



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102019023450-4 A2



(22) Data do Depósito: 07/11/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 18/05/2021

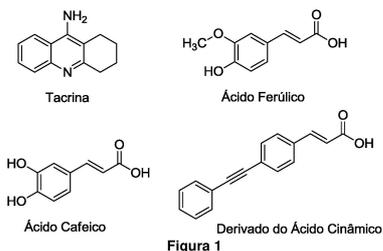
(54) **Título:** MOLÉCULAS COM NÚCLEO HÍBRIDO TACRINA-ETINIL-FENIL-CINAMAMIDA COM PROPRIEDADE ANTICOLINÉRGICA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PROCESSO DE SÍNTESE E SEUS USOS

(51) **Int. Cl.:** C07D 219/00; C07C 235/38; C07C 11/28; A61K 31/473; A61P 25/28.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL; UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA - UFSM; LABORATÓRIO NACIONAL DE COMPUTAÇÃO CIENTÍFICA - LNCC; FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCAR.

(72) **Inventor(es):** MARCO ANTONIO CESCHI; LEANDRA FRANCISCATO CAMPO; ALOIR ANTONIO MERLO; FRANCIELA ARENHART SOARES; JOÃO PAULO BIZARRO LOPES; RENAN MICHAEL PILOTTI; JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA; BLESSING ARIYO AFOLABI; LAURENT EMMANUEL DARDENNE; ISABELLA ALVIM GUEDES; ALINE RIGON ZIMMER; THAÍS CARINE RUARO; JULIO ZUKERMAN SCHPECTOR.

(57) **Resumo:** MOLÉCULAS COM NÚCLEO HÍBRIDO TACRINA-ETINIL-FENIL-CINAMAMIDA COM PROPRIEDADE ANTICOLINÉRGICA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PROCESSO DE SÍNTESE E SEUS USOS. A presente invenção descreve moléculas com núcleo híbrido baseado em núcleos de tetraidroacridina e derivados do ácido cinâmico, ou etinil-fenilcinamamida, 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.



RELATÓRIO DESCRITIVO DE PATENTE DE INVENÇÃO

MOLÉCULAS COM NÚCLEO HÍBRIDO TACRINA-ETINIL-FENIL-CINAMAMIDA COM PROPRIEDADE ANTICOLINÉRGICA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PROCESSO DE SÍNTESE E SEUS USOS

Campo da Invenção

[001] A presente invenção descreve moléculas cinamamidas com núcleo híbrido baseado em núcleos de tetraidroacridina e derivados do ácido cinâmico, 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

[002] A doença de Alzheimer (DA) é a desordem neurodegenerativa que mais afeta pessoas acima de 65 anos, especialmente em países industrializados. A DA causa perda progressiva e irreversível de funções cerebrais, sendo a sua principal consequência a perda de memória. Também são observados alguns sintomas secundários, como depressão, alucinações, agitação e uma perda progressiva da fala. Em estados avançados, são observadas alterações em funções biológicas básicas. (Jameel, E.; *et al.*; *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *136*, 36). Atualmente, estima-se que mais de 18 milhões de pessoas sofram com a doença no mundo todo e que este número irá aumentar bruscamente para cerca de 70 milhões de afetados em 2050. (Kumar, A.; Singh, A.; Ekavali, *Pharmacol. Rep.* **2015**, *67*, 195; Alzheimer's Association Report, *Alzheimer's & Dementia* **2015**, *11*, 332). A importância socioeconômica do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para a DA supera os possíveis riscos e os custos de desenvolvimento. Por exemplo, nos Estados Unidos, entre 2010 e

2011, os prejuízos econômicos causados pela DA superaram os 215 bilhões de dólares. De acordo com estudos recentes, o lucro com a venda de drogas para o tratamento da doença de Alzheimer foi estimada em 8,3 bilhões de dólares em 2017 (Bachurin, S.O; Bovina, E.V.; Ustyugov, A.A.; *Med. Chem. Rev.* **2017**, *37*, 1186).

[003] A causa patológica da DA ainda não foi completamente esclarecida. Apesar da busca, não existem tratamentos terapêuticos capazes de interromper o curso da doença. Por outro lado, sabe-se que a acetilcolina cumpre um papel importante no mecanismo da neurotransmissão, de forma que algumas drogas disponíveis atualmente no mercado são destinadas especialmente ao controle dos sintomas cognitivos, isto é, ligados aos níveis de acetilcolina. Os inibidores da acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina no cérebro, representam o pilar central da terapêutica disponível para a DA (Sameem, B.; Saeedi, M.; Mahdavi, M.; Shafiee, A.; *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, *128*, 332), e quatro medicamentos foram aprovados para o tratamento sintomático da doença. Estes fármacos disponíveis são a Tacrina (Cognex[®]), Donepezil (Aricept[®]), Rivastigmina (Exelon[®]), Galantamina (Razadyne[®], Reminyl[®]), os quais compartilham o mecanismo de ação de inibição da acetilcolinesterase (AChE), enquanto Memantina (Namenda[®]) atua como um antagonista do receptor NMDA (*N-metil D-Aspartato*) (Liston, D. R.; Nielsen, J. A.; Villalobos, A.; Chapin, D.; Jones, S. B.; Hubbard, S. T.; Shalaby, I. A.; Ramirez, A.; Nason, D.; White, W. F., *Eur. J. Pharmacol.*, **2004**, 486, 9).

[004] A tacrina (THA) ou 9-amino-1,2,3,4-tetraidroacridina, Figura 1, foi descrita pela primeira vez na literatura em 1949 por Shaw e Bentley, como um agente analéptico. Em 1953 os mesmos autores demonstraram que a tacrina era tão potente quanto a eserina ou a neostigmina na inibição das colinesterases em concentrações de 10^{-7} M. Contudo, somente em 1961 Heilbronn caracterizou pela primeira vez o efeito da tacrina sobre a AChE e butirilcolinesterase (BuChE). A tacrina foi a primeira droga aprovada nos Estados Unidos pelo

Food and Drug Administration (FDA), em 1993, para o tratamento sintomático da DA (Giacobini, E.; *Neurochem. Int.*, **1998**, 32, 413). Contudo, devido a hepatotoxicidade observada clinicamente, o uso da tacrina foi logo limitado após sua inserção como aplicação terapêutica (Sameem, B.; Saeedi, M.; Mahdavi, M.; Shafiee, A., *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 126, 332).

[005] Com o intuito de diminuir efeitos hepatotóxicos da tacrina, Pang e colaboradores realizaram a síntese de compostos do tipo bis(n)-tacrina. Estes compostos são constituídos por duas unidades do núcleo tetrahydroacridina ligadas por uma cadeia espaçadora metilênica (Figura 2) (Pang, Y. P.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Hong, F.; Brimijoin, S., *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 23646). Os compostos sintetizados mostraram-se altamente potentes, sendo que o homodímero bis(7)-tacrina se mostrou mil vezes mais potente na inibição da enzima AChE do que a tacrina. Além disso, também foi observado uma maior seletividade na inibição da AChE em relação à BuChE. O trabalho de Pang *et al.* deu origem a uma série de pesquisas envolvendo diferentes dímeros da tacrina e sua capacidade de inibição das colinesterases (Hu, M. K.; Shaw, J., **2001**, Patente, WO200117529-A1; Hu, M. K.; Wu, L.; Hsiao, G.; Yen, M., *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 2277).

[006] A importância da estratégia dos compostos multialvo configura-se na habilidade de obter novas moléculas a partir de moléculas com propriedades biológicas e características distintas. Desse modo, ao inserir diferentes grupos farmacofóricos em um composto, pode-se atingir mais de um fator relacionado à doença. Para a doença de Alzheimer a estratégia empregada geralmente envolve o desenvolvimento e a síntese de compostos híbridos onde pelo menos um dos núcleos é um inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE), e um outro núcleo de interesse farmacológico, que ao serem unidos em uma única molécula, podem constituir um novo fármaco (Gil, A. M., *et al.* 2004, patente WO2004032929-A2).

[007] Por possuir caráter multifatorial, a doença de Alzheimer apresenta grande complexidade, de forma que há um grande interesse da comunidade científica

no desenvolvimento de moléculas “multialvo”. Tais moléculas são planejadas para interagir simultaneamente com diferentes fatores da doença, tendo como objetivo não só deter o progresso, mas também fornecer mais do que um tratamento paliativo dos sintomas, além de simplificar o regime de tratamento. Analogamente, diversos outros núcleos de interesse farmacológico também foram descritos como compostos híbridos, voltados para o estudo da DA (Wu, W. Y.; Dai, Y. C.; Li, N. G.; Dong, Z. X.; Gu, T.; Shi, Z. H.; Xue, X.; tang, Y. P.; Duan, J. A.; *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* **2017**, 32, 572).

[008] Apesar dos efeitos colaterais conhecidos, o núcleo tacrina, inibidor do sítio catalítico ativo (CAS) da AChE, ainda é o mais comumente utilizado na elaboração de moléculas multialvo. Diversos trabalhos encontrados na literatura demonstram a importância do núcleo tacrina como âncora de moléculas elaboradas com base na hipótese colinérgica da doença de Alzheimer (Sameen, B., Mahdavi, M., Shafiee, A. *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 128, 332., Spilovska, K., Korabecny, J., Nepovimova, E., Dolezal, R., Mezeiova, E., Soukup, O., Kuca, K. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2017**, 17, 1006., Li, Q., Yang, H., Chen, Y., Sun, H. *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 132, 294). Considerando a alta eficiência da tacrina como inibidor das enzimas colinesterases e também pelos estudos efetuados por Pang *et al.* que demonstraram a dupla interação com o CAS e o PAS (sítio aniônico periférico) da AChE (Pang, Y. P.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Hong, F.; Brimijoin, S., *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 23646), bem como as considerações 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), o interesse por moléculas contendo o núcleo tacrina tornou-se muito promissor. Desse modo, uma das principais características dessa nova geração de moléculas híbridas é justamente ambientada na interação simultânea nos CAS e PAS das ChEs, e também em outros fatores da DA.

[009] Sendo a hipótese colinérgica uma das mais estudadas para o tratamento da doença de Alzheimer, as enzimas AChE e BuChE constituem o grupo das colinesterases, encontradas nos humanos, majoritariamente, no sistema nervoso central e no restante do corpo, respectivamente. A AChE é a principal responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, localizando-se principalmente nas junções neuronais. Já a BuChE, é responsável pela hidrólise de outros ésteres e também da acetilcolina em estágios avançados da DA. A BuChE é sintetizada no fígado, sendo encontrada em grandes quantidades no soro. Apesar da função fisiológica da BuChE ainda não ser bem conhecida, sugere-se sua participação no mecanismo regulatório dos níveis da AChE na sinapse colinérgica (Giacobini, E., *Pharmacol. Res.* **2004**, 50, 433). Estudos tem mostrado que há um aumento da atividade da BuChE, de 40% a 90%, nas áreas mais afetadas do cérebro, como o córtex e o hipocampo durante a evolução da DA (Anand, P., Singh, B., *Arch. Pharm. Res.*, **2012**, 36, 375).

[0010] Os derivados do ácido cinâmico são um grupo de moléculas contendo um ácido carboxílico aromático que aparecem naturalmente no reino vegetal. O termo cinâmico é oriundo da especiaria proveniente da *Cinnamomum zeilanicum*, utilizada desde a antiguidade como aromatizante, estimulante, antisséptico e também como inseticida. (Pittman, S., *Ethnobot. Leaflet.* **2011**, 2000, 11). Além disso, na literatura encontram-se diversas aplicações farmacológicas para derivados do ácido cinâmico, como atividade anticâncer (De, P.; Baltas, M.; Bedos-Belval, F., *Curr. Med. Chem.* **2011**, 18, 1672.), antimalária (Wiesner, J.; Mitsch, A.; Wißner, P.; Jomaa, H.; Schlitzer, M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 423), antifúngico (Tawata, S.; Taira, S.; Kobamoto, N.; Zhu, J.; Ishihara, M.; Toyama, S., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1996**, 60, 909), antioxidante e antimicrobiano (Sova, M., *Mini Rev. Med. Chem.* **2012**, 12, 749).

[0011] Sabe-se que os derivados do ácido hidroxicinâmico, ácido ferúlico e ácido cafeico (Figura 1) apresentam atividade inibitória para a agregação de

alguns oligômeros de peptídeos β -amilóide. Além disso, o ácido ferúlico demonstrou atividade neuroprotetora e neurotófica quando administrado por rota parental. Já o ácido cafeico, demonstrou possuir atividade anti-inflamatória, uma vez que houve a redução dos biomarcadores interleucina-6 e o fator de necrose tumoral- α . Compostos híbridos envolvendo o núcleo tacrina e os ácidos cafeico e ferúlico demonstraram, além de caráter antioxidante, inibição das enzimas AChE e BuChE na faixa de micromolar (Zhang, X., He, X., Chen, Q., Lu, J., Rapposelli, S., Pi, R., *Bioorg. & Med. Chem.*, **2018**, 26, 543).

[0012] Recentemente um trabalho envolvendo híbridos tacrina e derivados do ácido cinâmico substituído, contendo uma cadeia espaçadora com duas unidades metilênicas foi apresentado por Chen e colaboradores (Chen, Y.; Lin, H.; Zhu, J.; Gu, K.; Li, Q.; He, S.; Lu X.; Tan, R.; Pei, Y.; Wu, I.; Bian, Y.; Sun, H.; *RSC Advances*. **2017**, 7, 33851). Foram observadas atividades inibitórias tanto da enzima AChE, como para a BuChE, e os valores de IC₅₀ apresentados foram na ordem da escala nanomolar. Além disso, os estudos de cinética e dinâmica molecular demonstraram que os híbridos interagem tanto no PAS, quanto no CAS da AChE.

[0013] Neste trabalho, foram elaborados derivados do ácido cinâmico contendo o grupo fenil acetileno na posição *para* do anel aromático. As ligações triplas aparecem em diversas moléculas com atividade biológica, como agentes antifúngicos (Baldrighi, M.; Bartesaghi, D.; Cavallo, G.; Chierotti, M. R.; Gobetto, R.; Metrangolo, P.; Pilati, T.; Resnati, G.; Terraneo, G. *Cryst. Eng. Comm.* **2014**, 16, 5897), sedativos (Milhorn, H. T. Sedative-Hypnotic Dependence, *in Substance use disorders*, **2017**, p59-76.) e inibidores de monoaminaoxidase (Weinreb, O.; Amit, T.; Bar-Am, O.; Youdim, M. B. H. *Brit. J. Pharmacol.* **2016**, 170, 2080). Chen e colaboradores analisaram via métodos computacionais derivados estruturais do donepezil contendo ligações triplas terminais. Os autores observaram que a inserção de uma ligação tripla terminal induziria interações do tipo van der Waals com o sítio ligante da proteína AChE (Chen,

P. O.; Tsai, C. T.; Ou, C. Y.; Hsu, W. T.; Jhuo, M. D.; Wu, C. H.; Shih, T. C.; Cheng, T.H.; Chung, J. G. *Mol. Med. Rep.* **2012**, 5, 1043.).

[0014] Youdim e colaboradores avaliaram a eficiência de derivados estruturais da Rasagilina, um fármaco para o tratamento da doença de Parkinson que possui uma ligação tripla terminal. Os autores identificaram atividade neuroprotetora das moléculas estudadas, além da modulação do sistema dopaminérgico, que se encontra alterado em estágios avançados da DA (Youdim, M. B. H.; Fridkin, M.; Zheng, H. *Mech. Age. Dev.* **2005**, 126, 317). Samadi e colaboradores estudaram híbridos desenvolvidos a partir da justaposição ladostigil, um derivado da rasagilina, e de um derivado núcleo tacrina, e identificaram a inibição simultânea tanto das enzimas colinesterases como de monominaoxidases (Samadi et al, *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 52, 251).

[0015] Portanto, a partir da literatura pesquisada, o desenvolvimento de moléculas multialvo contendo um derivado do ácido cinâmico apresentando como substituinte uma ligação tripla substituída, também chamado de etinil-fenil-cinamamida, não havia sido antecipado ou sugerido, de modo que os ensinamentos da presente invenção constituem novidades e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

[0016] Comparação da tecnologia com as patentes existentes:

[0017] Patente: WO2005005413 A1 (BRPI0411960-6 A; PT1646622 E) – Tacrine derivatives as inhibitors of acetylcholinesterase. Data: 20/01/2005. A patente versa sobre uma série de híbridos tacrina-heterociclo (anel imidazólico) unidos por uma cadeia espaçadora. As moléculas foram planejadas de forma apresentar interação dual com a enzima, isto é, com o CAS e o PAS, além de modificar a agregação de proteínas β -amilóide. A patente também apresenta a composição farmacêutica, formulações e modos de administração. As moléculas estudadas por Gil e colaboradores apresentaram valores de IC_{50} para a enzima acetilcolinesterase na faixa de nanomolar. Além disso, os compostos tiveram sua citotoxicidade avaliada frente as células de neuroblastoma humana SH-SY5Y. Os resultados de

citotoxicidade foram apresentados em termos da viabilidade celular. Os compostos também foram avaliados frente a capacidade de inibir a agregação de β -amilóide. Os compostos com cadeia espaçadora de 3 e 8 carbonos inibiram a agregação em 15% e 17%, respectivamente.

[0018] Comparação: WO2005005413 A1 – *Tacrine derivatives as inhibitors of acetylcholinesterase*. O primeiro diferencial da patente encontra-se no núcleo proposto. Enquanto que o documento em análise versa sobre compostos híbridos tacrina-imidazol, nosso trabalho propõe a utilização do núcleo etinil-fenil-cinâmico para a elaboração dos híbridos. Com o núcleo etinil-fenil-cinâmico esperam-se interações do tipo π -stacking com os resíduos de aminoácidos aromáticos presentes no sítio aniônico periférico. O segundo diferencial consiste na ausência de descrição de estudos de toxicidade frente as células de hepatócitos dos híbridos tacrina-imidazol. A tacrina foi retirada do mercado por ser um fármaco de elevada hepatotoxicidade. O estudo e a avaliação dos novos híbridos se constituem uma ferramenta importante nesse processo. Os híbridos tacrina-etinil-fenil-cinamamida tiveram sua toxicidade avaliada frente a três linhagens celulares, hepatócitos, tumorais e neuronais, apresentando em todos os três tipos celulares valores de toxicidade inferiores ao exibido pela tacrina que foi utilizada como controle. Além disso, a magnitude dos valores de atividade anticolinérgica (ou seja, capacidade de inibição na escala de IC_{50} baixo nanomolar) dos compostos inéditos desenvolvidos em nossa pesquisa, viabilizam o uso terapêutico. O terceiro diferencial está no método de síntese das moléculas híbridas que são diferentes no presente invento.

[0019] Patente: US6036973 A1 – Therapy for neurological disease. Data: 14/03/2000. A presente invenção apresenta a formulação em tablets compactos de tacrina contendo de 10 ng a 1200 mg de tacrina, de forma que a liberação do fármaco se dê de forma controlada em pacientes com doenças neurodegenerativas, ou Alzheimer. A formulação apresentada visa o aumento do tempo de liberação do fármaco, diminuição do efeito do trato gastrointestinal

e diminuição do número de doses diárias necessárias de tacrina. A patente também prevê composições com demais fármacos disponíveis comercialmente como: donepezil, selegilina, alfa-tocoferol, 1-hidroxi-tacrina, entre outros.

[0020] Comparação: a invenção US6036973 A1 – *Therapy for neurological disease*, trata da abordagem, dosagem e forma de administração do fármaco tacrina, retirado do mercado por ser reconhecidamente tóxico. A elaboração de híbridos visa a obtenção de moléculas mais potentes, devido a dupla interação simultânea com o sítio catalítico ativo e o sítio aniônico periférico das enzimas colinesterases. Os híbridos tacrina-etinil-fenil-cinamamida apresentaram inibição das enzimas colinesterases na faixa de nanomolar, isto é, mais potentes que o núcleo tacrina sozinho. Além disso, os compostos tiveram sua toxicidade avaliada frente a três diferentes linhagens celulares, sendo menos tóxicos nos três casos que o controle tacrina. A baixa toxicidade dos híbridos aliada a ação colinérgica em baixo nanomolar, permite que as moléculas tenham potencial terapêutico.

[0021] Patente: WO2001017529 A1 (US6194403 B1) – Tacrine derivatives for treating Alzheimer's disease. Data: 27/01/2001. A invenção apresenta uma série de derivados bis-tacrina que foram sintetizados para serem utilizados como fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer. Os derivados propostos tinham como objetivo aumentar a potência de inibição da enzima acetilcolinesterase a fim de contornar os efeitos hepatotóxicos da tacrina. O núcleo 1,2,3,4-tetrahydroacridina possuindo um átomo de cloro na posição 6 mostrou-se mais ativo que a tacrina, sendo, portanto, escolhido para a elaboração dos novos híbridos. A patente não relata estudos de toxicidade e nem valores de IC₅₀ frente as enzimas colinesterases.

[0022] Comparação: US6194403 B1 – *Tacrine derivatives for treating Alzheimer's disease*. Sendo conhecida hepatotoxicidade do núcleo tacrina, a patente em análise propõe a elaboração de híbridos bis-tacrina, onde o núcleo tetrahydroacridina possui um átomo de cloro na posição 6 do anel aromático. A elaboração dos híbridos teve como objetivo o aumento de potência de inibição

das enzimas colinesterases, contudo não foram relatados resultados de IC₅₀ para os compostos sintetizados e nem valores de toxicidade. Desse modo, um primeiro diferencial de nosso trabalho consiste na apresentação dos novos híbridos tacrina-etinil-fenil-cinamamida com atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase na faixa de baixo nanomolar. Um segundo diferencial entre a patente em análise as moléculas inéditas apresentadas no presente invento, é o fato dos híbridos tacrina-etinil-fenil-cinamamida terem se mostrado notoriamente não tóxicos quando comparado com a tacrina, frente a três linhagens celulares distintas. A baixa toxicidade dos híbridos aliada a ação colinérgica em baixo nanomolar, permite que as moléculas tenham potencial terapêutico. O terceiro diferencial está no método de síntese das moléculas híbridas que são diferentes no presente invento.

[0023] Patente: WO2003099269 A1 (US20050203180 A1) – Cinnamic acid dimers, their preparation and the use thereof for treating neurodegenerative disease. Data: 15/09/2005. A patente versa sobre dímeros do ácido cinâmico, sua preparação e aplicação no tratamento de doenças neurodegenerativas. Os compostos apresentaram efeitos de melhora na memória de retenção e aprendizagem em estudos realizados *in vivo*. São considerados dímeros do ácido cinâmico, moléculas onde a união feita pela cadeia espaçadora contendo grupamento alcoxi ou amino, se dá em posições *orto*, *meta* ou *para* do anel aromático. Os compostos foram testados em ratos e demonstraram melhora da capacidade de aprendizagem e de retenção de memória, sendo, portanto, adequados para uso na prevenção e no tratamento de doenças neurodegenerativas, como demência. Dessa forma foram sugeridas diversas formulações contendo as moléculas estudadas para diferentes formas de administração (oral, transdermal, subcutânea, intravenosa ou intramuscular). Os dímeros do ácido cinâmico também foram avaliados quanto a toxicidade *in vivo*, sendo demonstrado a bioestabilidade dos mesmos com LD₅₀ superiores a 5000mg/kg sem apresentar toxicidade aguda. Não

foram realizados estudos de inibição das enzimas colinesterases e nem avaliada a hepatotoxicidade das moléculas estudadas.

[0024] Comparação: US20050203180 A1 – *Cinnamic acid dimers, their preparation and the use thereof for treating neurodegenerative disease*. A patente em análise descreve a obtenção de dímeros derivados do ácido cinâmico e seu potencial uso para tratamento de doenças neurodegenerativas. Os compostos relatados apresentaram efeitos de melhora da memória e da aprendizagem em estudos realizados *in vivo*, além de apresentarem baixa toxicidade. O principal diferencial entre os compostos propostos na patente em análise e dos híbridos tacrina-etinil-fenil-cinamamida contitui na avaliação das moléculas frente as enzimas colinesterases. Os dímeros do ácido cinâmico não foram testados para a inibição das enzimas, enquanto os híbridos tacrina-etinil-fenil-cinamamida apresentaram valores de IC₅₀ na faixa de baixo nanomolar. O segundo diferencial está relacionado a estrutura química das moléculas. Os dímeros do ácido cinâmico são unidos por uma substituição no anel aromático. Os híbridos tacrina-etinil-fenil-cinamamida são unidos por uma cadeia espaçadora na porção ácida, formando um grupo amida. A ligação amida demonstrou ser importante por realizar interações de hidrogênio com a enzima, conforme exemplificado nos estudos de modelagem molecular apresentados no trabalho. O terceiro diferencial está no método de síntese das moléculas híbridas que são diferentes no presente invento.

[0025] Patente: WO2012165981 A1 (US2014080860 A1) – Novel hybrid cholinesterase inhibitors. Data: 20/04/2014. A presente invenção trata de novos híbridos inibidores das enzimas colinesterases contendo o núcleo tacrina como uma das porções farmacofóricas e a melatonina, ou os produtos de oxidação da melatonina, unidos por um espaçador carbamato. Os compostos sintetizados também apresentaram propriedades antioxidantes e preveniram a agregação de placas β -amilóide. A patente também apresenta o modo de preparação das moléculas, bem como formulações contendo as moléculas como princípio ativo, para administração oral, parental, intravenosa e tópica. A

avaliação da atividade frente a enzimas colinesterases foi feita utilizando o método de Ellman. Os híbridos contendo os núcleos tacrina-melatonina apresentaram IC_{50} na faixa de nanomolar, sendo seletivos para a enzima butirilcolinesterase. No entanto, não foram apresentados, na patente em análise, resultados de testes de toxicidade ou hepatotoxicidade dos compostos estudados.

[0026] Comparação: US2014080860 A1 – *Novel hybrid cholinesterase inhibitors*. A patente em análise apresenta híbridos derivados dos núcleos tacrina e melatonina unidos por uma cadeia espaçadora e sua capacidade de inibição das enzimas colinesterases. Os compostos da patente em análise apresentaram valores de IC_{50} na faixa de nanomolar sendo seletivos para a enzima butirilcolinesterase. O primeiro diferencial do invento proposto e da patente em análise consiste na seletividade das enzimas. Os híbridos tacrina-melatonina mostraram-se mais seletivos para a enzima BuChE, os híbridos tacrina-etinil-fenil-cinamamida mostraram-se mais ativos para a enzima AChE. A enzima AChE é utilizada como alvo dos medicamentos nos estágios iniciais da doença de Alzheimer estando presente em maiores quantidades no cérebro que a BuChE. A BuChE passa a ser o alvo apenas em estágios mais avançados da doença. O segundo diferencial observado entre a patente em análise e o invento proposto é a ausência do relato de testes de toxicidade para os híbridos tacrina-melatonina. Os híbridos tacrina-etinil-fenil-cinamamida foram avaliados quanto a toxicidade frente a três linhagens celulares distintas, mostrando-se menos tóxicos que a tacrina utilizada como controle. A baixa toxicidade dos híbridos aliada a ação colinérgica em baixo nanomolar, permite que as moléculas tenham potencial terapêutico. O terceiro diferencial está no método de síntese das moléculas híbridas que são diferentes no presente invento.

[0027] Patente: WO2017112988 A1 – Molecules with a hybrid nucleus, pharmaceutical composition, synthesis method and uses thereof. Data: 06/07/2017. A patente trata da descrição de novos híbridos contendo o núcleo

tacrina e o antidepressivo Tianeptina separados por uma cadeia espaçadora metilênica, obtidos por meio de uma reação de acoplamento. Além do método de preparação das moléculas foram descritos os testes frente as enzimas colinesterases, bem como a modulação da secreção da proteína S100B. Os híbridos tacrina-tianeptina inibiram as enzimas colinesterases na faixa de baixo nanomolar. As moléculas sintetizadas também foram capazes de diminuir a secreção de S100B um biomarcador de inflamação neuronal, presente em níveis alterados em pacientes com a doença de Alzheimer e depressão. A patente analisada também apresenta os estudos de modelagem molecular dos híbridos tacrina-tianeptina com a enzima acetilcolinesterase, identificando a dupla interação enzimática simultânea com o CAS e o PAS da enzima. Não foram apresentados relatos de estudos de hepatotoxicidade dos híbridos tacrina-tianeptina.

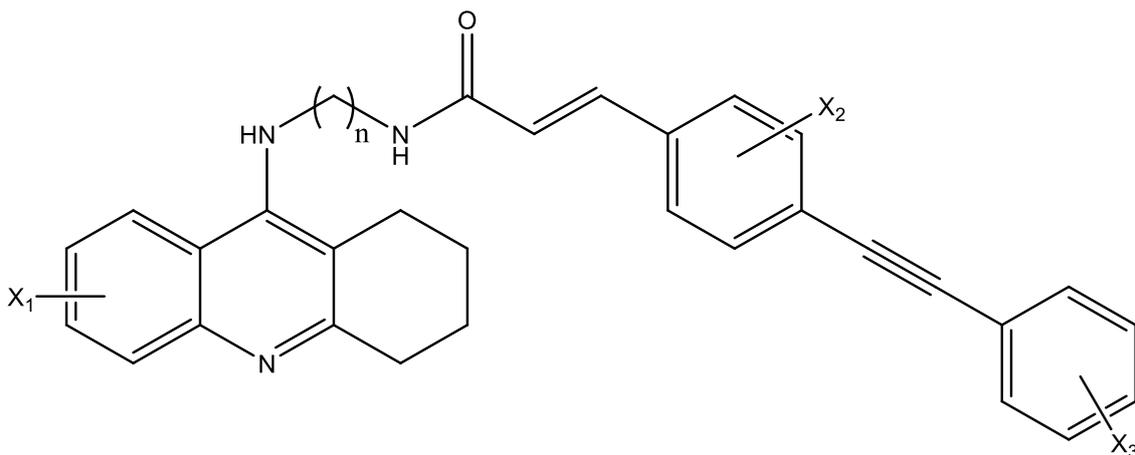
[0028] Comparação: WO2017112988 A1 – *Molecules with a hybrid nucleus, pharmaceutical composition, synthesis method and uses thereof*. A patente em análise descreve a elaboração de híbridos tacrina-tianeptina, um antidepressivo comercial. Os híbridos tacrina-tianeptina foram avaliados para inibição das enzimas colinesterases, apresentando valores de IC_{50} na escala de baixo nanomolar. O primeiro diferencial entre a patente analisada e o presente invento constitui a obtenção do núcleo ligado a tacrina. A tianeptina foi extraída dos comprimidos comerciais, enquanto que o ácido etinil-fenil-cinâmico foi preparado no laboratório. A patente em análise também apresenta os estudos de modulação da proteína da glia, S100B, indicando que os híbridos tacrina-tianeptina podem atuar como moduladores da expressão desse biomarcador. Por outro lado, não foram apresentados estudos de toxicidade dos compostos. O segundo diferencial entre a patente em análise e o invento proposto constitui na avaliação citotóxica dos híbridos tacrina-etinil-fenil-cinamamida. Os híbridos do presente invento foram testados frente células tumorais, hepáticas e neuronais, apresentando valores de toxicidade inferiores ao controle tacrina. A baixa toxicidade das moléculas estudadas aliada a ação colinérgica em baixo

nanomolar, permite que as moléculas tenham potencial terapêutico. O terceiro diferencial está no método de síntese das moléculas híbridas que são diferentes no presente invento.

Sumário da Invenção

[0029] 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 derivados do ácido cinâmico contendo ligação tripla substituída, também chamado de etinil-fenil-cinamamida, separados por cadeias espaçadoras metilênicas, via reação de acoplamento.

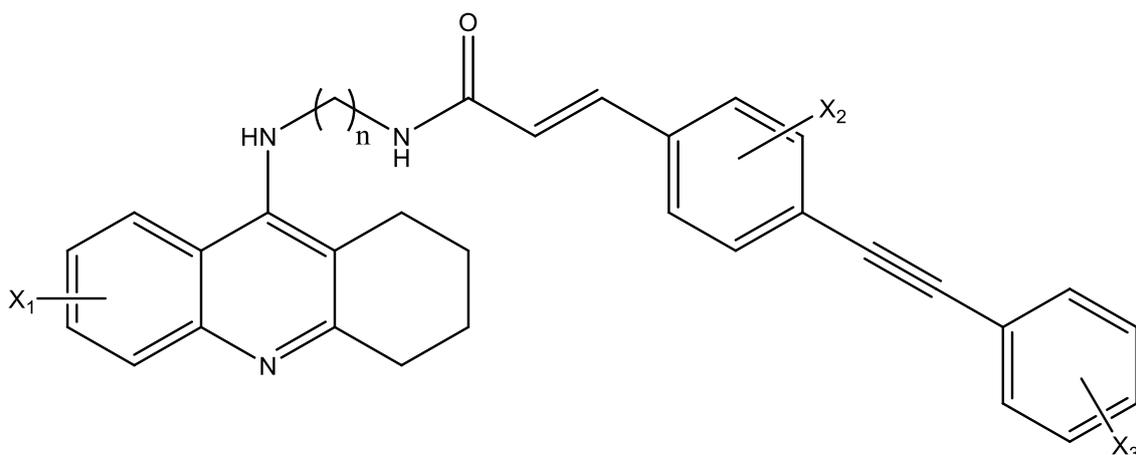
[0030] Em um primeiro objeto a presente invenção apresenta moléculas com núcleo híbrido, com a seguinte estrutura:



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, CN e NO_2 ou outros grupos retiradores ou doadores de elétrons; e,
- “n” pode variar entre 1 e 20.

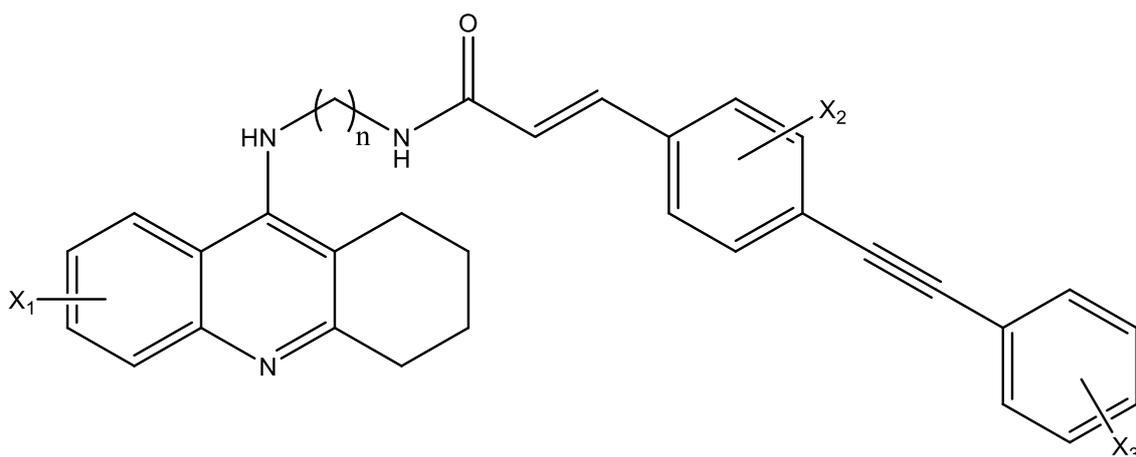
[0031] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta uma composição farmacêutica que compreende moléculas com núcleo híbrido com a seguinte estrutura:



em que:

- X₁, X₂ e X₃ são selecionados, independentemente, entre os grupos dos halogênios, OH, OR, HS, SR, NH₂, NH, NHR, CN e NO₂ ou outros grupos retiradores ou doadores de elétrons; e,
- "n" pode variar entre 1 e 20.

[0032] 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 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, CN e NO_2 ou outros grupos retiradores ou doadores de elétrons; e
- “n” pode variar entre 1 e 20.

[0033] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta o uso das ditas moléculas com núcleo híbrido para inibir enzimas colinesterases.

[0034] Em um quinto objeto, a presente invenção apresenta o uso das ditas moléculas com núcleo híbrido na preparação de um medicamento para tratar a Doença de Alzheimer.

[0035] Ainda, o conceito inventivo comum a todos os contextos de proteção reivindicados são as moléculas com núcleo híbrido baseado em núcleos de tetraidroacridina e derivados do ácido cinâmico, também chamado de etinil-fenil-cinamamida, separados por cadeias espaçadoras metilênicas, via reação de acoplamento.

[0036] 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

[0037] Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente são apresentadas as presente figuras:

[0038] A figura 1 mostra as estruturas das moléculas tacrina, ácido ferrúlico, ácido cafeico e derivado ácido cinâmico.

[0039] A figura 2 mostra a estrutura da bis(n)-tacrina.

[0040] A figura 3 apresenta os espectros de RMN de a) 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) do derivado do ácido cinâmico e b) ^{13}C (APT, $CDCl_3$, 101 MHz) do derivado do ácido cinâmico.

[0041] A figura 4 apresenta os espectros de RMN de a) 1H (400 MHz, $CDCl_3$) e b) ^{13}C -APT (101 MHz, $CDCl_3$) do composto **(10a)**.

[0042] A figura 5 apresenta os espectros de RMN de a) 1H (500 MHz, $CDCl_3$) e b) ^{13}C -APT (126 MHz, $CDCl_3$) do composto **(10b)**.

[0043] A figura 6 apresenta os espectros de RMN de a) ^1H (400 MHz, CDCl_3) e b) ^{13}C -APT (101 MHz, CDCl_3) do composto **(10c)**.

[0044] A figura 7 mostra um esquema da formação do derivado do ácido cinâmico.

[0045] A figura 8 mostra um esquema de formação dos intermediários **9a**, **9b**, e **9c**.

[0046] A figura 9 mostra um esquema ilustrativo da reação de acoplamento.

[0047] A figura 10 mostra os gráficos de citotoxicidade para as células HepG2 para o Híbrido **(10b)**

[0048] A figura 11 mostra os gráficos de citotoxicidade para as células HepG2 para o Híbrido **(10c)**

[0049] A figura 12 mostra os gráficos de nefrotoxicidade para as células VERO para o Híbrido **(10b)**

[0050] A figura 13 mostra os gráficos de nefrotoxicidade para as células VERO para o Híbrido **(10c)**

[0051] A figura 14 mostra os gráficos de neurotoxicidade para as células C6 astrogliial para o Híbrido **(10b)**

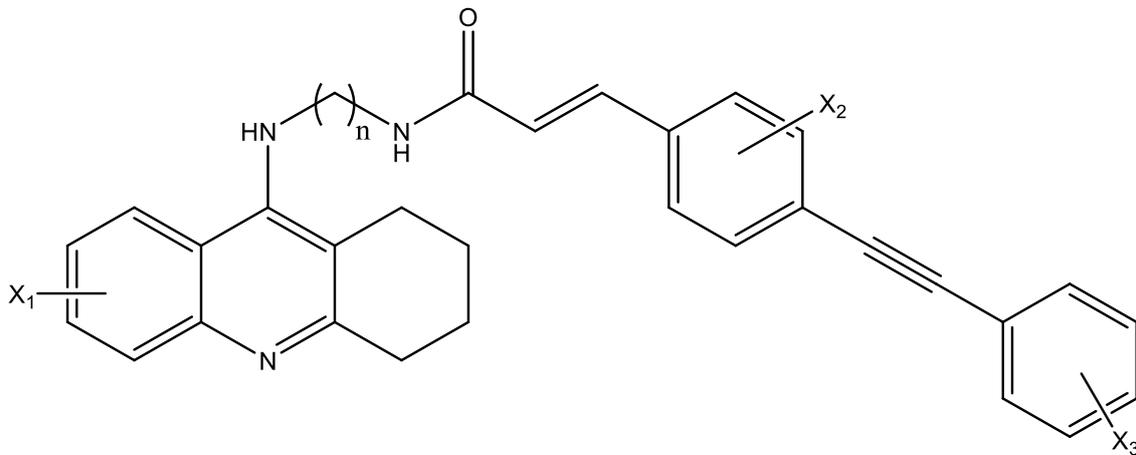
[0052] A figura 15 mostra os gráficos de neurotoxicidade para as células C6 astrogliial para o Híbrido **(10c)**

[0053] A figura 16 mostra o diagrama ORTEPE para o híbrido da tacrina e do derivado do ácido cinâmico **(10a)**

[0054] A figura 10 ilustra o modo de ligação predito para os compostos **(10b)** e **(10c)** para a melhor conformação da AChE (código 1ZGC) através da estratégia de *ensemble docking*. As ligações de hidrogênio estão representadas como linhas pontilhadas em verde. À direita de cada imagem 3D, encontra-se o diagrama de interações 2D de cada inibidor com a conformação 1ZGC da AChE.

Descrição Detalhada da Invenção

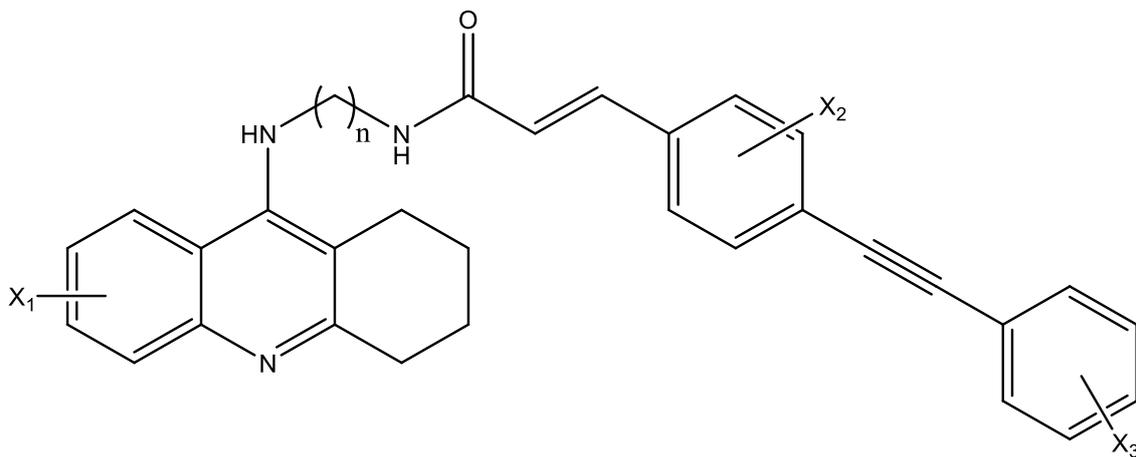
[0055] Em um primeiro objeto a presente invenção apresenta moléculas com núcleo híbrido, com a seguinte estrutura:



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, CN e NO_2 ou outros grupos retiradores ou doadores de elétrons; e,
- "n" pode variar entre 1 e 20.

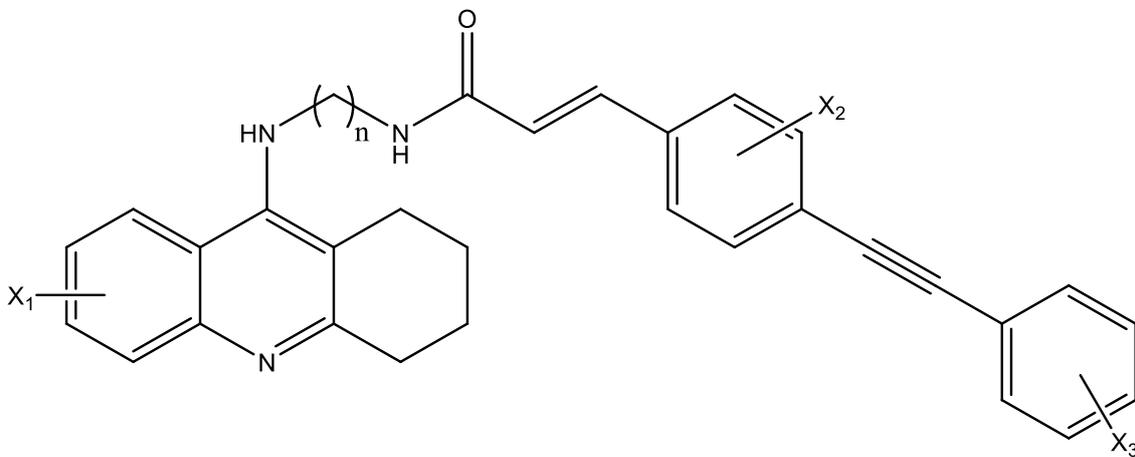
[0056] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta uma composição farmacêutica que compreende moléculas com núcleo híbrido com a seguinte estrutura:



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, CN e NO_2 ou outros grupos retiradores ou doadores de elétrons; e,
- “n” pode variar entre 1 e 20.

[0057] 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:



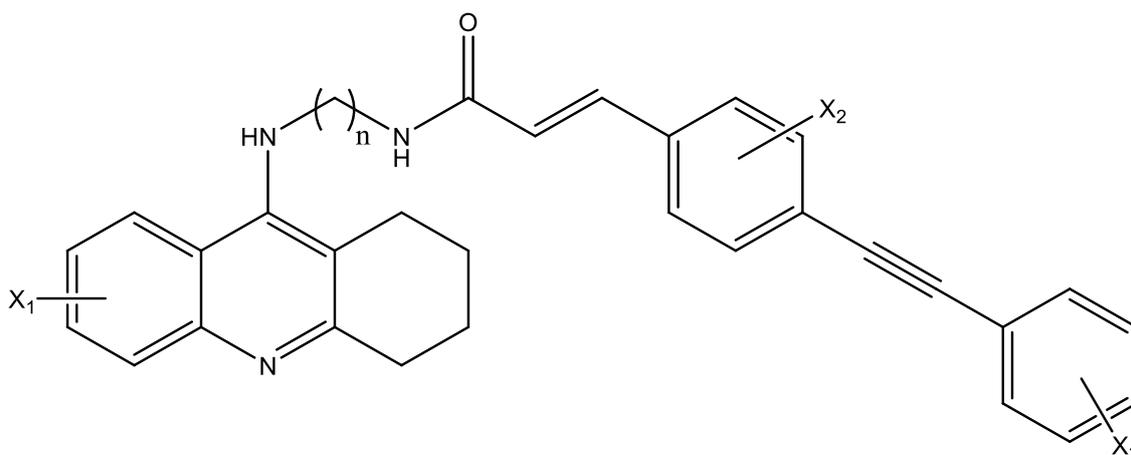
em que:

- X_1 , X_2 e X_3 são selecionados, independentemente, entre os grupos dos halogênios, OH, OR, HS, SR, NH_2 , NH, NHR, CN e NO_2 ou outros grupos retiradores ou doadores de elétrons; e,
- “n” pode variar entre 1 e 20.

[0058] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta o uso das ditas moléculas com núcleo híbrido para inibir enzimas colinesterases.

[0059] Em um quinto objeto, a presente invenção apresenta o uso das ditas moléculas com núcleo híbrido na preparação de um medicamento para tratar a Doença de Alzheimer.

[0060] Em uma concretização, a presente invenção apresenta as ditas moléculas com núcleo híbrido com a seguinte estrutura:



em que:

- X_1 é Cl ou hidrogênio; e
- “n” varia entre 1 e 20.

[0061] Em uma concretização, a presente invenção apresenta as ditas moléculas com núcleo híbrido em que as ditas moléculas inibem enzimas colinesterases.

[0062] 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.

[0063] 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 em baixa concentração ($IC_{50} < 5nM$)

[0064] 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.

[0065] 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 farmacologicamente aceitável.

[0066] 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.

[0067] 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).

[0068] 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).

[0069] 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 dicitloexilcarbodiimida (DCC) e o catalisador dimetilaminopiridina (DMAP).

[0070] 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).

[0071] 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:

[0072] No presente trabalho, o fármaco tacrina foi utilizado como núcleo estrutural para a síntese de novos híbridos derivados da tacrina e ácido cinâmico, com o intuito de acrescentar novas interações da enzima com o

substrato e também aditar em uma mesma molécula diferentes grupos farmacofóricos biologicamente ativos.

[0073] O processo de síntese dos híbridos de acordo com a presente invenção estrutura-se na reação de acoplamento entre o ácido (*E*)-3-4-(feniletinil)fenil)acrílico e 9-alkilamino-1,2,3,4-tetraidroacridinas, na presença de um reagente de acoplamento, como o 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) juntamente com o aditivo 1-hidroxi-1H-benzotriazol (HOBt) ou ainda o uso do reagente dicitloexilcarbodiimida (DCC) empregando-se dimetilaminopiridina (DMAP) como catalisador.

[0074] Avaliou-se os híbridos tacrina-derivados do ácido cinâmico como inibidores das enzimas colinesterases AChE e BuchE e também quanto a sua toxicidade frente a diferentes linhagens celulares.

[0075] Obtenção do núcleo ácido (*E*)-3-4-(feniletinil)fenil)acrílico

[0076] Síntese do **4-(feniletinil)benzaldeído (3)** : em um balão de Schlenck de 50 mL, previamente flambado e sob atmosfera inerte, foram adicionados trietilamina seca (15 mL), o bromobenzaldeído (**2**) (1,196 g, 6,46 mmol) e o alcino (**1**) (1,07 mL, 9,70 mmol). A mistura foi agitada por 20 minutos e então foram acrescentados o CuI (6,10 mg, $3,2 \times 10^{-5}$ mol), PPh₃ (37,8 mg, $1,40 \times 10^{-5}$ mol) e o catalisador PdCl₂(PPh₃)₂ (20,4 mg, $2,91 \times 10^{-5}$ mol, 0,3 mol %). A reação ficou sob refluxo por 48 horas. Após o término da reação a mistura é resfriada à temperatura ambiente e a solução é filtrada sob celite e lavada com CH₂Cl₂. O filtrado foi extraído com água (4 x 50 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente foi evaporado. O produto foi recristalizado em hexano. Rendimento: 70-75 % (sólido marrom).

[0077] Descreve-se na Figura 7 o processo para a síntese do **ácido (*E*)-3-4-(feniletinil)fenil)acrílico (5)**: em um balão adaptado com condensador de refluxo foram adicionados o aldeído **3** (0,450 g, 2,17 mmol), piridina (1 mL, 0,012 mol) e piperidina (16 µL, 0,16 mmol). Após a mistura solubilizar, foi adicionado o ácido malônico (0,498 g, 4,79 mmol) a 85°C. A reação permaneceu sob agitação durante 6 horas. A reação foi resfriada à temperatura

ambiente e foi adicionado HCl 10% até pH neutro. O precipitado amarelo é filtrado e recristalizado em etanol absoluto. Rendimento: 70-72% (sólido amarelo brilhante).

[0078] Descreve-se na Figura 8, o processo de obtenção dos intermediários **9a-c**, 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).

[0079] Obtenção dos híbridos derivados do ácido cinâmico-tacrina, ou etinil-fenil-cinamamida-tacrina, 10a, 10b e 10c.

[0080] Em um balão contendo um agitador magnético foram adicionados o ácido (*E*)-3-4-(feniletinil)fenil)acrílico (**5**) (0,3g, 1,2 mmol) e os agentes de acoplamento EDC (231,6 mg, 1,2 mmol) e HOBt (163,2mg, 1,2 mmol), os quais foram dissolvidos em CH₂Cl₂ anidro e deixados sob agitação durante 5 minutos sob atmosfera inerte. Após foi adicionado o intermediário (**9a-c**) (447,5mg, 1,37 mmol) dissolvido em 0,5 ml de CH₂Cl₂ anidro. A reação foi deixada sob agitação em temperatura ambiente durante 48 horas. Ao final do tempo a reação foi finalizada com 0,2 ml de água e seca com Na₂SO₄ anidro. Decorrido esse processo o solvente foi evaporado e o produto bruto purificado por cromatografia em coluna utilizando uma mistura de hexano, acetato de etila e trietilamina na proporção de 80:19:1 aumentando a polaridade até 0:99:1. Os produtos foram obtidos em rendimento de 62-98% e posteriormente caracterizados pelos métodos espectroscópicos adequados, sendo que, alguns exemplos representativos estão mostrados nas Figuras 4 a 6.

[0081] Híbrido derivado da tacrina e ácido cinâmico, ou etinil-fenil-cinamamida (10a): Sólido branco. Rendimento: 71%. Ponto de Fusão: 80-84°C. IV (*KBr*) v_{max}/cm^{-1} : 3280, 3057, 2933, 2867, 1943, 1654, 1556, 1144, 903, 754. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : 8,07 (dd, *J* = 8,5; 0,7 Hz, 1H); 7,93 (dd, *J* = 8,5; 0,8 Hz, 1H); 7,66 (d, *J* = 15,6 Hz, 1H); 7,59 – 7,49 (m, 4H); 7,47-7,44 (m,

2H); 7,41 – 7,33 (m, 4H); 6,49 – 6,37 (m, 2H); 4,98 (t, $J = 5,9$ Hz, 1H); 3,63 – 3,50 (m, 4H); 3,07 (s, 2H); 2,79 (s, 2H); 2,44 – 2,26 (m, 1H); 1,97 – 1,82 (m, 6H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ : 166,54; 158,57; 150,55; 147,25; 140,46; 134,49; 131,99; 131,65; 128,55; 128,51; 128,42; 128,38; 127,74; 124,65; 123,88; 122,95; 122,63; 121,04; 120,38; 116,54; 91,36; 89,06; 45,46; 37,00; 33,93; 31,53; 25,17; 23,08; 22,77. HRMS-ESI: calculado $[\text{M-H}]^+$ 486,2540; encontrado 486,2537.

[0082] Híbrido derivado da tacrina e ácido cinâmico, ou etinil-fenil-cinamamida (10b): Sólido amarelo. Rendimento: 80% Ponto de Fusão: 63-65°C. IV (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3275, 3073, 2929, 2857, 1946, 1661, 1552, 1136, 975, 755. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ : 7,92 – 7,86 (m, 2H); 7,60 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H); 7,56 – 7,49 (m, 4H); 7,47 – 7,43 (m, 2H); 7,39 – 7,32 (m, 3H); 7,29 – 7,24 (m, 1H); 6,38 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H); 5,82 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H); 3,97 (s, 1H); 3,47 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H); 3,38 (dd, $J = 13,3, 6,9$ Hz, 2H); 3,02 (s, 2H); 2,67 (s, 2H); 1,95 – 1,83 (m, 4H); 1,69 – 1,62 (m, 2H); 1,62 – 1,54 (m, 2H); 1,47 – 1,34 (m, 4H). RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ : 165,69; 159,59; 150,74; 148,15; 140,10; 134,59; 133,96; 131,95; 131,62; 128,50; 128,38; 127,66; 127,56; 124,54; 124,52; 124,24; 122,96; 121,30; 118,45; 115,86; 91,25; 89,05; 49,40; 39,54; 34,03; 31,63; 29,63; 26,58; 26,51; 24,61; 22,92; 22,64. HRMS-ESI: calculado $[\text{M-H}]^+$ 562,2620; encontrado 562,2624.

[0083] Híbrido derivado da tacrina e ácido cinâmico, ou etnil-fenil-cinamamida (10c): Sólido amarelo. Rendimento: 65% Ponto de Fusão: 58-60°C. IV (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3280, 3067, 2925, 2852, 1943, 1663, 1547, 1341, 986, 747. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 7,89 (dd, $J = 5,6, 3,3$ Hz, 2H); 7,60 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H); 7,56 – 7,41 (m, 6H); 7,39 – 7,31 (m, 3H); 7,29 – 7,22 (m, 1H); 6,42 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H); 5,92 (s, 1H); 3,48 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H); 3,36 (dd, $J = 13,4, 6,8$ Hz, 2H); 3,02 (s, 2H); 2,65 (s, 2H); 2,13 (s, 1H); 1,95 – 1,85 (m, 4H); 1,69 – 1,60 (m, 2H); 1,58 – 1,46 (m, 2H); 1,43 – 1,29 (m, 6H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ : 165,67; 159,59; 150,87; 148,17; 140,10; 134,65; 134,01; 131,99; 131,66; 128,53; 128,41; 127,70; 127,57; 124,62; 124,53; 124,25;

122,99; 121,36; 118,44; 115,80; 91,25; 89,08; 49,50; 39,69; 34,04; 31,70; 29,57; 28,92; 26,74; 26,73; 24,59; 22,94; 22,66. HRMS-ESI: calculado $[M-H]^+$ 576,2776; encontrado 576,2780.

[0084] Avaliação da atividade das enzimas AChE e BuChE

[0085] A atividade frente as enzimas colinesterases foi determinada pelo método de Ellman et al. (Ellman; G. L. *Arch Biochem Biophys*, **1959**, 82, 70). O sistema continha (concentração final dada em mM): 20 tampão fosfato de potássio pH 7,4, 1 de DTNB (5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid)), 6 µg de proteína dos eritrócitos, 16 µg da proteína do plasma sangue humano e 130 µL de água destilada. As amostras foram pré-incubados por 30 minutos (25°C) com DMSO ou os inibidores na presença de 0,1% de DMSO (dimetilsulfóxido). A reação foi iniciada pela adição de acetilcolina (0,4 mM, concentração final) e foi acompanhada durante 30 minutos utilizando leitor de placa espectral Max (Molecular Devices, CA, EUA) no comprimento de onda de 415 nM. O valor de IC_{50} foi calculado através da equação da reta obtida do gráfico de Dixon, que é um gráfico da inversão da velocidade da reação em relação à concentração do inibidor, onde a concentração do inibidor é variada e a concentração do substrato é mantida fixa (Dixon; M. *Biochem. J.*, **1953**, 55, 170.; Punekar N.S.: *ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms*. Springer Pte Ltd. **2018**. Pages 245-257).

[0086] Resultados da Atividade Biológica

Código	AChE IC_{50} (nM)	BuChE IC_{50} (nM)	AChE/BuChE
10a	29,2±0,44	n.a.	-
10b	4,4±2,1	96±14,1	0,05
10c	12,0±4,7	262,4±53,0	0,05

[0087] Os híbridos da tacrina e do derivado do ácido cinâmico, ou etinil-fenil-cinamamida, apresentaram atividades de inibição das enzimas colinesterases a baixas concentrações, na faixa de nanomolar, sendo mais seletivos para a enzima AChE. Pode-se observar que o híbrido contendo cadeia espaçadora de seis carbonos apresentou os menores valores de IC_{50} (4,4 nM) para a inibição

da AChE, o que pode indicar um tamanho ideal da cadeia espaçadora para interação de ambos os núcleos com a enzima.

[0088] Resultados Citotoxicidade: As moléculas foram testadas em três tipos celulares distintos, considerados saudáveis, com o objetivo de descartar a hipótese de toxicidade. As células utilizadas foram Hep-G2 para o indicativo de hepatotoxicidade, Vero para indicativo de nefrotoxicidade e C6 astroglial para o indicativo de neurotoxicidade. A viabilidade celular foi quantificada em leitor de placas pelo ensaio colorimétrico de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-diphenyl tetrazolium bromide) o qual avalia a atividade metabólica celular. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média e a significância estatística foi determinada pela Análise de Variância (ANOVA, $p < 0,05$), seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas.

[0089] Tendo em vista dos resultados apresentados para a série de híbridos da tacrina e do derivado do ácido cinâmico, observamos o melhor desempenho das moléculas **(10b)** e **(10c)**, as quais apresentaram excelente desempenho nos testes de citotoxicidade, não apresentando significativa hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade. Estas estruturas são promissoras para o tratamento da Doença de Alzheimer apresentando-se seguras nas linhagens celulares testadas, conforme resultados apresentados na Tabela 2 e nas figuras 10 a 15.

[0090] Tabela 2: Citotoxicidade ($IC_{50} \pm SEM - \mu M$)

Composto	Vero	HepG2	C6
10b	>250	>250	114,8 \pm 10,2
10c	>250	>250	204,7 \pm 6,8
Tacrina	168,9 \pm 14,0	114,9 \pm 17,9	450,7 \pm 4,2

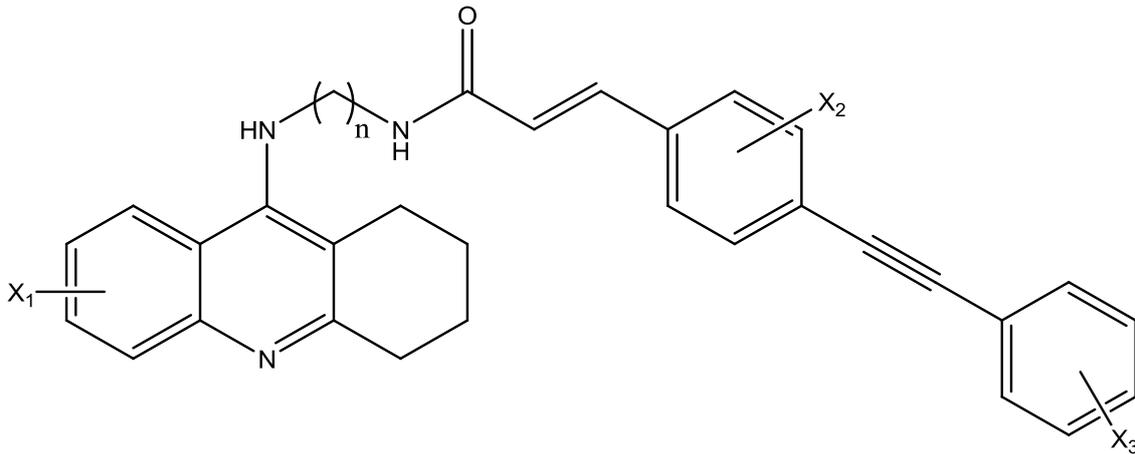
[0091] Com o intuito de obter a confirmação da estrutura dos híbridos desenvolvidos, bem como obtenção da conformação estrutural para auxílio dos cálculos de modelagem molecular, foi obtida a estrutura de Raios-X para um dos compostos da série sintetizada. O diagrama ORTEPE para o híbrido **(10a)**, contendo uma cadeia espaçadora de 3 carbonos, é apresentado na Figura 16.

[0092] Modelagem Molecular de Inibidores de Acetilcolinesterase

Utilizamos a estratégia de *ensemble docking* para predizer o modo de ligação mais provável dos compostos no sítio de ligação da AChE considerando o alto grau de flexibilidade observado na cavidade da enzima, principalmente no sítio aniônico periférico (PAS, *Peripheral Anionic Site* em inglês). Utilizamos três conformações representativas da enzima AChE, as quais foram preparadas com o programa *Protein Preparation Wizard* da suíte de aplicativos *Maestro* (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017). Os estudos de *docking* foram realizados com o programa GOLD considerando 30 execuções do algoritmo genético com precisão de 200% (indicada para ligantes altamente flexíveis) e a função de avaliação ChemPLP. O modo de ligação mais favorável para os compostos **(10b)** e **(10c)** foi encontrado na conformação 1ZGC da AChE com valores de pontuação similares ($\text{ChemPLP}_{\text{FAS54}} = 159,3$ e $\text{ChemPLP}_{\text{FAS55}} = 163,5$), caracterizando-se pelo grupo tacrina interagindo no fundo do sítio de ligação através das interações conservadas de *stacking* e ligações de hidrogênio enquanto que o grupo derivado do ácido cinâmico interage com a região do PAS (Figura 17). No meio da cavidade, o composto **(10b)** faz ligação de hidrogênio entre o grupo amida do espaçador com a cadeia principal da Try70, enquanto que o composto **(10c)** interage por ligação de hidrogênio com a cadeia principal da Phe288 através do grupo amida do espaçador.

Reivindicações

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

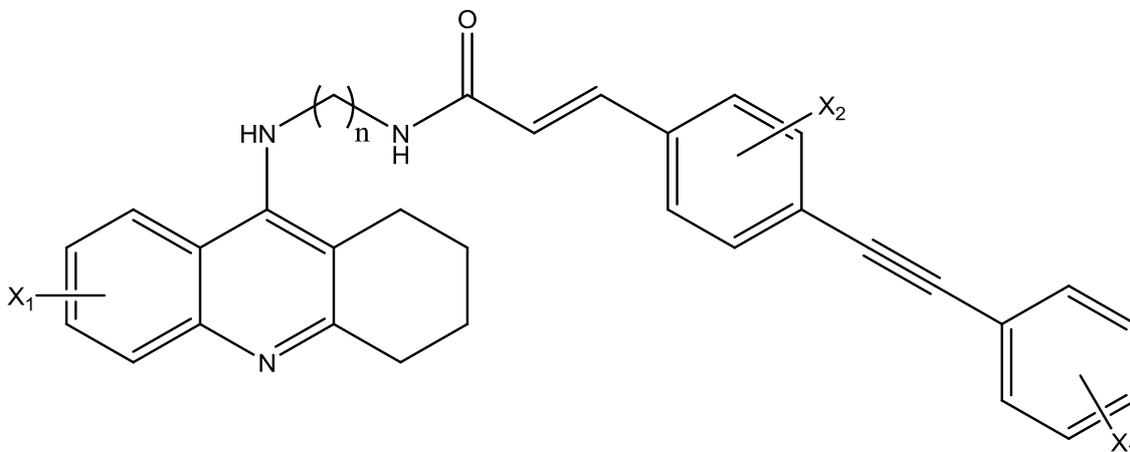


em que:

- 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;

- “n” pode 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 1 e 20

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 um veículo farmacêuticamente aceitável

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

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

7. 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)

8. 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)

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

10. 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)

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

12. 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

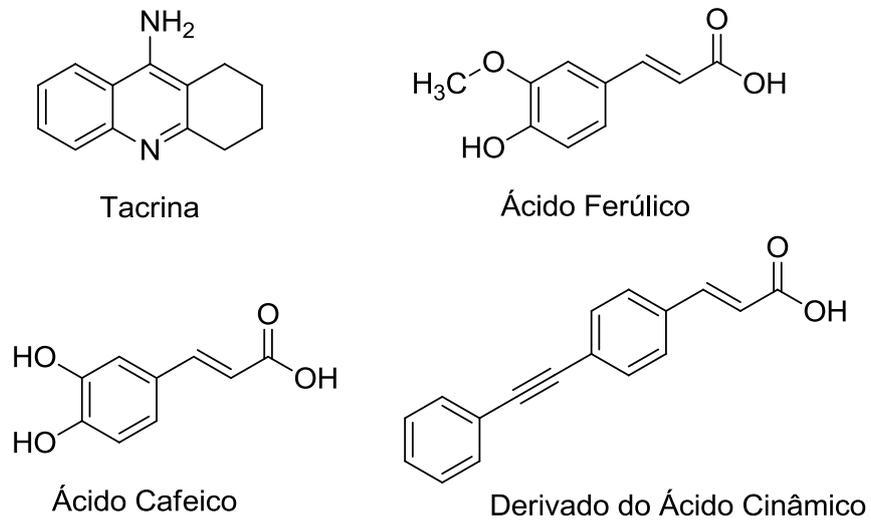


Figura 1

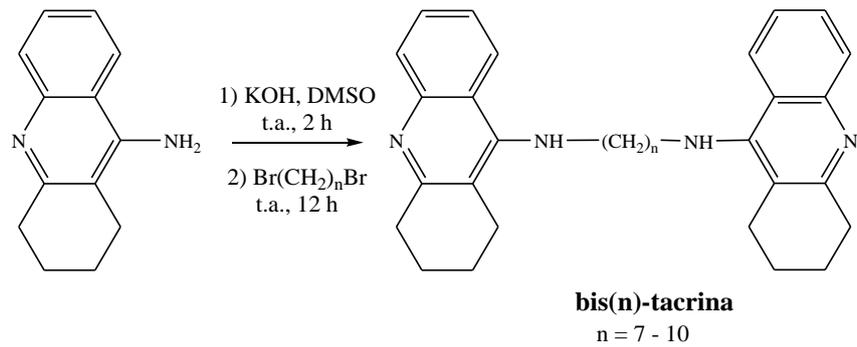


Figura 2

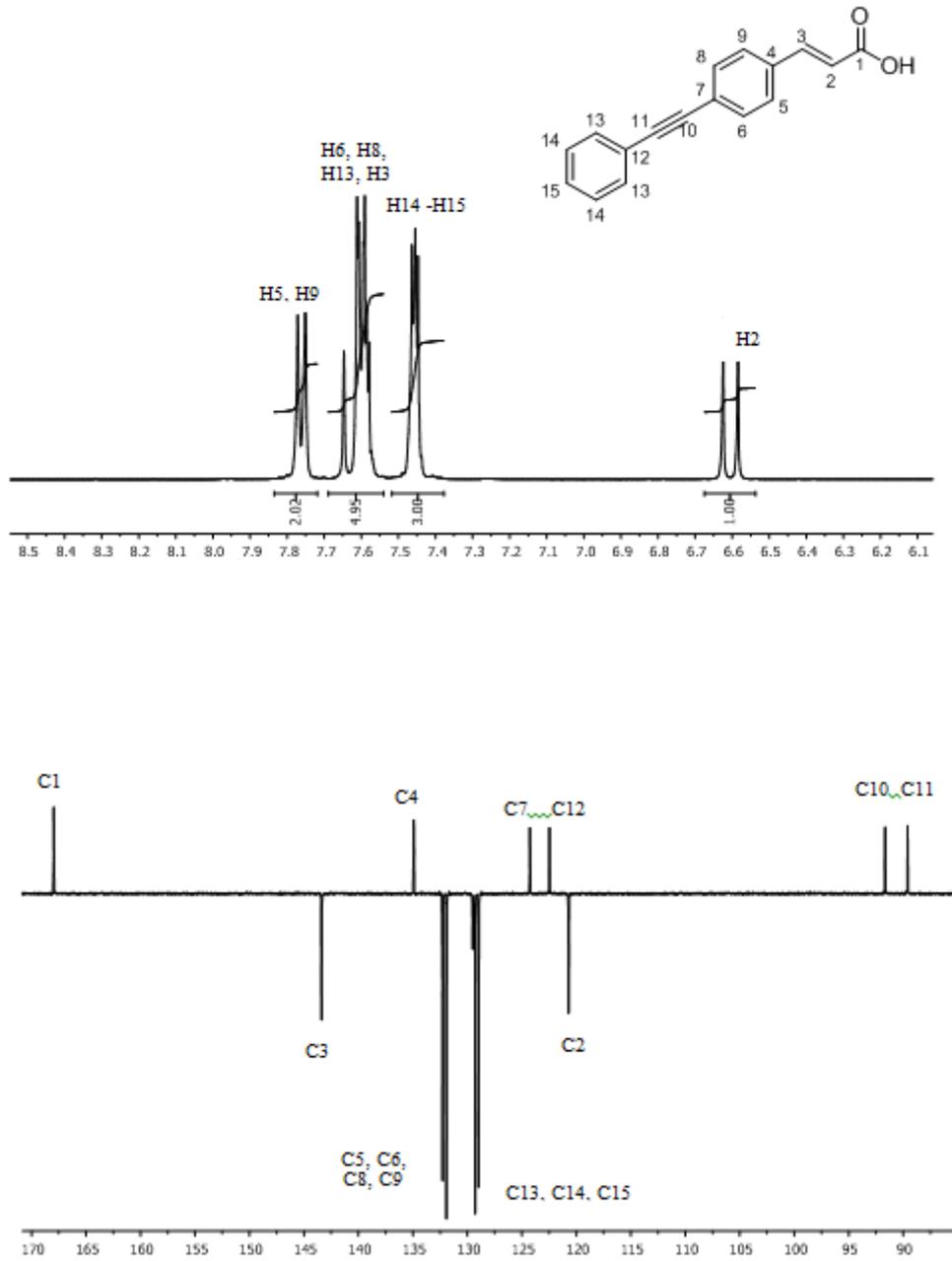


Figura 3

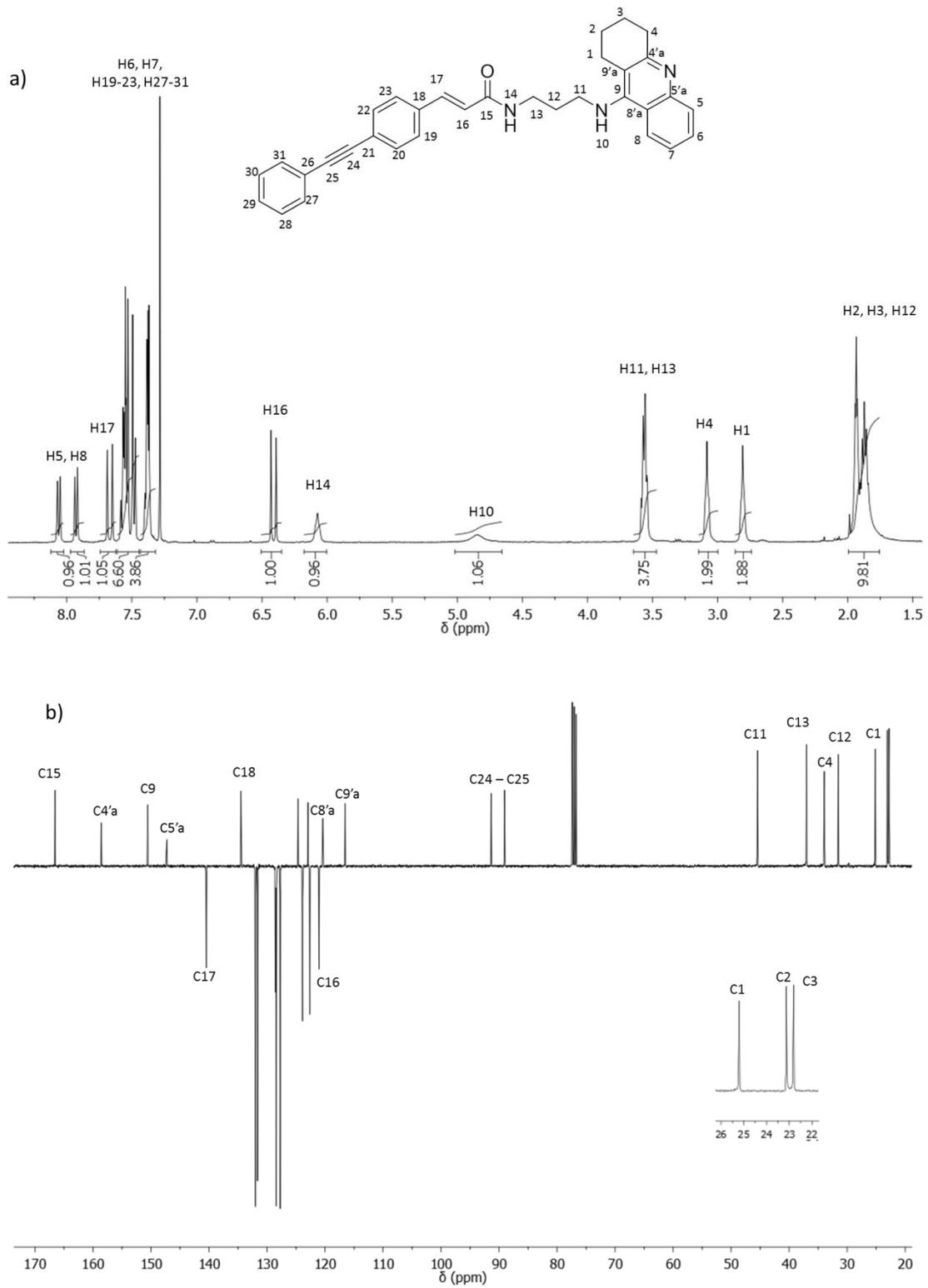


Figura 4

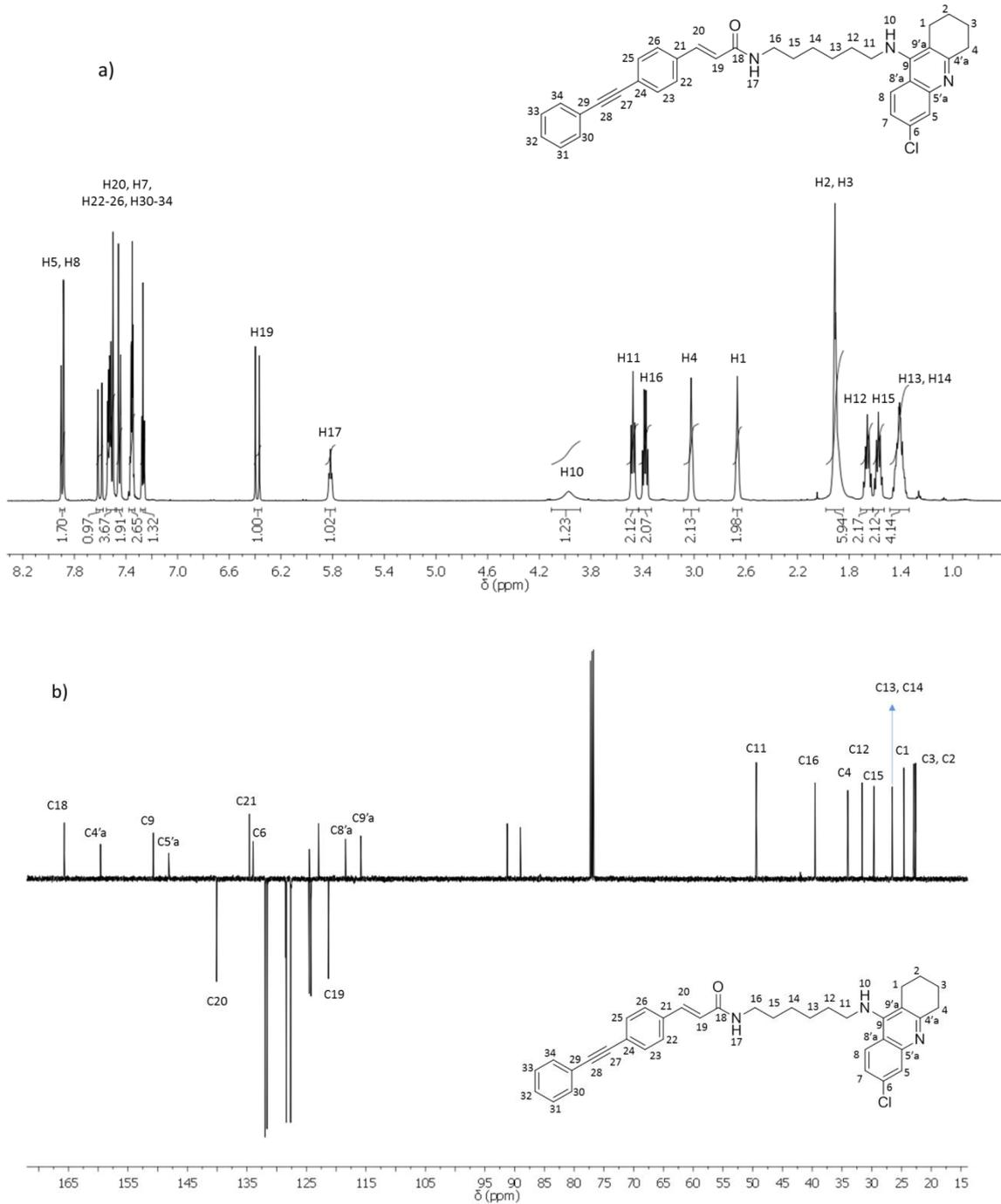


Figura 5

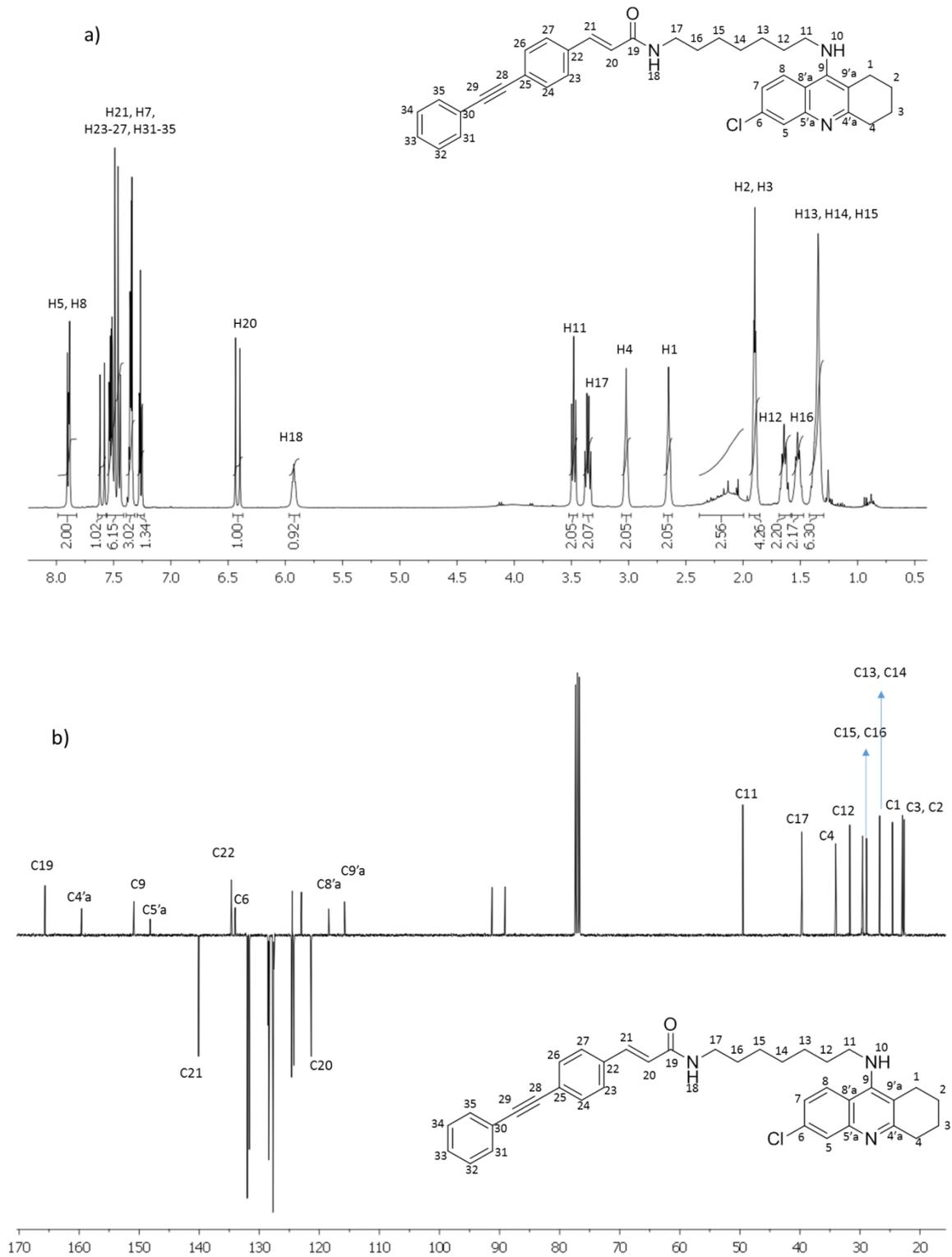


Figura 6

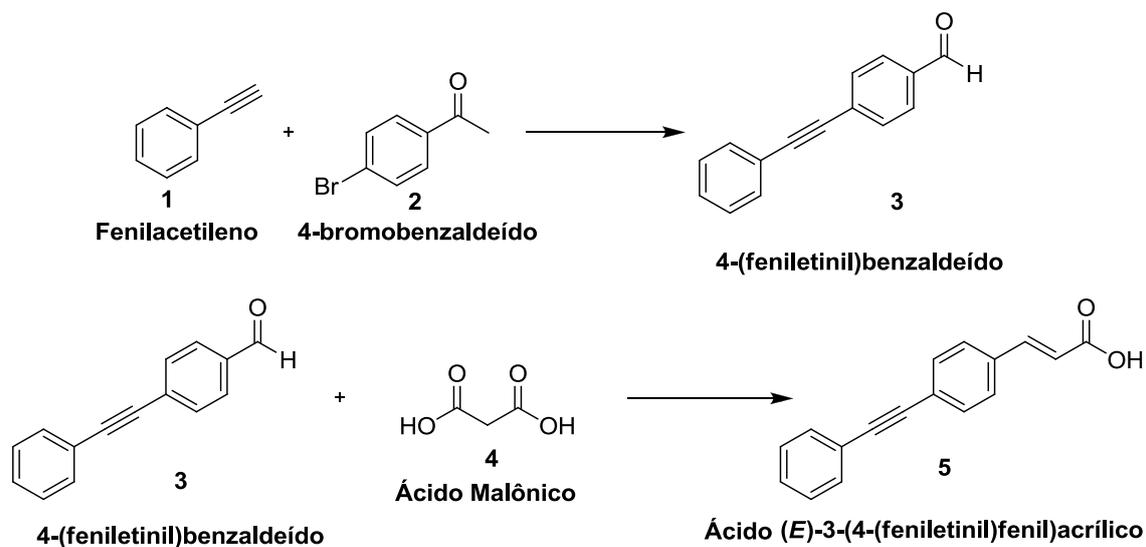


Figura 7

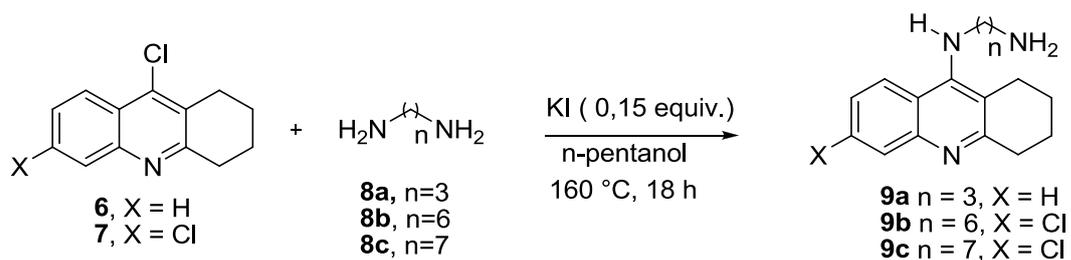


Figura 8

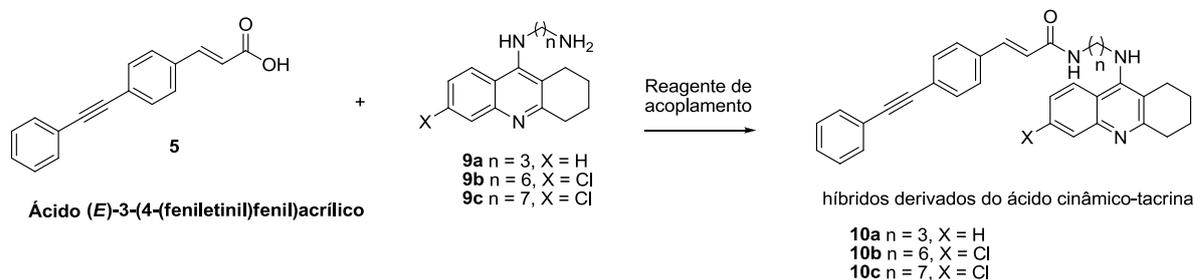


Figura 9

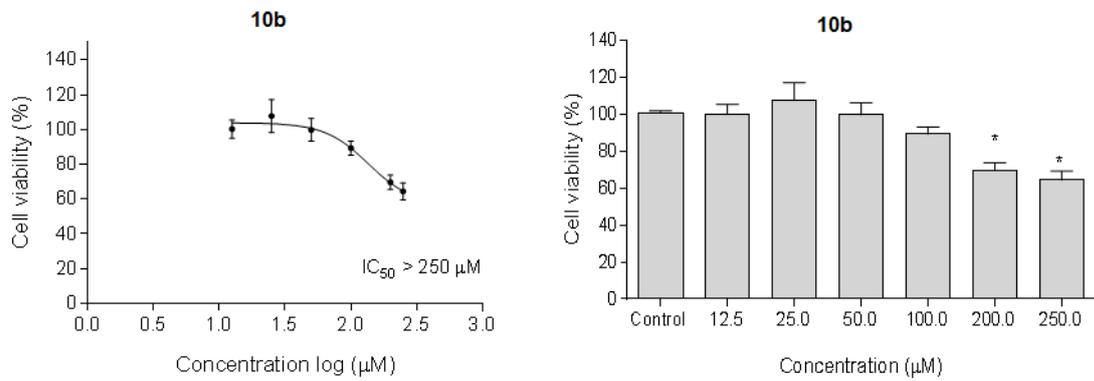


Figura 10

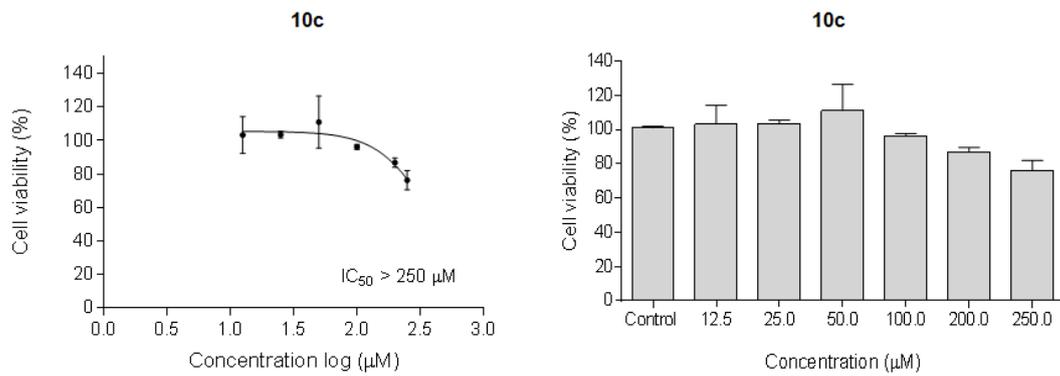


Figura 11

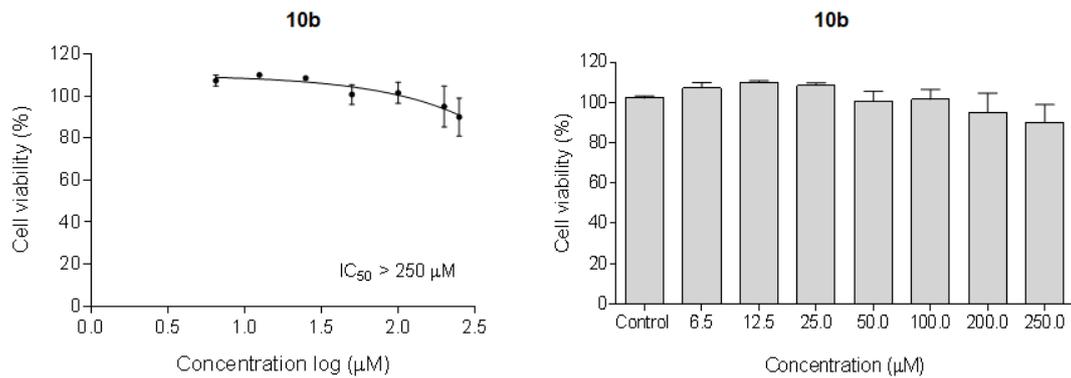


Figura 12

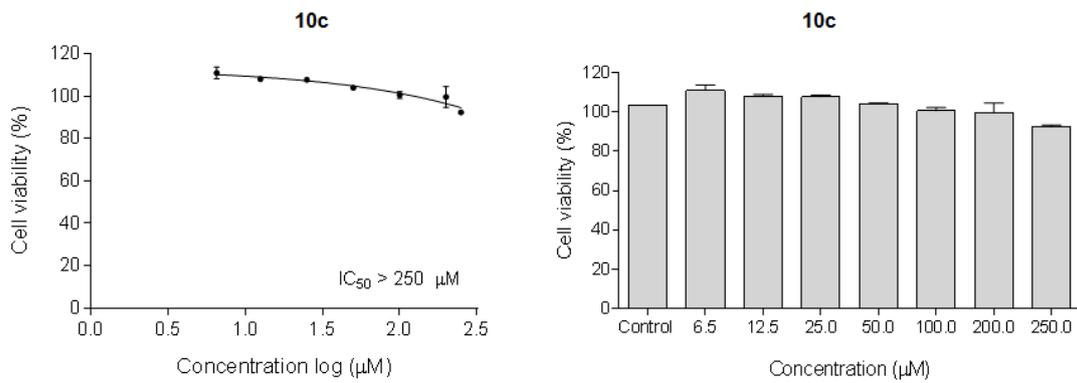


Figura 13

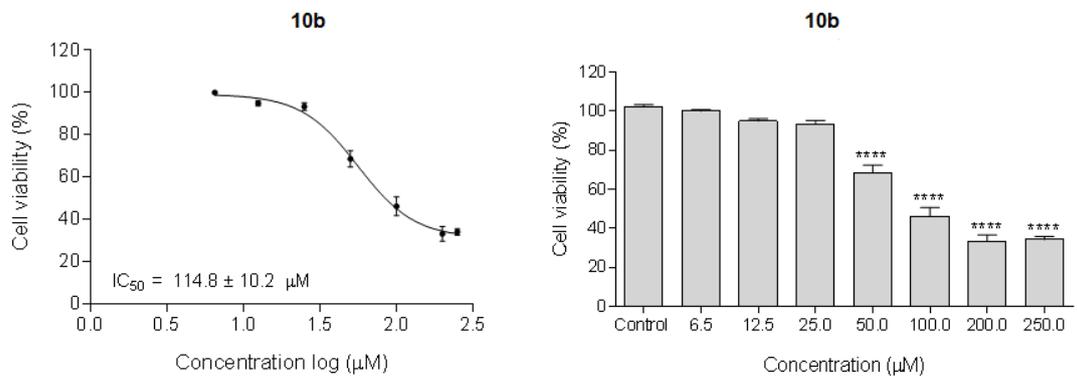


Figura 14

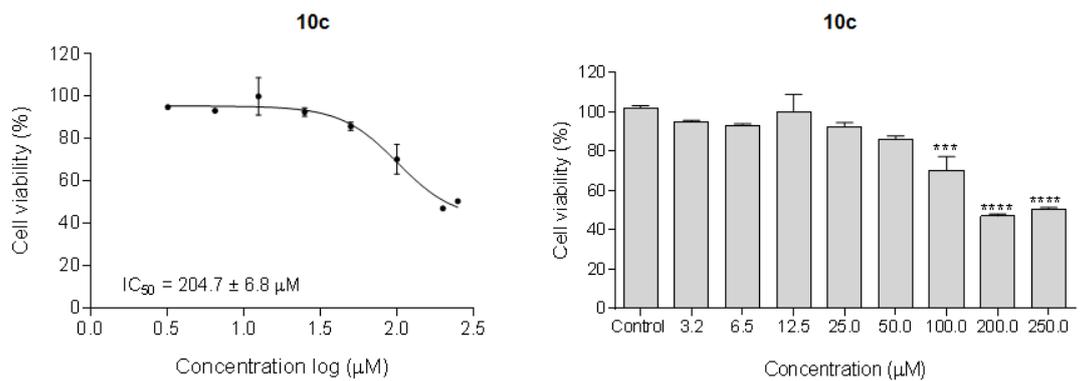


Figura 15

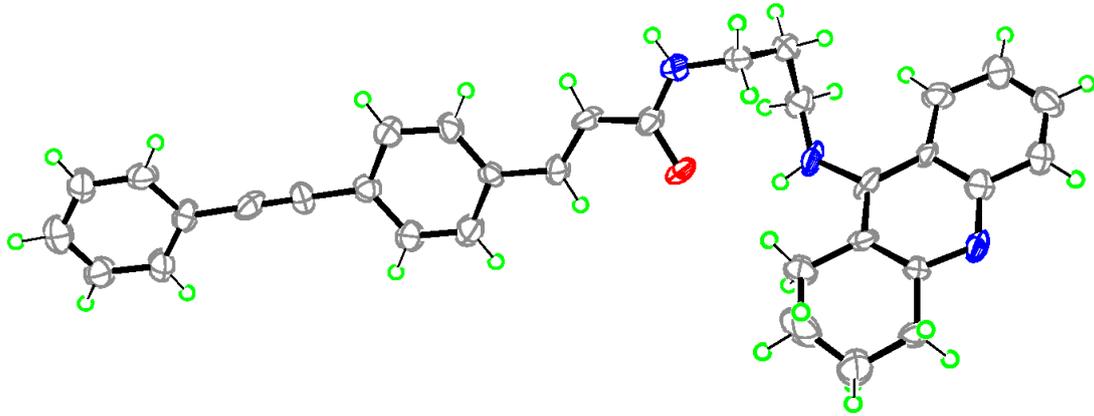


Figura 16

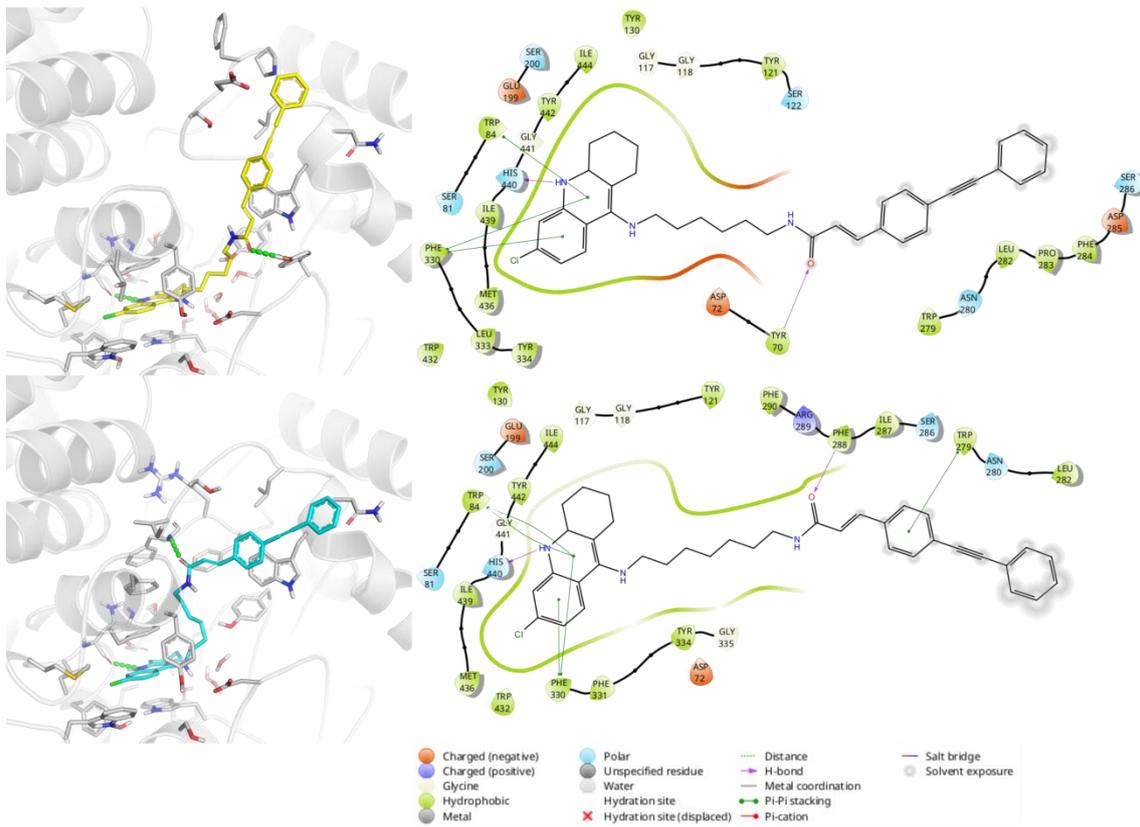


Figura 17

Resumo**MOLÉCULAS COM NÚCLEO HÍBRIDO TACRINA-ÉTINIL-FENIL-CINAMAMIDA
COM PROPRIEDADE ANTICOLINÉRGICA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA,
PROCESSO DE SÍNTESE E SEUS USOS**

A presente invenção descreve moléculas com núcleo híbrido baseado em núcleos de tetraidroacridina e derivados do ácido cinâmico, ou etinil-fenil-cinamamida, 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.