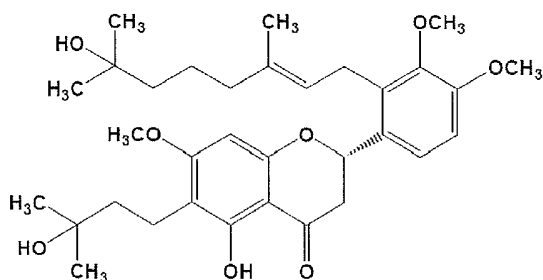


À mistura de Propolina G (2,30 g, 2,75 mmol), K_2CO_3 (1,94 g, 13,99 mmol), e acetona (80 mL) foi adiciona-

do Me_2SO_4 (2,17 mL, 17,35 mmol) e a solução resultante foi agitada à temperatura ambiente durante 0,5 h, e em seguida aquecida em refluxo sob azoto durante 6 h. Após remoção do solvente orgânico, o resíduo foi dissolvido em CH_2Cl_2 (40 mL) e lavado com H_2O (40 mL x 3). As camadas de CH_2Cl_2 foram secas sobre Na_2SO_4 e evaporadas sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por uma coluna de gel de sílica ($\text{EtOAc}:\text{n-Hexano} = 1:8$) para dar **4** (954 mg, 65%): $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 12,06 (1H, s), 7,26 (1H, d, $J = 8,4$ Hz), 6,86 (1H, d, $J = 8,4$ Hz), 6,03 (1H, s), 5,50 (1H, dd, $J = 2,4, 13,4$ Hz), 5,17-5,14 (1H, m), 5,04-5,00 (2H, m), 3,87 (3H, s), 3,79 (3H, s), 3,79 (6H, s), 3,46-3,45 (2H, m), 3,25-3,23 (2H, m), 3,05 (1H, dd, $J = 13,5, 16,7$ Hz), 2,70 (1H, dd, $J = 2,6, 16,7$ Hz), 2,02-1,94 (7H, m), 1,75 (3H, s), 1,67 (3H, s), 1,66 (3H, s), 1,61 (3H, s), 1,58 (3H, s).

EXEMPLO 9

6-(2-Hidroxi-2-metilbutil)-2'-(7-hidroxi-3,7-dimetiloct-2-enil)-5-hidroxi-3',4',7-trimetoxiflavanona (6d)



(NBM-HD-3)

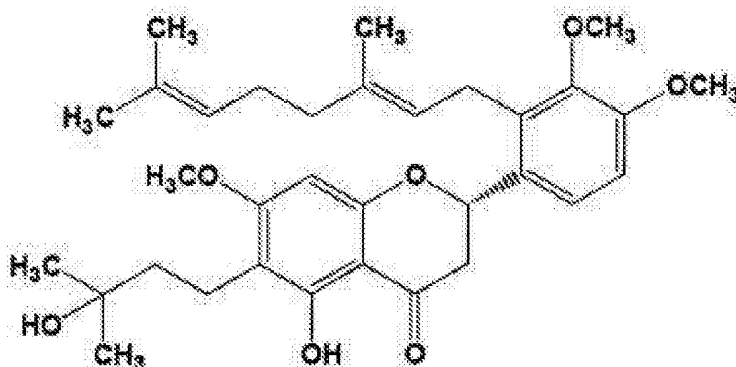
A uma solução do composto **4** (530 mg, 0,99 mmol)

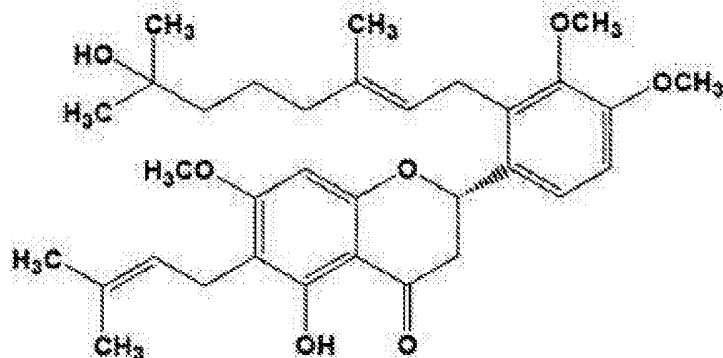
em THF (15 mL) foi adicionado H_2SO_4 49% (10 mL) em banho de gelo. Após adição completa, a mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante 8 h e em seguida diluída com H_2O . A mistura de reação foi extraída com CH_2Cl_2 (30 mL x 3). As camadas orgânicas combinadas foram secas sobre Na_2SO_4 e evaporadas sob pressão reduzida para darem um resíduo, o qual foi purificado por uma coluna de gel de sílica (*n*-hexano:EtAcO = 1:1) para dar o óleo **6d** puro (191 mg, 34%). ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 12,06 (1H, brs), 7,27 (1H, d, J = 8,6 Hz), 6,86 (1H, d, J = 8,6 Hz), 6,05 (1H, s), 5,50 (1H, dd, J = 2,6, 13,6 Hz), 5,03 (1H, t, J = 6,2 Hz), 3,87 (3H, s), 3,80 (6H, s), 3,48 (1H, dd, J = 5,5, 15,2 Hz), 3,42 (1H, dd, J = 6,1, 15,2 Hz), 3,06 (1H, dd, J = 13,6, 17,1 Hz), 2,70 (1H, dd, J = 2,7, 17,1 Hz), 2,65-2,61 (2H, m), 1,95-1,92 (2H, m), 1,65 (3H, s), 1,41-1,35 (5H, m), 1,26 (6H, s), 1,15 (3H, s), 1,14 (3H, s).

EXEMPLO 10

Outros Compostos

Os dois compostos seguintes são preparados de acordo com os métodos acima estabelecidos.

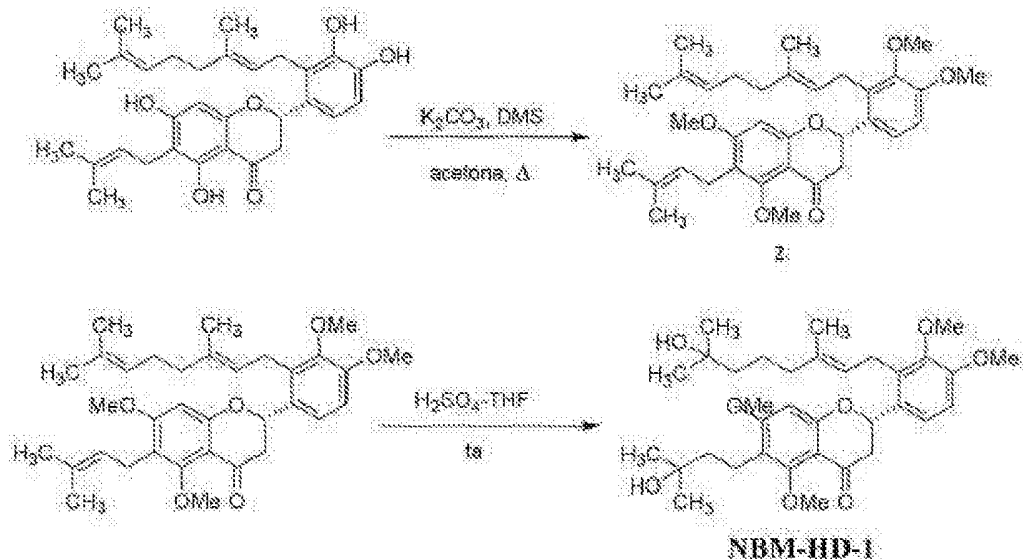




(NBM-HD-2)

EXEMPLO 11

**Inibição do Crescimento Celular do Cancro pelos Compostos
da Invenção (NBM-HD-1)**



A linha celular de cancro, células C6 de glioma de rato, foi cultivada em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco) suplementado com penicilina G, sulfato de estreptomicina, 0,5 mM de L-glutamina e soro bovino fetal 10% de (FBS ou SBF; Gibco) a 37 °C, CO₂ 5% e 95% de

humidade relativa. Para todas as experiências, as células foram semeadas a uma densidade de 3×10^5 por poço em placas de 6 poços. Após 24 horas, as células foram tratadas com diferentes concentrações do composto NBM-HD-1 (ou seja, o composto de fórmula III aqui delineado). Após 48 horas, as células foram observadas e contadas. De acordo com os resultados mostrados na Fig. 1, NBM-HD-1 pode parar o crescimento de células C6 de glioma de rato. Após as células C6 de glioma serem incubadas com 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (ver Fig. 1(A)-b), 5 $\mu\text{g/mL}$ (ver Fig. 1(A)-c) e 10 $\mu\text{g/mL}$ (ver Fig. 1(A)-d) de NBM-HD-1 durante 48 horas, a densidade das células reduziu-se drasticamente em comparação com a do controle (ver Fig. 1(A)-a). Os resultados obtidos por contagem de células mostrou a mesma tendência (ver Fig. 1(B)). Os resultados acima mencionados indicam que NBM-HD-1 podem inibir o crescimento de células C6 de glioma de uma forma dependente da dose.

1×10^6 células C6 de glioma de rato foram tratadas com várias concentrações de NBM-HD-1 (0 $\mu\text{g/mL}$, 2,5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$) durante 72 horas. As células tratadas foram tripsinizadas e recolhidas. As células resultantes foram ressuspensas em 200 μL de PBS e em seguida fixadas por adição de 800 μL de etanol 100% frio. As células resultantes foram fixados durante a noite a -20°C . Os sedimentos celulares foram recolhidos por centrifugação, ressuspensos em 1 mL de tampão hipotônico (Triton X-100 0,5% em PBS e RNase A 1 $\mu\text{g/mL}$) e incubados a 37°C durante 30 minutos. Em seguida, 1 mL de solução de PI

(50 µg/mL) foi adicionado ao pélete celular resultante. A mistura foi deixada em repouso a 4 °C durante 30 min. As quantidades de DNA das células foram analisadas por citometria de FACScan (Becton Dickinson) (ver Fig. 2). Os resultados da Fig. 2 mostraram que NBM-HD-1 pode inibir significativamente o crescimento de células C6 de glioma através da modulação da paragem do ciclo celular na fase G0/G1 de um modo dependente da dose.

EXEMPLO 12

Inibição do crescimento celular e da indução da diferenciação de células de cancro pelo composto da invenção (NBM-HD-1)

Para as células C6 de glioma de rato, o ciclo celular relacionado com a expressão de mRNA foi examinado por RT-PCR. Os RNAs no total foram isolados a partir das células C6 tratadas usando o RNeasy Mini Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Os cDNAs foram produzidos a partir de 500 ng do total de RNAs utilizando ReverTra-Plus-TM (TOYOBO). O produto da RT (1 µL) foi amplificado por PCR com «primers» ou iniciadores para analisar vários genes do ciclo celular usando GAPDH como controlo interno. Os resultados foram mostrados na Fig. 3. De acordo com os resultados da Fig. 3, NBM-HD-1 pode modular a expressão de alguns reguladores do ciclo celular. Os resultados mostraram que NBM-HD-1 pode diminuir a expressão de ciclina D1 e ciclina B1 e de uma forma dependente da dose. Pelo contrário, a expressão de p21 foi aumentada.

Depois das células C6 de glioma serem incubadas com NBM-HD-1 10 µg/mL durante 24 horas, elas foram fixadas e analisadas pelo método de coloração imunofluorescente tradicional. A coloração de neuróglia foi realizada usando anticorpo GFAP específico de neuróglia (SIGMA) como o anticorpo primário e uma imunoglobulina de coelho marcada com fluorescência (SIGMA) como anticorpo secundário para se ligar com o anticorpo primário. As células que são positivas a GFAP foram excitadas por uma fonte de luz específica para emitir fluorescência. Além disso, os núcleos foram corados com DAPI. Os resultados da coloração foram mostrados na Fig. 4(A). De acordo com a Fig. 4(A), NBM-HD-1 pode induzir a expressão de GFAP de células de cancro de glioma C6. Em contraste com o grupo de controlo, mais proteínas GFAP foram detetadas nas fotografias das células sendo tratadas com 10 µg/mL de NBM-HD-1. A linha do meio mostrou as fotos das células com coloração DAPI na Fig. 4(A).

A expressão de mRNA da GFAP foi examinado por RT-PCR. Os resultados da Fig. 4(B) mostraram que a expressão de GFAP foi aumentada de uma forma dependente da dose. Estes resultados indicaram que NBM-HD-1 pode induzir a diferenciação celular de células de cancro de glioma C6 de acordo com o aumento da expressão de GFAP.

EXEMPLO 13

Aumento da Acumulação de Histona Hiperacetilada nas Células de Cancro Tratadas com o Composto da Invenção (NBM-HD-1)

A acumulação de histona H4 hiperacetilada foi

analisada em lisados celulares utilizando a técnica Western blot e o anticorpo dirigido contra a histona H4 acetilada (Upstate). As células C6 de glioma foram semeadas a uma densidade de 1×10^6 por 10 centímetros de prato de cultura. Após 24 horas, as células foram tratadas com 10 $\mu\text{g/mL}$ de NBM-HD-1 ou butirato de sódio 4 mM durante várias horas. Os lisados celulares totais foram preparados usando tampão de amostra de SDS desnaturante e em seguida separadas em SDS 15%-gel de poliacrilamida. Conforme mostrado na Fig. 5, não só o butirato de sódio mas também o NBM-HD-1 pode aumentar a acumulação de histona H4 hiperacetilada. A quantidade de histonas acetiladas foi dificilmente detetável em células C6 de glioma não tratadas. A quantidade de histona H4 acetilada das células tratadas com butirato de sódio 4 mM durante 2 horas aumentou. O butirato de sódio foi em seguida removido do meio de cultura. Após 6 horas, a quantidade de histona H4 acetilada diminuiu. A acumulação de histona H4 acetilada aumentou nas células tratadas com NBM-HD-1 durante 2 horas. Após a remoção de NBM-HD-1, a quantidade de histona H4 acetilada aumentou ao longo do tempo. A acetilação de histona mais elevada apareceu às 6 horas após o composto ter sido removido. Estes resultados indicaram que, de modo semelhante ao butirato de sódio, NBM-HD-1 é um inibidor de HDAC. Porque NBM-HD-1 é mais hidrofóbico do que o butirato de sódio, NBM-HD-1 pode ser retido nas células mais tempo do que o butirato de sódio e induzir continuamente a acetilação de histona H4.

EXEMPLO 14**Inibição da Actividade de HDAC pelo Composto da Invenção
(NBM-HD-1)**

As células C6 de glioma foram tratados com diferentes doses de NBM-HD-1 e butirato de sódio (SB). Após 24 horas, as células foram colhidas para extrair as proteínas nucleares pelo kit de extração de proteínas NucBuster™ Protein Extraction Kit (Novagen) conforme descrito nas instruções do fabricante. Estes extratos foram em seguida usados no HDAC Activity Assay Kit (Calbiochem) para analisar a sua atividade de inibição de HDAC (histona-desacetilase). O substrato fluorométrico de HDAC, que compreende uma cadeia lateral de lisina acetilada, foi incubado com a primeira proteína nuclear extraída. A desacetilação do substrato sensibilizou o substrato, de modo que, no segundo passo, o tratamento com o revelador de lisina produziu um fluoróforo. O fluoróforo pode facilmente ser analisado usando um leitor de placas de fluorescência. Conforme mostrado na Fig. 6, NBM-HD-1 pode inibir a atividade de HDAC em células C6 de glioma. A inibição de HDAC tem sido implicada na indução da diferenciação em células cancerosas. Nesta experiência, um composto bem conhecido para a inibição de HDAC, butirato de sódio, foi utilizado como controlo positivo. A unidade de fluorescência mais baixa apresentou atividade de inibição de HDAC mais alta no grupo experimental. Os resultados indicaram que NBM-HD-1 inibe de forma significativa a atividade de HDAC.

EXEMPLO 15**Inibição da Atividade de HDAC e Mudança da Morfologia de Células de Cancro pelo Composto da Invenção (NBM-HD-1)**

As células de cancro DBTRG-05MG de glioblastoma humano foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com penicilina G, sulfato de estreptomicina, L-glutamina 0,5 mM e soro bovino fetal (SBF; Gibco) 10%, piruvato de sódio (Gibco) 10 mg/L, e NEAA (Gibco) 1% a 37 °C, CO₂ 5% e 95% de humidade relativa. Para estas experiências, as células foram semeadas a uma densidade de 3×10^5 por poço em placas de 6 poços. Após 24 horas, as células foram tratadas com diferentes concentrações de NBM-HD-1 e butirato de sódio 4 mM. As células foram observadas e contadas após 72 horas. Conforme mostrado na Fig. 7, NBM-HD-1 inibiu significativamente o crescimento de células de cancro 05MG e mudou a morfologia das células. Em células 05MG (Fig. 7(A)), após incubação com 2,5 µg/mL (Fig. 7(A)-b), 5 µg/mL (Fig. 7(A)-c) e 10 µg/mL (Fig. 7(A)-d) de NBM-HD-1 durante 72 horas, a densidade das células reduziu-se drasticamente em comparação com a do grupo de controlo (Fig. 7(A)-a). As células 05MG no grupo experimental também se alteraram para se tornarem mais compridas do que as do grupo de controlo. Os resultados da contagem de células (Fig. 7(B)) indicaram que o butirato de sódio pôde inibir a proliferação de células de cancro 05MG, e do mesmo modo a NBM-HD-1. Estes resultados indicam que NBM-HD-1 pode inibir o crescimento de células 05MG de uma forma dependente da dose e alteram a morfologia das células de cancro 05MG.

As células MCF-7 de cancro da mama foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco) suplementado com penicilina G, sulfato de estreptomicina, L-glutamina 0,5 mM e soro bovino fetal (SBF; Gibco) 10% a 37 °C, CO₂ 5% e 95% de humidade relativa. As células foram semeadas a uma densidade de 3×10^5 por poço em placas de 6 poços. Após 24 horas, as células foram tratadas com diferentes concentrações de composto NBM-HD-1 e sendo usado butirato de sódio 4 mM como controlo positivo. As células foram observadas após 48 horas e contadas após 96 horas. Conforme mostrado na Fig. 8, NBM-HD-1 inibe significativamente o crescimento de células de cancro MCF-7 e altera a morfologia das células. Na Fig. 8(A), depois das células serem incubadas com 2,5 µg/mL (Fig. 8(A)-b), 5 µg/mL (Fig. 8(A)-c) e 10 µg/mL (Fig. 8(A)-d) de NBM-HD-1 durante 48 horas, a densidade das células MCF-7 reduziu-se dramaticamente em comparação com a do grupo de controlo (Fig. 8(A)-a). A morfologia das células MCF-7 no grupo experimental alterou-se em comparação com a do grupo de controlo, Fig. 8(B), e mostrou que o butirato de sódio 4 mM foi capaz de inibir o crescimento de células MCF-7. Os resultados da contagem de células (Fig. 8(B)) indicam que, de modo semelhante ao butirato de sódio, NBM-HD-1 inibe o crescimento celular. Estes resultados indicam que NBM-HD-1 pode inibir o crescimento de células MCF-7 de cancro de um modo dependente da dose e modificar a sua morfologia.

Células de cancro MCF-7 (1×10^6) numa placa de

100 mm foram tratadas com várias concentrações de NBM-HD-1 (0, 2,5, 5 e 10 µg/mL) ou butirato de sódio 4 mM durante 72 horas. As amostras foram preparadas seguindo os passos mencionados acima em [0063]. O DNA das células foi em seguida analisado por citometria de FACScan (Becton Dickinson). Como mostrado na Fig. 9, NBM-HD-1 inibiu marcadamente o crescimento celular de MCF-7 através da modulação do ciclo celular, parado na fase G0/G1 de uma forma dependente da dose. A percentagem de fase G0/G1 aumentou de 74,46 para 92,55 de uma forma dependente da dose. Verificou-se também que NBM-HD-1 diminuiu significativamente nas fases não só S mas também G2/M das células de uma forma dependente da dose.

O ciclo celular relacionado com a expressão de mRNA de p21 foi examinado por RT-PCR. O total de RNAs foi isolado a partir das células MCF-7 tratadas e utilizado na reação de RT. cDNA (1 µL) foi utilizado como um molde para amplificar o gene p21 por PCR. GAPDH foi usada como um controlo interno. Conforme mostrado na Fig. 10, NBM-HD-1 pode aumentar a expressão de mRNA de p21 em células de cancro MCF-7. Nesta experiência, as células MCF-7 foram tratadas com diferentes doses de NBM-HD-1 durante 24 horas. Os resultados indicaram que NBM-HD-1 induziu a expressão de p21 em uma maneira dependente da dose.

A acumulação de histona H4 hiperacetilada foi analisada nos lisados celulares utilizando Western blot e um anticorpo que se liga a histona H4 acetilada (Upstate).

As células de cancro MCF-7 foram semeadas a uma densidade de 1×10^6 por placa de cultura de 10 cm. Após 24 horas, as células foram tratadas com 10 µg/mL de NBM-HD-1 ou butirato de sódio 4 mM durante várias horas. A inibição de HDAC por NBM-HD-1 foi testada através da análise do grau de acetilação da histona com um anticorpo específico para a histona H4 hiperacetilada. O butirato de sódio foi usado como um controlo positivo. Conforme mostrado na Fig. 11, os resultados com células MCF-7 foram semelhantes àqueles com células C6 de glioma.

EXEMPLO 16

Intensificação do Crescimento de Neurites pelo Composto da Invenção (NBM-HD-1)

O meio de crescimento para as CTN (células-tronco neurais) e neurónios corticais foi preparado por adição de penicilina G, estreptomicina e L-glutamina 0,5 mM num meio neurobasal suplementado B-27 (Gibco). O feto não nascido foi retirado do saco fetal na cavidade abdominal de uma ratazana Wistar grávida de 17 dias sob anestesia. O tecido cerebral foi removido do feto e tratado com solução de tripsina a 0,1% a 25 °C durante três minutos. Após lavagem com solução de PBS 3 vezes, as células foram dissociadas mexendo de cima para baixo. A solução resultante foi passada através de um filtro de células de nylon de 70 µm (Falcon), a fim de obter-se o filtrado que continha células cerebrais. O filtrado foi centrifugado a 1000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi aspirado. O sedimento resultante foi

ressuspenso no meio de crescimento preparado conforme indicado acima. A suspensão resultante continha CTNs.

As células obtidas a partir da suspensão foram cultivadas em placas de 6 poços revestidos com 30 µg/mL de poli-D-lisina (Sigma) a uma densidade de 75 células/mm². As células foram cultivadas a 37 °C, CO₂ 5% e 95% de humidade relativa. O meio de crescimento continha 0,63 µg/mL de NBM-HD-1 e o meio de crescimento com 1 µL de DMSO foi usado como controlo. As células diferenciadas após o cultivo foram categoricamente chamadas neurónios corticais.

Após cultivação durante 6 dias, as células vivas foram observadas ao microscópio. Os comprimentos das neurites dos neurónios em 6 campos diferentes foram medidos e ponderados. Conforme mostrado na Fig. 12, NBM-HD-1 pode promover o desenvolvimento de neurites. Na Fig. 12, o comprimento das neurites do grupo experimental (Fig. 12(A)-b) é maior do que o do grupo de controlo (Fig. 12(A)-a). Após a medição dos comprimentos das neurites, o resultado indicou que o comprimento médio das neurites do grupo experimental era maior do que o do grupo de controlo (Fig. 12(B)).

EXEMPLO 17

Inibição do Crescimento de Células de Cancro pelo Composto da Invenção (NBM-HD-2)

Células MCF-7 de cancro foram semeadas a uma

densidade de 3×10^5 por poço em placas de 6 poços. Após 24 horas, as células foram tratadas com diferentes concentrações de composto de NBM-HD-2 e butirato de sódio 4 mM sendo usado como controlo positivo. As células foram observadas e contadas após 72 horas. Conforme mostrado na Fig. 13, NBM-HD-2 inibe significativamente o crescimento de células MCF-7 de cancro e altera a morfologia das células. Na Fig. 13(A), depois das células serem incubadas com 2,5 µg/mL (Fig. 13(A)-c), 5 µg/mL (Fig. 13(A)-d), 7,5 µg/mL (Fig. 13(A)-e) e 10 µg/mL (Fig. 13(A)-f) de NBM-HD-2 durante 72 horas, a densidade de células MCF-7 reduziu-se drasticamente em comparação com a do grupo de controlo (Fig. 13(A)-a). A morfologia das células MCF-7 no grupo experimental alterou-se em comparação com a do grupo de controlo. A Fig. 13(A) mostrou que o butirato de sódio 4 mM foi capaz de inibir o crescimento de células MCF-7. Os resultados da contagem de células (Fig. 13(B)) indicou que, tal como o butirato de sódio, NBM-HD-2 inibiu o crescimento celular. Estes resultados indicam que NBM-HD-2 pode inibir o crescimento de células MCF-7 de cancro de um modo dependente da dose e modificar a sua morfologia.

EXEMPLO 18

Inibição do Crescimento de Células do Cancro pelos Compostos da Invenção (NBM-HD-3)

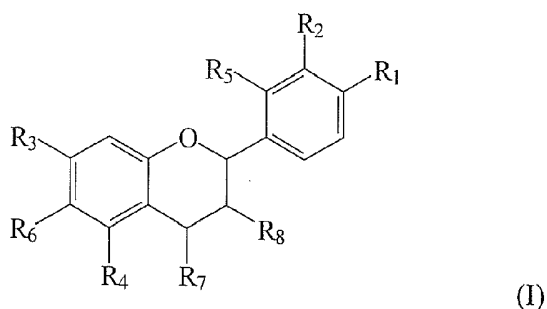
As células MCF-7 de cancro foram semeadas a uma densidade de 3×10^5 por poço em placas de 6 poços. Após 24 horas, as células foram tratadas com diferentes concentra-

ções de composto de NBM-HD-3 e butirato de sódio 4 mM, o qual foi usado como controlo positivo. As células foram observadas e contadas após 72 horas. Conforme mostrado na Fig. 14, NBM-HD-3 inibe significativamente o crescimento de células MCF-7 de cancro e altera a morfologia das células. Na Fig. 14(A), depois das células serem incubadas com 2,5 µg/mL (Fig. 14(A)-c), 5 µg/mL (Fig. 14(A)-d), 7,5 µg/mL (Fig. 14(A)-e) e 10 µg/mL (Fig. 14(A)-f) de NBM-HD-3 durante 72 horas, a densidade de células MCF-7 reduzidas drasticamente em comparação com a do grupo de controlo (Fig. 14(A)-a). A morfologia das células MCF-7 no grupo experimental alterou-se em comparação com a do grupo de controlo. A Fig. 14(A) mostrou que o butirato de sódio 4 mM foi capaz de inibir o crescimento de células MCF-7. Os resultados da contagem de células (Fig. 14(B)) indicam que, de modo semelhante ao butirato de sódio, NBM-HD-3 inibe o crescimento celular. Estes resultados indicam que NBM-HD-3 pode inibir o crescimento de células MCF-7 de cancro de um modo dependente da dose e modificar a sua morfologia.

Lisboa, 14 de maio de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Um composto representado pela seguinte fórmula (I):



em que

R₁ e R₂ são, cada um independentemente, O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo, O-alcenilo, S-alcenilo, NH-alcenilo, O-alcinilo, S-alcinilo, N-alcinilo, O-cicloalquilo C₃-C₈, S-cicloalquilo C₃-C₈, NH-cicloalquilo C₃-C₈, O-anel monocíclico ou bicíclico de 5 a 10 membros insaturado, O-benzilo, S-anel monocíclico ou bicíclico de 5 a 10 membros insaturado, NH-anel monocíclico ou bicíclico de 5 a 10 membros insaturado, alquilo, alcenilo, alcinilo, cicloalquilo C₃-C₈, um anel monocíclico ou bicíclico de 5 a 10 membros insaturado ou um anel heterocíclico de 5 a 10 membros saturado ou insaturado compreendendo pelo menos um heteroátomo no anel selecionado a partir do grupo constituído por N, O e S; ou

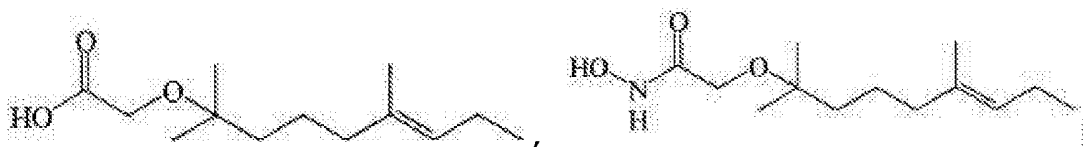
R₁ e R₂ podem formar em conjunto dioxolano;

R₃ é O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo, O-alcenilo, S-alcenilo, NH-alcenilo, O-alcinilo, S-alcinilo, NH-alcinilo, O-cicloalquilo C₃-C₈, S-cicloalquilo C₃-C₈, NH-cicloalquilo C₃-C₈, O-anel monocíclico ou bicíclico de 5 a 10 membros insaturado, O-benzilo, S-anel monocíclico ou bicí-

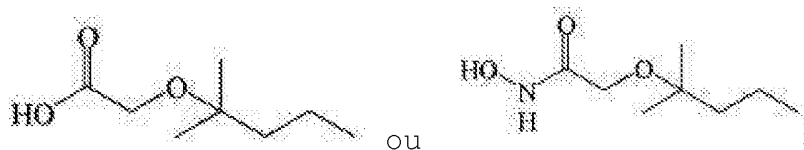
clico de 5 a 10 membros insaturado, NH-anel monocíclico ou bicíclico de 5 a 10 membros insaturado, alquilo, alcenilo, alcinilo, cicloalquilo C₃-C₈, um anel monocíclico ou bicíclico de 5 a 10 membros insaturado ou um anel heterocíclico de 5 a 10 membros insaturado compreendendo pelo menos um heteroátomo no anel selecionado a partir do grupo constituído por N, O e S;

R₄ é OH, OC(=O)alquilo, O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo, O-alcenilo, S-alcenilo, NH-alcenilo, O-alcinilo, S-alcinilo, NH-alcinilo, O-cicloalquilo C₃-C₈, S-cicloalquilo C₃-C₈, NH-cicloalquilo C₃-C₈, O-anel monocíclico ou bicíclico de 5 a 10 membros insaturado, O-benzilo, S-anel monocíclico ou bicíclico de 5 a 10 membros insaturado, NH-anel monocíclico ou bicíclico de 5 a 10 membros insaturado, alquilo, alcenilo, alcinilo, cicloalquilo C₃-C₈, um anel monocíclico ou bicíclico de 5 a 10 membros insaturado, ou um anel heterocíclico de 5 a 10 membros saturado ou insaturado compreendendo pelo menos um heteroátomo no anel selecionado a partir do grupo constituído por N, O e S;

R₅ é alquilo C₄-C₁₆ ou alcenilo C₄-C₁₆ não substituído ou substituído com um ou mais alquilo C₁-C₆, OH, halogéneo, CN, NO, N₃, NH₂, CHO, OR₉, SR₉, NR₉, COOR₉,



R₆ é alquilo C₂-C₁₂ ou alcenilo C₂-C₁₂ não substituído ou substituído com um ou mais alquilo C₁-C₆, OH, halogéneo, CN, NO, N₃, NH₂, CHO, OR₉, SR₉, NR₉,



R_7 é hidrogénio, halogéneo, OH, NH_2 , $COOH$, CHO , CN , NO , $=O$ ou R_7 e R_8 podem em conjunto formar uma ligação dupla, um cicloalquilo C_3-C_6 , ou um anel heterocíclico de 5 a 10 membros compreendendo pelo menos um heteroátomo selecionado a partir do grupo constituído por N, O e S;

R_8 é hidrogénio, halogéneo, OH, NH_2 , $COOH$, CHO , CN ou NO ;

R_9 é fenilo, $C(=O)R^{10}$ ou $C(=O)OR^{10}$; e

R^{10} é OH, $NHOH$ ou NH_2 ;

em que ambos R_5 e R_6 não são simultaneamente alquilo ou alcenilo não substituído;

ou seus sais, estereoisómeros, enantiómeros ou solvatos farmaceuticamente aceitáveis.

2. O composto de acordo com a Reivindicação 1, em que R_1 e R_2 são cada um independentemente O-alquilo C_1-C_6 , O-fenilo ou O-benzilo ou R_1 e R_2 em conjunto formam dioxaleno.

3. O composto de acordo com a Reivindicação 2, em que R_1 e R_2 são cada um independentemente OCH_3 , OCH_2CH_3 , $OCH_2CH_2CH_3$, O-fenilo ou O-benzilo.

4. O composto de acordo com a Reivindicação 1, em que R_1 e R_2 em conjunto formam dioxaleno.

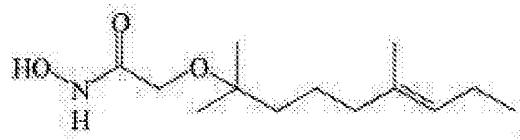
5. O composto de acordo com a Reivindicação 1, em que R_3 e R_4 são cada um independentemente O-alquilo C_1-C_6 , O-fenilo ou O-benzilo.

6. O composto de acordo com a Reivindicação 1, em que R_3 e R_4 são cada um independentemente OCH_3 , OCH_2CH_3 , $OCH_2CH_2CH_3$, O-fenilo ou O-benzilo.

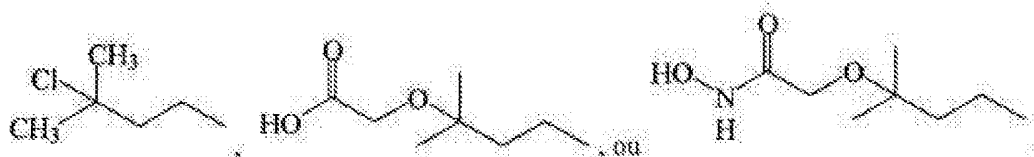
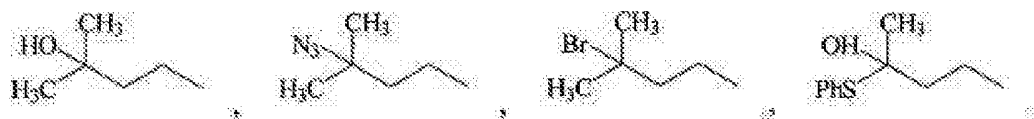
7. O composto de acordo com a Reivindicação 1, em que R_5 é



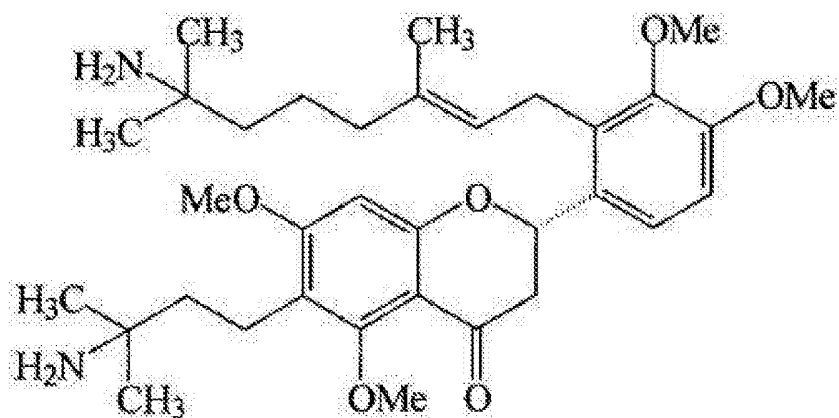
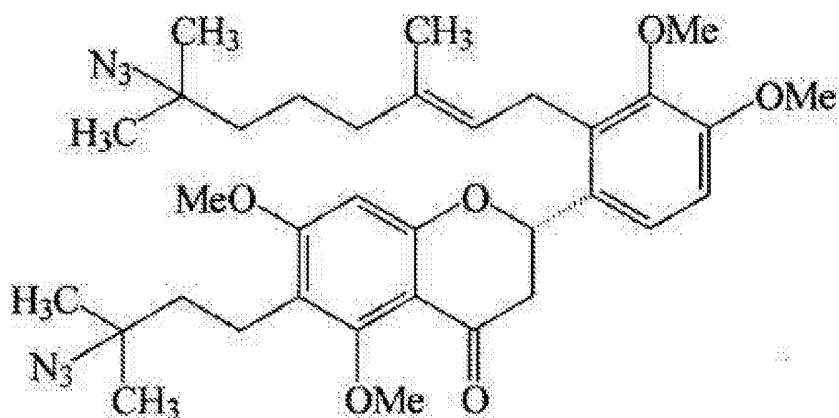
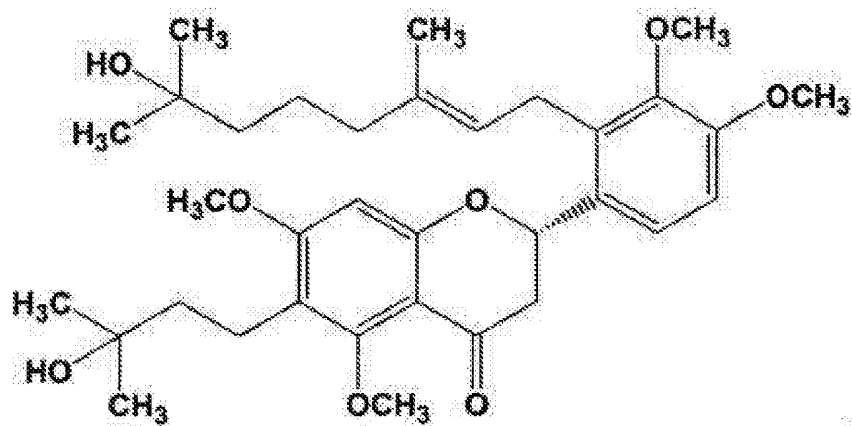
ou

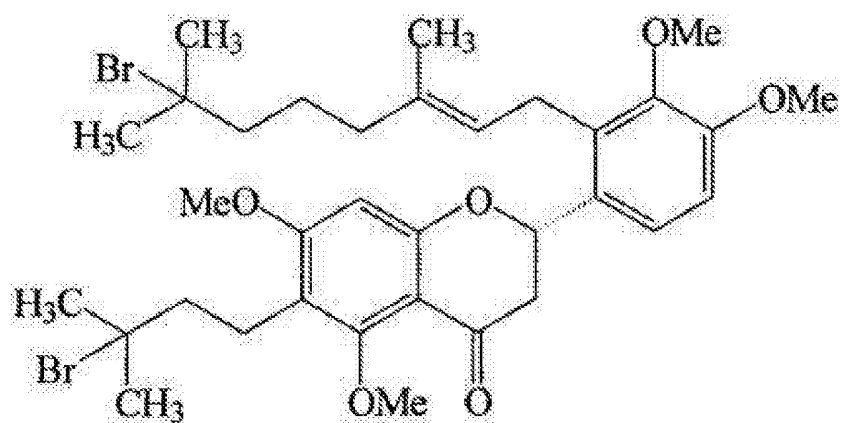


8. O composto de acordo com a reivindicação 1, em que R_6 é

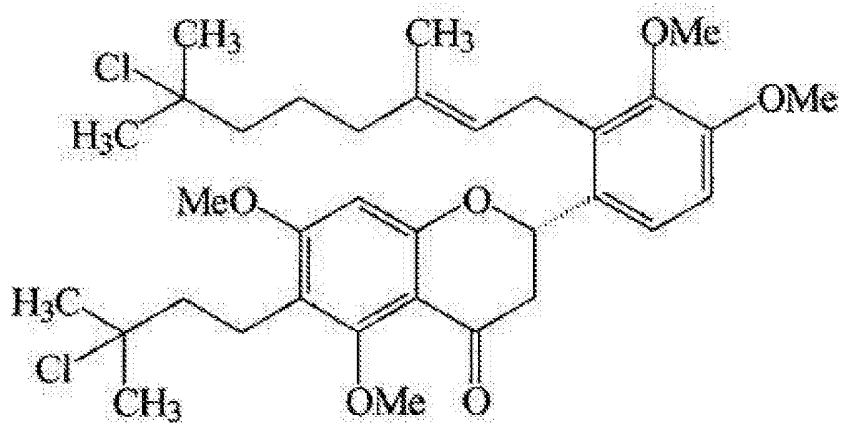


9. O composto de acordo com a reivindicação 1, o qual é selecionado a partir do grupo constituído por:

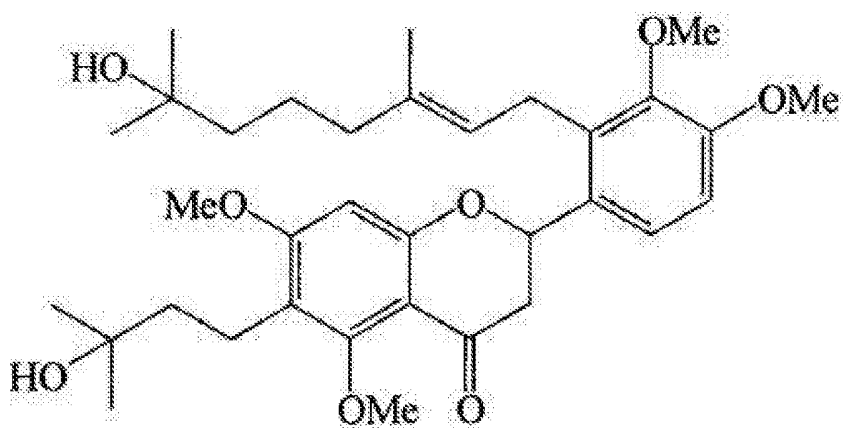




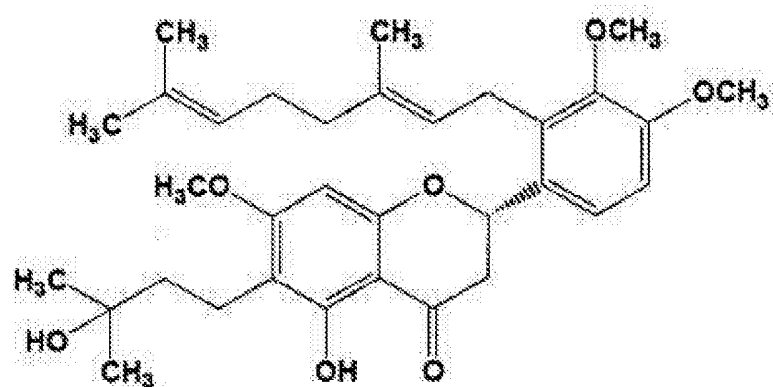
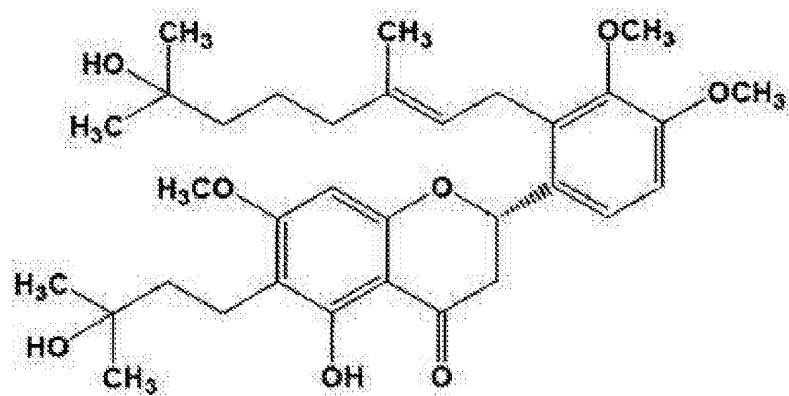
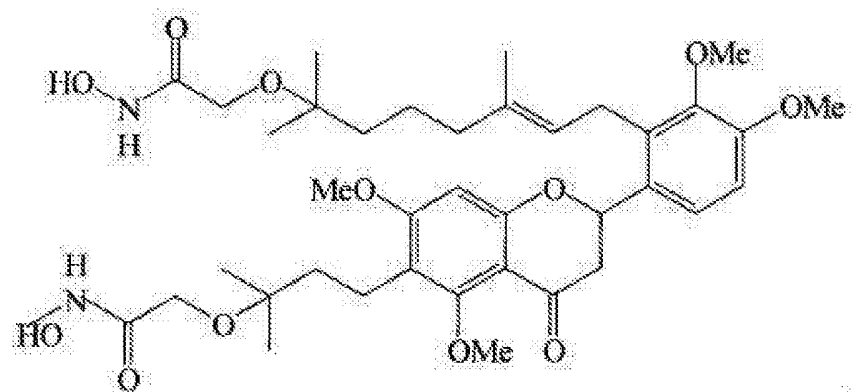
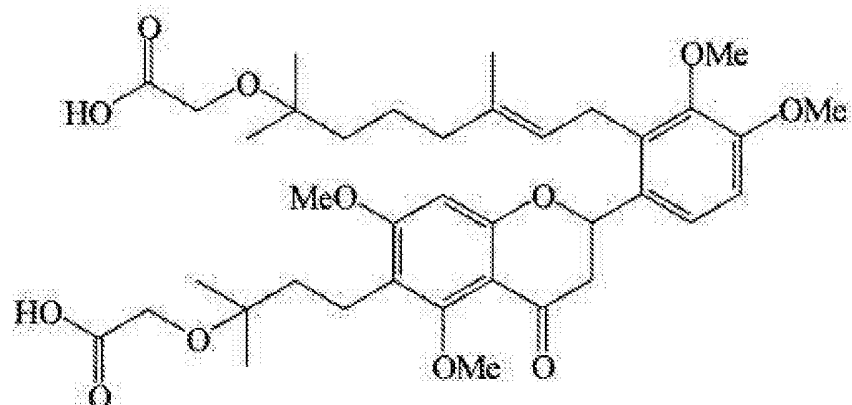
2



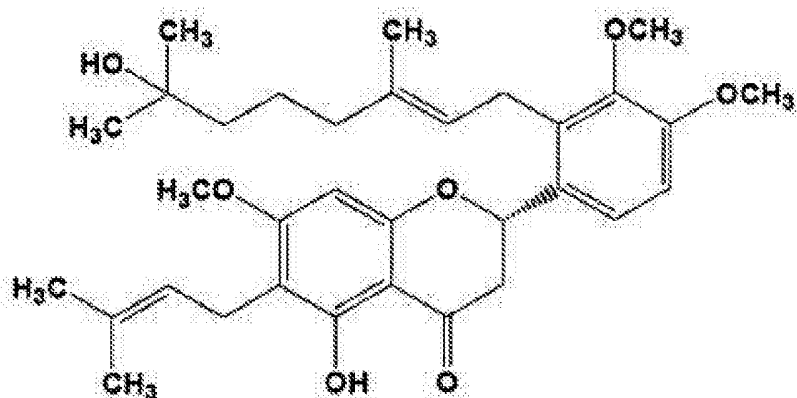
3



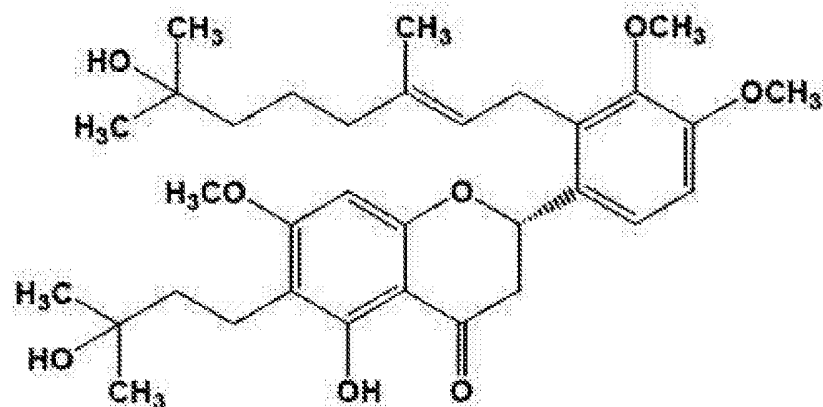
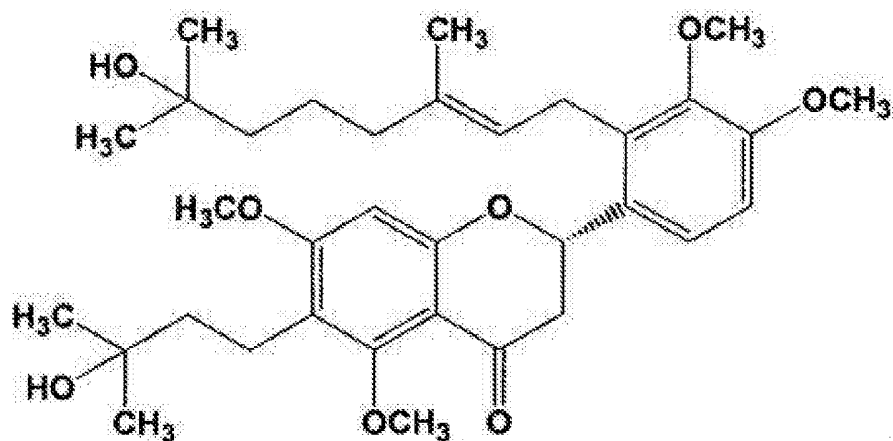
3

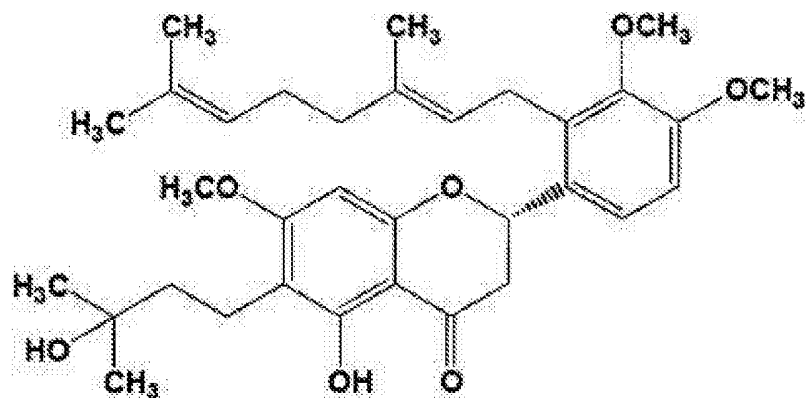


e

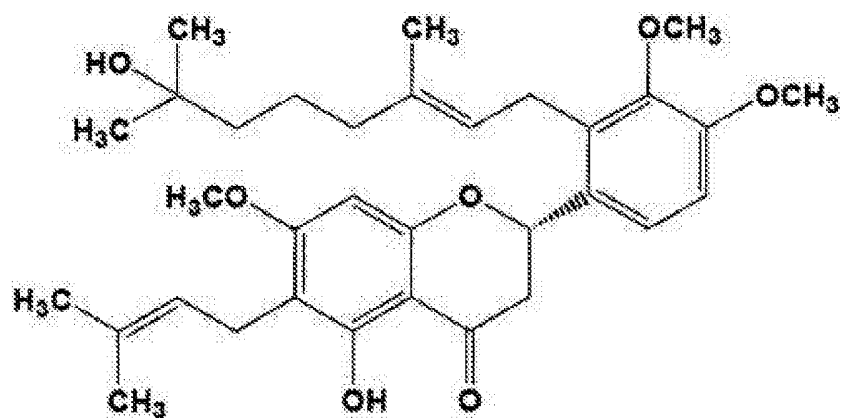


10. O composto de acordo com a reivindicação 1, o qual é selecionado a partir do grupo constituído por:

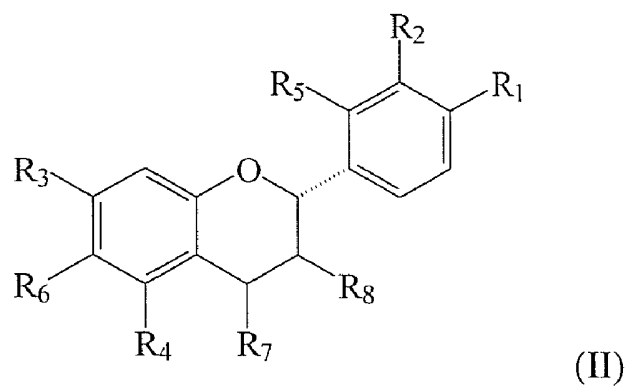




e



11. Um estereoisômero do composto de fórmula (I) de acordo com o definido na Reivindicação 1, o qual é representado pela seguinte fórmula (II):



em que R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 e R_8 são conforme definidos na fórmula (I).

12. O composto de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 11, para utilização como um medicamento.

13. Uma composição farmacêutica compreendendo o composto de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 11, ou seus sais, estereoisômeros, enantiômeros e solvatos farmaceuticamente aceitáveis, como um ingrediente ativo e um agente de suporte farmaceuticamente aceitável.

14. Utilização do composto de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 11, ou seus sais, estereoisômeros, enantiômeros e solvatos farmaceuticamente aceitáveis, no fabrico de um medicamento para a inibição de histona-desacetilase (HDAC) num indivíduo.

15. Utilização do composto de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 11, ou seus sais, estereoisômeros, enantiômeros e solvatos farmaceuticamente aceitáveis, no fabrico de um medicamento para o tratamento de uma doença tumoral ou proliferativa celular num indivíduo.

16. Utilização do composto de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 11, ou seus sais, estereoisômeros, enantiômeros e solvatos farmaceuticamente aceitáveis, no fabrico de um medicamento para a intensificação do crescimento de neurites num indivíduo.

17. Utilização do composto de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 11, ou seus sais, estereoisómeros, enantiómeros e solvatos farmacêuticamente aceitáveis, no fabrico de um medicamento para o tratamento de doenças neurodegenerativas e atrofia muscular espinhal (AME) humana num indivíduo.

Lisboa, 14 de maio de 2015

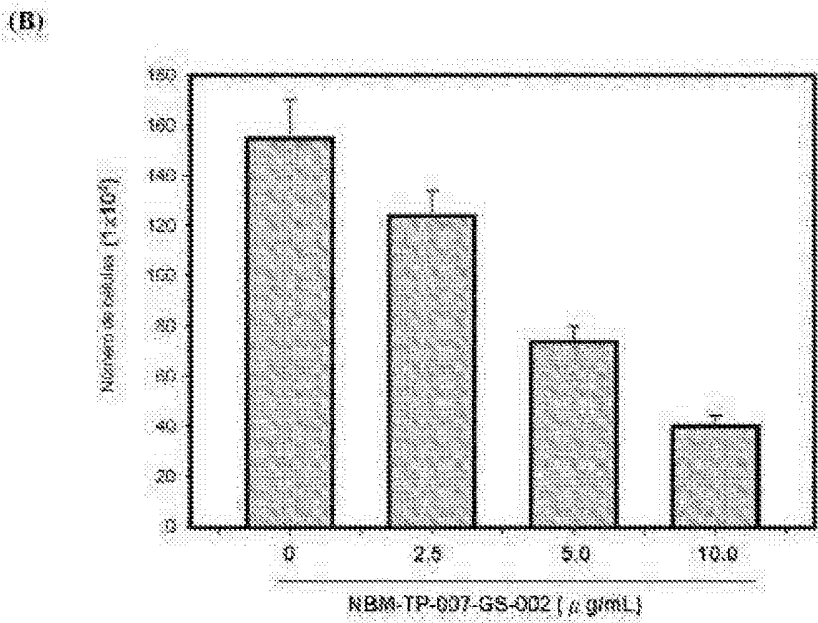
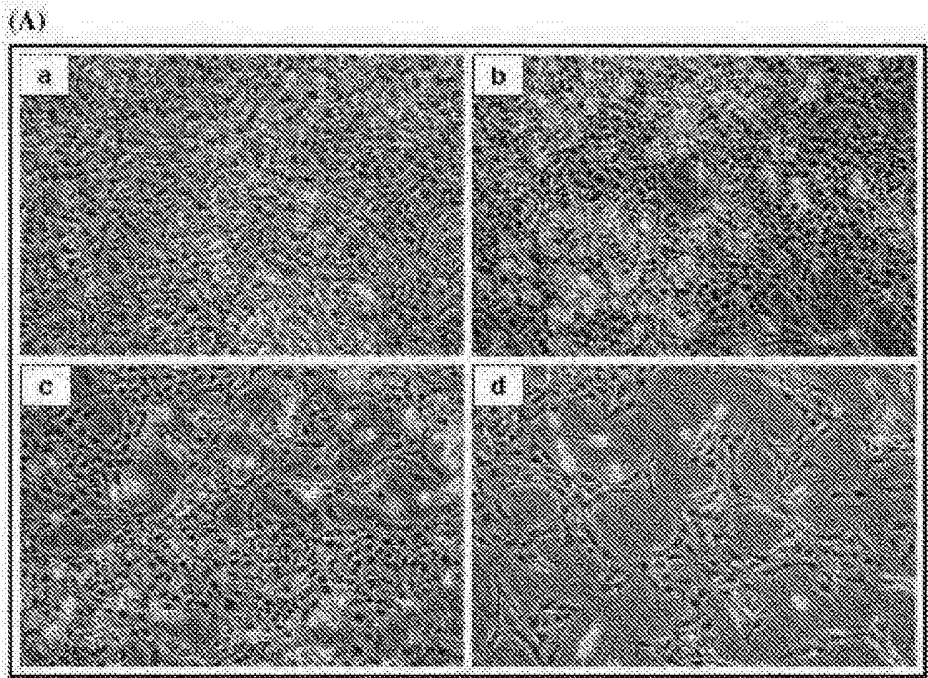


FIG. 1

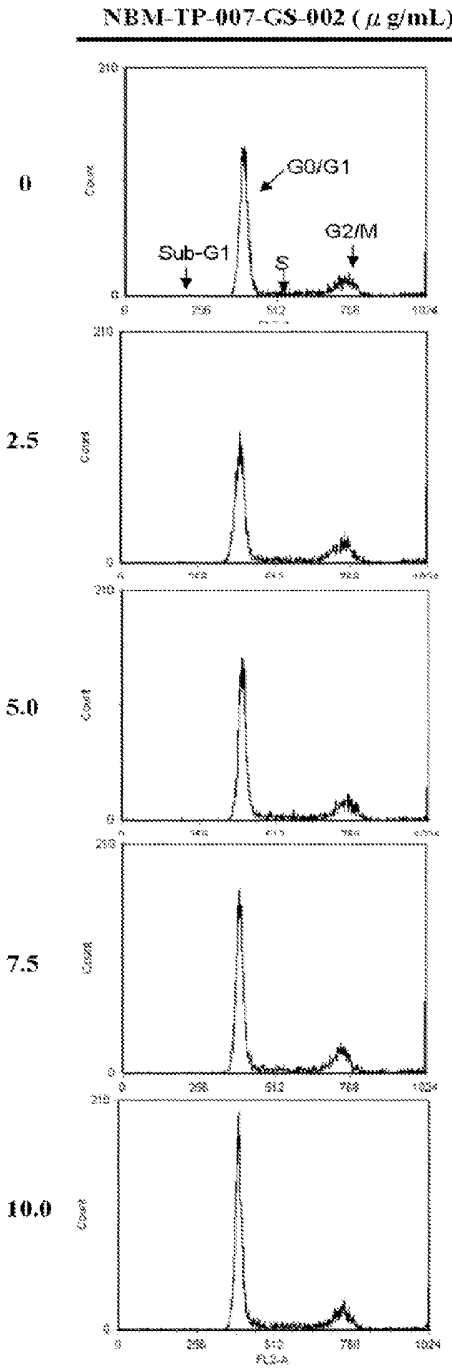


FIG. 2

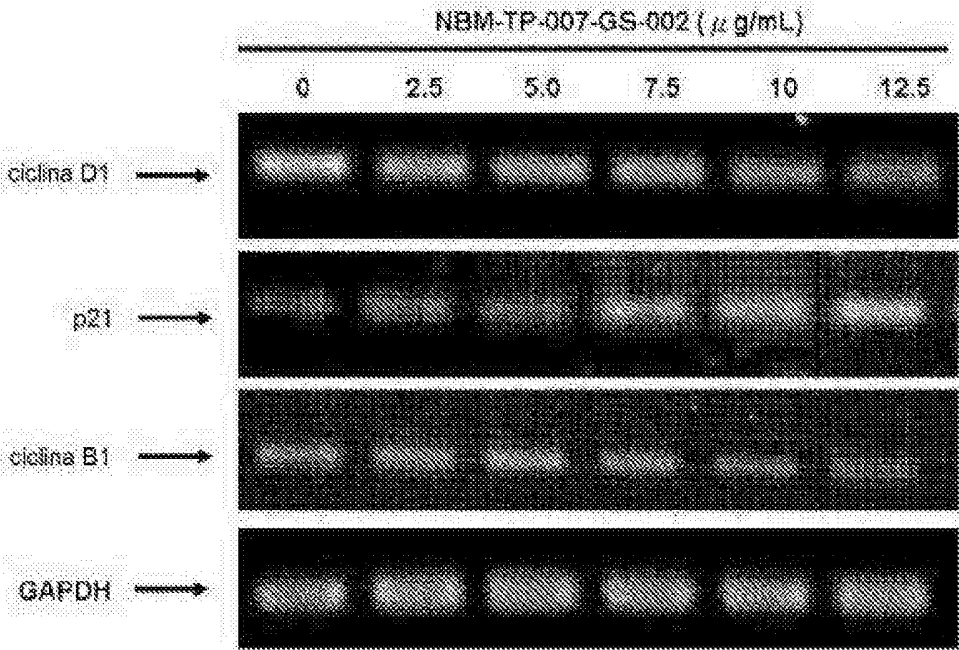


FIG. 3

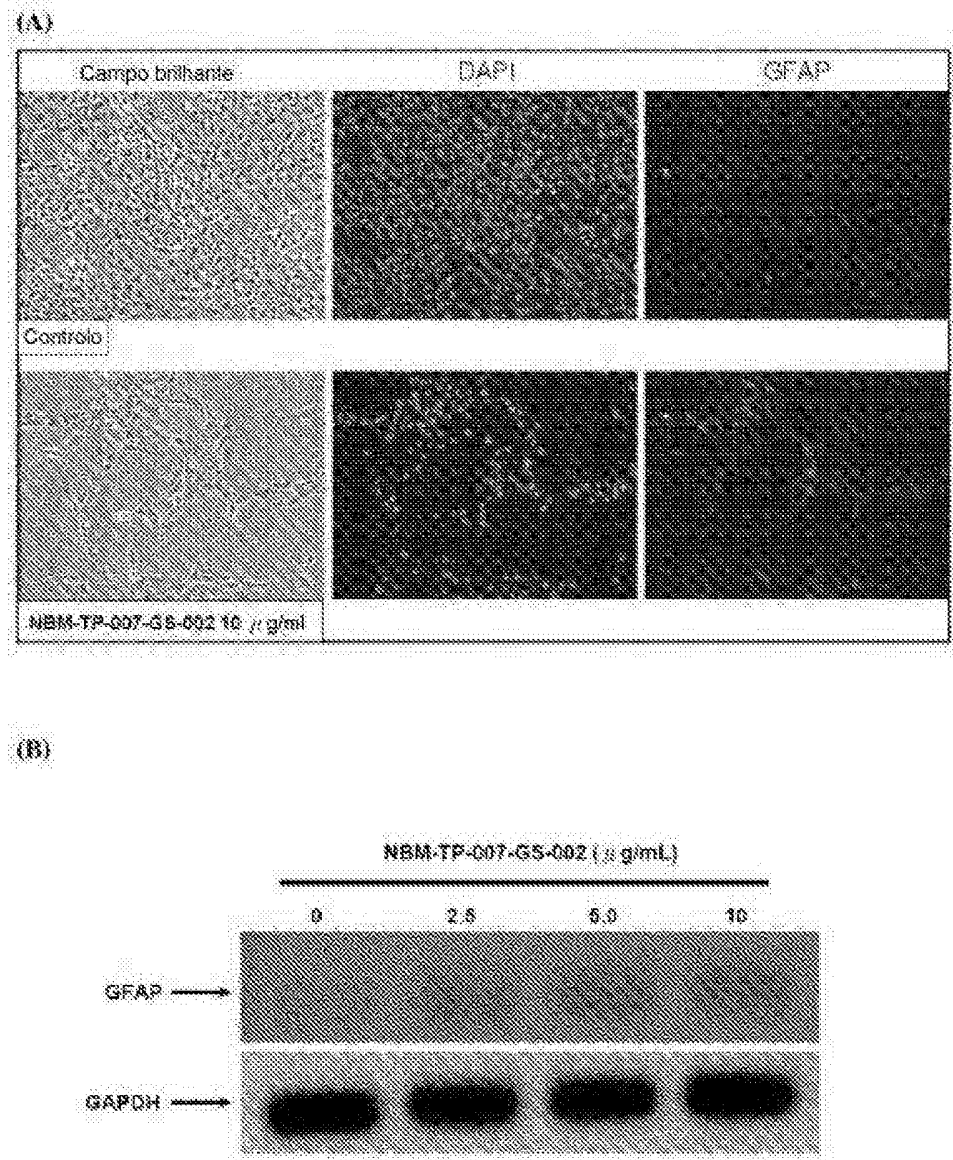


FIG. 4

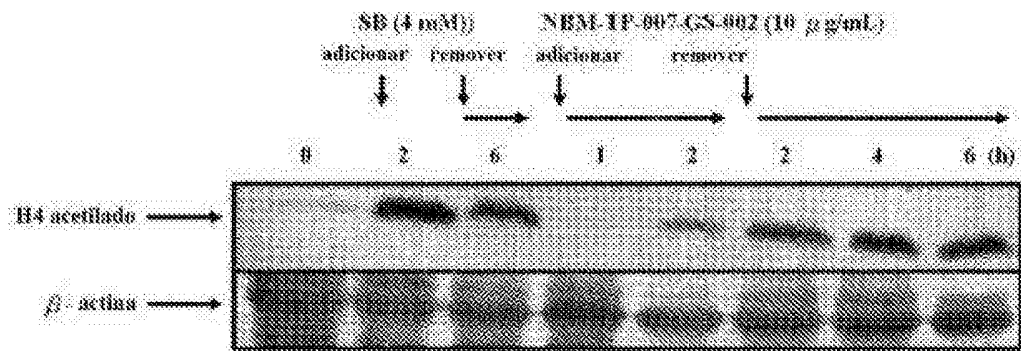


FIG. 5

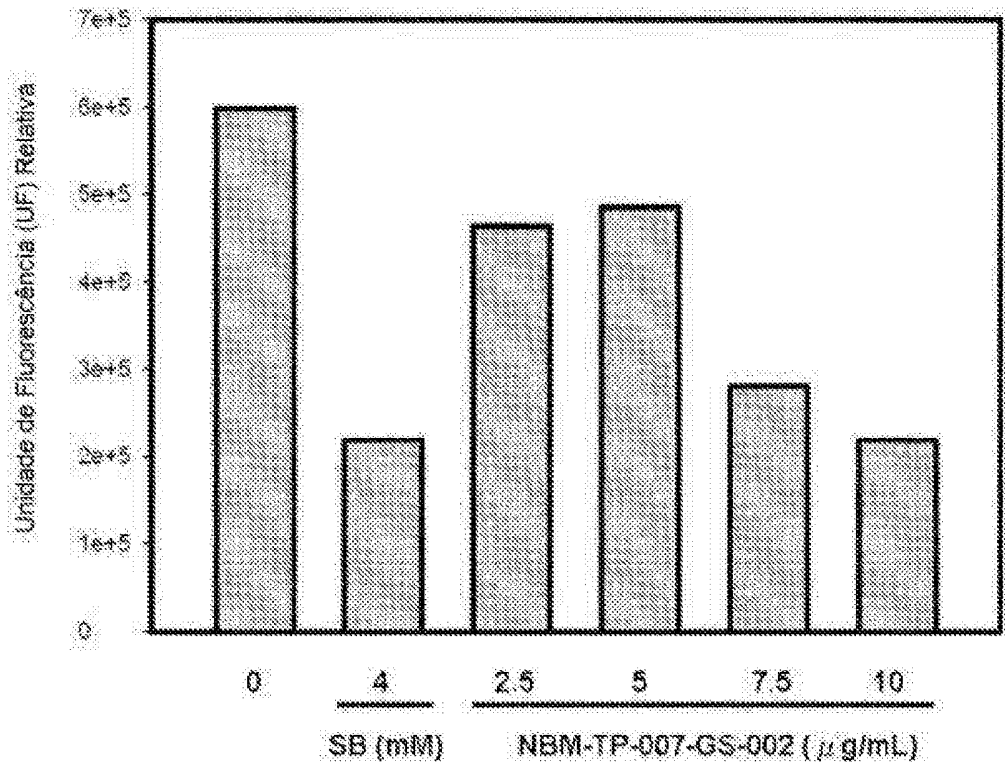


FIG. 6

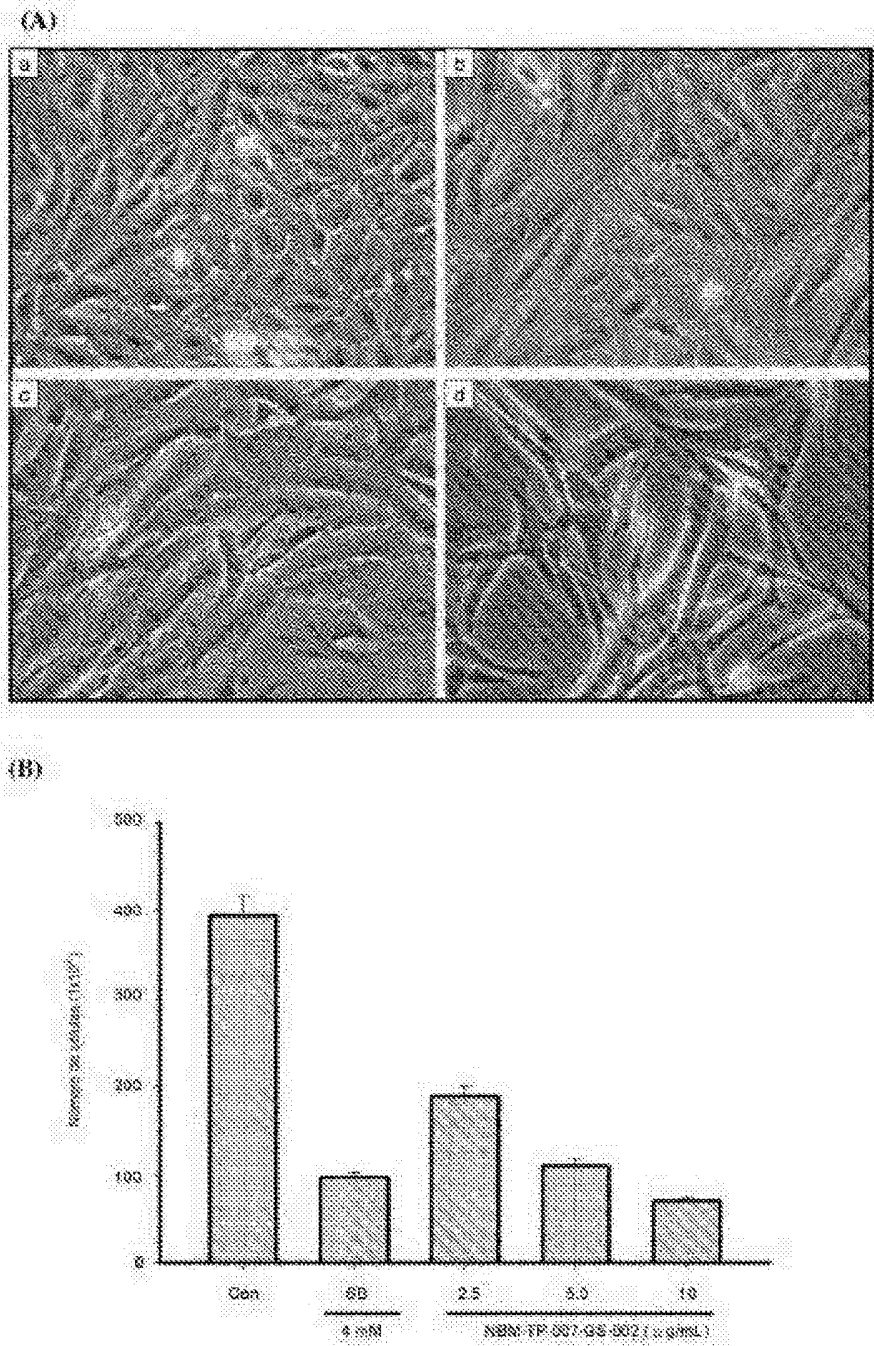


FIG. 7

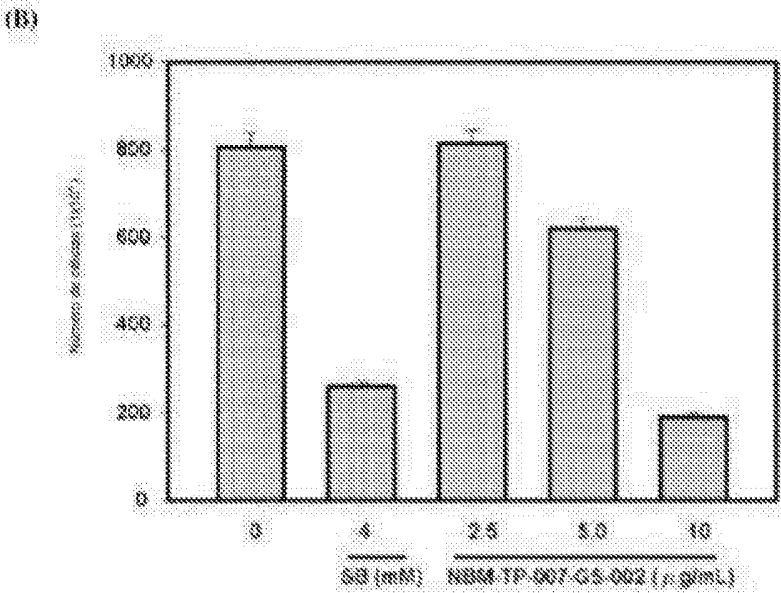
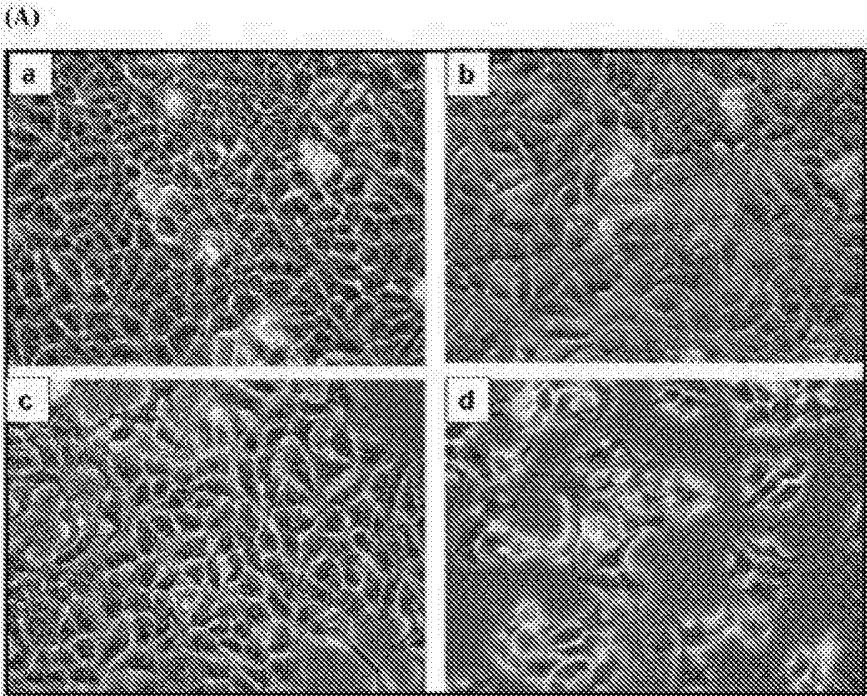


FIG. 8

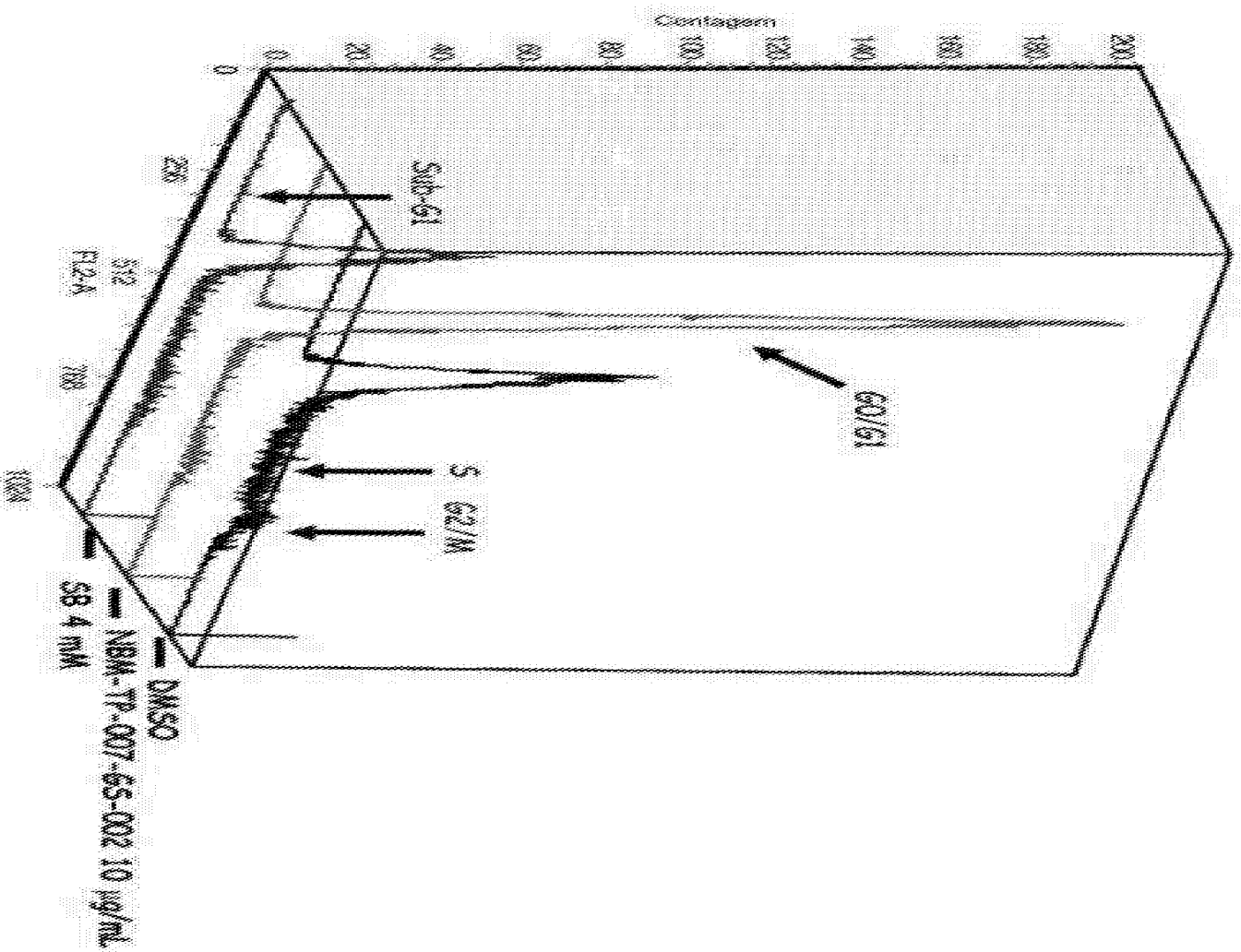


Fig. 9

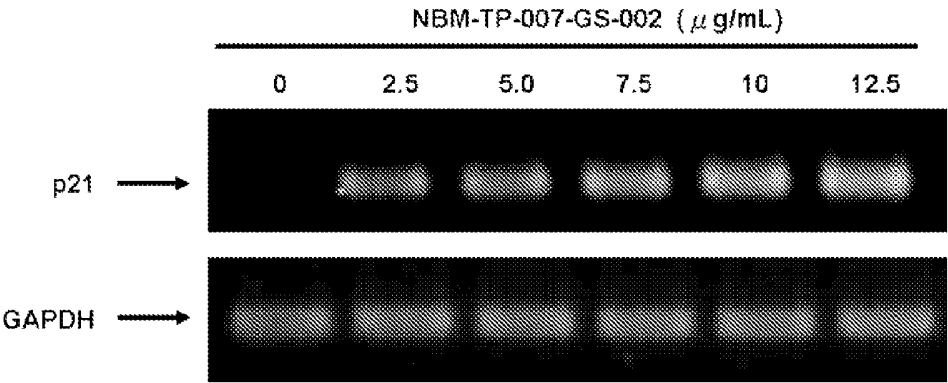


FIG. 10

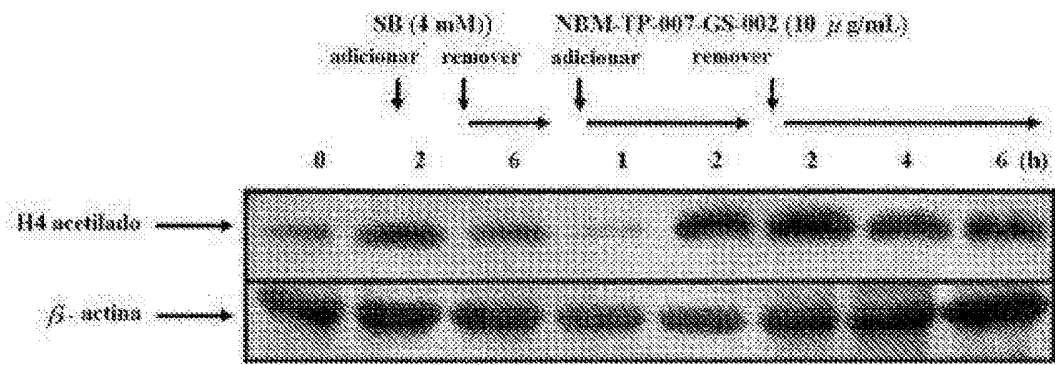


FIG. 11

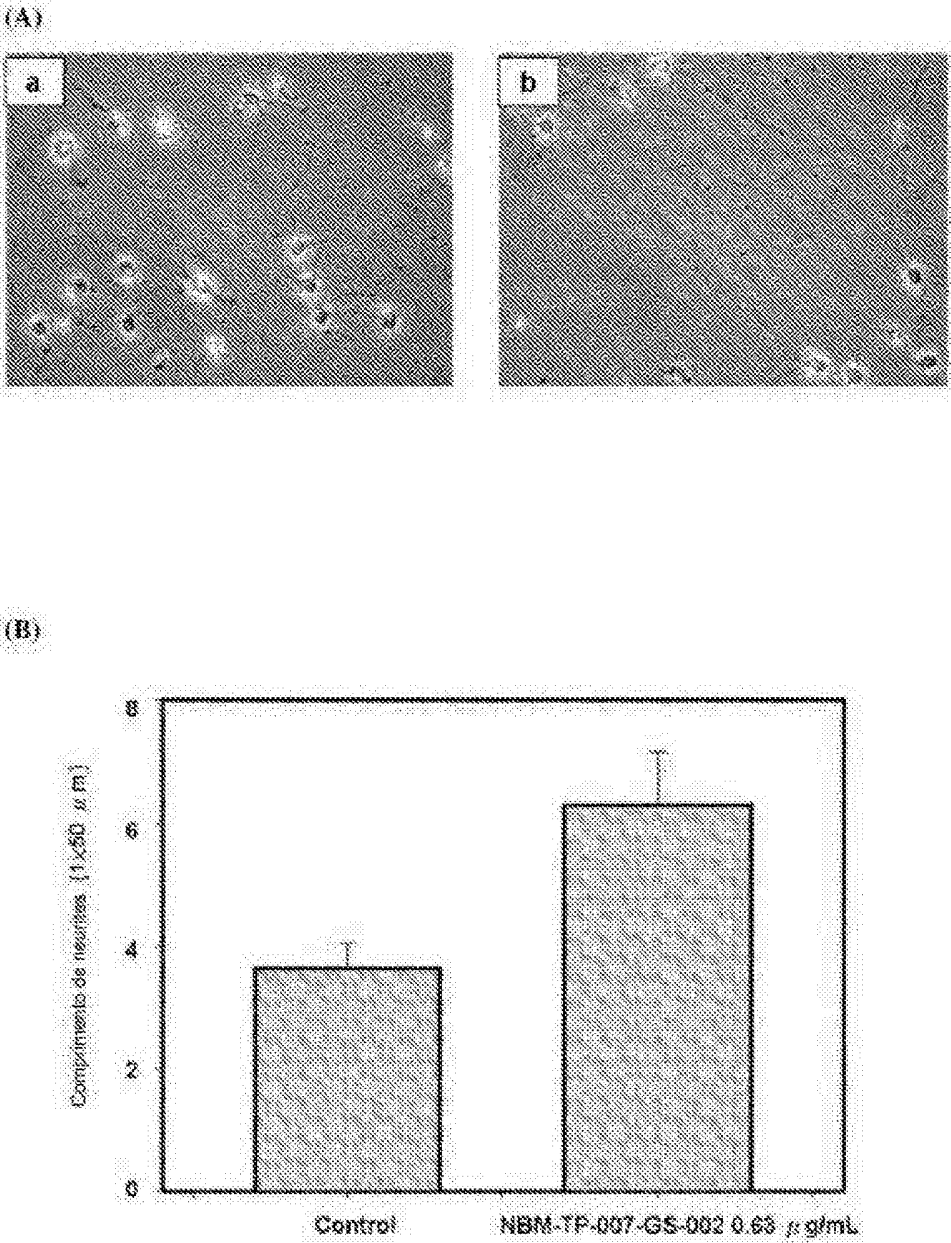
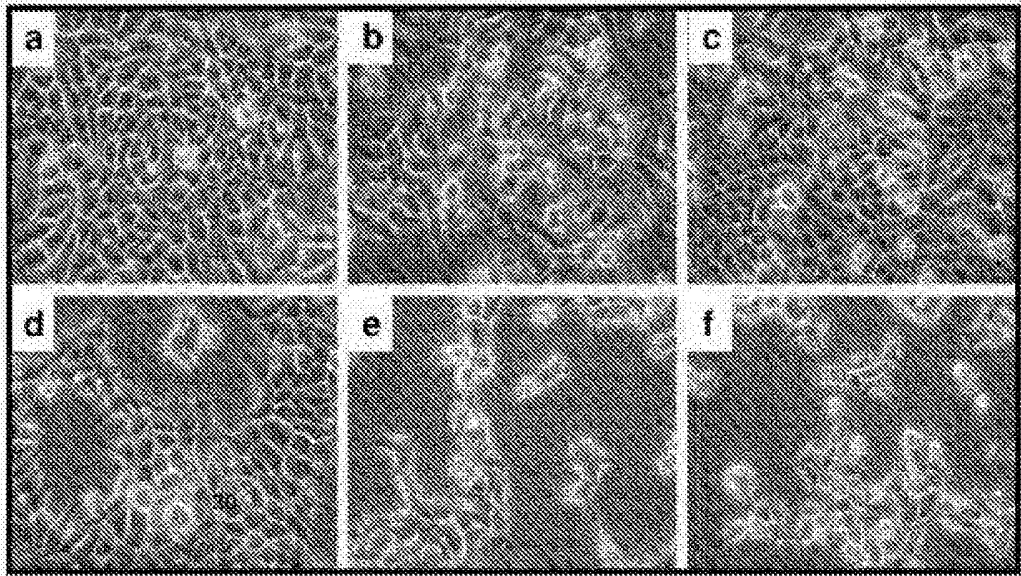


FIG. 12

(A)



a. Control
b. SB 4mM
c. NBM-HD-2 2.5 µg/ml
d. NBM-HD-2 5.0 µg/ml
e. NBM-HD-2 7.5 µg/ml
f. NBM-HD-2 10.0 µg/ml

(B)

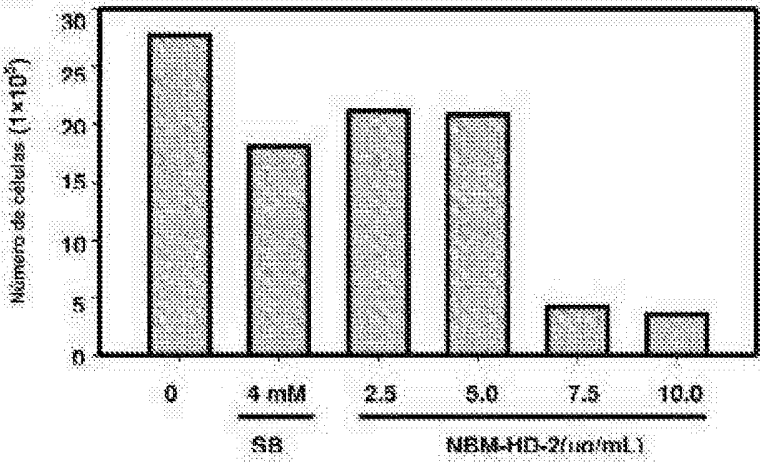


Fig. 13

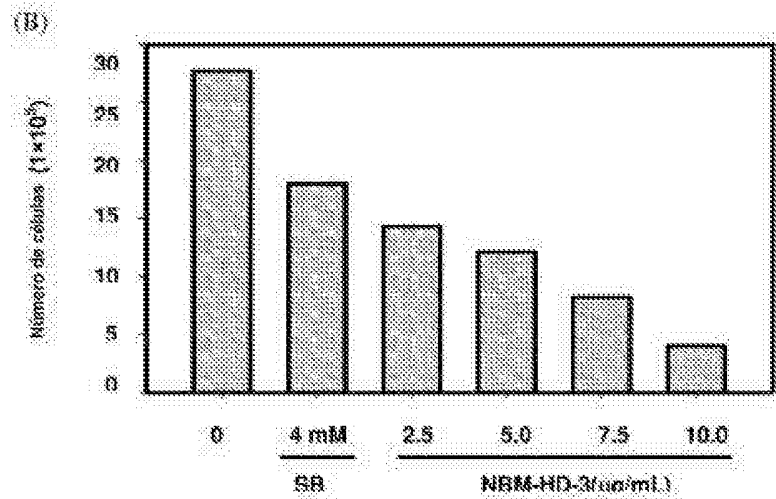
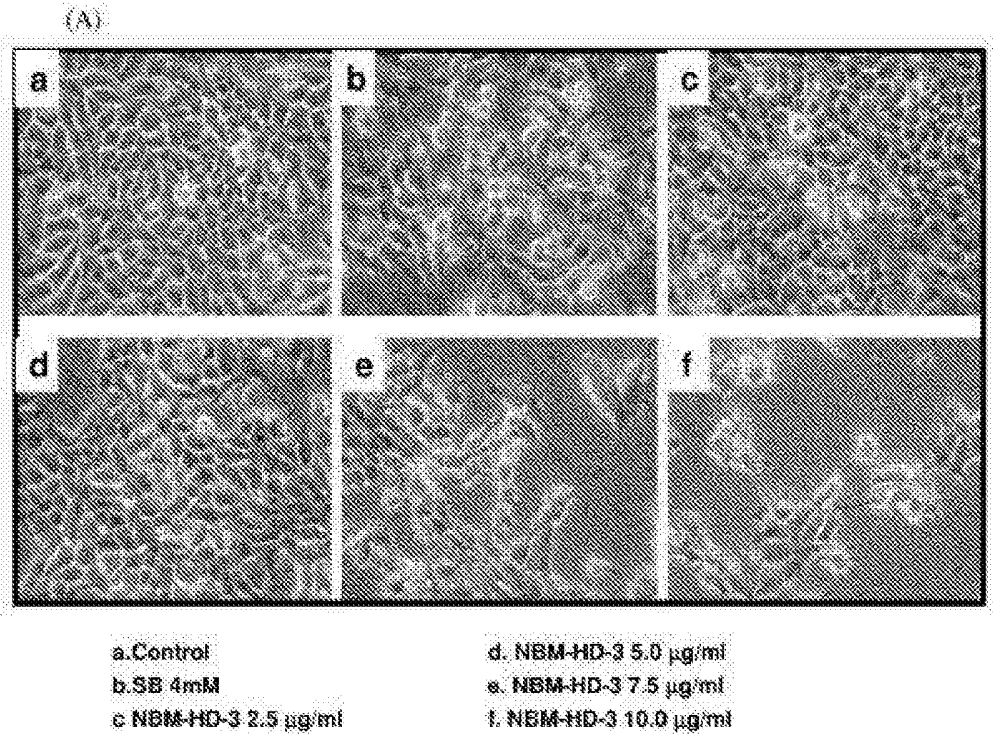


Fig. 14

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- | | |
|-----------------|----------------|
| * US 6174905 B | * US 7169801 B |
| * EP 0847992 A | * US 6888027 B |
| * JP 8258863 A | * EP 1301184 A |
| * JP 10138957 B | * EP 1640371 A |
| * WO 0138322 A | |

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- | | |
|---|--|
| * <i>Medicinal Research Reviews</i> , 2006, vol. 26 (4), 397-413 | * CHEN C-N et al. COMPARISON OF RADICAL SCAVENGING ACTIVITY, CYTOTOXIC EFFECTS AND APOPTOSIS INDUCTION IN HUMAN MELANOMA CELLS BY TAIWANESE PROPOLIS FROM DIFFERENT SOURCES. EVIDENCE-BASED COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE, 18 August 2004, vol. 1 (2), 175185 |
| * <i>Journal of the National Cancer Institute</i> , 02 August 2000, vol. 92 (15), 1210-1216 | * FUKAI T et al. CYTOTOXIC ACTIVITY OF LOW MOLECULAR WEIGHT POLYPHENOLS AGAINST HUMAN ORAL TUMOR CELL LINES. ANTICANCER RESEARCH, HELENIC ANTICANCER INSTITUTE, ATHENS, 01 January 2000, vol. 20 (4), ISSN 0250-7005, 2525-2538 |
| * <i>Hum Genet</i> , 2006, vol. 120, 101-110 | |
| * <i>Human Molecular Genetics</i> , 2004, vol. 13 (11), 1183-1182 | |
| * <i>Molecular Cancer</i> , 2006, vol. 5, 8, http://www.molecular-cancer.com/content/5/1/8 [0004] | |