



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

(21) BR 10 2012 021833-0 A2



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

(22) Data de Depósito: 22/08/2012
(43) Data da Publicação: 10/06/2014
(RPI 2266)

(51) Int.Cl.:
A61K 31/381
A61K 31/724
A61P 25/20
A61P 25/22
C07D 333/50

(54) Título: PRODUTOS FARMACÊUTICOS Á BASE DE 2 - [(2,6-DICLOROBENZILIDENO)AMINO] -5,6-DIIDRO-4H-CICLOPENTA[B]TIOFENO-3-CARBONITRILA) (5TIO1) COM PROPRIEDADE ANSIOLÍTICA, SEDATIVA E HIPNÓTICA

(73) Titular(es): Universidade Estadual da Paraíba, Universidade Federal de Pernambuco, Universidade Federal do Piauí

(72) Inventor(es): Elimara Barroso Sabino, Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior, José Lamartine Soares Sobrinho, Monica Felts de La Roca Soares, Rivelilson Mendes de Freitas

(57) Resumo: PRODUTOS FARMACÊUTICOS Á BASE DE 2 - [(2,6-DICLOROBENZILIDENO)AMINO] -5,6-DIIDRO-4H-CICLOPENTA[B]TIOFENO-3-CARBONITRILA) (5TIO1) COM PROPRIEDADE ANSIOLÍTICA, SEDATIVA E HIPNÓTICA. A presente patente de invenção trata da atividade de 2-[(2,6-diclorobenzilideno)amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila)(5TIO1) e seu complexo de inclusão fármaco-ciclodextrina sobre o sistema nervoso central, com propriedade ansiolítica, sedativa e hipnótica para uso na saúde humana e/ou animal com fins de tratamento, profilaxia ou paliativa.

“PRODUTOS FARMACÊUTICOS À BASE DE 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4*H*-ciclopenta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila) (5TIO1) COM PROPRIEDADE ANSIOLÍTICA, SEDATIVA E HIPNÓTICA”

Campo da Invenção

- 5 A presente patente de invenção caracterizam-se por produtos farmacêuticos que apresentam atividade ansiolítica, sedativa e hipnótica por possuírem o fármaco 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4*H*-ciclopenta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila), em sua formulação, nomeado genericamente por 5TIO.
- 10 Os efeitos farmacológicos apresentados e reivindicados por esta patente do 5TIO1 foram avaliados por meio de testes pré-clínicos *in vivo*, sendo estes testes campo aberto, labirinto em cruz elevado, campo claro/escuro e tempo de sono induzido por pentobarbital sódico em camundongos.
- 15 Os ensaios pré-clínicos foram conduzidos com administração intraperitoneal, as dosagens do fármaco inicialmente testadas foram de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, diluídos em veículos apropriados para a realização de testes. Para o controle positivo foi utilizado o benzodiazepínico diazepam a 2mg/kg via intraperitoneal. Diante do exposto, os produtos farmacêuticos
- 20 formulados à base do fármaco, apresentaram efeitos farmacológicos ansiolítico, sedativo e/ou hipnótico significativos e de interesse à terapêutica atual.

Fundamentos da Invenção

- 25 A busca por fármacos menos tóxicos e que tratem as doenças humanas, tem sido objeto de vários estudos. Entre as diversas estratégias utilizadas para a introdução de novos fármacos na terapêutica, as modificações moleculares mostram-se promissoras. Estas consistem na transformação química de moléculas conhecidas, com o objetivo de
- 30 aumentar a potência e segurança, garantindo, assim, um melhor perfil farmacocinético e farmacodinâmico (VERMUTH, C. Selective optimization of side activities: another way for drug discovery. **J. Med. Chem.**, v. 6, n. 47, p. 1303-1314, 2004). Várias moléculas são alvo de estudos para o possível

delineamento de fármacos com ação sobre o sistema nervoso central, onde destaca-se ação ansiolítica, como demonstrado em PI0822385-8, PI 0807604-9, PI 0722185-1, PI 0602106-9, PI 0211124-1, PI 9906905-9 e PI 0013961-0. Entretanto, estudos pré-clínicos com ação sobre o SNC da molécula 5TIO1 nunca foram realizados, demonstrando o caráter inédito desta patente.

Neste panorama, o 5TIO1, (2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila), apresenta-se como um fármaco sintético, obtido por meio de substituições moleculares, utilizando como molécula protótipo 2-amino tiofeno, com já comprovada ação farmacológica, antihistamínica, antiinflamatória, antipsicótica. Por sua vez, seu derivado, o 5TIO1 demonstra atividades farmacológicas diferentes, tais como atividade antifúngica, antichagásica e sob o sistema nervoso central (SNC), sendo objeto desta patente os produtos farmacêuticos com comprovada ação sob o SNC, atividade sedativa, ansiolítica e/ou hipinótica.

As atividades objeto de investigação sob o sistema nervoso central, realciona-se com diversas patologias, dentre elas os distúrbios do sono e a ansiedade, que acometem um grande número de indivíduos da população mundial. Estudos demonstram que aproximadamente de 9 a 18% dos brasileiros apresentam em algum momento de sua vida um transtorno de ansiedade. Estima-se que a prevalência da ansiedade no mundo é de 28,8%. Pesquisas também apontam uma maior prevalência de ansiedade em mulheres, podendo representar 6,6% contra apenas 3,6% em homens.

O medicamento olanzapina que é um tiobenzopiazepínico, de origem sintética, é o antipsicótico mais prescrito no Brasil e um dos mais prescritos no mundo. Como o 5TIO1, a olanzapina também deriva do núcleo tiofênico, demonstrando a importância do estudo desta molécula sobre o SNC. O composto tiofênico (5TIO1) é um sal com ação ansiolítica como observado em outros estudos descrito em PI 0211124-1.

A molécula 5TIO1 apresenta baixa solubilidade aquosa e o delineamento de formas de vetorização deste fármaco, é um passo promissor para dissolução e biodisponibilidade. Neste sentido, para otimizar

a atividade farmacológica dos medicamentos, muitos sistemas de vetorização têm sido desenvolvidos. A tecnologia associada à modificação de condicionar a velocidade e liberação de fármacos tem sido objeto de investigação na área da indústria farmacêutica.

5 Aproximadamente 40% dos fármacos em desenvolvimento eram retirados da pesquisa devido aos problemas com a característica biofarmacêutica, ocasionados por deficiência de solubilidade. Neste panorama justifica-se à vetorização com ciclodextrinas, carboidratos derivados do amido que podem apresentar-se na forma natural (α -
10 ciclodextrina, β - ciclodextrina, γ - ciclodextrina), ou na forma modificada (como por exemplo a sulfobutil- β -ciclodextrina), tais moléculas favorecem à dissolução, solubilização e biodisponibilidade de fármacos. As ciclodextrinas possuem cavidade interna hidrofóbica e superfície externa hidrofílica. Complexos de inclusão (CI), nome dado ao complexo fármaco-ciclodextrina,
15 funcionam como molécula de acolhimento, inserindo a molécula hóspede (5TIO1) na cavidade hidrofóbica, visando melhorar os problemas de biodisponibilidade deste fármaco sintético, promovendo um perfil terapêutico desejável.

 Anteriormente a esta patente de produtos farmacêuticos contendo o
20 5TIO1, como princípio ativo, o grupo de pesquisa em questão já depositou patente a cerca do fármaco 5TIO1 e outros derivados tiofênicos destinados a saúde humana e/ou animal, cujo número de protocolo 000173.

 O grupo realizou experimentos pré-clínicos que comprovam que a obtenção de CI não altera as ações farmacológicas ou toxicológicas do
25 princípio ativo, sendo objeto de interesse com a complexação: aumentando a taxa de dissolução, estabilidade físico-química e biodisponibilidade da molécula hóspede.

 Embora diversos outros derivados tiofênicos sejam amplamente descritos na literatura e alvos de proteção intelectual, os derivados 2-
30 [(benzilideno)amino]-5,6-diidro-4*H*-ciclopenta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila cloro substituídos, assim como o derivado 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4*H*-ciclopenta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (5TIO1), não apresentam até o

momento patentes a seus respeitos, o que corrobora com o caráter inovador deste trabalho.

Os produtos farmacêuticos que contém o 5TIO1 associados a qualquer outro fármaco que venha potencializar a ação farmacológica, atuando como princípio sinérgico, sendo na forma isolada, sendo 5 complexo com ciclodextrina, formando compostos binários, ternários ou associados a polímeros hidrofílicos, ou associado a outras formas de vetorização, e por possuírem o 5TIO1 apresentando ações sedativa, ansiolítica e/ou hipnótica.

10 Descrição Detalhada da Invenção

Esta patente refere-se às atividades ansiolítica, sedativa e hipnótica do novo derivado do núcleo tiofeno, 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4*H*-ciclopenta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila nomeado genericamente por 5TIO1 e de seu complexo de inclusão (5TIO1-CD). Tal molécula apresenta 15 baixa solubilidade aquosa necessitando da nanotecnologia para sua vetorização, neste sentido, utilizamos como molécula vetor as ciclodextrinas (CDs).

Diversas pesquisas vêm demonstrando o grande potencial da nanotecnologia na solubilização e permeabilidade de fármacos. 20 Nanodispositivos permitem o uso de fármacos potencialmente tóxicos e promovem aumento na duração e eficácia da resposta, como demonstrado em vetorizações fármaco-ciclodextrina.

Um das abordagens promissoras é encapsular a molécula na cavidade hidrofóbica da ciclodextrina, pois promove aumento da biodisponibilidade, produzindo melhor atividade biológica. Assim, a CD 25 potencializar a solubilidade em água, reatividade química e as propriedades espectrais de vários fármacos lipofílicos, sem alterar a sua capacidade intrínseca de permear membranas lipofílicas, além de melhorar propriedades das moléculas como taxa de dissolução, biodisponibilidade, bem como 30 reduzir a sua irritação e toxicidade.

As ciclodextrinas são utilizadas para solubilizar e estabilizar substâncias com importância central, como os benzodiazepínicos alozapam,

midazolam e triazolam, sem no entanto, as ciclodextrinas possuírem atividade farmacológica, funcionando apenas como molécula de acolhimento. As ciclodextrinas são utilizadas para formulações de benzodiazepínicos como diazepam e zolpidem, com finalidade de melhorar a solubilidade e estabilidade do medicamento.

Posteriormente, foram analisadas as propriedades físico-químicas da molécula e seu complexo de inclusão (CI), tendo em vista que estes testes são cruciais para o posterior desenvolvimento das demais etapas de desenvolvimento do medicamento oriundo deste fármaco. Dentre as diversas técnicas utilizadas, duas técnicas foram de grande relevância para a compreensão das características físico-químicas da molécula no estado sólido, sendo estas a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e a Espectroscopia de Infravermelho com transformador de Fourier (IV-TF) e análises térmicas do complexo de inclusão (CI), como Análise térmica diferencial (DTA) e Termogravimetria (TG).

Para formação do complexo de inclusão fármaco-ciclodextrina, foi adicionado 20 g de ciclodextrinas em 100 ml de água, com posterior adição da molécula 5TIO1 em excesso. A suspensão resultante permaneceu a temperatura constante (25 °C) sob agitação, por um intervalo um período de 72 horas, de tempo suficiente para atingir o equilíbrio termodinâmico. Após filtração das amostras, a solução obtida contendo complexo de inclusão (CI) CD-5TIO1, teve seu teor da substância ativa determinada por espectrometria no ultra-violeta visível. Para tal determinação utilizou-se o 5TIO1 isolado, para a construção da curva de calibração, e solução CD-H₂O (20% p/v), como branco. Foi utilizado espectrômetro Agilent 8453 (Agilent corp, Santa Clara, CA) e após varredura espectrofotométrica foi selecionado o comprimento de onda $\lambda = 301\text{nm}$.

Por meio da técnica de Espectroscopia de Infravermelho com transformador de Fourier (IV-TF), utilizando o equipamento PerkinElmer® (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de selênio, as amostras analisadas foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR e as espectros foram obtidas de

650 a 4000 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} , observou-se a presença de algumas bandas principais tais como: 2220 cm^{-1} (estiramento $\text{C}\equiv\text{N}$); 778 cm^{-1} (estiramento $\text{C}-\text{Cl}$); as demais bandas secundárias apresentaram uma diminuição da intensidade.

5 Os termogramas foram obtidos em Calorímetro de Varredura Shimadzu® DSC-60 com atmosfera de nitrogênio de 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, na faixa de temperatura de 30-600 $^{\circ}\text{C}$. As amostras foram colocadas em porta amostra de alumínio hermeticamente fechados com o equivalente a 2 $\text{mg} \pm 0,2$ de fármaco. Índio e Zinco foram
10 utilizados para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia. Através da curva de DSC realizada para a verificação da faixa de fusão do 5TIO1 na razão de 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, pode-se evidenciar um pico endotérmico na faixa de temperatura entre 174,2-176,2 $^{\circ}\text{C}$ ($\Delta\text{H}=24,9$ J/g) característico do processo de fusão do princípio ativo. Adicionalmente, na faixa entre 287,9-
15 288,3 $^{\circ}\text{C}$ ($\Delta\text{H}= -46,9$ J/g), observou-se um pico exotérmico referente ao processo de degradação térmica do princípio ativo.

Para caracterização dos complexos 5TIO1:CD foi preparado na razão molar 1:1, utilizando o método de evaporação. Inicialmente para a solubilização do 5TIO1 utilizou-se acetona e água. Para tal, foram utilizadas
20 quantidades mínimas dos solventes. Enquanto que para as ciclodextrinas utilizou-se apenas água na solubilização. Após a dissolução completa de cada componente individualmente, verteu-se a solução de 5TIO1 na solução da CD, realizando-se em seguida vigorosa homogeneização. O solvente orgânico foi retirado inicialmente em rotoevaporador (Evaporador rotativo
25 Marconi®), sob temperatura controlada (50 $^{\circ}\text{C} \pm 5$ $^{\circ}\text{C}$) e pressão reduzida (-900 $\text{mbar} \pm 20$ mbar) com agitação contínua de 90 ± 3 rpm. Posteriormente, as amostras resultantes foram congeladas a -40 $^{\circ}\text{C}$ por 4 dias, e posteriormente foram liofilizadas (pressão de 80 a 150 μHg ; vácuo 220 ± 2 Vca). Após a secagem os complexos foram pulverizados, misturados em gral
30 de porcelana com auxílio de pistilo e tamisados em malha de 250 μm . Os produtos foram acondicionados em frascos ampola hermeticamente fechados e armazenados em dessecador de vidro a vácuo.

A mistura física (MF) foi obtida por homogeneização durante 20 minutos em grau de porcelana com auxílio de pistilo na proporção 1:1 (mol:mol). Posteriormente os produtos foram tamisados em malha de 250 µm e acondicionados em frascos ampola hermeticamente fechados e armazenados em dissecador de vidro a vácuo.

A caracterização termoanalítica através de TG e DTA foi realizada em duplicata por meio de termobalança, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 ml/min, utilizando massa de cerca de 2,0 mg ($\pm 0,2$), acondicionadas em cadinho de alumina e analisadas na faixa de temperatura entre 25 °C e 500 °C na razão de aquecimento de 10 °C/min. Antes dos ensaios, verificou-se a calibração do instrumento empregando-se uma amostra de alumínio e zinco.

Em relação ao DTA do CI, observou-se que a fusão do 5TIO1 foi antecipada em aproximadamente 10 °C, havendo também uma diminuição significativa da entalpia envolvida no processo, indicando uma possível diminuição da cristalinidade do fármaco na presença de ciclodextrina. Adicionalmente, também houve um deslocamento da degradação do fármaco para faixas de temperaturas superiores e a uma diminuição do percentual de fármaco degradado.

O desenvolvimento de novos medicamentos a partir de componentes do 5TIO1 e seu complexo de inclusão (5TIO1-CD) precisam de modelos adequados para identificar alvos moleculares que são críticas no cérebro *in vitro* ou *in vivo*. Entre o grande número de possibilidades de testes realizados para obter a atividade da molécula e seu complexo de inclusão, selecionamos alguns testes *in vivo* para avaliação da atividade central, que constituem importantes alvos terapêuticos para doenças neurodegenerativas.

Para a triagem pré-clínica da molécula e seu complexo de inclusão, foram realizados testes comportamentais, dentre eles a determinação da atividade ansiolítica, sedativa e hipnótica sobre o SNC determinada em modelo animal. Os ensaios realizados foram tempo de sono induzido por barbitúrico, labirinto em cruz elevado, campo aberto e tempo de

permanência em claro, as mudanças visam investigar a atividade sedativa, ansiolítica e locomotora, respectivamente.

5 Para triagem de atividade farmacológica, foram utilizados, por experimento, camundongos *Swiss* machos com 2 meses de idade e com peso de 25 a 30 g. Os animais receberam água e dieta (Labina[®]) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura (23 ± 2 °C). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí, protocolo nº. 093/2010.

10 Todos os testes comportamentais foram conduzidos em quartos tranquilos nas mesmas condições acima referidas controlada e isolada de ruídos externos. Diferentes grupos de camundongos foram usados para cada tarefa comportamental. Para cada experimento, os camundongos foram divididos aleatoriamente em oito grupos (7 camundongos por grupo):
15 um grupo controle tratado com o veículo, três grupos tratados com 5TIO1 nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, respectivamente, três grupos tratados com CI nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, e um oitavo grupo de referência tratado com drogas pentobarbital sódico 40 mg/kg (i.p.) (pentobarbital induzida por teste de tempo de sono) e DZP 2 mg/kg (i.p.) (testes do campo
20 aberto, labirinto pluz e claro-escuro). Tratamento com 5TIO1, CI e veículo foi administrado intraperitonealmente (i.p.) 30 minutos antes dos testes comportamentais. Após os tratamentos, cada animal foi submetido a uma série de testes na forma descrita abaixo. Em primeiro lugar, o animal foi observado em uma sala fechada, em temperatura constante (23 ± 1 °C).
25 Todos os testes foram realizados 08:00-18:00 pm.

Durante a triagem comportamental os animais foram observados durante 24 horas após o tratamento com 5TIO1 e 5TIO1-CD (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, ip). Durante estes 24 h foram observados a ocorrência dos seguintes sinais gerais de toxicidade: piloereção, prostração, grooming, grupos
30 distintos, dispnéia, sedação, analgesia e ptose palpebral. Doses mais baixas de 5TIO1 (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg), não produziram qualquer alteração

perceptível no sistema motor ou comportamental, e não causaram mortes dentro de 72 h de sua administração.

Para o teste de tempo de permanência em campo claro, que avalia a atividade ansiolítica, foi utilizado um aparato feito de acrílico dividido em 2 compartimentos (*box* claro e *box* escuro) que se comunicam por meio de uma pequena porta. O *box* escuro (acrílico preto, 27 x 18 x 29 cm) é pobremente iluminado. O *box* claro (acrílico transparente, 27 x 18 x 29 cm) é iluminado pela luz do ambiente. O animal foi observado por 5 minutos o parâmetro utilizado foi o tempo de permanência no *box* claro onde o tempo avaliado foi em segundos.

A administração de DZP aumentou significativamente o tempo gasto pelos camundongos no espaço iluminado. No entanto, não foram encontradas alterações no número de entradas para este lugar. Neste modelo, a administração de 5TIO1 aumentou significativamente o tempo gasto pelos camundongos no compartimento iluminado quando comparado com o grupo controle. Este efeito não foi dose dependente e estatisticamente diferente quando comparado com o grupo DZP.

No entanto, não foram encontradas alterações no número de entradas para este lugar. Neste modelo, a administração de CI aumentou significativamente o tempo gasto pelos camundongos no compartimento iluminado quando comparado com o grupo controle, demonstrando assim que a vetorização com cilodextrina potencializou a atividade ansiolítica. Este efeito não foi dose dependente e estatisticamente diferente quando comparado com o grupo DZP.

A atividade motora dos animais foi verificada por meio de um campo aberto feito de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) e dividido em 9 quadrantes iguais. Após 30 minutos dos tratamentos, os animais, um por vez, serão colocados no centro do campo aberto onde o número de cruzamentos com as quatro patas (atividade locomotora espontânea - ALE), número de comportamento de autolimpeza (*grooming*) e o número de levantamentos (*rearing*), sem encostar-se à parede, serão observados durante o tempo de 5 minutos.

O teste de campo aberto foi utilizado para avaliar a atividade exploratória do animal, atividade locomotora espontânea, *rearing* e *grooming* são parâmetros de comportamento mais comumente usados para descrever as influências dos acontecimentos da vida ou a administração de drogas.

5 5TIO1 foi primeiramente avaliados no teste de campo aberto, que dá uma boa indicação do estado emocional do animal, uma vez que se admite que o rearing é uma função do nível de excitabilidade do sistema nervoso central. Alguns autores relataram que o rearing reflete o comportamento exploratório de um animal e, portanto, substâncias ansiolíticas induzem um aumento na
10 atividade ou não altera este parâmetro, e sugerem que os agentes ansiolíticos e sedativos diminuem este parâmetro, demonstrando apresentar atividade miorreaxante.

Após administração de 5TIO1 (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg i.p.) reduziu o número de cruzamentos, e *rearings*, quando comparado grupo controle. Em
15 5TIO1 (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg) foram observados um aumento no número de *groomings* (movimento de autolimpeza), quando comparado grupo controle. Diferentemente, quando administrado 5TIO1 (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg i.p.) aumentou o número de cruzamentos, *groomings*, e *rearings* no teste de campo aberto, quando comparado grupo DZP. Diazepam, como esperado,
20 mostrou efeito sedativo na dose utilizada (2 mg/kg, ip).

Quando administrada 5TIO1-CD (CI) em todas as doses, reduziu o número de cruzamentos, e *rearings* no teste de campo aberto, quando comparados ao grupo veículo, diminuindo a atividade motora, indicando efeito relaxante. Em comparação ao grupo tratado com a molécula apenas,
25 observou-se que a atividade ansiolítica foi potencializada, quando comparado o número de *rearings*. O número de cruzamentos reduziu significativamente em relação ao controle, só que de forma branda em relação aos grupos tratados apenas com 5TIO1, demonstrando que o CI não altera a atividade locomotora. No CI em todas as doses foram observados
30 um aumento no número de *groomings*, quando comparados os grupos de controle. Diazepam, como esperado, mostrou efeito sedativo na dose utilizada (2 mg/kg, ip).

Na literatura, o aumento do *grooming* é observado em roedores que estão apreensivos, os pesquisadores descobriram que as drogas ansiolíticas reduzem este parâmetro no campo aberto. Estudos mostram que o número de cruzamentos dá uma indicação do nível de excitabilidade do sistema nervoso central, portanto, substâncias psicoestimulantes aumentam este parâmetro. Os resultados têm mostrado que 5TIO1 foi capaz de diminuir significativamente o número de cruzamentos, *groomings* e *rearing*, reduzindo a atividade locomotora, o que poderia ser um indicativo de efeito sedativo e relaxante muscular.

Para atividade ansiolítica, foi realizado teste de labirinto em cruz elevado. Este modelo consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm), também opostos, em forma de cruz, conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm). O aparelho está elevado a uma altura de 45 cm do nível do chão. Após 30 minutos dos tratamentos, os animais serão colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento será observado por 5 minutos. As medidas comportamentais observadas serão: número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados, respectivamente. O tempo de permanência mede o tempo gasto pelo animal nos braços abertos e fechados. Compostos ansiolíticos reduzem a aversão do animal natural para os braços abertos e promove a exploração dos mesmos. Por outro lado, as passagens forçada ou voluntária dos animais nos braços abertos da EPM estão associados a alterações hormonais e comportamentais indicativos de aumento da ansiedade. Estes testes foram feitos em lugares diferentes, justificando o uso deste aparelho.

O número de entrada em braços abertos, em todos os grupos tratados com diferentes doses de 5TIO1 produziu uma diminuição significativa em comparação aos grupos controle e DZP. Na porcentagem de entradas em braços abertos um aumento significativo em doses de 0,1 e 0,5 mg/kg foi verificada quando comparado ao grupo controle. No entanto, houve uma diminuição significativa na dose mais elevada, em comparação ao grupo controle. Em comparação com DZP, diminuiu significativamente todos os

parâmetros observados em animais tratados com as três doses de 5TIO1. Houve uma diminuição significativa no grupo de 1,0 mg/kg em comparação à dose de 0,1 e 0,5 mg/kg. Para tempo de permanência em braços abertos, houve uma redução significativa nos grupos tratados com doses de 0,1, 0,5 e 1 mg/kg de 5TIO1, quando comparado ao grupo controle, mas uma diferença significativa foi detectada apenas no grupo tratado com 1,0 mg/kg, quando comparado ao grupo controle DZP. Para a porcentagem de tempo em braços abertos, foi visto dose dependente quando comparado com os grupos DZP e controle. Observamos uma diminuição significativa no grupo tratado com doses de 0,5 e 1,0 mg/kg quando comparado a 0,1 mg/kg, e uma diminuição significativa no grupo tratado com a dose mais elevada quando comparada com a dose mais baixa.

Para o número de entrada em braços abertos, os grupos tratados com diferentes doses de CI tiveram uma diminuição significativa em comparação aos grupos controle e DZP. Em relação ao grupo tratado apenas com 5TIO1, os grupos CI obtiveram um aumento, assemelhando-se ao grupo tratado com diazepam, potencializando o efeito ansiolítico de 5TIO1. Em porcentagem de entradas em braços abertos, foi verificado um aumento significativo nas doses de CI 0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg quando comparado ao grupo controle. Em comparação com DZP, diminuindo significativamente todos os parâmetros observados em animais tratados com as três doses do CI, assemelhando-se ao grupo tratado com diazepam. Houve uma diminuição significativa no grupo de 1,0 mg/kg em comparação à dose de 0,1 e 0,5 mg/kg. Para tempo de permanência em braços abertos, ocorreu uma significativa redução no grupo tratado com a dose CI 1 mg/kg, quando comparado ao grupo controle, mas uma diferença significativa foi detectada nos grupos tratados com CI 0,1, 0,5 mg/kg e 1,0 mg/kg, quando comparado com DZP. Para porcentagem de tempo em braços abertos, foi visto em uma dose-dependente quando comparado com os grupos tratados com DZP e controle. Observamos uma diminuição significativa no grupo tratado com a dose mais elevada quando comparada com a dose mais baixa.

Os resultados demonstraram que 5TIO1 também foi capaz de aumentar significativamente o número de porcentagem de permanência, bem como o número de entradas nos braços abertos, o que indica uma resposta positiva. No teste de tempo de permanência no campo claro e escuro, as doses testadas assemelham grupo DZP, sugerindo uma atividade ansiolítica provável. Nossos resultados apontam que o efeito sedativo, assim, como efeito ansiolítico de 5TIO1 possivelmente envolve o complexo do receptor $GABA_A$ no cérebro de camundongos. Assim, os efeitos ansiolíticos e hipnóticos de 5TIO1 podem ser causados por sua ação combinada de vários sistemas de neurotransmissores e receptores, incluindo os receptores $GABA_A$. O efeito ansiolítico pode ser também entendida pelo sistema serotoninérgico, derivados da atividade núcleo tífeno mostraram que atuam seletivamente sobre os receptores 5HT. Barbitúricos, que induzem tempo de sono mede a atividade hipnótica e sedativa de 5TIO1, aumentando o tempo de duração do sono, sugerindo um efeito maior que o pentobarbital.

Para avaliar a atividade sedativa e hipinótica de 5TIO1 e seu complexo de inclusão, o sono do camundongo foi induzida por um administração de 40 mg/kg (i.p.) por peso do corpo de pentobarbital, e a duração do sono em minutos de cada animal foi observado. O tempo de sono foi registrado como o período para a recuperação do reflexo de endireitamento.

O pré-tratamento com 5TIO1 (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, i.p.) reduziu a latência do sono, além de aumentar significativamente em 81,3 e 87,2% o tempo total de sono induzido pelo pentobarbital observado nas doses de 5TIO1 (0,5 e 1,0 mg/kg), quando comparado ao grupo controle, respectivamente. Quando realizado pré-tratamento com Cl (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, ip) reduziu a latência do sono, além de aumentar significativamente a 37, 25% no tempo total de sono induzido pelo pentobarbital, observado em Cl 0,5 mg/kg, quando comparado ao grupo controle, respectivamente.

Comprovando que 5TIO1 e seu complexo de inclusão promovem efeito hipnótico e sedativo, quando comparado ao grupo controle negativo. Nossos resultados dão suporte à idéia de que 5TIO1 interage com o receptor

GABA_A, provavelmente no subtipo de receptores que mediam os efeitos benzodiazepínicos, para produzir atividades sedativa e hipnótica.

Contudo, através destas análises, este grupo comprova que esta molécula e seu complexo de inclusão fármaco-ciclodextrina vêm, ampliar o arsenal terapêutico disponível contra as doenças que acometem a população humana, uma vez que em triagem farmacológica, mostraram-se promissoras para tratamento de doenças do sistema nervoso central, com ação ansiolítica, sedativa e hipnótica, sendo por sua vez de interesse de patenteamento. Os resultados da associação de 5TIO1 com ciclodextrina potencializou as atividades ansiolíticas, sedativa e hipnótica da nova molécula sintética.

REIVINDICAÇÕES

1. “PRODUTOS FARMACÊUTICOS À BASE DE 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4*H*-ciclopenta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila), (5TIO1) COM PROPRIEDADE ANSIOLÍTICA, SEDATIVA E HIPNÓTICA” **caracterizado**
5 **por** possuir o princípio ativo 5TIO1, apresenta ação sedativa, hipnótica e ansiolítica.
2. “PRODUTOS FARMACÊUTICOS À BASE DE 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4*H*-ciclopenta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila), (5TIO1) COM PROPRIEDADE ANSIOLÍTICA, SEDATIVA E HIPNÓTICA” produto
10 farmacêutico que possui o composto sintético da reivindicação 1, **caracterizado por** ser apresentado na forma seca, semi-sólida e/ou líquida.
3. “PRODUTOS FARMACÊUTICOS À BASE DE 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4*H*-ciclopenta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila), (5TIO1) COM PROPRIEDADE ANSIOLÍTICA, SEDATIVA E HIPNÓTICA” produto
15 farmacêutico das Reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** ser obtido por meio de qualquer solvente ou solução extrativa, independente das proporções entre os solventes.
4. “PRODUTOS FARMACÊUTICOS À BASE DE 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4*H*-ciclopenta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila), (5TIO1) COM
20 PROPRIEDADE ANSIOLÍTICA, SEDATIVA E HIPNÓTICA” produto farmacêutico das Reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizado por** ser obtido por meio de qualquer técnica e/ou processo de síntese.
5. “PRODUTOS FARMACÊUTICOS À BASE DE 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4*H*-ciclopenta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila), (5TIO1) COM
25 PROPRIEDADE ANSIOLÍTICA, SEDATIVA E HIPNÓTICA” produto farmacêutico da Reivindicação 2, **caracterizado por** se apresentar na forma seca, pode ter sido obtido por meio do processo de secagem do produto sintético por meio de qualquer processo viável de secagem e que possua ou não qualquer excipiente sólido como carreador.
- 30 6. “PRODUTOS FARMACÊUTICOS À BASE DE 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4*H*-ciclopenta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila), (5TIO1) COM PROPRIEDADE ANSIOLÍTICA, SEDATIVA E HIPNÓTICA” produto

- farmacêutico da Reivindicação 1, **caracterizado por** veiculado em qualquer apresentação farmacêutica, esteja esta na forma de produtos farmacêuticos sólidos, semi-sólidos e/ou líquidos, estéreis ou não, independente da via de administração, posologia, concentração do produto sintético na formulação e forma de liberação dos ativos (liberação imediata, liberação controlada, e etc.).
- 5
7. "PRODUTOS FARMACÊUTICOS À BASE DE 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4*H*-ciclopenta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila), (5TIO1) COM PROPRIEDADE ANSIOLÍTICA, SEDATIVA E HIPNÓTICA" produto
- 10 farmacêutico da Reivindicação 6, **caracterizado por** apresentar a ação farmacológica de interesse quando isolado ou quando associado a qualquer outro fármaco (sintético, semissintético, fitofármaco, mineral, biológico, biotecnológico ou fitoterápico) que potencialize a ação sedativa, hipnótica e ansiolítica do mesmo.
- 15
8. "PRODUTOS FARMACÊUTICOS À BASE DE 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4*H*-ciclopenta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila), (5TIO1) COM PROPRIEDADE ANSIOLÍTICA, SEDATIVA E HIPNÓTICA" produto farmacêutico da Reivindicação 7, **caracterizado por** uso veterinário e/ou humano.
- 20
9. "PRODUTOS FARMACÊUTICOS À BASE DE 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4*H*-ciclopenta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila), (5TIO1) COM PROPRIEDADE ANSIOLÍTICA, SEDATIVA E HIPNÓTICA" produto farmacêutico da Reivindicação 8, **caracterizado por** se o uso em humanos, pode ser destinado a administração pediátrica, adulta ou geriátrica.
- 25
10. "PRODUTOS FARMACÊUTICOS À BASE DE 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4*H*-ciclopenta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila), (5TIO1) COM PROPRIEDADE ANSIOLÍTICA, SEDATIVA E HIPNÓTICA" produto sintético da reivindicação 1, **caracterizado por** apresentar atividade sedativa, hipnótica e ansiolítica.
- 30
11. "PRODUTOS FARMACÊUTICOS À BASE DE 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4*H*-ciclopenta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila), (5TIO1) COM PROPRIEDADE ANSIOLÍTICA, SEDATIVA E HIPNÓTICA" produto

farmacêutico da Reivindicação 8, **caracterizado por** tratar distúrbios do sono e da ansiedade, bem como outras doenças onde o processo neurológico responde pela fisiopatologia inerente.

RESUMO

“PRODUTOS FARMACÊUTICOS À BASE DE 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4*H*-ciclopenta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila), (5TIO1) COM PROPRIEDADE ANSIOLÍTICA, SEDATIVA E HIPNÓTICA”

- 5 A presente patente de invenção trata da atividade de 2-[(2,6-diclorobenzilideno)amino]-5,6-diidro-4*H*-ciclopenta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila) (5TIO1) e seu complexo de inclusão fármaco-ciclodextrina sobre o sistema nervoso central, com propriedade ansiolítica, sedativa e hipnótica para uso na saúde humana e/ou animal com fins de tratamento, profilaxia ou paliativa.