



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102015032685-8 A2

(22) Data do Depósito: 28/12/2015

(43) Data da Publicação: 04/07/2017



* B R 1 0 2 0 1 5 0 3 2 6 8 5 A

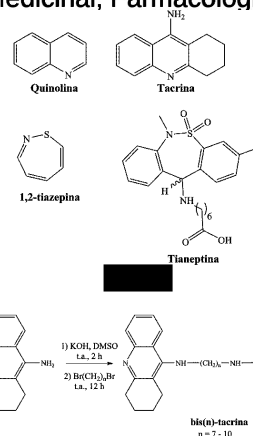
(54) Título: MOLÉCULAS COM NÚCLEO HÍBRIDO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PROCESSO DE SÍNTESE E SEUS USOS

(51) Int. Cl.: C07D 221/08; C07D 257/04; C07D 281/02; A61K 31/38; A61K 31/435; (...)

(73) Titular(es): LABORATÓRIO NACIONAL DE COMPUTAÇÃO CIENTÍFICA-LNCC, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

(72) Inventor(es): MARCO ANTONIO CESCHI; LEANDRA FRANCISCATO CAMPO; CARLOS ALBERTO SARAIVA GONÇALVES; EDUARDO LUIS KONRATH; JESSE SOBIESKI DA COSTA; DANIELA FRAGA DE SOUZA; JOÃO PAULO BIZARRO LOPES; VIKTOR SARAIVA CÂMARA; LAURENT EMMANUEL DARDENNE; ISABELLA ALVIM GUEDES; ANA LUIZA MARTINS KARL

(57) Resumo: MOLÉCULAS COM NÚCLEO HÍBRIDO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PROCESSO DE SÍNTESE E SEUS USOS. A presente invenção descreve moléculas com núcleo híbrido baseado em núcleos de tetraidroacridina e tianeptina, separados por cadeias espaçadoras metilênicas, via reação de acoplamento, uma composição farmacêutica compreendendo estas moléculas, um processo de síntese destas moléculas, e seus usos. A presente invenção se situa nos campos da Química Medicinal, Farmacologia e Medicina.



MOLÉCULAS COM NÚCLEO HÍBRIDO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA,
PROCESSO DE SÍNTESE E SEUS USOS

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção descreve moléculas com núcleo híbrido baseado em núcleos de tetraidroacridina e tianeptina, separados por cadeias espaçadoras metilênicas, via reação de acoplamento, uma composição farmacêutica compreendendo estas moléculas, um processo de síntese destas moléculas, e seus usos. A presente invenção se situa nos campos da Química Medicinal, Farmacologia e Medicina.

Antecedentes da Invenção

[0002] A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa que resulta na perda progressiva e irreversível de funções cerebrais. Cerca de 200 mil pessoas no mundo com menos de 65 anos de idade são portadoras da DA, o que corresponde a população mais jovem de pessoas com a doença, enquanto cinco milhões de pessoas com 65 anos ou mais apresentam a DA. É estimado que em 2050 cerca de 13,8 milhões de pessoas desenvolverão a DA. (Kumar, A.; Singh, A.; Ekavali, *Pharmacol. Rep.* **2015**, *67*, 195; Alzheimer's Association Report, *Alzheimer's & Dementia* **2015**, *11*, 332).

[0003] A maioria dos casos de DA tem causas substancialmente desconhecidas. Hoje ainda não há tratamentos terapêuticos capazes de interromper a progressão da doença, embora algumas drogas têm sido recentemente introduzidas no mercado, destinadas especialmente no controle dos sintomas cognitivos. Estas drogas, Rivastigmina (Exelon[®]), Galantamina (Razadyne[®], Reminyl[®]), Tacrina (Cognex[®]), Donepezil (Aricept[®]) compartilham o mecanismo de ação de inibição da acetilcolinesterase (AChE), enquanto Memantina (Namenda[®]) atua como um antagonista do receptor NMDA (*N-metil D-Aspartato*).

[0004] Dentre os derivados quinolínicos sintéticos, a tacrina (THA) ou 9-amino-1,2,3,4-tetraidroacridina, Figura 1, é de elevada importância e teve comprovada sua atividade farmacológica pela primeira vez em 1949 como agente analéptico. Em 1961 foi descrito pela primeira vez seu efeito sobre enzimas colinesterases (Kozurkova, M.; Hamulakova, S.; Gazova, Z.; Paulikova, H.; Kristian, P., *Pharmaceuticals* **2011**, *4*, 382). Foi a primeira droga aprovada nos Estados Unidos, em 1993, para o tratamento sintomático da doença de Alzheimer (DA), para a qual ainda não há um tratamento eficiente na prevenção, cura ou até mesmo retardamento do seu progresso.

[0005] Pang e colaboradores realizaram a síntese de compostos do tipo bis(n)-tacrina, que são moléculas com duas unidades de tacrina ligadas por uma cadeia espaçadora de metilenos (Figura 2) (Pang, Y. P.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Hong, F.; Brimijoin, S., *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23646). O dímero bis(7)-tacrina se mostrou mil vezes mais potente na inibição da acetilcolinesterase do que a tacrina, e possui maior seletividade na inibição da AChE em relação à butirilcolinesterase (BuChE). A partir dos estudos de Pang et al., diferentes dímeros da tacrina têm sido sintetizados e avaliados quanto à inibição de enzimas colinesterase (Hu, M. K; Shaw, J., 2001, Patente, WO200117529-A1).

[0006] Também são descritos na literatura diversos compostos híbridos contendo diferentes núcleos de interesse farmacológico voltados para o estudo de doenças neurodegenerativas (Gil, A. M., et al. 2004, patente WO2004032929-A2).

[0007] Devido à complexidade da doença de Alzheimer, por seu caráter multifatorial, há grande interesse da comunidade científica no *design* de moléculas "multialvo", que possam interagir simultaneamente com diferentes fatores da doença, de maneira a impedir o seu progresso mais do que apenas "mitigar" seus sintomas.

[0008] A construção de moléculas híbridas é uma estratégia importante no desenho da arquitetura de um novo protótipo de fármacos a partir da

combinação de características estruturais e biológicas definidas de compostos distintos. Esta estratégia permite agregar ao híbrido diferentes grupos farmacofóricos e assim, modular simultaneamente múltiplos alvos de doenças multifatoriais, tal como a doença de Alzheimer. Essa estratégia geralmente envolve a síntese de compostos híbridos que possuem em uma única molécula dois ou mais núcleos de interesse farmacológico, dos quais, geralmente um é do tipo inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE) (WO2004032929-A2).

[0009] O núcleo tacrina é o mais comumente incorporado nestes compostos como inibidor do sítio CAS (*catalytic active site*) da AChE. O interesse por tais moléculas foi impulsionado frente às contribuições de Pang et al., que demonstraram a excelente atuação de compostos com dupla interação simultânea aos CAS e PAS (*peripheral anionic site*) da AChE (Pang, Y. P.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Hong, F.; Brimijoin, S., *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23646), bem como frente aos apontamentos de Inestrosa et al (Inestrosa, N. C.; Álvarez, A.; Pérez, C. A.; Moreno, R. D.; Vicente, M.; Linker, C.; Casanueva, O. I.; Soto, C.; Garrido, J., *Neuron* **1996**, *16*, 881), que indicaram que o PAS da enzima pode acelerar a deposição de peptídeos beta-amiloide (A β). Essa nova geração de moléculas híbridas é planejada de forma a atuar simultaneamente nos CAS e PAS das ChEs, e em outros fatores da DA.

[0010] As enzimas AChE e BuChE constituem o grupo das colinesterases. A AChE é encontrada principalmente nas sinapses neuronais. A BuChE é sintetizada pelo fígado, sendo encontrada em grandes quantidades no soro. A acetilcolinesterase, entre outras funções fisiológicas, age em células pós-sinápticas, realizando a hidrólise da acetilcolina e encerrando a transmissão do impulso nervoso. A função fisiológica da BuChE ainda não é bem conhecida, mas é sugerida sua participação no mecanismo regulatório dos níveis da AChE na sinapse colinérgica. Além disso, a observação de que a razão BuChE/AChE eleva com o progresso da DA, com o aumento significativo da BuChE no hipocampo e córtex temporal, deve favorecer o uso de inibidores

seletivos de BuChE em tratamentos de formas moderadas a avançadas de DA (Giacobini, E., *Pharmacol. Res.* **2004**, *50*, 433).

[0011] Tianeptina (Stablon[®]), 7-(3-cloro-6-metil - 6,11 - dihidrodibenzo [c,f] [1,2] tiazepin-11-ilamino) ácido heptanoico S,S-dióxido, é uma droga antidepressiva, da classe dos tricíclicos, e é um derivado do núcleo tiazepina, mais especificamente um derivado dioxodibenzo[1,2]tiazepina, contendo dois anéis benzênicos fundidos e como cadeia lateral o ácido 7-aminoeptanoico. Esta droga foi sintetizada no Instituto Servier, França, e descrita pela primeira vez na patente FR 2104728. Possui fórmula química $C_{21}H_{24}ClN_2NaO_4S$ com peso molecular 436,95g. A tianeptina apresenta propriedades como antidepressiva a neuroprotetora e ansiolítica. (Guzman, et al., 2009, patente WO/2010/051239; Blanchard, 2002, patente US 6,441,165; Huet De Barochez & Wuthrich, 1999, patente US 5,888,542). Possui propriedades neuroquímicas distintas dos demais antidepressivos tricíclicos ou não-tricíclicos, atuando no aumento da captação neuronal do neurotransmissor serotonina, podendo atuar também como anticonvulsivante e analgésico (Nowakowska, E.; Kus, K., Chodera, A.; Rybakowski, J. *Arzneimittelforschung* **2000**, *50*, 5; Uzbay, T. I., *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol.* **2008**, *32*, 915). Adicionalmente, a tianeptina regula a entrada de cálcio prevenindo a super estimulação dos receptores AMPA e modula a atividade dos receptores NMDA normalizando sua atividade no hipocampo, características que estão relacionadas ao envelhecimento quanto à doença de Alzheimer (revisado em Mcewen, B. S.; Chattarji, S.; Diamond, D. M.; Jay, T. M.; Reagan, L. P.; Svenningsson, P. ; Fuchs, E., *Mol. Psychiatry.* **2010**, *15*, 237).

[0012] A ativação glial libera uma variedade de citocinas pró-inflamatórias que contribuem para a disfunção neuronal (Khansari, N.; Shakiba, Y.; Mahmoudi, M., *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* **2009**, *3*, 73). Níveis elevados de S100B, uma proteína derivada da glia, têm sido observados no líquido de pacientes nos primeiros estágios da doença de Alzheimer (Peskind, E. R.; Griffin, W. S; Akama, K. T.; Raskind, M. A.; Van Eldik, L. J.,

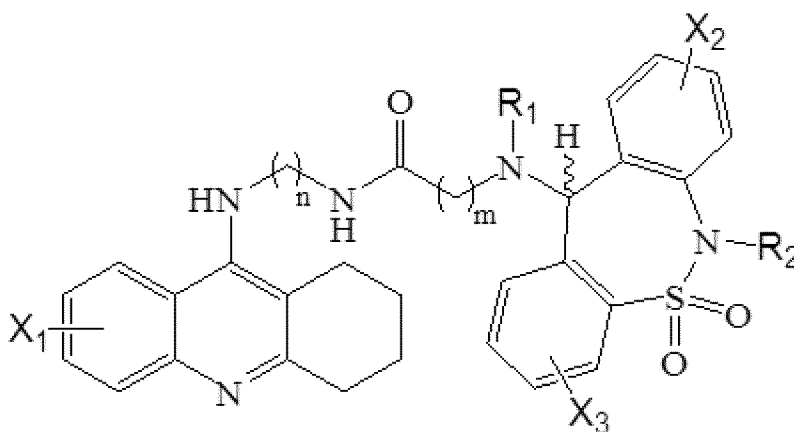
Neurochem. Int. **2001**, 39, 409) e no soro de pacientes com Depressão Maior (Schroeter, M. L.; Abdul-Khaliq, H.; Diefenbacher, A.; Blasig, I. E. *Neuroreport*, **2002**, 13, 1675), sugerindo um papel da glia nessas patologias. Já foi demonstrado anteriormente que a tacrina não é capaz de modificar a secreção de S100B *in vitro* (Lunardi, P.; Nardin, P.; Guerra, M. C.; Abib, R.; Leite M. C.; Gonçalves C. A., *Life Sci.* **2013**, 92, 701).

[0013] Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Sumário da Invenção

[0014] Dessa forma, a presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir de uma nova molécula com núcleo híbrido baseado em núcleos de tetraidroacridina e tianeptina, separados por cadeias espaçadoras metilênicas, via reação de acoplamento.

[0015] Em um primeiro objeto a presente invenção apresenta moléculas com núcleo híbrido, com a seguinte estrutura:



em que:

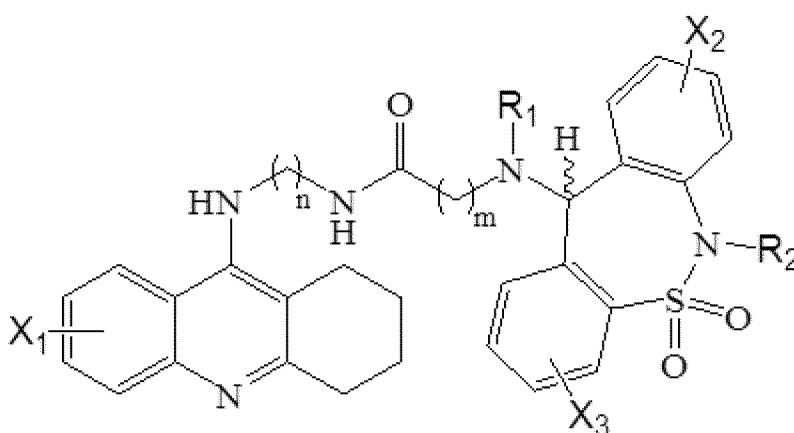
- X₁, X₂ e X₃ são selecionados, independentemente, entre os grupos dos halogênios, OH, OR, HS, SR, NH₂, NH, NHR ou outros grupos retiradores ou

doadores de elétrons, onde R é selecionado entre os grupos alquila, arila, alila, benzila ou propargila;

- R₁ e R₂ são selecionados, independentemente, entre os grupos H, alquila, arila, alila benzila ou propargila; e

- “n” e “m” podem variar entre 1 e 20.

[0016] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta uma composição farmacêutica que compreende moléculas com núcleo híbrido com a seguinte estrutura:



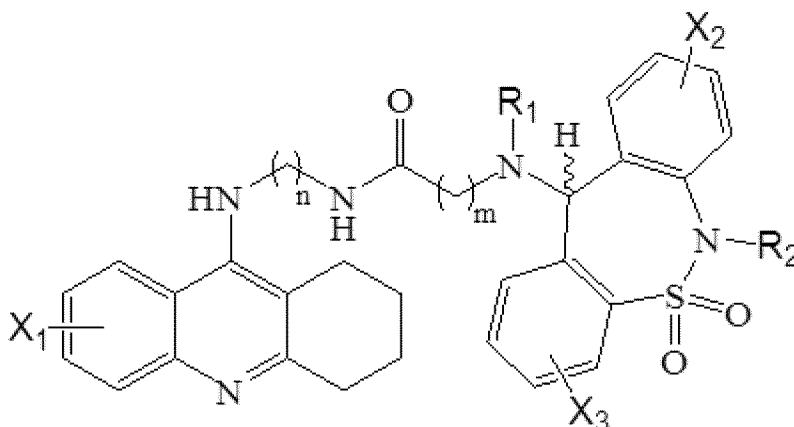
em que:

- X₁, X₂ e X₃ são selecionados, independentemente, entre os grupos dos halogênios, OH, OR, HS, SR, NH₂, NH, NHR ou outros grupos retiradores ou doadores de elétrons, onde R é selecionado entre os grupos alquila, arila, alila, benzila ou propargila;

- R₁ e R₂ são selecionados, independentemente, entre os grupos H, alquila, arila, alila benzila ou propargila; e

- “n” e “m” podem variar entre 1 e 20.

[0017] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta um processo de síntese de moléculas com núcleo híbrido, em que o processo compreende uma reação de acoplamento, e em que a molécula com núcleo híbrido possui a seguinte estrutura:



em que:

- X_1 , X_2 e X_3 são selecionados, independentemente, entre os grupos dos halogênios, OH, OR, HS, SR, NH_2 , NH, NHR ou outros grupos retiradores ou doadores de elétrons, onde R é selecionado entre os grupos alquila, arila, alila, benzila ou propargila;

- R_1 e R_2 são selecionados, independentemente, entre os grupos H, alquila, arila, alila benzila ou propargila; e

- “n” e “m” podem variar entre 1 e 20.

[0018] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta o uso das ditas moléculas com núcleo híbrido para inibir enzimas colinesterases.

[0019] Em um quinto objeto, a presente invenção apresenta o uso das ditas moléculas com núcleo híbrido para diminuir a secreção de pelo menos uma proteína oriunda da glia.

[0020] Em um sexto objeto, a presente invenção apresenta o uso das ditas moléculas com núcleo híbrido na preparação de um medicamento para tratar a Doença de Alzheimer.

[0021] Ainda, o conceito inventivo comum a todos os contextos de proteção reivindicados são as moléculas com núcleo híbrido baseado em núcleos de tetraidroacridina e tianeptina, separados por cadeias espaçadoras metilênicas, via reação de acoplamento.

[0022] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no

segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0023] Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente, são apresentadas as presente figuras:

[0024] A figura 1 mostra as estruturas das moléculas tacrina e tianeptina.

[0025] A figura 2 mostra a estrutura da bis(n)-tacrina.

[0026] A figura 3 apresenta os espectros de RMN de a) ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da tianeptina e b) ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) da tianeptina

[0027] A figura 4 apresenta os espectros de RMN de a) ^1H (300 MHz, CDCl_3) e b) ^{13}C -APT (75 MHz, CDCl_3) do composto **1a**.

[0028] A figura 5 apresenta os espectros de RMN de a) ^1H (300 MHz, CDCl_3) e b) ^{13}C -APT (75 MHz, CDCl_3) do composto **1b**.

[0029] A figura 6 apresenta os espectros de RMN de a) ^1H (300 MHz, CDCl_3) e b) ^{13}C -APT (75 MHz, CDCl_3) do composto **1c**.

[0030] A figura 7 mostra um esquema de formação dos intermediários 2a, 2b, e 2c.

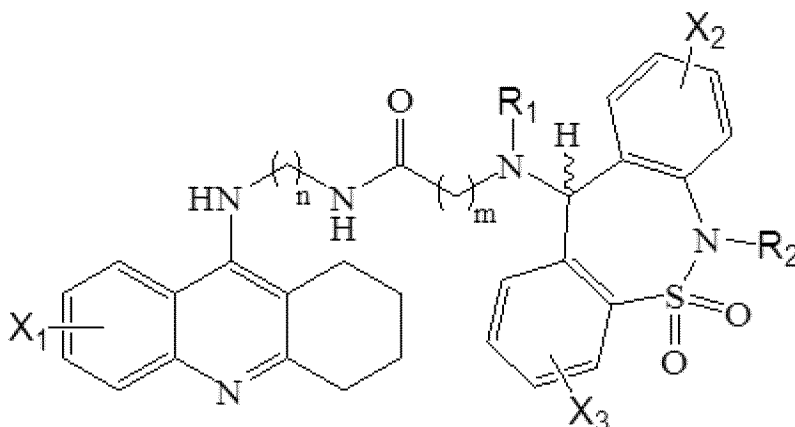
[0031] A figura 8 mostra um esquema ilustrativo da reação de acoplamento.

[0032] A figura 9 mostra os modos de ligação do inibidor (**R**)-**1a** complexado com a conformação 2ckm da AChE.

[0033] A figura 10 mostra os modos de ligação do inibidor (**S**)-**1a** complexado com a conformação 1q83 da AChE.

Descrição Detalhada da Invenção

[0034] Em um primeiro objeto a presente invenção apresenta moléculas com núcleo híbrido, com a seguinte estrutura:



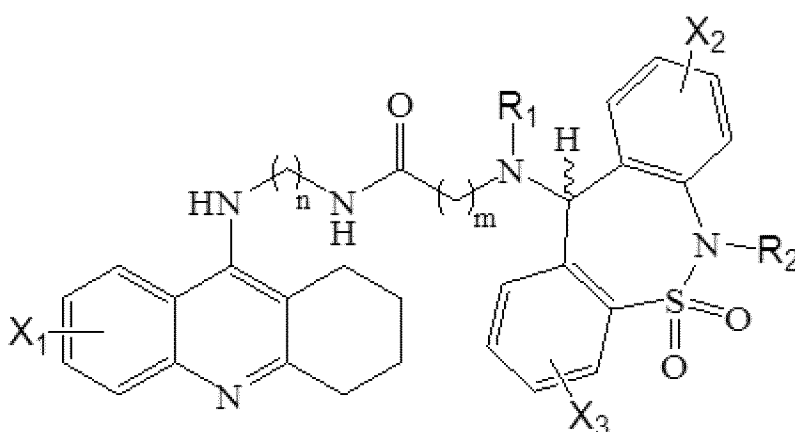
em que:

- X_1 , X_2 e X_3 são selecionados, independentemente, entre os grupos dos halogênios, OH, OR, HS, SR, NH_2 , NH, NHR ou outros grupos retiradores ou doadores de elétrons, onde R é selecionado entre os grupos alquila, arila, alila, benzila ou propargila;

- R_1 e R_2 são selecionados, independentemente, entre os grupos H, alquila, arila, alila benzila ou propargila; e

- "n" e "m" podem variar entre 1 e 20.

[0035] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta uma composição farmacêutica que compreende moléculas com núcleo híbrido com a seguinte estrutura:



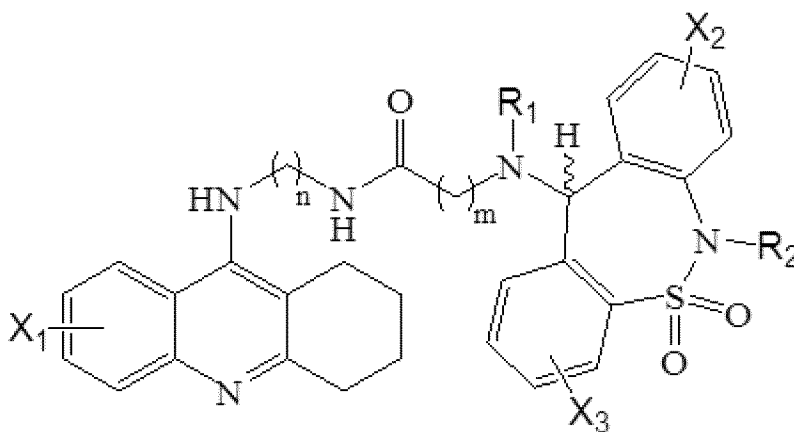
em que:

- X_1 , X_2 e X_3 são selecionados, independentemente, entre os grupos dos halogênios, OH, OR, HS, SR, NH_2 , NH, NHR ou outros grupos retiradores ou doadores de elétrons, onde R é selecionado entre os grupos alquila, arila, alila, benzila ou propargila;

- R_1 e R_2 são selecionados, independentemente, entre os grupos H, alquila, arila, alila benzila ou propargila; e

- “n” e “m” podem variar entre 1 e 20.

[0036] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta um processo de síntese de moléculas com núcleo híbrido, em que o processo compreende uma reação de acoplamento, e em que as moléculas com núcleo híbrido possuem a seguinte estrutura:



em que:

- X_1 , X_2 e X_3 são selecionados, independentemente, entre os grupos dos halogênios, OH, OR, HS, SR, NH_2 , NH, NHR ou outros grupos retiradores ou doadores de elétrons, onde R é selecionado entre os grupos alquila, arila, alila, benzila ou propargila;

- R_1 e R_2 são selecionados, independentemente, entre os grupos H, alquila, arila, alila benzila ou propargila; e

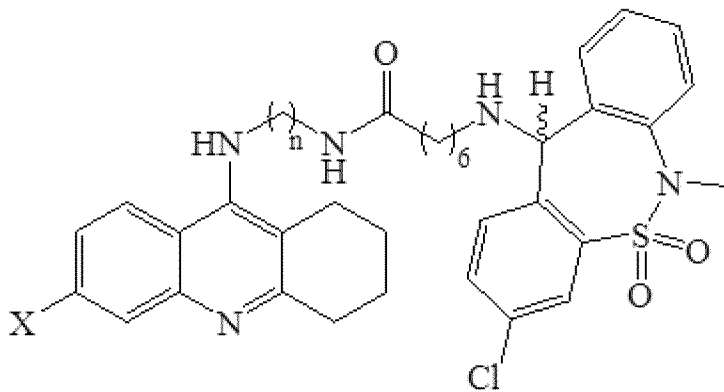
- “n” e “m” podem variar entre 1 e 20.

[0037] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta o uso das ditas moléculas com núcleo híbrido para inibir enzimas colinesterases.

[0038] Em um quinto objeto, a presente invenção apresenta o uso das ditas moléculas com núcleo híbrido para diminuir a secreção de pelo menos uma proteína oriunda da glia.

[0039] Em um sexto objeto, a presente invenção apresenta o uso das ditas moléculas com núcleo híbrido na preparação de um medicamento para tratar a Doença de Alzheimer.

[0040] Em uma concretização, a presente invenção apresenta as ditas moléculas com núcleo híbrido com a seguinte estrutura:



em que:

- X é Cl ou hidrogênio; e
- "n" varia entre 3 e 5.

[0041] Em uma concretização, a presente invenção apresenta as ditas moléculas com núcleo híbrido em que as ditas moléculas inibem enzimas colinesterases.

[0042] Em uma concretização, a presente invenção apresenta as ditas moléculas com núcleo híbrido em que as ditas moléculas são capazes de diminuir a secreção de pelo menos uma proteína oriunda da glia.

[0043] Em uma concretização, a presente invenção apresenta as ditas moléculas com núcleo híbrido em que as ditas moléculas são capazes de diminuir a secreção de S100B.

[0044] Em uma concretização, a presente invenção apresenta as ditas moléculas com núcleo híbrido por ser utilizada na preparação de um medicamento para tratar a Doença de Alzheimer.

[0045] Em uma concretização, a presente invenção apresenta uma composição farmacêutica que compreende as ditas moléculas com núcleo híbrido em uma concentração de 0,01 μM até 0,1 μM .

[0046] Em uma concretização, a presente invenção apresenta uma composição farmacêutica que compreende as ditas moléculas com núcleo híbrido que é capaz de inibir enzimas colinesterases.

[0047] Em uma concretização, a presente invenção apresenta uma composição farmacêutica que compreende as ditas moléculas com núcleo híbrido que é capaz de diminuir a secreção de pelo menos uma proteína oriunda da glia.

[0048] Em uma concretização, a presente invenção apresenta uma composição farmacêutica que compreende as ditas moléculas com núcleo híbrido que é capaz de diminuir a secreção de S100B.

[0049] Em uma concretização, a presente invenção apresenta uma composição farmacêutica que compreende as ditas moléculas com núcleo híbrido por ser utilizada na preparação de um medicamento para tratar a Doença de Alzheimer.

[0050] Em uma concretização, a presente invenção apresenta uma composição farmacêutica que compreende as ditas moléculas com núcleo híbrido, em que a composição farmacêutica compreende um veículo farmaceuticamente aceitável.

[0051] Em uma concretização, a presente invenção apresenta o dito processo de síntese de moléculas com núcleo híbrido, em que o processo compreende uma reação de acoplamento e um reagente de acoplamento.

[0052] Em uma concretização, a presente invenção apresenta o dito processo de síntese de moléculas com núcleo híbrido, em que o processo compreende uma reação de acoplamento e um reagente de acoplamento selecionado entre 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e dicitloexilcarbodiimida (DCC).

[0053] Em uma concretização, a presente invenção apresenta o dito processo de síntese de moléculas com núcleo híbrido, em que o processo compreende uma reação de acoplamento, o reagente de acoplamento 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e o aditivo 1-hidroxi-1H-benzotriazol (HOBt).

[0054] Em uma concretização, a presente invenção apresenta o dito processo de síntese de moléculas com núcleo híbrido, em que o processo compreende uma reação de acoplamento, o reagente de acoplamento dicitcloexilcarbodiimida (DCC) e o catalisador dimetilaminopiridina (DMAP).

[0055] Em uma concretização, a presente invenção apresenta o dito processo de síntese de moléculas com núcleo híbrido, em que o processo compreende uma reação de acoplamento em um solvente selecionado entre clorofórmio, diclorometano, tolueno, acetonitrila, dimetilformamida (DMF) e tetraidrofurano (THF).

[0056] Em uma concretização, a presente invenção apresenta o uso da dita molécula com núcleo híbrido para diminuir a secreção de S100B.

[0057] A composição farmacêutica, em um veículo farmacologicamente aceitável, poderia auxiliar no tratamento de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer, e também com uso multifatorial para outros distúrbios, incluindo estresse oxidativo, que possui efeito neurodegenerativo.

Exemplos:

[0058] Neste trabalho, os fármacos tacrina e tianeptina foram escolhidos como núcleos estruturais para a síntese de novos híbridos tacrina-tianeptina, com o objetivo de agregar novas interações enzima-substrato e também agregar em um mesmo composto diferentes grupos farmacofóricos bioativos.

[0059] O processo de preparo de híbridos de acordo com a presente invenção baseia-se na reação de acoplamento entre tianeptina e 9-alkilamino-1,2,3,4-tetraidroacridinas, na presença de um reagente de acoplamento, como por exemplo 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) juntamente com o aditivo 1-hidroxi-1H-benzotriazol (HOBt) ou ainda o uso do reagente

dicicloexilcarbodiimida (DCC) empregando-se dimetilaminopiridina (DMAP) como catalisador.

[0060] Inicialmente, avaliou-se os híbridos tacrina-tianeptina como inibidores das enzimas colinesterases AChE e BuchE. Foi avaliado também o impacto desses compostos sobre a integridade celular através da medição da enzima Desidrogenase Láctica (LDH). Além disso, foi medido o efeito dos compostos sobre a secreção de S100B.

Obtenção dos híbridos tacrina-tianeptina 1a, 1b e 1c

Extração de Tianeptina (STABLON)

[0061] A tianeptina foi extraída de comprimidos Stablon[®]. Os comprimidos de Stablon foram macerados, dissolvidos em tetraidrofurano (THF) e mantidos sob agitação por 30 minutos. A solução foi filtrada e a seguir concentrada em um evaporador rotatório. O produto bruto resultante foi purificado por cromatografia em coluna com sílica gel, empregando como mistura eluente CHCl₃-MeOH-NH₄OH com eluição no modo gradiente; proporção inicial 93:6,5:0,5 até a proporção 80:19,5:0,5. Observou-se por Ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono que a tianeptina foi obtida em alto grau de pureza (Figura 3).

[0062] A mistura de tianeptina (0,20 mmol), 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, 0,20 mmol) e 1-hidróxi-1*H*-benzotriazol (HOBt, 0,20 mmol) em CH₂Cl₂ anidro (1 mL) foi mantida sob agitação e atmosfera inerte por 2 h. Então, adicionou-se a solução das 9-alkilamino-1,2,3,4-tetraidroacridinas **2a-2c** (0,18 mmol) em CH₂Cl₂ anidro (0,5 mL) sobre a mistura reacional, e a reação permaneceu sob agitação e atmosfera inerte por mais 20 h. Decorrido este período, adicionou-se água (0,2 mL), secou-se com Na₂SO₄ anidro e filtrou-se. O solvente foi removido à pressão reduzida e o produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna em sílica gel empregando como mistura eluente hexano-acetato de etila-trietilamina (eluição no modo gradiente; proporção inicial 85:14:1 até a proporção 0:99:1). Os produtos foram obtidos em rendimento de 85-88 % e posteriormente

caracterizados pelos métodos espectroscópicos adequados, sendo que, alguns exemplos representativos estão mostrados nas Figuras 4 a 6.

[0063] Descreve-se na Figura 7, o processo de obtenção dos intermediários 2a-2c, via reação de acoplamento entre 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridinas e 1,n-alcanodiaminas na presença de KI como catalisador e *n*-pentanol como solvente, sob refluxo por 18 h, conforme protocolo da literatura (Luo, W.; Li, Y. P.; He, Y.; Huang, S. L.; Tan, J. H.; Ou, T. M.; Li, D.; Gu, L. Q.; Huang, Z. S., *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 763).

Híbrido tacrina-tianeptina 1a

[0064] Sólido amarelo; rendimento: 75%; ponto de fusão 75-76 °C; IV (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3321, 3065, 2929, 1649, 1556, 1490, 1331, 1153; RMN-¹H (CDCl₃) δ 7,95 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz), 7,94 (d, 1H, *J* = 2,1 Hz), 7,84 (d, 1H, *J* = 2,1 Hz), 7,48-7,22 (m, 7H), 6,00 (t, 1H, *J* = 6,1 Hz), 4,96 (s, 1H), 4,94 (sl, 1H), 3,48-3,28 (m, 4H), 3,32 (s, 3H), 3,04-2,96 (m, 2H), 2,76-2,66 (m, 2H), 2,50-2,34 (m, 2H), 2,28 (sl, 1H), 2,15 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz), 1,94-1,82 (m, 4H), 1,71 (qn, 2H, *J* = 6,3 Hz), 1,66-1,52 (m, 2H), 1,50-1,37 (m, 2H), 1,32-1,18 (m, 4H); RMN-¹³C (CDCl₃) δ 174,2; 159,9; 150,8; 148,1; 140,2; 138,7; 138,4; 136,9; 134,3; 134,0; 132,4; 131,6; 130,6; 129,5; 128,6; 128,2; 128,1; 127,5; 124,5; 118,8; 116,6; 66,6; 48,1; 45,2; 39,0; 36,7; 36,5; 34,1; 31,6; 29,9; 29,2; 27,0; 25,8; 25,2; 23,1; 22,8;

Híbrido tacrina-tianeptina 1b

[0065] Sólido amarelo; rendimento: 88%; ponto de fusão 45-47 °C; IV (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3350, 3409, 3061, 2927, 1639, 1560, 1140, 1107, 763; RMN-¹H (CDCl₃) δ 7,94 (d, 1H, *J* = 1,8 Hz), 7,92 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz), 7,88 (d, 1H, *J* = 8,7 Hz), 7,60-7,48 (m, 1H), 7,46-7,24 (m, 7H), 5,94 (t, 1H, *J* = 5,8 Hz), 4,96 (s, 1H), 3,45 (t, 2H, *J* = 6,9 Hz), 3,33 (s, 3H), 3,28-3,18 (m, 2H), 3,10-2,98 (m, 2H), 2,72-2,60 (m, 2H), 2,48-2,38 (m, 2H), 2,08 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz), 1,95-1,80 (m, 4H), 1,70-1,36 (m, 8H), 1,36-1,17 (6H); RMN-¹³C (CDCl₃) δ 173,3; 158,5; 150,7; 147,4; 140,2; 138,6; 138,5; 136,9; 134,2; 132,3; 131,5; 130,4; 129,4;

128,6; 128,4; 128,2; 128,0; 123,8; 122,9; 120,3; 116,3; 66,4; 49,0; 48,0; 39,1; 38,9; 36,6; 34,0; 29,9; 29,1; 29,0; 27,2; 27,0; 25,7; 24,9; 23,1; 22,8.

Híbrido tacrina-tianeptina 1c

[0066] Sólido amarelo; rendimento: 68%; ponto de fusão 62-63 °C; IV (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3396, 3061, 2929, 1649, 1560, 1329, 1153, 763; RMN-¹H (CDCl₃) δ 7,99-7,91 (m, 2H), 7,89 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,58-7,48 (m, 1H), 7,48-7,22 (m, 7H), 5,89 (sl, 1H), 4,97 (s, 1H), 4,00 (sl, 1H), 3,45 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz), 3,33 (s, 3H), 3,24-3,14 (m, 2H), 3,10-2,98 (m, 2H), 2,72-2,50 (m, 3H), 2,41 (t, 2H, $J = 5,7$ Hz), 2,09 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz), 1,98-1,80 (m, 4H), 1,72-1,34 (m, 10H), 1,34-1,18 (4H); RMN-¹³C (CDCl₃) δ 173,2; 158,4; 150,9; 147,3; 140,2; 138,6; 138,5; 136,9; 134,2; 132,3; 131,5; 130,4; 129,4; 128,5; 128,4; 128,2; 128,0; 123,7; 123,0; 120,2; 115,9; 66,4; 49,3; 48,0; 39,2; 38,9; 36,6; 34,0; 31,4; 29,9; 29,5; 29,1; 27,0; 25,7; 24,9; 24,3; 23,1; 22,8.

Avaliação da atividade das enzimas AChE e BuChE

[0067] A atividade anticolinesterásica foi determinada através do método colorimétrico descrito por ELLMAN e colaboradores (Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Featherstone, R. M., *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88), com modificações laboratoriais para microplacas, empregando-se tacrina e bis (7)-tacrina como controles inibitórios. Como fonte das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE), foram empregados sobrenadante de homogenato de cérebro de ratos e plasma humano, respectivamente. Para tanto, ratos Wistar machos adultos (2-3 meses de idade) fornecidos pelo Departamento de Bioquímica da UFRGS, mantidos em caixas de plástico com livre acesso a água e alimento em ciclos de claro/escuro de 12 horas (07:00 – 19:00 h), em ambiente com temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ$ C) e umidade monitorada foram utilizados. Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

[0068] Para a obtenção da fonte de AChE, os ratos foram decapitados, os córtices foram rapidamente dissecados e homogeneizados em tampão Tris-

HCl 10 mM, pH 7,2 contendo sacarose 160 mM. Os homogenatos foram então centrifugados a 10,000 x *g* durante 10 min a 4° C e aliqotados para os experimentos enzimáticos, sendo estocados a -20° C. Para a fonte de BuChE, plasma humano foi obtido de voluntários sadios (24-32 anos de idade) de ambos os sexos com consentimento escrito, sendo que o protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As amostras de sangue foram centrifugadas a 1000x *g* durante 15 minutos à temperatura ambiente em tubos contendo heparina, sendo separado o plasma, que foi aliqotado para os experimentos enzimáticos, então estocados a -20° C até seu emprego. A concentração de proteínas para ambas as amostras enzimáticas foi medida através da modificação de Peterson para o método de Lowry (Peterson, G. L., *Anal. Biochem.* **1977**, 83, 346), empregando-se albumina bovina como padrão.

[0069] Para a determinação da atividade da AChE, foram empregados DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) na concentração de 10 mM, como reagente cromogênico, o substrato iodeto de acetiltiocolina (0,8 mM), solução da enzima AChE e as moléculas a serem testadas, solubilizadas em DMSO a 1% (concentração final máxima). Para a determinação da atividade da BuChE, os ensaios foram conduzidos de maneira semelhante, exceto pela utilização de BuChE como fonte enzimática e de iodeto de *S*-butiriltiocolina (0,8 mM) como substrato. As incubações dos produtos na presença das enzimas foram todas realizadas em temperatura ambiente e as absorvâncias do ânion amarelado do ácido 5-tio-2-nitrobenzoico monitoradas a 415 nm em um SPECTRAMax 190 durante 6 minutos, em intervalos de 30 segundos. Os valores de IC₅₀ foram determinados através dos gráficos de log de atividade (inibição) vs resposta, processados através de um software (GraFit 6.0). Todos os resultados foram calculados como médias ± DP de 3 experimentos independentes, cada um desenvolvido em triplicata.

Avaliação dos níveis da proteína de S100B e enzima Desidrogenase Láctica (LDH)

Preparação e incubação de fatias cerebrais

[0070] Os ratos foram decapitados, os hipocampos foram dissecados rapidamente e as secções transversais (300 μM) foram rapidamente obtidas utilizando um cortador de tecido McIlwain. Uma fatia por poço foi colocada em uma placa de cultura de 24 poços. As fatias foram incubadas em meio fisiológico oxigenado contendo NaCl 120 mM, KCl 2,0 mM, CaCl_2 1,0 mM, MgSO_4 1,0 mM, 25,0 mM HEPES, 1,0 mM de KH_2PO_4 e 10,0 mM de glucose, pH 7,4 a temperatura ambiente. O meio foi trocado a cada 15 min por meio fresco. Após um período de estabilização de 120 min, as fatias foram incubadas em meio com os compostos híbridos análogos da tacrina-tianeptina (**1b** e **1c**) ou tianeptina nas concentrações de 0,03 μM ; 0,1 μM ou 0,3 μM durante 1 h a 30° C.

ELISA para S100B

[0071] Foi verificado se a secreção de S100B em fatias hipocampais agudas pode ser alterada pelos compostos análogos híbridos tacrina-tianeptina **1b** e **1c** (Figura 8) e/ou por tianeptina nas concentrações de 0,03 μM ; 0,1 μM ou 0,3 μM .

[0072] A concentração de S100B foi determinada no meio de incubação de fatias em 1 h. Níveis de S100B foram determinados por ELISA, utilizando 50 μL de amostra e 50 μL de tampão Tris, incubados durante 2 h em uma placa de microtitulação previamente revestidas com anticorpo monoclonal anti-S100B (SH-B1, da Sigma). Anti-S100 anticorpo policlonal (da DAKO) foi incubado durante 30 min e, em seguida, anticorpos anti-rabbit conjugado com peroxidase foi adicionada durante mais 30 min. A reação de cor com o-fenilenodiamina foi medida a 492 nm. A curva padrão de S100B variou 0,002-1 ng / mL.

Determinação da Desidrogenase Láctica (LDH) no meio de incubação

[0073] Além disso, é fundamental a determinação do impacto desses compostos sobre a integridade celular, para tanto a enzima Desidrogenase Láctica (LDH) foi dosada no meio de incubação de fatias hipocampais agudas. A

LDH se encontra presente em todas as células do organismo, sendo que concentrações aumentadas indicam maior incidência de rompimento celular.

[0074] Ensaio da lactato desidrogenase foi realizado em 150 μ L de meio extracelular, utilizando um ensaio cinético comercial da Bioclin (QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda.).

Análise estatística

[0075] Os dados paramétricos são relatados como médias \pm erro padrão e foram analisados por ANOVA de uma via (seguido de teste de Dunnett). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

[0076] Os resultados demonstraram que apenas a tianeptina, nas concentrações mais altas (0,1 μ M e 0,3 μ M), aumentou a concentração de LDH no meio de incubação das fatias ($109,7 \pm 5,5$ % e $110,8 \pm 6,7$ %, em relação ao controle; $p = 0,0374$), contudo tanto o composto 1c na concentração de 0,03 μ M ($67,4 \pm 13,6$ %; $p = 0,0327$), quanto o composto 1b nas concentrações de 0,03 μ M e 0,1 μ M ($72,7 \pm 14,8$ % e $74,9 \pm 11,7$ %, respectivamente; $p = 0,0380$) foram hábeis em diminuir a secreção de S100B em relação ao controle. Os resultados são bastante interessantes, uma vez que não foi encontrada incidência de diminuição da integridade celular com a utilização dos análogos, mesmo nas concentrações mais altas, diferentemente da tianeptina. Além disso, dois dos três análogos testados (1c e 1b) foram capazes de diminuir a concentração basal de S100B, que por sua vez encontra-se aumentada tanto na Depressão Maior, quanto nos primeiros estágios da doença de Alzheimer.

Modelagem Molecular de Inibidores de Acetilcolinesterase

[0077] Atualmente existem diversas estruturas tridimensionais da enzima acetilcolinesterase (AChE) disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB) complexadas com uma ampla variedade de inibidores (Bernstein, F. C.; Koetzle, T. F.; Williams, G. J.; Meyer Jr., E. F.; Brice, M. D.; Rodgers, J. R. et al.; The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures, *J. Mol. Biol.* **1977**, *112*, 535). Devido à significativa variação

conformacional observada em regiões específicas da cavidade de ligação da acetilcolina (ACh) do sítio aniônico periférico (PAS, *peripheral anionic site*), selecionamos três estruturas representantes para realizar estudos de *ensemble docking* (Johnson G.; Moore S. W. *Curr. Pharm. Des.* **2006** 12 217). Esta metodologia consiste na realização do atracamento molecular em cada estrutura representante com o objetivo de incluir implicitamente a flexibilidade proteica. As estruturas selecionadas foram 1zgc (*Torpedo Californica*) (Haviv, H.; Wong, D. M.; Greenblatt, H. M.; Carlier, P. R.; Pang, Y.-P; Silman, I.; et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 11029. doi:10.1021/ja051765f.), 2ckm (*Torpedo Californica*) (Rydberg, E. H.; Brumshtein, B.; Greenblatt, H. M.; Wong, D. M., Shaya, D.; Williams L. .D., et al., *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 5491. doi:10.1021/jm060164b).e 1q83 (*Mus musculus*) (Bourne, Y.; Kolb, H. C.; Radic, Z.; Sharpless, K. B.; Taylor, P.; Marchot, P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, 101, 1449. doi:10.1073/pnas.0308206100).

[0078] Não foram selecionadas estruturas de *Homo sapiens* por não haver complexos da HsAChE com inibidores de tamanho similar aos que estão sendo avaliados. Todos os inibidores das três estruturas representantes (i) interagem no sítio catalítico, (ii) interagem com o sítio aniônico periférico (PAS), e (iii) são análogos à tacrina. Quatro moléculas de águas estruturais, conservadas nas três estruturas representantes, foram utilizadas durante os estudos de atracamento molecular.

[0079] Os isômeros, estados de protonação e interações dos ligantes foram preditos com a ferramenta LigPrep/Epik. As diferentes conformações da AChE foram preparadas com a ferramenta PrepWizard respeitando o estado de protonação dos resíduos de aminoácido do sítio ativo descritos na literatura: Glu202 e Glu327 carregados negativamente e His440 neutra em ND1. Posteriormente foi realizada a otimização da rede de ligações de hidrogênio entre proteína e inibidor.

[0080] Os estudos de *ensemble docking* foram realizados com os programas de atracamento molecular Glide e DockThor. A seleção da melhor

conformação para cada inibidor e isômero foi feita de acordo com o valor de *glide Emodel*, e a energia utilizada para comparação entre diferentes isômeros e inibidores foi o *docking score*.

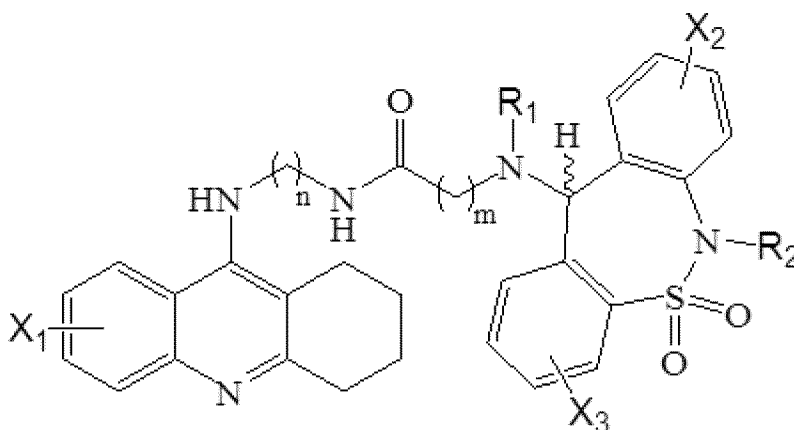
[0081] Os modos de ligação obtidos no estudo de *ensemble docking* são similares para todos os inibidores testados em AChE. Em todos os casos, o grupamento análogo à tacrina mantém as interações já descritas na literatura para este inibidor: (i) interação do tipo π -stacking com Trp84 e Phe330, e (ii) ligação de hidrogênio do nitrogênio protonado aromático com o oxigênio carbonílico da cadeia principal da His440. A maior variabilidade dos modos de ligação entre os inibidores se encontra na região da tianeptina.

[0082] O isômero *R* do inibidor **1a** teve melhor modo de ligação no complexo 2ckm (-16,989 kcal/mol, Figura **Figura 9**) em que o grupo fenila clorado da tianeptina faz π -stacking com Trp279 e Tyr70. A amina próxima à tacrina faz ligação de hidrogênio com uma água. Não foram observadas ligações com hidrogênio do grupo amida com os resíduos de tirosina localizados nesta região.

[0083] O isômero **S** possui o melhor modo de ligação com a conformação da enzima no complexo 1q83 (-17,735 kcal/mol, Figura 10), em que são previstas interações do tipo cátion- π do nitrogênio protonado da tianeptina com Trp279, π -stacking com Tyr70 e T-stacking com Tyr334. Já a amida do *linker* faz ligação de hidrogênio com Tyr121 e Tyr334. De acordo com os resultados de *ensemble docking*, o halogênio, na porção tacrina, está localizado em um sítio hidrofóbico adjacente, formado pelos resíduos de aminoácido Trp432, Met436, Ile439 e Pro446. As interações por ligação de hidrogênio do grupo amida com os resíduos de aminoácido Tyr121 e/ou Tyr334 só estão presentes nos inibidores com *linker* com até quatro átomos de carbono entre o núcleo tacrina e a função amida.

Reivindicações

1. MOLÉCULAS COM NÚCLEO HÍBRIDO, **caracterizadas** por possuir a estrutura:



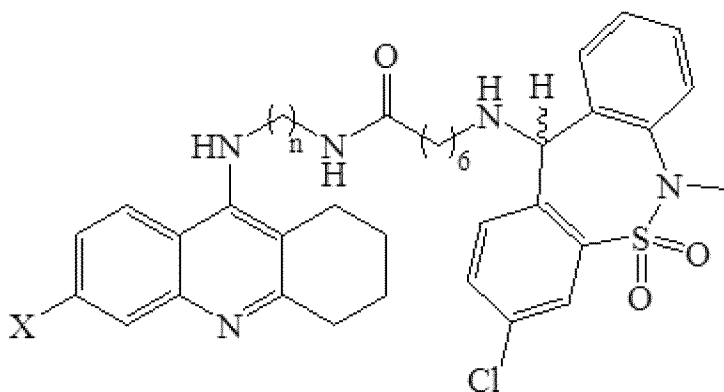
em que:

- X_1 , X_2 e X_3 são selecionados, independentemente, entre os grupos dos halogênios, OH, OR, HS, SR, NH_2 , NH, NHR ou outros grupos retiradores ou doadores de elétrons, onde R é selecionado entre os grupos alquila, arila, alila, benzila ou propargila;

- R_1 e R_2 são selecionados, independentemente, entre os grupos H, alquila, arila, alila benzila ou propargila; e

- "n" e "m" podem variar entre 1 e 20

2. MOLÉCULAS COM NÚCLEO HÍBRIDO de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por possuir a estrutura:



em que:

- X é Cl ou hidrogênio; e

- "n" varia entre 3 e 5

3. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA **caracterizada** por compreender moléculas com núcleo híbrido conforme definido na reivindicação 1

4. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada** por compreender as ditas moléculas com núcleo híbrido em uma concentração de 0,01 μM até 0,1 μM

5. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada** por compreender um veículo farmacêuticamente aceitável

6. PROCESSO DE SÍNTESE DE MOLÉCULAS COM NÚCLEO HÍBRIDO conforme definida na reivindicação 1, **caracterizado** por compreender uma reação de acoplamento

7. PROCESSO DE SÍNTESE de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** por compreender um reagente de acoplamento

8. PROCESSO DE SÍNTESE de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo dito reagente de acoplamento ser selecionado entre 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e dicitloexilcarbodiimida (DCC)

9. PROCESSO DE SÍNTESE de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** por compreender 1-hidroxi-1H-benzotriazol (HOBt) se o reagente de acoplamento for 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC)

10. PROCESSO DE SÍNTESE de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** por compreender dimetilaminopiridina (DMAP) se o dito reagente de acoplamento for dicitloexilcarbodiimida (DCC)

11. PROCESSO DE SÍNTESE de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** por compreender um solvente selecionado entre clorofórmio, diclorometano, tolueno, acetonitrila, dimetilformamida (DMF) e tetraidrofurano (THF)

12. USO DE MOLÉCULAS COM NÚCLEO HÍBRIDO conforme definido na reivindicação 1, **caracterizada** por ser para inibir enzimas colinesterases

13. USO DE MOLÉCULAS COM NÚCLEO HÍBRIDO conforme definido na reivindicação 1, **caracterizado** por ser para diminuir a secreção de pelo menos uma proteína oriunda da glia

14. USO DE MOLÉCULAS COM NÚCLEO HÍBRIDO de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pela dita proteína oriunda da glia ser S100B

15. USO DE MOLÉCULAS COM NÚCLEO HÍBRIDO conforme definido na reivindicação 1, **caracterizado** por ser na preparação de um medicamento para tratar a Doença de Alzheimer

FIGURAS

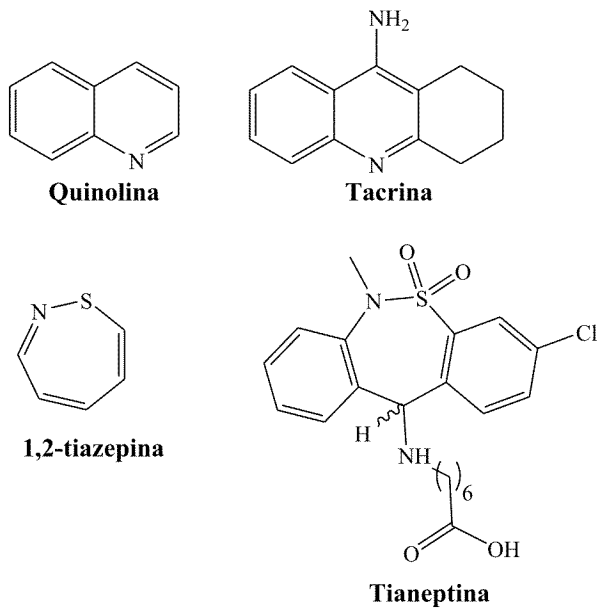


Figura 1

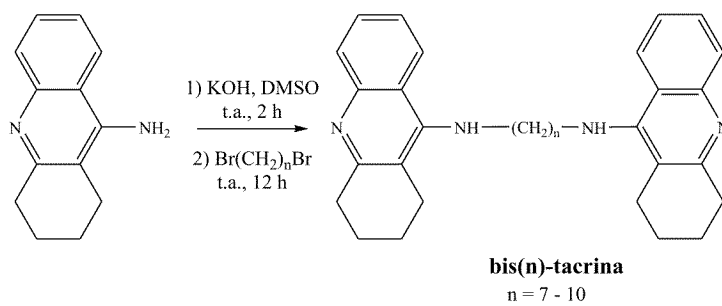


Figura 2

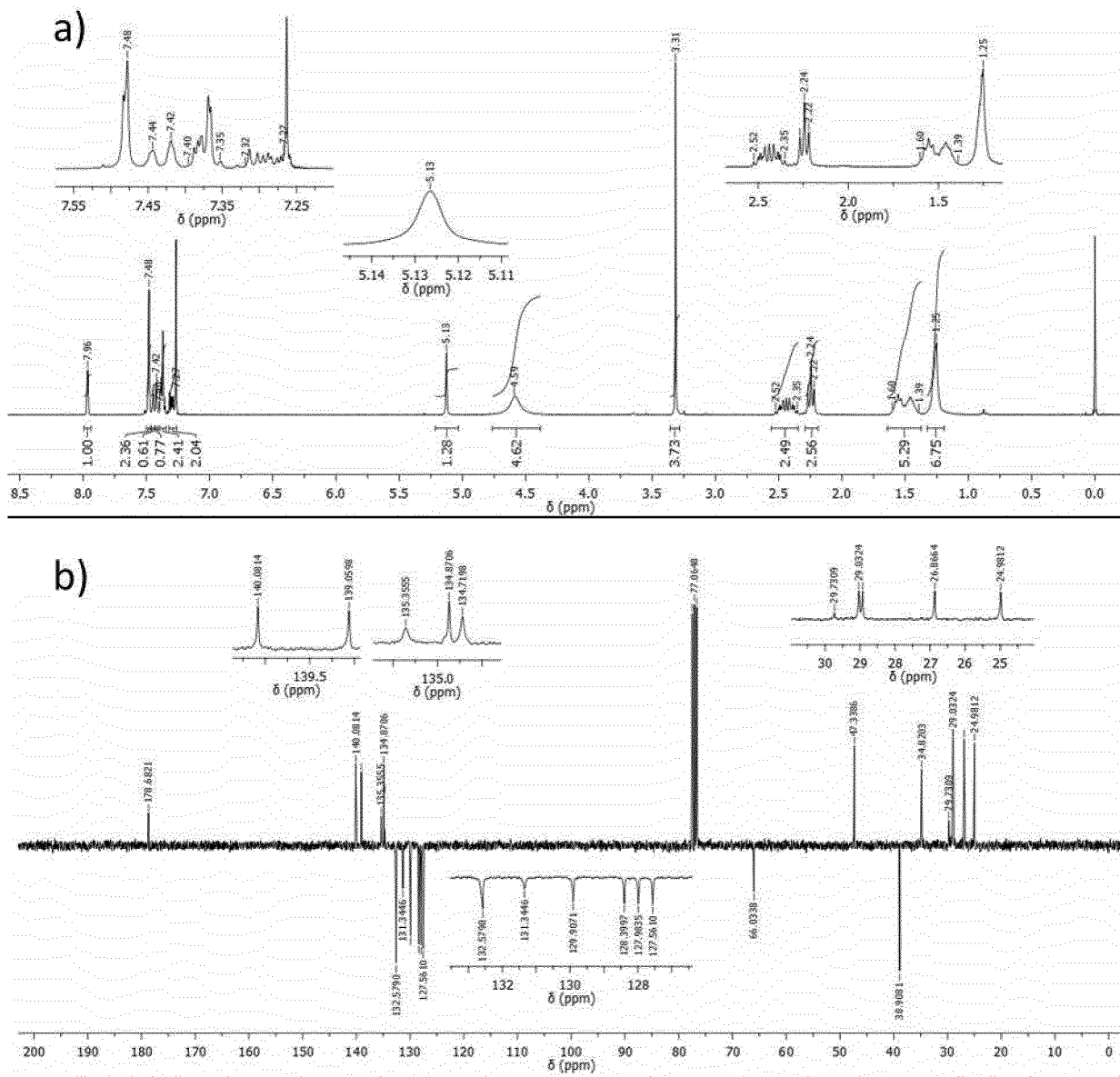


Figure 3

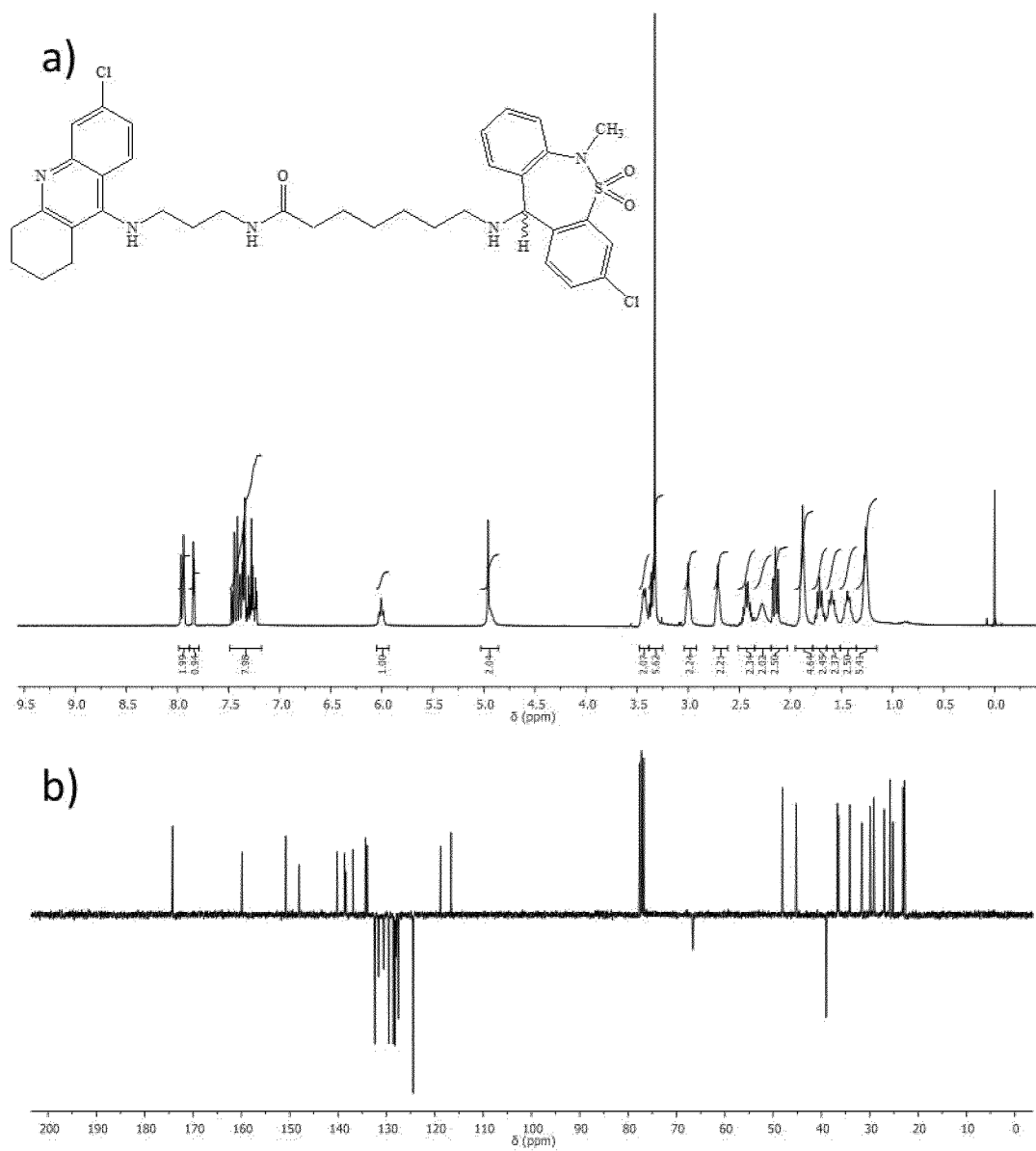


Figura 4

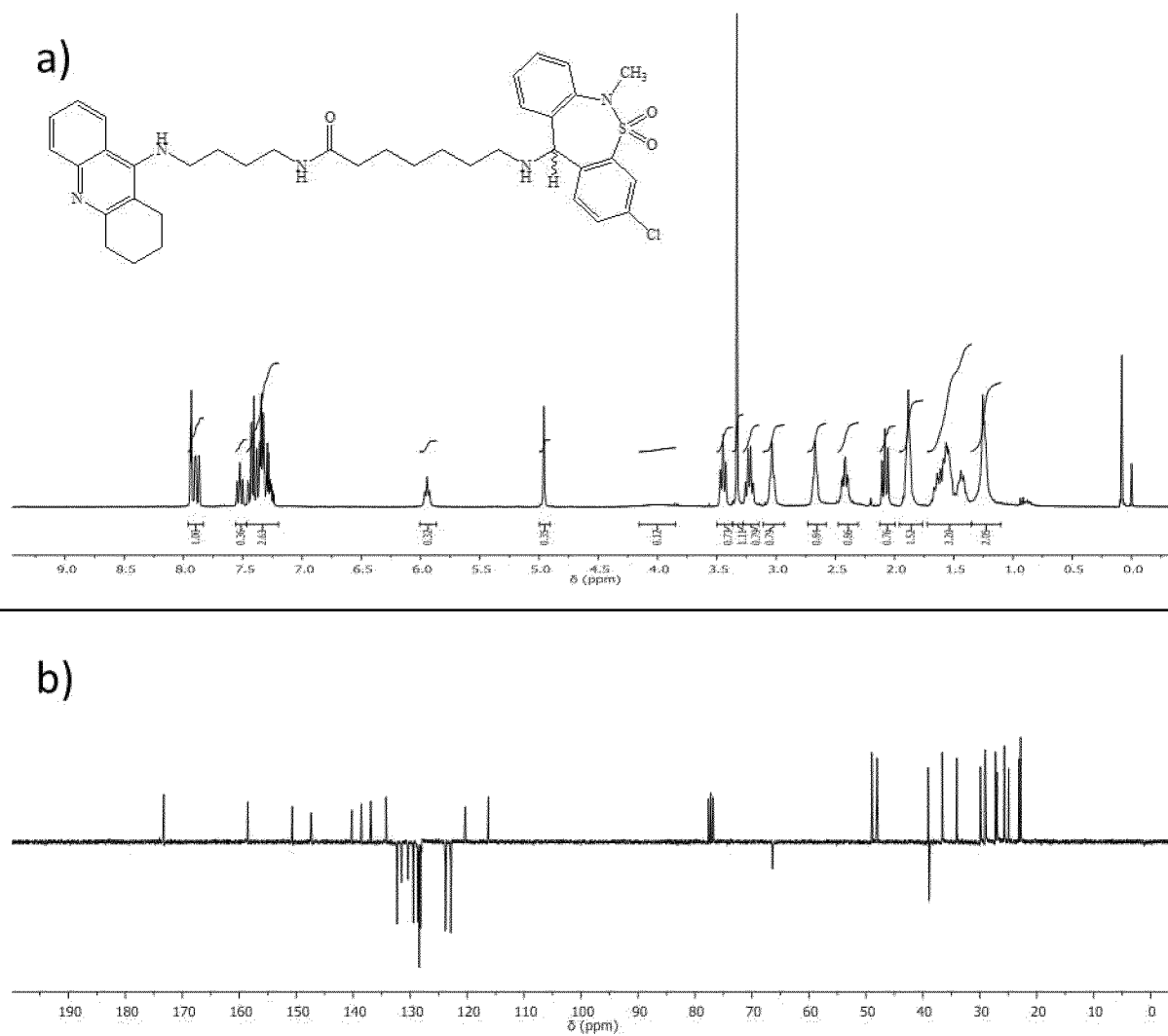


Figura 5

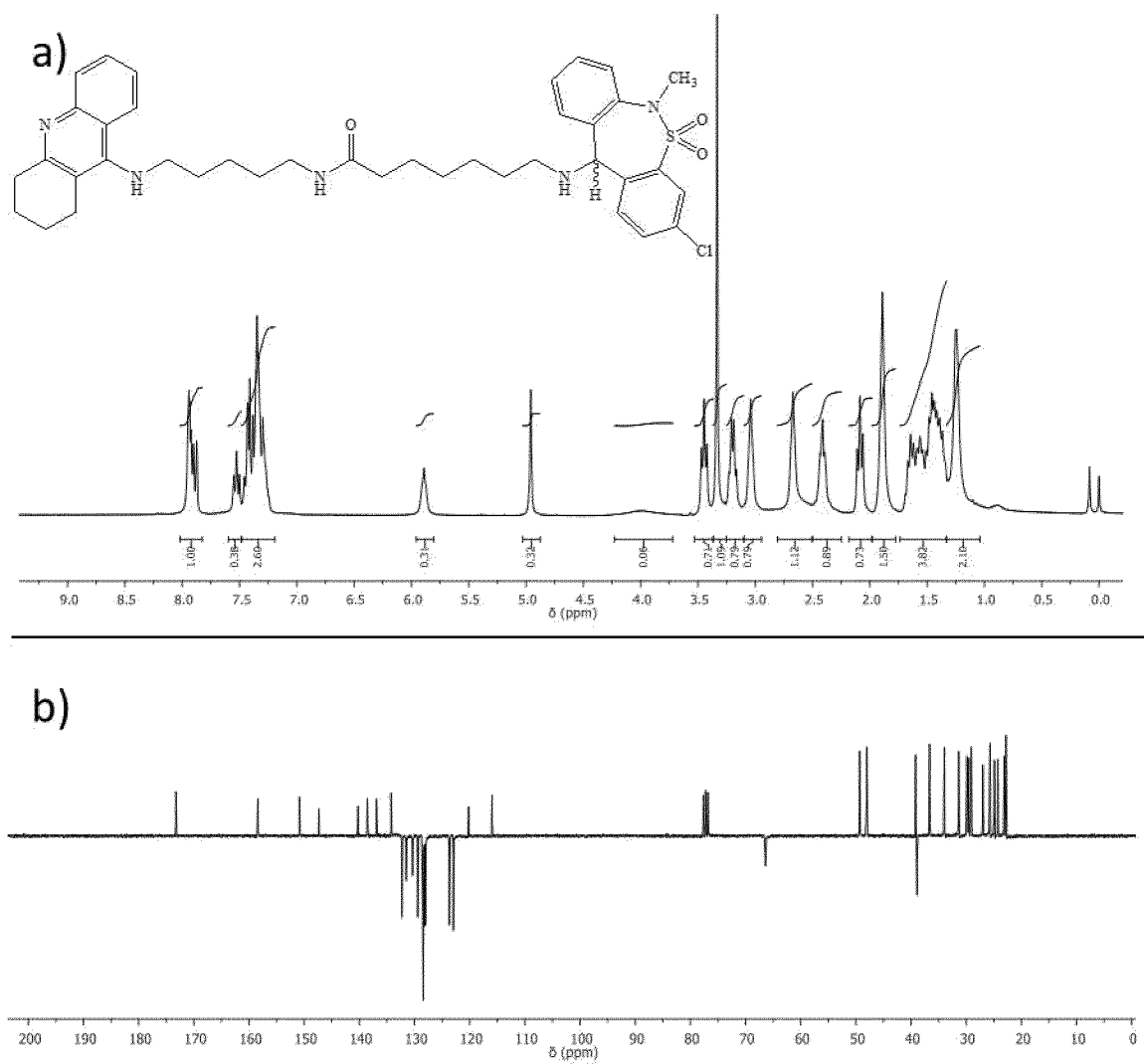


Figura 6

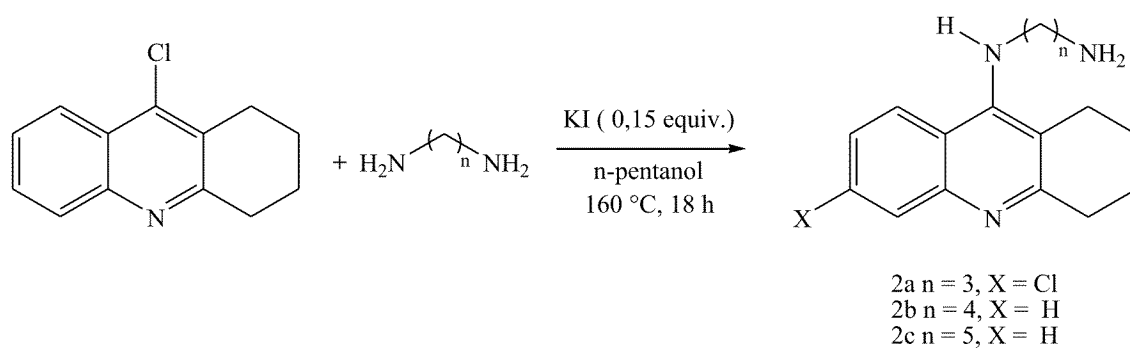


Figura 7

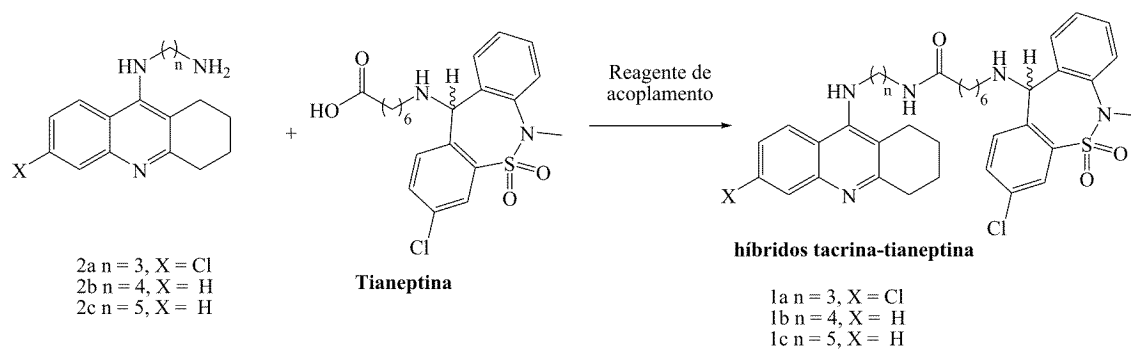


Figura 8

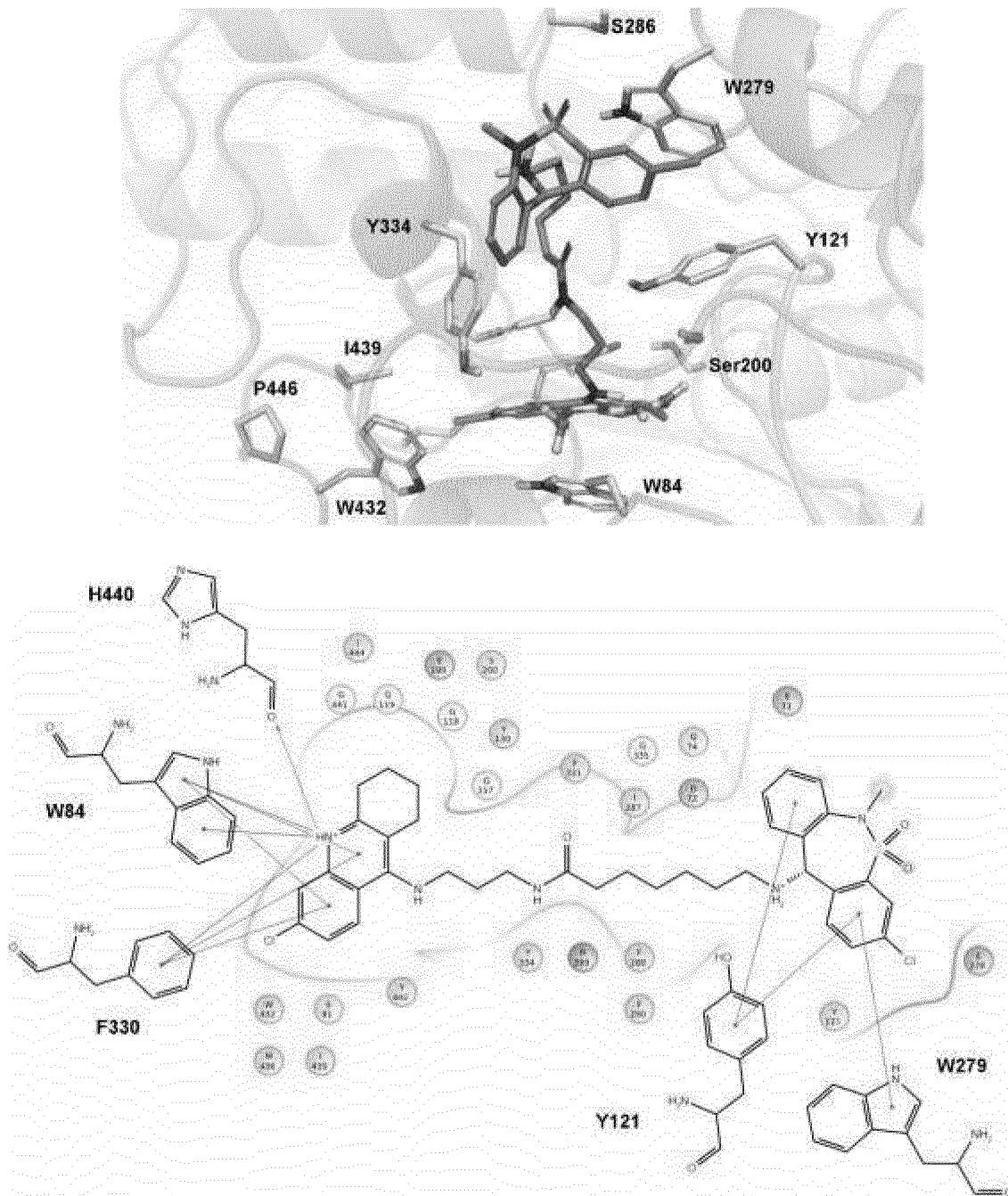


Figura 9

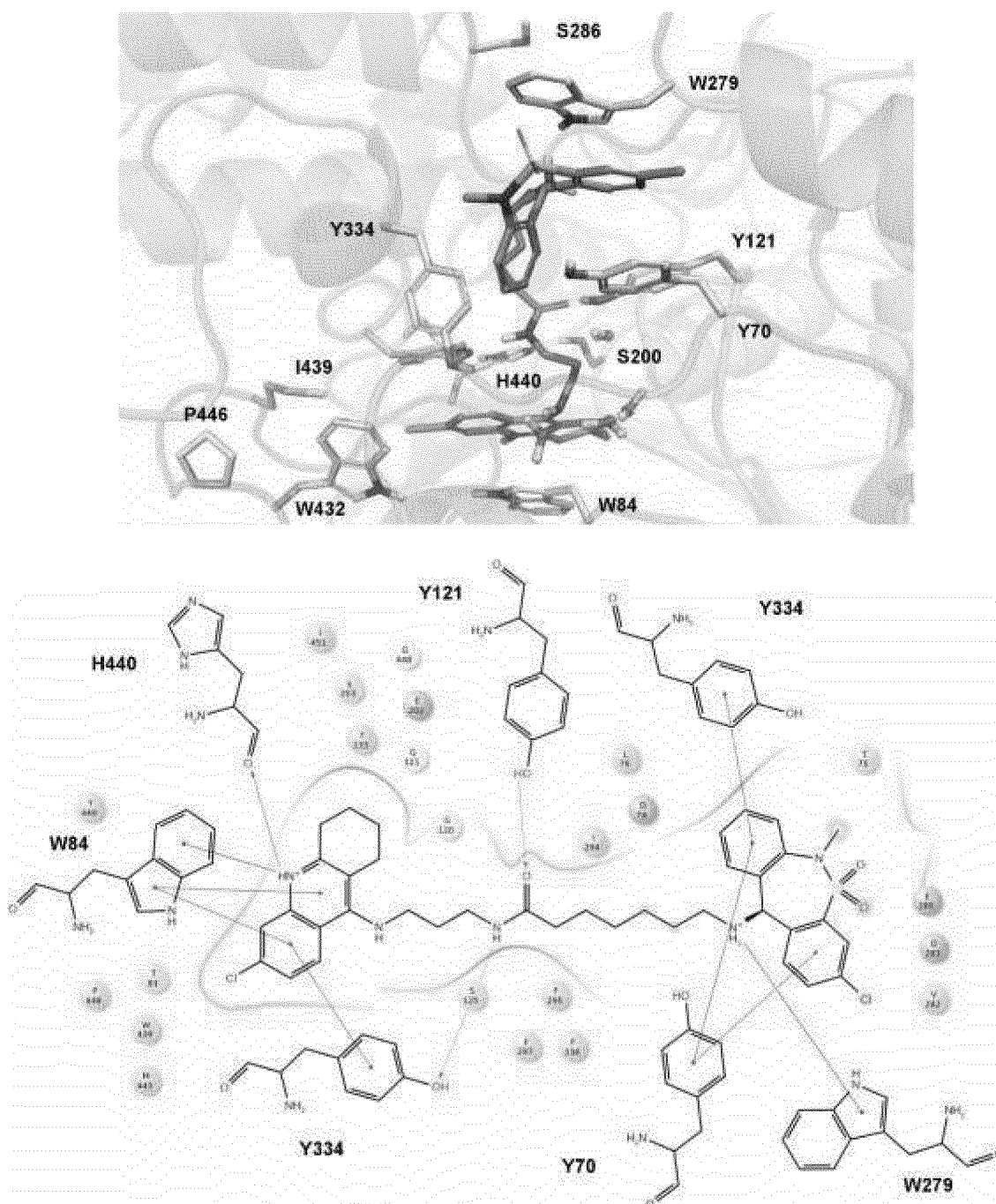


Figura 10

Resumo**MOLÉCULAS COM NÚCLEO HÍBRIDO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA,
PROCESSO DE SÍNTESE E SEUS USOS**

A presente invenção descreve moléculas com núcleo híbrido baseado em núcleos de tetraidroacridina e tianeptina, separados por cadeias espaçadoras metilênicas, via reação de acoplamento, uma composição farmacêutica compreendendo estas moléculas, um processo de síntese destas moléculas, e seus usos. A presente invenção se situa nos campos da Química Medicinal, Farmacologia e Medicina.