



### **“USO DE UM COMPOSTO”**

[001] A presente invenção refere-se ao tratamento de doenças neurodegenerativas.

[002] Doenças neurodegenerativas são aquelas que são induzidas pelo colapso da rede neural do circuito nervoso com base na degeneração sistemática e deciduação de neurócitos, sendo conhecidas como diversas doenças intratáveis, tais como mal de Alzheimer (AD), mal de Parkinson, demência de corpos Lewis, demência vascular e problemas associados ao envelhecimento, incluindo (i) neurodegeneração não cognitiva, (ii) degeneração neuromuscular não cognitiva e (iii) neurodegeneração sensorial motora, mal de Huntington, doenças neuronais motoras incluindo esclerose lateral amiotrófica (ALS), síndrome de Down, degeneração gangliônica corticobasal, atrofia de múltiplos sistemas, atrofia cerebral, atrofia olivopontocerebelar, paralisia supranuclear, ataxia de Friedreich, ataxia espinhocerebelar do tipo 2, degenerações frontotemporais (FTD) e afasia progressiva primária.

[003] Sintomas clínicos de doenças neurodegenerativas variam de menores a severas, dependendo da doença. Eles incluem tremor, rigidez, aquinesia, hipoquinesia, bradiquinesia, falhas de reflexos comportamentais, disfunção autonômica, pulsão, perturbações da marcha, depressão, apatia, confusão, alteração do aprendizado, déficits de memória, impedimento cognitivo, amiotrofia, perda muscular, distúrbios da cintura escapular, distúrbios das articulações, disfagia, distúrbios respiratórios, dormência, paralisia e demência, que são barreiras importantes para a realização de atividades diárias.

[004] A morte neurodegenerativa é um mecanismo complicado, provavelmente devido a diversos grupos moleculares que acionam doenças neurodegenerativas quando ocorrerem problemas na sua expressão, atividade e/ou regulação. Isso pode explicar por que nenhum método eficaz de inibição ou reversão da neurodegeneração foi estabelecido até hoje.

[005] Além do tratamento para remoção das causas dessas doenças, é também importante reconstruir a rede neural. Tem sido afirmado, por exemplo, que, em mal de Alzheimer, para o qual foi reconhecida a citotoxicidade de peptídeo amiloide  $\beta$  como causa, a atrofia de neurites e a redução das sinapses acionam a deterioração da função neurológica e, por outro lado, mesmo após esse acionamento, neurócitos que não são totalmente desnaturados ou que sobreviveram sem degeneração podem ser recuperados se puderem ser possivelmente ativados para fornecer neurites para a recuperação das sinapses.

[006] Existe, portanto, importante necessidade de novos agentes capazes de proteger neurites, mas também capazes de aumentar o crescimento de neurites e promover a formação de novas sinapses, a fim de prevenir e tratar curativamente doenças neurodegenerativas.

[007] A presente invenção satisfaz essa necessidade.

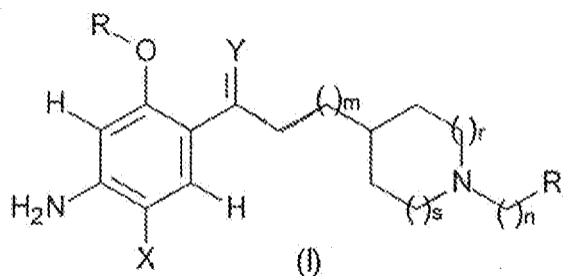
[008] A presente invenção resulta, de fato, da descoberta inesperada dos inventores de que o composto Donecoprida, descrito no pedido internacional WO 2014/195593, possui atividade neuroprotetora, pois é capaz, além de reduzir a hiperfosforilação de Tau, de aumentar o crescimento de neurites para manter a taxa de sinapses e, o que é mais importante e inesperado, promover a formação de novas sinapses.

[009] Devido a esse efeito protetor geral e eficiente sobre neurites, o composto Donecoprida é um agente neuroprotetor muito promissor para evitar e/ou tratar doenças neurodegenerativas que envolvam a degeneração de neurites.

[0010] Este efeito foi adicionalmente confirmado com grande quantidade de compostos da fórmula geral (I) abaixo em diversos modelos de doenças neurodegenerativas, particularmente em modelos de mal de Alzheimer, modelos de mal de Parkinson, modelos de esclerose lateral amiotrófica, modelos de mal de Huntington e modelos de doenças neurodegenerativas induzidas por

isquemia ou lesões cerebrais traumáticas.

[0011] A presente invenção refere-se, portanto, a compostos da fórmula (I) a seguir:



em que:

- X representa:

- um átomo de hidrogênio;
- um átomo de halogênio (Hal), em que (Hal) é flúor,

cloro, bromo ou iodo; ou

- um grupo poli-halogênio alquila  $C_p(\text{Hal})_{2p+1}$  de cadeia linear ou ramificada, em que  $p = 1, 2, 3$  ou  $4$  (Hal), que possui o mesmo significado indicado acima;

- Y representa:

- um átomo de oxigênio;
- um átomo de enxofre; ou
- um radical N-R", em que R" representa um átomo de

hidrogênio, radical -OH, radical -O-A em que A representa um grupo alquila  $C_1-C_6$  de cadeia linear ou ramificada, particularmente em que A representa um grupo metila ou radical alquila  $C_qH_{2q+1}$  de cadeia linear ou ramificada, em que  $q = 1, 2, 3$  ou  $4$ ;

- m é um número inteiro selecionado a partir de 1, 2 e 3;

- n é um número inteiro selecionado a partir de 0, 1, 2 e 3;

- r e s são números inteiros cujos valores são:  $r=s=0$ ;  $r=s=1$ ;

$r=s=2$ ; ou  $r=0$  e  $s=1$ ; ou, por fim,  $r=0$  e  $s=2$ ;

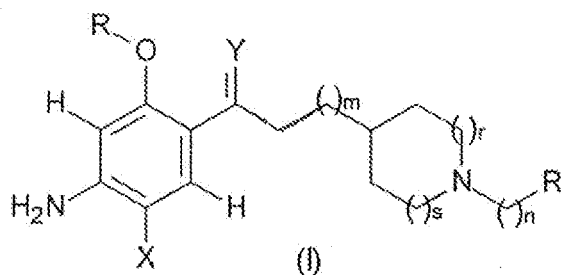
- R representa:
  - um átomo de hidrogênio; ou
  - um grupo alquila C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> de cadeia linear ou ramificada capaz de conduzir um ou mais átomos de F;
- R' representa:
  - um radical alquila C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> de cadeia ramificada; ou
  - um grupo cicloalquila C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> ou bicíclico C<sub>5</sub>-C<sub>13</sub>, capaz de conduzir um ou mais grupos R e de possuir um átomo de oxigênio ou átomo de nitrogênio que pode ser substituído por R, átomo de enxofre ou radical -SO<sub>2</sub>- ou -SO-;

bem como seus enantiômeros ou diaestereoisômeros e seus racêmicos, seus sais de ácidos, seus hidratos ou seus produtos de solvatação; para uso como agente neuroprotetor na prevenção e/ou tratamento de doenças neurodegenerativas.

### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0012] Compostos:

[0013] O composto utilizado de acordo com a presente invenção é um composto da fórmula (I) a seguir:



em que:

- X representa:
  - um átomo de hidrogênio;
  - um átomo de halogênio (Hal), em que (Hal) é flúor, cloro, bromo ou iodo; ou

- um grupo poli-halogênio alquila  $C_p(\text{Hal})_{2p+1}$  de cadeia linear ou ramificada, em que  $p = 1, 2, 3$  ou  $4$  (Hal), que possui o mesmo significado indicado acima;

- Y representa:

- um átomo de oxigênio;
- um átomo de enxofre; ou
- um radical  $N-R''$ , em que  $R''$  representa um átomo de

hidrogênio, radical  $-OH$ , radical  $-O-A$  em que A representa um grupo alquila  $C_1-C_6$  de cadeia linear ou ramificada, particularmente em que A representa um grupo metila ou radical alquila  $C_qH_{2q+1}$  de cadeia linear ou ramificada, em que  $q = 1, 2, 3$  ou  $4$ ;

- m é um número inteiro selecionado a partir de 1, 2 e 3;
- n é um número inteiro selecionado a partir de 0, 1, 2 e 3; e
- r e s são números inteiros cujos valores são:  $r=s=0$ ;  $r=s=1$ ;

$r=s=2$ ; ou  $r=0$  e  $s=1$ ; ou, por fim,  $r=0$  e  $s=2$ ;

- R representa:

- um átomo de hidrogênio; ou
- um grupo alquila  $C_1-C_5$  de cadeia linear ou ramificada

capaz de conduzir um ou mais átomos de F; e

- R' representa:

- um radical alquila  $C_1-C_6$  de cadeia ramificada; ou
- um grupo cicloalquila  $C_3-C_{10}$  ou bicíclico  $C_5-C_{13}$ ,

capaz de conduzir um ou mais grupos R e de possuir um átomo de oxigênio ou átomo de nitrogênio que pode ser substituído por R, átomo de enxofre ou radical  $-SO_2-$  ou  $-SO-$ ;

bem como seus enantiômeros ou diaestereoisômeros e seus racêmicos, seus sais de ácidos, seus hidratos ou seus produtos de solvatação.

[0014] Em realização específica, na fórmula (I), Y representa:

- um átomo de oxigênio;
- um átomo de enxofre; ou
- um radical N-R'' em que R'' representa um átomo de hidrogênio, radical -OH ou um radical alquila C<sub>q</sub>H<sub>2q+1</sub> de cadeia linear ou ramificada, em que q = 1, 2, 3 ou 4.

[0015] Em realização específica, na fórmula (I), X representa um átomo de halogênio, particularmente cloro ou flúor, mais especificamente cloro, mais especificamente flúor.

[0016] Em outra realização específica, na fórmula (I), Y representa um átomo de oxigênio.

[0017] Em outra realização específica, na fórmula (I), todos dentre m, n, r e s possuem o valor 1.

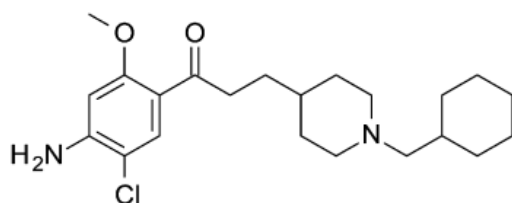
[0018] Em outra realização específica, na fórmula (I), R representa H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> ou CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>F. Preferencialmente, R representa CH<sub>3</sub>.

[0019] Em outra realização específica, na fórmula (I), R' representa um radical selecionado a partir do grupo que consiste dos radicais ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, ciclo-hexila, ciclo-heptila, 4-piperidina e -CH<sub>2</sub>NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>. Em outra realização específica, na fórmula (I), R' representa um radical selecionado a partir do grupo que consiste dos radicais ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, ciclo-hexila, 4-piperidina e -CH<sub>2</sub>NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>. Preferencialmente, na fórmula (I), R' representa um radical selecionado a partir do grupo que consiste dos radicais ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, ciclo-hexila, ciclo-heptila e 4-piperidina. Preferencialmente, (na fórmula (I), R' representa um radical selecionado a partir do grupo que consiste dos radicais ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, ciclo-hexila e 4-piperidina. De maior preferência, R' representa um radical cicloalquila C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub>. De maior preferência, R' representa um radical ciclopentila, radical ciclo-hexila, radical ciclo-heptila ou radical 2-piperidina. De maior preferência, R' representa um radical ciclopentila. De maior preferência, R'

representa um radical ciclo-hexila. De maior preferência, R' representa um radical 2-piperidina. De preferência superior, R' representa um radical ciclo-heptila.

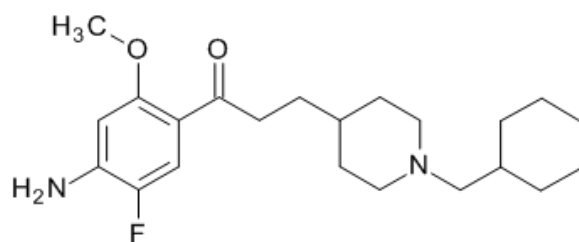
[0020] Em outra realização específica, na fórmula (I), R representa CH<sub>3</sub> e R' representa um radical cicloalquila C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub>, particularmente um radical ciclo-hexila. Em outra realização específica, na fórmula (I), R representa CH<sub>3</sub> e R' representa um radical cicloalquila C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub>, particularmente um radical ciclopentila. Em outra realização específica, na fórmula (I), R representa CH<sub>3</sub> e R' representa um radical cicloalquila C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub>, particularmente um radical 2-piperidina. Em outra realização específica, na fórmula (I), R representa CH<sub>3</sub> e R' representa um radical cicloalquila C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub>, particularmente um radical ciclo-heptila.

[0021] Em realização particularmente preferida, na fórmula (I), X representa cloro, Y representa um átomo de oxigênio, todos dentre m, n, r e s possuem valor 1, R representa CH<sub>3</sub> e R' representa um radical ciclo-hexila. Em outras palavras, em realização particularmente preferida, o composto utilizado de acordo com a presente invenção é o composto de donecoprida da fórmula (II) a seguir:



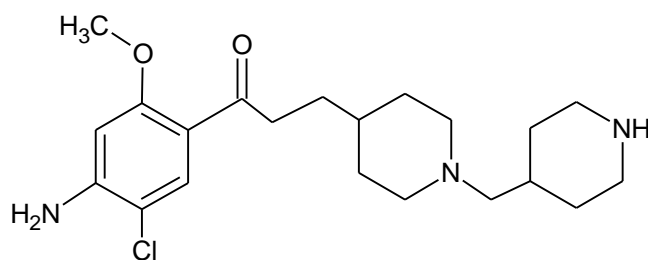
(II).

[0022] Em outra realização particularmente preferida, na fórmula (I), X representa flúor, Y representa um átomo de oxigênio, todos dentre m, n, r e s possuem valor 1, R representa CH<sub>3</sub> e R' representa um radical ciclo-hexila. Em outras palavras, em realização particularmente preferida, o composto utilizado de acordo com a presente invenção é o composto de flucoprida da fórmula (III) a seguir:



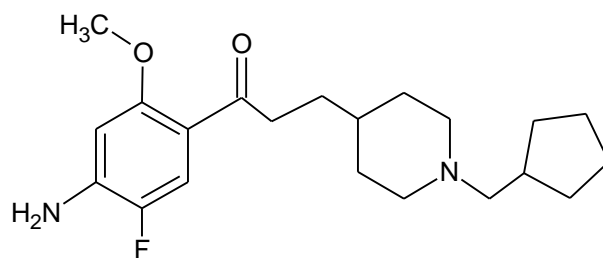
(III).

[0023] Em outra realização particularmente preferida, na fórmula (I), X representa cloro, Y representa um átomo de oxigênio, todos dentre m, n, r e s possuem valor 1, R representa CH<sub>3</sub> e R' representa um radical 2-piperidina. Em outras palavras, em realização particularmente preferida, o composto utilizado de acordo com a presente invenção é o composto MR31176 da fórmula (IV) a seguir:



(IV).

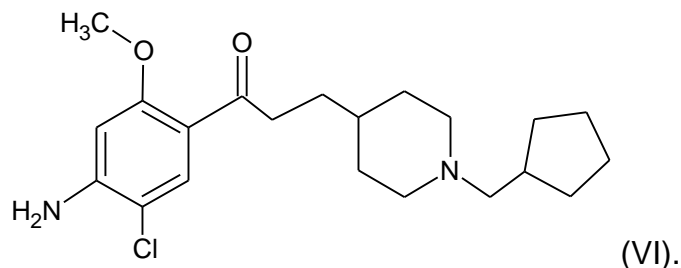
[0024] Em outra realização particularmente preferida, na fórmula (I), X representa flúor, Y representa um átomo de oxigênio, todos dentre m, n, r e s possuem valor 1, R representa CH<sub>3</sub> e R' representa um radical ciclopentila. Em outras palavras, em realização particularmente preferida, o composto utilizado de acordo com a presente invenção é o composto MR33583 da fórmula (V) a seguir:



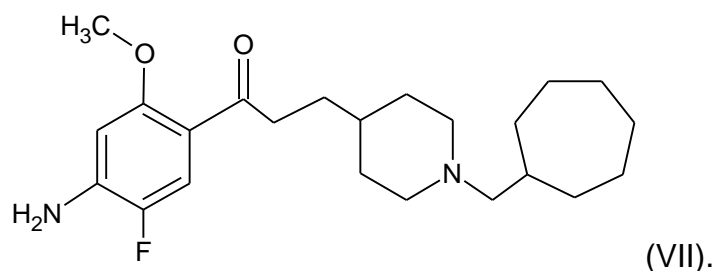
(V).

[0025] Em outra realização particularmente preferida, na fórmula (I), X representa cloro, Y representa um átomo de oxigênio, todos dentre m, n, r e s possuem valor 1, R representa CH<sub>3</sub> e R' representa um radical ciclopentila.

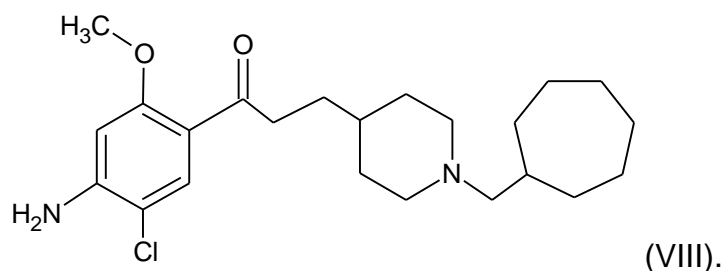
Em outras palavras, em realização particularmente preferida, o composto utilizado de acordo com a presente invenção é o composto MR31172 da fórmula (VI) a seguir:



[0026] Em outra realização particularmente preferida, na fórmula (I), X representa flúor, Y representa um átomo de oxigênio, todos dentre m, n, r e s possuem valor 1, R representa CH<sub>3</sub> e R' representa um radical ciclo-heptila. Em outras palavras, em realização particularmente preferida, o composto utilizado de acordo com a presente invenção é o composto MR36014 da fórmula (VII) a seguir:



[0027] Em outra realização de preferência superior, na fórmula (I), X representa cloro, Y representa um átomo de oxigênio, todos dentre m, n, r e s possuem valor 1, R representa CH<sub>3</sub> e R' representa um radical ciclo-heptila. Em outras palavras, em realização particularmente preferida, o composto utilizado de acordo com a presente invenção é o composto MR31192 da fórmula (VIII) a seguir:



[0028] Em outra realização específica, X representa cloro, Y representa um radical N-R" em que R" representa um radical -O-A em que A representa um grupo metila, todos dentre m, n, r e s possuem o valor 1, R representa CH<sub>3</sub> e R' representa um radical ciclo-hexila. Em outras palavras, em realização específica, o composto utilizado de acordo com a presente invenção é o composto 2-cloro-4-[[2-[1-(ciclo-hexilmetil)-4-piperidil]etil]-N-metoxicarbonimidoil]-5-metoxianilina.

[0029] Em realizações específicas, são utilizados sais de ácidos dos compostos definidos acima. Em realização mais específica, os mencionados sais de ácidos são fumaratos ou dicloridratos.

[0030] Mais especificamente, em realização particularmente preferida, o composto utilizado de acordo com a presente invenção é fumarato de Donecoprida (da fórmula (II) acima), particularmente hidrato fumarato de Donecoprida.

[0031] Em outra realização particularmente preferida, o composto utilizado de acordo com a presente invenção é fumarato de flucoprida (da fórmula (III) acima).

[0032] Em outra realização particularmente preferida, o composto utilizado de acordo com a presente invenção é dicloridrato de MR31176 (da fórmula (IV) acima), particularmente desidrato de dicloridrato.

[0033] Em outra realização particularmente preferida, o composto utilizado de acordo com a presente invenção é fumarato de MR33583 (da fórmula (V) acima).

[0034] Em outra realização particularmente preferida, o composto utilizado de acordo com a presente invenção é fumarato de MR31172 (da fórmula (VI) acima).

[0035] Em outra realização particularmente preferida, o composto utilizado de acordo com a presente invenção é fumarato de MR36014 (da fórmula

(VII) acima).

[0036] Em outra realização particularmente preferida, o composto utilizado de acordo com a presente invenção é fumarato de MR31192 (da fórmula (VIII) acima).

[0037] Doença neurodegenerativa:

[0038] “Doença neurodegenerativa” indica no presente uma doença induzida pelo colapso da rede neural do circuito nervoso com base na degeneração sistemática e decidação de neurócitos.

[0039] Conforme explicado acima, os inventores do presente demonstraram que Donecoprida exibiu efeito protetor geral e eficiente sobre neurites. Devido a esse efeito neuroprotetor geral, Donecoprida pode ser utilizada como agente neuroprotetor para evitar e/ou tratar qualquer doença neurodegenerativa.

[0040] Os inventores confirmaram ainda este efeito com grande quantidade de compostos da fórmula geral (I) acima, particularmente os compostos especificamente definidos no capítulo “Compostos” acima, em diversos modelos de doenças neurodegenerativas, particularmente em modelos de mal de Alzheimer, modelos de mal de Parkinson, modelos de esclerose lateral amiotrófica, modelos de mal de Huntington e modelos de doenças neurodegenerativas induzidas por isquemia ou lesões cerebrais traumáticas.

[0041] Exemplos de doenças neurodegenerativas incluem mal de Alzheimer (AD), mal de Parkinson, demência de corpos Lewis, demência vascular e problemas associados ao envelhecimento, incluindo (i) neurodegeneração não cognitiva, (ii) degeneração neuromuscular não cognitiva e (iii) neurodegeneração sensorial motora, mal de Huntington, doenças neuronais motoras incluindo esclerose lateral amiotrófica (ALS), síndrome de Down, degeneração gangliônica corticobasal, atrofia de múltiplos sistemas, atrofia cerebral, atrofia olivopontocerebelar, paralisia supranuclear, ataxia de

Friedreich, ataxia espinhocerebelar do tipo 2, degenerações frontotemporais (FTD) e afasia progressiva primária.

[0042] Em realização específica, a doença neurodegenerativa é selecionada a partir do grupo que consiste em mal de Alzheimer, mal de Parkinson, mal de Huntington, atrofia de múltiplos sistemas, doenças neuronais motoras incluindo esclerose lateral amiotrófica, síndrome de Down e degenerações frontotemporais.

[0043] Em realização mais específica, a doença neurodegenerativa é selecionada a partir do grupo que consiste em mal de Alzheimer, mal de Parkinson, mal de Huntington e esclerose lateral amiotrófica.

[0044] Em outra realização, a doença neurodegenerativa é mal de Alzheimer.

[0045] Em realização alternativa, a doença neurodegenerativa é doença neurodegenerativa diferente de mal de Alzheimer.

[0046] Na mencionada realização alternativa, a doença neurodegenerativa é selecionada a partir do grupo que consiste em mal de Parkinson, mal de Huntington e esclerose lateral amiotrófica.

[0047] Indicações médicas:

[0048] A presente invenção refere-se a um composto conforme definido no item “Compostos” acima para uso como agente neuroprotetor na prevenção e/ou tratamento de doenças neurodegenerativas conforme definido no item “Doença neurodegenerativa” acima.

[0049] A presente invenção refere-se ainda ao uso de um composto conforme definido no item “Compostos” acima para fabricação de agente neuroprotetor para prevenção e/ou tratamento de doenças neurodegenerativas conforme definido no item “Doença neurodegenerativa” acima.

[0050] A presente invenção refere-se ainda a um método para evitar e/ou tratar doenças neurodegenerativas conforme definido no item

“Doença neurodegenerativa” acima, que compreende a administração a pacientes dele necessitados de quantidade terapêuticamente eficiente de um composto conforme definido no item “Compostos” acima como agente neuroprotetor.

[0051] A presente invenção refere-se ainda a um método de neuroproteção em pacientes que sofrem ou se encontram em risco de sofrer de doenças neurodegenerativas conforme definido no item “Doença neurodegenerativa” acima, que compreende a administração aos mencionados pacientes de quantidade terapêuticamente eficiente de um composto conforme definido no item “Compostos” acima.

[0052] Segundo a presente invenção, o termo “paciente” ou “paciente dele necessitado” indica mamífero humano ou não humano afetado ou propenso a ser afetado por doenças neurodegenerativas conforme definido no item “Doenças neurodegenerativas” acima.

[0053] No contexto da presente invenção, o termo “tratar” ou “tratamento” indica a reversão, alívio ou inibição do progresso do distúrbio ou condição ao qual esse termo se aplica ou um ou mais sintomas desse distúrbio ou condição.

[0054] No contexto da presente invenção, o termo “prevenir” ou “prevenção” indica retardar ou evitar o início do distúrbio ou condição a que se aplica esse termo ou um ou mais sintomas desse distúrbio ou condição.

[0055] “Neuroproteção” indica no presente prevenção ou inibição de efeitos degenerativos e restauração da integridade neuronal no sistema nervoso central, particularmente prevenção ou inibição da degeneração neuronal.

[0056] “Agente neuroprotetor” indica no presente um agente capaz de neuroproteção, conforme definido acima.

[0057] Os inventores demonstraram mais especificamente que os

compostos utilizados de acordo com a presente invenção foram capazes de aumentar o crescimento de neurites, manter a taxa de sinapses, reduzir a hiperfosforilação de Tau e/ou promover a formação de novas sinapses.

[0058] Conseqüentemente, em realização específica, o composto conforme definido no item “Compostos” acima destina-se a aumentar o crescimento de neurites.

[0059] A presente invenção também se refere a um método de aumento do crescimento de neurites em pacientes que sofrem ou se encontram em risco de sofrer doenças neurodegenerativas conforme definido no item “Doença neurodegenerativa” acima, que compreende a administração aos mencionados pacientes de quantidade terapêuticamente eficiente de um composto conforme definido no item “Compostos” acima.

[0060] “Crescimento de neurites” indica no presente o processo de extensão de qualquer projeção do corpo celular de neurônios e a gênese de sinapses associada.

[0061] “Aumento do crescimento de neurites” indica no presente que o crescimento de neurites é maior (ou seja, mais eficiente, mais rápido ou mais longo), preferencialmente maior em quantidade estatisticamente significativa, quando o composto de interesse for aplicado em comparação com o crescimento de neurites observado nas mesmas condições, mas sem aplicação do composto de interesse. Preferencialmente, o crescimento de neurites aumenta em pelo menos 120%, em comparação com o crescimento de neurites observado nas mesmas condições, mas sem aplicar o composto de interesse.

[0062] Em outra realização específica, o composto definido no item “Compostos” acima destina-se a manter a taxa de sinapses.

[0063] Outro objeto da presente invenção refere-se a um método de manutenção da taxa de sinapses em pacientes que sofrem ou se encontram

em risco de sofrer doenças neurodegenerativas conforme definido no item “Doença neurodegenerativa” acima, que compreende a administração aos mencionados pacientes de quantidade terapêuticamente eficiente de um composto conforme definido no item “Compostos” acima.

[0064] “Taxa de sinapses” indica no presente a razão entre o número de sinapses e o número de neurônios.

[0065] “Manutenção da taxa de sinapses” indica no presente que a taxa de sinapses é similar (ou seja, a diferença não é estatisticamente significativa) quando o composto de interesse for aplicado em comparação com a taxa de sinapses observada em condições de controle, tal como as mesmas condições, mas sem aplicação do composto de interesse ou condições em que os neurônios não enfrentam condições neurodegenerativas.

[0066] Em outra realização específica, o composto definido no item “Compostos” acima destina-se à promoção da formação de novas sinapses.

[0067] Outro objeto da presente invenção refere-se a um método de promoção da formação de novas sinapses em pacientes que sofrem ou se encontram em risco de sofrer de doenças neurodegenerativas conforme definido no item “Doença neurodegenerativa” acima, que compreende a administração aos mencionados pacientes de quantidade terapêuticamente eficiente de um composto conforme definido no item “Compostos” acima.

[0068] “Promoção da formação de novas sinapses” indica no presente que o número de sinapses recém-formadas é maior, preferencialmente maior de forma estatisticamente significativa, quando o composto de interesse for aplicado em comparação com o número de sinapses recém-formadas observadas nas mesmas condições, mas sem aplicar o composto de interesse. Preferencialmente, a formação de novas sinapses aumenta em pelo menos 120%, em comparação com a formação de novas sinapses observada nas mesmas condições, mas sem aplicar o composto de interesse.

[0069] Em outra realização específica, o composto definido na seção “Compostos” acima destina-se a reduzir a hiperfosforilação de Tau.

[0070] Outro objeto da presente invenção refere-se a um método de redução da fosforilação de Tau em pacientes que sofrem ou se encontram em risco de sofrer de doenças neurodegenerativas conforme definido no item “Doença Neurodegenerativa” acima, que compreende a administração aos mencionados pacientes de quantidade terapêuticamente eficiente de um composto conforme definido no item “Compostos” acima.

[0071] Por “hiperfosforilação de Tau”, indica-se no presente a fosforilação anormalmente alta da proteína Tau, particularmente a fosforilação anormal da proteína Tau de pelo menos um dentre os resíduos Thr39, Ser46, Thr50, Ser68, Thr69, Thr71, Ser113, Thr153, Thr175, Thr181, Ser184, Ser185, Ser191, Ser198, Ser199, Ser202, Thr205, Ser208, Ser210, Thr212, Ser214, Thr217, Thr231, Ser235, Ser237, Ser238, Ser241, Ser258, Ser262, Ser285, Ser289, Ser305, Ser324, Ser352, Ser356, Tyr394, Ser396, Ser400, Thr403, Ser404, Ser409, Ser412, Ser413, Thr414, Ser416, Ser422, Ser433 e Ser435.

[0072] “Redução da hiperfosforilação de Tau” indica no presente que pelo menos um dentre os resíduos Thr39, Ser46, Thr50, Ser68, Thr69, Thr71, Ser113, Thr153, Thr175, Thr181, Ser184, Ser185, Ser191, Ser198, Ser199, Ser202, Thr205, Ser208, Ser210, Thr212, Ser214, Thr217, Thr231, Ser235, Ser237, Ser238, Ser241, Ser258, Ser262, Ser285, Ser289, Ser305, Ser324, Ser352, Ser356, Tyr394, Ser396, Ser400, Thr403, Ser404, Ser409, Ser412, Ser413, Thr414, Ser416, Ser422, Ser433 e Ser435, particularmente um dos resíduos Ser212 e Thr214 da proteína Tau não é anormalmente fosforilado quando o composto de interesse for aplicado, embora o mencionado resíduo seja anormalmente fosforilado nas mesmas condições, mas sem a aplicação do composto de interesse.

[0073] “Quantidade terapêuticamente eficaz” indica no presente

quantidade suficiente do composto para agir como agente neuroprotetor no tratamento e/ou prevenção de doenças neurodegenerativas com razão risco-benefício razoável aplicável a qualquer tratamento médico. Compreende-se, entretanto, que o uso diário total dos compostos de acordo com a presente invenção será decidido pelo médico atendente dentro do escopo de julgamento médico adequado. O nível de dosagem terapeuticamente eficaz específico para qualquer paciente em particular dependerá de uma série de fatores que incluem o distúrbio sendo tratado e a severidade do distúrbio, atividade dos compostos específicos empregados, idade, peso do corpo, saúde geral, sexo e alimentação do paciente, tempo de administração, via de administração e taxa de excreção dos compostos específicos empregados, duração do tratamento, drogas utilizadas em combinação ou coincidentes com os compostos específicos empregados e fatores similares bem conhecidos na técnica médica. Encontra-se dentro do estado da técnica, por exemplo, o início de doses dos compostos em níveis inferiores aos necessários para atingir o efeito terapêutico desejado e o aumento gradual da dosagem até que seja atingido o efeito desejado.

[0074] Os compostos utilizados de acordo com a presente invenção podem ser administrados na forma de composição farmacêutica que inclui excipientes farmacêuticamente aceitáveis e, opcionalmente, matrizes de liberação prolongada, tais como polímeros biodegradáveis, para formar composições terapêuticas.

[0075] “Farmacêutico” ou “farmacêuticamente aceitável” indica composições e entidades moleculares que não produzem reação adversa, alérgica ou outra indesejável quando administradas a mamíferos, especialmente seres humanos, conforme apropriado. Excipiente ou veículo farmacêuticamente aceitável designa carga, diluente, material encapsulante ou auxiliar de formulação sólido, semissólido ou líquido não tóxico de qualquer tipo.

[0076] A forma das composições farmacêuticas que incluem os

compostos utilizados de acordo com a presente invenção e a via de administração dependem naturalmente da condição a ser tratada, severidade da doença, idade, peso, gênero do paciente etc.

[0077] Os compostos utilizados de acordo com a presente invenção podem ser formulados para administração tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutânea ou intraocular e similares. Em realização específica, o composto utilizado de acordo com a presente invenção é administrado por via oral.

[0078] Alternativamente, as composições farmacêuticas que incluem os compostos utilizados de acordo com a presente invenção podem conter veículos que são farmacêuticamente aceitáveis para uma formulação capaz de ser injetada. Essas podem ser soluções salinas estéreis, particularmente isotônicas (fosfato monossódico ou dissódico, cloreto de sódio, potássio, cálcio ou magnésio e similares, ou misturas desses sais), ou composições secas, especialmente secas por congelamento que, mediante adição, dependendo do caso, de água esterilizada ou solução salina fisiológica, permitem a constituição de soluções injetáveis.

[0079] Para preparar composições farmacêuticas, quantidade eficaz dos compostos utilizados de acordo com a presente invenção pode ser dissolvida ou dispersa em meio aquoso ou veículo farmacêuticamente aceitável.

[0080] As formas farmacêuticas apropriadas para uso injetável incluem dispersões ou soluções aquosas estéreis e pós estéreis para preparação extemporânea de dispersões ou soluções injetáveis estéreis. Em todos os casos, a forma deve ser estéril e fluida para que haja fácil aplicação por seringa. A composição deve ser estável sob as condições de fabricação e armazenagem e preservada contra a ação contaminante de micro-organismos, tais como bactérias e fungos.

[0081] O veículo pode ser um solvente ou meio de dispersão que

contém, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, polietileno glicol líquido e similares) e suas misturas apropriadas. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, utilizando-se um revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersão e utilizando tensoativos, agentes estabilizantes, crioprotetores ou antioxidantes. A prevenção da ação de micro-organismos pode ser causada por agentes antifúngicos e antibacterianos. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, tais como açúcares ou cloreto de sódio.

[0082] Soluções injetáveis estéreis são preparadas por meio da incorporação dos compostos ativos na quantidade necessária no solvente apropriado com diversos outros ingredientes indicados acima, conforme o necessário, seguida por esterilização por filtração. Geralmente, as dispersões são preparadas por meio de incorporação dos diversos ingredientes ativos esterilizados em um veículo estéril que contém o meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários a partir dos indicados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são secagem a vácuo e secagem por congelamento, que geram um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente desejado adicional de uma solução filtrada previamente esterilizada.

[0083] Mediante formulação, as soluções serão administradas de forma compatível com a formulação de dosagem e em quantidade terapeuticamente eficaz. As formulações são facilmente administradas em uma série de formas de dosagem, tais como o tipo de soluções injetáveis descritas acima, mas cápsulas de liberação de drogas e similares também podem ser empregadas.

[0084] Para administração parenteral em solução aquosa, por exemplo, a solução deverá ser adequadamente tamponada, se necessário, e o diluente líquido tornou-se isotônico em primeiro lugar com solução salina ou

glicose suficiente. Essas soluções aquosas específicas são especialmente apropriadas para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea e intraperitoneal. Neste particular, meios aquosos estéreis que podem ser empregados serão os conhecidos pelos técnicos no assunto à luz da presente invenção. Uma dosagem poderá ser dissolvida, por exemplo, em 1 ml de solução isotônica de NaCl e adicionada a 1000 ml de fluido de hipodermoclise ou injetada no local de infusão proposto (vide, por exemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 15ª Edição, págs. 1035-1038 e 1570-1580). Alguma variação da dosagem necessariamente ocorrerá, dependendo da condição do paciente sendo tratado. A pessoa responsável pela administração determinará, em qualquer dos casos, a dose apropriada para o paciente individual.

[0085] O composto utilizado de acordo com a presente invenção pode ser tipicamente administrado por via oral, por exemplo, na forma de pastilhas, cápsulas, microcápsulas, pós, grânulos, xaropes, soluções ou suspensões tomadas por via oral ou sublingual.

[0086] Em realização específica, o composto utilizado de acordo com a presente invenção é adequadamente administrado por via oral em dose diária de 1 a 20 mg/kg de peso do corpo, particularmente em dose diária de 2 mg/kg.

[0087] Em outra realização específica, os compostos utilizados de acordo com a presente invenção são adequadamente administrados por via oral, duas vezes por semana, em dose de 1 a 20 mg/kg de peso do corpo, particularmente em dose de 1 mg/kg duas vezes por semana.

[0088] Segundo outra realização específica, o composto utilizado de acordo com a presente invenção é administrado em doses de 10 a 1000 mg por dia, preferencialmente doses de 0,2 a 2 mg, cinco vezes por dia.

[0089] A presente invenção será adicionalmente ilustrada pelas figuras e exemplos abaixo.

**BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

[0090] Figura 1: efeito de MR31193 sobre a sobrevivência de neurônios MAP-2 (A), rede de neurites total (B), comprimento de neurites normalizado pelo número de neurônios (C) e sobre a fosforilação de Tau (AT100) (D) em cultivo primário de neurônios hipocâmpais lesionados com A $\beta$  1-42. Os resultados são expressos na forma de percentual de controle como média  $\pm$  desvio padrão (n = 4-6/grupo). ANOVA de uma via foi seguido por teste LSD de Fisher. \* p < 0,05 foi considerado significativo.

[0091] Figura 2: efeito de MR31193 sobre a preservação de sinapses de neurônios MAP-2 em cultivo primário de neurônios hipocâmpais lesionados com A $\beta$  1-42. Os resultados são expressos na forma de percentual de controle como média  $\pm$  desvio padrão (n = 4-6/grupo). ANOVA de uma via foi seguido por teste LSD de Fisher. \* p < 0,05 foi considerado significativo.

[0092] Figura 3: efeito de MR31176 sobre a sobrevivência de neurônios MAP-2 (A), rede de neurites total (B), comprimento de neurites normalizado pelo número de neurônios (C) e sobre a fosforilação de Tau (AT100) (D) em cultivo primário de neurônios hipocâmpais lesionados com A $\beta$  1-42. Os resultados são expressos na forma de percentual de controle como média  $\pm$  desvio padrão (n = 4-6/grupo). ANOVA de uma via foi seguido por teste LSD de Fisher. \* p < 0,05 foi considerado significativo.

[0093] Figura 4: efeito de MR31176 sobre a preservação de sinapses de neurônios MAP-2 em cultivo primário de neurônios hipocâmpais lesionados com A $\beta$  1-42. Os resultados são expressos na forma de percentual de controle como média  $\pm$  desvio padrão (n = 4-6/grupo). ANOVA de uma via foi seguido por teste LSD de Fisher. \* p < 0,05 foi considerado significativo.

[0094] Figura 5: efeito de MR31192 sobre a sobrevivência de neurônios MAP-2 (A), rede de neurites total (B), comprimento de neurites normalizado pelo número de neurônios (C) e sobre a fosforilação de Tau (AT100)

(D) em cultivo primário de neurônios hipocâmpais lesionados com A $\beta$  1-42. Os resultados são expressos na forma de percentual de controle como média  $\pm$  desvio padrão (n = 4-6/grupo). ANOVA de uma via foi seguido por teste LSD de Fisher. \* p < 0,05 foi considerado significativo.

[0095] Figura 6: efeito de MR31192 sobre a preservação de sinapses de neurônios MAP-2 em cultivo primário de neurônios hipocâmpais lesionados com A $\beta$  1-42. Os resultados são expressos na forma de percentual de controle como média  $\pm$  desvio padrão (n = 4-6/grupo). ANOVA de uma via foi seguido por teste LSD de Fisher. \* p < 0,05 foi considerado significativo.

[0096] Figura 7: efeito de MR33583 sobre a sobrevivência de neurônios MAP-2 (A), rede de neurites total (B), comprimento de neurites normalizado pelo número de neurônios (C) e sobre a fosforilação de Tau (AT100) (D) em cultivo primário de neurônios hipocâmpais lesionados com A $\beta$  1-42. Os resultados são expressos na forma de percentual de controle como média  $\pm$  desvio padrão (n = 4-6/grupo). ANOVA de uma via foi seguido por teste LSD de Fisher. \* p < 0,05 foi considerado significativo.

[0097] Figura 8: efeito de MR33583 sobre a preservação de sinapses de neurônios MAP-2 em cultivo primário de neurônios hipocâmpais lesionados com A $\beta$  1-42. Os resultados são expressos na forma de percentual de controle como média  $\pm$  desvio padrão (n = 4-6/grupo). ANOVA de uma via foi seguido por teste LSD de Fisher. \* p < 0,05 foi considerado significativo.

[0098] Figura 9: efeito de MR31192 sobre a sobrevivência de neurônios MAP-2 (A), rede de neurites total (B), comprimento de neurites normalizado pelo número de neurônios (C) e sobre a fosforilação de Tau (AT100) (D) em cultivo primário de neurônios hipocâmpais lesionados com A $\beta$  1-42. Os resultados são expressos na forma de percentual de controle como média  $\pm$  desvio padrão (n = 4-6/grupo). ANOVA de uma via foi seguido por teste LSD de Fisher. \* p < 0,05 foi considerado significativo.

[0099] Figura 10: efeito de MR31192 ou Donepezil sobre a preservação de sinapses de neurônios MAP-2 em cultivo primário de neurônios hipocampais lesionados com A $\beta$  1-42. Os resultados são expressos na forma de percentual de controle como média  $\pm$  desvio padrão (n = 4-6/grupo). ANOVA de uma via foi seguido por teste LSD de Fisher. \* p < 0,05 foi considerado significativo.

[00100] Figura 11: efeito de MR36014 ou Donepezil sobre a sobrevivência de neurônios MAP-2 (A), rede de neurites total (B), comprimento de neurites normalizado pelo número de neurônios (C) e sobre a fosforilação de Tau (AT100) (D) em cultivo primário de neurônios hipocampais lesionados com A $\beta$  1-42. Os resultados são expressos na forma de percentual de controle como média  $\pm$  desvio padrão (n = 4-6/grupo). ANOVA de uma via foi seguido por teste LSD de Fisher. \* p < 0,05 foi considerado significativo.

[00101] Figura 12: efeito de MR36014 ou Donepezil sobre a preservação de sinapses de neurônios MAP-2 em cultivo primário de neurônios hipocampais lesionados com A $\beta$  1-42. Os resultados são expressos na forma de percentual de controle como média  $\pm$  desvio padrão (n = 4-6/grupo). ANOVA de uma via foi seguido por teste LSD de Fisher. \* p < 0,05 foi considerado significativo.

[00102] Figura 13: efeito de MR36014 sobre a sobrevivência de neurônios TH (A), sobre a rede de neurites total de neurônios TH (B) e sobre a agregação de aSyn em neurônios TH (C) em cultivo primário de neurônios mesencefálicos lesionados com MPP<sup>+</sup>. Os resultados são expressos na forma de percentual de controle como média  $\pm$  desvio padrão (n = 4-6/grupo). ANOVA de uma via foi seguido por teste LSD de Fisher. \* p < 0,05 foi considerado significativo.

[00103] Figura 14: efeito de MR33583 sobre a sobrevivência de neurônios TH (A), sobre a rede de neurites total de neurônios TH (B) e sobre a

agregação de aSyn em neurônios TH (C) em cultivo primário de neurônios mesencefálicos lesionados com MPP<sup>+</sup>. Os resultados são expressos na forma de percentual de controle como média  $\pm$  desvio padrão (n = 4-6/grupo). ANOVA de uma via foi seguido por teste LSD de Fisher. \* p < 0,05 foi considerado significativo.

[00104] Figura 15: efeito de MR36014 (A-B) e MR33583 (C-D) sobre a sobrevivência de neurônios MAP-2 (A-C) e a proteção da rede de neurites total (B-D)) em cultivo primário de neurônios corticais lesionados com glutamato. Os resultados são expressos na forma de percentual de controle como média  $\pm$  desvio padrão (n = 4-6/grupo). ANOVA de uma via foi seguido por teste LSD de Fisher. \* p < 0,05 foi considerado significativo.

[00105] Figura 16: efeito de MR36014 sobre a sobrevivência (A) e rede de neurites (B, C) em neurônios motores espinhais, após lesão de glutamato. Os resultados são expressos na forma de percentual de controle, exibindo a média  $\pm$  desvio padrão (100% = CT, sem composto). ANOVA de uma via seguido por teste LSD de Fisher, n = 4-6. p < 0,05 foi considerado significativo.

[00106] Figura 17: efeito de MR33583 sobre a sobrevivência (A), a rede de neurites (B, C) e sobre a translocação citoplasmática de TDP-43 (D) em neurônios motores espinhais, após lesão de glutamato. Os resultados são expressos na forma de percentual de controle, exibindo a média  $\pm$  desvio padrão (100% = CT, sem composto). ANOVA de uma via seguido por teste LSD de Fisher, n = 4-6. p < 0,05 foi considerado significativo.

[00107] Figura 18: efeito de MR33583 sobre a sobrevivência de neurônios GABAérgica em cultivo primário de células mesencefálicas, após o esgotamento de fatores de crescimento. Os resultados são expressos na forma de percentual de controle, exibindo a média  $\pm$  desvio padrão (100% = CT, sem composto). ANOVA de uma via seguido por teste LSD de Fisher, n = 4-6. p <

0,05 foi considerado significativo.

### EXEMPLOS

#### EXEMPLO 1

[00108] Este exemplo exhibe o efeito de Donecoprida em neurônios hipocâmpais primários de ratos lesionados com A $\beta$  (exposição por 24 horas).

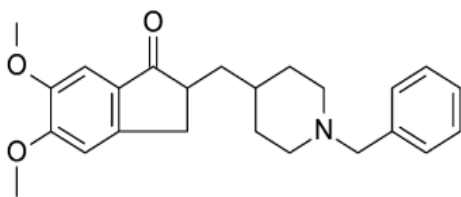
[00109] Mal de Alzheimer (AD) é uma doença neurodegenerativa que afeta principalmente pessoas com mais de 65 anos de idade, que sofrem de diferentes sintomas clínicos, tais como declínio progressivo do raciocínio, linguagem e capacidade de aprendizado. Evidência crescente de diversas fontes indica oligômeros A $\beta$  (A $\beta$ O)/protofibrilas como supostas substâncias tóxicas na patogênese de AD.

[00110] Com a geração de uma solução de A $\beta$ O e alteração da concentração e do tempo de exposição a A $\beta$ O, foi possível reproduzir efeitos iniciais (tensão oxidativa) e o desenvolvimento a longo prazo de alterações estruturais (morte de neurônios).

[00111] O modelo utilizado no presente exemplo, utilizando solução de peptídeo A $\beta$  que contém A $\beta$ O (medido com precisão por meio de Western Blot automático), reproduziu características neuropatológicas essenciais de AD.

[00112] O objeto deste estudo foi avaliar os efeitos de um composto de teste (fumarato de Donecoprida em diversas concentrações) em neurônios hipocâmpais primários de ratos lesionados com A $\beta$  (exposição por 24 horas).

Donepezil da fórmula a seguir:



(uma concentração) foi utilizado como composto de teste de

referência.

[00113] Materiais e métodos:

[00114] Cultivo primário de neurônios hipocâmpais:

[00115] Neurônios hipocâmpais de ratos foram cultivados conforme descrito por Callizot et al (2013), *J. Neurosci. Res.* 91: 706-716. Fêmeas de ratos grávidas com 17 dias de gestação (Ratos Wistar; Janvier Labs, França) foram mortas utilizando anestesia profunda com câmara de CO<sub>2</sub> seguida por deslocamento da cervical. Os fetos foram removidos em seguida do útero e imediatamente colocados em meio Leibovitz L15 gelado com uma solução de 2% de penicilina (10.000 U/ml) e estreptomicina (10 mg/ml) (PS) e 1% de albumina de soro bovino (BSA). Neurônios hipocâmpais foram tratados por 20 minutos a 37 °C com uma solução de tripsina-EDTA em concentração final de 0,05% de tripsina e 0,02% de EDTA. A dissociação foi suspensa por meio da adição de meio Eagle modificado da Dulbecco (DMEM) com 4,5 g/l de glicose, que contém DNase I grau II (concentração final de 0,5 mg/ml) e 10% de soro de feto bovino (FCS). As células foram dissociadas mecanicamente por três passagens forçadas através da ponta de uma pipeta de 10 ml e centrifugadas em seguida a 515 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a pelota foi novamente suspensa em meio de cultivo definido que consiste em meio neurobasal com solução a 2% de suplemento B27, 2 mmol/l de L-glutamina, 2% de solução de PS e 10 ng/ml de fator neurotrófico cerebral (BDNF). Células viáveis foram contadas em um citômetro de Neubauer, utilizando o teste de exclusão de azul de tripano. Células foram semeadas em densidade de 20.000 por cavidade em placas com 96 cavidades previamente revestidas com poli-L-lisina e cultivadas a 37 °C em um incubador de ar (95%)-CO<sub>2</sub> (5%). O meio foi alterado a cada dois dias.

[00116] Donecoprida e exposição a A $\beta$  1-42 humano:

[00117] Os neurônios hipocâmpais foram expostos a soluções de

A $\beta$  (conforme abaixo) após 17 dias de cultivo. A preparação A $\beta$  1-42 foi elaborada seguindo-se o procedimento descrito por Callizot et al (2013), *J. Neurosci. Res.* 91: 706-716. Resumidamente, o peptídeo A $\beta$  1-42 foi dissolvido no meio de cultivo definido mencionado acima, em concentração inicial de 40  $\mu$ M. Esta solução foi suavemente agitada por três dias a 37 °C no escuro e utilizada imediatamente após diluição adequada em meio de cultivo até as concentrações empregadas (20  $\mu$ M (placa 1) ou 2,5  $\mu$ M (placa 2) correspondentes a 2  $\mu$ M ou 0,25  $\mu$ M de oligômeros (A $\beta$ O), respectivamente).

[00118] Fumarato de donecoprida foi dissolvido em meio de cultivo e previamente incubado uma hora antes da aplicação de A $\beta$ . A preparação de A $\beta$  1-42 foi adicionada até concentração final de 20 ou 2,5  $\mu$ M (= 2  $\mu$ M ou 0,25  $\mu$ M de A $\beta$ O, avaliada por meio de Western Blot automático) diluída em meio controle na presença de Donecoprida.

[00119] Organização de placas de cultivo:

[00120] Fumarato de donecoprida (Donecoprida) foi testado sobre um cultivo em uma placa com 96 cavidades (6 cavidades por condições). O composto foi previamente incubado uma hora antes da aplicação de A $\beta$ . Foram determinadas as condições a seguir:

PLACA 1 (MAP-2 / Tau)	PLACA 2 (PSD95 / SYN)
Controle (Veículo)	Controle (Veículo)
+ A $\beta$ (20 $\mu$ M 24 h) / veículo	+ A $\beta$ (2,5 $\mu$ M 24 h) / veículo
+ A $\beta$ (20 $\mu$ M 24 h) / Donecoprida (1 $\mu$ M)	+ A $\beta$ (2,5 $\mu$ M 24 h) / Donecoprida (1 $\mu$ M)
+ A $\beta$ (20 $\mu$ M 24 h) / Donecoprida (500 nM)	+ A $\beta$ (2,5 $\mu$ M 24 h) / Donecoprida (500 nM)
+ A $\beta$ (20 $\mu$ M 24 h) / Donecoprida (100 nM)	+ A $\beta$ (2,5 $\mu$ M 24 h) / Donecoprida (100 nM)

PLACA 1 (MAP-2 / Tau)	PLACA 2 (PSD95 / SYN)
+ A $\beta$ (20 $\mu$ M 24 h) / Donecoprida (50 nM)	+ A $\beta$ (2,5 $\mu$ M 24 h) / Donecoprida (50 nM)
+ A $\beta$ (20 $\mu$ M 24 h) / Donecoprida (10 nM)	+ A $\beta$ (2,5 $\mu$ M 24 h) / Donecoprida (10 nM)
+ A $\beta$ (20 $\mu$ M 24 h) / Donecoprida (5 nM)	+ A $\beta$ (2,5 $\mu$ M 24 h) / Donecoprida (5 nM)
+ A $\beta$ (20 $\mu$ M 24 h) / Donecoprida (1 nM)	+ A $\beta$ (2,5 $\mu$ M 24 h) / Donecoprida (1 nM)
+ A $\beta$ (20 $\mu$ M 24 h) / Donepezil (1 $\mu$ M)	+ A $\beta$ (2,5 $\mu$ M 24 h) / Donepezil (1 $\mu$ M)

[00121] Avaliação de objetivos:

[00122] Placa 1: sobrevivência, rede de neurites e avaliação de fosfo tau.

[00123] Em 24 horas após a intoxicação, os neurônios hipocampais foram fixados por uma solução fria de etanol (95%) e ácido acético (5%) por cinco minutos a -20 °C. Após permeabilização com 0,1% de saponina, as células foram incubadas por duas horas com:

a. anticorpo policlonal de galinha antiproteína associada a microtúbulos 2 (MAP-2), diluído a 1/1000 em PBS, que contém 1% de soro de feto bovino e 0,1% de saponina (esse anticorpo permite manchas específicas de corpos de células neuronais e neurites; e permite o estudo da morte de células neuronais e rede de neurites); e

b. anticorpo monoclonal de camundongo antifosfo Tau (AT100) em diluição de 1/400 em PBS que contém 1% de soro de feto bovino e 0,1% de saponina.

[00124] Esses anticorpos foram revelados com anti-IgG de

camundongo de cabra Alexa Flúor 488 e anti-IgG de galinha de cabra Alexa Flúor 568 em diluição 1/400 em PBS contendo 1% de FCS e 0,1% de saponina por uma hora à temperatura ambiente.

[00125] Para cada condição, 30 fotografias (que representam toda a área da cavidade) por cavidade foram tomadas utilizando ImageXpress (Molecular Devices) em ampliação de 20x. Todas as imagens foram tomadas com os mesmos parâmetros de obtenção. As análises foram realizadas automaticamente utilizando Custom Module Editor (Molecular Devices).

[00126] Foram determinados os objetivos a seguir:

- número total de neurônios (sobrevivência de neurônios, número de neurônios positivos para MAP-2);
- rede de neurites (em  $\mu\text{m}$  de neurônios positivos para MAP-2); e
- área de tau em neurônios ( $\mu\text{m}^2$ , sobrepostos com neurônios positivos para MAP-2).

[00127] Placa 2: avaliação das sinapses.

[00128] Em 24 horas após a intoxicação, os neurônios hipocampais foram fixados por uma solução fria de etanol (95%) e ácido acético (5%) por cinco minutos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após permeabilização com 0,1% de saponina, células foram incubadas por duas horas com:

- a. anticorpo monoclonal de camundongo antipós-sináptico com densidade de 95 kDa (PSD95) em diluição de 1/100 em PBS que contém 1% de soro de feto bovino e 0,1% de saponina; e
- b. anticorpo policlonal de coelho antissinaptofisina (SYN) em diluição de 1/100 em PBS contendo 1% de soro de feto bovino e 0,1% de saponina.

[00129] Esses anticorpos foram revelados com anti-IgG de camundongo de cabra Alexa Flúor 488 e anti-IgG de coelho de cabra Alexa Flúor

568 em diluição 1/400 em PBS contendo 1% de FCS e 0,1% de saponina por uma hora à temperatura ambiente.

[00130] Para cada condição, 40 fotografias por cavidade foram tomadas utilizando ImageXpress (Molecular Devices) com ampliação de 40x. Todas as imagens foram tomadas com os mesmos parâmetros de obtenção.

[00131] Análise das sinapses foi realizada automaticamente utilizando Custom Module Editor (Molecular Devices).

[00132] Foram determinados os objetivos a seguir:

- número total de sinapses (sobreposição entre PSD95/SYN).

[00133] Análise estatística:

[00134] Todos os valores são expressos na forma de média  $\pm$  desvio padrão. Realizou-se análise estatística por meio de ANOVA de uma via, seguido por teste PLSD de Fisher, e  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

[00135] Gráficos e análises estatísticas das diferentes condições foram realizados utilizando software GraphPad Prism versão 7.04. \*  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

[00136] Resultados:

[00137] Efeitos de Donecoprida sobre a sobrevivência e rede de neurites de neurônios hipocampais MAP-2 e sobre a hiperfosforilação de Tau.

[00138] Sobrevivência dos neurônios:

[00139] O efeito de Donecoprida sobre a sobrevivência de neurônios MAP-2 em cultivo primário de neurônios hipocampais é exibido na Tabela 1 abaixo.

### TABELA 1

[00140] Neurônios MAP-2 (% de controle):

	Neurônios MAP-2 (% de controle)		
	Média	Desvio padrão	n
Controle	100	5	6

	Neurônios MAP-2 (% de controle)		
	Média	Desvio padrão	n
+ A $\beta$ 1-42 (20 $\mu$ M)	70	2	6
+ Donecoprida (1 nM)	70	2	5
+ Donecoprida (5 nM)	69	2	6
+ Donecoprida (10 nM)	73	2	5
+ Donecoprida (50 nM)	74	2	5
+ Donecoprida (100 nM)	<b>78*</b>	1	4
+ Donecoprida (500 nM)	<b>79*</b>	1	5
+ Donecoprida (1 $\mu$ M)	<b>62*</b>	2	5
+ Donepezil (1 $\mu$ M)	<b>82*</b>	2	5

\*  $p < 0,05$  contra A $\beta$  1-42, determinado por meio de ANOVA de uma via seguido por teste LSD da Fisher.

[00141] Perda importante de neurônios MAP-2 foi consecutiva à aplicação do peptídeo A $\beta$ . Donepezil, utilizado no presente como controle positivo, foi capaz de proteger significativamente os neurônios da morte. Duas doses de Donecoprida (100 nM e 500 nM) exerceram efeitos neuroprotetores similares a Donepezil.

[00142] Rede de neurites:

[00143] O efeito de Donecoprida sobre a rede de neurites de neurônios MAP-2 em cultivo primário de neurônios hipocâmpais é exibido na Tabela 2 abaixo.

**TABELA 2**

[00144] Rede de neurites de MAP-2 (% do controle):

	Rede de neurites MAP-2 (% de controle)		
	Média	Desvio padrão	n
Controle	100	2	6
+ A $\beta$ 1-42 (20 $\mu$ M)	63	1	6
+ Donecoprida (1 nM)	64	2	5
+ Donecoprida (5 nM)	69	2	6
+ Donecoprida (10 nM)	68	2	5
+ Donecoprida (50 nM)	<b>71*</b>	3	5
+ Donecoprida (100 nM)	<b>73*</b>	1	5
+ Donecoprida (500 nM)	<b>79*</b>	3	6
+ Donecoprida (1 $\mu$ M)	<b>76*</b>	2	6
+ Donepezil (1 $\mu$ M)	<b>92*</b>	3	5

\*  $p < 0,05$  contra A $\beta$  1-42, determinado por meio de ANOVA de uma via seguido por teste LSD da Fisher.

[00145] A rede de neurites total foi severamente contraída mediante lesão de A $\beta$  1-42. Donepezil foi significativamente preservado em quase toda a rede de neurites. Quatro doses de Donecoprida (50 nM, 100 nM, 500 nM e 1  $\mu$ M) também exerceram efeitos protetores sobre a rede de neurites.

[00146] A rede de neurites é proporcional ao número de neurônios no cultivo. A rede de neurites total foi normalizada pelo número de neurônios, a fim de determinar o comprimento médio de neurite por neurônios. Os resultados

correspondentes são exibidos na Tabela 3 abaixo.

**TABELA 3**

[00147] Rede de neurites/neurônios MAP-2 (% de controle):

	Rede de neurites/neurônios MAP-2 (% de controle)		
	Média	Desvio padrão	n
Controle	100	6	6
+ A $\beta$ 1-42 (20 $\mu$ M)	90	3	6
+ Donecoprida (1 nM)	90	3	4
+ Donecoprida (5 nM)	99	2	6
+ Donecoprida (10 nM)	96	3	4
+ Donecoprida (50 nM)	91	5	4
+ Donecoprida (100 nM)	93	1	4
+ Donecoprida (500 nM)	100	4	5
+ Donecoprida (1 $\mu$ M)	124*	5	5
+ Donepezil (1 $\mu$ M)	113*	4	4

\*  $p < 0,05$  contra A $\beta$  1-42, determinado por meio de ANOVA de uma via seguido por teste LSD da Fisher.

[00148] Este ajuste demonstrou que o comprimento de neurites por neurônio foi maior na presença de Donepezil e Donecoprida (1  $\mu$ M), o que sugere que esses dois compostos apresentaram efeito sobre o resultado de neurites.

[00149] Fosforilação de Tau:

[00150] O efeito de Donecoprida sobre a fosforilação de Tau (AT100) em neurônios MAP-2 em cultivo primário de neurônios hipocâmpais é

exibido na Tabela 4 abaixo.

**TABELA 4**

[00151] Área de Tau (AT100)/neurônios (% do controle):

	Área de Tau (AT100)/neurônios (% do controle)		
	Média	Desvio padrão	n
Controle	100	4	5
+ A $\beta$ 1-42 (20 $\mu$ M)	200	11	5
+ Donecoprida (1 nM)	204	7	4
+ Donecoprida (5 nM)	201	8	5
+ Donecoprida (10 nM)	175	11	4
+ Donecoprida (50 nM)	161*	12	5
+ Donecoprida (100 nM)	154*	6	3
+ Donecoprida (500 nM)	152*	8	4
+ Donecoprida (1 $\mu$ M)	198	8	5
+ Donepezil (1 $\mu$ M)	151*	6	4

\*  $p < 0,05$  contra A $\beta$  1-42, determinado por meio de ANOVA de uma via seguido por teste LSD de Fisher.

[00152] Hiperfosforilação de Tau (sobre AT100) foi observada em aplicação de A $\beta$  1-42. Donepezil foi capaz de reduzir significativamente essa hiperfosforilação. De forma similar, Donecoprida (50 nM, 100 nM, 500 nM) reduziu significativamente a hiperfosforilação de Tau de forma dependente da dosagem.

[00153] Efeitos de Donecoprida sobre sinapses em cultivo primário

de neurônios hipocâmpais:

[00154] Para determinar a formação de sinapses, foi estudada a distribuição de PSD-95, marcador pós-sináptico, e sinaptofisina, marcador pré-sináptico. Estrutura positiva para ambos, manchas de sinaptofisina e PSD-95, foi considerada sinapse.

[00155] O efeito de Donecoprida sobre essas sinapses é exibido na Tabela 5 abaixo.

**TABELA 5**

[00156] Número de sinapses (% do controle):

	Número de sinapses (% do controle):		
	Média	Desvio padrão	n
Controle	100*	6	5
+ A $\beta$ 1-42 (20 $\mu$ M)	67	4	6
+ Donecoprida (1 nM)	69	5	4
+ Donecoprida (5 nM)	83*	3	5
+ Donecoprida (10 nM)	87*	7	5
+ Donecoprida (50 nM)	91*	3	6
+ Donecoprida (100 nM)	93*	3	4
+ Donecoprida (500 nM)	94*	5	4
+ Donecoprida (1 $\mu$ M)	85*	4	5
+ Donepezil (1 $\mu$ M)	88*	6	5

\*  $p < 0,05$  contra A $\beta$  1-42, determinado por meio de ANOVA de uma via seguido por teste LSD da Fisher.

[00157] A tensão resultante da aplicação de A $\beta$  1-42 causou redução do número de sinapses (conforme exibido anteriormente por Callizot et al (2013), *J. Neurosci. Res.* 91: 706-716).

[00158] Donepezil reduziu a perda de sinapses. De forma similar, Donecoprida também foi capaz de preservar o número de sinapses, de forma dependente da dosagem (5 nM a 1  $\mu$ M). De forma interessante, este efeito foi observado em baixa dose do composto (5 nM). Este efeito aumentou com a dosagem.

[00159] Devido à lesão causada pelo peptídeo A $\beta$  1-42, o número de neurônios foi reduzido nas condições experimentais, o que gerou redução do número de sinapses. Para estimar o número de sinapses por neurônio, portanto, o número de sinapses foi normalizado pelo número de neurônios para o controle, A $\beta$  1-42, Donecoprida (500 nM, em que a condição exibe o número mais alto de sinapses) e grupos Donepezil.

[00160] Este ajuste demonstrou que somente Donecoprida promoveu significativamente a formação de novas sinapses enquanto Donepezil não apresentou efeito.

[00161] Conclusão:

[00162] O presente estudo indica que Donecoprida possui efeitos benéficos sobre a sobrevivência dos neurônios e a rede de neurites de neurônios hipocampais lesionados com peptídeo A $\beta$  1-42, que é um modelo *in vitro* de mal de Alzheimer.

[00163] Além disso, Donecoprida foi capaz de reduzir a hiperfosforilação de Tau sobre o lado AT100 e estimular significativamente a formação de novas sinapses.

[00164] Os efeitos de Donecoprida foram maiores que os de Donepezil, o que sugere que esse composto é uma possível droga interessante como agente neuroprotetor, particularmente para o tratamento de doenças

neurodegenerativas.

### **EXEMPLO 2**

[00165] O exemplo do presente demonstra que os compostos de acordo com a presente invenção podem aprimorar o desempenho cognitivo dos camundongos em um modelo *in vivo* de AD/s.

[00166] Com este propósito, a eficácia de dois compostos (fumarato de Donecoprida e fumarato de Flucoprida) foi pesquisada utilizando camundongos C57Bl6/J do tipo selvagem que receberam injeção intracerebroventricular de oligômeros A $\beta$  1-42 (A $\beta$ O).

[00167] Os compostos foram dosados por via oral (alimentação forçada) em três doses diferentes. O desempenho cognitivo foi determinado utilizando o teste de labirinto em Y, o teste de Reconhecimento de Objetos Novos e o teste de labirinto de água Morris. Ao final dos testes cognitivos, todos os animais foram sacrificados e o sangue e o cérebro foram amostrados para análises *ex vivo* adicionais.

[00168] Representação esquemática do experimento:

[00169] Resumidamente, 144 camundongos machos C57Bl6/J (três meses de idade) foram recebidos e abrigados (4 a 5 por gaiola) em quarentena por sete dias ou mais. Itens de teste foram dosados por via oral (alimentação forçada) uma vez por dia em concentrações diferentes do dia -1 ao dia +17.

[00170] No dia 0, os camundongos receberam uma única injeção icv de veículo ou A $\beta$ O.

[00171] No dia +4 (ou seja, quatro dias após a indução da doença), determinou-se a memória de trabalho espacial utilizando o teste de labirinto em Y.

[00172] Do dia +3 ao dia +14, as capacidades de aprendizado e a memória de longo prazo foram investigadas no teste MWM.

[00173] Nos dias +15/+16, foi pesquisada a memória de reconhecimento utilizando o teste de Reconhecimento de Objetos Novos (NOR).

[00174] Os animais foram sacrificados no dia +17 e tecidos foram preparados para análises *ex vivo* adicionais.

[00175] Descrição dos grupos experimentais:

[00176] O estudo envolveu, ao todo, 144 camundongos divididos em 12 grupos experimentais com 12 camundongos por grupo experimental. Todos os animais receberam uma única injeção icv (unilateral) de veículo ou A $\beta$ O em volume total de 1  $\mu$ l.

[00177] Os diferentes grupos experimentais são definidos conforme segue:

- GRUPO A (veículo CTRL): veículo oral E injeção icv de veículo (n = 12);
- GRUPO B (A $\beta$ O CTRL): veículo oral E injeção icv de A $\beta$ O (n = 12);
- GRUPO C (CTRL positivo): Donepezil oral subcrônico E injeção icv de A $\beta$ O (n = 12);
- GRUPO D (Donecoprida CTRL): Donecoprida oral (9 mg/kg) E injeção icv de veículo (n = 12);
- GRUPO E (Flucoprida CTRL): Flucoprida oral (9 mg/kg) E injeção icv de veículo (n = 12);
- GRUPO F (tratado com Donecoprida): Donecoprida oral (1 mg/kg) E injeção icv de A $\beta$ O (n = 12);
- GRUPO G (tratado com Donecoprida): Donecoprida oral (3 mg/kg) E injeção icv de A $\beta$ O (n = 12);
- GRUPO H (tratado com Donecoprida): Donecoprida oral (9 mg/kg) E injeção icv de A $\beta$ O (n = 12);
- GRUPO I (tratado com Flucoprida): Flucoprida oral (1 mg/kg)

E injeção icv de A $\beta$ O (n = 12);

- GRUPO J (tratado com Flucoprida): Flucoprida oral (3 mg/kg) E injeção icv de A $\beta$ O (n = 12);

- GRUPO K (tratado com Flucoprida): Flucoprida oral (9 mg/kg) E injeção icv de A $\beta$ O (n = 12); e

- GRUPO L (CTRL positivo): Donepezil intraperitoneal agudo nos dias de teste E injeção icv de A $\beta$ O (n = 12).

[00178] Como, no máximo, 24 camundongos puderam receber injeção icv por dia, o estudo foi realizado em seis conduções independentes. Dois camundongos de todos os grupos foram incluídos em cada condução.

[00179] Procedimentos experimentais:

[00180] Abrigo de animais:

[00181] Recebimento de 144 camundongos machos C57Bl6/J (da Janvier, França) (três meses de idade). Quando recebidos, os animais foram colocados em quarentena por um período de sete dias ou mais.

[00182] Os camundongos foram abrigados sob temperatura padrão ( $22 \pm 2$  °C) e em ambiente com luz e umidade controladas (luzes ligadas das 8 às 20 horas; umidade de  $55 \pm 10\%$ ) com acesso a alimento e água à vontade. Os camundongos foram abrigados em grupo e monitorados duas vezes por dia por funcionários de laboratório (às 8 e 16 horas). No caso de dois ou mais problemas significativos na situação geral de saúde, o camundongo afetado foi sacrificado. As definições de situação de saúde inaceitável são as seguintes: ausência de movimentos espontâneos e incapacidade de beber ou alimentar-se durante um período de observação de 24 horas, perda de peso de mais de 12%, sangramento massivo, inflamação espontânea (observações gerais da pele e dos olhos do camundongo) ou perda de anatomia.

[00183] Ao longo de todo o procedimento, os camundongos foram pesados por três vezes (ou seja, antes do tratamento e nos dias +8 e +17).

[00184] Armazenagem, formulação e dosagem do composto:

[00185] Para dosagem por via oral, Donecoprida e Flucoprida foram formuladas por meio de solubilização em NaCl a 0,9%. A dosagem do composto (volume total de 200 µl) foi iniciada um dia antes da indução da doença (por meio de injeção icv de AβO) e realizada por 19 dias consecutivos.

[00186] Injeção estereotáxica:

[00187] Injeção intracerebroventricular isolada de 144 camundongos com veículo ou AβO (máx. 24 camundongos por dia, todos os camundongos foram aleatorizados): sob anestesia (injeção ip de uma mistura de cetamina/xilasina em dose de 110 e 15 mg/kg, respectivamente), AβO (1 µl) ou veículo (1 µl) foram injetados no ventrículo lateral direito. Foram realizadas injeções utilizando microsseringas Hamilton de 10 µl equipadas com uma agulha de 26 gauge. O procedimento foi encerrado por meio de injeção subcutânea de metacam (analgesia) em dose de 5 mg/kg. Os animais foram colocados individualmente em seguida na sua gaiola de abrigo e a gaiola foi colocada em um gabinete aquecido até que o animal se recupere totalmente. Os animais foram monitorados cuidadosamente para controlar a recuperação após a anestesia.

[00188] Preparação de AβO: Aβ 1-42 foi obtido por meio da Bachem (ref. H1368) (número do lote: 1052301). A preparação de oligômeros Aβ 1-42 estáveis foi realizada conforme descrito em Garcia et al (2010), *J. Neurosci.* 30: 7516-7527. A preparação oligomérica (identificada como Lote n° 2016-14) continha uma mistura de trímeros e tetrâmeros estáveis de Aβ 1-42, bem como formas monoméricas do peptídeo. Todas as preparações oligoméricas utilizadas foram caracterizadas anteriormente em termos de composição de oligômeros e neurotoxicidade *in vitro*.

[00189] Teste de cognição, teste de labirinto Y:

[00190] Seis testes independentes que envolvem 24 camundongos

cada um (ou seja, 2 camundongos de cada grupo experimental) para um total de 144 camundongos no dia +4 – testes de comportamento foram realizados uma hora após a dosagem.

[00191] Este teste determina memória de trabalho espacial que é mediada principalmente pelo córtex pré-frontal (memória de trabalho) e pelo hipocampo (componente espacial). Vide Yoon et al (2008), *Learn Mem.* 15: 97-105 e Spellman et al (2015), *Nature* 522: 309-314 para os componentes diferentes.

[00192] O córtex pré-frontal media a memória de trabalho em roedores, primatas e seres humanos.

[00193] A medição do comportamento alternante espontâneo vem sendo amplamente utilizada por farmacologistas comportamentais para determinar a memória de trabalho espacial, um componente da memória de curto prazo. Na sua forma mais simples, o comportamento alternante espontâneo compreende a tendência dos camundongos de alternar sua seleção de braços convencional não reforçada em oportunidades sucessivas.

[00194] Este teste foi implementado com sucesso utilizando infusão icv de A $\beta$ O para induzir déficits cognitivos (Garcia et al (2010), *J. Neurosci.* 30: 7516-7527).

[00195] Protocolo detalhado: o desempenho de memória de trabalho espacial imediato foi determinado por meio do registro de comportamento de alternância espontâneo em um labirinto em Y. O labirinto é feito de Plexiglas opaco e cada um dos três braços possui 40 cm de comprimento, 14 cm de altura, 10 cm de altura e é posicionado em ângulos iguais. O aparelho é colocado em uma sala de teste com iluminação homogênea para obter 12-15 lux em todos os braços e também na zona central. Os camundongos são colocados no meio de um braço e mantidos para explorar livremente o labirinto durante uma sessão de cinco minutos. A série de entradas

de braços é gravada em vídeo (software Smart v3.0, Bioseb) e uma entrada de braço é considerada completa quando as patas traseiras do camundongo forem colocadas completamente no braço. A alternância é definida como entradas sucessivas nos três braços sobre conjuntos triplos sobrepostos. O percentual de alternância é calculado como a razão entre o total de alternâncias reais e alternâncias possíveis, definidas como o número de entradas de braços menos 2, multiplicado por 100. A atividade locomotora também é registrada e avaliada durante essa fase (por exemplo, índice motivacional) por meio de monitoramento da velocidade média e da distância total.

[00196] Análise de dados: utiliza-se software de computador Graphpad/Prism para as análises estatísticas. Foi conduzida análise não paramétrica da variação (teste de Kruskal Wallis), seguida por testes U de Mann-Whitney não paramétricos para comparação entre os grupos. Valores  $p < 0,05$  são considerados estatisticamente significativos. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

[00197] Teste de cognição, teste NOR:

[00198] Seis testes independentes que envolvem 24 camundongos cada um (ou seja, 2 camundongos de cada grupo experimental) para um total de 144 camundongos no dia +4 – testes de comportamento foram realizados uma hora após a dosagem.

[00199] Este teste determina memória de reconhecimento para os itens e seu equivalente humano é a comparação visual em pares (VPC) (Wallace et al, (2015), *Handb. Exp. Pharmacol.* 228: 27-57). O reconhecimento do objeto é mediado pelo córtex perirrinal em roedores (Albasser et al (2009), *Behav. Neurosci.* 123: 115-124), primatas (Zeamer et al (2015), *Dev. Cogn. Neurosci.* 11: 31-41) e seres humanos (Watson & Lee (2013), *J. Neurosci.* 33: 4192-4200).

[00200] Demonstrou-se anteriormente que injeção intracerebroventricular de A $\beta$ O em camundongos gera impedimento da tarefa de

Reconhecimento de Objetos Novos, é reversível com o inibidor acetilcolina esterase donepezil e exibiu efeito protetor com seres humanos em um peptídeo derivado de mitocôndrias citoprotetor e neuroprotetor.

[00201] Protocolo detalhado: um dia antes do teste cognitivo (ou seja, no dia +15), camundongos são habituados durante um teste de dez minutos, durante o qual são colocados em campo aberto vazio. No dia do teste cognitivo (ou seja, dia +16), os animais são colocados no mesmo campo aberto e mantidos para explorar livremente dois objetos idênticos por um teste de cinco minutos (teste de obtenção). Os animais são devolvidos em seguida para a sua gaiola de abrigo por um intervalo entre os testes de cinco minutos. Durante o teste de retenção, permite-se que os animais explorem dois objetos diferentes: um objeto familiar e um novo. Durante esse período, o experimentador, cego para o tratamento, registra o tempo em que o camundongo está explorando ativamente cada objeto. Todos os testes são gravados em vídeo (software Smart v3.0, Bioseb). É gerado em seguida um índice de discriminação: índice de discriminação = (tempo de exploração de objeto novo – tempo de exploração de objeto familiar) / tempo total de exploração.

[00202] Análise de dados: utiliza-se software de computador Graphpad/Prism para as análises estatísticas. Foi conduzida análise não paramétrica da variação (teste de Kruskal Wallis), seguida por testes U de Mann-Whitney não paramétricos para comparação entre os grupos. Valores  $p < 0,05$  são considerados estatisticamente significativos. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

[00203] Teste de cognição, teste MWM:

[00204] Seis testes independentes que envolvem 24 camundongos cada um (ou seja, 2 camundongos de cada grupo experimental) para um total de 144 camundongos no dia +4.

[00205] A memória de referência espacial é um processo que testa

a capacidade de lembrar as indicações espaciais para identificar um local. Ela é mediada pelo hipocampo em roedores (Broadbent et al (2006), *Learn Mem.* 13: 187-191) e em seres humanos (Bartsch et al (2010), *Science* 328: 1412-1415), utilizando uma tarefa de labirinto de água virtual. Este teste também envolve um componente de aprendizado.

[00206] Injeção icv de A $\beta$ O em camundongos induz déficit de memória de referência espacial no Labirinto de Água Morris (Garcia et al (2010), *J. Neurosci.* 30: 7516-7527).

[00207] Protocolo detalhado: testes de habituação (plataforma visível) – o labirinto de água Morris (MWM) foi realizado conforme descrito em Garcia et al (2010), *J. Neurosci.* 30: 7516-7527. O aparelho experimental consiste em um tanque de água circular (diâmetro = 100 cm; altura = 50 cm) contendo água a 21 °C até profundidade de 25 cm e tornado opaco para bloquear a visão para além da superfície da água por meio da adição de uma emulsão acrílica aquosa. Uma plataforma (diâmetro = 10 cm) é utilizada e colocada no ponto intermediário de um quadrante. A piscina está localizada em uma sala de teste, iluminada homogeneamente a 100 lux. O trajeto de nado dos animais é registrado utilizando um sistema de rastreamento por vídeo. Os camundongos são trazidos para a sala experimental pelo menos 30 minutos antes do teste, para permitir aclimatação às condições da sala experimental. Navegação para uma plataforma visível é conduzida antes da navegação no lugar, para avaliar as capacidades visuais e motoras de todos os camundongos. Os camundongos são submetidos a quatro testes de 60 s por dia (durante dois dias consecutivos), com intervalo entre os testes de pelo menos uma hora. Depois de encontrarem a plataforma, os camundongos são mantidos sobre a plataforma por um tempo adicional de 30 s. Não há indicações adicionais na sala. A posição na plataforma e os pontos iniciais são distribuídos aleatoriamente ao longo de todos os quatro quadrantes da piscina. Os camundongos que não conseguirem encontrar a

plataforma após 60 segundos são orientados para a sua localização e colocados sobre a plataforma por 30 segundos.

[00208] Testes de obtenção de memória (testes de aprendizado com plataforma oculta) são realizados durante cinco dias consecutivos e utilizados para atingir estado estável de latência de escape. Os camundongos são trazidos para a sala experimental por pelo menos 30 minutos antes do teste, para permitir aclimação às condições da sala experimental. A plataforma oculta é submersa a 1 cm abaixo da superfície da água e colocada no ponto intermediário de um quadrante. A piscina está localizada em uma sala de teste iluminada homoganeamente a 100 lux, contendo diversas orientações visuais proeminentes. Os trajetos de nado, distância de nado, velocidade de nado e tigmotaxia são registrados utilizando-se um sistema de rastreamento por vídeo. Os camundongos são submetidos a quatro testes de 60 s por dia, com intervalo entre os testes de pelo menos uma hora. Os camundongos são mantidos em nado livre por 60 segundos, isolados por 30 s adicionais sobre a plataforma oculta e devolvidos em seguida para a sua gaiola de abrigo durante o intervalo entre os testes. As posições iniciais (definidas na borda dos quadrantes) são selecionadas aleatoriamente para cada animal. Em cada teste, o tempo necessário para escapar para a plataforma oculta é registrado. Os camundongos que não conseguem encontrar a plataforma após 60 s são orientados e colocados sobre a plataforma por 30 s, antes de serem devolvidos para a sua gaiola de abrigo.

[00209] Testes de retenção de memória (testes de sonda, sem plataforma): são realizados dois dias após a última sessão de treinamento. Os camundongos são novamente aclimatados para a sala experimental por pelo menos 30 minutos antes do teste. A plataforma é removida e cada animal é mantido em nado livre por 60 segundos. Durante o teste, o tempo passado no quadrante alvo, o tempo passado no quadrante oposto e os cruzamentos sobre

o local anterior da plataforma são medidos e monitorados por meio de rastreamento por vídeo.

[00210] Análise de dados: utiliza-se software de computador Graphpad/Prism para as análises estatísticas. Foi conduzida análise não paramétrica da variação (teste de Kruskal Wallis), seguida por testes U de Mann-Whitney não paramétricos para comparação entre os grupos. Valores  $p < 0,05$  são considerados estatisticamente significativos. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

[00211] Amostragem de tecidos:

[00212] Os camundongos foram sacrificados no dia +17.

[00213] Coleta de amostras de sangue: mediante anestesia, os camundongos são sangrados. Cerca de 600  $\mu$ l de sangue integral foram retirados da veia cava com uma seringa de 1 ml. O sangue foi coletado em tubos BD Microtainer K2E (ref. 365975) ou microtubos Sarstedt LiHe (ref. 41.1503.005). Os tubos foram suavemente invertidos e as amostras foram colocadas sobre gelo. Microrrecipientes foram centrifugados por 5 minutos a 4 °C, 8600 g. Cerca de 250  $\mu$ l de plasma foram transferidos em tubos Eppendorf e congelados a -80 °C para análises adicionais.

[00214] Coleta de amostras de sangue: após a coleta de sangue, os camundongos sofreram perfusão flash intracardíaca com solução salina a 0,9%. O cérebro inteiro foi removido e os hemisférios foram separados. O hemisfério esquerdo contralateral foi congelado subitamente em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C para análise adicional (ou seja, exposição de composto). O hemisfério direito ipsilateral foi utilizado para isolar o hipocampo, córtex pré-frontal e o córtex. Todas as estruturas do cérebro foram isoladas sobre suporte resfriado e congeladas subitamente em nitrogênio líquido.

[00215] Resultados:

[00216] Efeitos dos compostos de acordo com a presente invenção

sobre a memória de trabalho espacial:

[00217] Para determinar o efeito de Donecoprida e Flucoprida sobre a memória de trabalho espacial de camundongos, foi realizado um teste de labirinto em Y quatro dias após a injeção icv de veículo ou A $\beta$ O. Durante os cinco minutos do teste, permitiu-se que os animais explorassem o dispositivo de labirinto em Y e o comportamento de alternância foi avaliado conforme descrito nos Procedimentos Experimentais.

[00218] Camundongos do grupo controle veículo (Grupo A) exibiram comportamento normal na exploração do labirinto em Y com comportamento de alternância de  $68,0 \pm 3,0\%$ . Estes resultados estão de acordo com observações anteriores de grupos controle similares (vide Garcia et al (2010), *J. Neurosci.* 30: 7516-7527).

[00219] Conforme o esperado, uma única injeção icv de A $\beta$ O (Grupo B) resultou em impedimento significativo ( $p = 0,0026$ ) dos desempenhos cognitivos no teste de labirinto em Y em comparação com camundongos controle veículos, com apenas  $54,0 \pm 2,0\%$  alternâncias.

[00220] Camundongos controle positivos, que receberam Donepezil por via oral e injeção icv de A $\beta$ O (Grupo C) não puderam ser distinguidos de camundongos controle (comportamento de alternância de  $66,1 \pm 1,8\%$ ) e eram estatisticamente diferentes ( $p = 0,0011$ ) de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O. Camundongos controle positivos, que receberam dose ip (aguda) de donepezil e injeção icv de A $\beta$ O (Grupo L) foram estatisticamente diferentes dos camundongos controle ( $p = 0,0278$ ; comportamento de alternância de  $60,8 \pm 1,9\%$ ) e também estatisticamente diferentes ( $p = 0,0421$ ) de camundongos com injeção de A $\beta$ O.

[00221] Camundongos que receberam dose de Donecoprida (9 mg/kg/dia) e injeção de icv com veículo (Grupo D) exibiram comportamento de alternância de  $59,3 \pm 4,0\%$ , não diferente de camundongos controle ( $p = 0,2640$ )

e não diferentes de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,5371$ ).

[00222] Camundongos que receberam dose de Flucoprida (9 mg/kg/dia) e injeção de icv com veículo (Grupo E) exibiram comportamento de alternância de  $63,1 \pm 2,3\%$ , não diferente de camundongos controle ( $p = 0,1166$ ) e diferentes de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,0111$ ).

[00223] Os camundongos receberam doses crescentes de Donecoprida (1, 3 e 9 mg/kg/dia) e injeção icv de A $\beta$ O (Grupos F, G e H, respectivamente). Em dose de 3 mg/kg/dia, Donecoprida inibiu o enfraquecimento induzido por A $\beta$ O da memória de trabalho espacial. De fato, camundongos do Grupo G exibiram comportamento de alternância de  $65,5 \pm 4,4\%$ , não diferente de camundongos controle ( $p = 0,5543$ ) e diferente de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,0137$ ). Em dose de 1 mg/kg/dia, Donecoprida não apresentou efeito sobre o enfraquecimento induzido por A $\beta$ O de memória de trabalho espacial, pois esses camundongos exibiram comportamento de alternância de  $56,6 \pm 3,7\%$ , diferente de camundongos controle ( $p = 0,0488$ ) e não diferente de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,6859$ ). Devido à heterogeneidade mais alta, camundongos do Grupo H (que receberam dose de Donecoprida de 9 mg/kg/dia) exibiram fenótipo intermediário com comportamento de alternância de  $64,3 \pm 5,1\%$ , não diferente de camundongos controle ( $p = 0,5994$ ) e também não diferente de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,1316$ ).

[00224] Os camundongos receberam doses crescentes de Flucoprida (1, 3 e 9 mg/kg/dia) e injeção icv de A $\beta$ O (Grupos I, J e K, respectivamente). Em doses de 1 e 3 mg/kg/dia, Flucoprida inibiu o enfraquecimento induzido por A $\beta$ O da memória de trabalho espacial. De fato, camundongos dos Grupos I e J exibiram comportamento de alternância de  $67,1 \pm 2,7\%$  e  $65,3 \pm 4,1\%$ , respectivamente, não diferente de camundongos controle ( $p = 0,9754$  e  $p = 0,6936$  para os grupos I e J, respectivamente) e diferentes de

camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,0029$  e  $p = 0,0454$ , para os grupos I e J, respectivamente). Por outro lado, em dose de 9 mg/kg/dia, Flucoprida deixou de proteger os camundongos contra o enfraquecimento induzido por A $\beta$ O da memória de trabalho espacial. De fato, os camundongos do Grupo K exibiram comportamento de alternância de  $59,1 \pm 3,0\%$ , diferente de camundongos controle ( $p = 0,0290$ ), mas não diferente de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,2346$ ).

[00225] Efeitos dos compostos de acordo com a presente invenção sobre as capacidades de aprendizado e memória de longo prazo:

[00226] Para determinar os efeitos dos compostos de acordo com a presente invenção sobre as capacidades de aprendizado e memória de longo prazo, foi realizado um teste MWM do dia +3 até o dia +14 após injeção icv de veículo ou A $\beta$ O.

#### **TESTES DE HABITUAÇÃO:**

[00227] Em primeira etapa (testes de habituação realizados nos Dias +3 e +4 após infusão icv de veículo ou A $\beta$ O), os camundongos foram treinados para escapar da água para uma plataforma visível na ausência de outras indicações visuais. Durante esses testes, a latência de escape, distância de nado e velocidade de nado foram registradas. Não houve diferença significativa entre os grupos em latência de escape. Não foi detectada diferença da velocidade de nado ou distância de nado.

[00228] Em conjunto, esses dados sugerem que o tratamento não afetou a capacidade física, nem a motivação dos camundongos de escapar da água.

#### **TESTES DE APRENDIZADO:**

[00229] As capacidades de aprendizado dos camundongos foram monitoradas durante cinco dias consecutivos (do dia +7 até o dia +11 após infusão icv de veículo ou A $\beta$ O). Os animais realizaram quatro testes por dia e

foram treinados para localizar uma plataforma oculta utilizando indicações visuais. Durante esses testes de aprendizado, a latência de escape, distância de nado e velocidade de nado foram registradas.

[00230] Não houve diferença estatisticamente significativa da latência de escape média entre os grupos no início dos testes. Todos os grupos pareceram então exibir algum grau de aprendizado.

[00231] Os camundongos do grupo controle veículo (Grupo A) aprenderam eficientemente a localização da plataforma e, após cinco dias de treinamento (dia 5), exibiram latência de escape média de  $11,7 \pm 1,5$  s ( $p = 0,00031$  em comparação com o dia 1). Por outro lado, os camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O (grupo B) exibiram comportamento enfraquecido, o que resulta em latência de escape média de  $17,3 \pm 2,0$  s após cinco dias de treinamento ( $p = 0,4537$ , não diferente do dia 1, e  $p = 0,00293$ , significativamente diferente de camundongos controle).

[00232] Camundongos que receberam dose subcrônica de donepezil (via oral) e injeção icv de A $\beta$ O (Grupo C) aprenderam eficientemente a localização da plataforma. Após cinco dias de treinamento (dia 5), eles exibiram latência de escape média de  $14,7 \pm 1,9$  s ( $p = 0,09593$  em comparação com o dia 1). No dia 5, seus desempenhos não foram diferentes de camundongos controle ( $p = 0,2188$ ) e não foram diferentes de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,3477$ ).

[00233] Camundongos que receberam dose precisa (no dia do teste) de donepezil (intraperitoneal) e injeção icv de A $\beta$ O (Grupo L) aprenderam eficientemente a localização da plataforma. Após cinco dias de treinamento (dia 5), eles exibiram latência de escape média de  $13,4 \pm 1,5$  s ( $p = 0,01573$  em comparação com o dia 1). No dia 5, seus desempenhos não foram diferentes de camundongos controle ( $p = 0,4187$ ) e não foram diferentes de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,1272$ ).

[00234] Camundongos que receberam dose de Donecoprida (9 mg/kg/dia) ou Flucoprida (9 mg/kg/dia) e injeção de icv com veículo (Grupos D e E, respectivamente) exibiram desempenhos cognitivos normais. Após cinco dias de treinamento (dia 5), camundongos que receberam dose de Donecoprida exibiram latência de escape média de  $13,0 \pm 1,7$  s ( $p = 0,01778$  em comparação com o dia 1). No dia 5, seus desempenhos não foram diferentes de camundongos controle ( $p = 0,5476$ ) e não foram diferentes de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,10731$ ). Após cinco dias de treinamento (dia 5), camundongos que receberam dose de Flucoprida exibiram latência de escape média de  $16,3 \pm 2,0$  s ( $p = 0,04439$  em comparação com o dia 1). No dia 5, seus desempenhos foram (por razões desconhecidas) diferentes de camundongos controle ( $p = 0,06709$ ) e não foram diferentes de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,7235$ ). Merece observação que, no dia 4, Flucoprida exibiu latência de escape média de  $14,2 \pm 1,9$  s, não diferente de camundongos controle ( $p = 0,7933$ ) e não diferente de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,1225$ ).

[00235] Os camundongos receberam doses crescentes de Donecoprida e injeção icv de A $\beta$ O (Grupos F, G e H). A presença de Donecoprida (em dose de 3 mg/kg/dia) resultou em aumento das capacidades de aprendizado dos camundongos em comparação com camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O. De fato, os camundongos do grupo G exibiram latência de escape média de  $12,7 \pm 1,5$  s ( $p = 0,02933$  em comparação com o dia 1) após cinco dias de treinamento. Os seus desempenhos não foram diferentes de camundongos controle ( $p = 0,6284$ ), mas foram diferentes de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,07381$ ).

[00236] Os camundongos receberam doses crescentes de Flucoprida e injeção icv de A $\beta$ O (Grupos I, J e K). A presença de Flucoprida (em dose de 1 e 3 mg/kg/dia) resultou em aumento das capacidades de aprendizado

dos camundongos em comparação com camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O, enquanto o composto em dose de 9 mg/kg/dia não apresentou efeito. Os camundongos que receberam dose de Flucoprida de 1 mg/kg/dia exibiram latência de escape média de  $13,1 \pm 1,1$  s ( $p = 0,03759$  em comparação com o dia 1) após cinco dias de treinamento. Seus desempenhos não foram diferentes de camundongos controle ( $p = 0,4367$ ), mas foram diferentes de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,07422$ ). De forma similar, camundongos que receberam dose de Flucoprida a 3 mg/kg/dia exibiram latência de escape média de  $12,5 \pm 1,1$  s ( $p = 0,00146$  em comparação com o dia 1) após cinco dias de treinamento. Os seus desempenhos não foram diferentes de camundongos controle ( $p = 0,6477$ ), mas foram diferentes de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,04328$ ).

#### **TESTES DE SONDA:**

[00237] O desempenho de memória de longo prazo foi determinado em quatro dias após a última sessão de treinamento e 14 dias após a injeção icv de veículo ou A $\beta$ O. A plataforma foi removida e cada animal foi mantido em nado livre por 60 seg. Durante o teste de sonda, determinou-se o tempo passado em diversos quadrantes da piscina, o número de cruzamentos sobre o local anterior da plataforma e o tempo no primeiro cruzamento (ou seja, latência até o alvo). Durante o teste de sonda, não se observou diferença da velocidade de nado entre os grupos, o que demonstra motivação e capacidade física normais.

[00238] Número de cruzamentos: camundongos do grupo controle veículo (Grupo A) exibiram comportamento normal com número médio de cruzamentos de  $5,3 \pm 0,6$  (Figura 3). Estes resultados estão de acordo com observações anteriores de grupos controle similares. Conforme o esperado, uma única injeção icv de A $\beta$ O (Grupo B) resultou em enfraquecimento significativo do desempenho cognitivo em comparação com camundongos controle veículos, com número de cruzamento médio reduzido de  $2,2 \pm 0,4$  ( $p = 0,0010$  em

comparação com camundongos controle).

[00239] Camundongos que receberam dose subcrônica de donepezil (via oral) e injeção icv de A $\beta$ O (Grupo C) exibiram comportamento aprimorado com número médio de cruzamentos de  $3,7 \pm 0,4$ . Estes camundongos não foram diferentes de camundongos controle veículos ( $p = 0,0502$ ) e foram significativamente diferentes de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,0214$ ). De forma similar, camundongos que receberam dose aguda (no dia do teste) de donepezil e injeção icv de A $\beta$ O (Grupo L) exibiram comportamento aprimorado com número médio de cruzamentos de  $3,8 \pm 0,4$ . Esses camundongos não foram diferentes de camundongos controle veículos ( $p = 0,0857$ ) e foram significativamente diferentes de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,0159$ ).

[00240] Camundongos que receberam dose de Donecoprida (9 mg/kg/dia) ou Flucoprida (9 mg/kg/dia) na presença de veículo (Grupos D e E, respectivamente) exibiram desempenhos cognitivos normais com número médio de cruzamentos de  $4,6 \pm 0,5$  e  $4,6 \pm 0,7$ . Esses camundongos não foram diferentes de camundongos controle veículos ( $p = 0,4003$  e  $p = 0,3945$  para Donecoprida e Flucoprida, respectivamente) e foram significativamente diferentes de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,0026$  e  $p = 0,0077$  para Donecoprida e Flucoprida, respectivamente).

[00241] Os camundongos receberam doses crescentes de Donecoprida e injeção icv de A $\beta$ O (Grupos F, G e H). A presença de Donecoprida (em todas as doses) resultou em inibição do enfraquecimento induzido por A $\beta$ O de memória de longo prazo avaliado utilizando-se o número de cruzamentos. O efeito máximo foi atingido para dose de 3 mg/kg/dia (Grupo G). De fato, esses camundongos exibiram comportamento normal com número médio de cruzamentos de  $5,1 \pm 0,6$ , não diferente de camundongos controle veículos ( $p = 0,6575$ ) e significativamente diferente de camundongos que receberam injeção

de A $\beta$ O ( $p = 0,0018$ ).

[00242] Os camundongos receberam doses crescentes de Flucoprida e injeção icv de A $\beta$ O (Grupos I, J e K). A presença de Flucoprida (em todas as doses) resultou em inibição do enfraquecimento induzido por A $\beta$ O de memória de longo prazo avaliado utilizando-se o número de cruzamentos. O efeito máximo foi atingido para dose de 3 mg/kg/dia (Grupo J). De fato, esses camundongos exibiram comportamento normal com número médio de cruzamentos de  $4,1 \pm 0,6$ , não diferente de camundongos controle veículos ( $p = 0,1668$ ) e significativamente diferente de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,0242$ ).

[00243] Latência para o alvo: camundongos do grupo controle veículo (Grupo A) exibiram comportamento normal com latência média para o alvo de  $12,0 \pm 1,9$  s. Estes resultados estão de acordo com observações anteriores de grupos controle similares. Conforme o esperado, uma única injeção icv de A $\beta$ O (Grupo B) resultou em enfraquecimento significativo do desempenho cognitivo em comparação com camundongos controle veículos, com latência média aumentada para o alvo de  $24,4 \pm 4,7$  s ( $p = 0,0074$  em comparação com camundongos controle).

[00244] Camundongos que receberam dose subcrônica de donepezil (via oral) e injeção icv de A $\beta$ O (Grupo C) exibiram comportamento aprimorado com latência média para o alvo de  $14,6 \pm 2,7$  s. Estes camundongos não foram diferentes de camundongos controle veículos ( $p = 0,6860$ ) e foram significativamente diferentes de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,0272$ ). De forma similar, camundongos que receberam dose precisa (no dia de teste) de donepezil (ip) e injeção icv de A $\beta$ O (Grupo L) exibiram comportamento aprimorado com latência média para o alvo de  $13,3 \pm 2,3$  s. Esses camundongos não foram diferentes de camundongos controle veículos ( $p = 0,9264$ ) e foram significativamente diferentes de camundongos que receberam

injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,0028$ ).

[00245] Camundongos que receberam dose de Donecoprida (9 mg/kg/dia) ou Flucoprida (9 mg/kg/dia) na presença de veículo (Grupos D e E, respectivamente) exibiram desempenhos cognitivos normais com latência média para o alvo de  $7,2 \pm 1,5$  s e  $12,0 \pm 2,1$  s. Esses camundongos não foram diferentes de camundongos controle veículos ( $p = 0,0524$  e  $p = 0,7582$  para Donecoprida e Flucoprida, respectivamente) e foram significativamente diferentes de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,0017$  e  $p = 0,0082$  para Donecoprida e Flucoprida, respectivamente).

[00246] Os camundongos receberam doses crescentes de Donecoprida e injeção icv de A $\beta$ O (Grupos F, G e H). A presença de Donecoprida (em todas as doses) resultou em inibição do enfraquecimento induzido por A $\beta$ O de memória de longo prazo avaliado utilizando-se a latência para o alvo. O efeito máximo foi atingido para dose de 1 mg/kg/dia (Grupo F). De fato, esses camundongos exibiram comportamento normal com latência média para o alvo de  $9,3 \pm 1,4$  s, não diferente de camundongos controle veículos ( $p = 0,2548$ ) e significativamente diferente de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,0005$ ).

[00247] Os camundongos receberam doses crescentes de Flucoprida e injeção icv de A $\beta$ O (Grupos I, J e K). A presença de Flucoprida (apenas em dose de 9 mg/kg) resultou em inibição do enfraquecimento induzido por A $\beta$ O de memória de longo prazo avaliado utilizando-se a latência para o alvo. De fato, camundongos do Grupo K exibiram comportamento normal com latência média para o alvo de  $10,7 \pm 1,9$  s, não diferente de camundongos controle veículos ( $p = 0,6891$ ) e significativamente diferente de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,0031$ ).

[00248] Tempo em quadrante: camundongos do grupo controle veículo (Grupo A) passaram significativamente mais tempo no quadrante alvo ( $p$

< 0,0001 em comparação com o tempo passado no quadrante oposto). Estes resultados estão de acordo com observações anteriores de grupos controle similares. Como esperado, uma única injeção icv de A $\beta$ O (Grupo B) resultou em enfraquecimento significativo do desempenho cognitivo em comparação com camundongos controle veículos, com mais tempo passado no quadrante oposto que no quadrante alvo ( $p = 0,0779$ , quando são comparados os tempos passados no quadrante alvo x oposto). A dosagem aguda ou subcrônica de donepezil (Grupos C e L) deixou de aumentar o enfraquecimento induzido por A $\beta$ O da memória de longo prazo utilizando o tempo passado nos diferentes quadrantes como leitura. De forma similar, Donecoprida e Flucoprida não aumentaram a frequência do quadrante durante o teste de sonda.

[00249] Efeitos dos compostos de acordo com a presente invenção sobre a memória de reconhecimento:

[00250] Para determinar o efeito de itens de teste sobre memória de reconhecimento, realizou-se teste de NOR 16 dias após a injeção icv de veículo ou A $\beta$ O. Testes de comportamento foram realizados conforme descrito nos procedimentos experimentais.

[00251] Camundongos do grupo controle veículo (Grupo A) exibiram comportamento normal com índice de discriminação médio de  $0,35 \pm 0,04$ . Estes resultados estão de acordo com observações anteriores de grupos controle similares. Conforme esperado, uma única injeção icv de A $\beta$ O (Grupo B) resultou em enfraquecimento significativo ( $p < 0,0001$ ) do desempenho cognitivo em comparação com camundongos controle veículos; com índice de discriminação médio de  $-0,01 \pm 0,03$ , camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O não foram capazes de discriminar entre os objetos novos e familiares.

[00252] Camundongos que receberam dosagem subcrônica de Donepezil (via oral) e injeção icv de A $\beta$ O (Grupo C) exibiram comportamento normal com índice de discriminação médio de  $0,29 \pm 0,09$ . Esses camundongos

não foram diferentes de camundongos controle veículos ( $p = 0,7439$ ) e significativamente diferentes de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,0192$ ).

[00253] Camundongos que receberam dosagem aguda (no dia de teste) de Donepezil (ip) e injeção icv de A $\beta$ O (Grupo L) exibiram comportamento normal com índice de discriminação médio de  $0,30 \pm 0,07$ . Esses camundongos não foram diferentes de camundongos controle veículos ( $p = 0,9158$ ) e foram significativamente diferentes de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,0030$ ).

[00254] Camundongos que receberam dose de Donecoprida (9 mg/kg/dia) ou Flucoprida (9 mg/kg/dia) na presença de veículo (Grupos D e E, respectivamente) exibiram desempenhos cognitivos normais com índice de discriminação médio de  $0,29 \pm 0,04$  e  $0,36 \pm 0,06$ . Esses camundongos não foram diferentes de camundongos controle veículos ( $p = 0,3071$  e  $p = 0,8205$  para Donecoprida e Flucoprida, respectivamente) e foram significativamente diferentes de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,0007$  e  $p = 0,0003$  para Donecoprida e Flucoprida, respectivamente).

[00255] Os camundongos receberam doses crescentes de Donecoprida e injeção icv de A $\beta$ O (Grupos F, G e H). A presença de Donecoprida (em todas as doses) resultou em inibição dependente da dosagem de enfraquecimento induzido por A $\beta$ O da memória de reconhecimento. O efeito máximo foi atingido para dose de 9 mg/kg/dia (Grupo H). De fato, esses camundongos exibiram comportamento normal com índice de discriminação médio de  $0,43 \pm 0,06$  s, não diferente de camundongos controle veículos ( $p = 0,3440$ ) e significativamente diferente de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,0003$ ).

[00256] Os camundongos receberam doses crescentes de Flucoprida e injeção icv de A $\beta$ O (Grupos I, J e K). A presença de Flucoprida (em

todas as doses) resultou em inibição dependente da dosagem (curva em forma de sino) de enfraquecimento induzido por A $\beta$ O da memória de reconhecimento. O efeito máximo foi atingido para dose de 3 mg/kg/dia (Grupo J). De fato, esses camundongos exibiram comportamento normal com índice de discriminação médio de  $0,46 \pm 0,05$ , não diferente de camundongos controle veículos ( $p = 0,1039$ ) e significativamente diferente de camundongos que receberam injeção de A $\beta$ O ( $p = 0,0003$ ).

#### **CONCLUSÃO:**

[00257] Em conjunto, esses dados apresentam forte sugestão de que Donecoprida e Flucoprida aprimoraram os desempenhos cognitivos de camundongos que receberam A $\beta$ O.

#### **EXEMPLO 3**

[00258] Este exemplo exhibe os efeitos antiamnésicos, antiamiloides e anti-inflamatórios de Donecoprida e Flucoprida em administração crônica ao modelo de camundongo 5XFAD de mal de Alzheimer.

#### **RACIOCÍNIO DO ESTUDO:**

[00259] O objetivo do estudo foi avaliar os potenciais efeitos antiamnésicos, antiamiloides e anti-inflamatórios de Donecoprida e Flucoprida em administração crônica em modelo de camundongo de mal de Alzheimer.

[00260] O modelo de camundongo utilizado foi a linhagem 5XFAD (denominada no Jackson Laboratory “B6SJL-Tg(APP<sup>Sw</sup>FILon,PSEN1\*<sup>M146L</sup>\*<sup>L286V</sup>)6799Vas/Mmjax”, Estoque MMRRC n° 34840-JAX ou “B6.Cg-Tg(APP<sup>Sw</sup>FILon,PSEN1\*<sup>M146L</sup>\*<sup>L286V</sup>)6799Vas/Mmjax”, Estoque MMRRC n° 34848-JAX).

[00261] Esses camundongos transgênicos 5XFAD sobre-expressam APP(695) humano mutante com as mutações de Mal de Alzheimer Familiar (FAD) sueca (K670N, M671L), da Flórida (I716V) e de Londres (V717I)

em conjunto com PS1 humano que abriga duas mutações de FAD, M146L e L286V. Esses transgenes são regulados pelo promotor Thy1 de camundongo para dirigir a sobre-expressão no cérebro. Os camundongos 5XFAD recapitulam características importantes da patologia amiloide de Mal de Alzheimer e são um modelo útil de neurodegeneração induzida por A $\beta$ 42 intraneuronal e formação de placas amiloides.

### **MÉTODOS E PROJETO EXPERIMENTAL:**

#### **CAMUNDONGOS:**

[00262] Os experimentos com animais foram conduzidos de acordo com a Norma do Conselho das Comunidades Europeias de 24 de novembro de 1986 (86/609/EEC). Todos os esforços foram realizados para minimizar o sofrimento dos animais e reduzir o número de camundongos utilizados. A geração de camundongos 5XFAD foi descrita em Oakley et al (2006), *J. Neurosci.* 26: 10129-10140. Esses camundongos transgênicos sobre-expressam APP (695) humano que abriga as mutações de AD familiar (FAD) sueca (K670N, M671L), da Flórida (I716V) e de Londres (V717I) e Presenilina 1 (PS1) humana que abriga as duas mutações de FAD, M146L e L286V. A expressão dos dois transgenes é regulada por elementos específicos neuronais do promotor *Thy1* de camundongo. A linhagem 5XFAD (antecedentes genéticos B6/SJL) foi mantida por meio do cruzamento de camundongos transgênicos hemizigóticos com reprodutores B6/SJL F1. A linhagem 5XFAD (antecedentes genéticos C57BL/6J) foi mantida por meio de cruzamento de camundongos transgênicos hemizigóticos com reprodutores C57BL/6J F1. Todos os animais foram genotipificados por meio de PCR utilizando DNA genômico da cauda. Camundongos transgênicos e do tipo selvagem foram criados em nossas instalações para animais, tiveram acesso a alimentos e água à vontade e foram abrigados em um ciclo de 12 h de luz-escuro a 22-24 °C. Fêmeas de camundongos 5XFAD foram utilizadas neste estudo. Para cada experimento, a

idade de camundongos é indicada em meses (com faixa de duas semanas).

#### **DROGAS:**

[00263] Donecoprida (fumarato de Donecoprida, MR 31155) e Flucoprida (fumarato de Flucoprida, MR 31193) foram sintetizadas em CERMN, Caen, França.

[00264] RS 67333 (1-(4-amino-5-cloro-2-metoxifenil)-3-(1-butil-4-piperidinil)-1-propanona) foi utilizado como agonista receptor de 5-HT<sub>4</sub> de referência e foi adquirido da Tocris Bioscience (R&D Systems Europe, Lille, França).

[00265] Os compostos foram novamente suspensos em DMSO (37,5 µg/µl, armazenado a -20 °C) e recém-diluídos a 1:250 em NaCl a 0,9% antes da administração. Utilizou-se solução de veículo (0,9% de NaCl e 0,4% de DMSO) como controle.

#### **TRATAMENTO DE ANIMAIS:**

[00266] Camundongos 5XFAD receberam tratamentos crônicos com drogas ou veículo de acordo com dois protocolos diferentes. Em cada experimento, solução de drogas ou veículo foi administrada por via intraperitoneal duas vezes por semana (1 mg/kg). Em “Protocolo 1”, camundongos (n = 6-7 camundongos por grupo) foram tratados com compostos por dois meses, de 2 a 4 meses de idade. Em “Protocolo 2”, camundongos (n = 7) foram tratados com compostos por três meses, de 1 a 4 meses de idade. Ao final de cada protocolo, os camundongos foram anestesiados com uma mistura de 100 mg/kg de cetamina e 10 mg/kg de xilazina em solução salina e sofreram perfusão transcardial com PBS. Os cérebros foram rapidamente isolados sobre gelo, os bulbos olfativos e o cerebelo foram removidos e os dois hemisférios foram divididos. Um hemisfério foi congelado sobre gelo seco e armazenado a -80 °C para análise bioquímica, enquanto o outro foi pós-fixado em PFA a 4% para imuno-histoquímica (IHC).

**COLETA DE FLUIDO CEREBROESPINAL (CSF):**

[00267] Os camundongos foram anestesiados e montados sobre um instrumento estereotáxico. A pele do pescoço foi cortada e o tecido subcutâneo e os músculos foram separados com o auxílio de microrretratores (Fine Science Tools, Heidelberg, Alemanha). Os camundongos foram deitados em seguida, de forma que a cabeça formasse um ângulo de cerca de 135° com o corpo (Liu e Duff (2008), *J. Vis. Exp.* 10: 960). Um tubo capilar (vidro de borossilicato, B100-75-10, Sutter Instruments, Novato, Califórnia, Estados Unidos) foi utilizado para puncionar a matéria dura da cisterna magna. CSF foi coletado por meio de ação capilar e transferido para microtubos de 0,5 ml, imediatamente congelados sobre gelo seco e armazenados a -80 °C até a utilização. Após o descongelamento, amostras foram aquecidas a 60 °C por cinco minutos conforme descrito no pedido internacional WO 2008/009868 e analisadas sem ciclos de congelamento-descongelamento adicionais.

**PREPARAÇÃO DE EXTRATO CEREBRAL:**

[00268] Hemisférios cerebrais, córtex frontal e hipocampo de camundongos 5XFAD e controles foram descongelados, pesados e homogeneizados em quatro volumes de solução tris-salina (50 mM de Tris-HCl, pH = 7,4, 150 mM de NaCl) com um coquetel inibidor da protease (Roche Applied Science, Meylan, França). Os homogeneizados resultantes foram centrifugados a 54.000 x g por 20 minutos e os sobrenadantes (a “fração solúvel”) foram coletados e repartidos para armazenagem a -80 °C. As pelotas foram novamente suspensas por meio de rápida sonicação em 10 volumes de 6 M de guanidina HCl em 50 mM de Tris-HCl, pH = 7,6 e novamente centrifugadas a 26.500 x g por 20 minutos. Os sobrenadantes (a “fração insolúvel”) foram parcelados e armazenados a -80 °C (Morishima-Kawashima et al (2000), *Am. J. Pathol.* 157: 2093-2099).

**QUANTIFICAÇÃO DE A $\beta$ 40 E A $\beta$ 42:**

[00269] Kits ELISA da IBL International (Hamburgo, Alemanha) para dosagem de A $\beta$ <sub>40</sub> (kit de teste de amiloide  $\beta$  humano (1-40), n° 27713) ou A $\beta$ <sub>42</sub> (kit de teste de amiloide  $\beta$  humano (1-42), n° 27719) foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram lidas a 620 nm e 450 nm utilizando um contador da luminescência Infinite 2000. Os valores obtidos foram normalizados na concentração de proteína de cada amostra, medida utilizando-se um teste de proteína BCA (Sigma-Aldrich).

**IMUNO-HISTOQUÍMICA:**

[00270] Seções com 30 micrômetros de espessura foram cortadas utilizando um vibratomo (Microm HM 650V, Thermo Scientific, Saint Herblain, França) e armazenadas em meio crioprotetor a -20 °C. Para marcação de placas de amiloide, cortes de tecidos em livre fluxo de córtex frontal, hipocampo e córtex entorrinal (coordenadas do bregma: córtex frontal = 1,98 mm, hipocampo = -1,94 mm, córtex entorrinal = -3,08 mm) foram extensamente lavados em PBS e incubados em seguida em solução de bloqueio (PBS; 3% BSA; 0,1% Triton X-100) por uma hora. Os cortes foram manchados com tintura Hoechst (1:1000, Life Technologies, Saint Aubin, França) por 15 minutos para detectar núcleos celulares e, em seguida, com solução de Tioflavina T recém-preparada (n° T3516-5G, Sigma-Aldrich) (concentração final: 0,01 mg/ml em tampão de bloqueio) por 15 minutos. Após lavagem em etanol a 70% por cinco minutos, as amostras foram montadas sobre lâminas de polilisina com lamelas. Para manchas de GFAP (proteína ácida fibrilar glial), cortes do cérebro em livre flutuação foram bloqueados como anteriormente e incubados com anti-GFAP de coelho policlonal (1:1000, Z0334, Dako, Les Ullis, França) a 4 °C por uma noite. Após manchas com tioflavina T e lavagem com etanol a 70%, o anticorpo anticoelho de cabra Alexafluor 594 secundário (1:1000, A11012, Life Technologies) foi adicionado por duas horas. Lavagens com PBS e montagem

foram realizados conforme descrito acima.

#### **OBTENÇÃO E ANÁLISE DE IMAGENS:**

[00271] Foram obtidas imagens com um microscópio Axiomager Z1 (Carl Zeiss S. A. S., Marly le Roi, França). Análise de manchas de tioflavina T foi realizada de forma cega e os dados são apresentados como o número médio de partículas por mm<sup>2</sup> em dois a três cortes de tecidos da mesma área do cérebro/animal (software Image J). A expressão de GFAP foi quantificada utilizando software Image J e os resultados são expressos na forma de frações de área.

#### **TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS NOVOS:**

[00272] O desempenho cognitivo de camundongos foi testado utilizando-se o teste de reconhecimento de objetos novos (NOR) (Bevins e Besheer (2006), *Nat. Protoc.* 1: 1306-1311). Os animais foram extensamente manuseados durante o tratamento com drogas antes do início do teste. A cada dia, permitiu-se que os camundongos se familiarizassem com a sala de teste por pelo menos uma hora antes do teste. O teste foi conduzido em uma caixa Plexiglas (largura: 35 cm, comprimento: 20 cm, altura: 20 cm) colocado em uma sala com iluminação fraca. Nos dias 1 e 2, cada camundongo foi habituado à caixa vazia por 10 min/dia. No dia 3, dois objetos (construídos com brinquedos plásticos) foram posicionados na gaiola, a 5 cm de distância das paredes opostas. Durante a sessão de treinamento, cada animal foi colocado entre os dois objetos, frontal para a parede e, em seguida, foi mantido para explorar os objetos por cinco minutos. Os camundongos foram devolvidos em seguida para a sua gaiola de abrigo e, 24 h mais tarde, passaram por uma sessão de testes de 5 min, na qual um dos dois objetos (familiares) foi substituído por um novo. O experimento completo foi gravado em vídeo e a exploração do objeto (tempo passado pelo nariz do camundongo em contato com o objeto ou farejando-o a uma distância  $\leq 1$  cm) foi medida de forma cega. Dois parâmetros foram

considerados: (1) o tempo de exploração (seg) gasto pelo animal em interação com os dois objetos familiares durante a sessão de treinamento e (2) o tempo de exploração gasto pelo animal em interação com o objeto novo com relação ao tempo total de exploração ( $[\text{novo}/(\text{familiar} + \text{novo})] \times 100$ ) durante o teste. Foi também calculado um índice de discriminação ( $[\text{novo} - \text{familiar}]/[\text{familiar} + \text{novo}]$ ).

#### **ANÁLISE ESTATÍSTICA:**

[00273] Todos os valores são expressos na forma de média  $\pm$  desvio padrão. Efeitos significativos de tratamentos foram determinados por meio de análise ANOVA seguida por testes post hoc de Tukey no caso de diversos grupos comparativos. Em todos os outros casos, utilizou-se o teste t de Student desemparelhado. Para todos os testes estatísticos,  $P < 0,05$  foi considerado significativo. Realizou-se análise com GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla CA).

#### **RESULTADOS:**

[00274] Efeitos de Donecoprida e Flucoprida sobre carga de amiloide em cérebros 5XFAD:

[00275] 27 fêmeas de camundongos 5XFAD (antecedentes genéticos B6/SJL) foram utilizadas neste estudo. Os camundongos receberam veículo ou compostos (1 mg/kg) por via intraperitoneal, duas vezes por semana por dois meses, de 2 a 4 meses de idade.

[00276]  $A\beta_{40}$  e  $A\beta_{42}$  foram quantificados a partir de extrato cerebral em frações solúveis e insolúveis. Os resultados são expressos em percentual de veículo.

[00277] Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6 abaixo.

#### **TABELA 6**

[00278] Níveis de  $A\beta_{40}$  e  $A\beta_{42}$  (% de controles):

	Fração solúvel			Fração insolúvel		
	A $\beta$ <sub>40</sub>	Desvio padrão	n	A $\beta$ <sub>40</sub>	Desvio padrão	n
Veículo	100,00	11,38	7	100,00	14,56	7
Donecoprida	110,18	10,68	7	79,97	6,40	7
Flucoprida	110,51	16,67	7	97,16	10,43	7
	A $\beta$ <sub>42</sub>	Desvio padrão	n	A $\beta$ <sub>42</sub>	Desvio padrão	n
Veículo	100,00	11,26	6	100,00	6,70	7
Donecoprida	65,93*	8,36	7	67,85*	12,59	6
Flucoprida	30,19****	8,04	7	73,16	4,62	7

\*  $p < 0,05$  em comparação com o veículo, determinado por meio de ANOVA de uma via seguido por teste de Tukey.

[00279] Os valores dos grupos veículo apresentados na Tabela 6 foram os seguintes:

- fração solúvel:
  - A $\beta$ <sub>40</sub> = 9,48  $\pm$  1,08  $\mu$ g/mg de proteína; e
  - A $\beta$ <sub>42</sub> = 0,24  $\pm$  0,03  $\mu$ g/mg de proteína;
- fração insolúvel:
  - A $\beta$ <sub>40</sub> = 0,68  $\pm$  0,10  $\mu$ g/mg de proteína; e
  - A $\beta$ <sub>42</sub> = 10,84  $\pm$  0,73  $\mu$ g/mg de proteína.

[00280] Efeito antiamilóide: na fração solúvel de cérebros de camundongos 5XFAD, a administração crônica de Donecoprida e Flucoprida (1 mg/kg, duas vezes por semana) foi capaz de reduzir significativamente os níveis de A $\beta$ <sub>42</sub> (\* $p < 0,05$  contra o veículo para Donecoprida e \*\*\*\* $p < 0,0001$  contra o veículo para Flucoprida, determinado por meio de ANOVA de uma via, seguido por teste de Tukey), sem alteração dos níveis de A $\beta$ <sub>40</sub>. De forma similar, na fração insolúvel, donecoprida reduziu a carga de A $\beta$ <sub>42</sub> nos cérebros dos camundongos (\* $p < 0,05$  contra o veículo, determinado por meio de ANOVA de

uma via, seguido pelo teste de Tukey). Os níveis de A $\beta$ <sub>40</sub> insolúveis não foram afetados pelas duas drogas.

**EFEITOS DE DONECOPRIDA E FLUCOPRIDA SOBRE A MEMÓRIA, CARGA DE AMILOIDES EM CSF, PLACAS DE AMILOIDES E ASTROGLIOSE EM CAMUNDONGOS 5XFAD:**

[00281] 28 fêmeas de camundongos 5XFAD (antecedentes genéticos C57BL/6J) foram utilizadas neste estudo. Os camundongos receberam veículo ou compostos (1 mg/kg) por via intraperitoneal, duas vezes por semana por três meses, de 1 a 4 meses de idade.

[00282] Ao final do tratamento, os camundongos foram avaliados para determinar o desempenho da memória a longo prazo em teste de reconhecimento de objetos novos (NOR). O intervalo entre as sessões foi de 24 horas. Como nenhum camundongo deixou de explorar um dos dois objetos ou explorar os dois objetos por menos de 10 segundos durante a sessão de treinamento, todos os camundongos foram incluídos na análise de dados.

[00283] Efeito antiamnésico: fêmeas 5XFAD com um mês de idade e ninhadas do tipo selvagem foram tratadas com RS 67333, veículo, Donecoprida ou Flucoprida (1 mg/kg, duas vezes por semana por três meses) e a memória de reconhecimento foi determinada com o teste de reconhecimento de objetos novos (NOR). Sessões de habituação foram iniciadas em três dias após o final do tratamento para evitar interferência com efeitos agudos. O intervalo entre a sessão de treinamento e o teste foi de 24 horas. Camundongos tratados com veículo apresentaram desempenho de memória enfraquecido e não foram capazes de discriminar o objeto novo em comparação com o familiar, conforme exibido pelo tempo de exploração similar e pelo índice de discriminação não significativo. O tratamento com RS 67333 reverte o enfraquecimento cognitivo conforme indicado pelo percentual de tempo mais alto dedicado à exploração do objeto novo em comparação com camundongos tratados com veículo (\*\*p < 0,01 contra o objeto familiar, determinado por meio

de ANOVA de duas vias seguido por teste de Sidak). De forma similar, tratamentos crônicos de Donecoprida e Flucoprida puderam evitar alteração de memória (\*\*p < 0,01 contra o objeto familiar para Donecoprida, \*p < 0,05 contra o objeto familiar para Flucoprida, determinado por meio de ANOVA de duas vias seguido por teste de Sidak). O índice de discriminação dos três grupos tratados com composto foi diferente de zero, o nível de chance (determinado por meio de teste t de Student não emparelhado). O tempo total de exploração durante a sessão de treinamento não diferiu significativamente nos quatro grupos, o que indica que o aprimoramento da memória de reconhecimento em camundongos 5XFAD tratados com Donecoprida ou Flucoprida não é secundário ao aumento da atividade exploratória.

[00284] Carga de amiloide em CSF: a concentração de A $\beta$ <sub>42</sub> em fluido cerebrospinal (CSF) de camundongos 5XFAD tratados com RS 67333, Donecoprida ou Flucoprida (1 mg/kg, duas vezes por semana por três meses) não foi significativamente diferente em comparação com os controles, o que indica que o estímulo de receptor de 5-HT<sub>4</sub> crônico não afetou os níveis de amiloide em CSF (determinados por meio de ANOVA de uma via seguido por teste de Tukey).

[00285] Efeito anti-amiloide: Córtex frontal, hipocampo e córtex entorrinal foram analisados como áreas representativas do cérebro de camundongo 5XFAD (cortes frontal, médio e traseiro) e de regiões do cérebro humano que são afetadas precocemente pelo mal de Alzheimer e altamente enriquecidas em depósitos de amiloide.

[00286] Tratamento com donecoprida (1 mg/kg, duas vezes por semana por três meses) reduziu significativamente o número de placas de amiloide em comparação com veículo no córtex frontal (redução de 16 ± 3%, \*\*p < 0,01 em comparação com veículo) e em córtex entorrinal (redução de 24 ± 4%, \*\*p < 0,01 em comparação com veículo). Redução significativa do número de

placas foi também observada em córtex entorrinal após tratamento com Flucoprida (1 mg/kg, duas vezes por semana por três meses) com redução de  $28 \pm 6\%$ , com relação ao controle (\*\*p < 0,01 em comparação com veículo). Não foi observado efeito significativo após tratamento com RS 67333 (1 mg/kg, duas vezes por semana por três meses), no córtex frontal nem no córtex entorrinal. O número de placas de amiloide em hipocampo de camundongos 5XFAD tratados com RS 67333, Donecoprida ou Flucoprida (1 mg/kg, duas vezes por semana por três meses) não foi significativamente diferente em comparação com controles. As estatísticas foram determinadas por meio de ANOVA de uma via seguido por teste de Tukey.

[00287] Efeito anti-inflamatório: a determinação imunohistoquímica de astrogliose (anticorpo anti-GFAP, proteína ácida fibrilar glial) demonstrou que tratamentos crônicos com RS 67333 e Donecoprida (1 mg/kg, duas vezes por semana por três meses) reduziu significativamente a astrogliose ( $54 \pm 10\%$  e  $62 \pm 6\%$  de redução de manchas de GFAP em fatias do cérebro entorrinal de animais tratados em comparação com controles que receberam veículo, respectivamente \*p < 0,01 em comparação com veículo). Em córtex entorrinal, tratamento com Flucoprida (1 mg/kg, duas vezes por semana por três meses) induziu redução de  $51 \pm 5\%$  de manchas de GFAP próxima à significativa (p = 0,06). Manchas de GFAP no córtex frontal ou hipocampo de camundongos 5XFAD, tratadas com RS 67333, Donecoprida ou Flucoprida (1 mg/kg, duas vezes por semana por três meses), entretanto, não foram significativamente diferentes em comparação com os controles. As estatísticas foram determinadas por meio de ANOVA de uma via seguido por teste de Tukey.

#### **CONCLUSÃO:**

[00288] O estudo demonstra que Donecoprida e Flucoprida exercem efeitos antiamiloides (redução dos níveis de A $\beta$ <sub>42</sub> e placa de amiloide) e efeitos anti-inflamatórios (redução da astrogliose) mediante administração

crônica a camundongos 5XFAD, que é um modelo de mal de Alzheimer em camundongo transgênico. Estes efeitos são principalmente proeminentes em córtex entorrinal e córtex frontal. Além disso, a administração crônica de Donecoprida e Flucoprida é capaz de exercer efeito antiamnésico e evitar o surgimento de déficits de memória em camundongos 5XFAD.

[00289] Todos estes efeitos são comparáveis e, às vezes, maiores que os de RS 67333 (agonista receptor de 5-HT<sub>4</sub> selecionado como referência), o que indica que Donecoprida e Flucoprida são drogas promissoras contra mal de Alzheimer.

#### **EXEMPLO 4**

[00290] Este exemplo descreve o efeito neuroprotetor de diversos compostos da fórmula geral (I) conforme definido acima sobre neurônios hipocâmpais intoxicados com oligômeros de peptídeos de amiloide.

#### **MATERIAL E MÉTODOS:**

##### **CULTIVO PRIMÁRIO DE NEURÔNIOS HIPOCÂMPAIS:**

[00291] Neurônios hipocâmpais de ratos foram cultivados conforme descrito por Callizot et al (2013), *J. Neurosci. Res.* 91: 706-716. Resumidamente, fêmeas de ratos grávidas com 17 dias de gestação (Ratos Wistar; Janvier Labs, França) foram mortas utilizando anestesia profunda com câmara de CO<sub>2</sub> e deslocamento da cervical. Os fetos foram removidos em seguida do útero e imediatamente colocados em meio Leibovitz L15 gelado com uma solução de 2% de penicilina (10.000 U/ml) e estreptomicina (10 mg/ml) (PS) e 1% de albumina de soro bovino (BSA). Os hipocâmpais foram tratados por 20 minutos a 37 °C com uma solução de tripsina-EDTA em concentração final de 0,05% de tripsina e 0,02% de EDTA. A dissociação foi suspensa por meio da adição de meio Eagle modificado da Dulbecco (DMEM) com 4,5 g/l de glicose, que contém DNase I grau II (concentração final de 0,5 mg/ml) e 10% de soro de feto bovino (FCS). As células foram dissociadas mecanicamente por três

passagens forçadas através da ponta de uma pipeta de 10 ml.

[00292] As células foram centrifugadas a 515 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a pelota foi novamente suspensa em meio de cultivo definido que consiste em meio neurobasal com solução a 2% de suplemento B27, 2 mmol/l de L-glutamina, 2% de solução de PS e 10 ng/ml de fator neurotrófico cerebral (BDNF). Células viáveis foram contadas em um citômetro de Neubauer, utilizando o teste de exclusão de azul de tripano. Células foram semeadas em densidade de 20.000 por cavidade em placas com 96 cavidades previamente revestidas com poli-L-lisina e cultivadas a 37 °C em um incubador de ar (95%)-CO<sub>2</sub> (5%).

[00293] O meio foi alterado a cada dois dias. Para placas com 96 cavidades, apenas 60 cavidades foram utilizadas. As cavidades da primeira e da última linha e coluna não foram utilizadas (para evitar efeito de extremidades) e foram preenchidas com água esterilizada.

[00294] Compostos de teste e exposição a A $\beta$  1-42 humano:

[00295] Compostos de teste: foram testados os compostos a seguir:

- MR31193;
- MR31176;
- MR31192; e
- MR33583.

[00296] Incubação prévia: no dia 17 de cultivo, os compostos foram dissolvidos no meio de cultivo e previamente incubados com neurônios hipocâmpais primários por uma hora, antes da exposição a A $\beta$  1-42.

[00297] Danos: os neurônios hipocâmpais foram expostos a soluções de A $\beta$  (conforme abaixo) após 17 dias de cultivo. A preparação A $\beta$  1-42 foi realizada seguindo-se o procedimento descrito por Callizot et al (2013), *J. Neurosci. Res.* 91: 706-716. O número de bateladas do A $\beta$  1-42 utilizado neste

estudo contém 10% de oligômeros (quantificação por meio de WB conforme realizado em Combes et al (2015), *J. Neurosci. Res.* 93: 633-643). Resumidamente, o peptídeo A $\beta$  1-42 foi dissolvido no meio de cultivo definido mencionado acima, em concentração inicial de 40  $\mu\text{mol/l}$ . Esta solução foi suavemente agitada por três dias a 37 °C no escuro e utilizado imediatamente após diluição adequada em meio de cultivo até as concentrações utilizadas (20  $\mu\text{mol/l}$  ou 2,5  $\mu\text{mol/l}$  correspondentes a 2  $\mu\text{mol/l}$  ou 0,25  $\mu\text{mol/l}$  de oligômeros (A $\beta$ O), respectivamente). Adicionou-se preparação de A $\beta$  1-42 até concentração final de 20 ou 2,5  $\mu\text{mol/l}$  (respectivamente, 2  $\mu\text{mol/l}$  ou 0,25  $\mu\text{mol/l}$  de A $\beta$ O, determinados por meio de WB automático) diluída em meio controle na presença dos compostos.

#### **AVALIAÇÃO DE OBJETIVOS:**

[00298] Em 24 horas após a intoxicação, os sobrenadantes foram retirados e imediatamente congelados para testes analíticos futuros. Eles foram mantidos a -20 °C por até seis meses. Os neurônios hipocâmpais foram fixados em seguida por uma solução fria de etanol (95%) e ácido acético (5%) por cinco minutos a -20 °C. Eles foram lavados novamente por duas vezes em PBS, permeabilizados em seguida e os locais não específicos foram bloqueados utilizando solução de PBS contendo 0,1% de saponina e 1% de FCS por 15 minutos à temperatura ambiente.

[00299] Imunomanchas: MAP-2 / AT100 – após fixação e permeabilização, as células foram incubadas por duas horas com:

- um anticorpo policlonal de galinha antiproteína associada a microtúbulos 2 (MAP-2) em diluição de 1/1000 em PBS contendo 1% de soro de feto bovino e 0,1% de saponina (esse anticorpo mancha especificamente corpos celulares e neurites, permitindo o estudo da morte de células neuronais e da rede de neurites); e
- um anticorpo monoclonal de camundongo antifosfo Tau

(AT100) em diluição de 1/100 em PBS que contém 1% de soro de feto bovino e 0,1% de saponina.

[00300] Esses anticorpos foram revelados com anti-IgG de camundongo de cabra Alexa Flúor 488 e anti-IgG de galinha de cabra Alexa Flúor 568 em diluição 1/400 em PBS contendo 1% de FCS e 0,1% de saponina por uma hora à temperatura ambiente.

[00301] Para cada condição, 30 fotografias (que representam toda a área da cavidade) por cavidade foram tomadas utilizando ImageXpress® (Molecular Devices) com ampliação de 20x. Todas as imagens foram geradas utilizando os mesmos parâmetros de obtenção. A partir das imagens, análises foram realizadas direta e automaticamente utilizando Custom Module Editor® (Molecular Devices). Foram pesquisadas as leituras a seguir:

- número total de neurônios (sobrevivência de neurônios, número de neurônios positivos para MAP-2);
- rede de neurites (em  $\mu\text{m}$  de neurônios positivos para MAP-2); e
- área de AT100 ( $\mu\text{m}^2$ , sobrepostos com neurônios positivos para MAP-2).

[00302] Imunomanchas: PSD95 e SYN – após fixação e permeabilização, as células foram incubadas por duas horas com:

- um anticorpo monoclonal de camundongo antipós-sináptico com densidade de 95 kDa (PSD95) em diluição de 1/200 em PBS que contém 1% de soro de feto bovino e 0,1% de saponina; e
- um anticorpo policlonal de coelho antissinaptofisina (SYN) em diluição de 1/100 em PBS contendo 1% de soro de feto bovino e 0,1% de saponina.

[00303] Esses anticorpos foram revelados com anti-IgG de camundongo de cabra Alexa Flúor 488 e anti-IgG de coelho de cabra Alexa Flúor

568 em diluição 1/400 em PBS contendo 1% de FCS e 0,1% de saponina por uma hora à temperatura ambiente.

[00304] Para cada condição, 40 fotografias por cavidade foram tomadas utilizando ImageXpress (Molecular Devices) com ampliação de 40x. Todas as imagens foram tomadas com as mesmas condições. A avaliação das sinapses foi realizada automaticamente utilizando Custom Module Editor® (Molecular Devices). Foram determinados os objetivos a seguir:

- número de sinapses (sobreposição entre PSD95/SYN).

[00305] Análise estatística:

[00306] Todos os valores são expressos na forma de média +/- desvio padrão. Realizou-se análise estatística por meio de ANOVA de uma via, seguido por teste de Dunnett ou LSD de Fisher.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

### **RESULTADOS:**

[00307] São obtidos os resultados a seguir:

- MR31193 exibe forte efeito neuroprotetor (sobrevivência, neurites e rede sináptica). Como se pode observar nas Figuras 1 e 2, o efeito segue curva em forma de sino com efeito máximo observado sob concentração de 100 nM para sobrevivência e rede de neurites (Figuras 1A-C). O efeito máximo da rede de sinapses foi obtido sob concentrações mais baixas (5 nM a 100 nM, Figura 2). Observou-se também efeito significativo sobre a hiperfosforilação de Tau, com efeito máximo a 50 nM (vide a Figura 1D);
- como se pode observar nas Figuras 3 e 4, MR31176 exibe efeito neuroprotetor em altas concentrações (sobrevivência, neurite e rede sináptica). Observou-se também efeito significativo sobre a hiperfosforilação de Tau em alta concentração (vide a Figura 3D);
- como se pode observar nas Figuras 5 e 6, MR31192 exibe efeito neuroprotetor muito forte sob doses muito baixas (por exemplo, 1-5 nM

para sobrevivência, vide a Figura 5A). Observou-se ainda efeito muito grande sobre a rede de neurites em cada dose testada (vide a Figura 5B). Este composto chegou a exibir efeito neurotrófico (induziu o crescimento neurítico), como se pode observar na Figura 5C. O número de sinapses também aumentou em doses baixas (1-5 nM, vide a Figura 6). Observou-se ainda efeito importante sobre a hiperfosforilação de Tau (vide a Figura 5D);

- observou-se ainda efeito neuroprotetor que segue curva em forma de sino com MR33583 (vide as Figuras 7 e 8). As concentrações de ativo foram de mais de 50-500 nM. Observou-se forte efeito sobre a rede de neurites em quase todas as doses testadas (vide a Figura 7B). Observou-se ainda efeito em forma de sino sobre a hiperfosforilação de Tau com efeito máximo a 50-100 nM (vide a Figura 7D).

[00308] Estes resultados confirmam que todos os compostos da fórmula geral (I) testados são agentes neuroprotetores, em que os compostos MR31193, MR31192 e MR33583 são particularmente eficientes.

#### **EXEMPLO 5**

#### **ESTE EXEMPLO EXIBE OS EFEITOS NEUROPROTETORES DOS COMPOSTOS MR31192 E MR36014.**

#### **MATERIAL E MÉTODOS:**

[00309] Cultivo primário de neurônios hipocâmpais:

[00310] Neurônios hipocâmpais de ratos foram cultivados conforme descrito por Callizot et al (2013), *J. Neurosci. Res.* 91: 706-716. Resumidamente, fêmeas de ratos grávidas com 17 dias de gestação (Ratos Wistar; Janvier Labs, França) foram mortas utilizando anestesia profunda com câmara de CO<sub>2</sub> e deslocamento da cervical. Os fetos foram removidos em seguida do útero e imediatamente colocados em meio Leibovitz L15 gelado com uma solução de 2% de penicilina (10.000 U/ml) e estreptomicina (10 mg/ml) (PS) e 1% de albumina de soro bovino (BSA). Os hipocâmpos foram tratados por 20

minutos a 37 °C com uma solução de tripsina-EDTA em concentração final de 0,05% de tripsina e 0,02% de EDTA. A dissociação foi suspensa por meio da adição de meio Eagle modificado da Dulbecco (DMEM) com 4,5 g/l de glicose, que contém DNase I grau II (concentração final de 0,5 mg/ml) e 10% de soro de feto bovino (FCS). As células foram dissociadas mecanicamente por três passagens forçadas através da ponta de uma pipeta de 10 ml.

[00311] As células foram centrifugadas a 515 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a pelota foi novamente suspensa em meio de cultivo definido que consiste em meio neurobasal com solução a 2% de suplemento B27, 2 mmol/l de L-glutamina, 2% de solução de PS e 10 ng/ml de fator neurotrófico cerebral (BDNF). Células viáveis foram contadas em um citômetro de Neubauer, utilizando o teste de exclusão de azul de tripano. Células foram semeadas em densidade de 20.000 por cavidade em placas com 96 cavidades previamente revestidas com poli-L-lisina e cultivadas a 37 °C em um incubador de ar (95%)-CO<sub>2</sub> (5%).

[00312] O meio foi alterado a cada dois dias. Para placas com 96 cavidades, apenas 60 cavidades foram utilizadas. As cavidades da primeira e da última linha e coluna não foram utilizadas (para evitar efeito de extremidades) e foram preenchidas com água esterilizada.

[00313] Compostos de teste e exposição a A $\beta$  1-42 humano:

[00314] Compostos de teste: foram testados os compostos a seguir:

- MR31192;
- MR36014; e
- Donepezil.

[00315] Incubação prévia: no dia 17 de cultivo, os compostos foram dissolvidos no meio de cultivo e previamente incubados com neurônios hipocâmpais primários por uma hora, antes da exposição a A $\beta$  1-42.

[00316] Danos: os neurônios hipocâmpais foram expostos a soluções de A $\beta$  (conforme abaixo) após 17 dias de cultivo. A preparação A $\beta$  1-42 foi realizada seguindo-se o procedimento descrito por Callizot et al (2013), *J. Neurosci. Res.* 91: 706-716. O número de bateladas do A $\beta$  1-42 utilizado neste estudo contém 10% de oligômeros (quantificação por meio de WB conforme realizado em Combes et al (2015), *J. Neurosci. Res.* 93: 633-643). Resumidamente, o peptídeo A $\beta$  1-42 foi dissolvido no meio de cultivo definido mencionado acima, em concentração inicial de 40  $\mu\text{mol/l}$ . Esta solução foi suavemente agitada por três dias a 37 °C no escuro e utilizada imediatamente após diluição adequada em meio de cultivo até as concentrações utilizadas (20  $\mu\text{mol/l}$  ou 2,5  $\mu\text{mol/l}$  correspondentes a 2  $\mu\text{mol/l}$  ou 0,25  $\mu\text{mol/l}$  de oligômeros (A $\beta$ O), respectivamente). Adicionou-se preparação de A $\beta$  1-42 até concentração final de 20 ou 2,5  $\mu\text{mol/l}$  (respectivamente, 2  $\mu\text{mol/l}$  ou 0,25  $\mu\text{mol/l}$  de A $\beta$ O, determinados por meio de WB automático) diluída em meio controle na presença dos compostos.

#### **AVALIAÇÃO DE OBJETIVOS:**

[00317] Em 24 horas após a intoxicação, os sobrenadantes foram retirados e imediatamente congelados para testes analíticos futuros. Eles foram mantidos a -20 °C por até seis meses. Os neurônios hipocâmpais foram fixados em seguida por uma solução fria de etanol (95%) e ácido acético (5%) por cinco minutos a -20 °C. Eles foram lavados novamente por duas vezes em PBS, permeabilizados em seguida e os locais não específicos foram bloqueados utilizando solução de PBS contendo 0,1% de saponina e 1% de FCS por 15 minutos à temperatura ambiente.

[00318] Imunomanchas: MAP-2 / AT100 – após fixação e permeabilização, as células foram incubadas por duas horas com:

- um anticorpo policlonal de galinha antiproteína associada a microtúbulos 2 (MAP-2) em diluição de 1/1000 em PBS contendo 1% de soro de

feto bovino e 0,1% de saponina (esse anticorpo mancha especificamente corpos celulares e neurites, permitindo o estudo da morte de células neuronais e da rede de neurites); e

- um anticorpo monoclonal de camundongo antifosfo Tau (AT100) em diluição de 1/100 em PBS que contém 1% de soro de feto bovino e 0,1% de saponina.

[00319] Esses anticorpos foram revelados com anti-IgG de camundongo de cabra Alexa Flúor 488 e anti-IgG de galinha de cabra Alexa Flúor 568 em diluição 1/400 em PBS contendo 1% de FCS e 0,1% de saponina por uma hora à temperatura ambiente.

[00320] Para cada condição, 30 fotografias (que representam toda a área da cavidade) por cavidade foram tomadas utilizando ImageXpress® (Molecular Devices) com ampliação de 20x. Todas as imagens foram geradas utilizando os mesmos parâmetros de obtenção. A partir das imagens, análises foram realizadas direta e automaticamente utilizando Custom Module Editor® (Molecular Devices). Foram pesquisadas as leituras a seguir:

- número total de neurônios (sobrevivência de neurônios, número de neurônios positivos para MAP-2);
- rede de neurites (em  $\mu\text{m}$  de neurônios positivos para MAP-2); e
- área de AT100 ( $\mu\text{m}^2$ , sobrepostos com neurônios positivos para MAP-2).

[00321] Imunomanchas: PSD95 e SYN – após fixação e permeabilização, as células foram incubadas por duas horas com:

- um anticorpo monoclonal de camundongo antipós-sináptico com densidade de 95 kDa (PSD95) em diluição de 1/200 em PBS que contém 1% de soro de feto bovino e 0,1% de saponina; e
- um anticorpo policlonal de coelho antissinaptofisina (SYN)

em diluição de 1/100 em PBS contendo 1% de soro de feto bovino e 0,1% de saponina.

[00322] Esses anticorpos foram revelados com anti-IgG de camundongo de cabra Alexa Fluor 488 e anti-IgG de coelho de cabra Alexa Fluor 568 em diluição 1/400 em PBS contendo 1% de FCS e 0,1% de saponina por uma hora à temperatura ambiente.

[00323] Para cada condição, 40 fotografias por cavidade foram tomadas utilizando ImageXpress (Molecular Devices) com ampliação de 40x. Todas as imagens foram tomadas com as mesmas condições. A avaliação das sinapses foi realizada automaticamente utilizando Custom Module Editor® (Molecular Devices). Foram determinados os objetivos a seguir:

- número de sinapses (sobreposição entre PSD95/SYN).

[00324] Análise estatística:

[00325] Todos os valores são expressos na forma de média +/- desvio padrão. Realizou-se análise estatística por meio de ANOVA de uma via, seguido por teste de Dunnett ou LSD de Fisher.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

[00326] Resultados:

[00327] Como se pode observar nas Figuras 9 e 10, o composto MR31192 é ativo até concentração de 500 pM (sobrevivência e rede de neurites, vide as Figuras 9A, B e C) e redução significativa de hiperfosforilação de Tau (vide a Figura 9D) também é observada a 100 pM. Observa-se ainda efeito neuroprotetor sobre as sinapses a 500 pM (vide a Figura 10).

[00328] Consequentemente, o composto MR31192 é eficiente em doses muito baixas, particularmente em doses abaixo de 100 nM (100 pM a 500 pM). Nessas doses muito baixas, o MR31192 exibe efeito neuroprotetor similar ao observado com Donepezil, mas a 1  $\mu$ M.

[00329] Como se pode observar nas Figuras 11 e 12, o composto

MR36014 (análogo de flúor de MR31192) exibe perfil neuroprotetor similar ao obtido com MR31192 em doses nanomolares. Observou-se ainda efeito neuroprotetor em doses picomolares. Este efeito é particularmente significativo para sobrevivência e rede de neurites (vide as Figuras 11A, B e C) e para hiperfosforilação de Tau (vide a Figura 11D). O efeito sobre as sinapses é significativo até concentração de 50 pM (vide a Figura 12). Nessas doses muito baixas, MR36014 exibe efeito neuroprotetor quase equivalente ao observado com Donepezil, mas a 1  $\mu$ M.

[00330] Consequentemente, os dois compostos são ativos em doses muito baixas (em doses nanomolares e em doses picomolares), o que é particularmente interessante para evitar potencial toxicidade e/ou efeitos colaterais.

#### **EXEMPLO 6**

[00331] Este exemplo exibe os efeitos neuroprotetores de MR36014 e MR33583 sobre neurônios positivos para TH dopaminérgicos lesionados com MPP<sup>+</sup>.

[00332] Mal de Parkinson (PD) é um distúrbio dos movimentos neurodegenerativo comum que afeta cerca de 1% da população com idade acima de 70 anos. É a segunda doença neurodegenerativa mais comum, depois do mal de Alzheimer. Os pacientes que sofrem de PD exibem sintomas de instabilidades motoras com tremores em repouso como primeiro sintoma em 70% dos casos. Outros sintomas clínicos são rigidez, bradiquinesia e instabilidade da postura, frequentemente incluindo enfraquecimento cognitivo, depressão e distúrbios do sono.

[00333] Embora os mecanismos patológicos que geram degeneração de substância negra (SN) possam ser muitos, diversos processos são considerados principais: agregação de proteínas ligada a enfraquecimentos proteassomais, distúrbios mitocondriais (também causados por toxinas de DA

específicas) e enfraquecimento da liberação de dopamina (DA).

[00334] Conforme confirmado por Dauer e Przedborski (2003), *Neuron* 39: 889-909, toxinas específicas de neurônios dopaminérgicos (toxinas de DA), particularmente 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP, a pró-droga da neurotoxina MPP<sup>+</sup>), 6-hidroxidopamina (6-OHDA) ou rotenona, causam parkinsonismo em seres humanos. Essas toxinas são muito utilizadas por cientistas para imitar experimentalmente a patologia em animais. Qualquer substância redutora da neurotoxicidade de toxina de DA pode ser útil como agente terapêutico novo para o tratamento ou prevenção de PD.

[00335] O objeto do presente estudo foi de investigar o efeito neuroprotetor de MR36014 e MR33583 (em quatro concentrações) sobre neurônios positivos para TH dopaminérgicos lesionados com MPP<sup>+</sup>. Os compostos de teste foram previamente incubados por uma hora antes da aplicação de MPP<sup>+</sup> (4 µM por 48 horas). O efeito neuroprotetor (sobrevivência e rede de neurites) de compostos de teste foi pesquisado. Além disso, o efeito sobre o acúmulo de alfa-sinucleína citoplasmático foi estudado.

[00336] Materiais e método:

[00337] Cultivo primário de neurônios mesencefálicos:

[00338] Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com o Guia de Uso e Cuidados com Animais de Laboratório do National Institutes of Health e seguiram as regulamentações atuais da União Europeia (Norma 2010/63/EU). Número do contrato: A1301310.

[00339] Neurônios dopaminérgicos de ratos foram cultivados conforme descrito por Callizot et al (2019), *PLoS One* 14: e0215277 e Visanji et al (2008), *FASEB J.* 22: 2488-2497. Resumidamente, fêmeas de ratos grávidas (Wistar) com 15 dias de gestação foram mortas utilizando anestesia profunda com câmara de CO<sub>2</sub> e deslocamento da cervical. Os mesencéfalos obtidos de embriões de ratos com 15 dias de idade (Janvier, França) foram dissecados sob

microscópio. Os mesencéfalos embriônicos foram removidos e colocados em meio gelado de Leibovitz (L15) contendo 2% de penicilina-estreptomicina (PS) e albumina de soro bovino a 1% (BSA). A parte ventral da flexão mesencefálica, região do cérebro em desenvolvimento rica em neurônios dopaminérgicos, foi utilizada para as preparações celulares.

[00340] Os mesencéfalos foram dissociados por meio de tripsinação por 20 minutos a 37 °C (solução em concentração final de 0,05% de tripsina e 0,02% de EDTA). A reação foi suspensa por meio da adição de meio Eagle modificado da Dulbecco (DMEM) contendo DNase I grau II (0,5 mg/ml) e soro de feto bovino a 10% (FCS). As células foram dissociadas mecanicamente por três passagens através de uma pipeta de 10 ml. As células foram centrifugadas em seguida a 180 x g por 10 min a 4 °C sobre uma camada de BSA (3,5%) em meio L15. O sobrenadante foi descartado e as pelotas celulares foram novamente suspensas em meio de cultivo definido que consiste em neurobasal suplementado com B27 (2%), L-glutamina (2 mM), solução de PS a 2%, 10 ng/ml de fator neurotrófico cerebral (BDNF) e 1 ng/ml de fator neurotrófico derivado de glial (GDNF). Células viáveis foram contadas em um citômetro de Neubauer, utilizando o teste de exclusão de azul de tripano. As células foram semeadas em densidade de 40.000 células/cavidade em placas com 96 cavidades (previamente revestidas com poli-L-lisina) e mantidas em uma incubadora umidificada a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>/95% de ar. A metade do meio foi alterada a cada dois dias com meio novo.

[00341] Resumindo, no dia 6 de cultivo, o meio foi removido e adicionou-se meio novo, com ou sem compostos de teste e com ou sem MPP<sup>+</sup> por 48 horas diluídos em meio controle. Foram avaliadas seis cavidades por condição.

[00342] Compostos de teste e exposição de MPP<sup>+</sup>:

[00343] Incubação prévia: no dia 6 de cultivo, os compostos foram

diluídos no meio de cultivo e previamente incubados com neurônios dopaminérgicos primários por uma hora, antes da exposição a MPP<sup>+</sup>.

[00344] Danos: em uma hora após compostos de teste, MPP<sup>+</sup> foi adicionado a uma concentração final de 4 µM, diluído em meio de cultivo na presença de compostos por 48 horas.

[00345] Organização de placas de cultivo:

[00346] Compostos de teste foram testados em uma placa com 96 cavidades (n = 6 cavidades de cultivo por condição). MR36014 e MR33583 foram previamente incubados por uma hora antes da intoxicação com MPP<sup>+</sup>. Foram determinadas as condições a seguir:

<b>PLACA 1 (TH/α-syn)</b>
Controle (veículo)
+ MPP <sup>+</sup> (4 µM, 48 h) / veículo
+ MPP <sup>+</sup> (4 µM, 48 h) / MR36014 500 pM
+ MPP <sup>+</sup> (4 µM, 48 h) / MR36014 1 nM
+ MPP <sup>+</sup> (4 µM, 48 h) / MR36014 5 nM
+ MPP <sup>+</sup> (4 µM, 48 h) / MR36014 10 nM
+ MPP <sup>+</sup> (4 µM, 48 h) / MR33583 500 pM
+ MPP <sup>+</sup> (4 µM, 48 h) / MR33583 1 nM
+ MPP <sup>+</sup> (4 µM, 48 h) / MR33583 5 nM
+ MPP <sup>+</sup> (4 µM, 48 h) / MR33583 10 nM

[00347] Avaliação de objetivos:

[00348] Após 48 horas de intoxicação, os sobrenadantes de cultivo celular foram retirados e imediatamente congelados para análises futuras. As células foram fixadas por uma solução de paraformaldeído a 4% em PBS, pH = 7,3 por 20 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas por duas vezes em PBS. Realizou-se permeabilização da membrana celular e bloqueio de

locais não específicos utilizando uma solução de PBS contendo 0,1% de saponina e 1% de FCS por 15 minutos à temperatura ambiente.

[00349] Imunomanchas: TH e  $\alpha$ -syn – os cultivos foram incubados com:

- anticorpo monoclonal antitirosina hidroxilase (THF) produzido em camundongos em diluição de 1/10.000 em PBS contendo 1% de FCS e 0,1% de saponina por duas horas à temperatura ambiente; e
- anticorpo policlonal antialfa sinucleína ( $\alpha$ -syn) produzido em coelhos sob diluição de 1/200 em PBS contendo 1% de FCS e 0,1% de saponina por duas horas à temperatura ambiente.

[00350] Esses anticorpos foram revelados com anti-IgG de camundongo de cabra Alexa Flúor 488 em diluição 1/800 e anti-IgG de coelho de cabra Alexa Flúor 568 em diluição 1/400 em PBS contendo 1% de FCS e 0,1% de saponina por uma hora à temperatura ambiente.

[00351] Análise computadorizada automática: para cada condição, 20 fotografias (que representam a área total da cavidade) são automaticamente tomadas utilizando ImageXpress® (Molecular Devices) em ampliação de 10x (20 fotografias) utilizando os mesmos parâmetros de obtenção. A partir das imagens, análises foram realizadas direta e automaticamente utilizando Custom Module Editor® (Molecular Devices). Foram medidas as leituras a seguir:

- análise do número total de neurônios TH (neurônios positivos para TH);
- rede de neurites total de neurônios positivos para TH (em  $\mu\text{m}$ ); e
- agregação de  $\alpha$ -syn (área de sobreposição entre TH e manchas de  $\alpha$ -syn, em  $\mu\text{m}^2$ ).

[00352] Análise estatística:

[00353] Todos os valores são expressos na forma de média +/-

desvio padrão. Realizou-se análise estatística por meio de ANOVA de uma via, seguido por teste de Dunnett ou LSD de Fisher.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

[00354] Resultados:

[00355] Efeito de MR36014 sobre a sobrevivência, rede de neurites e agregação de  $\alpha$ -syn de neurônios TH após lesão com MPP<sup>+</sup>:

[00356] A aplicação de MPP<sup>+</sup> induziu clara neurotoxicidade sobre neurônios dopaminérgicos, conforme observado por sobrevivência reduzida (Figura 13A), perda da rede de neurites (Figura 13B) e acúmulo patológico de  $\alpha$ -syn (Figura 13C) conforme exibido anteriormente (Callizot et al (2019), *PLoS One* 14: e0215277).

[00357] A aplicação de MR36014 apresentou forte efeito neuroprotetor geral sobre neurônios TH, pois esse composto aumentou a sobrevivência de neurônios TH (de 1 nM para 10 nM), protegeu sua rede de neurites (todas as doses pesquisadas) e reduziu o acúmulo de  $\alpha$ -syn (todas as doses pesquisadas).

[00358] Efeito de MR33583 sobre a sobrevivência, rede de neurites e agregação de  $\alpha$ -syn de neurônios TH após lesão com MPP<sup>+</sup>:

[00359] Após lesão de MPP<sup>+</sup>, MR33583 aumentou a sobrevivência neuronal (100 nM, vide a Figura 14A) e protegeu parcialmente a rede de neurites (de 10 nM para 100 nM, vide a Figura 14B). Observou-se também efeito positivo de MR33583 sobre a agregação de  $\alpha$ -syn (50 nM e 100 nM, vide a Figura 14C).

[00360] Análise:

[00361] O objeto do estudo foi pesquisar os efeitos neuroprotetores de MR36014 e MR33583 em um modelo *in vitro* de mal de Parkinson.

[00362] Este estudo demonstra que:

- os dois compostos combatem a toxicidade de MPP<sup>+</sup> sobre neurônios dopaminérgicos;

- MR36014 é mais potente que MR33583, pois esse composto exibiu eficácia mais alta sobre a promoção da sobrevivência de neurônios TH; e

- MR36014 foi ativo em doses mais baixas que MR33583.

[00363] Por fim, este estudo demonstrou que MR36014 e MR33583 são possíveis drogas interessantes para mal de Parkinson e MR36014 é mais ativo que MR33583.

### **EXEMPLO 7**

[00364] Este exemplo descreve a avaliação de efeitos neuroprotetores de compostos MR36014 e MR33583 sobre neurônios corticais primários de ratos após lesão por glutamato.

[00365] O sistema glutamatérgico e, particularmente, os receptores de NMDA (receptores glutamatérgicos) possuem papel importante nos processos de aprendizado e memória. A plasticidade sináptica pode ser regulada por meio de sinalização de receptores de NMDA. Ativação excessiva de receptores de NMDA e excitotoxicidade glutamatérgica, entretanto, é uma característica patológica comum em doenças neurodegenerativas (Lewerenz e Maher (2015), *Front Neurosci.* 9: 469).

[00366] A excitotoxicidade de glutamato foi relacionada a lesões neurológicas agudas de isquemia e lesões cerebrais traumáticas e na neurodegeneração crônica em mal de Alzheimer (AD) e mal de Huntington (HD). A morte neuronal excitotóxica por meio de ativação excessiva de NMDAR contribui para o fluxo excessivo de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) para a célula. Isso aciona uma série de reações que resultam em morte celular, incluindo maior tensão oxidativa, ativação inadequada de proteases tais como calpaína, desregulação de processos relativos a  $Ca^{2+}$ , lesões mitocondriais e uma cascata apoptótica.

[00367] Desta forma, tratamento farmacológico inicial com substâncias redutoras da excitotoxicidade de glutamato, poderá representar

opção muito boa para aumentar a sobrevivência neuronal (e aumentar a função cognitiva) e poderá representar interessante estratégia terapêutica para pacientes diagnosticados com mal de Alzheimer (Wang e Reddy (2017), *J. Alzheimers Dis.* 57: 1041-1048).

[00368] O presente estudo determina o efeito neuroprotetor de MR36014 e MR33583 (em quatro concentrações) em neurônios corticais primários de ratos após lesão por glutamato. Os compostos de teste foram previamente incubados por uma hora antes da aplicação de glutamato (20  $\mu$ M por 20 minutos). O efeito neuroprotetor (sobrevivência e rede de neurites) de compostos de teste foi pesquisado.

[00369] Materiais e método:

[00370] Cultivo primário de neurônios corticais:

[00371] Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com o Guia de Uso e Cuidados com Animais de Laboratório do National Institutes of Health e seguiram as regulamentações atuais da União Europeia (Norma 2010/63/EU). Número do contrato: A1301310.

[00372] Neurônios corticais de ratos foram cultivados conforme descrito por Callizot et al (2013), *J. Neurosci. Res.* 91: 706-716. Fêmeas de ratos grávidas (Wistar) com 15 dias de gestação foram mortas utilizando anestesia profunda com câmara de CO<sub>2</sub> e deslocamento da cervical. Resumidamente, os fetos foram coletados e imediatamente colocados em meio Leibovitz L15 gelado com uma solução de 2% de penicilina (10.000 U/ml) e estreptomicina (10 mg/ml) (PS) e 1% de albumina de soro bovino (BSA). O córtex foi tratado por 20 minutos a 37 °C com uma solução de tripsina-EDTA em concentração final de 0,05% de tripsina e 0,02% de EDTA. A dissociação foi suspensa por meio da adição de meio Eagle modificado da Dulbecco (DMEM) com 4,5 g/l de glicose, que contém DNase I grau II (concentração final de 0,5 mg/ml) e 10% de soro de feto bovino (FCS). As células foram dissociadas mecanicamente por três passagens

forçadas através da ponta de uma pipeta de 10 ml. As células foram centrifugadas a 515 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a pelota foi novamente suspensa em meio de cultivo definido que consiste em meio neurobasal com solução a 2% de suplemento B27, 2 mmol/l de L-glutamina, 2% de solução de PS e 10 ng/ml de fator neurotrófico cerebral (BDNF). Células viáveis foram contadas em um citômetro de Neubauer, utilizando o teste de exclusão de azul de tripano.

[00373] As células foram semeadas em densidade de 25.000 por cavidade em placas com 96 cavidades previamente revestidas com poli-L-lisina e cultivadas a 37 °C em um incubador de ar (95%)-CO<sub>2</sub> (5%).

[00374] Para evitar o efeito de extremidades, as primeira e última colunas, bem como as primeira e última linhas da placa, não foram utilizadas no estudo. Cavidades vazias foram preenchidas com água.

[00375] O meio foi alterado a cada dois dias. Os neurônios corticais foram lesionados com soluções de A $\beta$  (conforme abaixo) após 11 dias de cultivo.

[00376] Compostos de teste e exposição de glutamato:

[00377] Incubação prévia: no dia 13 de cultivo, os compostos foram dissolvidos no meio de cultivo e previamente incubados com neurônios corticais primários por uma hora, antes da exposição a glutamato.

[00378] Danos: uma hora após a incubação do composto de teste, adicionou-se glutamato até concentração final de 20  $\mu$ M diluído em meio de controle, ainda na presença dos compostos de teste por 20 minutos. Após 20 minutos, glutamato foi lavado e meio de cultivo novo com os compostos de teste foi adicionado por mais 48 horas.

[00379] Organização de placas de cultivo:

[00380] Compostos de teste foram testados em uma placa com 96 cavidades (n = 6 cavidades de cultivo por condição). Foram determinadas as condições a seguir:

<b>PLACA 1 (MAP-2)</b>
Controle (veículo)
+ Glutamato (20 $\mu$ M, 20 min) / veículo
+ Glutamato (20 $\mu$ M, 20 min) / MR36014 500pM
+ Glutamato (20 $\mu$ M, 20 min) / MR36014 1 nM
+ Glutamato (20 $\mu$ M, 20 min) / MR36014 5 nM
+ Glutamato (20 $\mu$ M, 20 min) / MR36014 10 nM
+ Glutamato (20 $\mu$ M, 20 min) / MR33583 1 nM
+ Glutamato (20 $\mu$ M, 20 min) / MR33583 10 nM
+ Glutamato (20 $\mu$ M, 20 min) / MR33583 50 nM
+ Glutamato (20 $\mu$ M, 20 min) / MR33583 100 nM

[00381] Avaliação de objetivos:

[00382] Imunomanchas: MAP-2 (sobrevivência e rede de neurites)

– em 48 horas após a intoxicação, os sobrenadantes de cultivo celular foram retirados e imediatamente congelados para análises futuras. Células foram fixadas por uma solução fria de etanol (95%) e ácido acético (5%) por cinco minutos a -20 °C. As células foram lavadas por duas vezes em PBS. As células foram permeabilizadas e locais de ligação não específicos foram bloqueados com uma solução de PBS contendo 0,1% de saponina e 1% de FCS por 15 minutos à temperatura ambiente.

[00383] Os cultivos foram incubados por duas horas com um anticorpo monoclonal de camundongo antiproteína associada a microtúbulos 2 (MAP-2), em diluição de 1/400, em PBS contendo 1% de soro de feto bovino e 0,1% de saponina. Este anticorpo foi revelado com anti-IgG de camundongo de cabra Alexa Flúor (diluição 1/400) em PBS contendo 1% de FCS e 0,1% de saponina por uma hora à temperatura ambiente. MAP-2 é um marcador neuronal presente nos corpos celulares e neurites de neurônios, que permitem o estudo

da sobrevivência neuronal e do comprimento da rede de neurites.

[00384] Análise computadorizada automática – para cada condição, 30 fotografias (que representam toda a área da cavidade) por cavidade foram tomadas utilizando ImageXpress® (Molecular Devices) com ampliação de 20x. Todas as imagens serão geradas utilizando os mesmos parâmetros de obtenção. A partir das imagens, análises foram realizadas direta e automaticamente utilizando Custom Module Editor® (Molecular Devices).

[00385] Serão pesquisadas as leituras a seguir:

- sobrevivência total de neurônios (positivo para MAP-2, número) (os dados serão expressos em número médio de neurônios de 30 fotografias por cavidade); e
- a rede total de neurites (MAP-2 em  $\mu\text{m}$ ) (os dados serão expressos em média de neurônios de 30 fotografias por cavidade).

[00386] Análise estatística:

[00387] Todos os valores são expressos na forma de média +/- desvio padrão. Realizou-se análise estatística por meio de ANOVA de uma via, seguido por teste de Dunnett ou LSD de Fisher.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

[00388] Resultados:

[00389] Efeitos de MR36014 e MR33583 sobre neurônios corticais lesionados com glutamato:

[00390] A lesão glutamatérgica induziu perda de neurônios corticais (Figuras 15A e 15C; 32% da morte neuronal) e contração da rede de neurites total (Figuras 15B e 15D; 38% de perda de neurites).

[00391] Sobrevivência dos neurônios: MR36014, adicionado uma hora antes de glutamato e mantido por 48 horas após a aplicação de glutamato, protegeu significativamente os neurônios corticais contra a morte a 1 nM (vide a Figura 15A). Sob as mesmas condições experimentais, MR33583 protegeu

significativamente os neurônios corticais da morte a 50 nM e 100 nM (vide a Figura 15C).

[00392] Rede de neurites: todas as concentrações testadas de MR36014 (500 pM a 10 nM) protegeram significativamente a rede de neurites com efeito máximo a 1 nM (vide a Figura 15B). MR33583 protegeu significativamente a rede de neurites de 1 nM a 100 nM. O efeito seguiu uma curva com forma de sino com efeito máximo a 50 nM (vide a Figura 15D).

[00393] Análise:

[00394] O objetivo do estudo foi pesquisar os efeitos neuroprotetores de MR36014 e MR33583 em um modelo *in vitro* de tensão neuronal induzida por excitotoxicidade glutamatérgica. A tensão glutamatérgica é uma característica patológica presente em diferentes doenças neurológicas, incluindo mal de Alzheimer e isquemia cerebral.

[00395] Segundo os resultados do estudo, pode-se concluir que:

- os dois compostos combatem a toxicidade de glutamato sobre neurônios corticais; e
- MR36014 e MR33583 exibiram eficácia similar, embora MR36014 fosse ativo em dose inferior (sobre a sobrevivência neuronal).

[00396] Por fim, este estudo demonstra que MR36014 e MR33583 são drogas interessantes para doenças neurológicas que envolvem tensão glutamatérgica.

### **EXEMPLO 8**

[00397] Este exemplo descreve a avaliação de efeitos neuroprotetores de MR36014 e MR33583 sobre neurônios corticais primários de ratos após lesão por glutamato.

[00398] Esclerose lateral amiotrófica (ALS) é um distúrbio fatal caracterizado pelo início sutil de fraqueza focal, tipicamente nos membros, mas às vezes em músculos bulbares, que progride para paralisia de quase todos os

músculos do esqueleto. Existe sobreposição genética e clínico-patológica significativa entre ALS e demência lobular frontotemporal (FTLD). Em ALS, morte de paralisia respiratória ocorre tipicamente em até cinco anos. A patologia celular é focal no início e difunde-se em padrão que sugere envolvimento sucessivo de populações neuronais contíguas. A morte de motoneurônios ocorre em conjunto com a deposição de proteínas agregadas em motoneurônios e oligodendrócitos e neuroinflamação.

[00399] A patofisiologia complexa de ALS apresenta muitos alvos terapêuticos potenciais. Embora ampla variedade de agentes tenha sido pesquisada, apenas Riluzol (Rilutek®), uma droga antiglutamatérgica, demonstrou benefício constante e é a única droga aprovada para o tratamento da doença. Os benefícios de Riluzol, entretanto, são pequenos – ele prolonga a sobrevivência de pacientes com ALS por vários meses (cerca de 7%) com efeito mínimo sobre as medidas funcionais.

[00400] Embora os processos moleculares precisos que causam a morte de neurônios motores em ALS permaneçam desconhecidos, alguns mecanismos possíveis incluem (a) excitotoxicidade mediada por glutamato; (b) redução de fatores neurotróficos (BDNF, GDNF etc.); (c) alterações mitocondriais e lesões oxidativas; e (d) anormalidades em proteínas do citoesqueleto que resultam em atrofia neuronal e morte.

[00401] Demonstrou-se que TDP-43 (proteína de ligação de DNA de elemento de reação de transativação com 43 kDa) acumula-se em citoplasma de neurônios motores na maior parte dos casos de ALS. TDP43 é uma proteína de ligação de RNA nuclear envolvida em diversos aspectos de processamento de RNA que trafega ativamente entre o núcleo e o citoplasma.

[00402] O objeto do presente estudo foi avaliar os efeitos de MR36014 e MR33583 (em quatro concentrações) sobre neurônio motor espinhal primário (MN) após lesão de glutamato.

[00403] Materiais e método:

[00404] Cultivo primário de neurônios motores espinhais:

[00405] Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com o Guia de Uso e Cuidados com Animais de Laboratório do National Institutes of Health e seguiram as regulamentações atuais da União Europeia (Norma 2010/63/EU). Número do contrato: A1301310.

[00406] Neurônios motores (MNs) da medula espinhal de ratos foram cultivados conforme descrito por Martinou et al (1992), *Neuron*. 8: 737-744 e Wang et al (2013), *Hum. Mol. Genet.* 22: 4706-4719. Resumidamente, fêmeas de ratos grávidas com 14 dias de gestação (Ratos Wistar; Janvier Labs, França) foram mortas utilizando anestesia profunda com câmara de CO<sub>2</sub> e deslocamento da cervical. Os fetos foram removidos em seguida do útero e imediatamente colocados em meio Leibovitz L15 gelado com uma solução de 2% de penicilina (10.000 U/ml) e estreptomicina (10 mg/ml) (PS) e 1% de albumina de soro bovino (BSA).

[00407] A medula espinhal foi tratada por 20 minutos a 37 °C com uma solução de tripsina-EDTA em concentração final de 0,05% de tripsina e 0,02% de EDTA. A dissociação foi suspensa por meio da adição de meio Eagle modificado da Dulbecco (DMEM) com 4,5 g/l de glicose, que contém DNase I de grau II (concentração final de 0,5 mg/ml) e 10% de soro de feto bovino (FCS). As células foram dissociadas mecanicamente por três passagens forçadas através da ponta de uma pipeta de 10 ml. As células foram centrifugadas em seguida a 515 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a pelota foi novamente suspensa em meio de cultivo definido que consiste em meio neurobasal com solução a 2% de suplemento B27, 2 mmol/l de L-glutamina, 2% de solução de PS e 10 ng/ml de fator neurotrófico cerebral (BDNF). Células viáveis foram contadas em um citômetro de Neubauer, utilizando o teste de exclusão de azul de tripano. As células foram semeadas em densidade de

20.000 por cavidade em placas com 96 cavidades previamente revestidas com poli-L-lisina e cultivadas a 37 °C em um incubador de ar (95%)-CO<sub>2</sub> (5%).

[00408] O meio foi alterado a cada dois dias. As cavidades das primeiras linhas e colunas não foram utilizadas para cultivo (para evitar efeito de extremidades) e preenchidas com água estéril. Os neurônios motores foram lesionados com glutamato após 13 dias de cultivo.

[00409] Compostos de teste e exposição de glutamato:

[00410] Incubação prévia: no dia 13 de cultivo, os compostos foram dissolvidos no meio de cultivo e previamente incubados com neurônios corticais primários por uma hora, antes da exposição a glutamato.

[00411] Lesão por glutamina: No dia 13 de cultivo e após uma hora de incubação prévia, adicionou-se glutamato até concentração final de 5 µM diluídos em meio de controle, ainda na presença dos compostos por 20 minutos. Após 20 minutos, glutamato foi lavado e meio de cultivo novo com os compostos foi adicionado por mais 24 horas.

[00412] Organização de placas de cultivo:

[00413] Compostos de teste foram testados em uma placa com 96 cavidades (n = 6 cavidades de cultivo por condição).

[00414] Foram determinadas as condições a seguir:

<b>PLACA 1 (MAP-2 / TDP-43) neurônios motores</b>
Controle (veículo)
+ Glutamato (5 µM, 20 min) / veículo
+ Glutamato (5 µM, 20 min) / MR36014 (500 pM)
+ Glutamato (5 µM, 20 min) / MR36014 (1 nM)
+ Glutamato (5 µM, 20 min) / MR36014 (5 nM)
+ Glutamato (5 µM, 20 min) / MR36014 (10 nM)
+ Glutamato (5 µM, 20 min) / MR33583 (1 nM)

<b>PLACA 1 (MAP-2 / TDP-43) neurônios motores</b>
+ Glutamato (5 µM, 20 min) / MR33583 (10 nM)
+ Glutamato (5 µM, 20 min) / MR33583 (50 nM)
+ Glutamato (5 µM, 20 min) / MR33583 (10 nM)

[00415] Avaliação de objetivos:

[00416] Em 24 horas após a intoxicação, os sobrenadantes foram retirados e imediatamente congelados para análise futura. As células foram fixadas por uma solução fria de etanol (95%) e ácido acético (5%) por cinco minutos a -20 °C. Após permeabilização com 0,1% de saponina, as células foram incubadas por duas horas com:

- um anticorpo monoclonal de camundongo antiproteína associada a microtúbulos 2 (MAP-2) em diluição de 1/400 em PBS que contém 1% de soro de feto bovino e 0,1% de saponina. Este anticorpo foi revelado com anti-IgG de camundongo de cabra Alexa Flúor 488 na diluição 1/400 em PBS contendo 1% de FCS e 0,1% de saponina por uma hora à temperatura ambiente;

e

- um anticorpo policlonal de coelho antiproteína de ligação de DNA TAR nuclear 43 (TDP-43) em diluição de 1/100 em PBS contendo 1% de soro de feto bovino e 0,1% de saponina. O anticorpo TDP-43 foi revelado com antiovelho de cabra Alexa Flúor 568 sob diluição de 1/400 em PBS contendo 1% de FCS e 0,1% de saponina por uma hora à temperatura ambiente.

[00417] Para cada condição, 30 fotografias (que representam toda a área da cavidade) por cavidade foram tomadas automaticamente utilizando ImageXpress® (Molecular Devices) com ampliação de 20x, utilizando os mesmos parâmetros de obtenção. A partir das imagens, análises foram realizadas direta e automaticamente utilizando Custom Module Editor® (Molecular Devices).

[00418] Análise de objetos:

[00419] Foram determinados automaticamente os objetivos a seguir:

- análise da sobrevivência de neurônios (manchas de MAP-2, número de neurônios);
- análise da rede de neurites (manchas de MAP-2, comprimento total de neurites em  $\mu\text{m}$ );
- análise de rede de neurites/neurônios (rede neuronal/número de neurônios MAP2); e
- análise de TDP-43 citoplasmático em neurônios positivos para MAP-2 (sobreposição entre MAP-2 e TDP-43 citoplasmático em  $\mu\text{m}^2$ ).

[00420] Análise estatística:

[00421] Todos os valores são expressos na forma de média +/- desvio padrão. Realizou-se análise estatística por meio de ANOVA de uma via, seguido por teste LSD de Fisher.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

[00422] Resultados:

[00423] Efeitos de MR36014 em cultivo primário de neurônios motores espinhais lesionados com glutamato:

[00424] Sobrevivência dos neurônios: perda de neurônios motores espinhais MAP-2 grandes seguiu-se à aplicação de glutamato (42% de morte neuronal) (Figura 16A). A 500 pM e 1 nM, MR36014 aumentou significativamente a sobrevivência dos neurônios motores espinhais.

[00425] Rede de neurites: a rede de neurites foi severamente reduzida mediante lesão de glutamato (perda de neurites de 46%, Figura 16B). MR36014 protegeu significativamente a rede de neurites a 500 pM e 1 nM. O comprimento da rede de neurites é proporcional ao número de neurônios. A razão “comprimento de rede de neurites” / “número de neurônios” foi calculada para estimar o comprimento médio de neurite por neurônio. A razão não foi modificada por MR36014 (Figura 16C).

[00426] Efeitos de MR33583 em cultivo primário de neurônios motores espinhais lesionados com glutamato:

[00427] Sobrevivência dos neurônios: conforme exibido na Figura 17, perda de neurônios motores espinhais MAP-2 grandes seguiu-se à aplicação de glutamato (Figura 17A). MR33583 (adicionado em uma hora antes de glutamato e mantido por 24 horas após a lesão) exerceu efeito neuroprotetor dependente da dosagem (10 a 100 nM).

[00428] Rede de neurites: conforme exibido na Figura 17, a rede de neurites foi severamente reduzida mediante lesão de glutamato (Figura 17B). MR33583 protegeu significativamente a rede de neurites de 10 nM a 100 nM, de forma dependente de dosagem. A razão não foi modificada por MR36014 (Figura 17C).

[00429] TDP43: na dose mais alta, MR33583 (100 nM) reduziu o sinal de TDP43 no citoplasma de neurônios motores espinhais (Figura 17D).

[00430] Análise:

[00431] O objeto deste estudo foi determinar os efeitos neuroprotetores de dois compostos, MR36014 e MR33583, em um modelo *in vitro* de esclerose lateral amiotrófica, com base em cultivo primário de neurônios motores da medula espinhal lesionados com glutamato.

[00432] Os resultados deste estudo indicam que:

- MR36014 forneceu efeitos neuroprotetores a 500 pM e 1 nM, pois aumentou a sobrevivência neuronal e protegeu a rede de neurites; e
- MR33583 exibiu claros efeitos neuroprotetores sobre todos os parâmetros (sobrevivência neuronal, preservação da rede de neurites e acúmulo de TDP43 citoplasmático).

[00433] Em conjunto, estes resultados indicam que MR36014 e MR33583 foram capazes de mediar a neuroproteção sobre neurônios motores da medula espinhal e são possíveis drogas potenciais para esclerose lateral

amiotrófica.

### **EXEMPLO 9**

[00434] Este exemplo exhibe a avaliação de efeitos neuroprotetores de MR33583 sobre neurônios GABAérgicos primários de ratos sob esgotamento de fator de crescimento.

[00435] HD (mal de Huntington) é uma doença neurodegenerativa hereditária dominante autossomal que afeta cerca de 4-10 em 10.000 na comunidade caucasiana. O cérebro HD é caracterizado pela perda de MSNs (neurônios espinhais médios) do estriato, expansão dos ventrículos e contração correspondente do córtex sobrejacente. As células GABAérgicas (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) são o tipo de células neuronais mais populoso do estriato (90-95% em ratos e mais de 85% em seres humanos), em conjunto com diversas populações pequenas de interneurônios (Wictorin (1992), *Prog. Neurobiol.* 38: 611-639). MSNs são caracterizados pela sua expressão de enzima GAD64. Eles recebem a maior parte das entradas para o estriato, recebendo aferentes do córtex, tálamo e mesoencéfalo, sendo também o principal neurônio de saída do estriato, que se projeta para diversas regiões do SNC (sistema nervoso central), incluindo o globo pálido e a substância negra. Eles formam, portanto, circuitos neuronais complexos dentro dos gânglios basais que são importantes para o controle de ação, cognição e emoção (Nakano et al (2000), *J. Neurol.* 247 (supl. 5): v1-v15).

[00436] A importância dos fatores de crescimento e sua redução nas doenças neurodegenerativas (tais como AD, PD ou HD) é frequentemente considerada uma das diversas causas dessas patologias. Esgotamento genético e farmacológico de BDNF ou GDNF enfraquece o aprendizado e a memória e causa morte neuronal (Yamada et al (2003), *J. Pharmacol. Sci.* 91: 267-270). O modelo de esgotamento de fator de crescimento foi caracterizado em diversos tipos de células neuronais, tais como cultivo primário de neurônios de roedores

(Atabay et al (1996), *J. Neurosci. Res.* 43: 465-475), células de neuroblastoma SK-N-SH e SH-SY5Y humano (Ba et al (2003), *J. Neurosci. Methods* 123: 11-22; e Russo et al (2004), *Brain Res.* 1009: 40-53).

[00437] Sob essas condições de esgotamento de fator de crescimento, a perda severa de viabilidade deve-se à morte das células apoptóticas, detectada por suprarregulagem significativa dos parâmetros associados apoptóticos, incluindo caspase-3 dividida, PARP e H2A.X. Além disso, demonstrou-se que a expressão de genes e proteínas do Bcl-2 antiapoptótico é infrarregulada, enquanto a do Bax pró-apoptótico foi suprarregulada. Adicionalmente, demonstrou-se que o esgotamento de fator neurotrófico cerebral (BDNF) aciona processos de morte celular por meio da ativação de caspases por aumento da sinalização de p75NTR (Yu et al (2008), *J. Neurosci.* 28: 7467-7475).

[00438] De forma interessante, camundongos *Bdnf*<sup>-/-</sup> também demonstram alterações neuroanatômicas específicas de estrutura e anormalidades comportamentais. Eles exibem densidade espinhal e complexidade dendrítica reduzida no córtex e hipocampo e, até um ponto ainda maior, no estriato, onde 90% das células afetadas são MSNs GABAérgicos (Rauskolb et al (2010), *J. Neurosci.* 30: 1739-1749).

[00439] O objeto deste estudo foi pesquisar o efeito neuroprotetor de MR33583 (em quatro concentrações) em MSN de sobrevivência no estriato após esgotamento do fator de crescimento (esgotamento de BDNF e GDNF), que é um modelo *in vitro* de mal de Huntington.

[00440] Materiais e método:

[00441] Cultivo primário de neurônios GABAérgicos:

[00442] Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com o Guia de Uso e Cuidados com Animais de Laboratório do National Institutes of Health e seguiram as regulamentações atuais da União Europeia (Norma

2010/63/EU). Número do contrato: A1301310.

[00443] MSNs de rato de estriato foram cultivados conforme descrito por Ivkovic et al (1999), *J. Neurosci.* 19: 5409-5419 e Schinelli et al (1988), *J. Neurochem.* 50: 1900-1907. Resumidamente, fêmeas de ratos grávidas com 15 dias de gestação foram mortas utilizando anestesia profunda com câmara de CO<sub>2</sub> e deslocamento da cervical. Os fetos foram coletados e imediatamente colocados em meio Leibovitz L15 gelado com uma solução de 2% de penicilina (10.000 U/ml) e estreptomicina (10 mg/ml) (PS) e 1% de albumina de soro bovino (BSA). Somente uma parte ventral restrita da flexão mesencefálica foi utilizada para preparação celular, pois esta é a região do cérebro em desenvolvimento rica em células MSN. Essas áreas foram tratadas por 20 minutos a 37 °C com uma solução de tripsina-EDTA em concentração final de 0,05% de tripsina e 0,02% de EDTA. A dissociação foi suspensa por meio da adição de meio Eagle modificado da Dulbecco (DMEM) com 4,5 g/l de glicose, que contém DNase I grau II (concentração final de 0,5 mg/ml) e 10% de soro de feto bovino (FCS). As células foram dissociadas mecanicamente por três passagens forçadas através da ponta de uma pipeta de 10 ml. As células foram centrifugadas em seguida a 180 x g por 10 min à temperatura ambiente sobre uma camada de BSA (3,5%) em meio L15. O sobrenadante foi descartado e as pelotas celulares foram novamente suspensas em meio de cultivo definido que consiste em neurobasal suplementado com B27 (2%), L-glutamina (2 mM), solução de PS a 1%, BDNF (10 ng/ml) e GDNF (1 ng/ml). Células viáveis foram contadas em um citômetro de Neubauer, utilizando o teste de exclusão de azul de tripano. As células foram semeadas em densidade de 40.000 células/cavidade em placas com 96 cavidades (as cavidades foram previamente revestidas com poli-L-lisina) e cultivadas a 37 °C em um incubador de ar (95%)-CO<sub>2</sub> (5%).

[00444] Para evitar efeito de extremidades, as primeira e última

colunas, bem como as primeira e última linhas da placa, não foram utilizadas no estudo. Cavidades vazias foram preenchidas com água. O meio foi alterado a cada dois dias.

[00445] Compostos de teste e esgotamento do fator de crescimento:

[00446] Incubação prévia: no dia 13 de cultivo, o composto de teste foi diluído no meio de cultivo e previamente incubado com neurônios GABAérgicos por uma hora antes do esgotamento de fator de crescimento (BDNF e GDNF).

[00447] Esgotamento de fator de crescimento: uma hora após a incubação com composto de teste, metade do meio foi alterada com meio isento de fatores de crescimento. O esgotamento foi aplicado por 96 horas.

[00448] Organização das placas de cultivo:

[00449] Compostos de teste foram testados em uma placa com 96 cavidades (n = 6 cavidades de cultivo por condição). Foram determinadas as condições a seguir:

<b>PLACA 1 (GAD67)</b>
Controle (veículo)
+ Esgotamento do fator de crescimento/ veículo
+ Esgotamento do fator de crescimento/ MR33583 (1 nM)
+ Esgotamento do fator de crescimento/ MR33583 (10 nM)
+ Esgotamento do fator de crescimento/ MR33583 (50 nM)
+ Esgotamento do fator de crescimento/ MR33583 (10 nM)

[00450] Avaliação de objetivos:

[00451] Em 96 horas após o esgotamento do fator de crescimento, o sobrenadante de cultivo celular foi retirado e imediatamente congelado para análise futura. Células foram fixadas por uma solução fria de etanol (95%) e

ácido acético (5%) por cinco minutos a -20 °C. As células foram lavadas por duas vezes em PBS e permeabilizadas em seguida. Locais não específicos foram bloqueados com uma solução de PBS contendo 0,1% de saponina e 1% de FCS por 15 minutos à temperatura ambiente.

[00452] Imunomanchas: GAD67 (sobrevivência) – os cultivos foram incubados por duas horas com um anticorpo anti-GAD67 monoclonal de camundongo em diluição de 1/200 em PBS contendo 1% de soro de feto bovino e 0,1% de saponina (este anticorpo mancha especificamente neurônios GABAérgicos). Este anticorpo foi revelado com anti-IgG de camundongo de cabra Alexa Flúor (diluição 1/400) em PBS contendo 1% de FCS e 0,1% de saponina por uma hora à temperatura ambiente.

[00453] Análise computadorizada automática: para cada condição, 30 fotografias (que representam toda a área da cavidade) por cavidade foram tomadas utilizando ImageXpress® (Molecular Devices) com ampliação de 20x. Todas as imagens foram geradas utilizando os mesmos parâmetros de obtenção. A partir das imagens, análises foram realizadas direta e automaticamente utilizando Custom Module Editor® (Molecular Devices).

[00454] Foi pesquisada a leitura a seguir: análise da sobrevivência de MSNs (manchas de GAD67, número de neurônios GABAérgicos).

[00455] Análise estatística:

[00456] Todos os valores são expressos na forma de média +/- desvio padrão. Realizou-se análise estatística por meio de ANOVA de uma via, seguido por teste LSD de Fisher.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

[00457] Resultados:

[00458] Efeito de MR33583 em cultivo primário de neurônios GABAérgicos fortalecidos pelo esgotamento de fatores de crescimento:

[00459] Sobrevivência dos neurônios: perda de neurônios GABAérgicos positivos para GAD-67 grandes seguiu-se ao esgotamento de

fatores de crescimento (Figura 18).

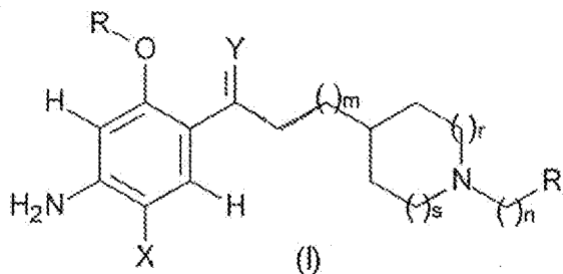
[00460] MR33583 (50 nM) exerceu efeito neuroprotetor significativo, demonstrado com o aumento da sobrevivência de neurônios GABAérgicos.

[00461] Análise:

[00462] Em conjunto, estes resultados indicam que MR33583 foi capaz de promover efeitos neuroprotetores (50 nM) em neurônios GABAérgicos e poderia ser possível droga potencial para mal de Huntington.

**REIVINDICAÇÕES**

1. USO DE UM COMPOSTO, da fórmula (I) a seguir:



em que:

- X representa:
  - um átomo de hidrogênio; ou
  - um átomo de halogênio (Hal), em que (Hal) é flúor, cloro, bromo ou iodo; ou
  - um grupo poli-halogênio alquila  $C_p(\text{Hal})_{2p+1}$  de cadeia linear ou ramificada, em que  $p = 1, 2, 3$  ou  $4$ , (Hal) possuindo o mesmo significado indicado acima;
- Y representa:
  - um átomo de oxigênio; ou
  - um átomo de enxofre; ou
  - um radical  $N-R''$ , em que  $R''$  representa um átomo de hidrogênio, um radical  $-OH$ , um radical  $-O-A$  em que A representa um grupo alquila  $C_1-C_6$  de cadeia linear ou ramificada, particularmente em que A representa um grupo metila ou radical alquila  $C_qH_{2q+1}$  de cadeia linear ou ramificada, em que  $q = 1, 2, 3$  ou  $4$ ;
- m é um número inteiro selecionado a partir de 1, 2 e 3;
- n é um número inteiro selecionado a partir de 0, 1, 2 e 3;
- r e s são números inteiros cujos valores são:  $r=s=0$ ; ou  $r=s=1$ ; ou  $r=s=2$ ; ou  $r=0$  e  $s=1$ ; ou, por fim,  $r=0$  e  $s=2$ ;
- R representa:

- um átomo de hidrogênio; ou
- um grupo alquila C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> de cadeia linear ou ramificada capaz de conduzir um ou mais átomos de F;

- R' representa:
  - um radical alquila C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> de cadeia ramificada; ou
  - um grupo cicloalquila C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> ou bicíclico C<sub>5</sub>-C<sub>13</sub>, capaz de conduzir um ou mais grupos R e de possuir um átomo de oxigênio ou átomo de nitrogênio que pode ser substituído por R, ou átomo de enxofre ou um radical -SO<sub>2</sub>- ou -SO-;

bem como seus enantiômeros ou diaestereoisômeros e seus racêmicos, seus sais de ácidos, seus hidratos ou seus produtos de solvatação, sendo o uso do referido composto caracterizado por ser para fabricação de um agente neuroprotetor na prevenção e/ou tratamento de doenças neurodegenerativas.

2. USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por Y na fórmula (I) representar:

- um átomo de oxigênio; ou
- um átomo de enxofre; ou
- um radical N-R'' em que R'' representa um átomo de hidrogênio, um radical -OH ou um radical alquila C<sub>q</sub>H<sub>2q+1</sub> de cadeia linear ou ramificada, em que q = 1, 2, 3 ou 4.

3. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado por X na fórmula (I) representar um átomo de halogênio.

4. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado por Y na fórmula (I) representar um átomo de oxigênio.

5. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado por todos dentre m, n, r e s na fórmula (I) possuírem o valor 1.

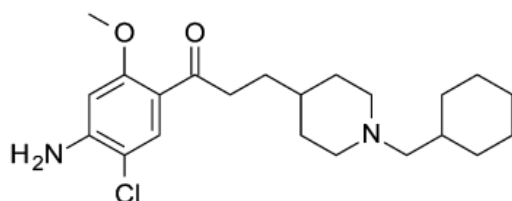
6. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a

5, caracterizado por R na fórmula (I) representar H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> ou CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>F.

7. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado por R' na fórmula (I) representar um radical selecionado a partir do grupo que consiste nos radicais ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, ciclohexila, ciclo-heptila e 4-piperidina.

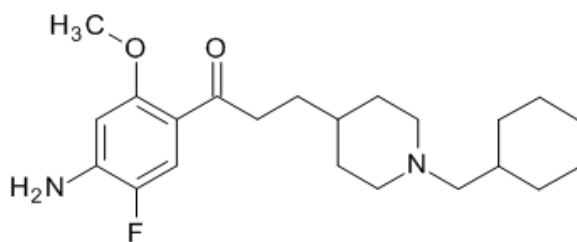
8. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 7, caracterizado por R na fórmula (I) representar um radical metila e R' representar um radical cicloalquila C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub>.

9. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo composto ser Donecoprida da fórmula (II) a seguir:



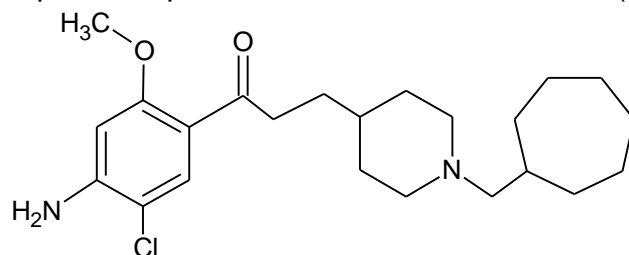
(II).

10. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo composto ser Flucoprida da fórmula (III) a seguir:



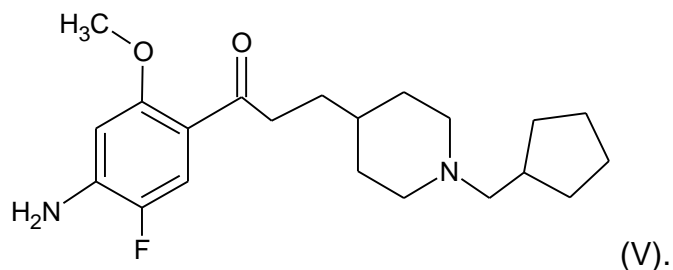
(III).

11. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo composto ser MR31192 da fórmula (VIII) a seguir:

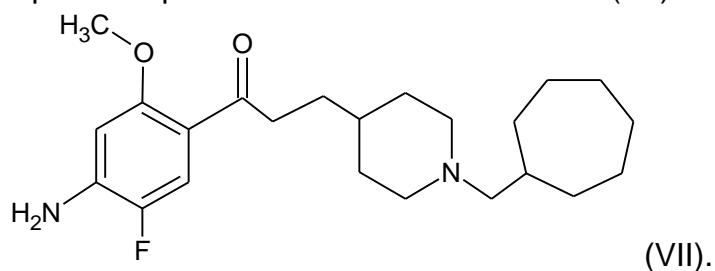


(VIII).

12. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo composto ser MR33583 da fórmula (V) a seguir:



13. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo composto ser MR36014 da fórmula (VII) a seguir:



14. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelos mencionados sais de ácidos serem fumaratos ou dicloridratos.

15. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pela doença neurodegenerativa ser selecionada a partir do grupo que consiste em mal de Alzheimer, mal de Parkinson, mal de Huntington, atrofia de múltiplos sistemas, doenças neuronais motoras incluindo esclerose lateral amiotrófica, síndrome de Down e degenerações frontotemporais.

16. USO, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pela doença neurodegenerativa ser selecionada a partir do grupo que consiste em mal de Alzheimer, mal de Parkinson, mal de Huntington e esclerose lateral amiotrófica.

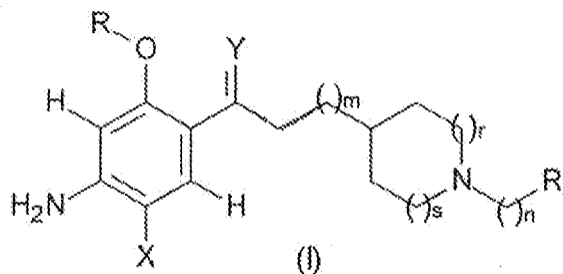
## **RESUMO**

### **“USO DE UM COMPOSTO”**

A presente invenção refere-se a um composto da fórmula (I) para uso como agente neuroprotetor na prevenção e/ou tratamento de doenças neurodegenerativas.

**REIVINDICAÇÕES**

1. COMPOSTO DA FÓRMULA (I), caracterizado por:



em que:

- X representa:
  - um átomo de hidrogênio; ou
  - um átomo de halogênio (Hal), em que (Hal) é flúor, cloro, bromo ou iodo; ou
  - um grupo póli-halogênio alquila  $C_p(\text{Hal})_{2p+1}$  de cadeia linear ou ramificada, em que  $p = 1, 2, 3$  ou  $4$  (Hal), que possui o mesmo significado indicado acima;
- Y representa:
  - um átomo de oxigênio;
  - um átomo de enxofre; ou
  - um radical N-R", em que R" representa um átomo de hidrogênio, radical -OH, radical -O-A em que A representa um grupo alquila  $C_1-C_6$  de cadeia linear ou ramificada, particularmente em que A representa um grupo metila ou radical alquila  $C_qH_{2q+1}$  de cadeia linear ou ramificada, em que  $q = 1, 2, 3$  ou  $4$ ;
- m é um número inteiro selecionado a partir de 1, 2 e 3;
- n é um número inteiro selecionado a partir de 0, 1, 2 e 3;
- r e s são números inteiros cujos valores são:  $r=s=0$ ;  $r=s=1$ ;  $r=s=2$ ; ou  $r=0$  e  $s=1$ ; ou, por fim,  $r=0$  e  $s=2$ ;
- R representa:

- um átomo de hidrogênio; ou
- um grupo alquila C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> de cadeia linear ou ramificada capaz de conduzir um ou mais átomos de F;

- R' representa:
  - um radical alquila C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> de cadeia ramificada; ou
  - um grupo cicloalquila C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> ou bicíclico C<sub>5</sub>-C<sub>13</sub>, capaz de conduzir um ou mais grupos R e de possuir um átomo de oxigênio ou átomo de nitrogênio que pode ser substituído por R, átomo de enxofre ou radical -SO<sub>2</sub>- ou -SO-;

bem como seus enantiômeros ou diaestereoisômeros e seus racêmicos, seus sais de ácidos, seus hidratos ou seus produtos de solvatação;

para uso como agente neuroprotetor na prevenção e/ou tratamento de doenças neurodegenerativas.

2. COMPOSTO PARA USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que Y na fórmula (I) representa:

- um átomo de oxigênio;
- um átomo de enxofre; ou
- um radical N-R'' em que R'' representa um átomo de hidrogênio, radical -OH ou um radical alquila C<sub>q</sub>H<sub>2q+1</sub> de cadeia linear ou ramificada, em que q = 1, 2, 3 ou 4.

3. COMPOSTO PARA USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado pelo fato de que X na fórmula (I) representa um átomo de halogênio.

4. COMPOSTO PARA USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que Y na fórmula (I) representa um átomo de oxigênio.

5. COMPOSTO PARA USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que todos dentre m, n, r e s na

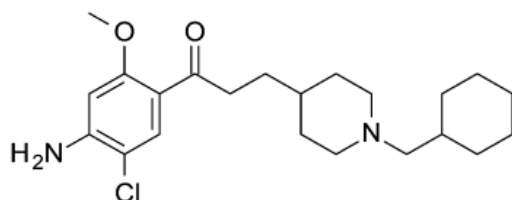
fórmula (I) possuem o valor 1.

6. COMPOSTO PARA USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que R na fórmula (I) representa H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> ou CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>F.

7. COMPOSTO PARA USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que R' na fórmula (I) representa um radical selecionado a partir do grupo que consiste dos radicais ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, ciclo-hexila, ciclo-heptila e 4-piperidina.

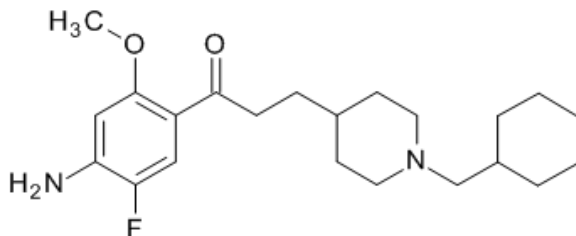
8. COMPOSTO PARA USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 7, caracterizado pelo fato de que R na fórmula (I) representa um radical metila e R' representa um radical cicloalquila C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub>.

9. COMPOSTO PARA USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o composto é o composto de Donecoprida da fórmula (II) a seguir:



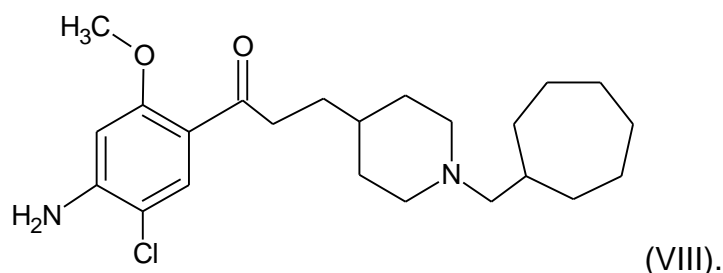
(II).

10. COMPOSTO PARA USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o composto é o composto de Flucoprida da fórmula (III) a seguir:

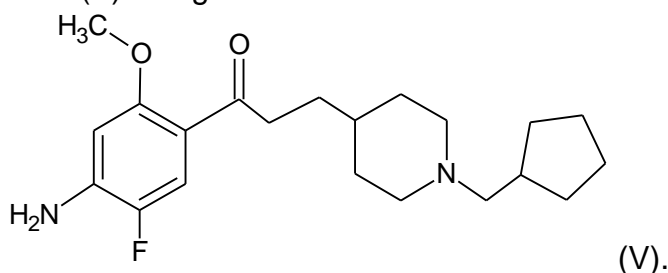


(III).

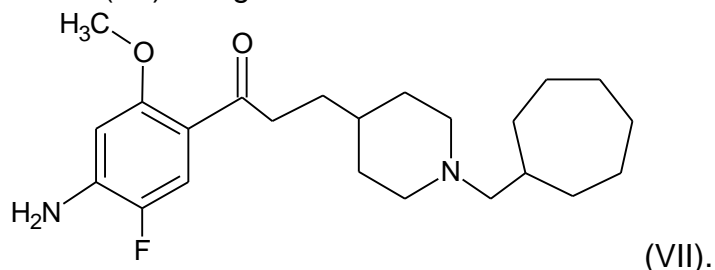
11. COMPOSTO PARA USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o composto é o composto MR31192 da fórmula (VIII) a seguir:



12. COMPOSTO PARA USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o composto é o composto MR33583 da fórmula (V) a seguir:



13. COMPOSTO PARA USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o composto é o composto MR36014 da fórmula (VII) a seguir:



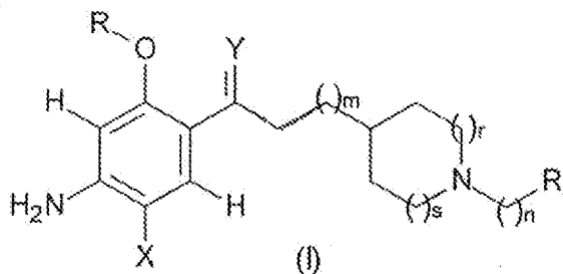
14. COMPOSTO PARA USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que os mencionados sais de ácidos são fumaratos ou dicloridratos.

15. COMPOSTO PARA USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que a doença neurodegenerativa é selecionada a partir do grupo que consiste de mal de Alzheimer, mal de Parkinson, mal de Huntington, atrofia de múltiplos sistemas, doenças neuronais motoras incluindo esclerose lateral amiotrófica, síndrome de Down e degenerações frontotemporais.

16. COMPOSTO PARA USO, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a doença neurodegenerativa é selecionada a partir do grupo que consiste de mal de Alzheimer, mal de Parkinson, mal de Huntington e esclerose lateral amiotrófica.

**REIVINDICAÇÕES**

1. USO DE UM COMPOSTO, da fórmula (I) a seguir:



em que:

- X representa:
  - um átomo de hidrogênio; ou
  - um átomo de halogênio (Hal), em que (Hal) é flúor, cloro, bromo ou iodo; ou
  - um grupo poli-halogênio alquila  $C_p(\text{Hal})_{2p+1}$  de cadeia linear ou ramificada, em que  $p = 1, 2, 3$  ou  $4$ , (Hal) possuindo o mesmo significado indicado acima;
- Y representa:
  - um átomo de oxigênio; ou
  - um átomo de enxofre; ou
  - um radical  $N-R''$ , em que  $R''$  representa um átomo de hidrogênio, um radical  $-OH$ , um radical  $-O-A$  em que A representa um grupo alquila  $C_1-C_6$  de cadeia linear ou ramificada, particularmente em que A representa um grupo metila ou radical alquila  $C_qH_{2q+1}$  de cadeia linear ou ramificada, em que  $q = 1, 2, 3$  ou  $4$ ;
- m é um número inteiro selecionado a partir de 1, 2 e 3;
- n é um número inteiro selecionado a partir de 0, 1, 2 e 3;
- r e s são números inteiros cujos valores são:  $r=s=0$ ; ou  $r=s=1$ ; ou  $r=s=2$ ; ou  $r=0$  e  $s=1$ ; ou, por fim,  $r=0$  e  $s=2$ ;
- R representa:

- um átomo de hidrogênio; ou
- um grupo alquila C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> de cadeia linear ou ramificada capaz de conduzir um ou mais átomos de F;

- R' representa:
  - um radical alquila C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> de cadeia ramificada; ou
  - um grupo cicloalquila C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> ou bicíclico C<sub>5</sub>-C<sub>13</sub>, capaz de conduzir um ou mais grupos R e de possuir um átomo de oxigênio ou átomo de nitrogênio que pode ser substituído por R, ou átomo de enxofre ou um radical -SO<sub>2</sub>- ou -SO-;

bem como seus enantiômeros ou diaestereoisômeros e seus racêmicos, seus sais de ácidos, seus hidratos ou seus produtos de solvatação, sendo o uso do referido composto caracterizado por ser para fabricação de um agente neuroprotetor na prevenção e/ou tratamento de doenças neurodegenerativas.

2. USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por Y na fórmula (I) representar:

- um átomo de oxigênio; ou
- um átomo de enxofre; ou
- um radical N-R'' em que R'' representa um átomo de hidrogênio, um radical -OH ou um radical alquila C<sub>q</sub>H<sub>2q+1</sub> de cadeia linear ou ramificada, em que q = 1, 2, 3 ou 4.

3. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado por X na fórmula (I) representar um átomo de halogênio.

4. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado por Y na fórmula (I) representar um átomo de oxigênio.

5. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado por todos dentre m, n, r e s na fórmula (I) possuírem o valor 1.

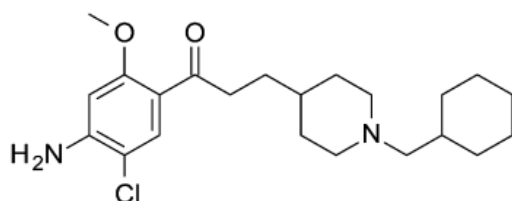
6. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a

5, caracterizado por R na fórmula (I) representar H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> ou CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>F.

7. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado por R' na fórmula (I) representar um radical selecionado a partir do grupo que consiste nos radicais ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, ciclohexila, ciclo-heptila e 4-piperidina.

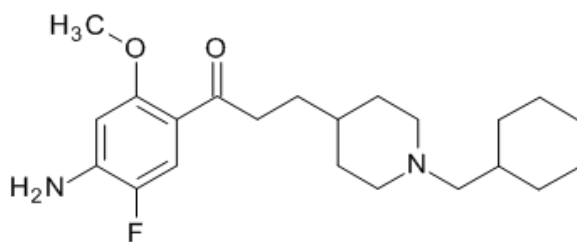
8. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 7, caracterizado por R na fórmula (I) representar um radical metila e R' representar um radical cicloalquila C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub>.

9. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo composto ser Donecoprida da fórmula (II) a seguir:



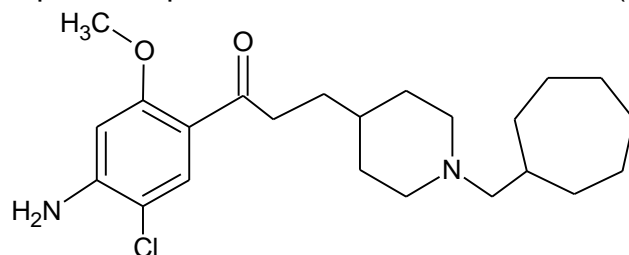
(II).

10. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo composto ser Flucoprida da fórmula (III) a seguir:



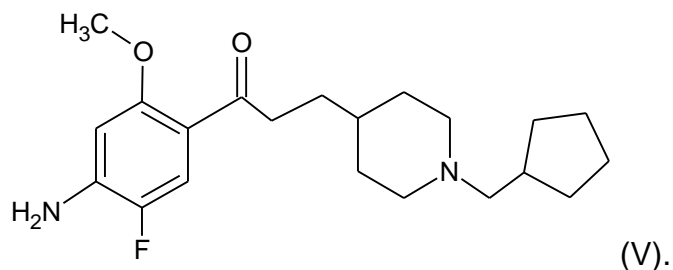
(III).

11. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo composto ser MR31192 da fórmula (VIII) a seguir:

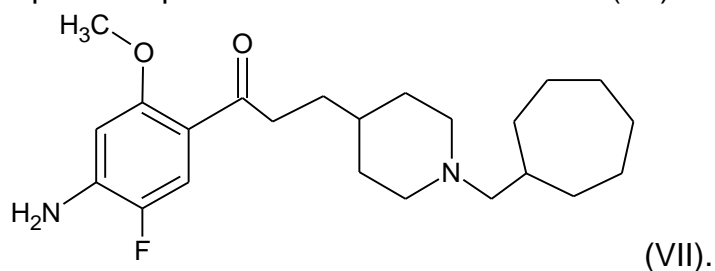


(VIII).

12. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo composto ser MR33583 da fórmula (V) a seguir:



13. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo composto ser MR36014 da fórmula (VII) a seguir:



14. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelos mencionados sais de ácidos serem fumaratos ou dicloridratos.

15. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pela doença neurodegenerativa ser selecionada a partir do grupo que consiste em mal de Alzheimer, mal de Parkinson, mal de Huntington, atrofia de múltiplos sistemas, doenças neuronais motoras incluindo esclerose lateral amiotrófica, síndrome de Down e degenerações frontotemporais.

16. USO, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pela doença neurodegenerativa ser selecionada a partir do grupo que consiste em mal de Alzheimer, mal de Parkinson, mal de Huntington e esclerose lateral amiotrófica.

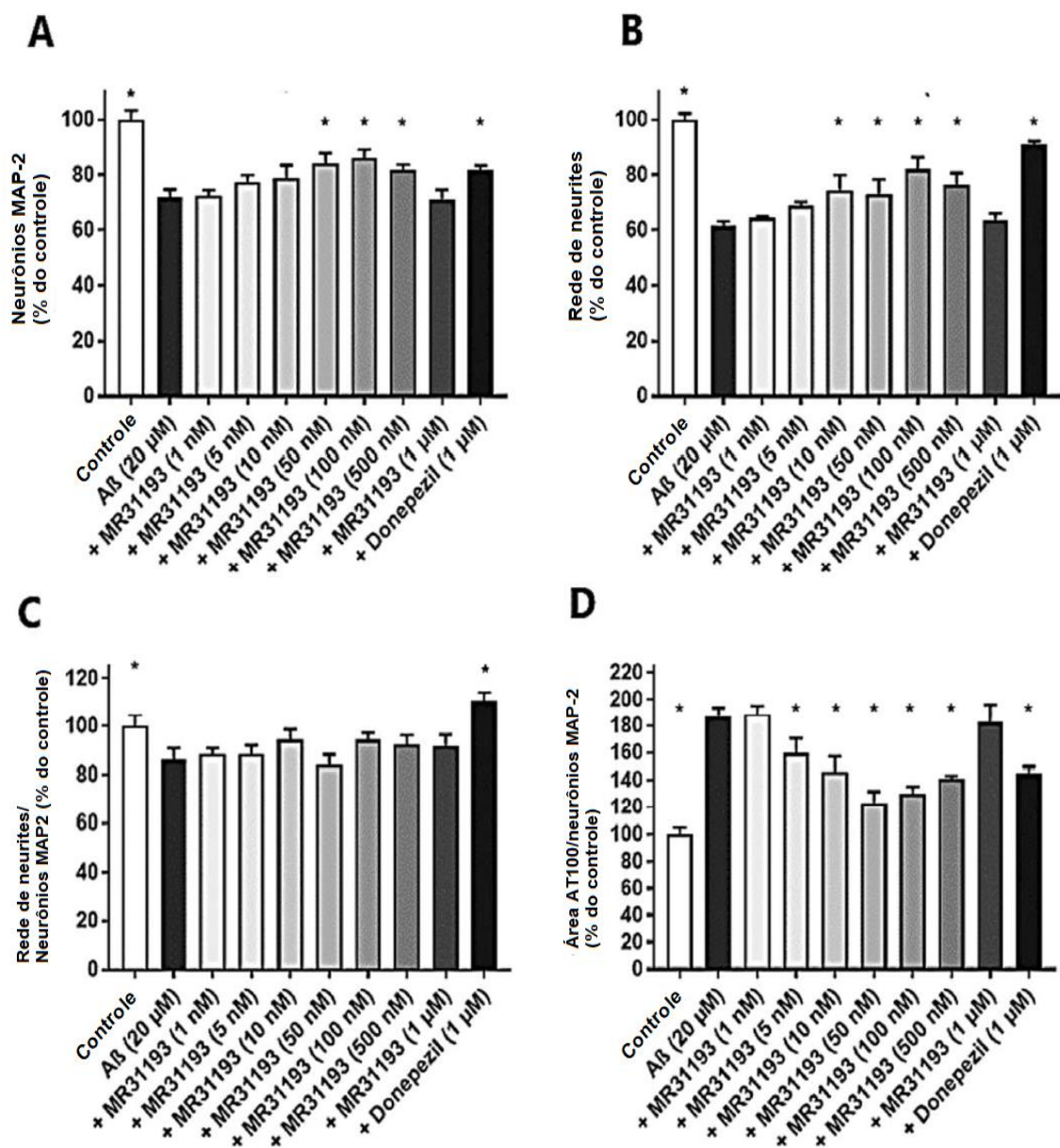


Fig. 1

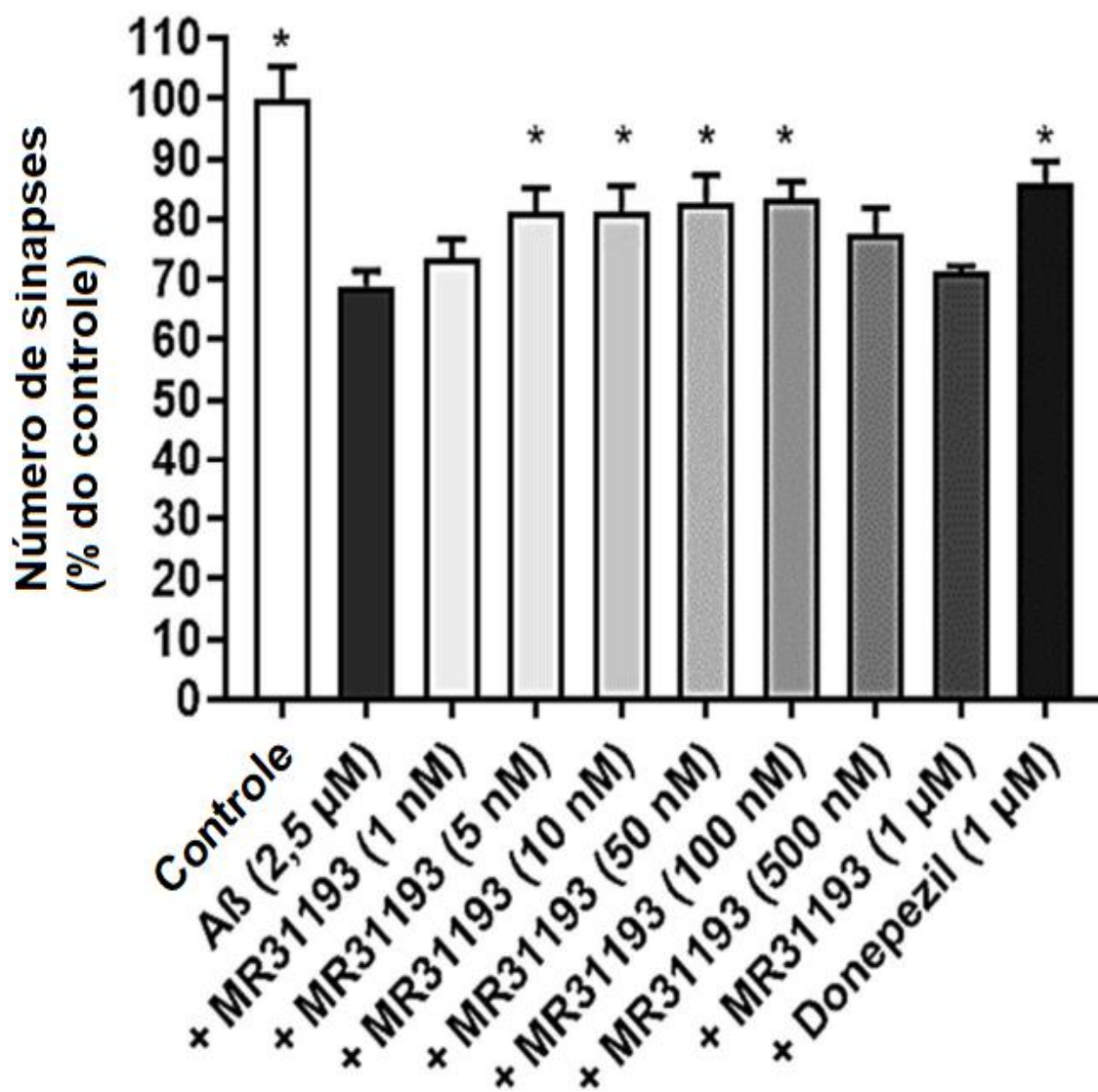


Fig. 2

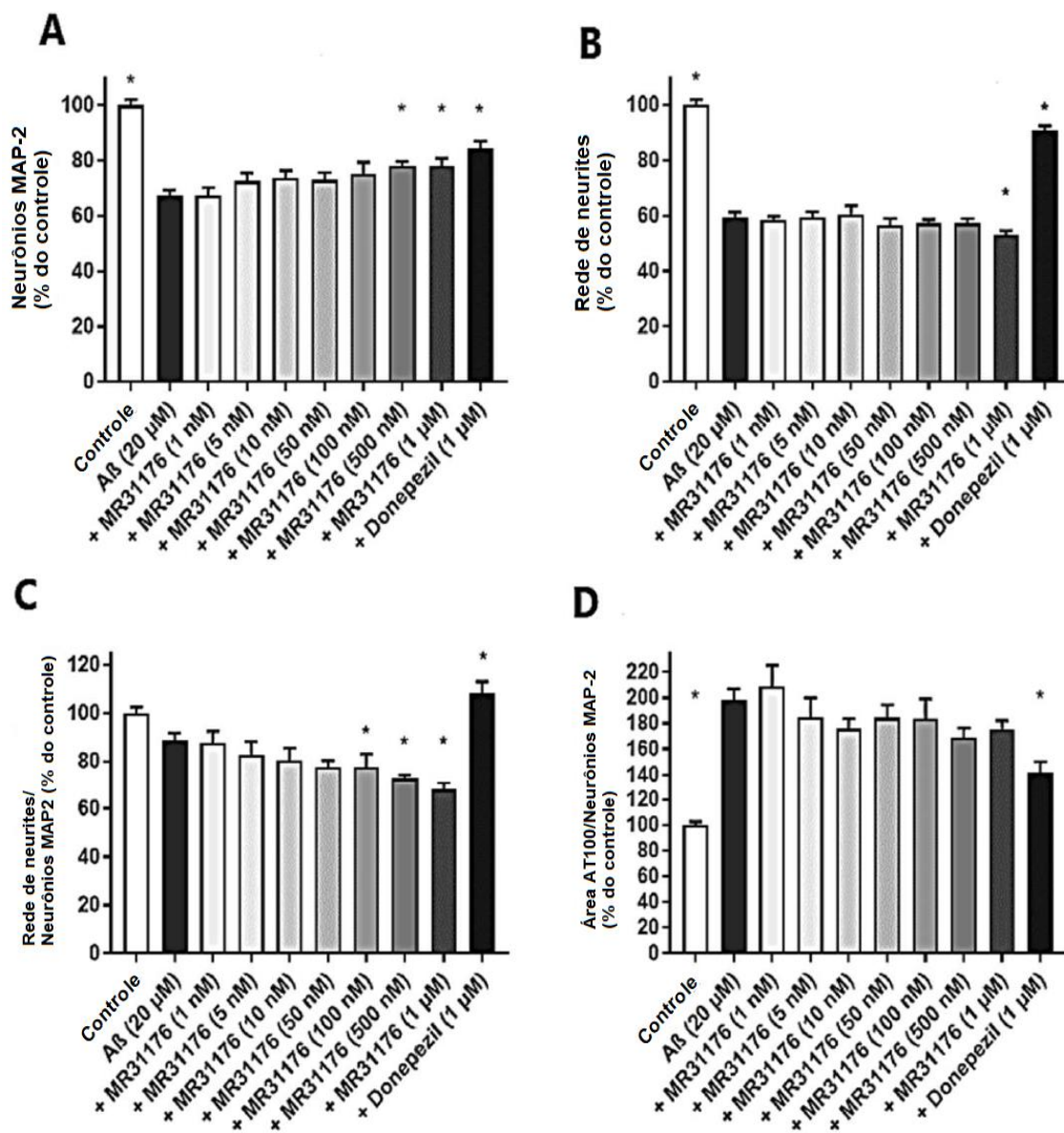


Fig. 3

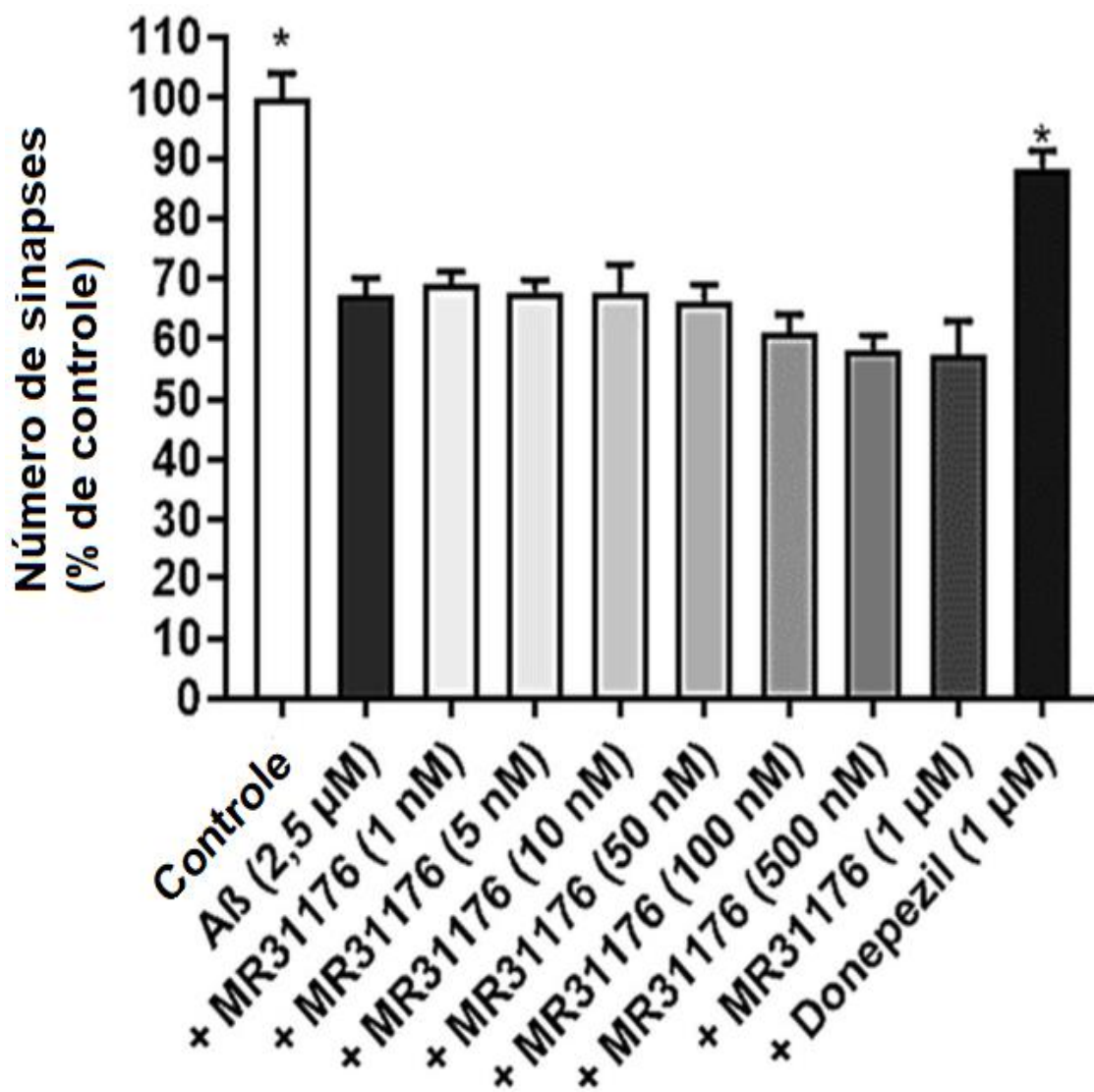


Fig. 4

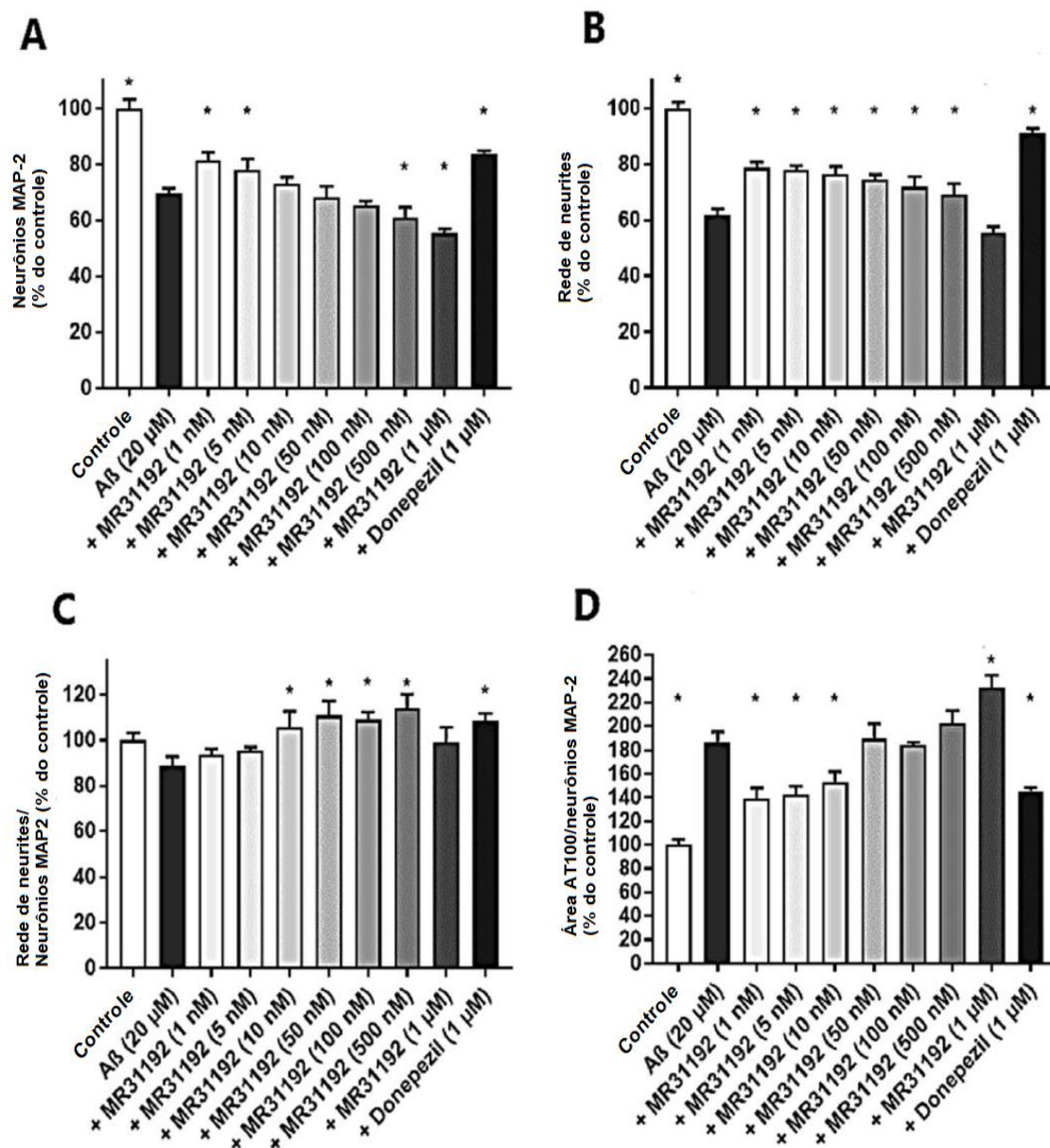


Fig. 5

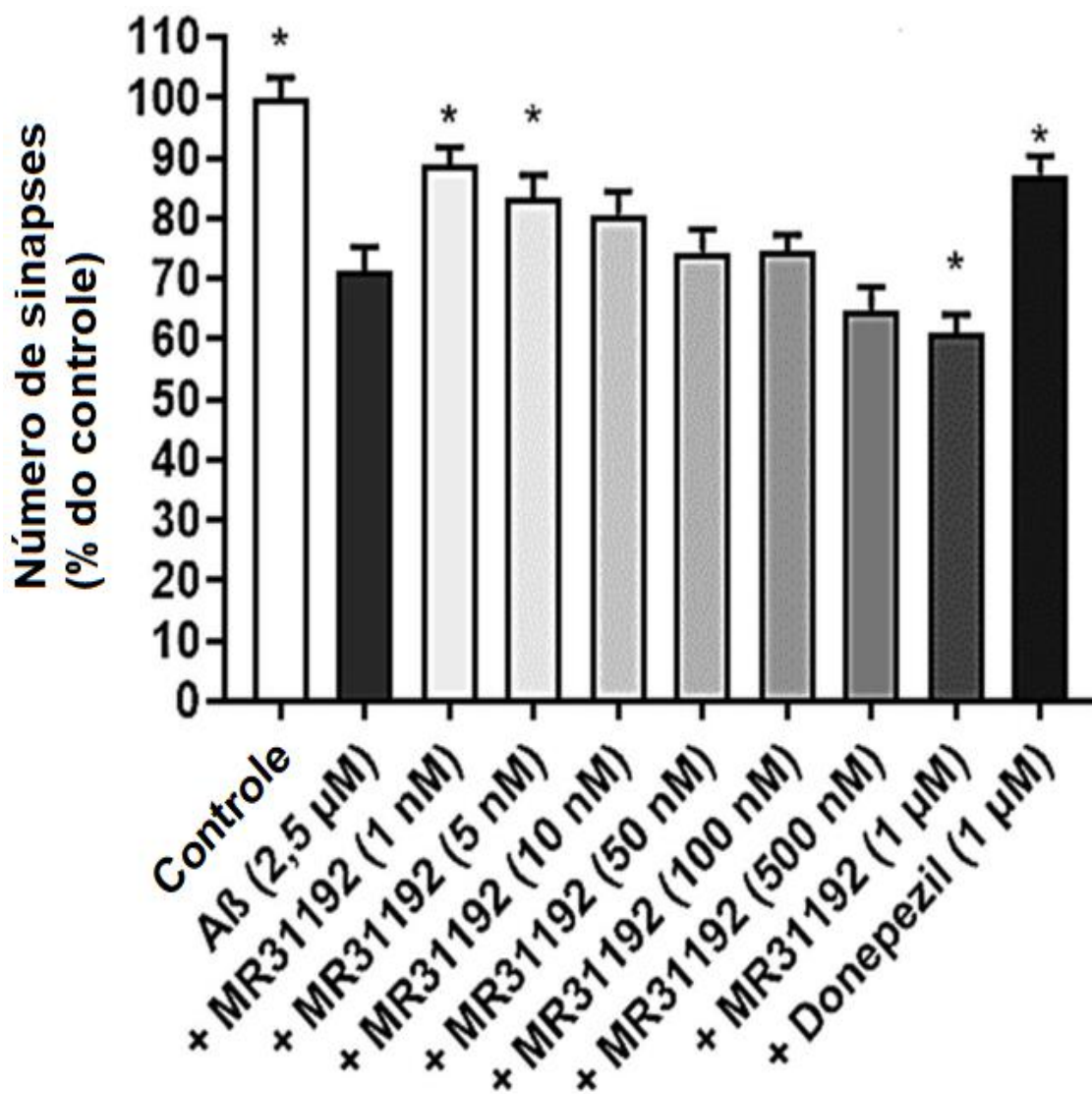


Fig. 6

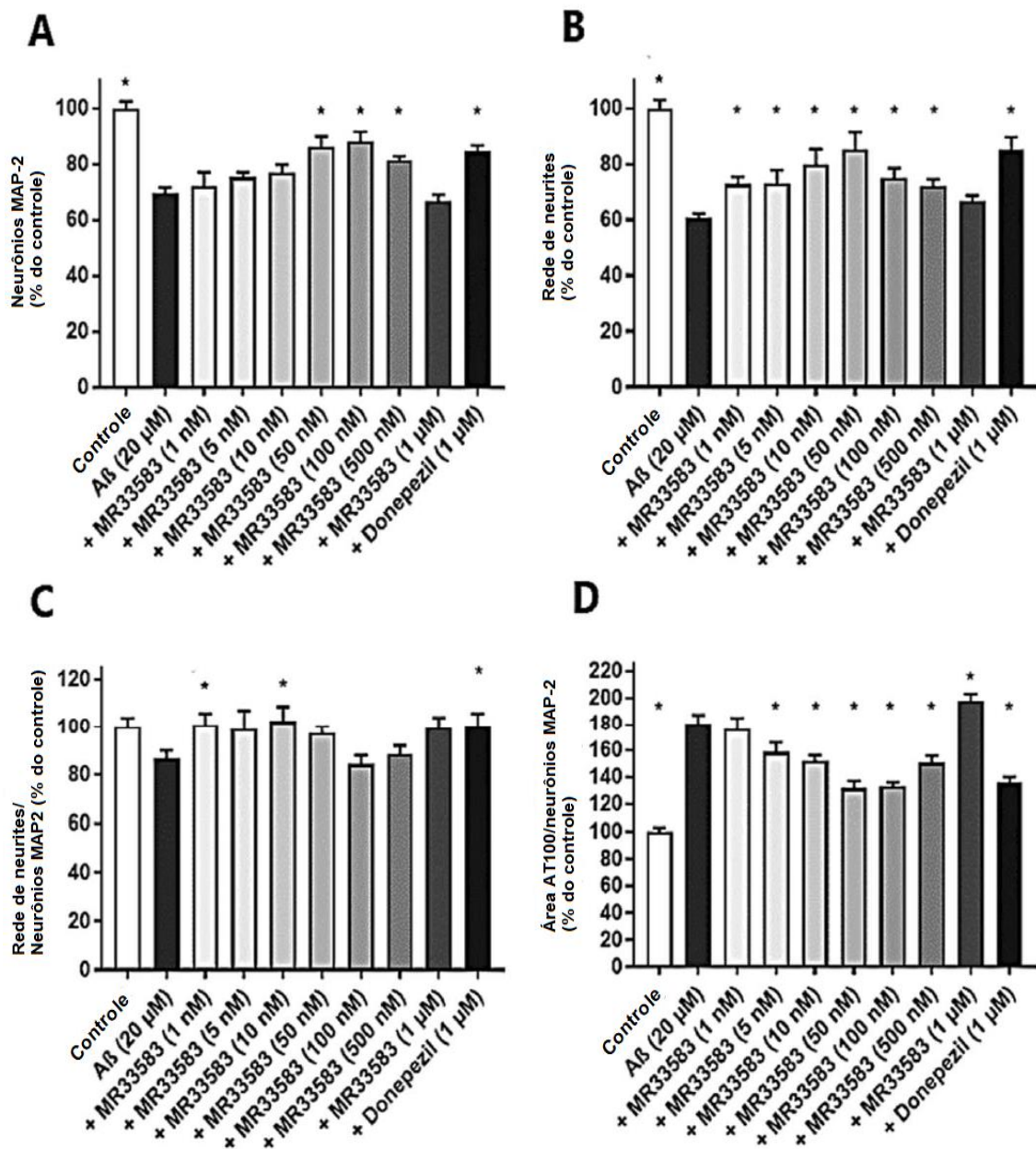


Fig. 7

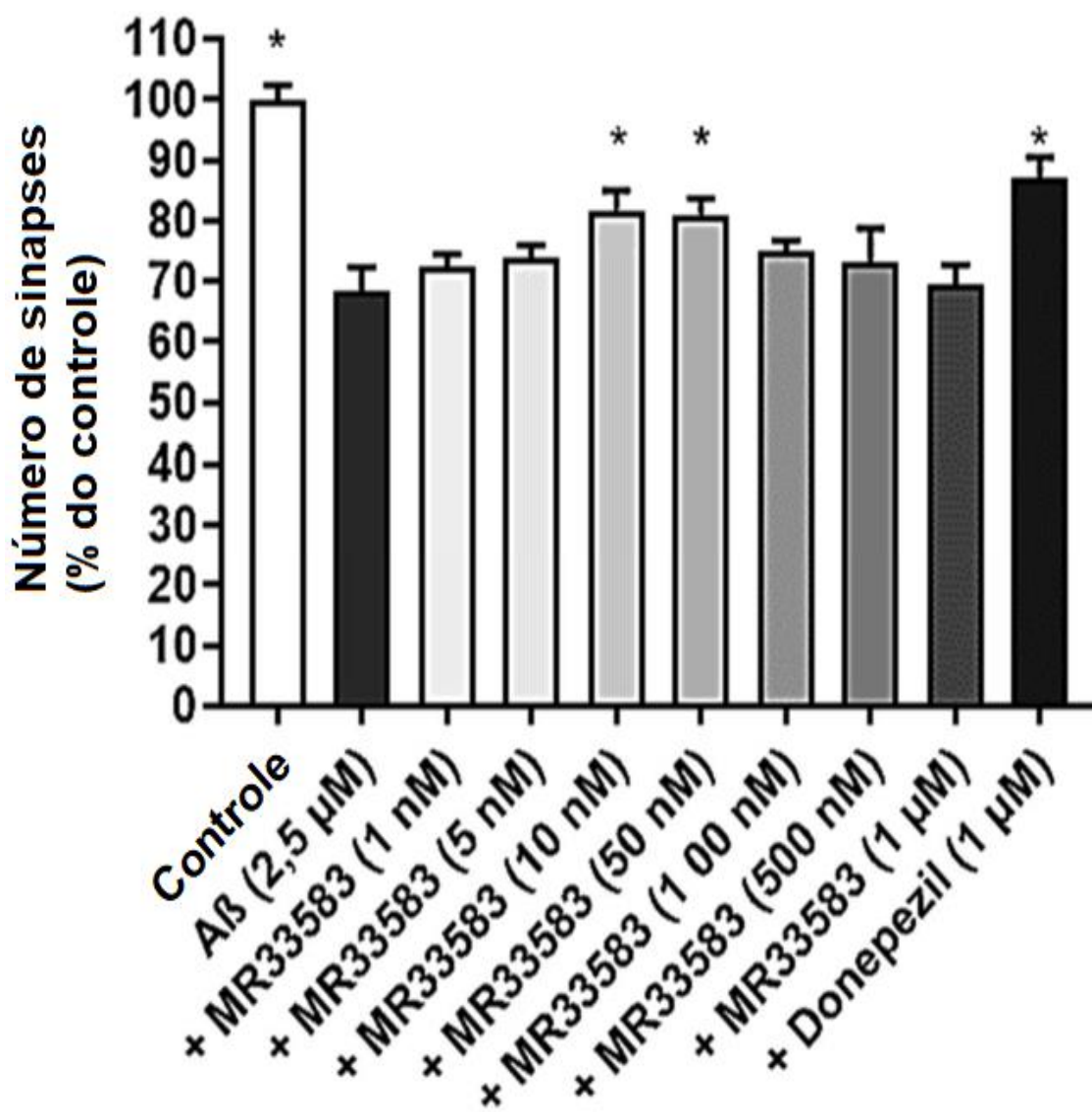


Fig. 8

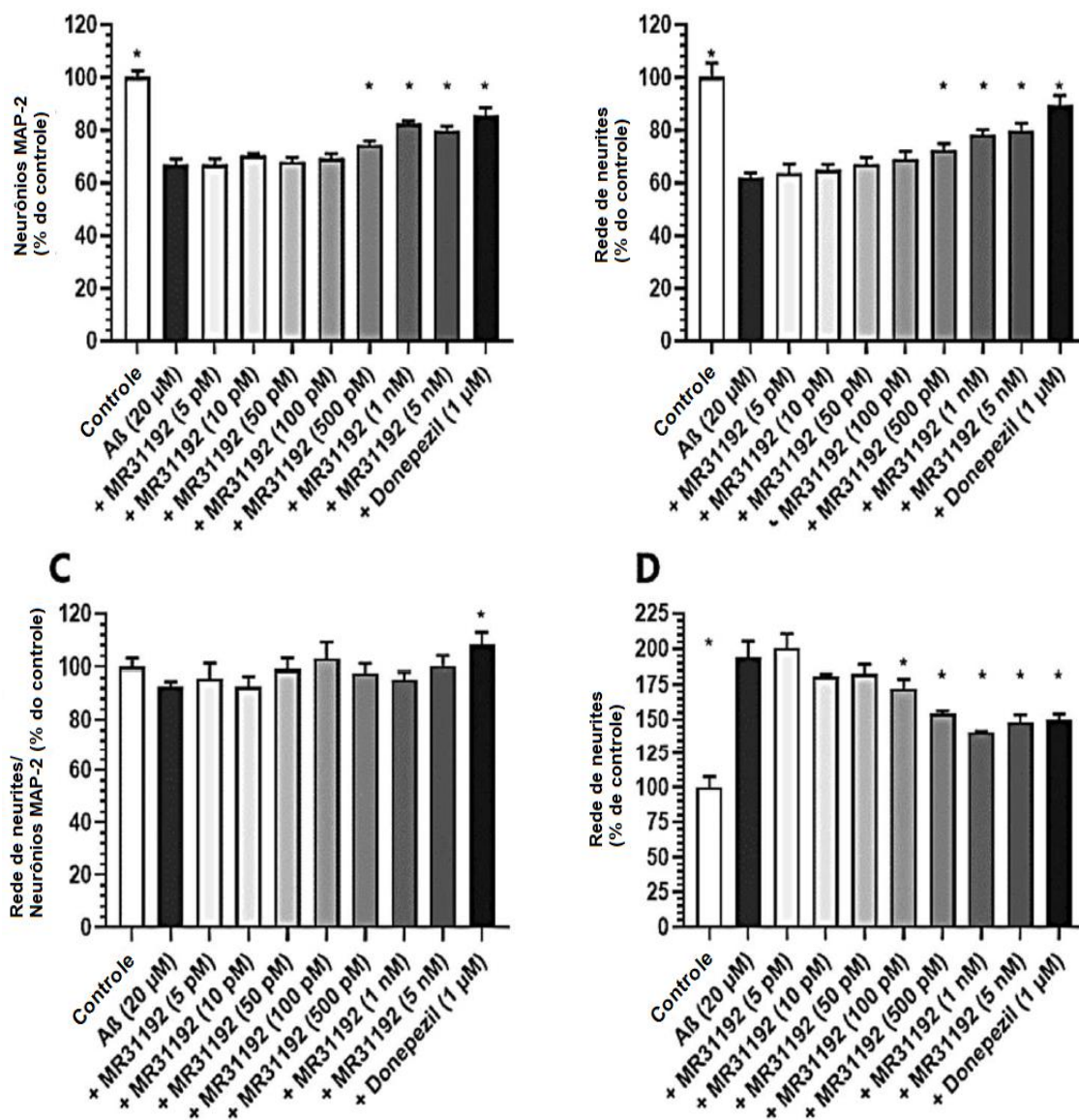


Fig. 9

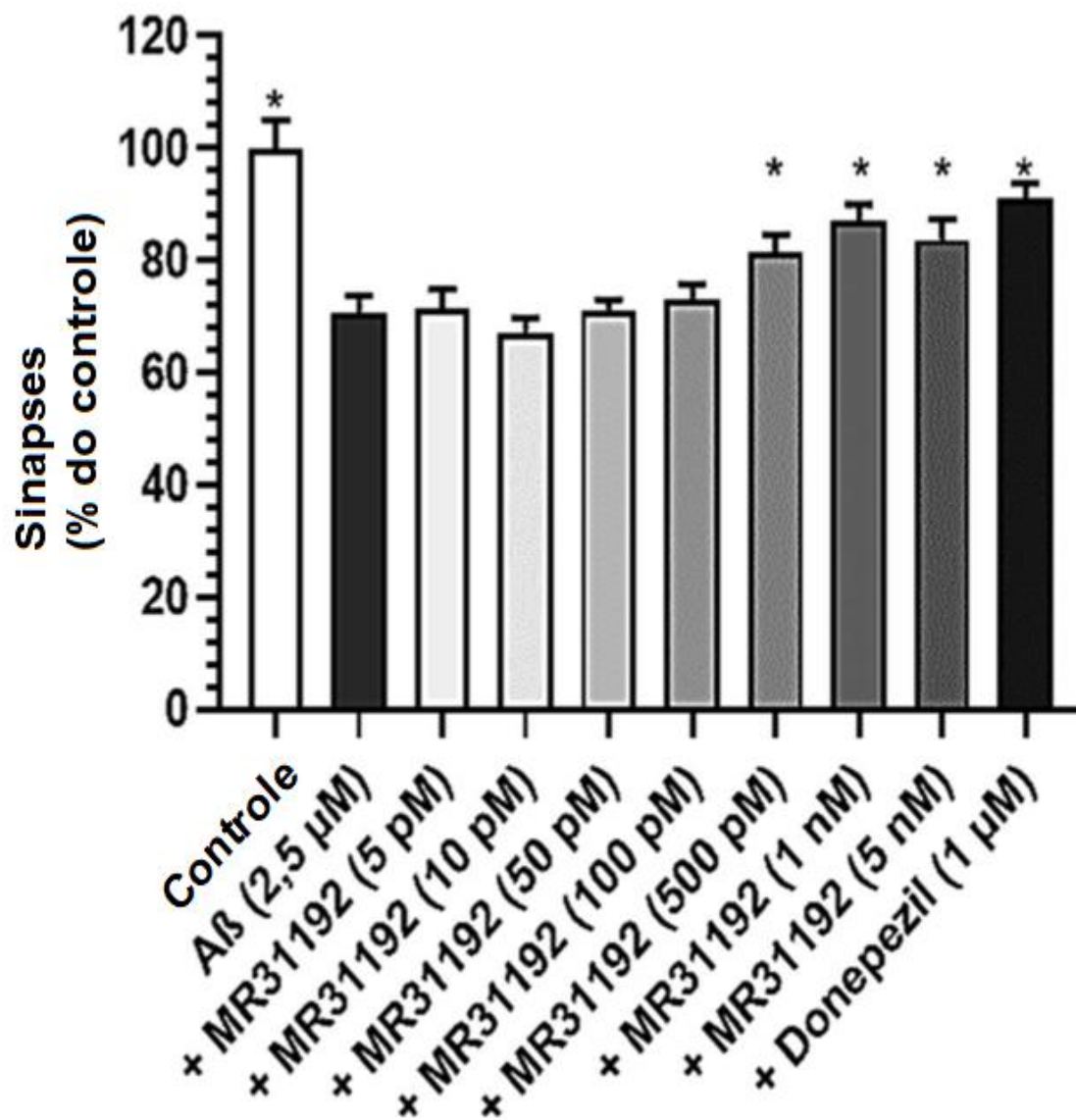


Fig. 10

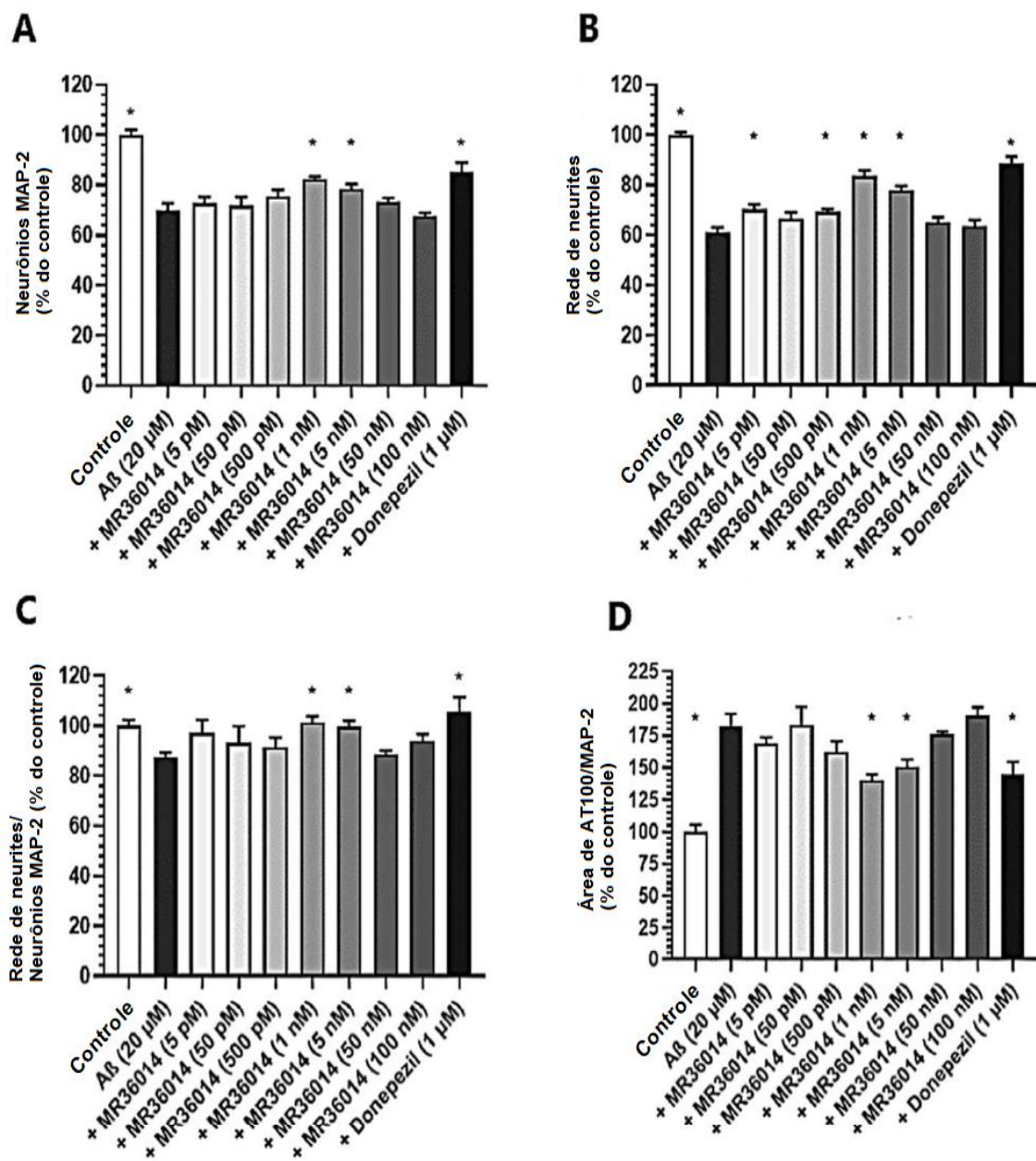


Fig. 11

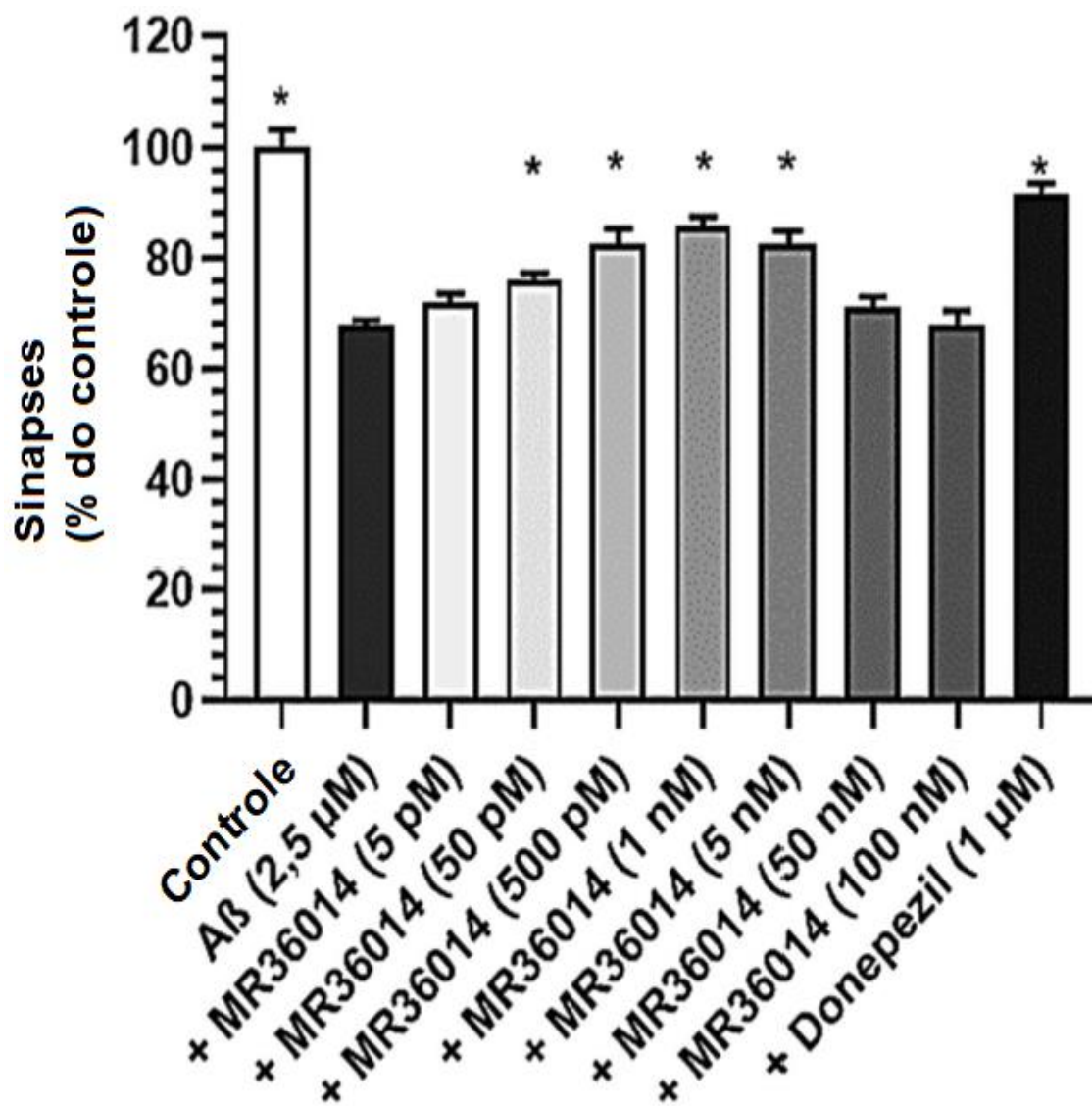


Fig. 12

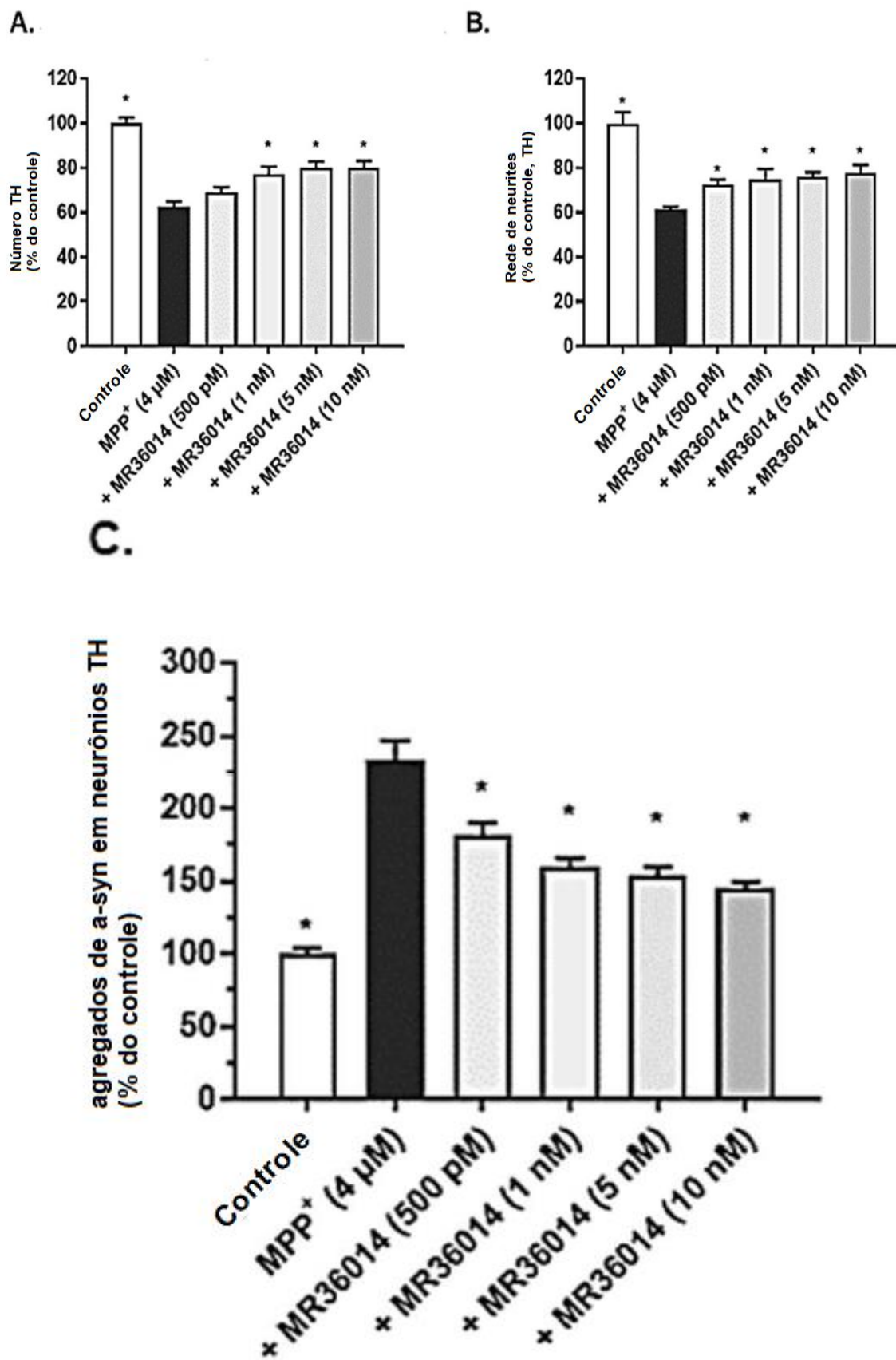


Fig. 13

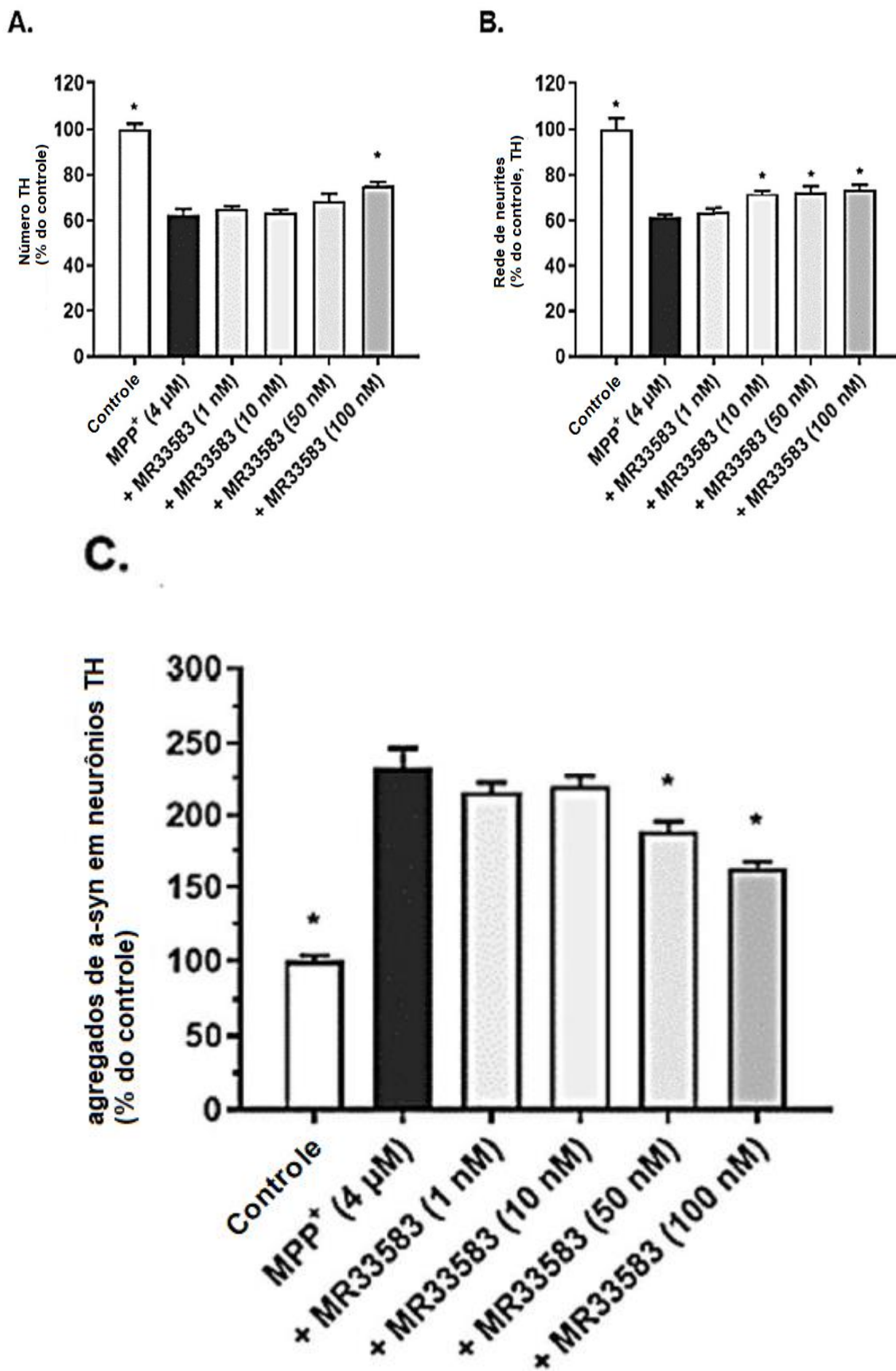


Fig. 14

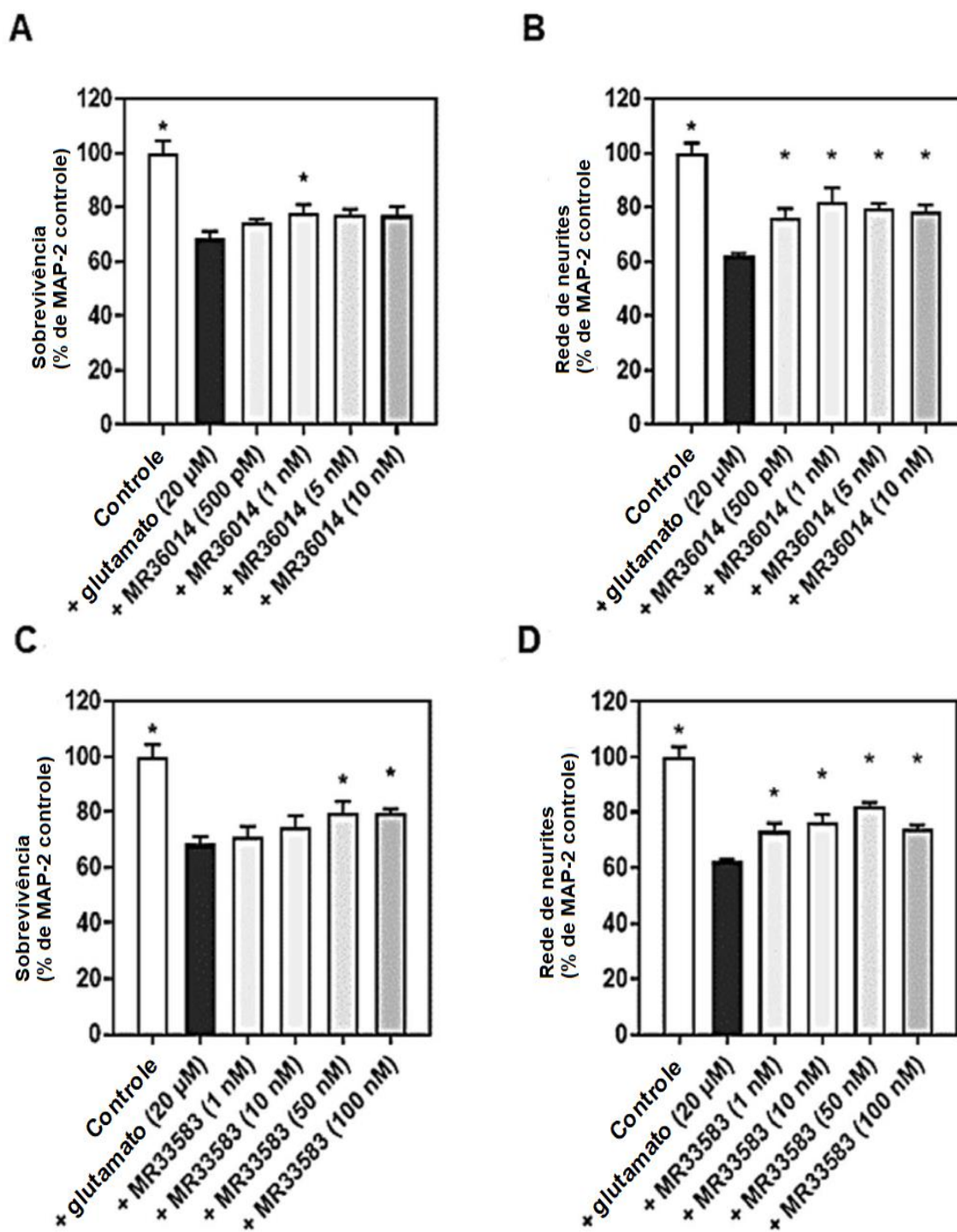


Fig. 15

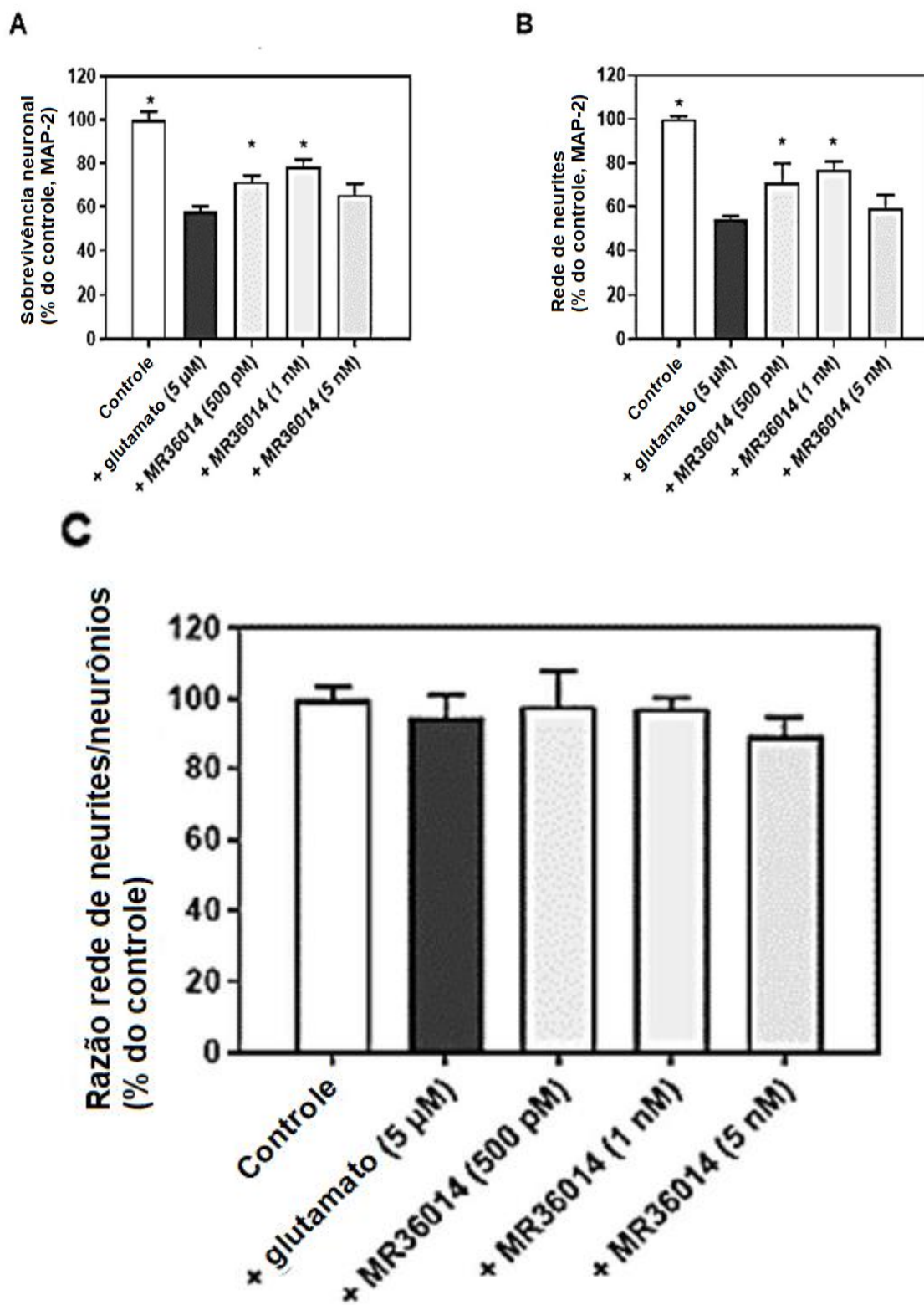


Fig. 16

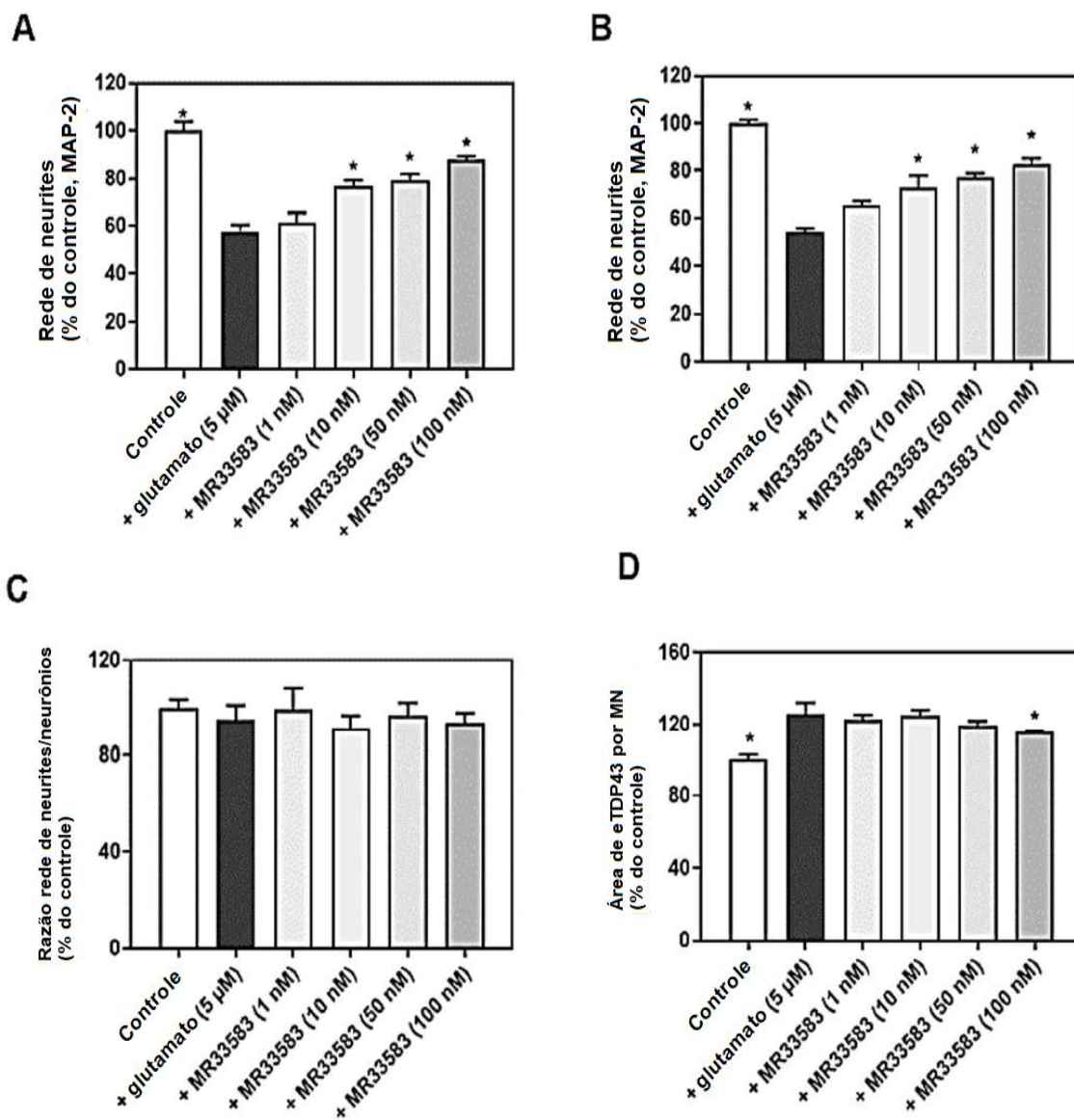


Fig. 17

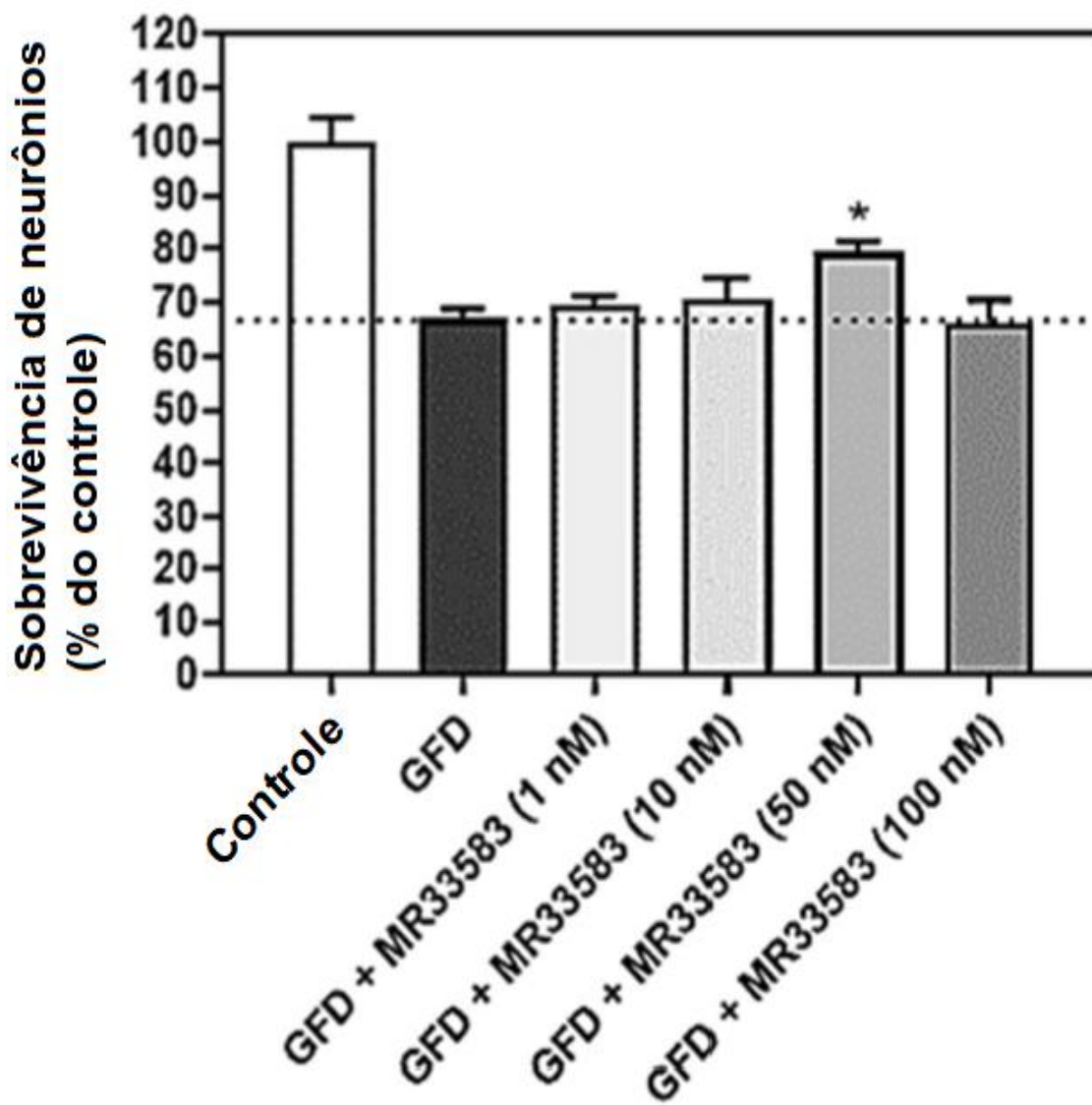


Fig. 18

## **RESUMO**

### **“USO DE UM COMPOSTO”**

A presente invenção refere-se a um composto da fórmula (I) para uso como agente neuroprotetor na prevenção e/ou tratamento de doenças neurodegenerativas.