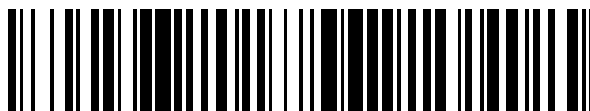


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 828**

51 Int. Cl.:

C07D 311/20 (2006.01)

C07D 407/04 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2007 E 07116430 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2045247**

54 Título: **Compuestos para la inhibición de la histona de acetilasa**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.07.2015

73 Titular/es:

**NATUREWISE BIOTECH & MEDICALS
CORPORATION (100.0%)
6F, No. 36, Sec. 3, Bade Rd.
Taipei City, TW**

72 Inventor/es:

**HUANG, CHUNG-YANG;
CHEN, CHIA-NAN;
HUANG, WEI-JAN;
HUANG, CHIH-HSIANG;
CHI, LI-LING y
YOU, CHIOU-PING**

74 Agente/Representante:

MORGADES MANONELLES, Juan Antonio

ES 2 539 828 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos para la inhibición de la histona de acetilasa

5 **Sector de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos compuestos que son útiles como agentes para la prevención o el tratamiento de enfermedades asociadas con la histona deacetilasa (HDAC), en particular enfermedades tumorales o proliferativas de las células. También se pueden utilizar como agentes para aumentar el crecimiento de las neuritas. En particular, los compuestos de la invención pueden ser utilizados como agentes para enfermedades anti-neurodegenerativas y de la atrofia muscular espinal humana (SMA)

Antecedentes de la invención

15 El ADN eucariótico está altamente organizado y empaquetado en el núcleo. La organización y empaquetado se consiguen por la adición de proteínas, incluyendo histonas del núcleo H2A, H2B, H3 y H4, que forman una estructura compleja, la cromatina, conjuntamente con el ADN. La modificación de histonas del núcleo es de fundamental importancia para los cambios de conformación de la cromatina. El nivel de acetilación se relaciona con la actividad de transcripción y entonces la acetilación induce una conformación abierta de la cromatina que permite que los instrumentos de la transcripción accedan a promotores. La histona deacetilasa (HDAC) e histona acetiltransferasa (HAT) son enzimas que influyen en la transcripción al desacetilar o acetilar selectivamente los grupos ϵ -amino de la lisina situada cerca de los amino terminales de las proteínas de histona del núcleo. La HDAC es una familia de 11 enzimas (isoformas) que pueden actuar como reguladores maestro de muchas enfermedades, incluyendo el cáncer, porque están involucrados en el control de expresión de genes. La disrupción de las HDAC se ha relacionado con una amplia variedad de cánceres humanos. Las enzimas de HDAC o isoformas aparecen involucradas en muchos tipos diferentes de cáncer.

Los inhibidores de la histona deacetilasa (HDAC) están mostrando como una atractiva nueva clase de agentes anticancerosos potenciales para el tratamiento de enfermedades malignas sólidas y hematológicas. En estos últimos años, han sido identificados un número creciente de inhibidores estructuralmente diversos de HDAC; inhiben la proliferación e inducen la diferenciación y/o la apoptosis de células tumorales en cultivos y en modelos animales. La inhibición de HDAC provoca que las histonas del núcleo acetiladas se acumulen tanto en los tejidos tumorales como los normales, proporcionando un marcador subrogado para la actividad biológica de inhibidores de HDAC in vivo. Los efectos de los inhibidores de HDAC sobre la expresión de los genes son altamente selectivos, conduciendo a la activación transcripcional de ciertos genes, tales como el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p21WAF1/CIP1 pero conduciendo a la represión de otros. La inhibición de HDAC no solamente resulta de la acetilación de histonas, sino también de factores de transcripción tales como p53, GATA-1 y el receptor alfa de estrógeno. La significación funcional de la acetilación de proteínas de no histona y los mecanismos precisos por los que los inhibidores de HDAC inducen la detención del crecimiento de células tumorales, diferenciación y/o apoptosis son actualmente el núcleo de intensas investigaciones. Los inhibidores de HDAC, actualmente en pruebas clínicas, han mostrado actividad y representan una clase de agentes antitumorales molecularmente dirigidos con potencial de eficacia basados en un nuevo mecanismo de acción.

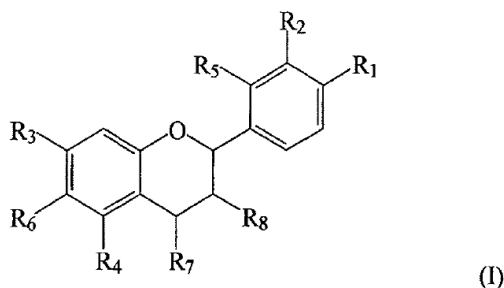
Un artículo de resumen publicado en Medicinal Research Reviews, Vol. 26, nº 4, págs. 397-413, 2006 señaló que se ha informado sobre cuatro clases de inhibidores de HDAC, ácidos grasos de cadena corta, ácidos hidroxámicos, benzamidas y péptidos cíclicos. Los compuestos polares híbridos basados en ácido hidroxámico (HPC) son inhibidores de HDAC que inducen diferenciación a concentraciones micromolares o inferiores (Journal of the National Cancer Institute, Vol. 92, nº 15, 2 de agosto, 2000, págs. 1210-1216). Las Patentes: USA nº 6.174.905, EP 0847992, JP 258863/96, y la Solicitud de Patente Japonesa nº 10138957 dan a conocer derivados de benzamida que inducen diferenciación celular HDAC. El documento WO 01/38322 da a conocer compuestos adicionales que sirven como inhibidores de HDAC. Se ha informado en la Publicación Hum Genet, 2006, 120, págs. 101-110 que la benzamida M344 regula de modo creciente la expresión de la proteína SMN2 en células de fibroblastos derivadas de pacientes SMA hasta 7 veces después de 64 horas de tratamiento. Se ha informado que el butirato sódico mejora la expresión fenotípica en un modelo de ratón transgénico de atrofia muscular espinal y bulbar (Human Molecular Genetics, 2004, Vol. 13, nº 11, págs. 1183-1192). La tricostatina A, un inhibidor de histona deacetilasa, se descubrió que inducía degradación de ciclina D1 dependiente de ubiquitina en células de cáncer de mama MCF-7 (Molecular Cancer 2006, 5:8; este artículo se puede conseguir del enlace: <http://www.molecular-cancer.com/content/5/1/81>). La Patente US nº 7.169.801 dio a conocer compuestos que pueden ser utilizados para inhibir la histona deacetilasa teniendo la fórmula Z-Q-L-M o Z-L-M. La Patente US Número 6888027 cubre una familia de inhibidores de sulfonamida de HDAC que incluyen PXD101. La Patente Europea Número EP 1 301 184 cubre la utilización de ácido valpróico y derivados como inhibidores de HDAC en el tratamiento de tumores sólidos. El documento EP-A-1 640 371 da a conocer en la página 6 el compuesto nimfaeol C, que es conocido también como Propolin G. No obstante, los sustituyentes en posiciones R₁ y R₂ de Propolin G es OH. CHEN C-N Y OTROS: "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, nº 2, 18 de agosto de 2004 (2004-08-18),

páginas 175185, XP009069460 da a conocer siete compuestos de tipo natural, a saber Propolinas A a F, que se pueden aislar de propolis. FUKAI T Y OTROS: "CYTOTOXIC ACTIVITY OF LOW MOLECULAR WEIGHT POLYPHENOLS AGAINST HUMAN ORAL TUMOR CELL LINES", ANTI- CANCER RESEARCH, HELENIC ANTICANCER INSTITUTE, ATENAS, vol. 20, n° 4, 1 de enero de 2000 (2000-01-01), páginas 2525-2536, XP001 016407 ISSN: 0250-7005 da a conocer actividad citotóxica contra tumores normales y células infectadas por HIV de 150 polifenoles naturales y sintéticos. No obstante, este documento no indica ni sugiere que estos polifenoles sean efectivos como inhibidores de HDAC.

De manera general existe todavía la necesidad de desarrollar una nueva clase de inhibidores de HDAC para prevenir o tratar cánceres.

Resumen de la invención

El objetivo de la invención es dar a conocer un grupo de compuestos representados por la siguiente fórmula (I):



y sales farmacéuticamente aceptables, estereoisómeros, enantiómeros, y solvatos de la misma, que son compuestos útiles como agente para aumentar el crecimiento de neuritas y prevenir o tratar enfermedades asociadas con HDAC, en particular, enfermedades tumorales o de proliferación de las células. En particular, los compuestos de la invención pueden ser utilizados como agentes para enfermedades anti-neurodegenerativas y para la atrofia muscular espinal humana (SMA).

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra fotografías microscópicas de células de glioma C6 de rata, tratadas con diferentes concentraciones de NBM- HD-1.

La figura 2 muestra el contenido de ADN de las células de glioma C6 de rata analizadas por medio de citometría FACScan.

La figura 3 muestra el gráfico de electroforesis de los genes del ciclo celular de las células C6 de glioma de rata tratadas con diferentes dosis de NBM-HD-1.

La figura 4 muestra las fotografías de tinción inmuno-fluorescente y datos RT-PCR de las células de glioma C6 de rata tratadas con NBM-HD-1.

La figura 5 muestra un gráfico de transferencia Western de las células de glioma C6 de rata tratadas con NBM-HD-1 y butirato sódico.

La figura 6 muestra la actividad inhibida del HDAC en las células de glioma C6 de rata tratadas con NBM-HD-1 y butirato sódico.

La figura 7 muestra las fotografías microscópicas de células de cáncer DBTRG-05MG de glioblastoma humano tratadas con diferentes dosis de NBM-HD-1.

La figura 8 muestra las fotografías microscópicas de células de cáncer MCF-7 de mama humana tratadas con diferentes dosis de NBM-HD-1.

La figura 9 muestra que NBM-HD-1 inhibieron notablemente el crecimiento de células MCF-7 por modulación del ciclo celular detenido en la fase G0/G1 de forma dependiente de la dosis.

La figura 10 muestra que NBM-HD-1 incrementó notablemente la expresión de genes p21^{WAF1/CIP1} en una forma dependiente de la dosis.

La figura 11 muestra transferencia Western de células MCF-7 tratadas con NBM-HD-1.

La figura 12 muestra fotografías del crecimiento de neuritas de neuronas corticales tratadas con NBM-HD-1.

5 La figura 13 muestra fotografías microscópicas de células MCF-7 de cáncer de mama humano tratado diferentes concentraciones de NBM-HD-2.

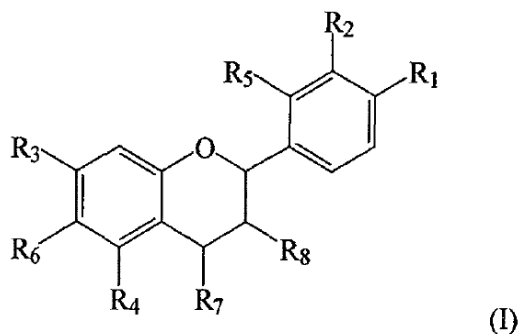
La figura 14 muestra fotografías microscópicas de células MCF-7 de cáncer humano de mama tratadas con diferentes concentraciones de NBM-HD-3.

10 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos compuestos derivados de propolinas, que son útiles como agentes para aumentar el crecimiento de neuritas y prevenir y tratar enfermedades asociadas con HDAC, en particular, enfermedades tumorales o de proliferación de las células. Los compuestos de la invención son potentes en la
15 inhibición de crecimiento de células de cáncer a través de la ruta de diferenciación. En particular, se pueden utilizar como agentes para enfermedades anti-neurodegenerativas y atrofia muscular espinal humana SMA.

Compuestos de la invención

20 De acuerdo con ello, la presente invención se refiere a compuestos representados por la siguiente fórmula (I):



en la que

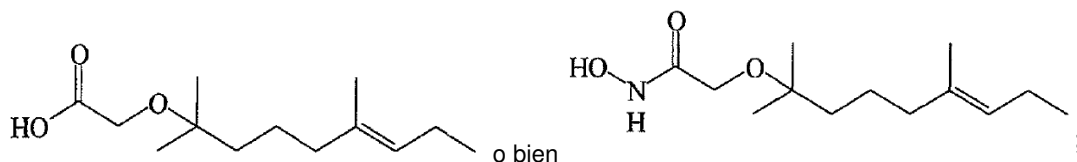
25 R₁ y R₂ son cada uno de ellos independientemente: O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo, O-alqueniilo, S-alqueniilo, NH-alqueniilo, O-alquiniilo, S-alquiniilo, NH-alquiniilo, O-C₃₋₈cicloalquilo, S-C₃₋₈cicloalquilo, NH-C₃₋₈cicloalquilo, anillos O- no saturados de 5 a 10 miembros monocíclicos o bicíclicos, anillos O- no saturados de 5 a 10 miembros monocíclicos o bicíclicos, anillos NH- no saturados de 5 a 10 miembros monocíclicos o bicíclicos, alquilo, alquilenilo, alquiniilo, C₃₋₈cicloalquilo, un anillo no saturado de 5 a 10 miembros monocíclico o bicíclico o un anillo no saturado de 5 a 10 miembros heterocíclico que comprende, como mínimo, un heteroátomo de anillo seleccionado del grupo que consiste en: N, O y S; o bien

R₁ y R₂ pueden formar conjuntamente dioxolano;

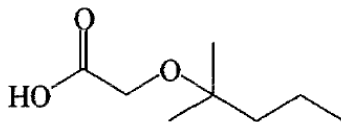
35 R₃ es O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo, O-alqueniilo, S-alqueniilo, NH-alqueniilo, O-alquiniilo, S-alquiniilo, NH-alquiniilo, O-C₃₋₈cicloalquilo, S-C₃₋₈cicloalquilo, NH-C₃₋₈cicloalquilo, anillo O- no saturado de 5 a 10 miembros monocíclico o bicíclico, O-bencilo, anillo S- no saturado de 5 a 10 miembros monocíclico o bicíclico, anillo NH- no saturado de 5 a 10 miembros monocíclico o bicíclico, alquilo, alquilenilo, alquiniilo, C₃₋₈cicloalquilo, un anillo no saturado de 5 a 10 miembros monocíclico o bicíclico o un anillo saturado o no saturado de 5 a 10 miembros heterocíclico que comprende, como mínimo, un heteroátomo de anillo seleccionado del grupo que consiste en: N, O y S;

40 R₄ es OH, OC(=O)alquilo, O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo, O-alqueniilo, S-alqueniilo, NH-alqueniilo, O-alquiniilo, S-alquiniilo, NH-alquiniilo, O-C₃₋₈cicloalquilo, S-C₃₋₈cicloalquilo, NH-C₃₋₈cicloalquilo, anillo O- no saturado de 5 a 10 miembros monocíclico o bicíclico, O-bencilo, anillo S- no saturado de 5 a 10 miembros monocíclico o bicíclico, anillo NH- no saturado de 5 a 10 miembros monocíclico o bicíclico, alquilo, alquilenilo, alquiniilo, C₃₋₈cicloalquilo, un anillo no saturado de 5 a 10 miembros monocíclico o bicíclico o un anillo saturado o no saturado de 5 a 10 miembros heterocíclico que comprende, como mínimo, un heteroátomo de anillo seleccionado del grupo que consiste en: N, O y S;

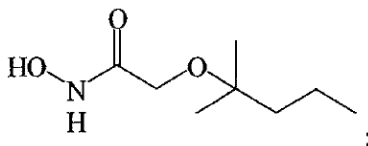
45 R₅ es C₄₋₁₆ alquilo o C₄₋₁₆alqueniilo no sustituido o sustituido con uno o varios C₁₋₆alquilo, OH, halógeno, CN, NO, N₃, NH₂, CHO, OR₉, SR₉, NR₉, COOR₉,



R₆ es C₂₋₁₂alquilo o C₂₋₁₂alquenilo no sustituido o sustituido con uno o varios C₁₋₆alquilo, OH, halógeno, CN, NO, N₃, NH₂, CHO, OR₉, SR₉, NR₉,



o bien



R₇ es hidrógeno, halógeno, OH, NH₂, COOH, CHO, CN, NO, o bien R₇ y R₈ pueden formar conjuntamente un doble enlace, un C₃₋₆cicloalquilo, o un anillo de 5 a 10 miembros heterocíclico que comprende, como mínimo, un heteroátomo de anillo seleccionado del grupo que consiste en: N, O y S;

R₈ es hidrógeno, halógeno, OH, NH₂, COOH, CHO, CN o NO;

15 R₉ es fenilo, C(=O)R¹⁰ o C(=O)OR₁₀; y

R¹⁰ es OH, NHOH o NH₂;

en las que tanto R₅ como R₆ no son simultáneamente alquilo o alquenilo no sustituido;

o bien sales farmacéuticamente aceptables, estereoisómeros, enantiómeros y solvatos de los mismos.

20 En el contexto de la presente descripción, el término "alquilo" significa cadenas de hidrocarburos rectas o ramificadas. El alquilo es preferentemente C₁₋₁₀alquilo. Preferentemente, el número de carbonos del alquilo se seleccionan del grupo que consiste de 1 a 8; más preferentemente es C₁₋₆alquilo o C₁₋₄alquilo. Entre los ejemplos de los grupos alquilo se incluyen metilo (-CH₃), etilo (-CH₂CH₃), propilo (-CH₂CH₂CH₃), isopropilo (CH₃)CH y butilo (-C₄H₉).

25 En el contexto de la presente descripción, el término "alquenilo" significa grupos de hidrocarburo tanto de cadena recta como ramificada no saturados, en los que la no saturación se encuentra presente solamente en forma enlaces dobles. De acuerdo con la invención, el alquenilo incluye uno o varios enlaces dobles. El alquenilo es preferentemente C₂₋₁₆alquenilo. Más preferentemente, el número de carbonos del alquenilo es seleccionado del grupo que consiste en 2 a 12. Entre los ejemplos de los grupos alquenilo se incluyen etenilo (-CH=CH₂), propenilo (-CH=CHCH₃ o -CH₂CH=CH₂), butenil (-CH₂CH=CHCH₃ o -CH=CHCH₂CH₃ o -CH₂CH₂CH=CH₂), -CH₂CH=C(CH₃)CH₃, -CH₂-CH=CH-CH₂-CH₂-CH=CH-CH₃ y -CH₂-CH=C(CH₃)-CH₂-CH₂-CH=C(CH₃)-CH₃.

30 En el contexto de la presente descripción, el término "alquinilo" significa grupos de hidrocarburo hidrocarburo tanto de cadena recta como ramificada no saturados, en los que la no saturación se encuentra presente solamente en forma de enlaces triples. Preferentemente, el número de carbonos de alquinilo se selecciona entre el grupo de 2 a 8. Más preferentemente, alquinilo es C₂₋₆alquinilo o C₂₋₄alquinilo. Se incluyen entre los ejemplos de grupos alquinilo el propinilo (por ejemplo, -CH₂C≡CH).

35 En el contexto de la presente descripción, el término "cicloalquilo" significa un anillo alifático (anillo carbocíclico saturado). Preferentemente, el número de carbonos de cicloalquilo se selecciona entre el grupo que consiste de 3 a 8. Se incluyen entre los ejemplos de grupos de cicloalquilo los ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

40 En el contexto de la presente descripción, el término "anillo no saturado de 5 a 10 miembros monocíclico o bicíclico" significa un sistema de anillo no saturado de 5 a 10 miembros monocíclico o bicíclico (fusionado o de otro tipo), entre cuyos ejemplos se incluyen fenilo y naftilo.

45 En el contexto de la presente descripción, el término "anillo no saturado o saturado de 5 a 10 miembros heterocíclico que comprende como mínimo un heteroátomo de anillo seleccionado entre el grupo que consiste en: N, O y S" significa un sistema de anillo no saturado o saturado de 5 a 10 miembros heterocíclico que comprende como mínimo un heteroátomo de anillo seleccionado entre nitrógeno, oxígeno y azufre, estando cada grupo opcionalmente sustituido, como mínimo, por un sustituyente seleccionado entre nitro, hidroxilo, oxo, halógeno, carboxilo, C₁₋₆alquilo, C₁₋₆alcoxi, C₁₋₆alquiltio, C₁₋₆alquilcarbonilo, C₁₋₆alcoxycarbonilo y fenilo. Se incluyen entre los ejemplos de anillo heterocíclico los piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirroilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tienilo, furanilo, quinolinilo, isoquinolinilo y similares.

55 En el contexto de la presente descripción, el término "halógeno" significa flúor, cloro, bromo y yodo.

En el contexto de la presente descripción, el término "sal farmacéuticamente aceptable" incluye las formadas tanto con ácidos orgánicos como con ácidos inorgánicos y bases. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas a partir de ácidos minerales tales como: ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico y fosfórico, y ácidos orgánicos tales como: ácido cítrico, tartárico, láctico, pirúvico, acético, trifluoroacético, succínico, oxálico, fórmico, fumárico, maleico, oxaloacético, metanosulfónico, etanosulfónico, p-toluenosulfónico, bencenosulfónico y ácidos isetiónicos. Las sales de bases farmacéuticamente aceptables incluyen sales de amonio, sales de metales alcalinos tales como las de sodio y potasio, sales de metales alcalinotérreos tales como las de calcio y magnesio y sales con bases orgánicas, incluyendo sales de aminas primarias, secundarias y terciarias.

En el contexto de la presente descripción, el término "pro-medicamento" significa un compuesto que se convierte dentro del cuerpo, por ejemplo, por hidrólisis de la sangre, en su forma activa que tiene efectos médicos.

En el contexto de la presente descripción, el término "solvato" significa un complejo que comprende el compuesto de la invención y un disolvente en el que reaccionan o del que precipitan o cristalizan.

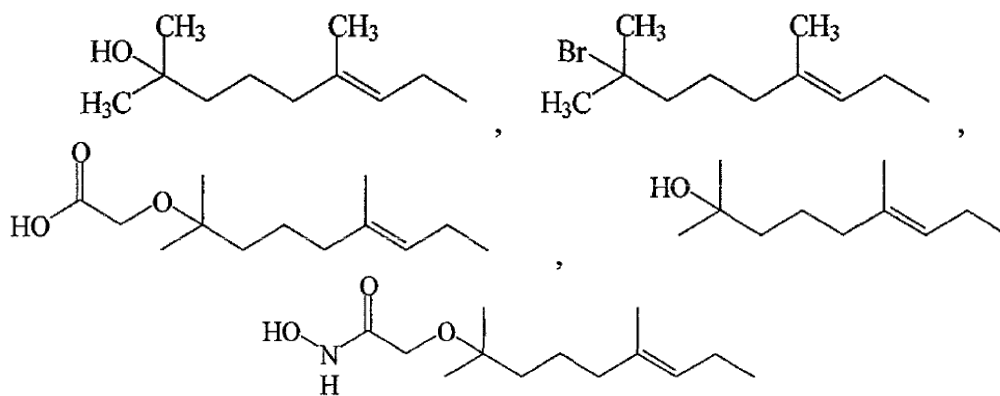
En el contexto de la presente descripción, el término "estereoisómeros" son moléculas isómeras cuya conectividad atómica es la misma, pero cuya distribución atómica en el espacio es distinta.

En el contexto de la presente descripción, el término "enantiómeros" son estereoisómeros que son imágenes a espejo completas no superponibles de cada uno, de manera parecida a cómo la mano izquierda y la mano derecha son "iguales" pero opuestas.

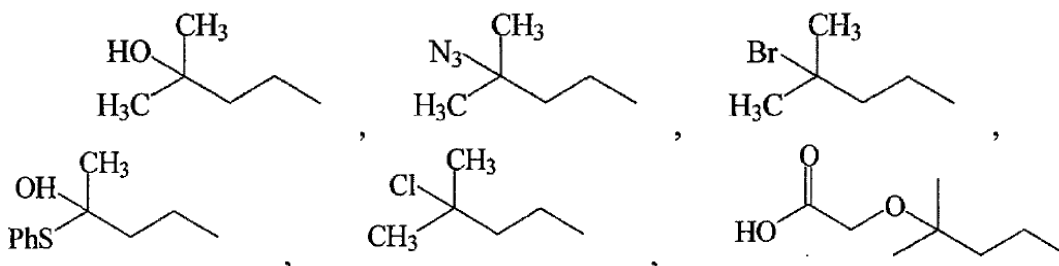
De acuerdo con una realización de los compuestos de fórmula (I) de la invención, preferentemente R_1 y R_2 son cada uno de ellos independientemente OC_{1-6} alquilo, O-fenilo o O-bencilo o R_1 y R_2 conjuntamente forman dioxaleno. De manera más preferente, R_1 y R_2 son cada uno de ellos independientemente OCH_3 , OCH_2CH_3 , $OCH_2CH_2CH_3$, O-fenilo o O-bencilo.

De acuerdo con una realización de los compuestos de fórmula (I) de la invención, preferentemente R_3 y R_4 son cada uno de ellos independientemente C_{1-6} alquilo, O-fenilo o O-bencilo. De manera más preferente, R_3 y R_4 son cada uno de ellos independientemente OCH_3 , OCH_2CH_3 , $OCH_2CH_2CH_3$, O-fenilo o O-bencilo.

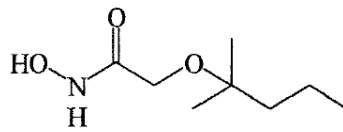
De acuerdo con una realización de los compuestos de fórmula (I) de la invención, preferentemente, R_5 es



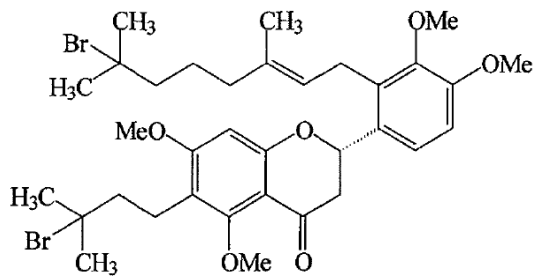
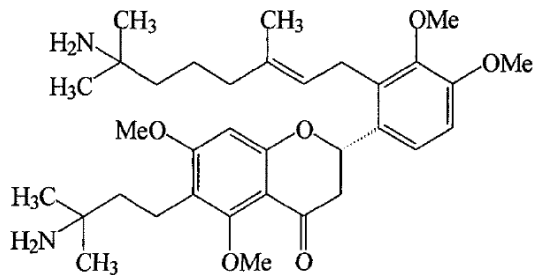
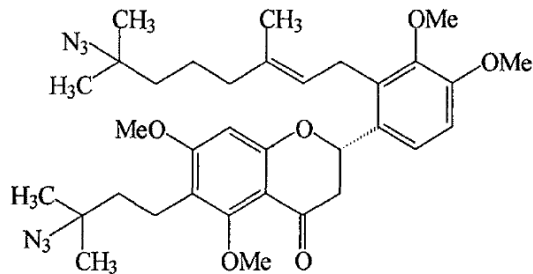
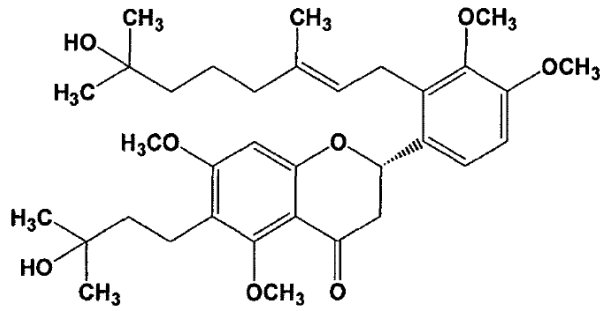
De acuerdo con una realización de los compuestos de fórmula (I) de la invención, preferentemente, R_6 es

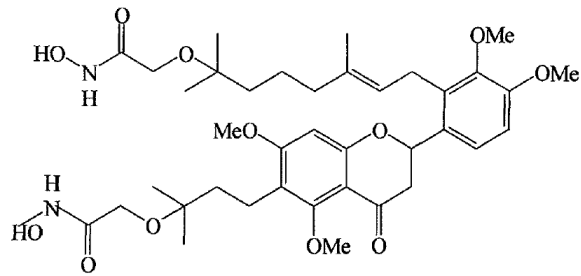
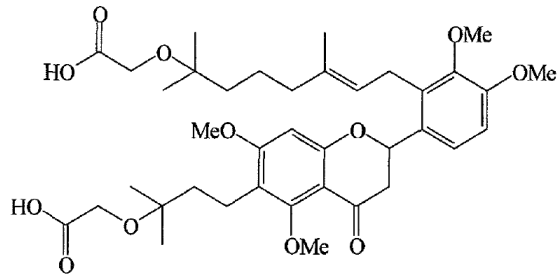
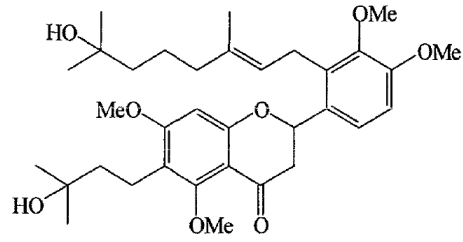
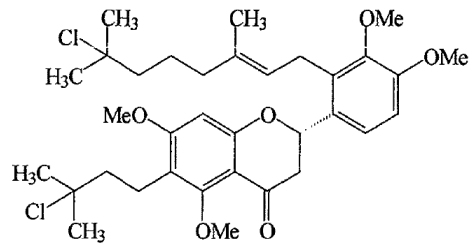


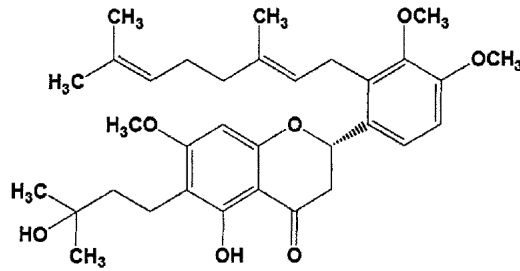
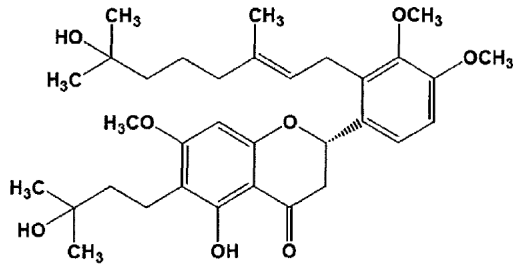
o bien



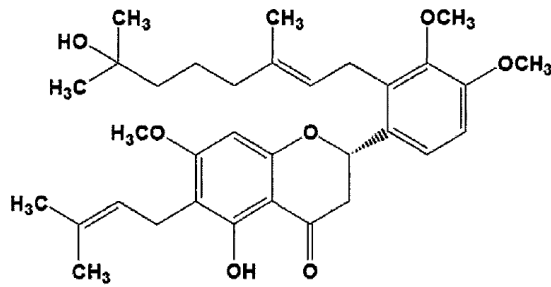
De acuerdo con la invención, el compuesto preferente de fórmula (I) de la invención es seleccionado del grupo que consiste en:





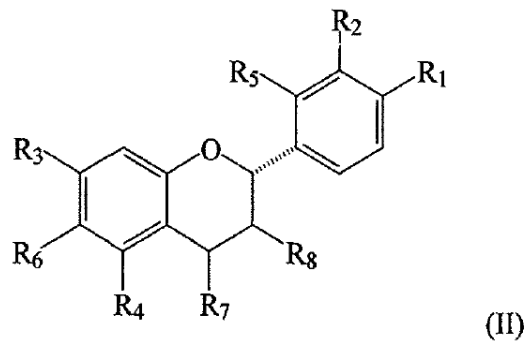


y



5

La presente invención se refiere también a un estereoisómero de acuerdo con el compuesto de fórmula (I), y está representado por la siguiente fórmula (II):

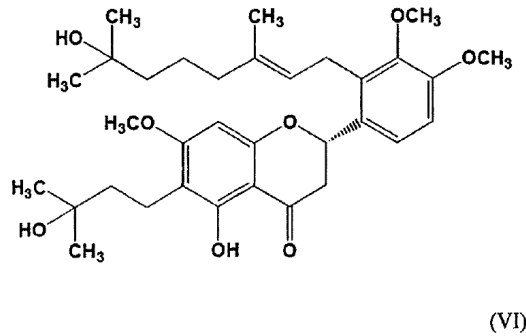
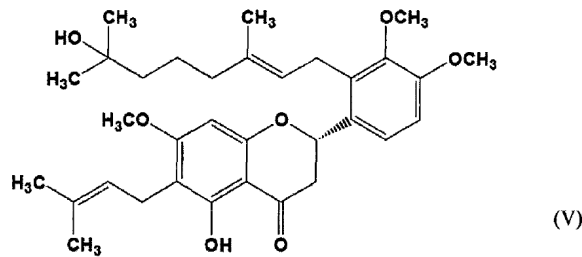
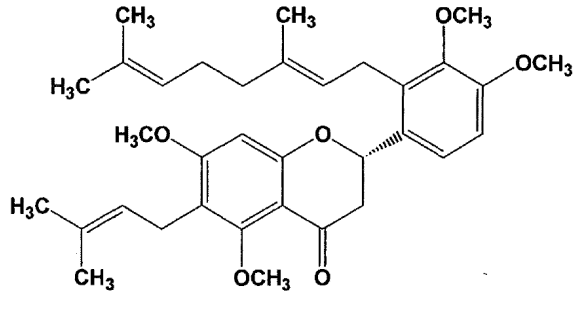
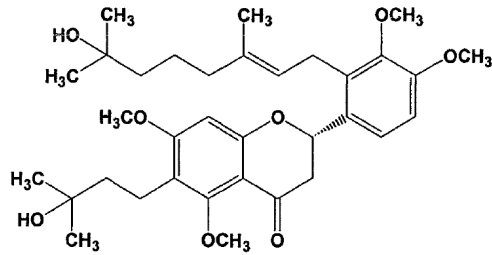


10

en la que R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son definidos como en la fórmula (I).

De acuerdo con una realización más preferente de la invención, el compuesto de fórmula (I) es el que tiene la siguiente fórmula (III), (IV), (V) o (VI):

15

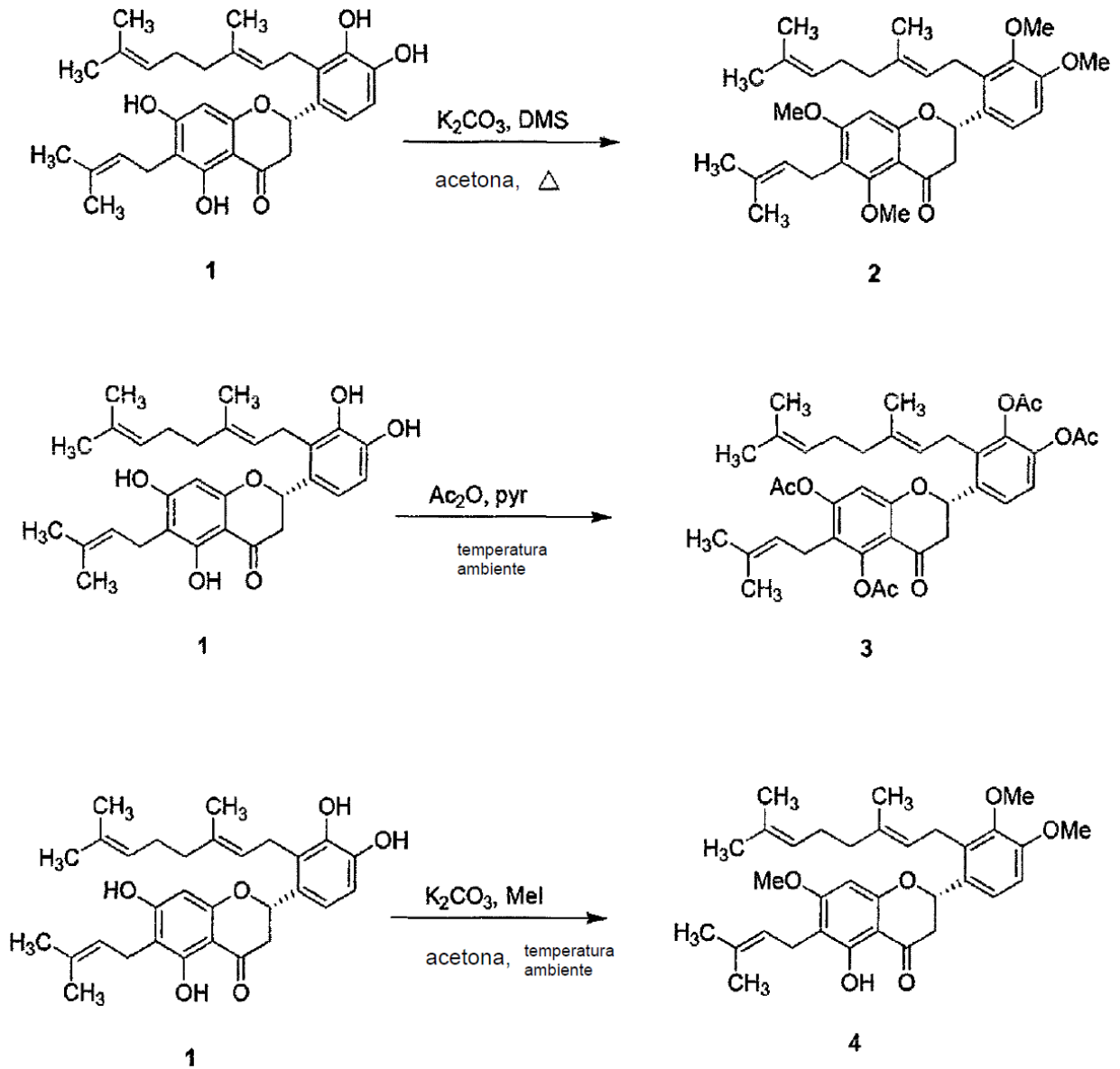


- 5 De acuerdo con la invención, los compuestos de fórmula (I) de la invención pueden inhibir HDAC y por lo tanto se pueden utilizar como agentes para la prevención o tratamiento de enfermedades asociadas con histona deacetilasa (HDAC). Además, los compuestos de la invención inhiben significativamente el crecimiento de múltiples líneas de células de cáncer, incluyendo las de glioma C6 de rata, glioblastoma humano, de cáncer de mama humano, células de leucemia humana, y células de melanoma humano. El mecanismo para inhibir el crecimiento de células de cáncer
- 10 puede ser a través de la ruta de diferenciación, en particular, mediante la diferenciación inducida y expresión de genes del regulador de ciclo celular regulado, incluyendo las de p21 y ciclina B1. Además, los compuestos de fórmula (I) de la invención pueden mediar la diferenciación neuronal de células madre neurales y, por lo tanto, se pueden utilizar como agentes contra enfermedades anti-neurodegenerativas.
- 15 Para los usos terapéuticos de los compuestos de la invención, la dosis administrada variará, desde luego, variará con el compuesto utilizado, la forma de administración, el tratamiento deseado y la enfermedad indicada. La dosis diaria del compuesto de fórmula (I) puede encontrarse en un rango de 1 mg/kg a 40 mg/kg. La invención da a conocer procedimientos de inhibir HDAC, tratamiento de tumores o enfermedad proliferativa celular, enfermedades neurodegenerativas y atrofia muscular espinal humana, y aumentando el crecimiento de neuritas en un paciente,
- 20 comprendiendo la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de los compuestos de la invención, respectivamente.

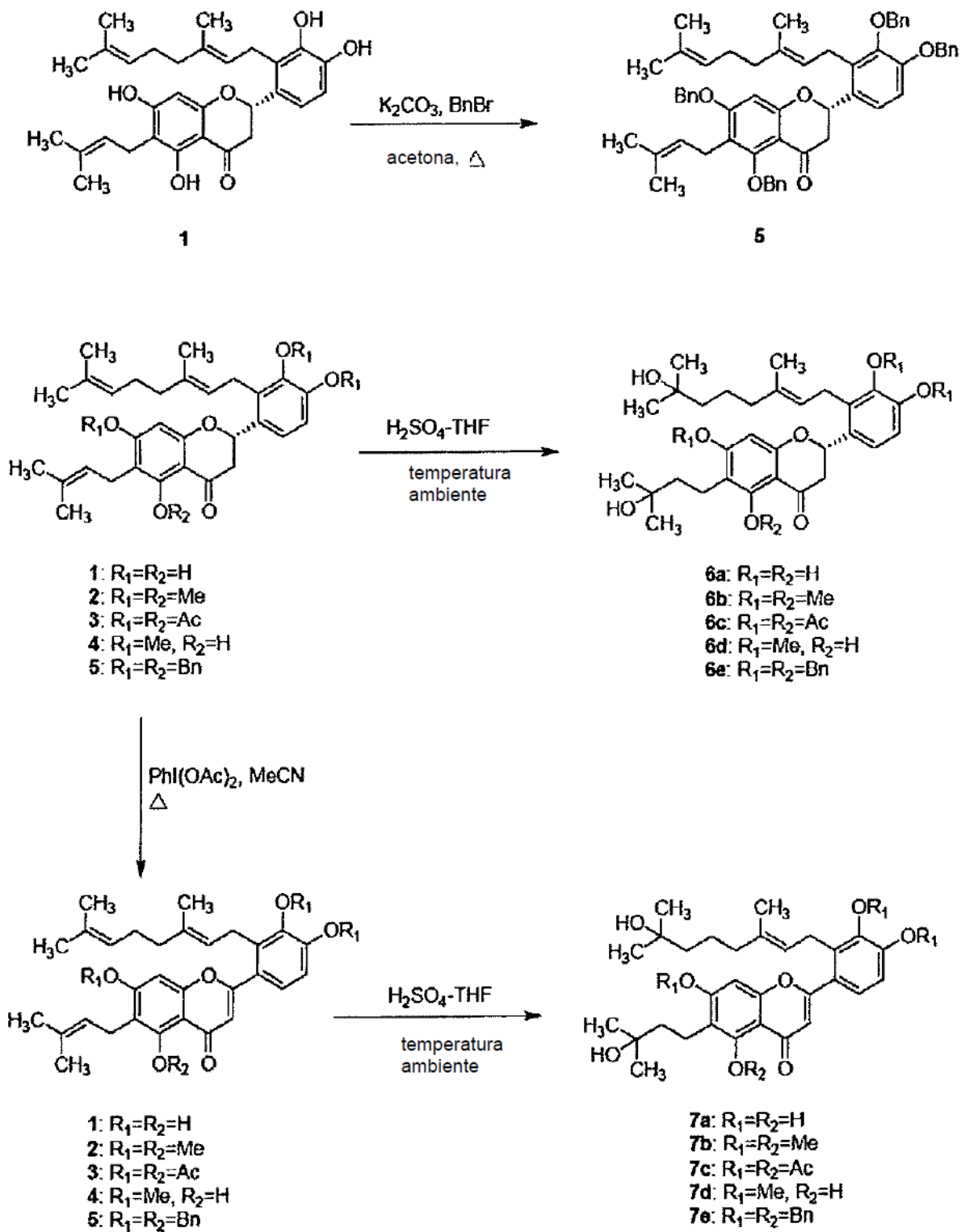
Síntesis General de los compuestos de fórmula I de la invención

Los compuestos de la presente invención pueden ser preparados por cualesquiera medios convencionales. Se facilitan procedimientos adecuados para sintetizar estos compuestos en los ejemplos. De manera general, los compuestos de fórmula I pueden ser preparados de acuerdo con uno de los esquemas sintéticos que se describen a continuación.

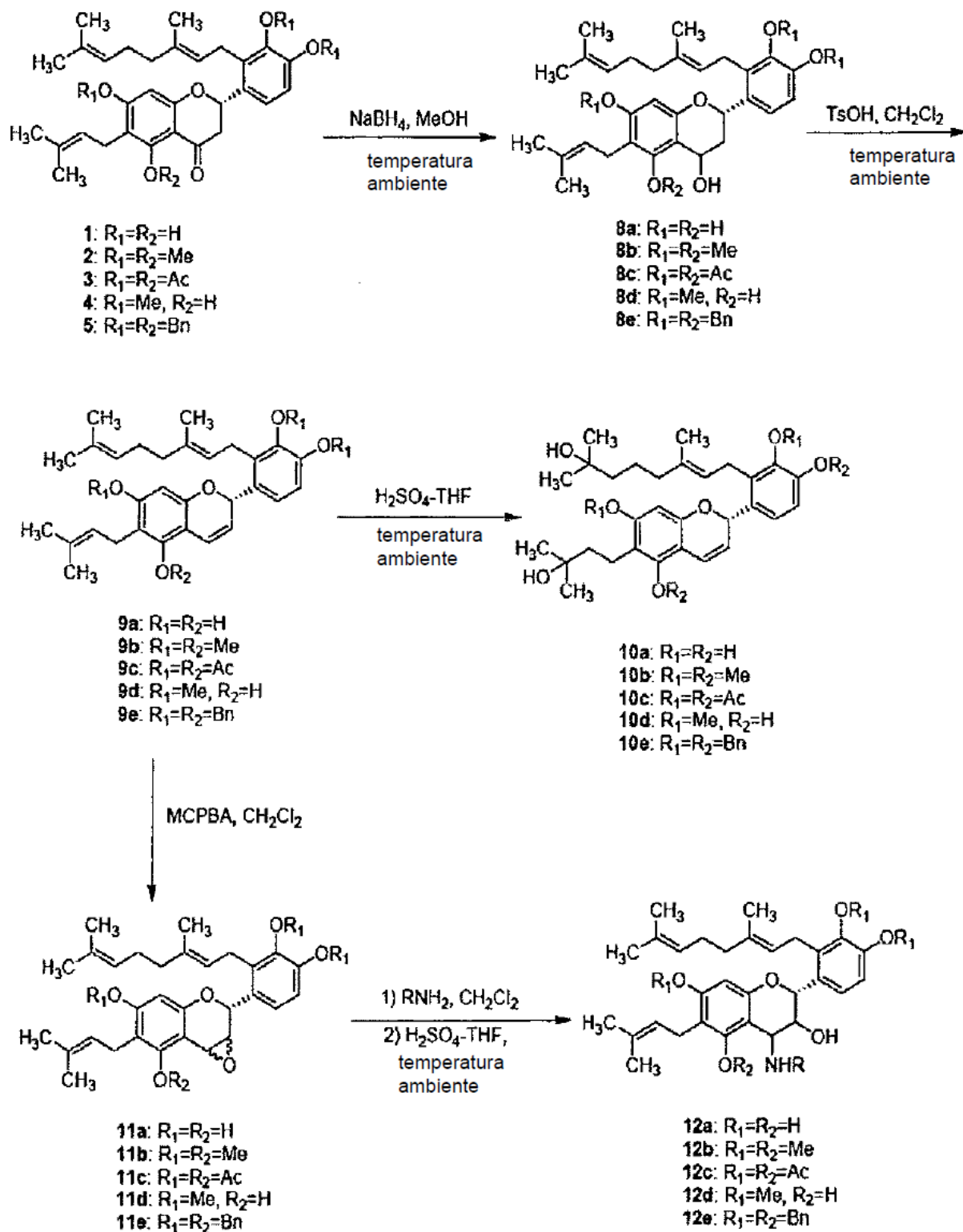
Esquema 1



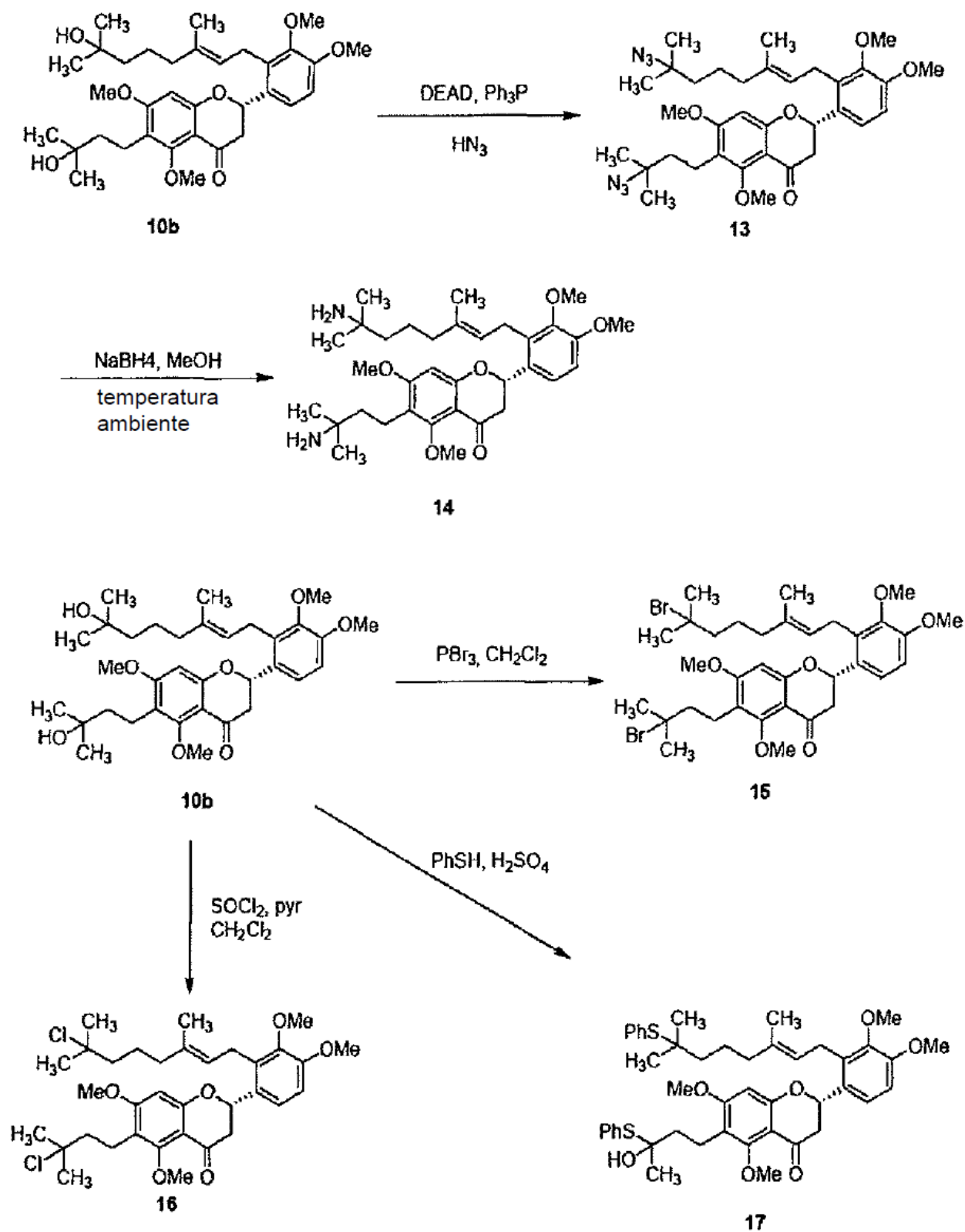
Esquema 2



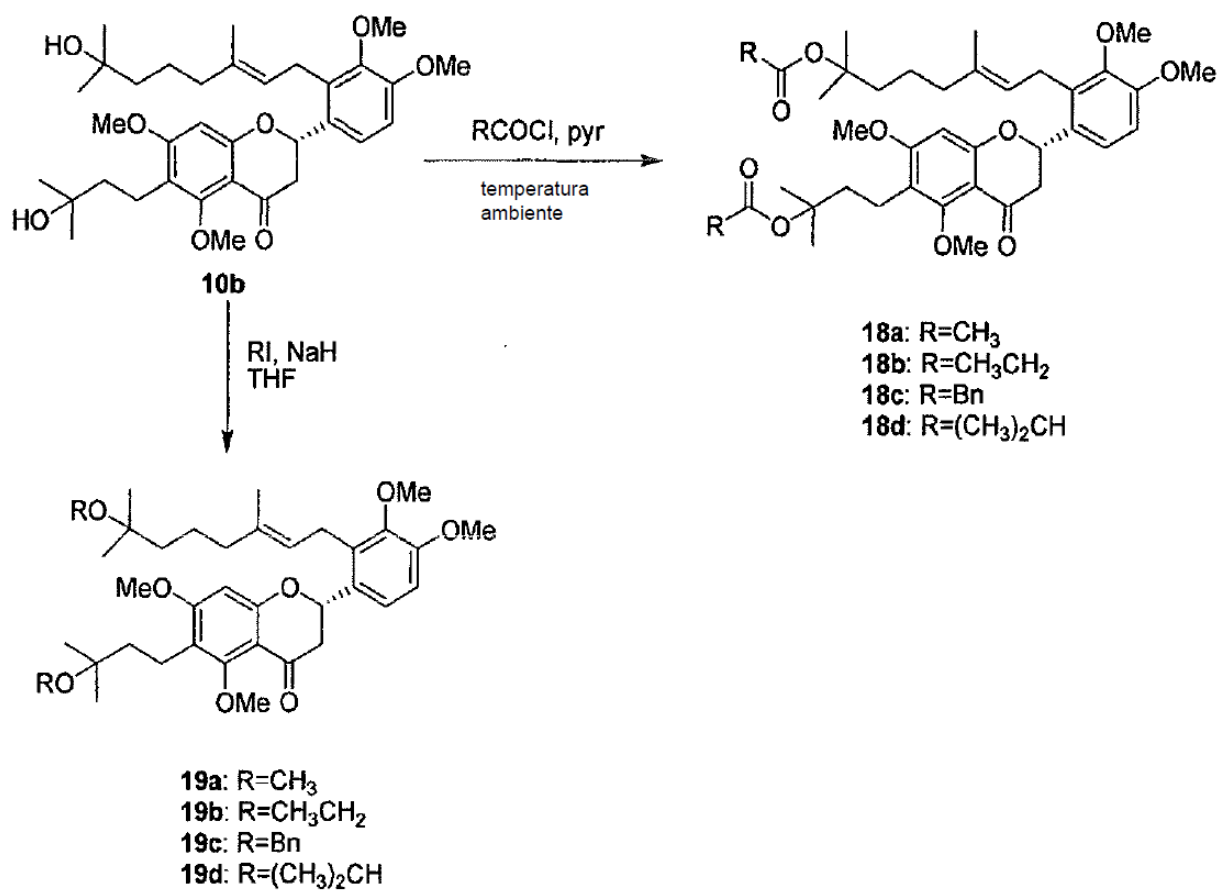
Esquema 3



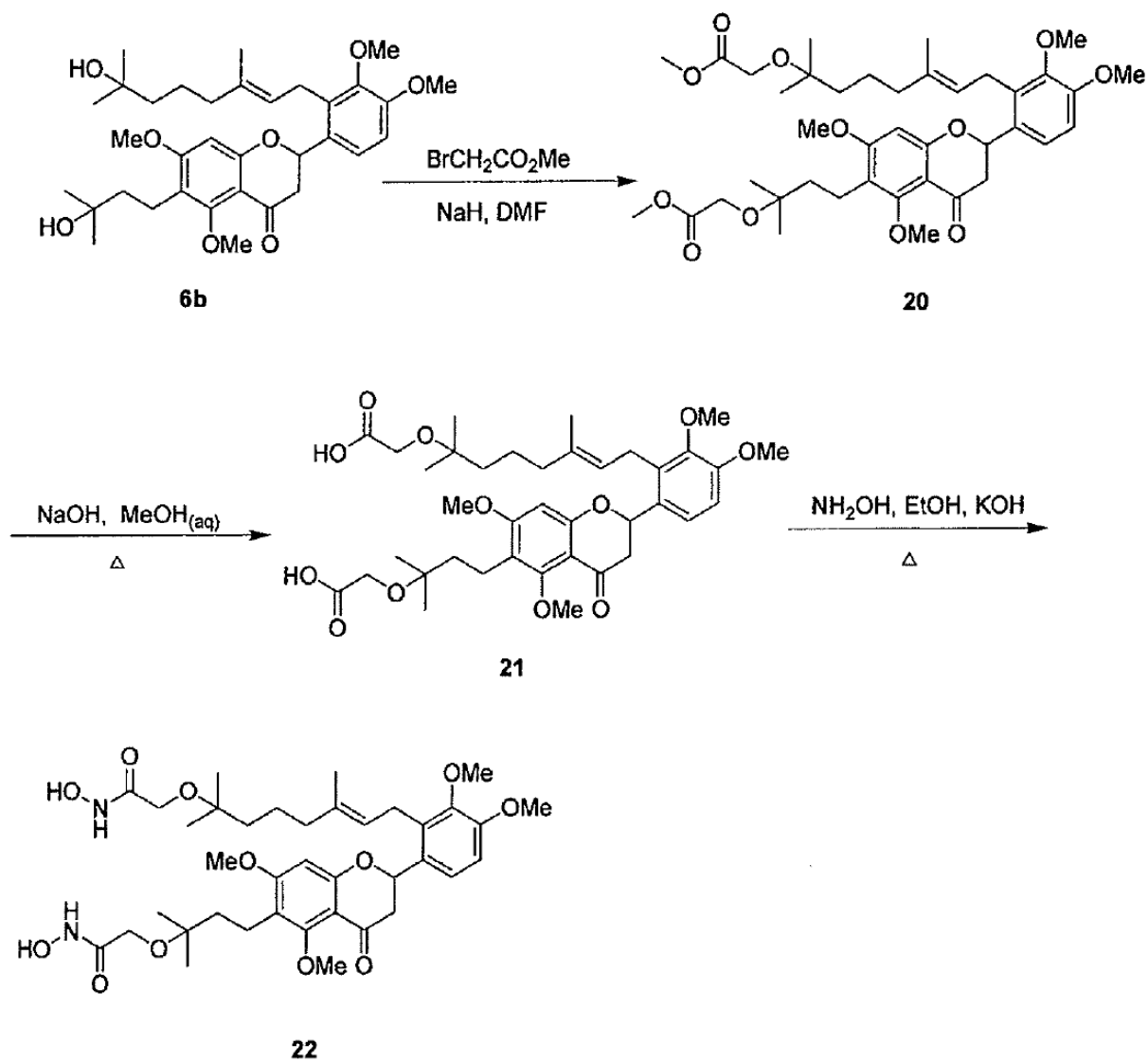
Esquema 4



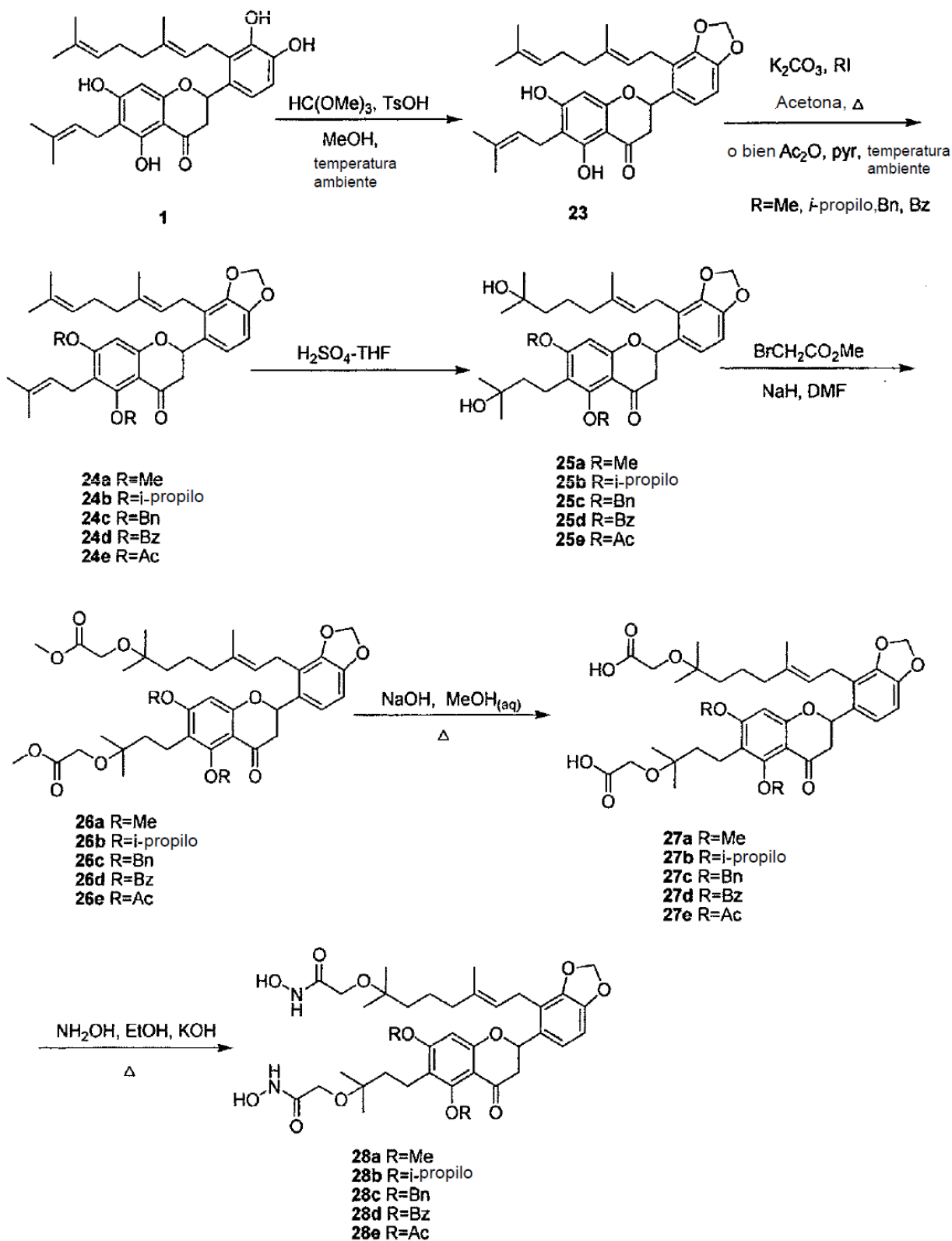
Esquema 5



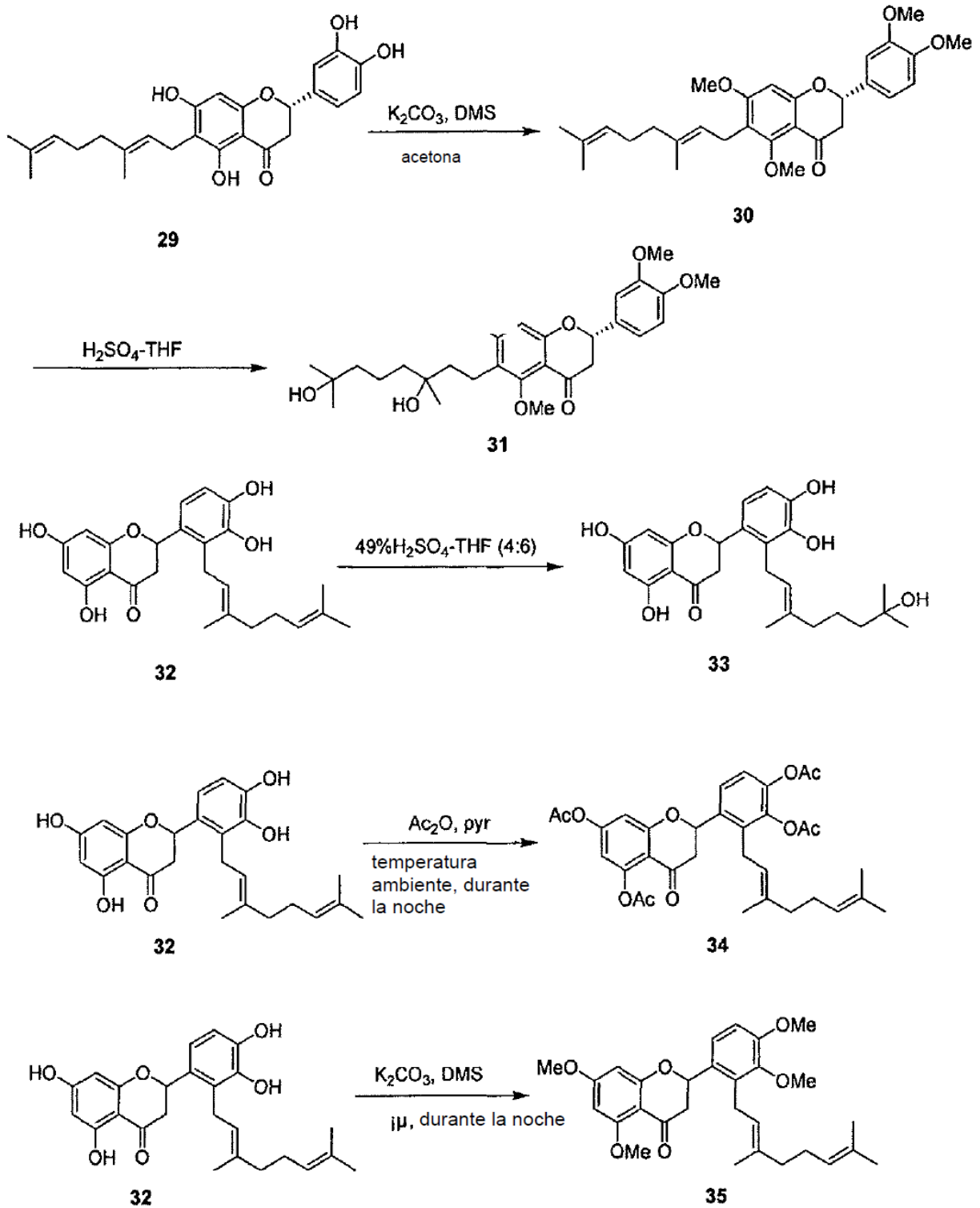
Esquema 6



Esquema 7



Esquema 8



5 La metilación de R₁, R₂, R₃ y R₄ de los compuestos de fórmula (I) se puede llevar a cabo por el siguiente procedimiento: mezclando el reactivo, K₂CO₃ y acetona con Me₂SO₄ (DMS), calentando y sometiendo a agitación la solución; sometiendo en reflujo la solución resultante en atmósfera controlada (por ejemplo, N₂) durante un cierto periodo; después de eliminar el disolvente orgánico, disolver el residuo en una cierta solución orgánica y lavarlo con

agua; secar la capa orgánica por evaporación a presión reducida y purificar el producto mediante columna de gel de sílice (EtOAc:n-hexano = 1:4).

La adición de OH a un doble enlace de R₅ o R₆ se puede realizar por el siguiente procedimiento: añadiendo la solución de reactivo en THF a H₂SO₄ en un baño de hielo; después de la adición con agitación de la solución, después de un periodo de tiempo, y diluyéndola a continuación con agua; sometiendo a extracción la mezcla con una solución orgánica adecuada; por ejemplo CH₂Cl₂; secando las capas orgánicas combinadas por evaporación a presión reducida para conseguir un residuo y purificando el residuo mediante columna de gel de sílice (0-3% Me-OH/CH₂Cl₂).

La preparación de los compuestos 6a-e y 7a-e se ha mostrado en los esquemas 1 y 2 que se ha descrito. El Propolin G, que es un derivado de propolin conocido en esta técnica, fue metilado, acetilado, metilado regio-selectivamente y bencilado con las correspondientes condiciones de reacción para proporcionar los compuestos 2-5 y seguido por hidratación ácida de los compuestos 1-5 proporcionó las dihidroflavonas objetivo 6a-e, respectivamente. La oxidación de diacetato yodosobenceno, seguido por hidratación ácida de los compuestos 1-5 facilitó las correspondientes flavonas 7a-e.

Se prepararon los compuestos 10a-e y 12a-e tal como se ha indicado en el esquema 3. La reducción mediante borohidruro sódico, seguida de deshidratación de los compuestos 1-5 facilitó los correspondientes compuestos 9a-e. La hidratación ácida de 9a-e proporcionó los compuestos objetivo 10a-e, respectivamente. La epoxidación MCPBA de los compuestos 9a-e proporcionó los epóxidos 11a-e, y la siguiente reacción nucleofílica con correspondientes aminas tales como metilamina, etilamina y enzilamina facilitó los compuestos objetivo 12a-e, respectivamente.

Los compuestos 14-17 fueron sintetizados tal como se ha descrito en el esquema 4. La reacción de Mitsunobu de 10b proporcionó la azida deseada 13 y la reacción siguiente de sodio convirtió la azida en la amina terciaria 14. La bromación con tribromuro de fósforo, tiolación con fenol tiol (PhSH) y la cloración con cloruro de tionilo del compuesto 10b proporcionó el bromuro 15, tiol éter 17 y el cloruro 16, respectivamente.

Los compuestos 18a-d y 19a-d fueron preparados tal como se ha descrito en el esquema 5. La acilación del compuesto 10b con los correspondientes cloruros de acilo, tales como acetilo, propanilo, benzoilo e isobutirilo proporcionó los compuestos 18a-d, respectivamente. La alquilación del compuesto 10b con los correspondientes yoduros de alquilo, tales como yoduro de metilo, etilo, bencilo e isopropilo facilitó los compuestos 19a-d, respectivamente.

El compuesto 22 fue sintetizado tal como se ha mostrado en el esquema 6. La reacción del alcohol terciario del compuesto 6b con bromoacetato de etilo en hidruro de sodio facilitó el compuesto 20. La hidrólisis básica del compuesto 20 facilitó el compuesto 21 y la reacción siguiente con hidroxilamina facilitó el ácido hidroxámico 22.

Los ácidos hidroxámicos 28a-e fueron preparados tal como se describe en el esquema 7. La reacción del compuesto 1 con trimetil ortoformato en condiciones ácidas facilitó la acetónida 23 y la siguiente alquilación con yoduros de alquilo, tales como yoduros de metilo, isopropilo y bencilo, o la acilación con cloruro de bencilo y ácido acético facilitó los compuestos 24a-e, respectivamente. La hidratación ácida de dos olefinas terminales de los compuestos 24a-e proporcionó compuestos 25a-e y la siguiente reacción con bromo acetato de etilo proporcionó los compuestos 26a-e. La hidrólisis básica de los compuestos 26a-e proporcionó los compuestos 27a-e y la siguiente reacción con hidroxilamina facilitó los ácidos hidroxámicos 28a-e, respectivamente.

Composición farmacéutica de la invención

Los compuestos de fórmula (I) y las sales farmacéuticamente aceptables, estereoisómeros, enantiómeros y solvatos de la misma pueden ser utilizados en sí mismos, pero generalmente serán administrados en forma de una composición farmacéutica en la que el compuesto/sal/solvato de fórmula (I) (ingrediente activo) está asociado con un coadyuvante farmacéuticamente aceptable, diluyente o portador. Dependiendo de la forma de administración, la composición farmacéutica comprenderá preferentemente de 10 a 30% en peso (porcentaje en peso), más preferentemente de 30 a 50% en peso y de modo todavía más preferentemente de 50 a 70% en peso, e incluso de forma más preferentemente de 70 a 100% en peso, del ingrediente activo, basándose todos los porcentajes en peso en la composición total. Además, la composición farmacéutica de la invención puede comprender adicionalmente otros agentes para la prevención o tratamiento de enfermedades asociadas con histona deacetilasa (HDAC).

Las composiciones farmacéuticas pueden ser administradas sistemáticamente, por ejemplo, por administración oral en forma de tabletas, cápsulas, jarabes, polvos o gránulos, o por administración parenteral en forma de soluciones o suspensiones o por administración subcutánea o por administración rectal en forma de supositorios o de forma transdérmica.

Los compuestos y composiciones farmacéuticas de la invención son un inhibidor de HDAC y se pueden retener de forma prolongada en las células induciendo de manera prolongada la acetilación de la histona H4. Son inhibidores de HDAC que inducen diferenciación de células y células madre neurales. Además, los compuestos de la invención

inhiben significativamente la actividad de HDAC. Los compuestos de la invención disminuyen significativamente tanto las fases S y G2/M de las células de forma dependiente de la dosis y cambian la morfología de las células de cáncer. Por lo tanto, los compuestos de la invención pueden tratar tumores o enfermedades de proliferación de las células. Además, los compuestos de la invención pueden aumentar el crecimiento de neuritas y tratar enfermedades neurodegenerativas y la atrofia muscular espinal humana (SMA).

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos muestran procedimientos preferentes para sintetizar y utilizar los compuestos.

Ejemplo 1 Preparación de 3',4',5,7-Tetrametil-propolin G (2)

A la mezcla de Propolin G (1,5 g, 10,16 mmol), K_2CO_3 (16,27 g, 117,89 mmol) y acetona (280 ml) se añadió Me_2SO_4 (15,76 ml, 126 mmol) y la solución resultante se calentó en reflujo bajo nitrógeno durante 24 h. Después de la eliminación del disolvente orgánico, el residuo se disolvió en CH_2Cl_2 (80 ml) y se lavó con H_2O (40 ml x 3). Las capas de CH_2Cl_2 se secaron sobre Na_2SO_4 y se evaporaron bajo presión reducida. El residuo obtenido se purificó mediante columna de gel de sílice (EtOAc: n-Hexano = 1:6) para proporcionar el compuesto 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); HREIMS Calculado para $C_{34}H_{44}O_6$ (M) 548,3142, Encontrado 548,3140.

Ejemplo 2 Preparación de 6-(2-hidroxi-2-metilbutil)-2'-(7-hidroxi-3,7-dimetil-oct-2-enil)-3',4',5,7-tetrametoxiflavanona (6b)

A una solución del compuesto 2 (7 g, 12,77 mmol) en THF (170 ml) se añadió H_2SO_4 al 49% (140 ml) en baño de hielo. Después de completar la adición, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 8 h y a continuación se diluyó con H_2O . La mezcla de reacción se extrajo con CH_2Cl_2 (100 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 y se evaporó bajo presión reducida para proporcionar un residuo, que se purificó mediante columna de gel de sílice (n-hexano:EtOAc=1:1~1:3) proporcionando el aceite 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 92H, 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); HREIMS Calculado para $C_{34}H_{46}O_8$ (M) 584,3338, Encontrado 584,3344.

Ejemplo 3 Preparación de 6-Geraniil-3',4',5,7-tetrametoxiflavanona (30)

A la mezcla 29 (Propolin C, 128 mg, 0,31 mmol), K_2CO_3 (431 mg, 3,1 mmol) y acetona (15 ml) se añadió Me_2SO_4 (0,25 ml, 2,48 mmol) y la solución resultante se calentó en reflujo bajo nitrógeno durante 24 h. Después de la eliminación del disolvente orgánico, el residuo se disolvió en CH_2Cl_2 (50 ml) y se lavó con H_2O (50 ml x 3). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó bajo presión reducida. El residuo obtenido se purificó mediante columna de gel de sílice (EtOAc: n-hexano=1:4) para proporcionar el compuesto 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, $CDCl_3$) δ 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); HREIMS Calculado para $C_{29}H_{36}O_6$ (M) 480,2510, Encontrado 480,2511.

Ejemplo 4 Preparación de 6-(2,6-dihidroxi-2,6-dimetil-octil)-3',4',5,7-tetrametoxiflavanona (31)

A una solución del compuesto 30 (80 mg, 0,17 mmol) en THF (6 ml) se añadió H_2SO_4 al 49% (4 ml) en un baño de hielo. Después de completar la adición, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 8 h y a continuación se diluyó con H_2O . La mezcla de reacción se extrajo con CH_2Cl_2 (50 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 y se evaporaron bajo presión reducida para proporcionar un residuo, que se purificó mediante columna de gel de sílice (0-3% MeOH/ CH_2Cl_2) proporcionando el aceite puro 31 (44 mg, 50%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 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, 16Hz), 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); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) 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); HREIMS Calculado para (M-18) 498,2602, Encontrado 498,2610.

Ejemplo 5 Preparación de Propolin A (33)

A una solución de Propolin D (compuesto 32, 100 mg, 0,24 mmol) en THF (6 ml) se añadió H₂SO₄ al 49% (4 ml) en un baño de hielo. Después de completar la adición, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 8 h y a continuación se diluyó con H₂O. La mezcla de reacción se extrajo con CH₂Cl₂ (50 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporaron bajo presión reducida para proporcionar un residuo, que se purificó mediante columna de gel de sílice (0-3% MeOH/CH₂Cl₂) proporcionando el aceite 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) δ 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).

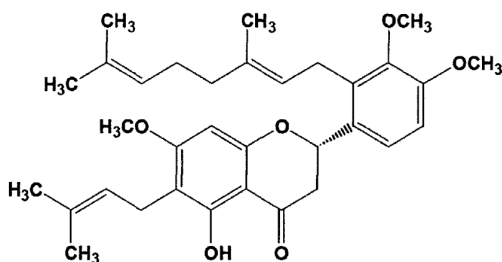
Ejemplo 6 3',4',5,7-tetraacetil Propolin D (34)

A una solución de Propolin D (compuesto 32, 124 mg, 0,29 mmol) en piridina (4 ml) se añadió anhídrido acético (2 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 h. Se añadió EtOAc (25 ml) a la mezcla de reacción y la mezcla se lavó con 0,1 N HCl (10 ml x 3). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó bajo presión reducida para proporcionar un residuo. El residuo se purificó mediante columna de gel de sílice (CH₂Cl₂) proporcionando el aceite puro 34 (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) δ 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).

Ejemplo 7 3',4',5,7-tetrametil Propolin D (35)

A la mezcla 32 (128 mg, 0,31 mmol), K₂CO₃ (431 mg, 3,1 mmol) y acetona (15 ml) se añadió Me₂SO₄ (0,25 ml, 2,48 mmol) y la solución resultante se calentó en reflujo bajo nitrógeno durante 24 h. Después de la eliminación del disolvente orgánico, el residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (50 ml) y se lavó con H₂O (50 ml x 3). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó bajo presión reducida. El residuo obtenido se purificó mediante columna de gel de sílice (EtOAc: n-Hexano=1:4) para proporcionar el compuesto 35 (107 mg, 72%). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 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).

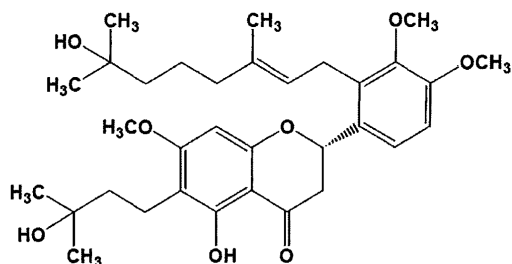
Ejemplo 8 3',4',7-O-trimetilpropolin G (4)



A la mezcla de Propolin G (2,30 g, 2,75 mmol), K₂CO₃ (1,94 g, 13,99 mmol) y acetona (80 ml) se añadió Me₂SO₄ (2,17 ml, 17,35 mmol) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 h, y a continuación se calentó en reflujo bajo nitrógeno durante 6 h. Después de la eliminación del disolvente orgánico, el residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (40 ml) y se lavó con H₂O (40 ml x 3). Las capas de CH₂Cl₂ se secaron sobre Na₂SO₄ y se

evaporaron bajo presión reducida. El residuo obtenido se purificó mediante columna de gel de sílice (EtOAc:n-hexano=1:8) proporcionando 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)

Ejemplo 9 6-(2-hidroxi-2-metilbutil)-2'-(7-hidroxi-3,7-dimetiloct-2-enil)-5-hidroxi-3',4',7-trimetoxiflavanona (6d)

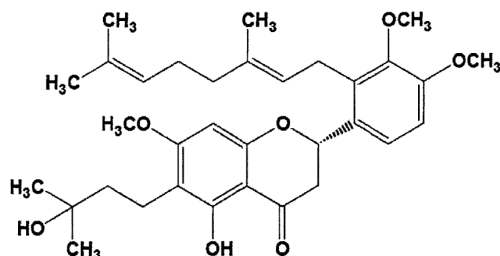


(NBM-HD-3)

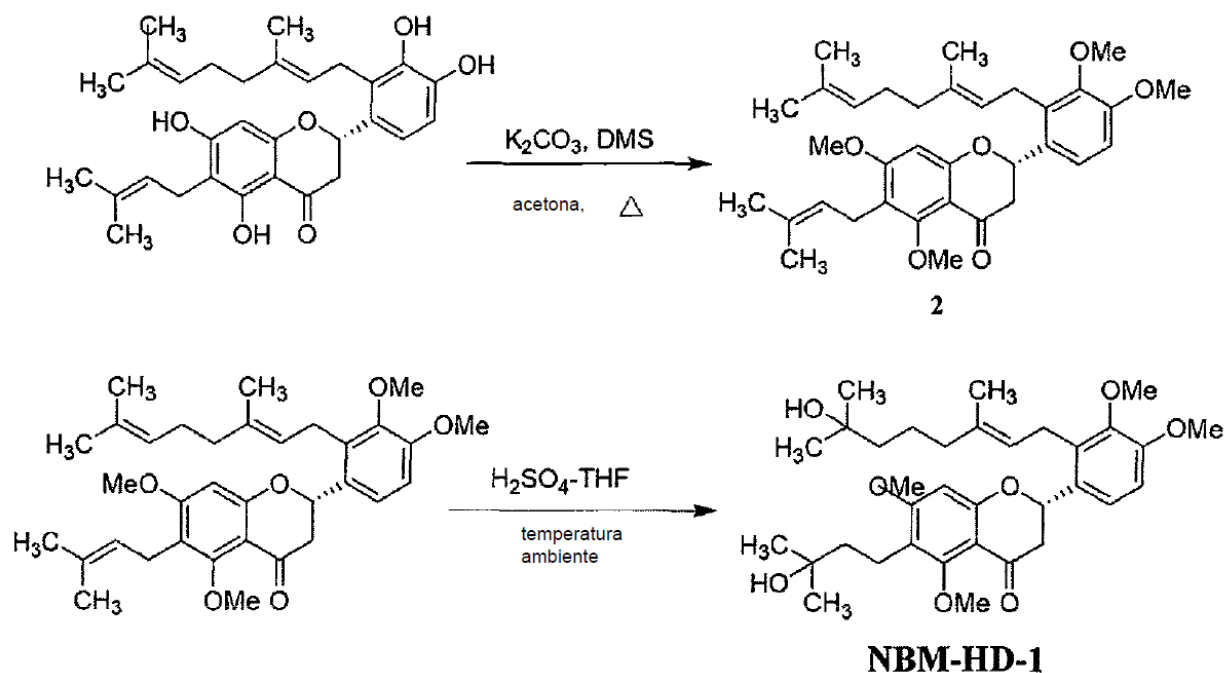
A una solución del compuesto 4 (530 mg, 0,99 mmol) en THF (15 ml) se añadió H_2SO_4 al 49% (10 ml) en baño de hielo. Después de completar la adición, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 8 h y a continuación se diluyó con H_2O . La mezcla de reacción se extrajo con CH_2Cl_2 (30 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 y se evaporaron bajo presión reducida para proporcionar un residuo, que se purificó mediante columna de gel de sílice (n-hexano:EtOAc=1: 1) proporcionando el aceite puro 6d (191 mg, 34%). $^1\text{H-NMR}$ (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, $J=G, 1, 15,2$ 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).

Ejemplo 10 Otros compuestos

Los dos compuestos siguientes se prepararon según los procedimientos antes mencionados.



(NBM-HD-2)

Ejemplo 11 Inhibición de células de crecimiento de cáncer mediante el compuesto de la invención (NBM-HD-1)

5 La línea de células de cáncer, células de glioma C6 de rata, fue cultivada en medio de Dulbecco modificado mediante Eagle (DMEM; Gibco) suplementado con penicilina G, sulfato de estreptomicina, 0,5 mM de L-glutamina y 10% de suero fetal bovino (FBS; Gibco) a 37°C, CO₂ al 5% y 95% de humedad relativa. Para todos los experimentos, las células fueron sembradas a una densidad de 3×10^5 por pocillo en placas de 6 pocillos. Después de 24 horas, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones del compuesto NBM-HD-1 (es decir, el compuesto de fórmula (III) que se ha representado). Después de 48 horas, las células fueron observadas y contadas. De acuerdo con los resultados mostrados en la figura 1, NBM-HD-1 puede detener el crecimiento de las células de glioma C6 de rata. Después de que las células de glioma C6 fueron incubadas con 2,5 µg/ml (ver figura 1(A)-b), 5 µg/ml (ver figura 1(A)-c) y 10 µg/ml (ver figura 1(A)-d) de NBM-HD-1 durante 48 horas, la densidad de las células se redujo notablemente en comparación con la del control (ver figura 1(A)-a). Los resultados obtenidos por el recuento de células mostró la misma tendencia (ver figura 1(B)). Los resultados antes indicados muestran que NBM-HD-1 puede inhibir el crecimiento de las células de glioma C6 de manera dependiente de la dosis.

Se trataron 1×10^6 células de glioma de rata con varias concentraciones de NBM-HD-1 (0 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, y 10 µg/ml) durante 72 horas. Las células tratadas fueron tripsinizadas y recogidas. Las células fueron resuspendidas en 200 µL de PBS y a continuación fueron fijadas por la adición de 800 µL de etanol frío al 100%. Las células resultantes fueron fijadas durante una noche a -20°C. Las pastillas de células fueron recogidas por centrifugación, resuspendidas en 1 ml e tampón hipotónico (0,5% Triton X-100 en PBS y 1 µg/ml RNasa A), e incubadas a 37°C durante 30 minutos. A continuación se añadió a las pastillas de células resultantes 1 ml de solución PI (50 µg/ml). La mezcla se dejó reposar a 4°C durante 30 min. Las cantidades de ADN de las células se analizaron mediante citometría FACSscan (Becton Dickinson) (ver figura 2). Los resultados de la figura 2 mostraron que NBM-HD-1 puede inhibir significativamente el crecimiento de células de glioma C6 modulando la detención del ciclo celular en la fase G₀/G₁ en una forma dependiente de la dosis.

Ejemplo 12. Inhibición del crecimiento celular e inducción de diferenciación de células de cáncer por el compuesto de la invención (NBM-HD-1)

Para las células de glioma C6 de rata, el ciclo celular relativo a la expresión de mRNA se examinó por RT-PCR. Los ARN totales fueron aislados de las células de C6 tratadas utilizando el mini-kit RNeasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cADN fueron producidos a partir de 500 ng de los ARN totales utilizando ReverTra-Plus-TM (TOYOBO). El producto RT (1 µl) fue amplificado por PCR con cebadores para analizar varios genes de ciclo celular utilizando GAPDH como control interno. Los resultados han sido mostrados en la figura 3. De acuerdo con los resultados de la figura 3, el NBM-HD-1 puede modular la expresión de algunos reguladores de ciclo celular. Los resultados han demostrado que NBM-HD-1 puede disminuir la expresión de ciclinD1 y ciclinB1 de forma dependiente de la dosis. Por el contrario, la expresión de p21 se incrementó.

Después de haber incubado células de glioma C6 con 10 µg/ml NBM-HD-1 durante 24 horas, se fijaron y se analizaron por el procedimiento tradicional de tinción inmuno-fluorescente. La tinción del glia fue llevada a cabo

utilizando anticuerpo GFAP específico glial (SIGMA) como anticuerpo primario y una inmunoglobulina de conejo etiquetada con fluorescencia (SIGMA) como anticuerpo secundario para unir con el anticuerpo primario. Las células que son GFAP-positivas fueron excitadas por una fuente de luz específica para emitir fluorescencia. Asimismo, los núcleos fueron sometidos a tinción con DAPI. Los resultados de la tinción se muestran en la figura 4(A). De acuerdo con la figura 4(A), NBM-HD-1 puede inducir la expresión GFAP de células de cáncer de glioma C6. En contraste con el grupo de control, se detectaron más proteínas GFAP en las fotos de las células tratadas con 10 µg/ml de NBM-HD-1. La fila intermedia mostró las fotos de las células con tinción DAPI en la figura 4(A).

La expresión GFAP de mRNA fue examinada por RT-PCR. Los resultados de la figura 4(B) muestran que la expresión de GFAP se incrementó de manera dependiente de la dosis. Estos resultados indican que NBM-HD-1 puede inducir la diferenciación celular de las células de cáncer de glioma C6 de acuerdo con el incremento de la expresión de GFAP.

Ejemplo 13. Aumento de la acumulación de histona hiperacetilada en las células de cáncer tratadas con el compuesto de la invención (NBM-HD-1)

Se realizó la acumulación de la histona hiperacetilada H4 en los lisados de células utilizando transferencia Western y el anticuerpo dirigido contra la histona acetilada H4 (Upstate). Las células de glioma C6 fueron sembradas con una densidad de 1×10^6 por 10 cm de platillo de cultivo. Después de 24 horas, las células fueron tratadas con 10 µg/ml de NBM-HD-1 o 4 mM de butirato sódico durante varias horas. Los lisados de células completas fueron preparados utilizando muestra SDS desnaturalizante, y a continuación, fueron separadas en 15% de geles de SDS-poliacrilamida. Tal como se ha mostrado en la figura 5, tanto el butirato sódico como el NBM-HD-1 pueden aumentar la acumulación de histona hiperacetilada H4. La cantidad de histonas acetiladas fue difícilmente detectable en células de glioma C6 no tratadas. La cantidad de histona acetilada H4 de las células tratadas con 4 mM de butirato sódico durante 2 horas incrementó. A continuación, se retiró el butirato sódico del medio de cultivo. Después de 6 horas, la cantidad de histona acetilada H4 disminuyó. La acumulación de histona acetilada H4 aumentó en las células tratadas con NBM-HD-1 durante 2 horas. Después de retirar el NBM-HD-1, la cantidad de histona acetilada H4 aumentó a lo largo del tiempo. La mayor acetilación de histona apareció a las 6 horas después de que el compuesto había sido retirado. Estos resultados indican que, de manera similar al butirato sódico, el NBM-HD-1 es un inhibidor de HDAC. Dado que NBM-HD-1 es más hidrofóbico que el butirato sódico, el NBM-HD-1 puede ser retenido en las células durante más tiempo que el butirato sódico, induciendo de manera continuada la acetilación de histona H4.

Ejemplo 14. Inhibición de la actividad de HDAC por el compuesto de la invención (NBM-HD-1)

Las células de glioma C6 fueron tratadas con diferentes dosis de NBM-HD-1 y butirato sódico (SB). Después de 24 horas, las células fueron recogidas para extraer las proteínas nucleares mediante el kit de extracción de proteínas NucBuster™ (Novagen) tal como se describe por las instrucciones del fabricante. Estos extractos fueron utilizados en el kit de ensayo de actividad HDAC (Calbiochem) para analizar sus actividades de inhibición de HDAC (histona deacetilasa). El sustrato fluorométrico de HDAC, que comprende una cadena secundaria de lisina acetilada, fue incubado con proteína nuclear extraída en primer lugar. La desacetilación del sustrato sensibilizó el sustrato, de manera que en la segunda etapa, el tratamiento con el Desarrollador de Lisina produjo un fluoróforo. El fluoróforo puede ser fácilmente analizando utilizando un lector de placa de fluorescencia. Tal como se ha mostrado en la figura 6, el NBM-HD-1 puede inhibir la actividad de HDAC en células de glioma C6. La inhibición de HDAC ha sido implicada en la inducción de diferenciación de células de cáncer. En este experimento, un compuesto bien conocido para la inhibición de HDAC, butirato sódico, fue utilizado como control positivo. La unidad de fluorescencia inferior mostró una actividad de inhibición de HDAC más elevada en el grupo experimental. Los resultados indicaron que NBM-HD-1 inhibe de manera significativa la actividad de HDAC.

Ejemplo 15. Inhibición de actividad de HDAC y cambio de la morfología de células de cáncer por el compuesto de la invención (NBM-HD-1)

Las células de cáncer DBTRG-05MG de glioblastoma humano fueron cultivadas en un medio en RPMI 1640 (Gibco) suplementado con penicilina G, sulfato de estreptomycin, 0,5 mM de L-glutamina y 10% de suero fetal bovino (FBS; Gibco), 100mh/L de piruvato sódico (Gibco) y 1% de NEAA (Gibco) a 37 °C, CO₂ al 5% y 95% de humedad relativa. Para estos experimentos, las células fueron sembradas con una densidad de 3×10^5 por pocillo de placas de 6 pocillos. Después de 24 horas, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de NBM-HD-1 y 4 mM de butirato sódico. Las células fueron observadas y contadas después de 72 horas. Tal como se ha mostrado en la figura 7, el NBM-HD-1 inhibió de manera significativa el crecimiento de células de cáncer 05MG y cambió la morfología de las células. En células 05MG (figura 7(A)), después de incubación con 2,5 µg/ml (figura 7(A)-b), 5 µg/ml (figura 7(A)-c) y 10 µg/ml (figura 7(A)-d) de NBM-HD-1 durante 72 horas, la densidad de las células se redujo notablemente en comparación con la del grupo de control (figura 7(A)-a). Las células 05MG del grupo experimental cambiaron también, pasando a ser más largas que las del grupo de control. Los resultados del recuento de células (figura 7(B)) indicaron que el butirato sódico podría inhibir la proliferación de células de cáncer 05MG, e igualmente podría hacerlo el NBM-HD-1. Estos resultados indican que el NBM-HD-1 puede inhibir el crecimiento de células 05MG de manera dependiente de la dosis, y puede cambiar la morfología de las células de cáncer 05MG.

Las células de cáncer de mama MCF-7, fueron cultivadas en medio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM; Gibco) suplementadas con penicilina G, sulfato de estreptomycin, 0,5 mM de L-glutamina y 10% de suero fetal bovino (FBS; Gibco) a 37°C, CO₂ al 5% y 95% de humedad relativa. Las células fueron sembradas a una densidad de 3 x 10⁵ por pocillo en placas de 6 pocillos. Después de 24 horas, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de compuesto NBM-HD-1 y 4 mM de butirato sódico utilizado como control positivo. Las células fueron observadas después de 48 horas y contadas después de 96 horas. Tal como se ha mostrado en la figura 8, el NBM-HD-1 inhibe significativamente el crecimiento de células de cáncer MCF-7 y cambia la morfología de las células. En la figura 8(A), después de que las células fueron incubadas con 2,5 µg/ml (figura 8(A)-b), 5 µg/ml (figura 8(A)-c) y 10 µg/ml (figura 8(A)-d) de NBM-HD-1 durante 48 horas, la densidad de las células MCF-7 se redujo notablemente en comparación con la del grupo del control (figura 8(A)-a). La morfología de las células MCF-7 en el grupo experimental cambió en comparación con la del grupo de control. La figura 8(B) mostró que 4 mM de butirato sódico era capaz de inhibir el crecimiento de células MCF-7. Los resultados del recuento de células (figura 8(B)) indican que, de manera similar al butirato sódico, el NBM-HD-1 inhibe el crecimiento de las células. Estos resultados indican que el NBM-HD-1 puede inhibir el crecimiento de células de cáncer MCF-7 de manera dependiente de la dosis y puede cambiar su morfología.

Las células de cáncer MCF-7 (1x10⁶) en un platillo de 100 mm fueron tratadas con varias concentraciones de NBM-HD-1 (0, 2,5, 5, y 10 µg/ml) o 4 mM de butirato sódico durante 72 horas. Las muestras fueron preparadas siguiendo las etapas mencionadas en [0063]. El ADN de las células fue analizado a continuación mediante citometría FACScan (Becton Dickinson). Tal como se ha mostrado en la figura 9, el NBM-HD-1 inhibió de manera notable el crecimiento de células MCF-7 por la modulación del ciclo de las células, detenido en la fase G₀/G₁ de forma dependiente de la dosis. El porcentaje de fase G₀/G₁ aumentó de 74,46 a 92,55 de forma dependiente de la dosis. Se descubrió que el NBM-HD-1 disminuía significativamente tanto la fase S como las fases G₂/M de las células de manera dependiente de la dosis.

El ciclo celular relativo a la expresión de p21 mRNA fue examinado mediante RT-PCR. Los ARN totales fueron aislados de las células MCF-7 tratadas y utilizados en la reacción RT. Se utilizó cADN (1 µl) como plantilla para amplificar el gen p21 por PCR. Se utilizó GAPDH como control interno. Tal como se ha mostrado en la figura 10, el NBM-HD-1 puede aumentar la expresión de p21 mRNA en las células de cáncer MCF-7. En el experimento, las células MCF-7 fueron tratadas con diferentes dosis de NBM-HD-1 durante 24 horas. Los resultados indicaron que el NBM-HD-1 indujo la expresión de p21 de forma dependiente de la dosis.

La acumulación de histona hiperacetilada H4 fue analizada en los lisados celulares utilizando transferencia Western y un anticuerpo que se une a la histona acetilada H4 (Upstate). Las células de cáncer MCF-7 fueron sembradas a una densidad de 1x10⁶ por platillo de cultivo. Después de 24 horas, las células fueron tratadas con 10 µg/ml de NBM-HD-1 o 4 mM de butirato sódico durante varias horas. La inhibición de HDAC por el NBM-HD-1 se comprobó analizando el grado de acetilación de histona con un anticuerpo específico para histona hiperacetilada H4. El butirato sódico fue utilizado como control positivo. Tal como se ha mostrado en la figura 11, los resultados con células MCF-7 fueron similares a los de las células de glioma C6.

Ejemplo 16. Incremento del crecimiento de neuritis por el compuesto de la invención (NBM-HD-1)

El medio de crecimiento para las NSC (células madre neurales) y neuronas corticales, fue preparado añadiendo penicilina G, estreptomycin y 0,5 mM de L-glutamina en medio neurobasal suplementado B-27 (Gibco). El feto no nacido fue retirado del saco fetal en la cavidad abdominal de una rata Wistar preñada de 17 días bajo anestesia. El tejido cerebral fue retirado del feto y tratado con solución de tripsina al 0,1% a 25°C durante tres minutos. Después de lavar 3 veces con solución PBS, las células fueron disociadas por mezcla creciente y decreciente. La solución resultante fue pasada por un filtro de células de nilón de 70µm (Falcon) para obtener el filtrado que contenía las células cerebrales. El filtrado fue centrifugado a 1000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante fue aspirado. La pastilla resultante fue resuspendida en el medio de crecimiento preparado tal como se ha indicado anteriormente. La suspensión resultante contenía las NSC.

Las células obtenidas de la suspensión fueron cultivadas en placas de 6 pocillos con recubrimiento de 30 µg/ml de poli-D-lisina (Sigma) a una densidad de 75 células/mm². Las células fueron cultivadas a 37°C, CO₂ al 5% y 95% de humedad relativa. El medio de crecimiento contenía 0,63 µg/ml de NBM-HD-1 y el medio de crecimiento con 1 µl de DMSO fue utilizado como control. Las células diferenciales después de cultivo fueron llamadas categóricamente neuronas corticales.

Después de cultivo durante 6 días, se observaron células vivas mediante microscopio. Las longitudes de las neuritas de los neurones en 6 campos diferenciados se midieron y promediaron. Tal como se ha mostrado en la figura 12, el NBM-HD-1 podría promover el crecimiento de las neuritas. En la figura 12, la longitud de las neuritas del grupo experimental (figura 12(A)-b) es más larga que la del grupo de control (figura 12(A)-a). Después de medir las longitudes de las neuritas, el resultado indicó que la longitud promedio de las neuritas del grupo experimental era mayor que la del grupo de control (figura 12(B)).

Ejemplo 17 Inhibición de crecimiento de células de cáncer por el compuesto de la invención (NBM-HD-2)

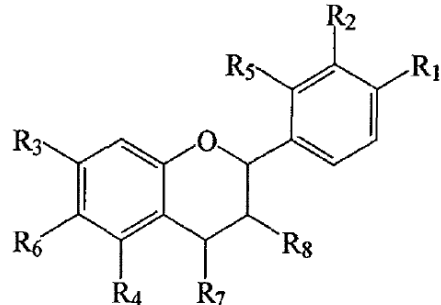
Se sembraron células de cáncer MCF-7 con una densidad de 3×10^5 por pocillo en platillos de 6 pocillos. Después de 24 horas, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones del compuesto. NBM-HD-2 y 4 mM de butirato sódico utilizado como control positivo. Las células fueron observadas y contadas después de 72 horas. Tal como se ha mostrado en la figura 13, el NBM-HD-2 inhibe significativamente el crecimiento de células de cáncer MCF-7 y cambia la morfología de las células. En la figura 13(A), después de que las células fueron incubadas con 2,5 µg/ml (figura 13(A)-c), 5 µg/ml (figura 13(A)-d), 7,5 µg/ml (figura 13(A)-e) y 10 µg/ml (figura 13(A)-f) de NBM-HD-2 durante 72 horas, la densidad de las células MCF-7 se redujo notablemente en comparación con el grupo de control (figura 13(A)-a). La morfología de las células MCF-7 del grupo experimental cambió en comparación con las del grupo de control. La figura 13(A) mostró que 4 mM de butirato sódico era capaz de inhibir el crecimiento de las células MCF-7. Los resultados del recuento de células (figura 13(B)) indicó que, de manera similar al butirato sódico, el NBM-HD-2 inhibió el crecimiento de las células. Estos resultados indican que el NBM-HD-2 puede inhibir el crecimiento de las células de cáncer MCF-7 de manera dependiente de la dosis y puede cambiar su morfología.

Ejemplo 18 Inhibición del crecimiento de células de cáncer por los compuestos de la invención (NBM-HD-3)

Se sembraron células de cáncer MCF-7 a una densidad de 3×10^5 por pocillo en placas de 6 pocillos. Después de 24 horas, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de compuesto NBM-HD-3 y 4 mM de butirato sódico, que era utilizado como control positivo. Las células fueron observadas y contadas después de 72 horas. Tal como se ha mostrado en la figura 14, el NBM-HD-3 inhibe significativamente el crecimiento de células de cáncer MCF-7 y cambia la morfología de las células. En la figura 14(A), después de que las células fueron incubadas con 2,5 µg/ml (figura 14(A)-c), 5 µg/ml (figura 14(A)-d), 7,5 µg/ml (figura 14(A)-e) y 10 µg/ml (figura 14(A)-f) de NBM-HD-3 durante 72 horas, la densidad de las células MCF-7 se redujo notablemente en comparación con el grupo de control (figura 14(A)-a). La morfología de las células MCF-7 del grupo experimental cambió en comparación con las del grupo de control. La figura 14(A) mostró que 4 mM de butirato sódico podía inhibir el crecimiento de células MCF-7. Los resultados del recuento de células (figura 14(B)) indican que, de manera similar al butirato sódico, el NBM-HD-3 inhibe el crecimiento de las células. Estos resultados indican que el NBM-HD-3 puede inhibir el crecimiento de las células de cáncer MCF-7 de forma dependiente de la dosis y puede cambiar su morfología.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto representado por la siguiente fórmula (I):



5

en la que

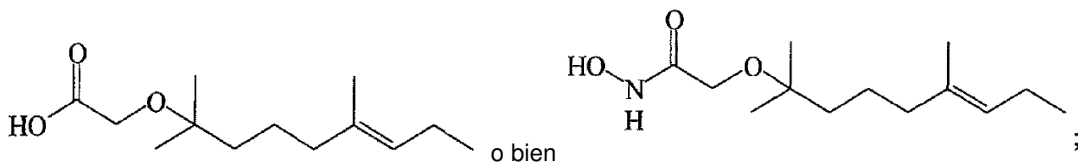
10 R₁ y R₂ son cada uno de ellos independientemente: O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo, O-alqueniilo, S-alqueniilo, NH-alqueniilo, O-alquinilo, S-alquinilo, NH-alquinilo, O-C₃₋₈cicloalquilo, S-C₃₋₈cicloalquilo, NH-C₃₋₈cicloalquilo, anillos O- no saturados de 5 a 10 miembros monocíclicos o bicíclicos, anillos O-bencilo, anillos S- no saturados de 5 a 10 miembros monocíclicos o bicíclicos, anillos NH- no saturados de 5 a 10 miembros monocíclicos o bicíclicos, alquilo, alquilenilo, alquinilo, C₃₋₈cicloalquilo, un anillo no saturado de 5 a 10 miembros monocíclico o bicíclico o un anillo no saturado de 5 a 10 miembros heterocíclico que comprende, como mínimo, un heteroátomo de anillo seleccionado del grupo que consiste en: N, O y S; o bien

15 R₁ y R₂ pueden formar conjuntamente dioxolano;

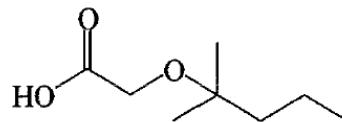
20 R₃ es O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo, O-alqueniilo, S-alqueniilo, NH-alqueniilo, O-alquinilo, S-alquinilo, NH-alquinilo, O-C₃₋₈cicloalquilo, S-C₃₋₈cicloalquilo, NH-C₃₋₈cicloalquilo, anillo O- no saturado de 5 a 10 miembros monocíclico o bicíclico, O-bencilo, anillo S- no saturado de 5 a 10 miembros monocíclico o bicíclico, anillo NH- no saturado de 5 a 10 miembros monocíclico o bicíclico, alquilo, alquilenilo, alquinilo, C₃₋₈cicloalquilo, un anillo no saturado de 5 a 10 miembros monocíclico o bicíclico o un anillo saturado o no saturado de 5 a 10 miembros heterocíclico que comprende, como mínimo, un heteroátomo de anillo seleccionado del grupo que consiste en: N, O y S;

25 R₄ es OH, OC(=O)alquilo, O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo, O-alqueniilo, S-alqueniilo, NH-alqueniilo, O-alquinilo, S-alquinilo, NH-alquinilo, O-C₃₋₈cicloalquilo, S-C₃₋₈cicloalquilo, NH-C₃₋₈cicloalquilo, anillo O- no saturado de 5 a 10 miembros monocíclico o bicíclico, O-bencilo, anillo S- no saturado de 5 a 10 miembros monocíclico o bicíclico, anillo NH- no saturado de 5 a 10 miembros monocíclico o bicíclico, alquilo, alquilenilo, alquinilo, C₃₋₈cicloalquilo, un anillo no saturado de 5 a 10 miembros monocíclico o bicíclico o un anillo saturado o no saturado de 5 a 10 miembros heterocíclico que comprende, como mínimo, un heteroátomo de anillo seleccionado del grupo que consiste en: N, O y S;

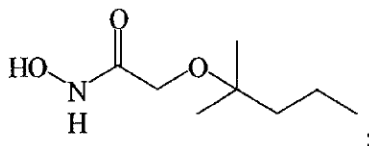
30 R₅ es C₄₋₁₆ alquilo o C₄₋₁₆alqueniilo no sustituido o sustituido con uno o varios C₁₋₆alquilo, OH, halógeno, CN, NO, N₃, NH₂, CHO, OR₉, SR₉, NR₉, COOR₉,



35 R₆ es C₂₋₁₂alquilo o C₂₋₁₂alqueniilo no sustituido o sustituido con uno o varios C₁₋₆alquilo, OH, halógeno, CN, NO, N₃, NH₂, CHO, OR₉, SR₉, NR₉,



40 o bien



R₇ es hidrógeno, halógeno, OH, NH₂, COOH, CHO, CN, NO, o bien R₇ y R₈ pueden formar conjuntamente un doble enlace, un C₃₋₆cicloalquilo, o un anillo de 5 a 10 miembros heterocíclico que comprende, como mínimo, un heteroátomo de anillo seleccionado del grupo que consiste en: N, O y S;

5 R₈ es hidrógeno, halógeno, OH, NH₂, COOH, CHO, CN o NO;

R₉ es fenilo, C(=O)R¹⁰ o C(=O)OR₁₀; y

R¹⁰ es OH, NHOH o NH₂;

en las que tanto R₅ como R₆ no son simultáneamente alquilo o alquenilo no sustituido;

o bien sales farmacéuticamente aceptables, estereoisómeros, enantiómeros y solvatos de los mismos.

10 2. Compuesto, según la reivindicación 1, en el que R₁ y R₂ son cada uno de ellos independientemente OC₁₋₆alquilo, O-fenilo o O-bencilo o bien R₁ y R₂ conjuntamente forman dioxaleno.

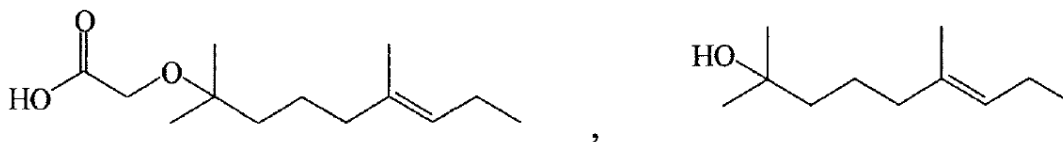
15 3. Compuesto, según la reivindicación 2, en el que R₁ y R₂ son cada uno de ellos independientemente OCH₃, OCH₂CH₃, OCH₂CH₂CH₃, O-fenilo o O-bencilo.

4. Compuesto, según la reivindicación 1, en el que R₁ y R₂ conjuntamente forman dioxaleno.

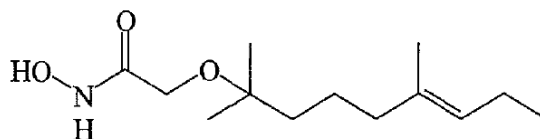
20 5. Compuesto, según la reivindicación 1, en el que R₃ y R₄ son cada uno de ellos independientemente OC₁₋₆alquilo, O-fenilo o O-bencilo.

6. Compuesto, según la reivindicación 1, en el que R₃ y R₄ son cada uno de ellos independientemente OCH₃, OCH₂CH₃, OCH₂CH₂CH₃, O-fenilo o O-bencilo.

25 7. Compuesto, según la reivindicación 1, en el que R₅ es

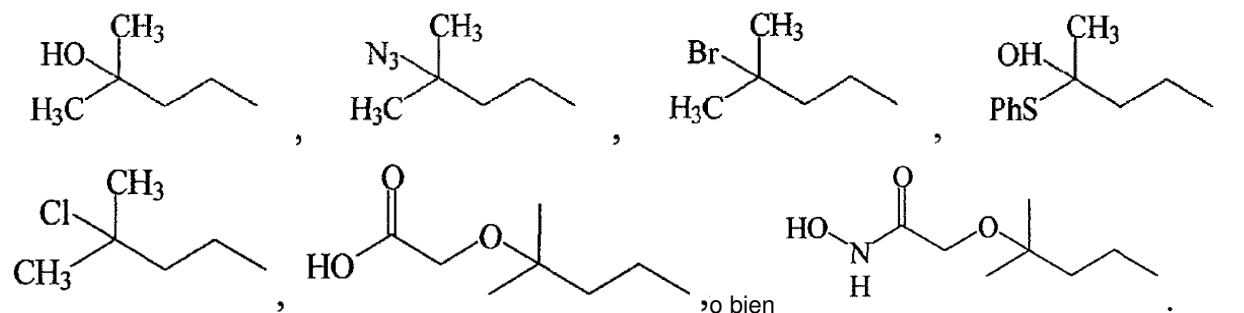


o bien



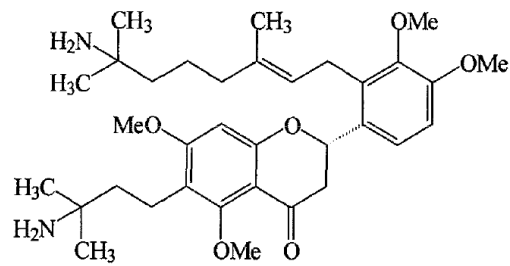
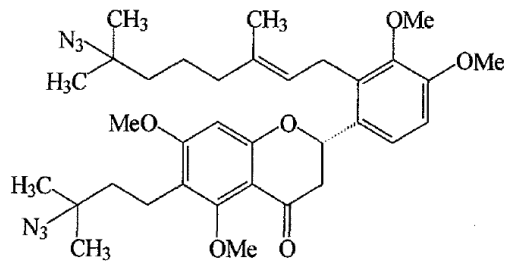
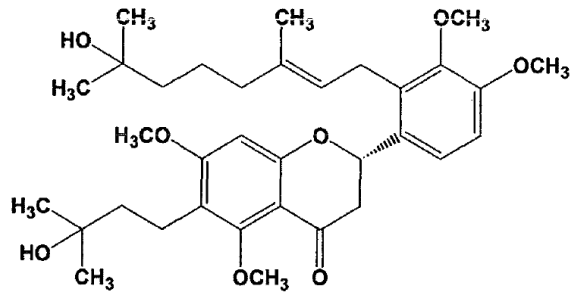
30

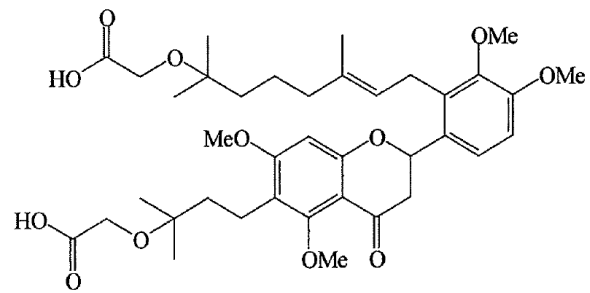
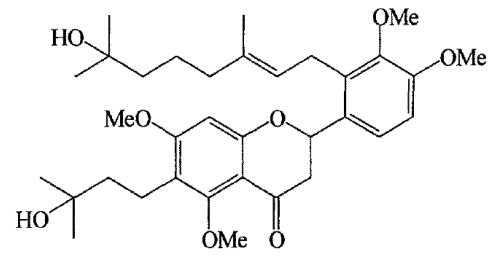
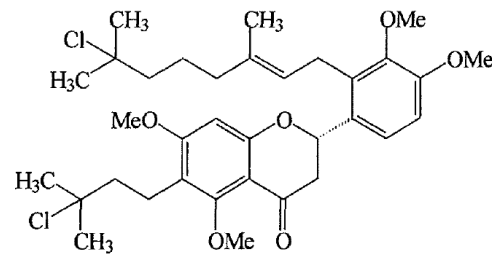
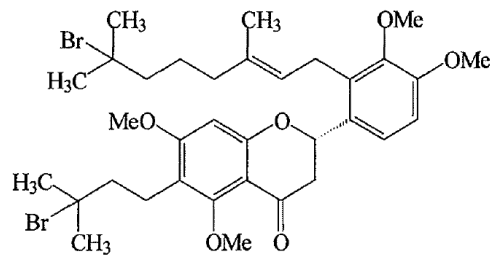
8. Compuesto, según la reivindicación 1, en el que R₆ es

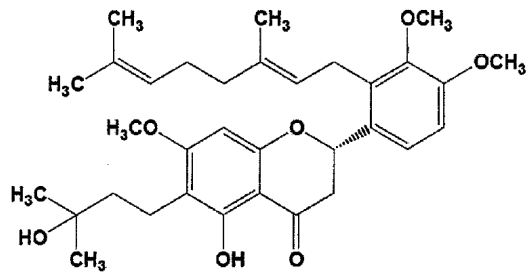
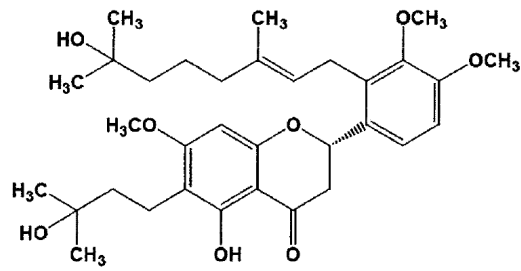
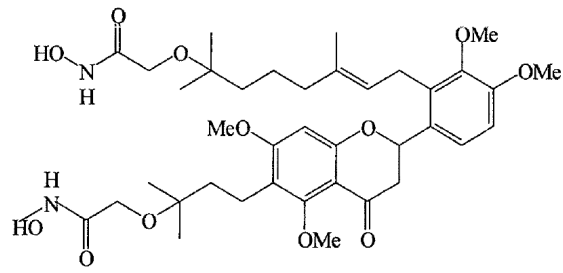


35

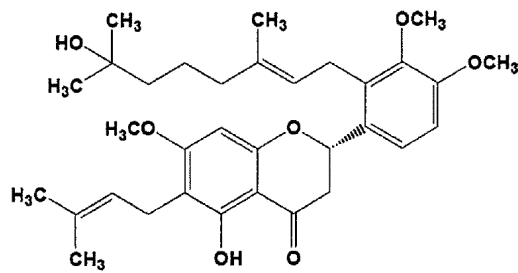
9. Compuesto, según la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en:





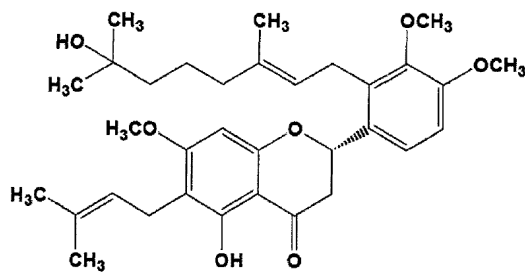
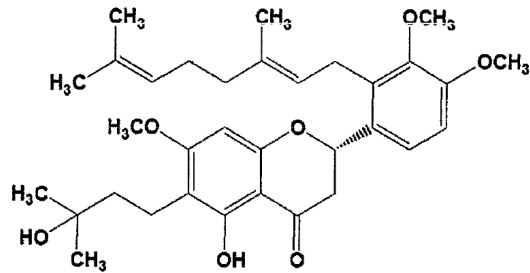
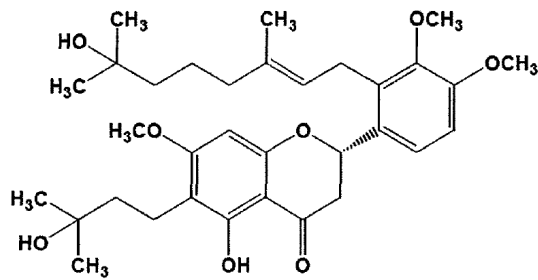
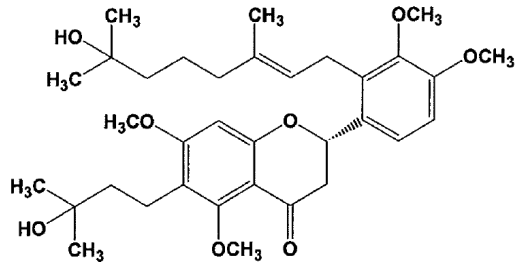


y



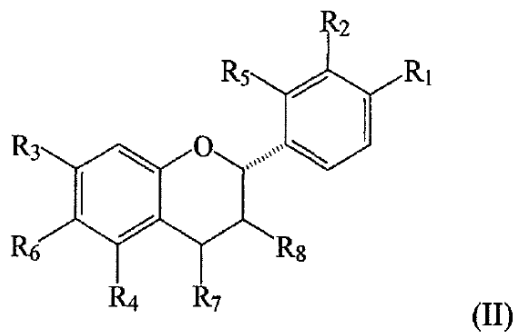
5

10. Compuesto, según la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en:



5 y

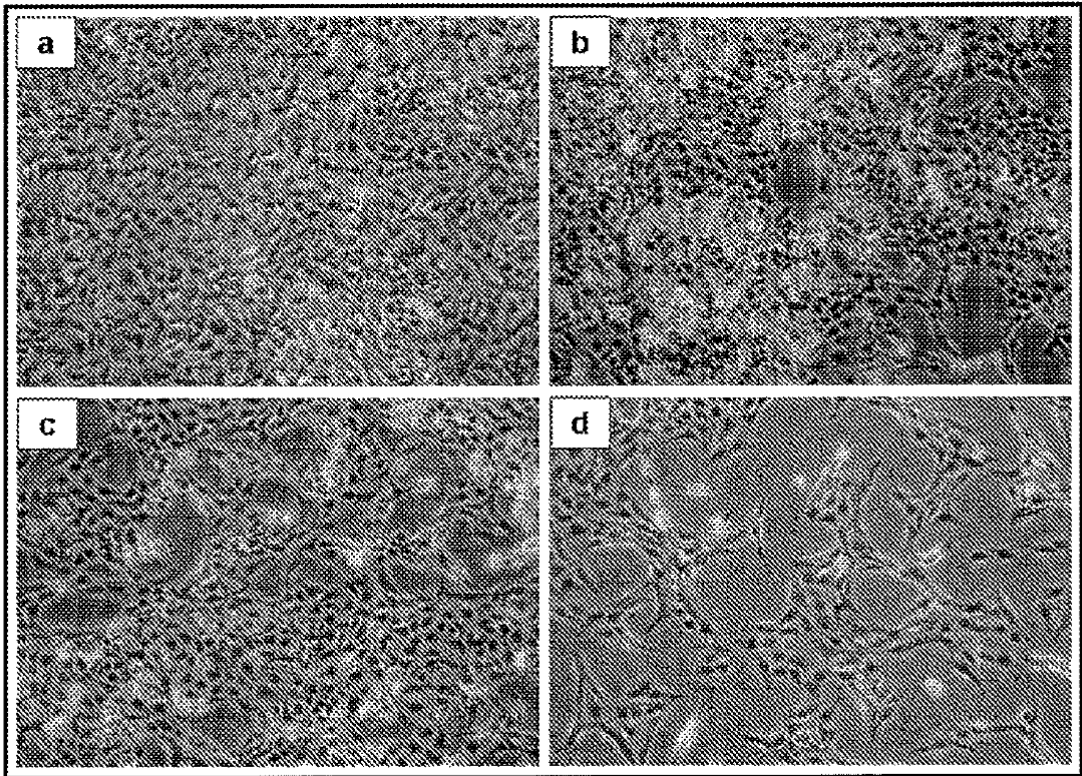
10 11. Estereoisómero del compuesto de fórmula (I), según la reivindicación 1, que está representado por la siguiente fórmula (II):



en la que R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son definidos como en la fórmula (I).

- 5 12. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su utilización como medicamento.
13. Composición farmacéutica que comprende el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o sales farmacéuticamente aceptables, estereoisómeros, enantiómeros y solvatos del mismo como un ingrediente activo y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 10 14. Utilización del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o sales farmacéuticamente aceptables, estereoisómeros, enantiómeros y solvatos del mismo en la fabricación de un medicamento para inhibir la histona deacetilasa (HDAC) en un paciente.
- 15 15. Utilización del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o sales farmacéuticamente aceptables, estereoisómeros, enantiómeros y solvatos del mismo en la fabricación de un medicamento para tratar tumores o enfermedades proliferativas de las células en un paciente.
- 20 16. Utilización del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o sales farmacéuticamente aceptables, estereoisómeros, enantiómeros y solvatos del mismo en la fabricación de un medicamento para aumentar el crecimiento de las neuritas en un paciente.
17. Utilización del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o sales farmacéuticamente aceptables, estereoisómeros, enantiómeros y solvatos del mismo en la fabricación de un medicamento para tratar enfermedades neurodegenerativas y atrofia muscular espinal humana (SMA) en un paciente.

(A)



(B)

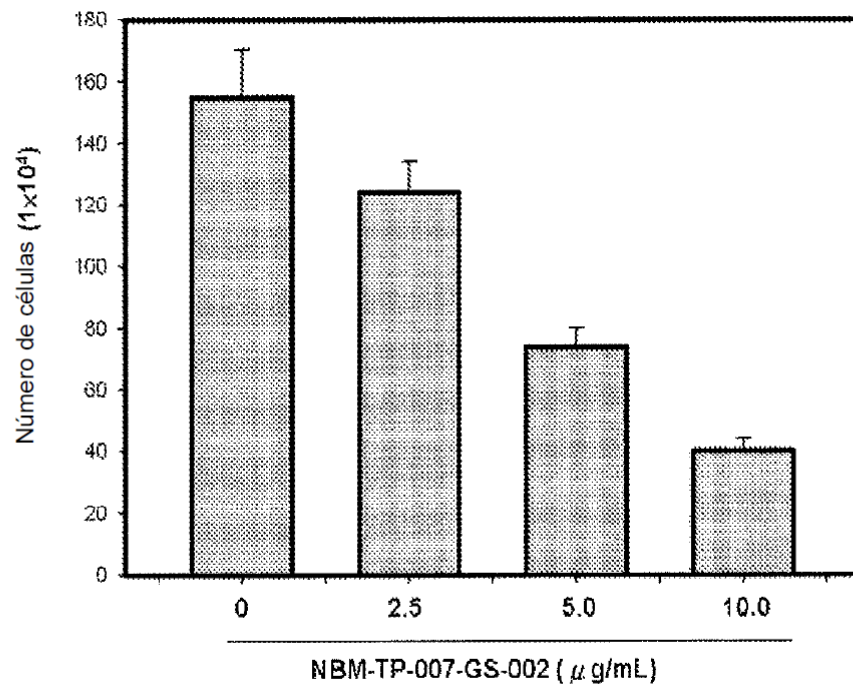


FIG. 1

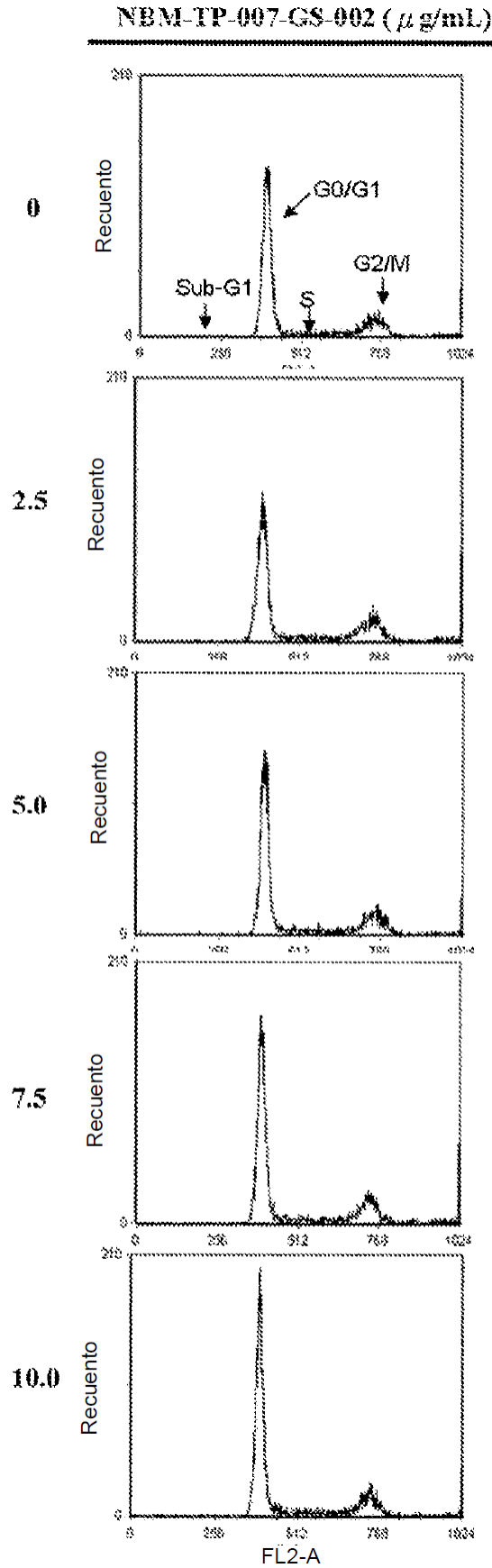


FIG. 2

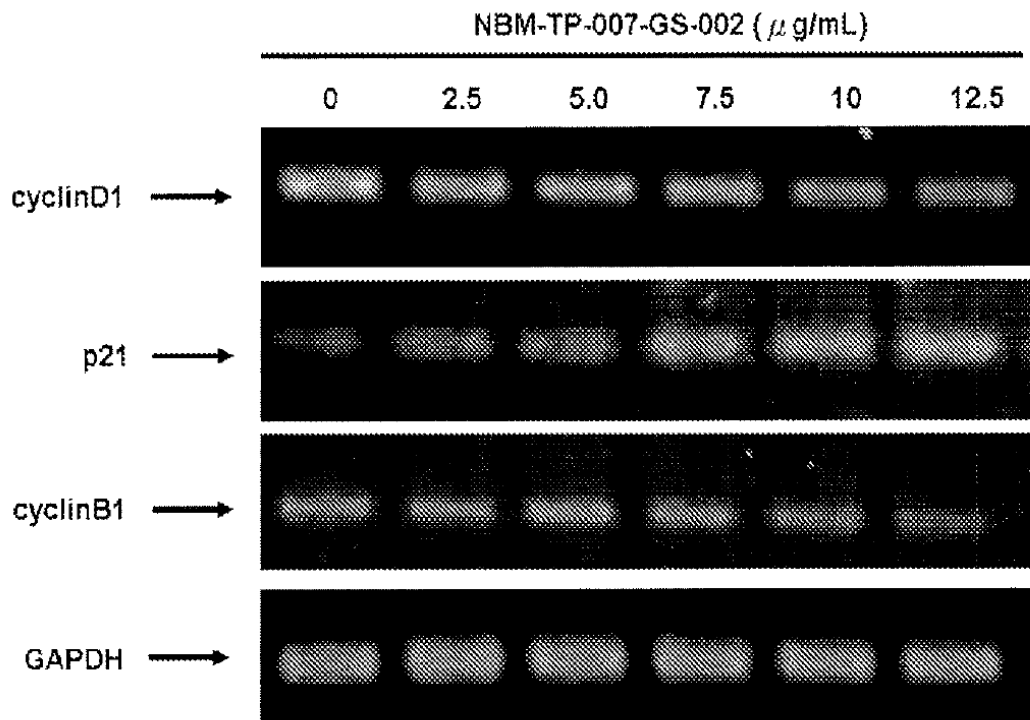
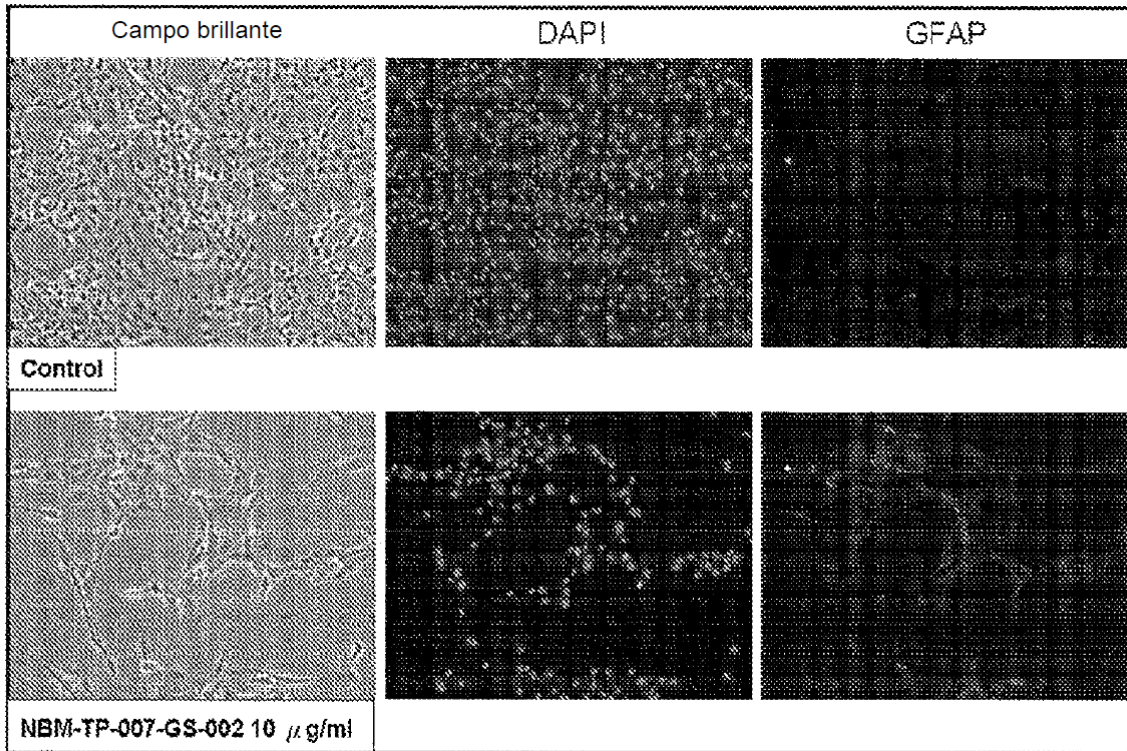


FIG. 3

(A)



(B)

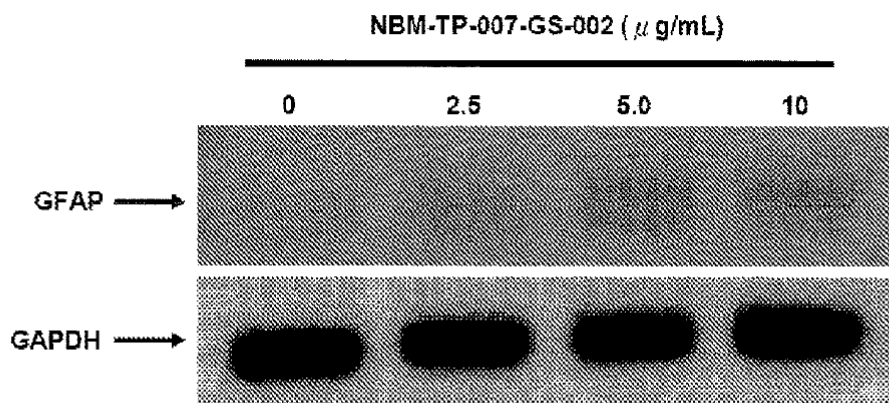


FIG. 4

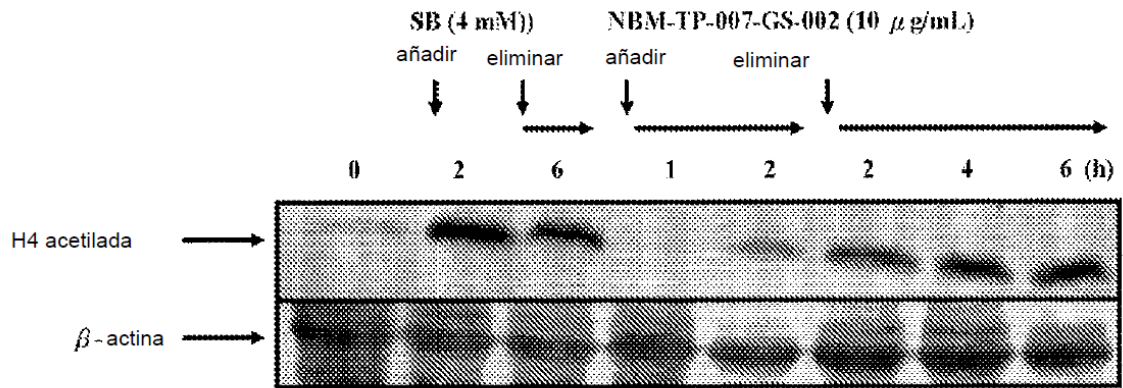


FIG. 5

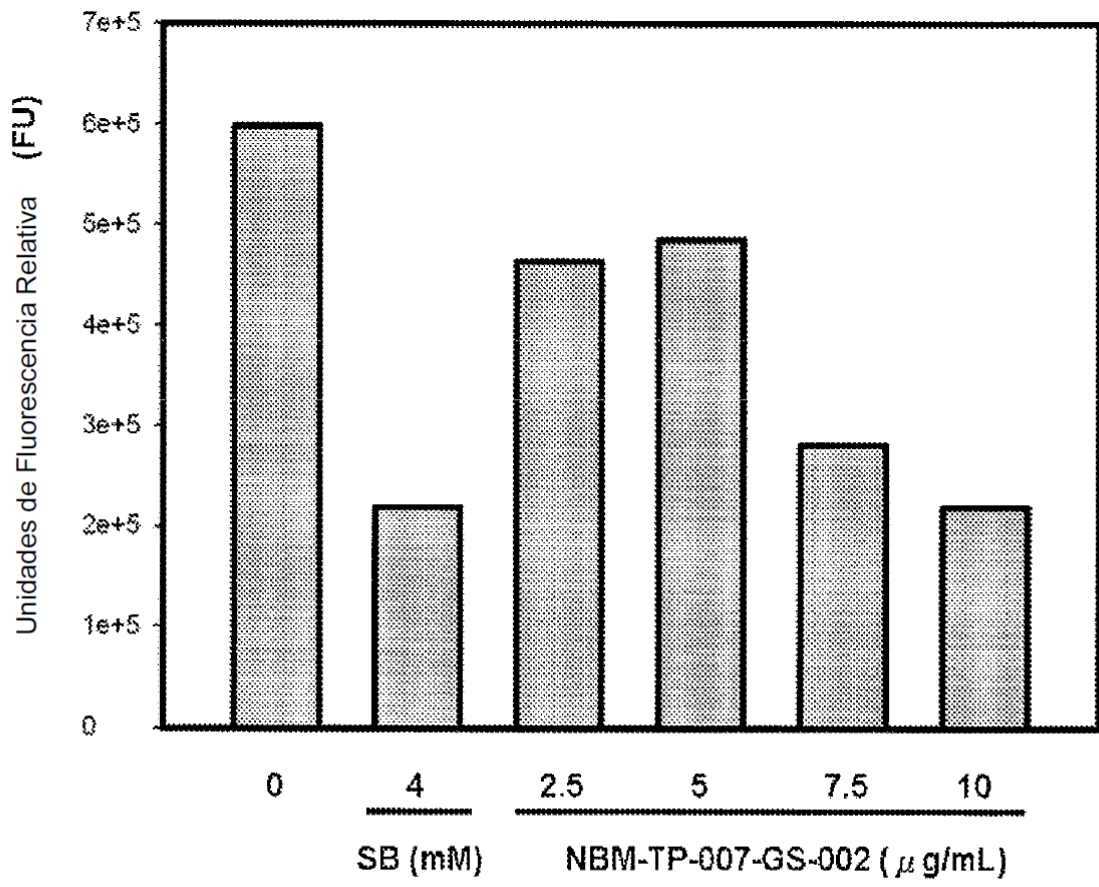
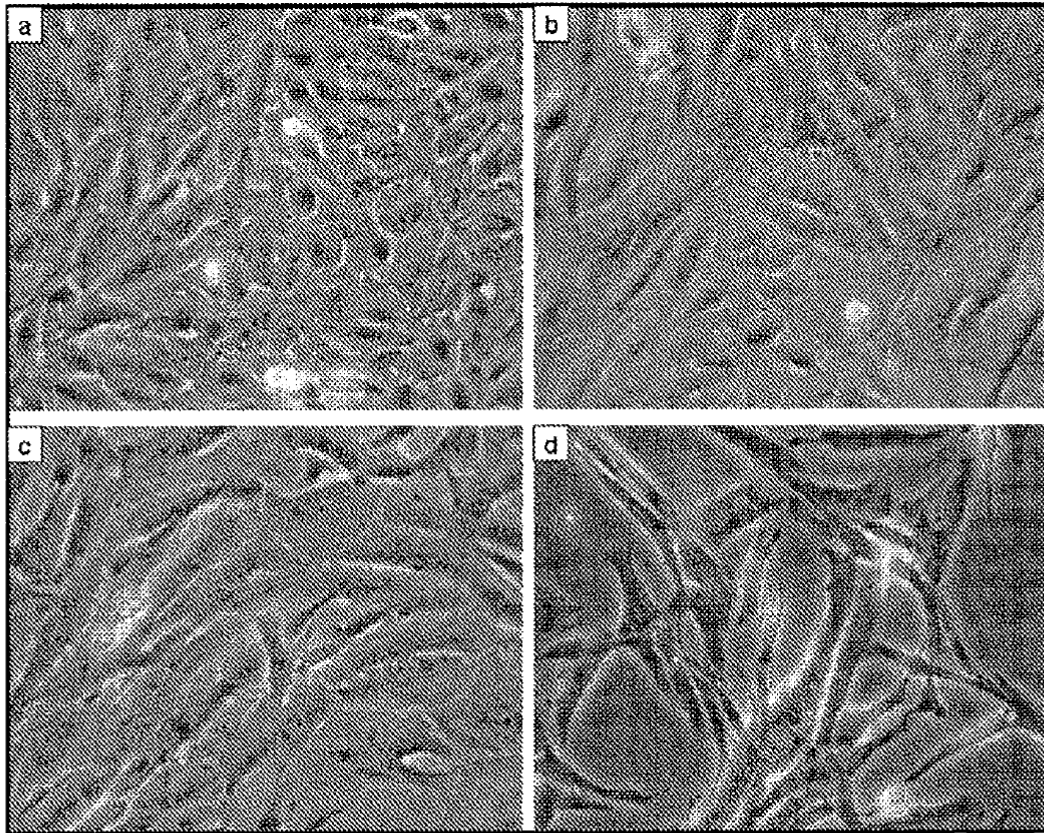


FIG. 6

(A)



(B)

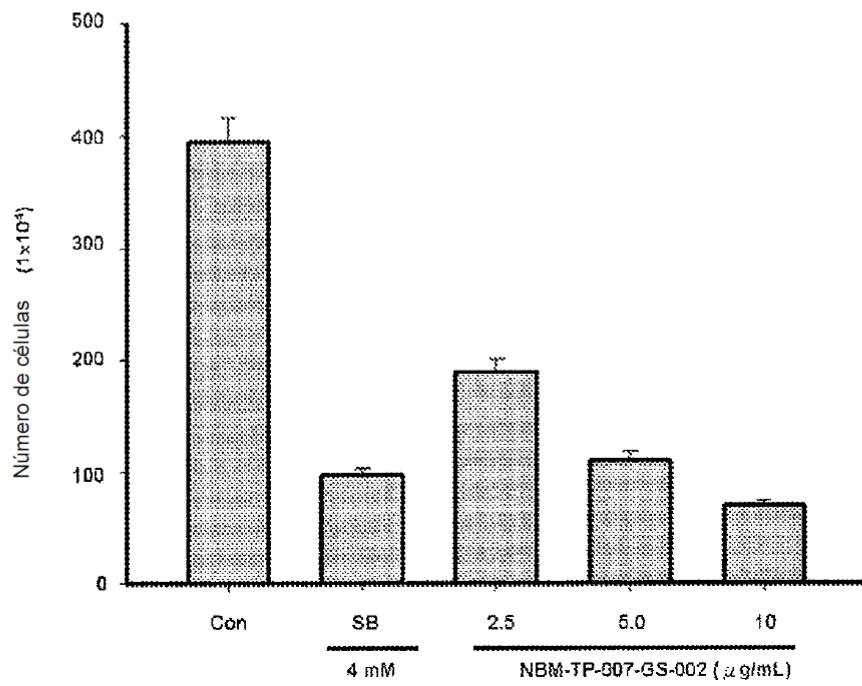
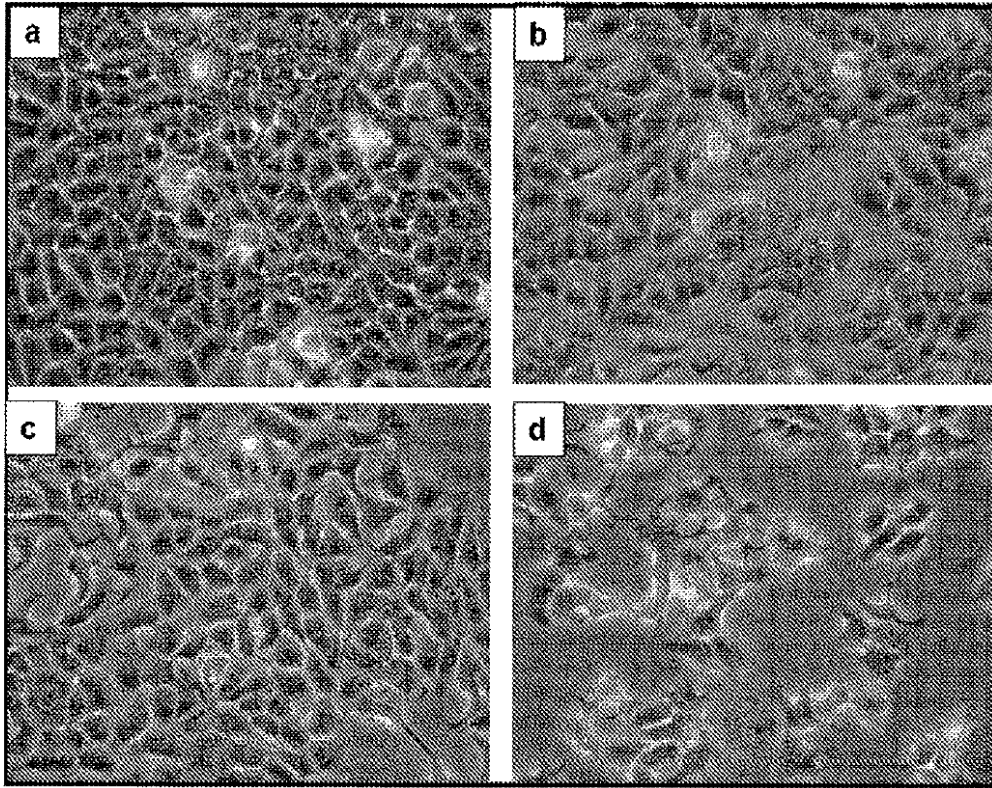


FIG. 7

(A)



(B)

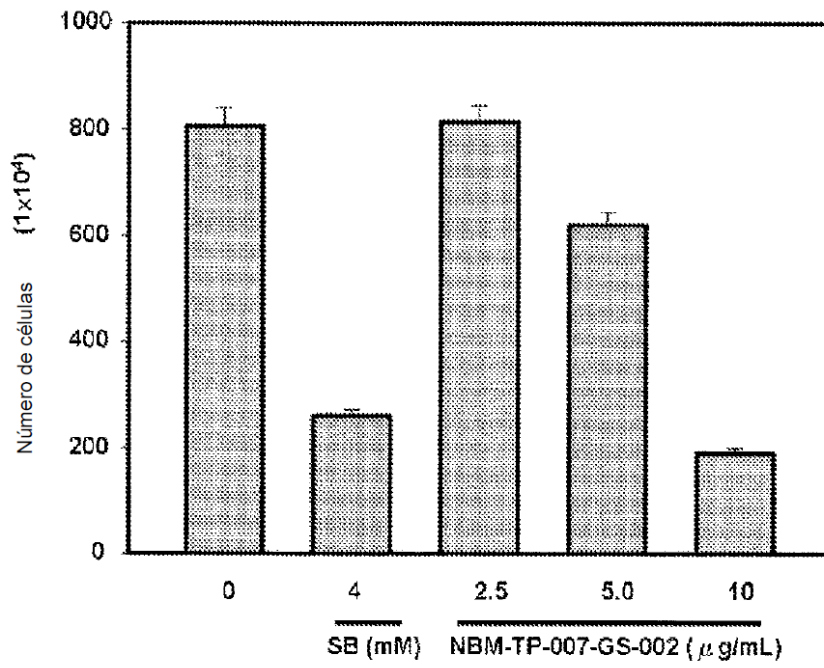
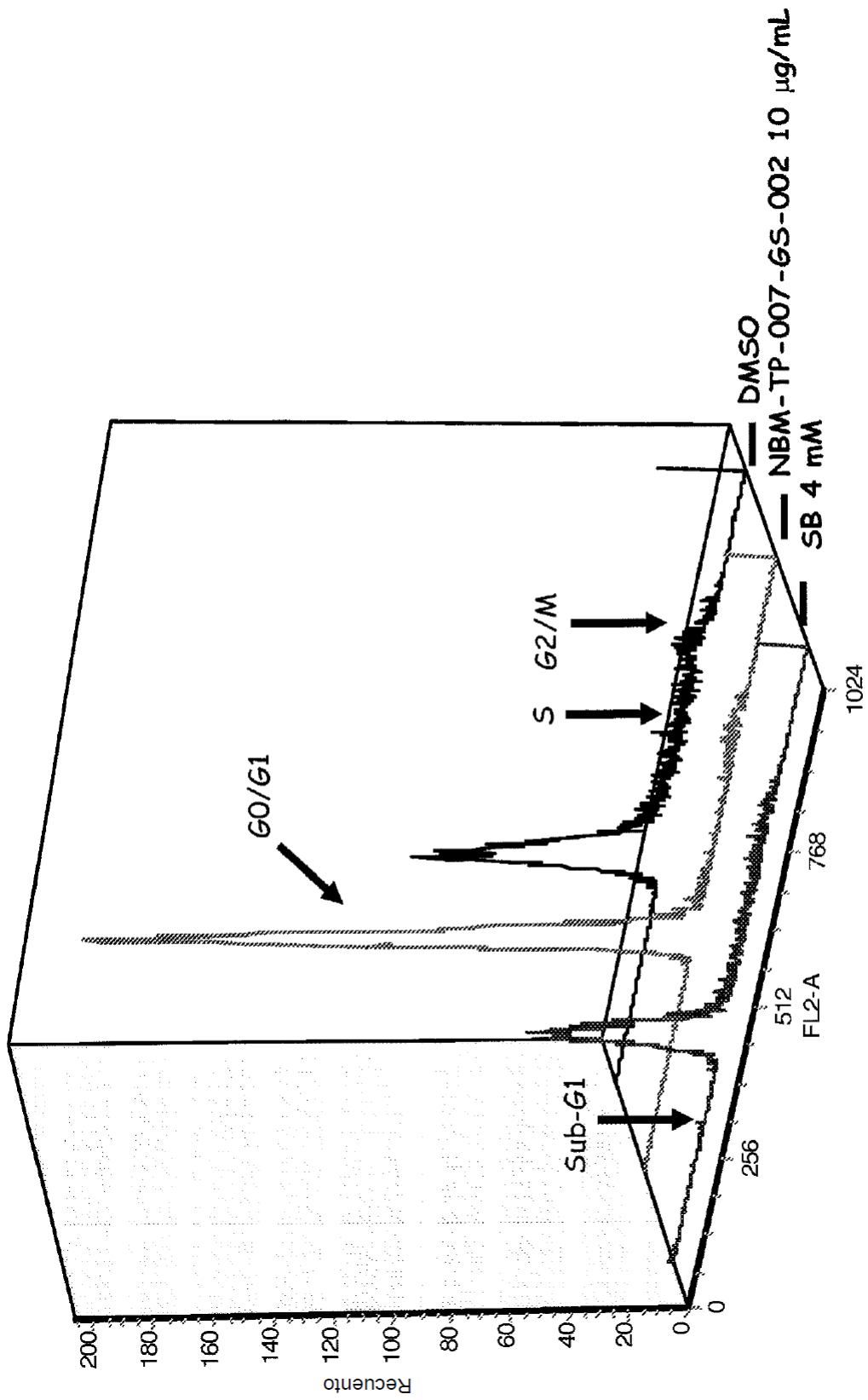


FIG. 8



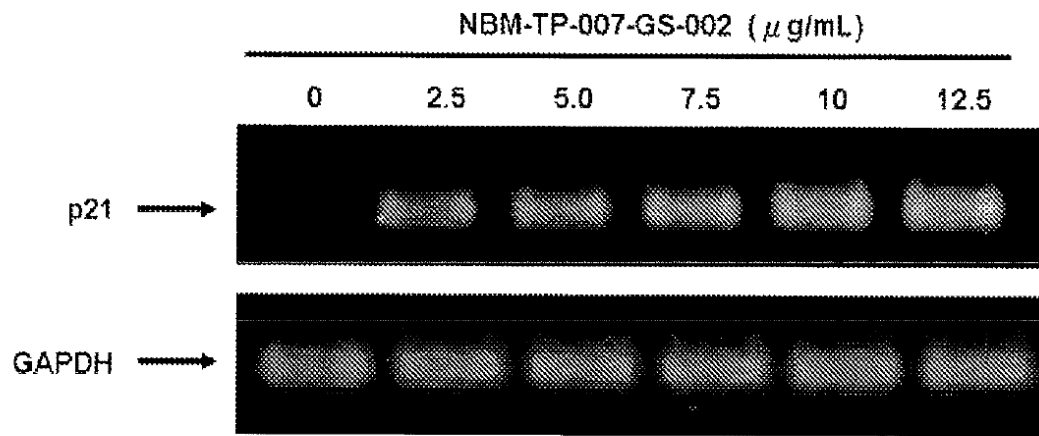


FIG. 10

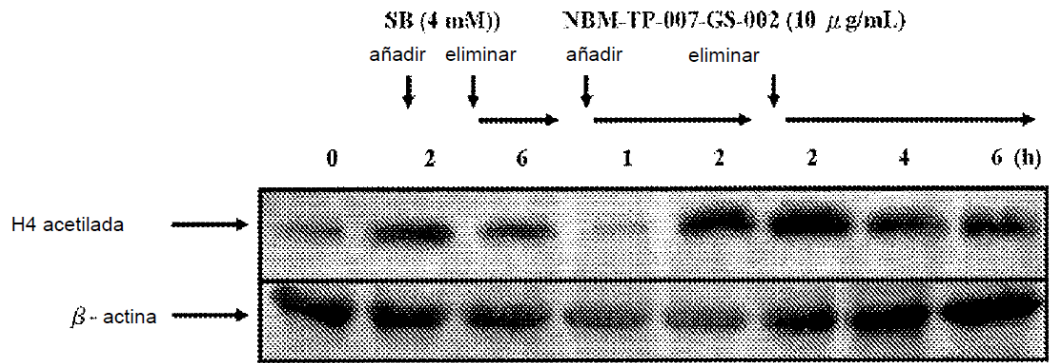
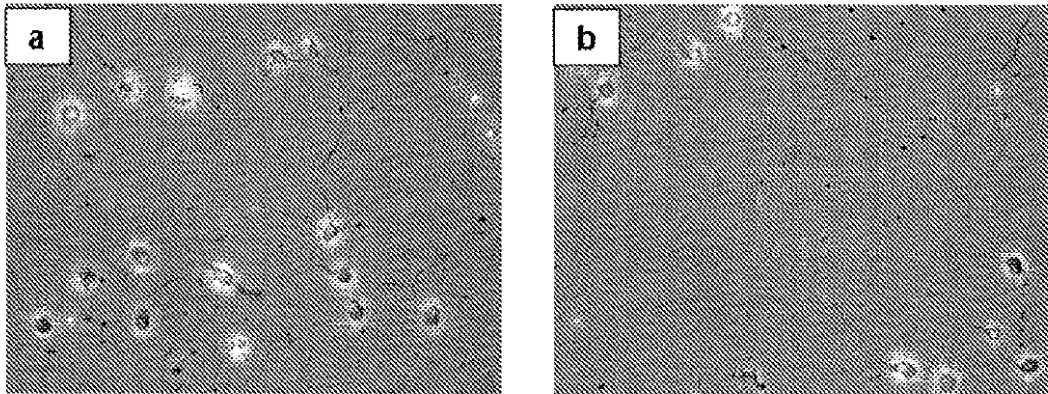


FIG. 11

(A)



(B)

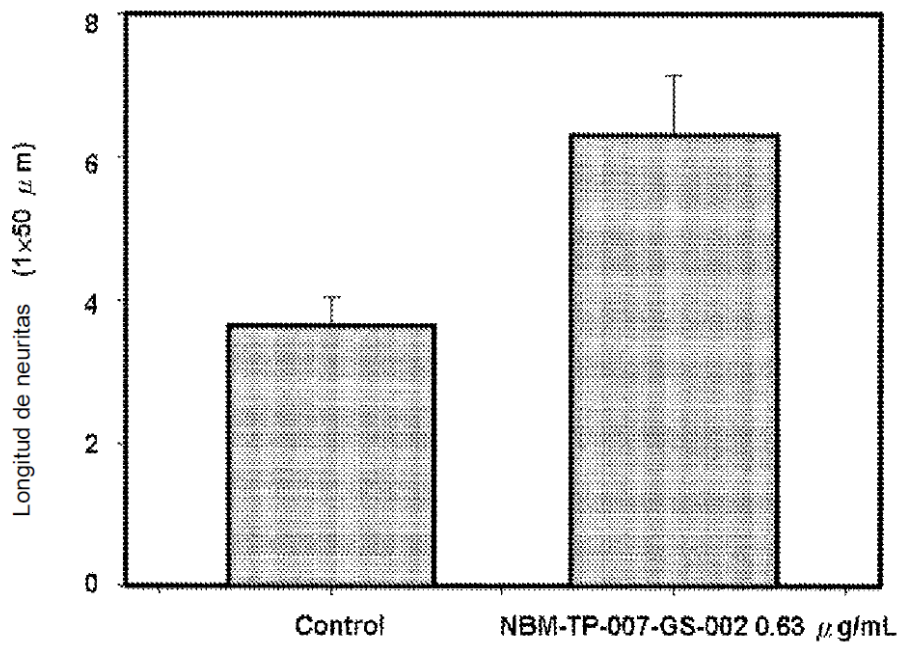
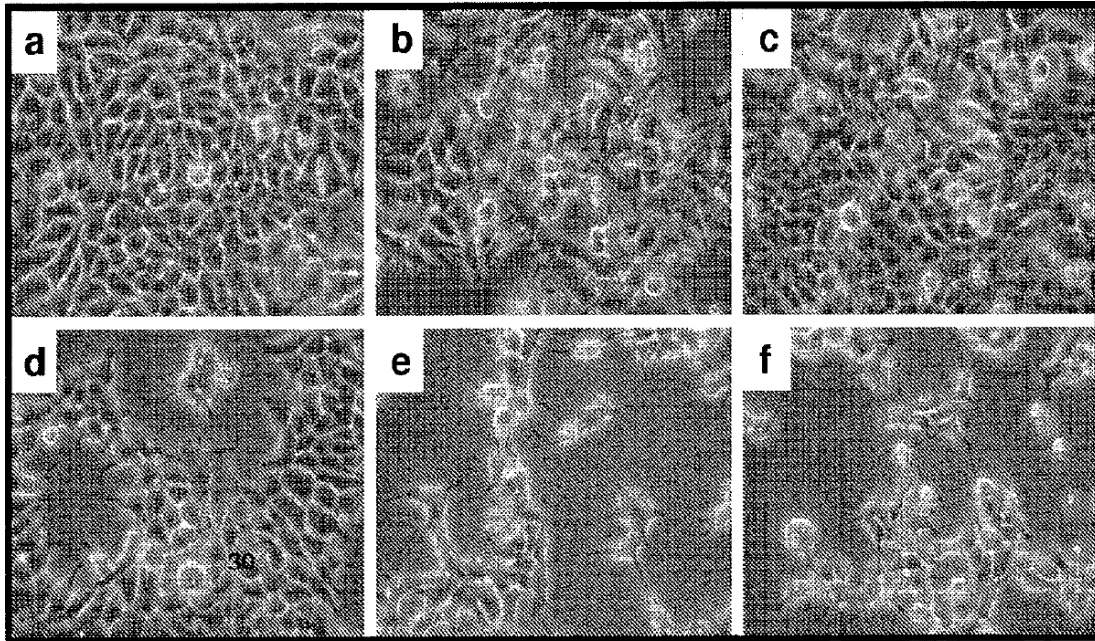


FIG. 12

(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)

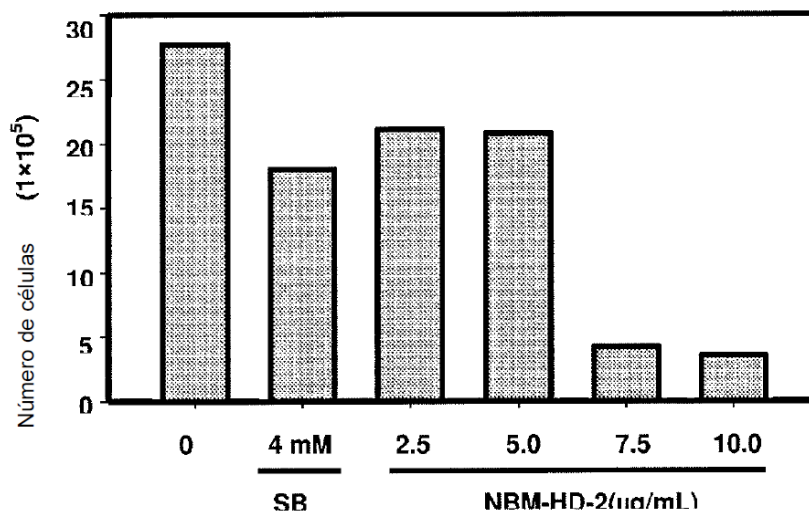


Fig. 13

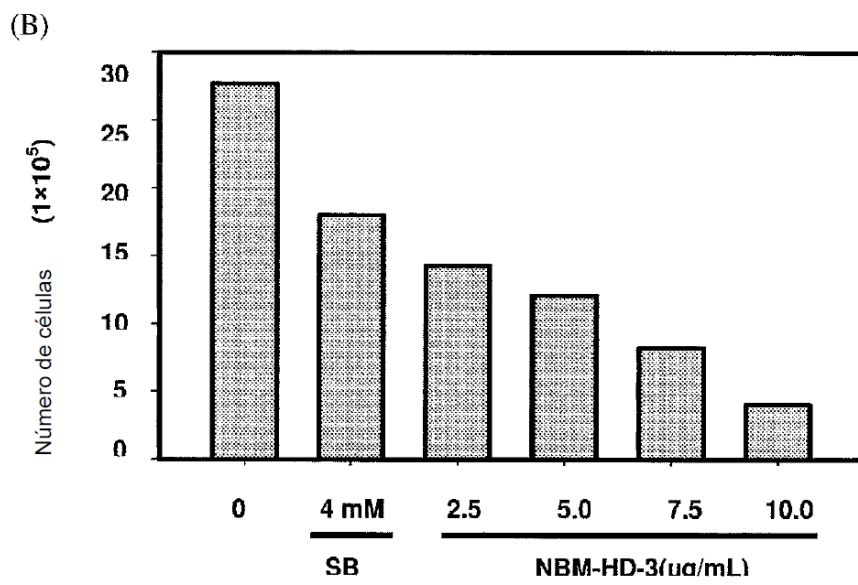
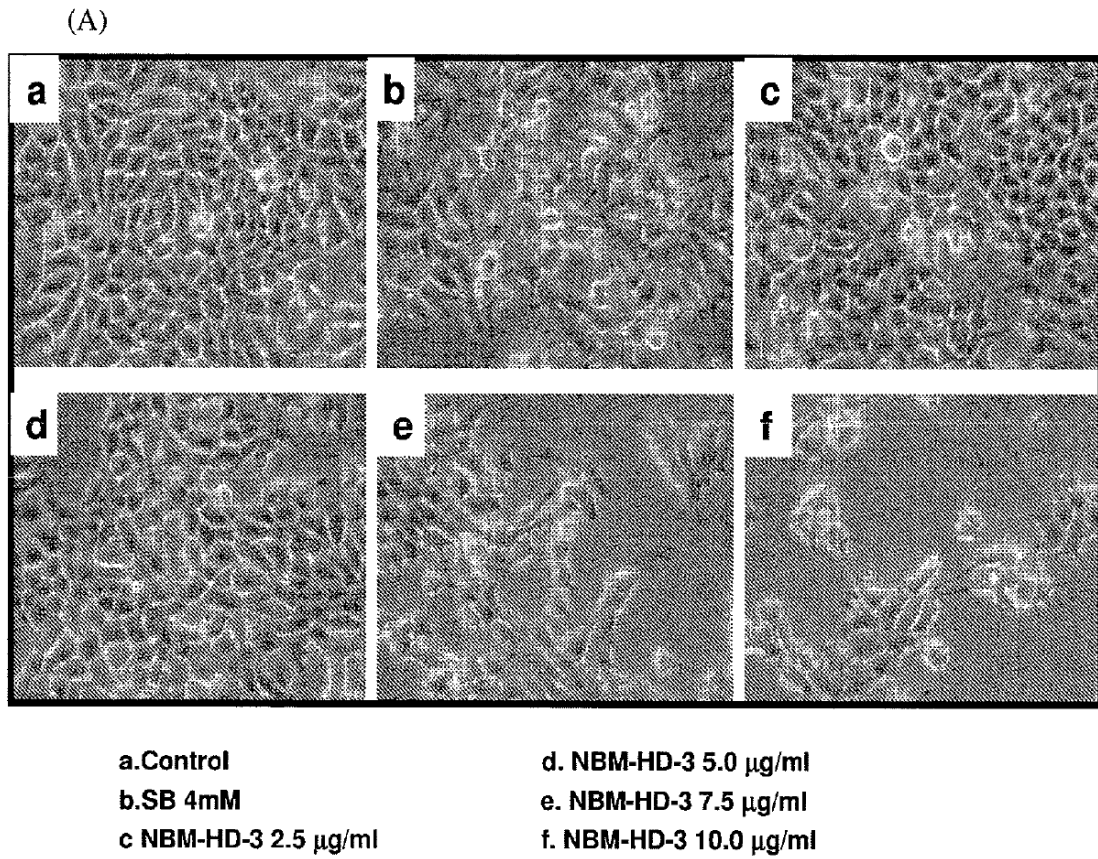


Fig. 14