

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

(21) PI 0721697-1 A2



* B R P I 0 7 2 1 6 9 7 A 2 *

(22) Data de Depósito: 11/05/2007

(43) Data da Publicação: 05/08/2014
(RPI 2274)

(51) Int.Cl.:

C12N 9/20

(54) Título: " MÉTODOS PARA TRATAR E/OU PREVENIR UMA DOENÇA OU DISTÚRBIO NEURODEGENERATIVO EM UM INDIVÍDUO, PARA TRATAR E/OU PREVENIR UM INDIVÍDUO COM OU EM RISCO DE DEMÊNCIA VASCULAR, PARA TRATAR E/OU PREVENIR UMA DOENÇA OU DISTÚRBIO ASSOCIADO COM UMA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA ANORMAL EM UM INDIVÍDUO, PARA DIMINUIR O ACÚMULO BETA AMILÓIDE NO CÉREBRO DE UM INDIVÍDUO, PARA TRATAR E/OU PREVENIR MAL DE ALZHEIMER EM UM INDIVÍDUO E PARA PREVENIR OU REDUZIR O RISCO DE DESENVOLVER MAL DE ALZHEIMER, E, USO DE UM AGENTE QUE INIBE A EXPRESSÃO E/OU ATIVIDADE DA PROTEÍNA LP-PLA2."

(57) Resumo:

(73) Titular(es): Thomas Jefferson University , University of Medicine and Dentistry of New Jersey

(72) Inventor(es): Robert Nagele, Yi Shi

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT US2007011365 de 11/05/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/140449de 20/11/2008

“MÉTODOS PARA TRATAR E/OU PREVENIR UMA DOENÇA OU
DISTÚRPIO NEURODEGENERATIVO EM UM INDIVÍDUO, PARA
TRATAR E/OU PREVENIR UM INDIVÍDUO COM OU EM RISCO DE
DEMÊNCIA VASCULAR, PARA TRATAR E/OU PREVENIR UMA
5 DOENÇA OU DISTÚRPIO ASSOCIADO COM UMA BARREIRA
HEMATOENCEFÁLICA ANORMAL EM UM INDIVÍDUO, PARA
DIMINUIR O ACÚMULO BETA AMILÓIDE NO CÉREBRO DE UM
INDIVÍDUO, PARA TRATAR E/OU PREVENIR MAL DE ALZHEIMER
EM UM INDIVÍDUO E PARA PREVENIR OU REDUZIR O RISCO DE
10 DESENVOLVER MAL DE ALZHEIMER, E, USO DE UM AGENTE QUE
INIBE A EXPRESSÃO E/OU ATIVIDADE DA PROTEÍNA Lp-PLA₂”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se geralmente a métodos para o
tratamento e/ou a prevenção de doenças e distúrbios neurodegenerativos, e,
15 mais particularmente, ao tratamento e/ou à prevenção de doença
neurodegenerativa associada com permeabilidade anormal da barreira
sanguínea usando-se agentes que inibem a expressão e/ou atividade da
proteína Lp-PLA₂.

FUNDAMENTOS

20 Fosfolipase A₂ Associada a Lipoproteína (Lp-PLA₂), também
conhecida na arte previamente acetil-hidrolase de fator ativador de plaquetas
(PAF) é um membro da superfamília de enzimas de fosfolipase A₂ que estão
envolvidas na hidrólise de fosfolipídeos ou lipídeos de lipoproteína. Ela é
secretada por várias células que desempenham um papel importante na
25 resposta inflamatória sistêmica à lesão, incluindo linfócitos, monócitos,
macrófago, linfócitos T e mastócitos.

Durante a conversão do LDL a sua forma oxidada, Lp-PLA₂ é
responsável pela hidrolisação do éster sn-2 de fosfatidilcolina modificada
oxidativamente dando liso-fosfatidilcolina e um ácido graxo modificado

oxidativamente. Lp-PLA₂ hidrolisa a posição sn2 de um fosfolípídeo truncado associado com LDL oxidado. Como um resultado, há uma geração de dois mediadores de ativação de células inflamatórias (ácidos graxos não-esterificados (NEFA) e LYSO PC). Ambos, NEFA e LYSO PCs são quimioatratores para monócitos circulantes, desempenham um papel na ativação de macrófagos e aumentam o estresse oxidativo e também afetam as respostas funcionais e imediatas de linfócitos T. Lp-PLA₂ é ligada em humanos e porcos à molécula de LDL via a lipoproteína B, em uma vez na parede arterial, o LDL oxidado é suscetível a hidrólise por LpPLA2.

Ambos estes produtos de ação de Lp-PLA₂ são quimioatratores potentes para monócitos circulantes. Assim, considera-se que esta enzima é responsável pelo acúmulo de células carregadas com éster de colesterol nas artérias, causando a 'estrias gordurosas' característica associada com os estágios precoces da aterosclerose, e a inibição da enzima Lp-PLA₂ pode ser útil na prevenção do acúmulo desta estria gordurosa (por meio de inibição da formação de lisofosfatidilcolina), e útil no tratamento da aterosclerose.

Adicionalmente, propõe-se que Lp-PLA₂ desempenha um papel direto na oxidação do LDL. Isto deve-se a produtos de peróxido de lipídeo derivados de ácido graxo poliinsaturados da ação de Lp-PLA₂ contribuindo para, e incrementando o processo oxidativo global. De acordo com esta idéia, inibidores de Lp-PLA₂ inibem a oxidação do LDL. Portanto, inibidores de Lp-PLA₂ podem apresentar uma aplicação geral em qualquer distúrbio que envolva a peroxidação de lipídeos em conjunto com a atividade de enzima, por exemplo, adicionalmente a condições, como aterosclerose e diabetes[,] outras condições, como artrite reumatóide, infarto miocárdico e lesão por reperfusão.

O manejo clínico de numerosas distúrbios neurológicos foi frustrado pela natureza progressiva de doenças neurológicas degenerativas,

traumáticas, ou destrutivas e pela limitada eficácia de efeitos secundários sérios de agentes farmacológicos disponíveis. Condições, como doença de Huntington, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, distúrbios de ataques apopléticos graves (p. ex., epilepsia e disautonomia familiar), escaparam da maior parte das tentativas farmacológicas convencionais para aliviar ou curar as condições.

Demência, uma disfunção progressiva do cérebro, leva a uma restrição gradualmente crescente de atividades diárias. O tipo de demência de tipo mais conhecido é mal de Alzheimer. Ele afeta cerca de 10 % da população acima de 65 anos e cerca de 40 % da população acima de 80 anos. Aproximadamente 4,5 milhões de pessoas nos Estados Unidos são acometidos correntemente por esta distúrbio; e espera-se que o número venha a crescer agudamente nos anos à frente, porque esta população demográfica é o segmento de crescimento mais rápido em nossa sociedade. Por volta de 2050, se não forem proporcionados tratamentos preventivos, espera-se que o número de Americanos com mal de Alzheimer venha a triplicar (de 4,6 a 14 milhões) e que o custo de tratar pessoas com a doença nos E.U.A. ultrapassará 100 bilhões de dólares anualmente. Esta epidemia tem implicações enormes para a sociedade, em termos de sofrimento humano e de custo monetário.

A demência vascular é definida como a perda da função cognitiva resultante de lesões cerebrais isquêmicas, isquêmico-hipóxicas, ou hemorrágicas como um resultado de doenças cardiovasculares e alterações patológicas cardiovasculares. Ver, p. ex., G. C. Roman, *Med. Clin. North. Am.*, 86, pp. 477-99 (2002). A demência vascular é uma distúrbio crônica e progressiva. Os sintomas da demência vascular incluem perda cognitiva, cefaléias, insônia e perda de memória. A demência vascular pode ser causada por lacunas múltiplas, e lesões de hipoperfusão, como infartos de zona limítrofe e leucoencefalopatia periventricular isquêmica (doença de Binswanger). Ver, G. C. Roman, *supra*. Em países asiáticos, como a China,

Japão e Coréia, a demência vascular é observada em mais de 60 % dos pacientes com demência.

O tratamento da demência vascular envolve tipicamente o controle de fatores de risco (i.e., hipertensão, diabetes, dieta com alto teor de
5 gordura, hábito de fumar, hiperfibrinogenemia, hiper-homocistinemia, hipotensão ortostática, arritmias cardíacas). Ver, G. C. Roman, *supra*. Pesquisadores também investigaram se terapia de reposição de hormônios e terapia de reposição de estrogênio poderiam retardar o início da demência em
mulheres. Ver, E. Hogervorst *et al.*, *Cochrane Database Syst. Rev.*, 3,
10 CD003799 (2002). No entanto, referida terapia de reposição hormonal apresenta efeitos negativos.

Além disso, embora a aspirina seja amplamente prescrita para a demência vascular, há uma evidência muito limitada de que a aspirina seja realmente eficaz no tratamento de pacientes com demência vascular. Ver, P.
15 S. Williams *et al.*, *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2, CD001296 (2000). A nimodipina tem sido implicada como uma droga que demonstra benefícios de curto prazo em pacientes com demência vascular, mas não foi justificada como uma droga anti-demência de longo prazo. Ver, J. M. Lopez-Arrieta e J. Birks, *Cochrane Database Syst. Rev.*, 3, CD000147 (2002). Adicionalmente,
20 dados clínicos sobre a eficácia do piracetam não corroboram o uso desta droga no tratamento de demência ou deficiência cognitiva. L. Flicker e G. (irimley Evans, *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2, CD001011 (2001).

Até o presente, nenhum tratamento pode prevenir a demência vascular ou interromper o mal de Alzheimer. Para pessoas nos estágios
25 precoces e intermediários da doença, drogas correntes (Cognex, Aricept, Exelon, Razadyne, Namenda) podem reduzir alguns sintomas durante um tempo limitado. Como inflamação no cérebro pode contribuir para o mal de Alzheimer, drogas antiinflamatórias não-esteróides (NSAIDs, Vioxx, Aleve, Celebrex) foram testadas em ensaios clínicos e não apresentaram benefícios.

SUMÁRIO

A presente invenção refere-se a métodos para o tratamento e/ou a prevenção de distúrbios e doença neurodegenerativa por meio de inibição de Lp-PLA₂, por exemplo, inibição da expressão e/ou atividade da
5 proteína Lp-PLA₂. Em concretizações particulares, doenças neurodegenerativas passíveis de tratamento e/ou prevenção por meio dos métodos da presente invenção estão associadas com a função anormal da barreira hematoencefálica (BBB), por exemplo, doença neurodegenerativa com uma BBB permeável, e incluem, por exemplo, embora sem limitação, mal de
10 Alzheimer, doença de Huntington, mal de Parkinson, demência vascular e análogos.

Em uma concretização, os métodos como revelados aqui compreendem administrar a um sujeito que disto necessita tratamento e/ou prevenção de uma doença neurodegenerativa, uma composição farmacêutica
15 compreendendo um agente que inibe Lp-PLA₂, por exemplo, um agente que inibe a expressão de Lp-PLA₂ e/ou a atividade da proteína Lp-PLA₂. Não se pretende que a presente invenção seja limitada a qualquer estágio particular da doença (p. ex., precoce ou avançado).

Em algumas concretizações, como revelado aqui, métodos
20 para prevenir o vazamento da BBB são proporcionados por meio de inibição da Lp-PLA₂, por exemplo, inibição da expressão de Lp-PLA₂ e/ou inibição da atividade da proteína de Lp-PLA₂. Assim, algumas concretizações proporcionam métodos para inibir Lp-PLA₂ por meio de bloqueio da atividade enzimática, e algumas concretizações proporcionam métodos para
25 inibir Lp-PLA₂ por meio da redução e/ou regulação-para-baixo da expressão do RNA de Lp-PLA₂. Em algumas concretizações, a prevenção e/ou a redução do vazamento da BBB ou da permeabilidade da BBB leva à prevenção e/ou redução de sintomas associados com doenças ou distúrbios neurodegenerativas.

Em um aspecto, os métodos como revelados aqui proporcionam métodos de tratar e/ou prevenir uma doença ou distúrbio neurodegenerativa em um sujeito, sendo que os métodos compreendem administrar ao sujeito que disto necessita uma composição farmacêutica compreendendo uma agente que inibe a atividade e/ou a expressão da proteína Lp-PLA₂. Em referida concretização, uma doença ou distúrbio neurodegenerativa do tipo referido pode ser uma doença ou distúrbio neurodegenerativa e pode ser, por exemplo, mas sem limitação, mal de Alzheimer, demência vascular, mal de Parkinson e doença de Huntington. Em concretizações alternativas, a doença ou distúrbio neurodegenerativa está associada com uma barreira hematencefálica anormal. Em uma concretização adicional, o sujeito que recebeu a administração de um agente que inibe a atividade ou a expressão da proteína Lp-PLA₂ é um humano.

Em outra concretização, a presente invenção proporciona métodos de tratar e/ou prevenir um sujeito com ou em risco de demência vascular compreendendo administrar ao sujeito uma composição farmacêutica compreendendo um agente que inibe a atividade e/ou a expressão da proteína Lp-PLA₂, sendo que a inibição da proteína Lp-PLA₂ reduz ou interrompe um sintoma de demência vascular. Em algumas concretizações, a demência vascular está associada com mal de Alzheimer.

Em outra concretização, a presente invenção proporciona métodos de tratar e/ou prevenir uma doença ou distúrbio associada com uma barreira hematencefálica anormal em um sujeito que disto necessita, compreendendo administrar ao sujeito uma composição farmacêutica compreendendo um agente que inibe a expressão e/ou atividade da proteína Lp-PLA₂. Em alguma concretização a BBB anormal é uma barreira hematencefálica permeável, e em concretizações adicionais, a doença ou distúrbio é uma doença ou distúrbio neurodegenerativa. Referidas doenças e distúrbios neurodegenerativos são, por exemplo, embora sem limitação,

demência vascular, mal de Alzheimer, mal de Parkinson e doença de Huntington e análogos.

Em outra concretização, a presente invenção proporciona métodos de diminuir beta amiloide, e é referida como o acúmulo de "A β " no cérebro de um sujeito, compreendendo administrar ao sujeito uma composição farmacêutica compreendendo um agente que inibe a expressão e/ou atividade da proteína Lp-PLA₂, sendo que a inibição da proteína Lp-PLA₂ reduz ou interrompe um sintoma de acúmulo de beta amiloide no cérebro. Em algumas concretizações, o beta amiloide é Abeta-42.

Em algumas concretizações, o agente que inibe Lp-PLA₂ pode inibir a expressão da Lp-PLA₂, por exemplo, inibe a tradução da RNA de Lp-PLA₂ para produzir a proteína Lp-PLA₂. Em concretizações alternativas, o agente que inibe Lp-PLA₂ pode inibir a proteína Lp-PLA₂. Qualquer agente é compreendido para uso nos métodos como revelado aqui. Em algumas concretizações, o agente pode ser uma molécula pequena, ácido nucleico, análogo de ácido nucleico, proteína, anticorpo, peptídio, aptâmero ou variantes ou fragmentos dos mesmos. Em algumas concretizações, o agente é um agente de ácido nucleico, por exemplo, embora sem limitação, um agente de RNAi, por exemplo, embora sem limitação, siRNA, shRNA, miRNA, dsRNA ou ribozima ou variantes dos mesmos.

Em algumas concretizações, o agente que inibe a atividade da proteína de Lp-PLA₂ é uma molécula pequena, por exemplo, embora sem limitação, um inibidor reversível ou irreversível de molécula pequena da proteína Lp-PLA₂. Em algumas concretizações, uma molécula pequena do tipo referido é um composto à base de pirimidiona. Em algumas concretizações, um inibidor de molécula pequena de Lp-PLA₂ é, por exemplo, embora sem limitação, 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)benzil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobenzil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona (que também é conhecida como SB480848) ou um

sal da mesma. Em algumas concretizações, um inibidor de molécula pequena de Lp-PLA₂ é, por exemplo, embora sem limitação, N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetraidro-ciclopentapirimidin-1-il]-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida ou um sal do mesmo. Em

5 algumas concretizações, um inibidor de molécula pequena de Lp-PLA₂ é, por exemplo, embora sem limitação, N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida; ou um sal do mesmo. Em algumas concretizações, um inibidor de molécula pequena de Lp-PLA₂ é, por exemplo, embora sem

10 limitação, 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]-acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil} amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metila ou um sal do mesmo.

Em algumas concretizações, onde a doença neurodegenerativa resulta em um declínio da função cognitiva, por exemplo, onde a doença

15 neurodegenerativa é, por exemplo, o mal de Alzheimer e/ou a demência vascular, sendo que o método de tratamento e/ou prevenção da doença usando os métodos como revelados aqui podem compreender adicionalmente a avaliação da função cognitiva do sujeito após a administração da composição farmacêutica compreendendo uma agente que inibe a expressão e/ou atividade

20 de Lp-PLA₂.

Em concretizações adicionais, os métodos como revelados aqui para o tratamento e/ou a prevenção de doenças neurodegenerativas, e/ou o tratamento e/ou a prevenção de BBB anormal em um sujeito, o método pode compreender adicionalmente o monitoramento do tratamento por meio de

25 avaliação do fluxo sanguíneo cerebral ou da função de barreira hematoencefálica. Referidos métodos podem ser realizados por alguém com prática ordinária na arte, por exemplo, embora sem limitação, avaliação da presença de tau e Aβ-42 no fluido cérebro-espinhal (CSF).

Em algumas concretizações, onde um sujeito recebe a

administração de uma composição farmacêutica compreendendo um inibidor de Lp-PLA₂, os métodos podem compreender adicionalmente administrar ao sujeito agentes terapêuticos adicionais, por exemplo, mas sem limitação, agentes terapêuticos usados no tratamento de distúrbios neurodegenerativas.

5 Por exemplo, onde a distúrbio neurodegenerativa é, por exemplo, mal de Alzheimer, o sujeito pode receber adicionalmente a administração de agentes terapêuticos para o tratamento de mal de Alzheimer, por exemplo, embora sem limitação, ARICEPT ou donepezil, COGNEX ou tacrina, EXELON ou rivastigmina, REMINILA ou galantamina, vacina anti-amilóide, terapias
10 diminuidoras de Abeta, estímulo ou exercício mental.

Em algumas concretizações, os métodos como revelado aqui para o tratamento e/ou a prevenção de doenças neurodegenerativas são aplicáveis a sujeitos, por exemplo, sujeitos mamíferos. Em algumas concretizações, o sujeito é um humano.

15 **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

A Figura 1 mostra evidência de hemorragia induzida por DM/HC e vazamento da BBB. O quadro A mostra nenhuma hemorragia no cérebro de controle, em comparação com o cérebro no cérebro DM/HC no quadro B, sendo que setas pretas mostram células inflamatórias fora do vaso
20 sanguíneo, e seta branca mostra adesão incrementada de células inflamatórias sobre a superfície de células endoteliais. O quadro C mostra nenhuma permeabilidade vascular e a BBB intacta no animal de controle, em comparação com vazamento da BBB no cérebro de animal DM/HC como mostrado no quadro D, sendo que setas em C e D mostram a borda da "nuvem
25 de vazamento" positiva para imunoglobulina (Ig) que envolve vasos sanguíneos pequenos.

A Figura 2 mostra que Ig vazou em cérebros DM/HC liga-se a neurônios e induz colapso de dendritos. Os quadros Esquerdo e Direito mostram neurônios positivos para Ig (Ig-pos) com colapso característico de

dendritos conforme revelado pela "morfologia de sacarolha" dos troncos de dendritos do corpo de células neuroniais.

A Figura 3 mostra evidência da ativação de astrócitos induzida por DM/HC, e mostra imuno-manchamento de GFAP como um marcador para astrócitos ativados nas imediações de "neurônios doentes" no cérebro de animais tratados com DM/HC.

A Figura 4 mostra evidência do acúmulo, induzido por DM/HC, de Abeta-42 em neurônios e na microvasculatura cerebral local. O quadro A mostra neurônios que são intensamente imunopositivos para Abeta-42 e uma arteríola apresentando a deposição de Abeta-42 na camada de músculos lisos vasculares (amiloidose cerebrovascular), e o quadro B mostra que neurônios imunopositivos para Abeta-42 apresentam "dendritos sacarolha" indicativos da retração de dendritos.

A Figura 5 mostra que o inibidor de Lp-PLA₂ previne o vazamento da BBB e a ligação de Ig a neurônios. Os quadros de A a F são imagens representativas do comprometimento da BBB (permeabilidade) dos cérebros de animais DM/HC sem tratamento (n=6), e os quadros de G a L são imagens representativas da BBB intacta de regiões comparáveis no cérebro de animais DM/HC tratados com um inibidor de Lp-PLA₂ (n=6). Os quadros de A a F mostram abundante vazamento de Ig da microvasculatura local do cérebro no tecido cerebral e a ligação de Ig a neurônios em comparação com os quadros de G a L.

A Figura 6 mostra que o inibidor de Lp-PLA₂ preserva a saúde de neurônios em animais DM/HC por meio do bloqueio do efluxo de componentes do plasma (incluindo Ig) de vasos sanguíneos. Como um resultado, a Ig é confinada ao lúmen dos vasos sanguíneos em animais DM/HC tratados com um inibidor de Lp-PLA₂, tornando imunonegativos para Ig tanto paredes das arteríolas e neurônios.

A Figura 7 mostra que o inibidor de Lp-PLA₂ previne o

acúmulo de Abeta-42 em neurônios. Os quadros de A a F são imagens representativas do imunomanchamento de Abeta-42 do imunomanchamento dos cérebros de animais DM/HC sem tratamento (n=6) e quadros de G a L são imagens representativas do imunomanchamento de Abeta-42 em regiões comparativas no cérebro dos animais DM/HC tratados com um inibidor de Lp-PLA₂ (n=6). Como mostrado nos quadros de A a F, a imunorreatividade incrementada de Abeta-42 mostra a ligação de Abeta-42 e o acúmulo em neurônios em comparação com neurônios imunonegativos para Abeta-42 nos quadros de G a L.

A Figura 8 mostra que o inibidor de Lp-PLA₂ reduziu a amiloidose cerebrovascular. O quadro A mostra o imunomanchamento de Abeta-42 na camada de células musculares lisas de arteríolas (i.e., amiloidose cerebrovascular) em cérebros de animais DM/HC sem tratamento, em comparação com o quadro B, que mostra pouco ou nenhum imunomanchamento de Abeta-42 arterial em regiões comparáveis do cérebro de animais DM/HC tratados com um inibidor de Lp-PLA₂.

A figura 9 mostra uma imagem representativa do cérebro porcino, mostrando o cérebro intacto pleno no quadro A e seccionado ao meio ao longo da linha média no quadro B com setas indicando a localização da base do cérebro e do hipocampo, e também como uma grade das regiões do cérebro usadas para análises imuno-histoquímicas.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Como revelado aqui, os inventores verificaram que animais propensos a características patológicas da demência vascular, incluindo vazamento da BBB e permeabilidade e hemorragia, quando tratados com um inibidor de Lp-PLA₂, apresentam sinais e sintomas reduzidos da permeabilidade da BBB e reduzida BBB anormal. Por exemplo, animais tratados com um inibidor de Lp-PLA₂ mostraram reduzida permeabilidade da BBB, menor ativação de células gliais e menos dano neuronal. Em particular,

os animais tratados com um inibidor de Lp-PLA₂ também apresentou menos acúmulo de amilóide, por exemplo, acúmulo de beta-amilóide (ou Abeta-42) no cérebro e na vasculatura do cérebro. Portanto, os inventores verificaram que inibidores de Lp-PLA₂ podem ser usados no tratamento e/ou na
5 prevenção de doenças e distúrbios neurodegenerativos, em particular doenças e distúrbios neurodegenerativos associadas com a função anormal da barreira hematencefálica, por exemplo, doenças neurodegenerativas com permeabilidade da BBB ou incrementada permeabilidade da BBB. Referidas doenças incluem, por exemplo, embora sem limitação, demência vascular,
10 mal de Alzheimer, doença de Huntington, mal de Parkinson e análogos.

Definições

Para maior conveniência, determinados termos empregados em todo o pedido (incluindo a descrição, exemplos, e reivindicações anexas) são agrupados aqui. Exceto se definido de outra forma, todos os termos técnicos e
15 científicos usados aqui têm o mesmo significado como é comumente conhecido por alguém com prática ordinária na arte a que esta invenção se refere.

O termo "doença neurodegenerativa" como usado aqui refere-se a uma seleção variada de distúrbios do sistema nervoso central
20 caracterizadas pela perda gradual e progressiva do tecido neural e/ou da função do tecido neural. Uma doença neurodegenerativa é uma classe de distúrbio ou doença neurológica, e onde a doença neurológica é caracterizado por uma perda gradual e progressiva do tecido neural, e/ou função neurológica alterada, função neurológica tipicamente reduzida como um
25 resultado de uma perda gradual e progressiva do tecido neural. As doenças neurodegenerativas passíveis de prevenção e/ou tratamento usando os métodos como descrito aqui são doenças neurodegenerativas, com o que há uma barreira hematencefálica anormal, por exemplo, uma barreira hematoencefálica permeável. Exemplos de doenças neurodegenerativas em

que há uma barreira hematoencefálica defectiva incluem, por exemplo, embora sem limitação, mal de Alzheimer, doença de Huntington, mal de Parkinson, demência vascular e análogos.

O termo "demência vascular" também é referido como uma
5 "demência de múltiplos infartos" na arte refere-se a um grupo de síndromes causadas por diferentes mecanismos, todos resultantes em lesões vasculares no cérebro. Os subtipos principais de demência vascular são, por exemplo, deficiência cognitiva vascular branda, demência de múltiplos infartos, demência vascular devida a um infarto único estratégico (afetando o tálamo, a
10 artéria cerebral anterior, os lobos parietais ou o giro cingulado), demência vascular devida a lesões hemorrágicas, doença de vasos pequenos (incluindo, p. ex., demência vascular devida a lesões lacunares e doença de Binswanger), e mal de Alzheimer mista com demência vascular.

O termo "doença" ou "distúrbio" é usado aqui de forma
15 intercambiável, e refere-se a qualquer alteração no estado do corpo ou de alguns dos órgãos, interrompendo ou perturbando o desempenho das funções e/ou causando sintomas, como desconforto, disfunção, sofrimento, ou mesmo morte da pessoa acometida ou daquelas em contato com uma pessoa. Uma doença ou distúrbio também pode relacionar-se com uma intemperança,
20 doença, indisposição, doença, distúrbio, doença, doença, queixa, indisposição ou acometimento.

Os termos "barreira hematoencefálica" ou "BBB" são usados aqui de forma intercambiável, e são usados para referir à barreira de permeabilidade que existe em vasos sangüíneos à medida que se deslocam
25 através do tecido cerebral que restringe severamente, e regula estreitamente o que é trocado entre o sangue e o tecido cerebral. Os componentes da barreira hematoencefálica incluem as células endoteliais que formam o revestimento mais interno de todos os vasos sanguíneos, as junções estreitas entre células endoteliais adjacentes que são o correspondente estrutural da BBB, as

membranas de base de células endoteliais e os processos de pé expandidos de astrócitos próximos que cobrem quase toda a superfície exterior exposta do vaso sanguíneo. A BBB impede que a maior parte do sangue entre no tecido cerebral, incluindo a maior parte das moléculas grandes, como Ig, anticorpos, 5 complemento, albumina e drogas e moléculas pequenas.

O termo "BBB anormal" é usado para referir a uma BBB disfuncional, por exemplo, onde a BBB não permita o trânsito de moléculas que transitam normalmente através de uma BBB funcional, por exemplo, nutrientes e açúcares, como glicose. Uma BBB anormal também pode ser 10 referida quando a BBB é permeável a moléculas que uma BBB de funcionamento normal poderia excluir tipicamente, o que é referido aqui tipicamente como "permeabilidade da BBB".

Os termos "permeabilidade da BBB" ou "BBB permeável" são referidos comumente por pessoas versadas na arte como "BBB vazante". Os 15 termos são usados aqui intercambiavelmente referindo a uma integridade prejudicada da BBB e permeabilidade vascular incrementada. Por exemplo, uma BBB permeável permite o trânsito de moléculas através da BBB que uma BBB intacta poderia excluir normalmente do tecido cerebral, por exemplo, moléculas de Ig, proteínas de complemento, albumina do soro e numerosas 20 outras proteínas. Um ensaio para determinar a presença de uma BBB permeável pode ser, por exemplo, para avaliar a presença de Ig extravascular no tecido cerebral que é normalmente restrita ao lúmen de vasos sanguíneos quando a BBB está funcionando normalmente (i.e. quando a BBB não é permeável).

25 O termo "agente" refere-se a qualquer entidade que normalmente não está presente ou não presente nos níveis que são administrados na célula. O agente pode ser selecionado do grupo que compreendendo: químicos; moléculas pequenas; sequências de ácido nucleico; análogos de ácido nucleico; proteínas; peptídios; aptâmeros;

anticorpos; ou fragmentos dos mesmos. Uma sequência de ácido nucleico pode ser RNA ou DNA, e pode ser de filamento simples ou de filamento duplo, e pode ser selecionada de um grupo que compreende; ácido nucleico codificando uma proteína de interesse, oligonucleotídeos, análogos de ácido nucleico, por exemplo, peptídio-ácido nucleico (PNA), PNA pseudo-complementar (pc-PNA), ácido nucleico 'travado' (LNA) [n.t.: também denominado 'RNA inacessível'] etc. Referidas sequências de ácido nucleico incluem, por exemplo, embora sem limitação, sequência de ácido nucleico codificando proteínas, por exemplo, que atuam como repressores transcricionais, moléculas anti-sentido, ribozimas, sequências de ácido nucleico inibitórias pequenas, por exemplo, embora sem limitação, RNAi, shRNAi, siRNA, micro RNAi (mRNAi), oligonucleotídeos anti-sentido etc. Uma proteína e/ou peptídio ou fragmento do mesmo pode ser qualquer proteína de interesse, por exemplo, embora sem limitação: proteínas mutadas; proteínas terapêuticas e proteínas truncadas, sendo que a proteína está normalmente ausente ou é expressa em níveis menores na célula. Proteínas também podem ser selecionadas de um grupo que compreende; proteínas mutadas, proteínas manipuladas geneticamente, peptídios sintéticos, proteínas recombinantes, proteínas quiméricas, anticorpos, *midibodies*, *minibodies*, *triabodies*, proteínas humanizadas, anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos, proteínas modificadas e fragmentos dos mesmos. Alternativamente, o agente pode ser intracelular na célula, como um resultado da introdução de uma sequência de ácido nucleico na célula, e sua transcrição resulta na produção do ácido nucleico e/ou inibidor de proteína da Lp-PLA₂ dentro da célula. Em algumas concretizações, o agente é qualquer químico, entidade ou porção, incluindo sem limitação entidades não-proteináceas sintéticas e naturalmente ocorrentes. Em determinadas concretizações o agente é uma molécula pequena apresentando uma porção química. Por exemplo, porções químicas incluíram porções alquila substituídas ou não

substituídas, aromáticas, ou heterocíclica incluindo macrólidos, leptomicinas e produtos naturais relacionados ou análogos dos mesmos. Agentes podem ser conhecidos por apresentarem uma desejada atividade e/ou propriedade, ou podem ser selecionados de uma biblioteca de compostos diversos.

5 O termo "inibir" como usado aqui significa que a expressão ou atividade da proteína Lp-PLA₂ ou variantes ou homólogos dos mesmos é reduzida a uma extensão, e/ou durante um período, suficiente para produzir o efeito desejado. A redução da atividade pode dever-se ao efeito de uma ou mais características de Lp-PLA₂ incluindo diminuir sua atividade catalítica ou
10 por meio da inibição de um cofator de Lp-PLA₂ ou por meio da ligação com Lp-PLA₂ com um grau de aversez que é tal que o resultado é o tratamento ou a prevenção de uma distúrbio neurodegenerativa ou BBB anormal, como uma BBB permeável. Em particular, a inibição de Lp-PLA₂ pode ser determinada usando-se um ensaio para a inibição de Lp-PLA₂, por exemplo, embora sem
15 limitação, usando o bio-ensaio para a proteína Lp-PLA₂ como revelado aqui.

Como usado aqui, o termo "Lp-PLA₂" refere-se ao alvo de proteína a ser inibido pelos métodos como revelado aqui. Lp-PLA₂ é usada intercambiavelmente com Lp-PLA₂ e fosfolipase associada com lipoproteína A₂, também previamente conhecida na arte como Acetil Hidrolase de Fator
20 Ativador de Plaquetas (PAF acetyl hydrolase) [*Platelet Activating Factor Acetyl Hydrolase*]. Lp-PLA₂ humana é codificada pelo ácido nucleico correspondente ao número de acesso: U20157 (SEQ ID NO: 1) ou Seq ID de Ref: NM_005084 (SEQ ID NO:2) ou e a Lp-PLA₂ humana corresponde à sequência de proteínas correspondente ao número de acesso: NP_005075
25 (SEQ ID NO:3), que são revelados no Pedido de Patente dos E.U.A. 5.981.252, que é incorporado especificamente aqui integralmente por referência.

Como usado aqui, "silenciamento de genes" ou "gene silenciado" com referência a uma atividade de molécula de RNAi, por

exemplo, um siRNA ou miRNA refere-se a um decréscimo do nível de mRNA em uma célula para um gene-alvo em pelo menos cerca de 5 %, cerca de 10 %, cerca de 20 %, cerca de 30 %, cerca de 40 %, cerca de 50 %, cerca de 60 %, cerca de 70 %, cerca de 80 %, cerca de 90 %, cerca de 95 %, cerca de 99 %, cerca de 100 % do nível de mRNA encontrado na célula sem a presença da molécula de interferência de miRNA ou RNA. Em uma concretização preferida, os níveis de mRNA são diminuídos em pelo menos cerca de 70 %, cerca de 80 %, cerca de 90 %, cerca de 95 %, cerca de 99 %, cerca de 100 %.

Como usado aqui, o termo "RNAi" refere-se a qualquer tipo de RNA interferente, incluindo embora sem limitação, siRNAi, shRNAi, microRNA endógeno e microRNA artificial. Por exemplo, isto inclui sequências previamente identificadas como siRNA, independentemente do mecanismo de processamento a jusante do RNA (i.e. embora se acredite que siRNAs apresentem um método específico de processamento *in vivo* resultante na clivagem de mRNA, referidas sequências podem ser incorporadas nos vetores no contexto das sequências de flanqueamento aqui descritas).

Como usado aqui, um "siRNA" refere-se a um ácido nucleico que forma um RNA de filamento duplo, sendo que referido RNA de filamento duplo tem a capacidade de reduzir ou inibir a expressão de um gene ou gene-alvo quando o siRNA está presente ou é expresso na mesma célula que o gene-alvo, por exemplo, Lp-PLA₂. O RNA de filamento duplo siRNA pode ser formado pelos filamentos complementares. Em uma concretização, um siRNA refere-se a um ácido nucleico que pode formar um siRNA de filamento duplo. A sequência do siRNA pode corresponder ao gene-alvo de comprimento pleno, ou uma subsequência do mesmo. Tipicamente, o siRNA tem comprimento de pelo menos cerca de 15 a 50 nucleotídeos (p. ex., cada sequência complementar do siRNA de filamento duplo tem comprimento de

cerca de 15 a 50 nucleotídeos, e o siRNA de filamento duplo tem comprimento de cerca de 15 a 50 pares de bases, de preferência, de cerca de 19 a 30 bases de nucleotídeos, de preferência, comprimento de cerca de 20 a 25 nucleotídeos, p. ex., comprimento de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ou 30 nucleotídeos).

Como usado aqui "shRNA" ou "RNA de grampo-de-cabelo pequeno" (também denominado *stem loop*) é um tipo de siRNA. Em uma concretização, estes shRNAs são constituídos de um nucleotídeo curto, p. ex., com cerca de 19 a cerca de 25 nucleotídeos, filamento anti-sentido, seguido de uma alça de nucleotídios de cerca de 5 a cerca de 9 nucleotídeos, e o filamento *sense* análogo. Alternativamente, o filamento *sense* pode preceder a estrutura de alça dos nucleotídeos e o filamento anti-sentido pode vir a seguir.

Os termos "microRNA" ou "miRNA" são usados aqui de forma intercambiável são RNAs endógenos, sendo que alguns dos quais são conhecidos por regular a expressão de genes codificando proteína no nível pós-transcricional. MicroRNA endógeno consiste de RNAs pequenos naturalmente presentes no genoma e que são capazes de modular o uso produtivo de mRNA. O termo microRNA artificial inclui qualquer tipo de sequência de RNA, diferente do microRNA endógeno, que é capaz de modular o uso produtivo de mRNA. Sequências de microRNA foram descritas em publicações, como Lim, *et al.*, *Genes & Development*, 17, p. 991- 1008 (2003), Lim *et al.*, *Science* 299, 1540 (2003), Lee e Ambros, *Science*, 294, 862 (2001), Lau *et al.*, *Science* 294, 858-861 (2001), Lagos-Quintana *et al.*, *Current Biology*, 12, 735-739 (2002), Lagos Quintana *et al.*, *Science* 294, 853-857 (2001), e Lagos-Quintana *et al.*, *RNA*, 9, 175-179 (2003), que são incorporados por referência. MicroRNAs múltiplos também podem ser incorporados em uma molécula precursora. Adicionalmente, *stem-loops* semelhantes a miRNA podem ser expressos em células como um veículo para fornecer miRNAs artificiais e RNAs interferentes curtos

(siRNAs) com a finalidade de modular a expressão de genes endógenos através das vias de miRNA e ou RNAi.

Como usado aqui, "RNA de filamento duplo" ou "dsRNA" refere-se a moléculas de RNA que são constituídas de dois filamentos.

5 Moléculas de filamento duplo incluem aquelas constituídas de uma molécula de RNA simples que se dobra sobre si mesma para formar uma estrutura de dois filamentos. Por exemplo, a estrutura de *stem loop* das moléculas progenitoras de que o miRNA de filamento duplo é derivado, denominado o pré-miRNA (Bartel *et al.* 2004, *Cell* 116:281-297), compreende uma
10 molécula de dsRNA.

Os termos "paciente", "sujeito" e "indivíduo" são usados aqui de forma intercambiável, e referem-se a um animal, particularmente um humano, a quem se proporciona tratamento, incluindo tratamento profilático. O termo "sujeito" como usado aqui refere-se a animais humanos e não-
15 humanos. Os termos "animais não-humanos" e "mamíferos não-humanos" são usados aqui intercambiavelmente e inclui todos os vertebrados, p. ex., mamíferos, como primatas não-humanos, (particularmente primatas superiores), ovelha, cão, roedor (p. ex., camundongo ou rato), porquinho-da-índia, cabra, porco, gato, coelhos, vacas, e não-mamíferos, como frangos,
20 anfíbios, répteis etc. Em uma concretização, o sujeito é humano. Em outra concretização, o sujeito é um animal experimental ou substituto animal como um modelo de doença.

O termo "gene" usado aqui pode ser um gene genômico compreendendo sequências reguladoras transcricionais e/ou de tradução e/ou
25 uma região codificante e/ou sequências não-traduzidas (p. ex., íntrons, sequências não-traduzidas a 5' e 3' e sequências reguladoras). A região codificante de um gene pode ser uma sequência de nucleotídeos codificando para uma sequência de aminoácidos ou um RNA funcional, como tRNA, rRNA, RNA catalítico, siRNA, miRNA e RNA anti-sentido. Um gene

também pode ser um mRNA ou cDNA correspondente às regiões codificantes (p. ex., éxons e miRNA) opcionalmente compreendendo sequências não-traduzidas a 5' ou 3' ligadas ao mesmo. Um gene também pode ser uma molécula de ácido nucleico amplificada produzida *in vitro* compreendendo
5 toda, ou uma parte da região codificante e/ou sequências não-traduzidas a 5' ou 3' ligadas à mesma.

O termo "ácido nucleico" ou "oligonucleotídeo" ou "polinucleotídeo" usado aqui pode significar pelo menos dois nucleotídeos ligados entre si de forma covalente. Como o perceberão aqueles versados na
10 arte, a ilustração de um filamento duplo também define a sequência do filamento complementar. Assim, um ácido nucleico também compreende o filamento complementar de um filamento simples ilustrado. Como também o perceberão aqueles versados na arte, é possível usar muitas variantes de um ácido nucleico para o mesmo fim que um dado ácido nucleico. Assim, um
15 ácido nucleico também compreende ácidos nucleicos substancialmente idênticos e complementos dos mesmos. Como também o compreenderão aqueles versados na arte, um filamento simples proporciona uma sonda para uma sonda que pode hibridizar a uma sequência-alvo em condições de hibridação estringentes. Assim, um ácido nucleico também compreende uma
20 sonda que hibridiza em condições de hibridização estringentes.

Ácidos nucleicos podem ser filamento simples ou de filamento duplo, ou podem conter porções tanto de sequência de filamento duplo e de filamento simples. O ácido nucleico pode ser DNA, tanto genômico e cDNA, RNA, ou um híbrido, sendo que o ácido nucleico pode conter combinações de
25 desoxirribo- e ribo-nucleotídeos, e combinações de bases incluindo uracila, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina hipoxantina, isocitosina e isoguanina. Ácidos nucleicos podem ser obtidos por meio de métodos de síntese química ou por meio de métodos recombinantes.

Um ácido nucleico conterá, geralmente, ligações fosfodiéster,

embora seja possível incluir análogos de ácido nucleico que podem apresentar pelo menos uma ligação diferente, p. ex., ligações fosforamidoato, fosforotioato, fosforoditioato, ou O-metilfosforoamidita e ligações e espinhas dorsais de ácido nucleico de peptídio. Outros ácidos nucleicos análogos

5 incluem aqueles com espinhas dorsais positivas; espinhas dorsais não-iônicas, e espinhas dorsais não-ribose, incluindo aquelas descritas nas Patentes US nums. 5.235.033 e 5.034.506, que são incorporadas por referência. Ácidos nucleicos contendo um ou mais nucleotídios modificados ou não-naturalmente ocorrentes também são incluídos em uma definição de ácidos

10 nucleicos. O análogo de nucleotídio modificado pode ser localizado, por exemplo, na ponta 5' e/ou na ponta 3' da molécula de ácido nucleico. Exemplos representativos de análogos de nucleotídios podem ser selecionados dentre ribonucleotídeos modificados no açúcar ou espinha dorsal. No entanto, deveria-se notar que também são vantajosos ribonucleotídeos modificados em

15 nucleobase, i.e. ribonucleotídeos, contendo uma nucleobase não-naturalmente ocorrente em lugar de uma nucleobase naturalmente ocorrente, como uridinas ou citidinas modificadas na posição 5, p. ex., 5-(2- amino)propil uridina, 5-bromo uridina; adenosinas e guanosinas modificadas na posição 8, p. ex., 8-bromo guanosina; nucleotídeos deaza, p. ex., 7 deaza-adenosina; nucleotídios

20 O- e N-alquilados, p. ex., N6-metil adenosina. O grupo OH- em 2' pode ser substituído por um grupo selecionado dentre H, OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR² ou CN, sendo que R é C-C6 alquila, alquenila ou alquinila e halo é F, Cl, Br ou I. Modificações da espinha dorsal de ribose-fosfato podem ser realizadas por diversas razões, p. ex., para aumentar a estabilidade e a meia-

25 vida de referidas moléculas em ambientes fisiológicos ou como sondas em um biochip. Misturas de ácidos nucleicos naturalmente ocorrentes e análogos podem ser realizadas; alternativamente, misturas de diferentes análogos de ácido nucleico, e misturas de ácidos nucleicos naturalmente ocorrentes e análogos podem ser realizadas.

O termo "vetor" usado aqui refere-se a uma sequência de ácido nucleico contendo uma origem de replicação. Um vetor pode ser um plasmídeo, bacteriófago, cromossomo bacteriano artificial ou cromossomo de levedura artificial. Um vetor pode ser um vetor de DNA ou RNA. Um vetor
5 pode ser um vetor extracromossômico auto-replicante ou um vetor que integra em um genoma hospedeiro.

Como usado aqui, o termo "tratar" inclui reduzir ou aliviar pelo menos um sintoma ou efeito adverso de uma condição, doença ou distúrbio associada com BBB permeável e/ou demência vascular e/ou mal de
10 Alzheimer. Como usado aqui, o termo tratar é usado para referir à redução de um sintoma e/ou um marcador bioquímico de mal de Alzheimer em pelo menos 10 %. Por exemplo, embora sem limitação, uma redução de um marcador bioquímico de mal de Alzheimer, por exemplo, uma redução da deposição da placa amilóide em 10 %, ou uma redução na ativação de células
15 gliais, por exemplo, uma redução em células que expressam GFAP em 10 %, poderiam ser considerados tratamentos efetivos por meio dos métodos como revelado aqui. Como exemplos alternativos, uma redução de um sintoma, por exemplo, uma diminuição da taxa de perda de memória em 10 % ou uma cessação do declínio da taxa de memória, ou uma redução da perda de
20 memória em 10 % ou um melhoramento da memória em 10 % também poderiam ser considerados tratamentos efetivos pelos métodos como revelado aqui.

O termo "quantidade eficaz" como usado aqui refere-se à quantidade de agente terapêutico de composição farmacêutica para reduzir ou
25 interromper pelo menos um sintoma da doença ou distúrbio, por exemplo, um sintoma ou distúrbio de uma BBB defectiva ou demência vascular. Por exemplo, uma quantidade eficaz usando os métodos, como revelado aqui, poderia ser considerada como a quantidade suficiente para reduzir um sintoma da doença ou distúrbio, por exemplo, demência vascular ou permeabilidade da

BBB em pelo menos 10 %. Uma quantidade eficaz como usado aqui também poderia incluir uma quantidade suficiente para prevenir ou retardar o desenvolvimento de um sintoma da doença, alterar o curso de um sintoma de doença (por exemplo, embora sem limitação, diminuir a progressão de um sintoma da doença), ou reverter um sintoma da doença.

Como usado aqui, os termos "administrar" e "introduzir" são usados intercambiavelmente e referem-se à colocação dos agentes que inibem Lp-PLA₂ como revelado aqui em um sujeito por meio de um método ou via que resulta na localização pelo menos parcial dos agentes em um sítio desejado. Os compostos da presente invenção podem ser administrados por qualquer via apropriada que resulte em um tratamento efetivo no sujeito.

O termo "vetores" é usado intercambiavelmente com "plasmídio" para referir a uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar outro ácido nucleico ao qual ela foi ligada. Vetores capazes de direcionar a expressão de genes e/ou sequência de ácido nucleico a que estão ligados operacionalmente são referidos aqui como "vetores de expressão". De uma forma geral, vetores de expressão de utilidade em técnicas de DNA recombinante encontram-se frequentemente em forma de "plasmídios" que se referem a alças de DNA de filamento duplo circular que, em sua forma de vetor, não são ligados ao cromossomo. Outros vetores de expressão podem ser usados em diferentes concretizações da invenção, por exemplo, embora sem limitação, plasmídeos, episomas, bacteriófagos ou vetores virais, e referidos vetores podem integrar-se no genoma do hospedeiro ou replicar-se autonomamente na célula particular. Outras formas de vetores de expressão conhecidas por aqueles versados na arte e que servem às funções equivalentes também podem ser usadas. Vetores de expressão compreendem vetores de expressão para a expressão estável ou transiente codificando o DNA.

Os artigos "o/a" e "um/uma" são usados aqui para referir a um ou mais de um (i.e., a pelo menos um) do objeto gramatical do artigo. A título

de exemplo, "um elemento" significa um elemento ou mais de um elemento.

Lp-PLA₂; Informação geral

Lp-PLA₂ também é referido na arte como nomes alternativos para Lp-PLA₂. LDL-PLA₂, fosfolipase associada com lipoproteína A₂, PLA₂G7, fosfolipase A₂ (grupo VII), ou acetil-hidrolase de fator ativador de plaquetas (PAF *acetyl hydrolase* ou PAFAH). Lp-PLA₂ humana é codificada por ácido nucleico correspondente ao número de acesso GenBank nº: U20157 (SEQ ID NO: 1) ou Seq ID de Ref: NM_005084 (SEQ ID NO:2) e a Lp-PLA₂ humana corresponde à sequência de proteínas correspondente ao número de acesso GenBank nº: NP_005075 (SEQ ID NO:3), que são revelados na Patente US nº 5.981.252, que é incorporada aqui integralmente especificamente por referência.

Fosfolipase A₂ Associada a Lipoproteína de enzima Fosfolipase A₂ (Lp-PLA₂), a sequência, isolamento e purificação da mesma, ácidos nucleicos isolados que codificam a enzima, e células hospedeiras recombinantes transformadas com DNA que codifica a enzima são reveladas no WO95/00649 (SmithKline Beecham pic), que é incorporado aqui especificamente integralmente por referência. Uma publicação subsequente do mesmo grupo descreve adicionalmente esta enzima (Tew D *et al*, *Arterioscler Thromb Vas Biol* 1996: 16; 591-9) sendo que é referida como LDL-PLA₂ e pedido de patente posterior (WO 95/09921, Icos Corporation) e uma publicação relacionada em *Nature* (Tjoelker *et al*, vol 374, 6 de abril de 1995, 549) descrevem a enzima PAF-AH que tem substancialmente a mesma sequência que Lp-PLA₂.

Mostrou-se que Lp-PLA₂ é responsável pela conversão de fosfatidilcolina a lisofosfatidilcolina, durante a conversão de lipoproteína de baixa densidade (LDL) a sua forma oxidada. A enzima é conhecida por hidrolisar o éster sn-2 da fosfatidilcolina oxidada dando lisofosfatidilcolina e um ácido graxo modificado oxidativamente. Ambos os produtos da ação de

Lp-PLA₂ são biologicamente ativos com lisofosfatidilcolina, apresentando em particular várias atividades pró-aterogênicas atribuídas à mesma incluindo quimotaxia de monócitos e indução da disfunção endotelial, sendo que ambas facilitam o acúmulo de macrófagos derivados de monoócitos no interior da
5 parede arterial.

Os inventores verificaram que animais propensos a distúrbios caracterizadas por vazamento da BBB apresentam uma BBB intacta e sinais reduzidos de permeabilidade da BBB quando tratados com um inibidor de Lp-PLA₂. Referidos animais tratados com um inibidor de Lp-PLA₂ também
10 apresentaram sinais reduzidos de demência vascular, e reduzido acúmulo de beta-amilóide no tecido cerebral e nos vasos sangüíneos que se estendem através do cérebro em comparação com animais não tratados com o inibidor. Portanto, inibidores de Lp-PLA₂ podem ser usados para tratar e/ou prevenir doenças e distúrbios com permeabilidade da BBB, por exemplo, embora sem
15 limitação, doenças neurodegenerativas. Exemplos de doenças neurodegenerativas passíveis de tratamento e/ou prevenção usando-se os métodos como revelado aqui incluem, embora sem limitação, demência vascular, mal de Alzheimer, e outras doenças neurodegenerativas, por exemplo, doença de Huntington e mal de Parkinson.

Agentes que inibem Lp-PLA₂

Em algumas concretizações, a presente invenção refere-se à inibição de Lp-PLA₂. Em algumas concretizações, inibição é inibição de transcrições de ácido nucleico codificando Lp-PLA₂, por exemplo, inibição de RNA mensageiro (mRNA). Em concretizações alternativas, inibição de Lp-
25 PLA₂ é inibição da expressão e/ou inibição de atividade do produto gênico de Lp-PLA₂, por exemplo, o polipeptídio ou proteína de Lp-PLA₂, ou isoformas dos mesmos. Como usado aqui, o termo "produto gênico" refere-se a RNA transcrito de um gene, ou um polipeptídio codificado por um gene ou traduzida de RNA.

Em algumas concretizações, inibição de Lp-PLA₂ é por um agente. É possível usar qualquer agente, por exemplo, embora sem limitação, ácidos nucleicos, análogo de ácidos nucleicos, peptídios, fago, fagomídeos, polipeptídios, peptidomiméticos, ribossomas, aptâmeros, anticorpos, moléculas inorgânicas ou orgânicas pequenas ou grandes, ou qualquer combinação dos
5 mesmos. Em algumas concretizações, agentes úteis em métodos da presente invenção incluem agentes que funcionam como inibidores da expressão de Lp-PLA, por exemplo, inibidores de mRNA codificando Lp-PLA.

Agentes úteis nos métodos como revelado aqui também podem
10 inibir a expressão gênica (i.e. suprimir e/ou reprimir a expressão do gene). Referidos agentes são referidos na arte como "silenciadores de genes" e são comumente conhecidos por aqueles com prática ordinária na arte. Exemplos incluem, embora sem limitação, uma sequência de ácido nucleico, para um RNA, DNA ou análogo de ácido nucleico, e pode ser de filamento simples ou
15 de filamento duplo, e pode ser selecionada de um grupo compreendendo ácido nucleico codificando uma proteína de interesse, oligonucleotídeos, ácidos nucleicos, análogo de ácidos nucleicos, por exemplo, embora sem limitação, peptídio ácido nucleico (PNA), PNA pseudo-complementar PNA (pc-PNA), ácidos nucleicos 'travados' (LNA) e derivados dos mesmos etc. Agentes de
20 ácido nucleico também incluem, por exemplo, embora sem limitação, sequências de ácido nucleico codificando proteínas que atuam como repressores transcricionais, moléculas anti-sentido, ribozimas, sequências de ácido nucleico inibidoras pequenas, por exemplo, embora sem limitação, RNAi, shRNAi, siRNA, micro RNAi (miRNA), oligonucleotídeos anti-
25 sentido, etc.

Como usado aqui, agentes úteis no método como inibidores da expressão de Lp-PLA₂ expressão e/ou a inibição da função da proteína Lp-PLA₂ podem ser qualquer tipo de entidade, por exemplo, embora sem limitação, químicos, sequências de ácido nucleico, análogo de ácidos

nucleicos, proteínas, peptídios ou fragmentos dos mesmos. Em algumas concretizações, o agente é qualquer química, entidade ou porção, incluindo sem limitação, entidades não-proteináceas sintéticas e naturalmente ocorrentes. Em determinadas concretizações o agente é uma molécula pequena apresentando uma porção química. Por exemplo, em algumas concretizações, a porção química é um composto à base de pirimidiona como revelado aqui.

Em concretizações alternativas, agentes úteis nos métodos como revelado aqui são proteínas e/ou peptídios ou fragmento dos mesmos, que inibem a expressão gênica de Lp-PLA₂ ou a função da proteína Lp-PLA₂. Referidos agentes incluem, por exemplo, embora sem limitação, variantes de proteína, proteínas mutadas, proteínas terapêuticas, proteínas truncadas e fragmentos de proteína. Agentes de proteína também podem ser selecionados de um grupo que compreende proteínas mutadas, proteínas geneticamente manipuladas, peptídios, peptídios sintéticos, proteínas recombinantes, proteínas quiméricas, anticorpos, *midibodies*, *minibodies*, *triabodies*, proteínas humanizadas, anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos, proteínas modificadas e fragmentos das mesmas.

Alternativamente, agentes úteis nos métodos como revelado aqui como inibidores de Lp-PLA₂ podem ser um químico, molécula pequena, molécula grande ou entidade ou porção, incluindo sem limitação entidades não-proteináceas sintéticas e naturalmente ocorrentes. Em determinadas concretizações o agente é uma molécula pequena apresentando as porções químicas como revelado aqui.

Moléculas pequenas

Em algumas concretizações, agentes que inibem Lp-PLA₂ são moléculas pequenas. Inibidores irreversíveis ou reversíveis de Lp-PLA₂ podem ser usados nos métodos da presente invenção.

Inibidores irreversíveis de Lp-PLA₂ são revelados em pedidos

de patentes WO 96/13484, WO96/19451, WO 97/02242, WO97/217675, WO97/217676, WO 97/41098, e WO97/41099 (SmithKline Beecham pic) que são incorporados aqui especificamente na íntegra por referência e revelam, *inter alia*, várias séries de compostos de 4-tionil/sulfinil/sulfonila azetidinona que são inibidores da enzima Lp-PLA₂. Estes são inibidores aciladores irreversíveis (Tew *et al*, *Biochemistry*, 37, 10087, 1998).

Inibidores de Lp-PLA₂ efetivos em humanos são comumente conhecidos por pessoas com prática ordinária e incluem aqueles sendo submetidos a avaliação, por exemplo, que estão sendo submetidos a avaliação pré-clínica e clínica incluindo ensaios clínicos de Fase II. Diversos pedidos foram depositados e publicados pela SmithKline Beecham e seu sucessor Glaxo SmithKline. A seguir, uma lista de pedidos publicados relevantes indicados: WO01/60805, WO02/30904, WO03/016287, WO00/66567, WO03/042218, WO03/042206, WO03/042179, WO03/041712, WO03/086400, WO03/087088, WO02/30911, WO99/24420, WO00/66566, WOOO/68208, WO00/10980, e WO2005/021002, que são incorporados especificamente integralmente aqui por referência. Adicionalmente, faz-se referência aos pedidos provisionais dos E.U.A. 60/829.328 e 60/829.327, ambos depositados em 13 de outubro de 2006, que também são incorporados especificamente aqui por referência na íntegra.

Outros inibidores de Lp-PLA₂ úteis nos métodos como revelado aqui são descritos em pedidos de patentes publicados, por exemplo, WO2006063791-A1, WO2006063811-A1, WO2006063812-A1, WO2006063813-A1, todos em nome da Bayer Healthcare; e US2006106017-A1 designado ao Korea Res. Inst. Bioscience & Biotechnology, que são especificamente incorporados aqui integralmente por referência. Inibidores de Lp-PLA₂ também incluem agentes conhecidos, por exemplo, mas não se limitam o uso de estatinas com Niacina (ver www.genengnews.com/news/bnitem.aspx?name=6724568) e fenofibrato (ver

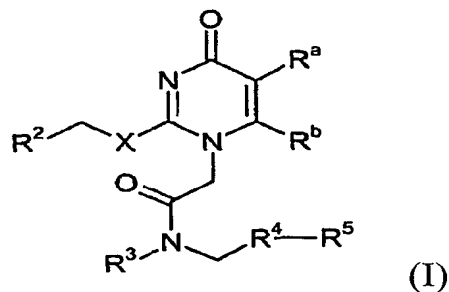
www.genengnews.com/news/bnitem.aspx?name=14817756&taxid=19).

Todos os pedidos apresentados nos parágrafos acima são incorporados aqui por referência. Acredita-se que qualquer um ou todos os compostos revelados nestes documentos são úteis para a profilaxia ou o tratamento de doenças e distúrbios neurodegenerativos, incluindo, por exemplo, embora sem limitação, demência vascular e mal de Alzheimer, e outras doenças neurodegenerativas como revelado aqui, onde ocorre BBB anormal. O modelo porcano de permeabilidade da BBB e doença neurodegenerativa aqui descrito, como exemplificado nos Exemplos, pode ser usado por alguém com prática ordinária na arte para determinar quais dos compostos revelados ou outros inibidores de Lp-PLA₂, por exemplo, anticorpos, ou RNAi são efetivos para o tratamento ou a prevenção de doenças ou distúrbios neurodegenerativas como reivindicado aqui. Em algumas concretizações, agentes que inibem Lp-PLA₂ podem ser avaliados em modelos animais para o efeito de aliviar a permeabilidade da BBB. Por exemplo, é possível usar o modelo porcano de hiperglicemia e hipercolesterolemia como revelado nos Exemplos aqui, sendo que a permeabilidade da BBB é anormal, por exemplo, a BBB é permeável, em que a permeabilidade da BBB pode ser avaliada na presença e na ausência de inibidores para Lp-PLA₂ por meio de métodos comumente conhecidos por pessoas versadas na arte. Em algumas concretizações é possível usar marcadores para a função da BBB, por exemplo, como revelado na Patente US nº 6.884.591, que é incorporada integralmente por referência.

Em uma concretização particular, inibidores de Lp-PLA₂ como divulgado na Patente US nº 6.649.619 e 7.153.861, que são especificamente incorporados aqui integralmente por referência (e Pedido Internacional WO 01/60805) e Patente US nº 7.169.924 que é incorporada aqui integralmente por referência (e Pedido de Patente Internacional WO 02/30911), são úteis nos métodos aqui revelados para a profilaxia ou para o tratamento de

demência vascular, por exemplo, mal de Alzheimer e/ou distúrbios da permeabilidade da BBB. Em algumas concretizações, os inibidores de Lp-PLA₂ como revelado na publicação U.S. nº 2005/0033052A1, que é incorporada aqui integralmente por referência, e Pedidos de Patentes Internacionais WO 02/30904, WO 03/042218, WO 03/042206, WO03/042179, WO 03/041712, WO 03/086400, e WO 03/87088 são inibidores de Lp-PLA₂ reversíveis.

Fórmula (I) É possível usar um grupo de inibidores de Lp-PLA₂ reversíveis que são revelados no pedido internacional WO 01/60805, do qual surgiram as Patentes dos Estados Unidos nums. 6.649.619 e 7.153.861 que são incorporadas aqui integralmente por referência, cujas revelações são incorporadas aqui integralmente, como se apresentadas neste documento. Um grupo menor de compostos de interesse são aqueles de fórmula (I) descritos no WO 01/60805 e reivindicados nas Patentes dos Estados Unidos nums. 6.649.619 e 7.153.861, ou seja:



sendo que:

R^a e R^b em conjunto com os átomos de carbono do anel pirimidina a que estão ligados formam um anel carbocíclico fundido com 5 membros;

R² é fenila, substituído por de um a três átomos de flúor;

R³ é metila ou C₍₁₋₃₎alquila substituído por NR⁸R⁹; ou

R³ é Het-C₍₀₋₂₎alquila em que Het é um anel heterociclila com de 5 a 7 membros apresentando N e em que N é não-substituído ou substituído por C₍₁₋₆₎alquila;

R^4 e R^5 em conjunto formam uma porção 4-(4-trifluorometilfenil)fenila;

R^8 e R^9 que podem ser iguais ou diferentes são selecionados do grupo que consiste de hidrogênio, ou $C_{(1-6)}$ alquila);

5 X é S, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

São ainda mais interessantes os compostos a seguir, todos no escopo da fórmula (I) e revelados nos pedidos e patentes indicados acima:

1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)benzil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobenzil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona,
10 usada no estudo em porco descrito aqui;

1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)benzil)-aminocarbonilmetil)-2-(2,3-difluorobenzil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona;

15 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)benzil)amino-carbonilmetil)-2-(3,4-difluorobenzil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona;

1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)benzil)amino-carbonilmetil)-2-(2,3,4-trifluorobenzil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona;

20 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)benzil)amino-carbonilmetil)-2-(2-fluorobenzil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona;

1-(N-metil-N-(4-(4-trifluorometilfenil)benzil)aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobenzil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona;

25 1-(N-(2-(1-piperidino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)benzil)amino-carbonilmetil)-2-(4-fluorobenzil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona;

1-(N-(1-etilpiperidin-4-il)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)benzil)amino-carbonilmetil)-2-(4-fluorobenzil)tio-5,6-

trimetilenopirimidin-4-ona;

1-(N-(2-etilamino-2-metilpropil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)benzil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobenzil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona;

5 N-(2-t-butilaminoetil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)benzil)amino-carbonilmetil)-2-(4-fluorobenzil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona;

1-(N-(1-metilpiperidin-4-il)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)benzil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobenzil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona;

1-(N-(1-isopropilpiperidin-4-il)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)benzil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobenzil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona;

15 1-(N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)benzil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobenzil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona;

1-(N-(2-(etilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)benzil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobenzil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona; ou um sal farmaceuticamente aceitável destes compostos.

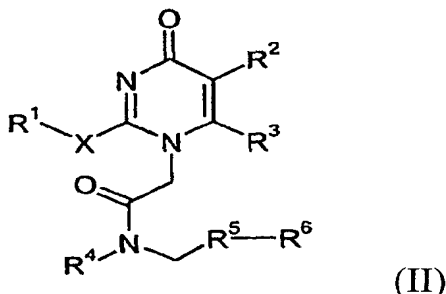
20 Métodos para preparar estes compostos são revelados nos documentos indicados.

Um segundo processo para preparar 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)benzil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobenzil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona pode ser encontrado no pedido WO 03/016287 (Pedido US nº 20050014793A1), que é incorporado aqui integralmente por referência.

Fórmula (II)

Um grupo adicional de compostos que podem ser úteis na prática dos métodos desta invenção encontra-se revelado no WO 02/30911;

Patente US nº 7.169.924 corresponde a este pedido internacional. Ambos são incorporados aqui integralmente. A fórmula genérica naquele caso, representada aqui como fórmula (II), é como a seguir:



em que:

5 R^1 é um grupo arila, opcionalmente substituído por 1, 2, 3 ou 4 substituintes que podem ser iguais ou diferentes selecionados dentre $C_{(1-6)}$ alquila, $C_{(1-6)}$ alcóxi, $C_{(1-6)}$ alquiltio, hidróxi, halogênio, CN, e mono a perfluoro- $C_{(1-4)}$ alquila;

10 R^2 é halogênio, $C_{(1-3)}$ alquila, $C_{(1-3)}$ alcóxi, hidróxi $C_{(1-3)}$ alquila, $C_{(1-3)}$ alquiltio, $C_{(1-3)}$ alquilsulfinila, amino $C_{(1-3)}$ alquila, mono- ou di- $C_{(1-3)}$ alquilamino $C_{(1-3)}$ alquila, $C_{(1-3)}$ alquilcarbonilamino $C_{(1-3)}$ alquila, $C_{(1-3)}$ alcóxi $C_{(1-3)}$ alquilcarbonilamino $C_{(1-3)}$ alquila, $C_{(1-3)}$ alquilsulfonilamino $C_{(1-3)}$ alquila, $C_{(1-3)}$ alquilcarbóxi, $C_{(1-3)}$ alquilcarbóxi $C_{(1-3)}$ alquila, e

15 R^3 é hidrogênio, halogênio, $C_{(1-3)}$ alquila, ou hidróxi $C_{(1-3)}$ alquila; ou

R^2 e R^3 em conjunto com os átomos de carbono do anel pirimidona a que estão ligados formam um anel carbocíclico fundido com 5 ou 6 membros; ou

20 R^2 e R^3 em conjunto com os átomos de carbono do anel pirimidona a que estão ligados formam um anel benzo ou heteroarila fundido opcionalmente substituído por 1, 2, 3 ou 4 substituintes que podem ser iguais ou diferentes selecionados dentre halogênio, $C_{(1-4)}$ alquila, ciano, $C_{(1-6)}$ alcóxi, $C_{(1-6)}$ alquiltio ou mono a perfluoro- $C_{(1-4)}$ alquila;

R^4 é hidrogênio, $C_{(1-6)}$ alquila que pode ser não substituído ou

substituído por 1, 2 ou 3 substituintes selecionados dentre hidróxi, halogênio, OR^7 , COR^7 , carbóxi, $COOR^7$, $CONR^9R^{10}$, NR^9R^{10} , NR^7COR^8 , mono- ou di-(hidróxi $C_{(1-6)}$ alquil)amino e N-hidróxi $C_{(1-6)}$ alquil-N- $C_{(1-6)}$ alquilamino; ou

R^4 é Het- $C_{(0-4)}$ alquila em que Het é um anel heterociclila com de 5 a 7 membros compreendendo N e opcionalmente O ou S, e em que N pode ser substituído por COR^7 , $COOR^7$, $CONR^9R^{10}$, ou $C_{(1-6)}$ alquila opcionalmente substituído por 1, 2 ou 3 substituintes selecionados dentre hidróxi, halogênio, OR^7 , COR^7 , carbóxi, $COOR^7$, $CONR^9R^{10}$ ou NR^9R^{10} , por exemplo, piperidin-4-ila, pirrolidin-3-ila;

R^5 é um anel arila ou heteroarila opcionalmente substituído por 1, 2, 3 ou 4 substituintes que podem ser iguais ou diferentes selecionados dentre $C_{(1-6)}$ alquila, $C_{(1-6)}$ alcóxi, $C_{(1-6)}$ alquiltio, aril $C_{(1-6)}$ alcóxi, hidróxi, halogênio, CN, COR^7 , carbóxi, $COOR^7$, NR^7COR^8 , $CONR^9R^{10}$, $SO_2NR^9R^{10}$, $NR^7SO_2R^8$, NR^9R^{10} , mono a perfluoro- $C_{(1-4)}$ alquila e mono a perfluoro- $C_{(1-4)}$ alcóxi;

R^6 é um anel arila ou heteroarila que é opcionalmente substituído adicionalmente por 1, 2, 3 ou 4 substituintes que podem ser iguais ou diferentes selecionados dentre $C_{(1-18)}$ alquila, $C_{(1-18)}$ alcóxi, $C_{(1-6)}$ alquiltio, $C_{(1-6)}$ alquilsulfonila, aril $C_{(1-6)}$ alcóxi, hidróxi, halogênio, CN, COR^7 , carbóxi, $COOR^7$, $CONR^9R^{10}$, NR^7COR^8 , $SO_2NR^9R^{10}$, $NR^7SO_2R^8$, NR^9R^{10} , mono a perfluoro- $C_{(1-4)}$ alquila e mono a perfluoro- $C_{(1-4)}$ alcóxi, ou $C_{(5-10)}$ alquila;

R^7 é hidrogênio ou $C_{(1-12)}$ alquila, por exemplo, $C_{(1-4)}$ alquila (p. ex., metila ou etila);

R^8 é hidrogênio, $OC_{(1-6)}$ alquila, ou $C_{(1-12)}$ alquila, por exemplo, $C_{(1-4)}$ alquila (p. ex., metila ou etila);

R^9 e R^{10} que podem ser iguais ou diferentes, são selecionados dentre hidrogênio, ou $C_{(1-12)}$ alquila ou R^9 e R^{10} em conjunto com o nitrogênio a que estão ligados formam um anel com de 5 a 7 membros contendo opcionalmente um ou mais heteroátomos adicionais selecionados dentre

oxigênio, nitrogênio e enxofre, e opcionalmente substituído por um ou dois substituintes selecionados dentre hidróxi, oxo, $C_{(1-4)}$ alquila, $C_{(1-4)}$ alquilcarbóxi, arila, p. ex., fenila, ou aralquila, p. ex. benzila, por exemplo, morfolina ou piperazina; e

- 5 X é $C_{(2-4)}$ alquilenos, opcionalmente substituído por 1, 2 ou 3 substituintes selecionados dentre metila e etila, ou $CH=CH$.

Todos os sais de fórmula (II), também podem ser usados no presente método de tratamento.

- São particularmente interessantes os compostos de fórmula (II)
 10 aqui, onde, como indicado no WO 02/30911 para a fórmula (I), R^1 pode ser um grupo fenila opcionalmente substituído por 1, 2, 3 ou 4 substituintes que podem ser iguais ou diferentes selecionados dentre halo, C_1-C_6 alquila, trifluorometila ou C_1-C_6 alcóxi. Mais especificamente, fenila é não substituído ou substituído por 1, 2, 3 ou 4 substituintes de halogênio, particularmente, de
 15 1 a 3 grupos flúor, e, o mais particularmente, 2,3-diflúor, 2,4-diflúor ou 4-flúor.

Uma concretização adicional de fórmula (II) aqui, é onde Y é -
 CH_2CH_2 -.

- Adicionalmente, são interessantes compostos de fórmula (II)
 20 em que R^2 é hidrogênio, por padrão, ou é halo, C_1-C_6 alquila, mono a perfluoro- C_1-C_4 alquila, mono a perfluoro C_1-C_6 alcóxi, ou C_1-C_6 alcóxi; particularmente mono a perfluoro- C_1-C_4 alquila, mono a perfluoro- C_1-C_4 alcóxi, ou C_1-C_6 alcóxi. São particularmente interessantes os compostos de fórmula (II) em que R^2 é diferentes de hidrogênio, n em $(R^2)_n$ é 1, 2, ou 3, e o
 25 padrão de substituição é meta e/ou para, particularmente para, i.e. um substituinte na posição 4. Ver também aqueles compostos em que R^2 é 4-trifluorometila ou 4-trifluorometóxi.

R^3 e R^4 podem ser iguais ou diferentes e são metila, etila, n-propila, ou n-butila. São particularmente interessantes aqueles compostos de

fórmula (II) aqui em que R^3 e R^4 são iguais e são metila, ou etila; metila é particularmente interessante.

R^5 pode ser hidrogênio, $C_{(1-6)}$ alquila que é uma cadeia reta, ou ramificada. São particularmente interessantes metila, etila, propila, isopropila, n-butila, s-butila, iso-butila, f-butila, n-pentila ou n-hexila.

Deve-se considerar que, nos compostos de fórmula (II) aqui há um subgrupo adicional de compostos em que:

R^1 é fenila substituído por 2,3-diflúor;

R^2 e R^3 , em conjunto com os átomos de carbono do anel pirimidina a que estão ligados, formam um anel ciclopentenila fundido de 5 membros;

R^4 é 2-(dietilamino)etila;

R^5 é fenila;

R^6 é fenila substituído por trifluorometila na posição 4, ou tien-2-ila substituído por trifluorometila na posição 5; e

X é $(CH_2)_2$.

Compostos particulares de fórmula (II) interessantes aqui são:

N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetraidro-ciclopentapirimidin-1-il]-N-trifluorometil-bifenil-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetraidro-ciclopentapirimidin-1-il]-N'-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-etilamino-2-metil-propil)-2-(2-(2-(2,3-difluorofenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetraidro-ciclopentapirimidin-1-il)-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)-acetamida;

bitartarato de N-(2-t-butilaminoetil)-2-(2-(2-(2,3-difluorofenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetraidro-ciclopentapirimidin-1-il)-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-etil-piperidin-4-il)-2-(2-(2-(2,3-difluorofenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetraidro-ciclopentapirimidin-1-il)-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;

5 bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(4-fluoro-2-(trifluorometil)fenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetraidro-ciclopentapiriridin-1-il)-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)-acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(4-fluoro-3-(trifluorometil)fenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetraidro-ciclopentapirimidin-1-il)-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)- acetamida;

10 bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(3-cloro-4-fluorofenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetraidro-ciclopentapirimidin-1-il)-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de (+/-)-N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-fenil-propil)-4-oxo-4,5,6,7-tetraidro-ciclopentapirimidin-1-il)-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;

15 bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(2,4-difluorofenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetraidro-ciclopentapirimidin-1-il)-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;

20 bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(2,5-difluorofenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetraidro-ciclopentapirimidin-1-il)-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;

N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(3,4-difluorofenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetraidro-ciclopentapirimidin-1-il)-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;

25 N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(2-fluorofenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetraidro-ciclopentapirimidin-1-il)-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(3-fluorofenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetraidro-ciclopentapirimidin-1-il)-N-(4'-trifluorometil-

bifenil-4-ilmetil)acetamida;

N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(3-clorofenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetraidro-ciclopentapirimidin-1-il)-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;

5 N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(4-clorofenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetraidro-ciclopentapirimidin-1-il)-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;

N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(4-metilfenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetraidro-ciclopentapirimidin-1-il)-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;

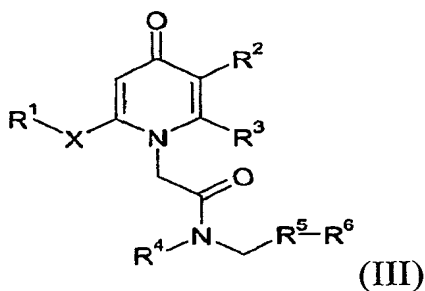
10 N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(4-(trifluorometil)fenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetraidro-ciclopentapirimidin-1-il)-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(4-metoxifenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetraidro-ciclopentapirimidin-1-il)-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(4-(trifluorometóxi)fenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetraidro-ciclopentapirimidin-1-il)-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;

20 ou a base livre de qualquer um dos sais de bitartarato, ou outro sal farmaceuticamente aceitável.

Adicionalmente, são interessantes compostos de fórmula (III), revelados no WO 02/30904:



em que:

R^1 é um grupo arila, opcionalmente substituído por 1, 2, 3 ou 4 substituintes que podem ser iguais ou diferentes selecionados dentre $C_{(1-6)}$ alquila, $C_{(1-6)}$ alcóxi, $C_{(1-6)}$ alquiltio, hidróxi, halogênio, CN, mono a perfluoro- $C_{(1-4)}$ alquila, mono a perfluoro- $C_{(1-4)}$ alcoxiarila, e aril $C_{(1-4)}$ alquila;

5 R^2 é halogênio, $C_{(1-3)}$ alquila, $C_{(1-3)}$ alcóxi, hidróxi $C_{(1-3)}$ alquila, $C_{(1-3)}$ alquiltio, $C_{(1-3)}$ alquilsulfinila, amino $C_{(1-3)}$ alquila, mono- ou di- $C_{(1-3)}$ alquilamino $C_{(1-3)}$ alquila, $C_{(1-3)}$ alquilcarbonilamino $C_{(1-3)}$ alquila, $C_{(1-3)}$ alcóxi $C_{(1-3)}$ alquilcarbonilamino $C_{(1-3)}$ alquila, $C_{(1-3)}$ alquilsulfonilamino $C_{(1-3)}$ alquila, $C_{(1-3)}$ alquilcarbóxi, $C_{(1-3)}$ alquilcarbóxi $C_{(1-3)}$ alquila, e

10 R^3 é hidrogênio, halogênio, $C_{(1-3)}$ alquila, ou hidróxi $C_{(1-3)}$ alquila; ou

R^2 e R^3 em conjunto com os átomos de carbono do anel piridona a que estão ligados formam um anel carbocíclico fundido com 5 ou 6 membros; ou

15 R^2 e R^3 em conjunto com os átomos de carbono do anel piridona a que estão ligados formam um anel benzo ou heteroarila fundido opcionalmente substituído por 1, 2, 3 ou 4 substituintes que podem ser iguais ou diferentes selecionados dentre halogênio, $C_{(1-4)}$ alquila, ciano, $C_{(1-3)}$ alcóxi $C_{(1-3)}$ alquila, $C_{(1-4)}$ alcóxi ou $C_{(1-4)}$ alquiltio, ou mono a perfluoro- $C_{(1-4)}$ alquila;

20 R^4 é hidrogênio, $C_{(1-6)}$ alquila que pode ser não substituído ou substituído por 1, 2 ou 3 substituintes selecionados dentre hidróxi, halogênio, OR^7 , COR^7 , carbóxi, $COOR^7$, $CONR^9R^{10}$, NR^9R^{10} , NR^7COR^8 , mono- ou di-(hidróxi $C_{(1-6)}$ alquil)amino e N-hidróxi $C_{(1-6)}$ alquil-N- $C_{(1-6)}$ alquilamino; ou

25 R^4 é Het- $C_{(0-4)}$ alquila em que Het é um anel heterociclila com de 5 a 7 membros compreendendo N e opcionalmente O ou S, e em que N pode ser substituído por COR^7 , $COOR^7$, $CONR^9R^{10}$, ou $C_{(1-6)}$ alquila opcionalmente substituído por 1, 2 ou 3 substituintes selecionados dentre hidróxi, halogênio, OR^7 , COR^7 , carbóxi, $COOR^7$, $CONR^9R^{10}$ ou NR^9R^{10} , por

exemplo, piperidin-4-ila, pirrolidin-3-ila;

R^5 é um anel arila ou heteroarila opcionalmente substituído por 1, 2, 3 ou 4 substituintes que podem ser iguais ou diferentes selecionados dentre arilC₍₁₋₆₎alcóxi, hidróxi, halogênio, CN, COR⁷, carbóxi, COOR⁷,
 5 NR⁷COR⁸, CONR⁹R¹⁰, SO₂NR⁹R¹⁰, NR⁷SO₂R⁸, NR⁹R¹⁰, mono a perfluoro-C₍₁₋₄₎)alquila e mono a perfluoro-C₍₁₋₄₎alcóxi;

R^6 é um anel arila ou heteroarila que é opcionalmente substituído adicionalmente por 1, 2, 3 ou 4 substituintes que podem ser iguais ou diferentes selecionados dentre C₍₁₋₆₎alquila, C₍₁₋₆₎alcóxi, C₍₁₋₆₎alquiltio, C₍₁₋₆₎alquilsulfonila, arilC₍₁₋₆₎alcóxi, hidróxi, halogênio, CN, COR⁷, carbóxi,
 10 COOR⁷, CONR⁹R¹⁰, NR⁷COR⁸, SO₂NR⁹R¹⁰, NR⁷SO₂R⁸, NR⁹R¹⁰, mono a perfluoro-C₍₁₋₄₎alquila e mono a perfluoro-C₍₁₋₄₎alcóxi, ou C₍₅₋₁₀₎alquila;

R^7 e R^8 são independentemente hidrogênio ou C₍₁₋₁₂₎alquila, por exemplo, C₍₁₋₄₎alquila (p. ex., metila ou etila);

R^9 e R^{10} que podem ser iguais ou diferentes, são selecionados dentre hidrogênio, ou C₍₁₋₁₂₎alquila, ou R^9 e R^{10} em conjunto com o nitrogênio a que estão ligados formam um anel com de 5 a 7 membros contendo opcionalmente um ou mais heteroátomos adicionais selecionados dentre oxigênio, nitrogênio e enxofre, e opcionalmente substituído por um ou dois
 20 substituintes selecionados dentre hidróxi, oxo, C₍₁₋₄₎alquila, C₍₁₋₄₎alquilcarbóxi, arila, p. ex., fenila, ou aralquila, p. ex., benzila, por exemplo, morfolina ou piperazina; e

X é um grupo C₍₂₋₄₎alquilenos (opcionalmente substituído por 1, 2 ou 3 substituintes selecionados dentre metila e etila), CH=CH, (CH₂)_nS ou
 25 (CH₂)_nO em que n é 1, 2 ou 3;

ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos.

São particularmente interessantes aqueles compostos de fórmula (III) em que R^2 e R^3 em conjunto com os átomos de carbono do anel piridona a que estão ligados formam um anel benzo ou heteroarila fundido

opcionalmente substituído por 1, 2, 3 ou 4 substituintes que podem ser iguais ou diferentes selecionados dentre halogênio, C₍₁₋₄₎alquila, ciano, C₍₁₋₄₎alcóxi ou C₍₁₋₄₎alquiltio, ou mono a perfluoro-C₍₁₋₄₎alquila. De preferência, R¹ é fenila opcionalmente substituído por halogênio, C₍₁₋₆₎alquila, trifluorometila, C₍₁₋₆₎alcóxi, de preferência, de 1 a 3 flúor, mais preferivelmente, 2,3-difluoro. Exemplos representativos de R⁴ incluem piperidin-4-ila substituído na posição 1 por metila, isopropila, 1-(2-metoxietil), 1-(2-hidroxietil), t-butoxicarbonila ou etoxicarbonilmetila; etila substituído na posição 2 por aminoetila; 1-etilpiperidinilmetila; piperidin-4-ila; 3-dietilaminopropila; 4-pirrolidin-1-ilbutila e 1-etilpirrolidin-3-ila. De preferência, R⁴ é 1-(2-metoxietil)piperidin-4-ila, 1-metilpiperidin-4-ila ou 1-etilpirrolidin-3-ila. Exemplos representativos de R⁵ incluem fenila e piridila. De preferência, R⁵ é fenila. Exemplos representativos de R⁶ incluem fenila opcionalmente substituído por halogênio, ou trifluorometila, de preferência, na posição 4 e hexila. De preferência, R⁶ é fenila substituído por trifluorometila na posição 4. Exemplos representativos adicionais de R⁶ incluem fenila substituído por 1 ou mais C₍₁₋₃₎alquila. De preferência, R⁶ é fenila substituído por etila na posição 4. De preferência, R⁵ e R⁶ em conjunto formam um 4-(fenil)fenila ou um substituinte 2-(fenil)piridinila em que o anel fenil remoto pode ser opcionalmente substituído por halogênio ou trifluorometila, de preferência, na posição 4. De preferência X é C₍₂₋₄₎alquileno, mais preferivelmente C₍₂₋₃₎alquileno, da forma mais preferível, (CH₂)₂, ou CH₂S.

Deve-se considerar que no grupo de compostos compreendendo fórmula (III) há um subgrupo de compostos em que:

- 25 R¹ é fenila substituído por 2,3-diflúor;
- R² e R³, em conjunto com os átomos de carbono do anel piridona a que estão ligados, formam um anel benzo ou pirido fundido;
- R⁴ é 1-(2-metoxietil)piperidin-4-ila;
- R⁵ e R⁶ em conjunto formam um substituinte 4-(fenil)fenila em

que o anel fenila remoto é substituído por trifluorometila, de preferência, na posição 4; e

X é CH₂S ou (CH₂)₂,

Os compostos a seguir de fórmula (III) são de interesse:

5 bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

N-(2-diethylaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

10 bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-5,6-trimetileno- piridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

15 N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-metilpiperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

20 bitartarato de N-(1-metilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

25 N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-etilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[5-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-metil-7-oxo-7H-tiazolo[4,5-b]piridin-4-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de (±)N-(1-etilpirolidin-3-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de (±)N-(1-etilpirrolidin-3-il)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

dicloridrato de N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida mono paratoluenossulfonato;

bitartarato de N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

monocloridrato de N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

dicloridrato de N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-

4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(4-fluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(4-fluorobenziltio)-4-oxo-5,6-trimetilenopiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-5,6-trimetileno-piridin-1-il]-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;

N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(4-fluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(3,4-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2-fluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(3-clorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il)]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il)]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-pirrolidin-1-iletel)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-isopropilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

5 bitartarato de N-(2-piperidin-1-iletel)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorobenziltio)-7-fluoro-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

10 bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-5-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-metil-7-oxo-7H-tieno[3,2-b]piridin-4-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-5,6-dimetil-4-oxo-4H-piridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

15 bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-5-etil-4-oxo-4H-piridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

20 bitartarato de N-(1-metilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

25 bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-tieno[3,4-b]piridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato d N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-

ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-pirrolidin-1-ilettil)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

5 bitartarato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[6-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-metil-4-oxo-4H-pirazolo[3,4-b]piridin-7-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-isopropilpiperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

10 bitartarato de N-(1-etilpiperidin-4-ilmetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(3-dietilaminopropil)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(4-pirrolidin-1-ilbutil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

20 bitartarato de N-(3-dietilaminopropil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(4-pirrolidin-1-ilbutil)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

25 bitartarato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[5-(2,3-difluorobenziltio)-7-oxo-7H-tieno[3,2-b]piridin-4-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[5-(2-(2,3-

difluorofenil)etil)-2-metil-7-oxo-7H-tiazolo[4,5-b]piridin-4-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-etilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etilil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-etilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-isopropilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-isopropilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-metilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-metilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-etoxicarbonilmetilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-isopropilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

5 bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(3',4'-dimetilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-(t-butoxicarbonil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

10 bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(3',4'-difluorobifenil-4-ilmetil)acetamida;

15 bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[6-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-tieno-[2,3-b]piridin-7-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-metilpiperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

20 bitartarato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3,4-trifluoropheniletile)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[6-(2,3-difluorobenziltio)-2-metil-4-oxo-2,4-diidro-pirazolo[3,4-b]piridin-7-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida

25 bitartarato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[6-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-etil-4-oxo-2,4-diidropirazolo[3,4-b]piridin-7-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[6-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-isopropil-4-oxo-2,4-diidropirazolo[3,4-b]piridin-7-il]-N-

(4'-trifluoronietilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-etilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

5 bitartarato de N-(1-isopropilpiperidin-4-il)-2-[5-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-metil-7-oxo-7H-tiazolo[4,5-b]piridin-4-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[5-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-metil-7-oxo-7H-tiazolo[4,5-b]piridin-4-il]-N-(4'-

10 trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-5,6-trimetileno-piridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

15 bitartarato de N-(1-metilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-5,6-trimetilenopiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-5,6-trimetilenopiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

20 bitartarato de N-(1-isopropilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-5,6-trimetilenopiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[5-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-metil-7-oxo-2,7-diidropirazolo[4,3-b]piridin-4-il]-N-(4'-

25 trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[5-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-1-metil-7-oxo-1,7-diidropirazolo[4,3-b]piridin-4-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-

difluorofenil)etil)-4-oxo-5,6-trimetileno-piridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-7-metil-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-

5 trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-7-metil-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-

trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-metilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-7-metil-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-

10 trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-isopropilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-7-metil-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-

trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

15 bitartarato de N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-7-metil-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-

trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-metilpiperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-5,6-trimetileno-

20 trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-5,6-trimetileno-

trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-isopropilpiperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-5,6-trimetileno-piridin-1-il]-N-(4'-

25 trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-5,6-trimetilenopiridin-1-il]-N-(4'-

trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-5,6-tetrametilenopiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

5 bitartarato de N-(1-metilpiperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-clorobifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-metilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-clorobifenil-4-ilmetil)acetamida;

10 bitartarato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-clorobifenil-4-ilmetil)acetamida;

15 bitartarato de N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-clorobifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(1-isopropilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-clorobifenil-4-ilmetil)acetamida;

20 bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[6-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-metil-4-oxo-4H-pirazolo[3,4-b]piridin-7-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

N-(1-(t-butoxicarbonil)piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

25 bitartarato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[6-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-(2-metoxietil)-4-oxo-4H-pirazolo[3,4-b]piridin-7-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[4-oxo-2-(2-(2,3,4-trifluorofenil)etil)-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-

ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,4-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

5 bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(3-fluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

10 bitartarato de N-(piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartarato de N-(piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-5,6-trimetilenopiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

15 bitartarato de N-(piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

trifluoroacetato de N-(piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

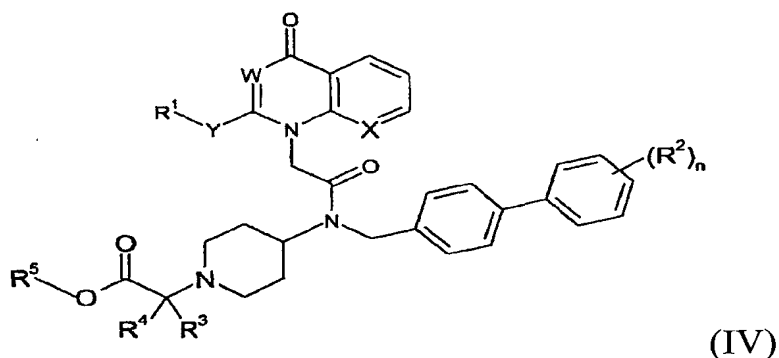
20 N-(2-etilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

N-(2-etilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

25 N-(1-(2-hidroxiethyl)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato; ou sua base livre, ou outro sal farmaceuticamente aceitável.

Fórmula (IV)

Também são interessantes compostos de fórmula (IV)



sendo que:

R^1 é um grupo arila, não substituído ou substituído por 1, 2, 3 ou 4 substituintes que podem ser iguais ou diferentes selecionados do grupo que consiste de C_1 - C_6 alquila, C_1 - C_6 alcóxi, C_1 - C_6 alquiltio, arila C_1 - C_6 alcóxi, hidróxi, halo, CN, COR^6 , $COOR^6$, NR^6COR^7 , $CONR^8R^9$, $SO_2NR^8R^9$, $NR^6SO_2R^7$, NR^8R^9 , halo C_1 - C_4 alquila, e halo C_1 - C_4 alcóxi;

W é CH e X é N, ou W é N e X é CH, W e X são ambos CH, ou W e X são N;

Y é C_2 - C_4 alquila,

R^2 é hidrogênio, C_1 - C_6 alquila, C_1 - C_6 alcóxi, C_1 - C_6 alquiltio, arila C_1 - C_6 alcóxi, hidróxi, halo, CN, COR^6 , carbóxi, $COOR^6$, NR^6COR^7 , $CONR^8R^9$, $SO_2NR^8R^9$, $NR^6SO_2R^7$, NR^8R^9 , mono a perfluoro- C_1 - C_6 alquila, ou mono a perfluoro- C_1 - C_6 alcóxi;

n é 0-5;

R^3 é C_1 - C_4 alquila;

R^4 é C_1 - C_4 alquila;

R^5 é hidrogênio, C_1 - C_{10} alquila, C_2 - C_{10} alquenila, C_2 - C_{10} alquinila, halo C_1 - C_4 alquila, C_3 - C_8 cicloalquila, C_3 - C_8 cicloalquila, C_3 - C_8 cicloalquila C_1 - C_4 alquila, C_5 - C_8 cicloalquenila, C_5 - C_8 cicloalquenila C_1 - C_4 alquila, heterocicloalquila com de 3 a 8 membros, heterocicloalquila C_1 - C_4 alquila com de 3 a 8 membros, C_6 - C_{14} arila, C_6 - C_{14} arila C_1 - C_{10} alquila, heteroarila, ou heteroarila C_1 - C_{10} alquila; sendo que cada grupo é

opcionalmente uma ou mais vezes pelo mesmo grupo e/ou um grupo diferente que é C₁-C₆ alcóxi, C₁-C₆ alquiltio, arila C₁-C₆ alcóxi, hidróxi, halo, CN, NR⁸R⁹, ou halo C₁-C₄ alcóxi.

R⁶ e R⁷ são independentemente hidrogênio ou C₁-C₁₀ alquila;

5 R⁸ e R⁹ são iguais ou diferentes e são hidrogênio ou C₁-C₁₀ alquila, ou R⁹ e R¹⁰ em conjunto com o nitrogênio a que estão ligados formam um anel com de 5 a 7 membros contendo opcionalmente um ou mais heteroátomos adicionais selecionados dentre oxigênio, nitrogênio e enxofre, e
10 opcionalmente substituído por um ou dois substituintes selecionados do grupo que consiste de hidróxi, oxo, C₁-C₄ alquila, C₁-C₄ alquilcarbóxi, arila, e arila C₁-C₄ alquila;

ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos.

Sem desejar excluir quaisquer substituintes definidos e/ou seus radicais indicados do escopo da fórmula (IV), os grupos R a seguir e os
15 radicais associados são particularmente interessantes:

No que se refere a R¹, ele pode ser um grupo fenila opcionalmente substituído por 1, 2, 3 ou 4 substituintes que podem ser iguais ou diferentes selecionados dentre halo, C₁-C₆ alquila, trifluorometila ou C₁-C₆ alcóxi. Mais especificamente, fenila é não substituído ou substituído por 1, 2,
20 3 ou 4 substituintes de halogênio, particularmente, de 1 a 3 grupos flúor, e, o mais particularmente, 2,3-diflúor, 2,4-diflúor ou 4-flúor.

Uma concretização adicional de fórmula (I) é onde Y é -CH₂CH₂-.

A invenção também proporciona um composto de fórmula (I)
25 em que R² é hidrogênio, por padrão, ou é halo, C₁-C₆ alquila, mono a perfluoro-C₁-C₄ alquila, mono a perfluoro C₁-C₄ alcóxi, ou C₁-C₆ alcóxi; particularmente mono a perfluoro- C₁-C₄ alquila, mono a perfluoro- C₁-C₄ alcóxi, ou C₁-C₆ alcóxi. São particularmente interessantes os compostos em que R² é diferente de hidrogênio, n em (R²)_n é 1, 2, ou 3, e o padrão de

substituição é meta e/ou para, particularmente para, i.e., um substituinte na posição 4. Compostos exemplificados incluem aqueles em que R^2 é 4-trifluorometila ou 4-trifluorometóxi.

5 R^3 e R^4 podem ser iguais ou diferentes e são metila, etila, n-propila, ou n-butila. São particularmente interessantes aqueles compostos de fórmula (I) onde R^3 e R^4 são iguais e são metila, ou etila; metila é particularmente interessante.

10 R^5 pode ser hidrogênio, $C_{(1-6)}$ alquila que é uma cadeia reta, ou ramificada. São particularmente interessantes metila, etila, propila, isopropila, n-butila, s-butila, iso-butila, t-butila, n-pentila ou n-hexila.

Qualquer um dos compostos descritos acima pode ser preparado em forma cristalina ou não-cristalina, e, se cristalina, pode ser solvatado, p. ex., como o hidrato. Esta invenção inclui em seu escopo solvatos estequiométricos (p. ex., hidratos).

15 Determinados dos compostos aqui descritos podem conter um ou mais átomos quirais, ou, de outra forma, podem ser capazes de existir como dois enantiômeros. Os compostos úteis nos métodos como descrito aqui incluem misturas de enantiômeros e também enantiômeros purificados ou misturas enriquecidas enantiomericamente. Também se inclui no escopo da
20 invenção os isômeros individuais dos compostos representados pelas fórmulas de (I) a (IV), e também quaisquer misturas totalmente ou parcialmente equilibradas dos mesmos. A presente invenção também compreende isômeros individuais dos compostos reivindicados como misturas com isômeros dos mesmos em que um mais centros quirais são invertidos. Compreende-se
25 também que quaisquer tautômeros e misturas de tautômeros dos compostos reivindicados são incluídos no escopo dos compostos de fórmulas de (I) a (IV). As formas isoméricas diferentes podem ser separadas ou separadas uma da outra por meio de métodos convencionais, ou qualquer isômero dado pode ser obtido por meio de métodos sintéticos convencionais ou por meio de

sínteses estereoespecíficas ou assimétricas.

Sínteses dos Compostos de Fórmula (I), (II), (III) e (IV)

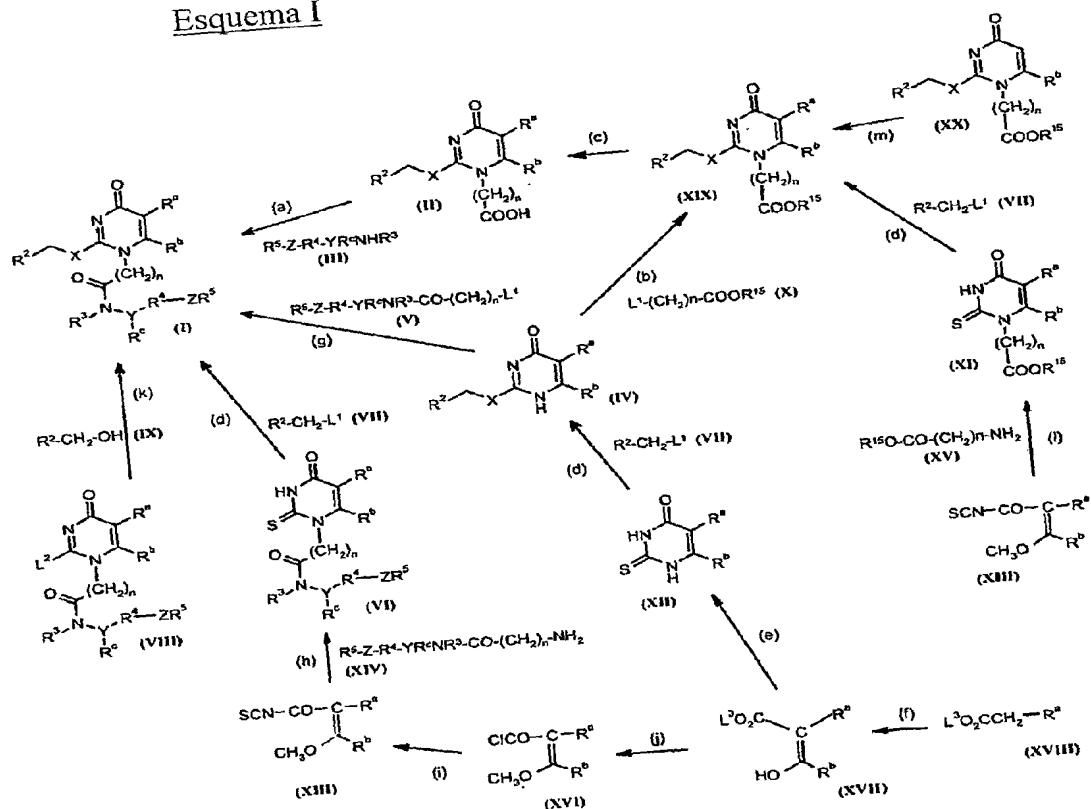
Métodos para preparar compostos de fórmula (I), (II) e (III) foram publicados na literatura de patentes. Por exemplo, métodos para preparar a fórmula (I) podem ser encontrados no WO 01/60805 e WO03/016287. Métodos para a preparação de compostos de fórmula (II) foram apresentados no WO 02/30911, e métodos para preparar compostos de fórmula (III) podem ser encontrados no WO 02/30904. Este documento proporciona métodos para preparar compostos de fórmula (IV), métodos copiados dos Pedidos Provisional dos E.U.A. 60/829.328 e 60/829.327, que são incorporados aqui especificamente por referência.

Alguns exemplos de sínteses são proporcionados abaixo. Para diferenciar entre os vários grupos genéricos dos compostos nos exemplos aqui, materiais relativos à fórmula (I) serão marcados como "Example of Synthesis Approach (I)-I" *et seq.*, para a fórmula (II) "Example of Synthesis Approach (II)-I" *et seq.*, para a fórmula (III), "Example of Synthesis Approach (III)-1 *et seq.*, e para a fórmula (I), "Example of Synthesis Approach (IV)-I, *et seq.*

Síntese da Fórmula (I)

Compostos de fórmulas (I) podem ser preparados por meio do esquema de processo I, como revelado no WO 01/60805:

Esquema I



em que:

L^3 é um grupo C(1-6)alquila, por exemplo, metila;

R^{15} é um grupo C(1-6)alquila, por exemplo, etila ou t-butila e

$L^1, L^2, R^a, R^b, R^c, R^d, R^e, R^f, R^g, R^h, R^i, R^j, R^k, R^l, R^m, R^n, R^o, R^p, R^q, R^r, R^s, R^t, R^u, R^v, R^w, R^x, R^y, R^z, R^{aa}, R^{ab}, R^{ac}, R^{ad}, R^{ae}, R^{af}, R^{ag}, R^{ah}, R^{ai}, R^{aj}, R^{ak}, R^{al}, R^{am}, R^{an}, R^{ao}, R^{ap}, R^{aq}, R^{ar}, R^{as}, R^{at}, R^{au}, R^{av}, R^{aw}, R^{ax}, R^{ay}, R^{az}, R^{ba}, R^{bb}, R^{bc}, R^{bd}, R^{be}, R^{bf}, R^{bg}, R^{bh}, R^{bi}, R^{bj}, R^{bk}, R^{bl}, R^{bm}, R^{bn}, R^{bo}, R^{bp}, R^{bq}, R^{br}, R^{bs}, R^{bt}, R^{bu}, R^{bv}, R^{bw}, R^{bx}, R^{by}, R^{bz}, R^{ca}, R^{cb}, R^{cc}, R^{cd}, R^{ce}, R^{cf}, R^{cg}, R^{ch}, R^{ci}, R^{cj}, R^{ck}, R^{cl}, R^{cm}, R^{cn}, R^{co}, R^{cp}, R^{cq}, R^{cr}, R^{cs}, R^{ct}, R^{cu}, R^{cv}, R^{cw}, R^{cx}, R^{cy}, R^{cz}, R^{da}, R^{db}, R^{dc}, R^{dd}, R^{de}, R^{df}, R^{dg}, R^{dh}, R^{di}, R^{dj}, R^{dk}, R^{dl}, R^{dm}, R^{dn}, R^{do}, R^{dp}, R^{dq}, R^{dr}, R^{ds}, R^{dt}, R^{du}, R^{dv}, R^{dw}, R^{dx}, R^{dy}, R^{dz}, R^{ea}, R^{eb}, R^{ec}, R^{ed}, R^{ee}, R^{ef}, R^{eg}, R^{eh}, R^{ei}, R^{ej}, R^{ek}, R^{el}, R^{em}, R^{en}, R^{eo}, R^{ep}, R^{eq}, R^{er}, R^{es}, R^{et}, R^{eu}, R^{ev}, R^{ew}, R^{ex}, R^{ey}, R^{ez}, R^{fa}, R^{fb}, R^{fc}, R^{fd}, R^{fe}, R^{ff}, R^{fg}, R^{fh}, R^{fi}, R^{fj}, R^{fk}, R^{fl}, R^{fm}, R^{fn}, R^{fo}, R^{fp}, R^{fq}, R^{fr}, R^{fs}, R^{ft}, R^{fu}, R^{fv}, R^{fw}, R^{fx}, R^{fy}, R^{fz}, R^{ga}, R^{gb}, R^{gc}, R^{gd}, R^{ge}, R^{gf}, R^{gg}, R^{gh}, R^{gi}, R^{gj}, R^{gk}, R^{gl}, R^{gm}, R^{gn}, R^{go}, R^{gp}, R^{gq}, R^{gr}, R^{gs}, R^{gt}, R^{gu}, R^{gv}, R^{gw}, R^{gx}, R^{gy}, R^{gz}, R^{ha}, R^{hb}, R^{hc}, R^{hd}, R^{he}, R^{hf}, R^{hg}, R^{hh}, R^{hi}, R^{hj}, R^{hk}, R^{hl}, R^{hm}, R^{hn}, R^{ho}, R^{hp}, R^{hq}, R^{hr}, R^{hs}, R^{ht}, R^{hu}, R^{hv}, R^{hw}, R^{hx}, R^{hy}, R^{hz}, R^{ia}, R^{ib}, R^{ic}, R^{id}, R^{ie}, R^{if}, R^{ig}, R^{ih}, R^{ii}, R^{ij}, R^{ik}, R^{il}, R^{im}, R^{in}, R^{io}, R^{ip}, R^{iq}, R^{ir}, R^{is}, R^{it}, R^{iu}, R^{iv}, R^{iw}, R^{ix}, R^{iy}, R^{iz}, R^{ja}, R^{jb}, R^{jc}, R^{jd}, R^{je}, R^{jf}, R^{jg}, R^{jh}, R^{ji}, R^{jj}, R^{jk}, R^{jl}, R^{jm}, R^{jn}, R^{jo}, R^{jp}, R^{jq}, R^{jr}, R^{js}, R^{jt}, R^{ju}, R^{jv}, R^{jw}, R^{jx}, R^{jy}, R^{jz}, R^{ka}, R^{kb}, R^{kc}, R^{kd}, R^{ke}, R^{kf}, R^{kg}, R^{kh}, R^{ki}, R^{kj}, R^{kk}, R^{kl}, R^{km}, R^{kn}, R^{ko}, R^{kp}, R^{kq}, R^{kr}, R^{ks}, R^{kt}, R^{ku}, R^{kv}, R^{kw}, R^{kx}, R^{ky}, R^{kz}, R^{la}, R^{lb}, R^{lc}, R^{ld}, R^{le}, R^{lf}, R^{lg}, R^{lh}, R^{li}, R^{lj}, R^{lk}, R^{ll}, R^{lm}, R^{ln}, R^{lo}, R^{lp}, R^{lq}, R^{lr}, R^{ls}, R^{lt}, R^{lu}, R^{lv}, R^{lw}, R^{lx}, R^{ly}, R^{lz}, R^{ma}, R^{mb}, R^{mc}, R^{md}, R^{me}, R^{mf}, R^{mg}, R^{mh}, R^{mi}, R^{mj}, R^{mk}, R^{ml}, R^{mm}, R^{mn}, R^{mo}, R^{mp}, R^{mq}, R^{mr}, R^{ms}, R^{mt}, R^{mu}, R^{mv}, R^{mw}, R^{mx}, R^{my}, R^{mz}, R^{na}, R^{nb}, R^{nc}, R^{nd}, R^{ne}, R^{nf}, R^{ng}, R^{nh}, R^{ni}, R^{nj}, R^{nk}, R^{nl}, R^{nm}, R^{nn}, R^{no}, R^{np}, R^{nq}, R^{nr}, R^{ns}, R^{nt}, R^{nu}, R^{nv}, R^{nw}, R^{nx}, R^{ny}, R^{nz}, R^{oa}, R^{ob}, R^{oc}, R^{od}, R^{oe}, R^{of}, R^{og}, R^{oh}, R^{oi}, R^{oj}, R^{ok}, R^{ol}, R^{om}, R^{on}, R^{oo}, R^{op}, R^{oq}, R^{or}, R^{os}, R^{ot}, R^{ou}, R^{ov}, R^{ow}, R^{ox}, R^{oy}, R^{oz}, R^{pa}, R^{pb}, R^{pc}, R^{pd}, R^{pe}, R^{pf}, R^{pg}, R^{ph}, R^{pi}, R^{pj}, R^{pk}, R^{pl}, R^{pm}, R^{pn}, R^{po}, R^{pp}, R^{pq}, R^{pr}, R^{ps}, R^{pt}, R^{pu}, R^{pv}, R^{pw}, R^{px}, R^{py}, R^{pz}, R^{qa}, R^{qb}, R^{qc}, R^{qd}, R^{qe}, R^{qf}, R^{qg}, R^{qh}, R^{qi}, R^{qj}, R^{qk}, R^{ql}, R^{qm}, R^{qn}, R^{qo}, R^{qp}, R^{qq}, R^{qr}, R^{qs}, R^{qt}, R^{qu}, R^{qv}, R^{qw}, R^{qx}, R^{qy}, R^{qz}, R^{ra}, R^{rb}, R^{rc}, R^{rd}, R^{re}, R^{rf}, R^{rg}, R^{rh}, R^{ri}, R^{rj}, R^{rk}, R^{rl}, R^{rm}, R^{rn}, R^{ro}, R^{rp}, R^{rq}, R^{rr}, R^{rs}, R^{rt}, R^{ru}, R^{rv}, R^{rw}, R^{rx}, R^{ry}, R^{rz}, R^{sa}, R^{sb}, R^{sc}, R^{sd}, R^{se}, R^{sf}, R^{sg}, R^{sh}, R^{si}, R^{sj}, R^{sk}, R^{sl}, R^{sm}, R^{sn}, R^{so}, R^{sp}, R^{sq}, R^{sr}, R^{ss}, R^{st}, R^{su}, R^{sv}, R^{sw}, R^{sx}, R^{sy}, R^{sz}, R^{ta}, R^{tb}, R^{tc}, R^{td}, R^{te}, R^{tf}, R^{tg}, R^{th}, R^{ti}, R^{tj}, R^{tk}, R^{tl}, R^{tm}, R^{tn}, R^{to}, R^{tp}, R^{tq}, R^{tr}, R^{ts}, R^{tt}, R^{tu}, R^{tv}, R^{tw}, R^{tx}, R^{ty}, R^{tz}, R^{ua}, R^{ub}, R^{uc}, R^{ud}, R^{ue}, R^{uf}, R^{ug}, R^{uh}, R^{ui}, R^{uj}, R^{uk}, R^{ul}, R^{um}, R^{un}, R^{uo}, R^{up}, R^{uq}, R^{ur}, R^{us}, R^{ut}, R^{uu}, R^{uv}, R^{uw}, R^{ux}, R^{uy}, R^{uz}, R^{va}, R^{vb}, R^{vc}, R^{vd}, R^{ve}, R^{vf}, R^{vg}, R^{vh}, R^{vi}, R^{vj}, R^{vk}, R^{vl}, R^{vm}, R^{vn}, R^{vo}, R^{vp}, R^{vq}, R^{vr}, R^{vs}, R^{vt}, R^{vu}, R^{vv}, R^{vw}, R^{vx}, R^{vy}, R^{vz}, R^{wa}, R^{wb}, R^{wc}, R^{wd}, R^{we}, R^{wf}, R^{wg}, R^{wh}, R^{wi}, R^{wj}, R^{wk}, R^{wl}, R^{wm}, R^{wn}, R^{wo}, R^{wp}, R^{wq}, R^{wr}, R^{ws}, R^{wt}, R^{wu}, R^{wv}, R^{ww}, R^{wx}, R^{wy}, R^{wz}, R^{xa}, R^{xb}, R^{xc}, R^{xd}, R^{xe}, R^{xf}, R^{xg}, R^{xh}, R^{xi}, R^{xj}, R^{xk}, R^{xl}, R^{xm}, R^{xn}, R^{xo}, R^{xp}, R^{xq}, R^{xr}, R^{xs}, R^{xt}, R^{xu}, R^{xv}, R^{xw}, R^{xx}, R^{xy}, R^{xz}, R^{ya}, R^{yb}, R^{yc}, R^{yd}, R^{ye}, R^{yf}, R^{yg}, R^{yh}, R^{yi}, R^{yj}, R^{yk}, R^{yl}, R^{ym}, R^{yn}, R^{yo}, R^{yp}, R^{yq}, R^{yr}, R^{ys}, R^{yt}, R^{yu}, R^{yv}, R^{yw}, R^{yx}, R^{yy}, R^{yz}, R^{za}, R^{zb}, R^{zc}, R^{zd}, R^{ze}, R^{zf}, R^{zg}, R^{zh}, R^{zi}, R^{zj}, R^{zk}, R^{zl}, R^{zm}, R^{zn}, R^{zo}, R^{zp}, R^{zq}, R^{zr}, R^{zs}, R^{zt}, R^{zu}, R^{zv}, R^{zw}, R^{zx}, R^{zy}, R^{zz}$

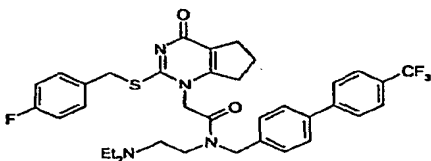
definidos no WO 01/60805.

Uma reação exemplar para preparar um composto de fórmula

(I) de interesse é como a seguir:

Exemplo de abordagem de síntese (I)-I(a)

10 1-(N-(2-(Dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)benzil)aminocarbonil-trimetilenopirimidin-4-ona



Intermediário B69 do WO 01/60805 (87,1 g, 0,26 mol) foi suspenso em diclorometano (2,9 litro). hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (35,2 g, 0,26 mol) e cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (99,7 g, 0,52 mol) foram adicionados e a suspensão foi agitada durante 45 minutos, sendo que neste momento obteve-se a solução completa. Intermediário A30 do WO 01/60805 (91,2 g, 0,26 mol) foi adicionado como uma solução em diclorometano (100 ml) ao longo de 5 minutos e a solução foi agitada durante 4 horas. Adicionou-se mistura de água:solução saturada de cloreto de amônio (1:1, 1 litro) e a solução foi agitada durante 10 minutos. A fase orgânica foi separada e extraída com mistura de cloreto de amônio saturado:água (1:1, 1 litro), extratos foram pH 6. A fase orgânica foi separada e extraída com água (1 litro) contendo ácido acético (10 ml), extrato pH 5. A camada de diclorometano foi separada e extraída com mistura de solução saturada de carbonato de sódio:água:salmoura saturada (1:3:0,2, 1 litro), pH 10,5, depois com mistura de salmoura saturada:água (1:1, 1 litro). A solução castanha foi secada sobre sulfato de sódio anidro na presença de carvão descolorante (35 g), filtrada e o solvente removido em vácuo dando uma espuma marrom escura. A espuma foi dissolvido em acetato de iso-propila (100 ml) e o solvente foi removido em vácuo. O resíduo gomoso castanho escuro foi dissolvido em acetato de iso-propila fervente (500 ml), resfriado à temperatura ambiente, semeado e agitado de um dia para o outro. O sólido creme claro produzido foi removido por filtração e lavado com acetato de iso-propila (100 ml). O sólido foi sugado à secura no síter durante 1 hora, depois recristalizado de acetato de iso-propila (400 ml). Após agitação de um dia para o outro o sólido formado foi removido por filtração, lavados com acetato de iso-propila (80 ml) e secado em vácuo dando o composto do título, 110 g,

63,5 % de rendimento. RMN ^1H (CDCl_3 , mistura de rotâmeros a aprox. 1,9:1) δ 0,99 (6H, t), 2,10 (2H, m), 2,50 (4H, q), 2,58/2,62 (2H, 2 x t), 2,70/2,82 (2H, 2 x t), 2,86 (2H, t), 3,28/3,58 (2H, 2 x t), 4,45/4,52 (2H, 2 x s), 4,68/4,70 (2H, 2 x s), 4,93 (2H, s), 6,95 (2H, m), 7,31 (2H, d), 7,31/7,37 (2H, 2 x m), 7,48/7,52 (2H, d), 7,65 (2H, m), 7,72 (2H, m); MS (APCI) $(\text{M}+\text{H})^+$ 667; p.f. 125°C (por meio de DSC - assimétrica endotérmica).

Exemplo de Abordagem de Síntese (I)-1(b)

bitartarato de 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)benzil)aminocarbonil-metil)-2-(4-fluorobenzil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona

Preparado dos intermediários A30 e B69 no WO 01/60805 por meio do método do Exemplo 1 no WO 01/60805. RMN ^1H (d_6 -DMSO, mistura de rotâmeros de aprox. 1:1) δ 0,92/0,99 (6H, 2x t), 1,99 (2H, m), 2,54 (6H, m), 2,68/2,74 (4H, m), 3,36 (2H, m), 4,21 (2H, s), 4,37/4,44 (2H, 2x s), 4,63/4,74 (2H, 2x s), 4,89/5,13 (2H, 2x s), 7,08/7,14 (2H, 2x m), 7,36-7,50 (4H, m), 7,64/7,70 (2H, 2x d), 7,83 (4H, m); MS (APCI+) encontrado $(\text{M}+1) = 667$; $\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{F}_4\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ requer 666.

Exemplo de Abordagem de Síntese (I)-1(c)

Cloridrato de 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)benzil)aminocarbonil-metil)-2-(4-fluorobenzil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona

A base livre do Exemplo (I)-1 (a) (3,00 g, 0,0045 mol) foi suspensa com agitação em isopropanol (30 ml) e aquecida a 45°C dando uma solução transparente. A solução foi então resfriada à temperatura ambiente e adicionou-se ácido clorídrico conc. (0,40 ml, 0,045 mol). A calda resultante foi então agitada à temperatura ambiente durante 35 minutos, antes de ser resfriada a 0°C durante 35 minutos. A calda foi então filtrada e lavada com isopropanol (10 ml), seguido de heptano (30 ml), antes de ser secada sob vácuo dando o composto do título como um sólido branco (3,00 g, 95 %).

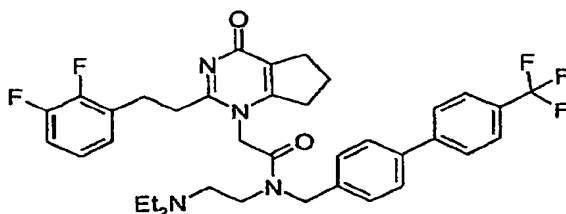
RMN ^1H (CDCl_3) δ 1,38 (6H, t), 2,08 (2H, m), 2,82 (2H, t), 2,99 (2H, t), 3,19 (4H, m), 3,35 (2H, m), 3,97 (2H, s), 4,42 (2H, s), 4,81 (2H, s), 4,99 (2H, s), 6,87 (2H, t), 7,26 (2H, t), 7,33 (2H, d), 7,41 (2H, d), 7,53 (2H, d), 7,71 (2H, d), 11,91 (1H, s).

5 Síntese da Fórmula (II)

Uma descrição de como preparar os compostos de fórmula (II) e exemplos de intermediários e produtos finais para os compostos indicados acima pode ser encontrada no pedido internacional publicado WO 02/30911, que é incorporado aqui por referência. Um método de última etapa para a
10 preparação de um composto útil nesta invenção é o Exemplo (II)-1

Exemplo de Abordagem de Síntese (II)-1.

bitartarato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-difluorofenil)etil]-4-oxo-4,5,6,7-tetraidro-ciclopentapirimidin-1-il]-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida



15 Uma solução de N,N-dietil-N'-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)-etano-1,2-diamina (Int D4 no WO 02/30911) (0,50 g, 1,44 mmol), 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (0,56 g, 1,45 mmol), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (0,12 g) e ácido 2-(2-[2-(2,3-difluorofenil)-etil]-4-oxo-4,5,6,7-tetraidro-ciclopentapirimidin-1-il)-acético (Int C1 no WO 02/30911)
20 (0,48 g, 1,44 mmol) em diclorometano (10 ml) foi agitada à temperatura ambiente de um dia para o outro, depois diluída com diclorometano (30 ml), lavada com bicarbonato de sódio aquoso e evaporada. O resíduo foi purificado por meio de cromatografia (cartucho de 10 g de sílica, acetato de etila-acetona) dando o composto do título como uma espuma amarela (base
25 livre) (0,50 g, 52 %). RMN ^1H (DMSO, mistura de rotâmeros) δ 0,83-0,89

(6H, m), 1,98 (2H, m), 2,40 (4H, m), 2,45-2,82 (10H, m), 3,02 (2H, m), 4,64/4,75 (2H, 2x s), 4,96/5,19 (2H, 2x s), 7,11-7,40 (5H, m), 7,65 (2H, m), 7,84 (4H, m); MS (APCI+) encontrado (M+1) = 667;

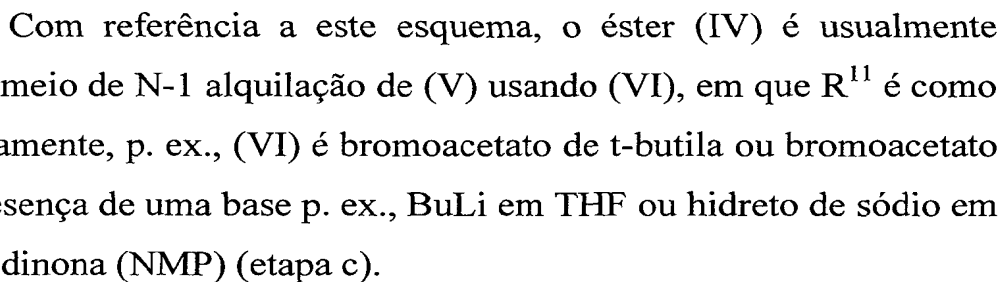
$_{37}\text{H}_{39}\text{F}_5\text{N}_4\text{O}_2$ requer 666.

5 Adicionou-se ácido (0,09 g, 0,60 mmol) a uma solução da base livre (0,40 g, 0,60 mmol) em metanol (10 ml) com agitação. A solução resultante foi evaporado dando o sal (0,49g). RMN ^1H (DMSO, mistura de rotâmeros) δ 0,85-0,97 (6H, m), 1,91-2,00 (2H, m), 2,40-2,49 (4H, m), 2,54-2,82 (10H, m), 3,02-3,46 (2H, m), 4,20 (2H, s), 4,64/4,75 (2H, 2x s),
10 4,97/5,18 (2H, 2x s), 7,11-7,40 (5H, m), 7,65 (2H, m), 7,84 (4H, m); MS (APCI+) encontrado (M+1) = 667; $\text{C}_{37}\text{H}_{39}\text{F}_5\text{N}_4\text{O}_2$ requer 666.

De acordo com este processo, ou alternativamente outros processos descritos no WO 02/30911, é possível preparar os outros compostos indicados acima que apresentam a estrutura de fórmula (II).

15 Síntese da Fórmula (III)

A síntese global de compostos de fórmula (III) é ilustrada no esquema III a seguir, como apresentada no WO02/30904:



Quando X é CH_2S , o intermediário-chave (IV) pode ser sintetizado reagindo-se (XX) com metilida de dimetiloxosulfônio, gerado via o tratamento de iodeto de trimetilsulfoxônio com hidreto de sódio a baixa temperatura, dando um ileto de enxofre (XXII) (etapa q). Tratamento

subsequente de (XXII) com dissulfeto de carbono na presença de diisopropilamina, seguido de $R^1CH_2-L^4$, em que L^4 é um grupo de saída, dá o intermediário (IV) (etapa r).

Alternativamente, quando X é CH_2S , o substituinte R^1X pode ser introduzida por meio de deslocamento de um grupo de saída L^2 (p. ex., Cl) (etapa e) seja sobre um N-óxido de piridina (VIII) ou N-óxido de piridina (XIV), dando piridinas substituídas em 2 (VII) e (XV). A transformação de (VII) ou (XV) à 4-piridona (V) é realizada por meio de desproteção do oxigênio em 4 (p. ex., usando $(Ph_3P)_3RhCl$ quando em etanol aq. quando R^{12} = alila) (etapa d), seguido por (XVI), por meio de remoção do substituinte de N-óxido, usando hidrogênio na presença de Pd/C em ácido acético (etapa k). A piridina (VIII) ou N-óxido de piridina (XIV) pode ser preparada por meio de etapas (i), (h), (g), (f), e (j), em que:

(j) tratamento de (VIII) com ácido m-cloroperbenzóico em diclorometano;

(f) tratamento de (IX) com $R^{12}OH$ (X), em que R^{12} é alila, e hidreto de sódio em DMF;

(g) tratamento de (XI) com oxiclreto de fósforo;

(h) tratamento de (XII) com HCl aq. com aquecimento;

(i) tratamento de (XIII) com malonato de alquila di-inferior e alcóxido de sódio em álcool (em que R^{13} é $C_{(1-6)}$ alquila, tipicamente $R^{13} = Et$); e

R^1-CH_2SH (XIX) é preparado tipicamente a partir do tioacetato, que é formado do brometo de alquila correspondente R^1-CH_2Br .

Alternativamente, quando X é CH_2S e R^2 e R^3 , em conjunto com os átomos de carbono do anel piridona a que estão ligados, formam um anel benzo fundido, o intermediário (IV) pode ser sintetizado a partir de materiais de partida conhecidos por meio das etapas (s), (c) e (v) em que:

(s) tratamento de ácido de Meldrum (XXIII) com hidreto de

sódio a baixa temperatura, seguido de reação com fenilisotiocianato e subsequente tratamento com $R^1 CH_2Br$;

(c) como discutido previamente;

(v) tratamento de (XXV) com ácido trifluoroacético.

5 Quando X é alquilenos, é preferível usar etapas (m) e (h) (intermediários (XVII), (XVIII)) ou etapas (n) e (p) (intermediários (XIX), (XX), (XXI)) em que:

(h) transformação de uma piridina substituída em 4 em uma 4-piridona p. ex., por meio de tratamento de (XVII) $R^{14} = Cl$ com HCl aq. e dioxano, ou desproteção de $R^{14} = OR^{12}$, p. ex., usando condições of etapa (d).

(m) extensão de cadeia de uma 2-alquil piridina, p. ex., em que $X = YCH_2CH_2$ por meio de tratamento de uma 2-metilpiridina (XVIII) com $R^1-Y-CH_2-L^4$ (XVI) em que L^4 é um grupo de saída e uma base forte, como BuLi, em THF.

15 Na via alternativa, o grupo 3-éster é removido do intermediário (XIX) $R^{15} = C_{(1-6)}$ alquila por meio de aquecimento em difenil éter sendo que $R^{15} = tBu$ (etapa n); Intermediário (XIX) é formado a partir da 2,6-dioxo-1,3-oxazina (XX) e éster (XXI) por meio de tratamento com uma base, como NaH em DMF ou 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ene em diclorometano.

Síntese de (XX) a partir dos materiais de partida conhecidos pode ser realizada via as etapas (w) e (c) ou etapas (y) e (c) em que:

(w) tratamento de (XXVII) com azidotrimetilsilano em THF;

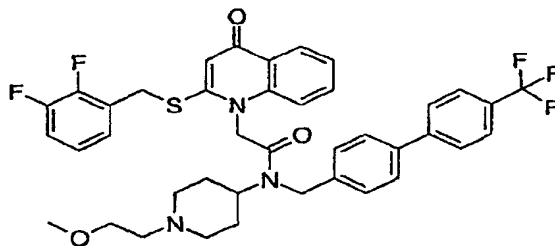
(y) tratamento de (XXVI) com fosgênio;

25 (c) como descrito previamente.

Ver WO02/30904, que é incorporado aqui por referência, para detalhes adicionais e exposição sobre como preparar compostos de fórmula (III).

Exemplo de Abordagem de Síntese (III)-1

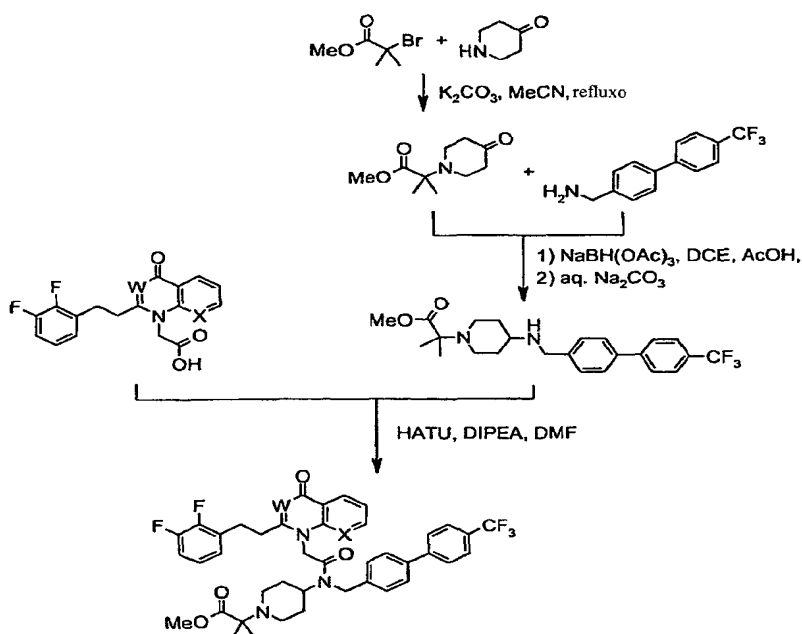
N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida



A base livre foi preparada a partir do Int. E1 e Int. A42 por meio do método do Exemplo 1 no WO 02/30904, exceto por se usar DMF como solvente em lugar de diclorometano. 1,97 g deste material foi cristalizado a partir de acetato de n-butila (10 ml) dando o composto do título (1,35 g). RMN ^1H (CD_3OD) δ 1,7-2,05 (4H, m), 2,05-2,3 (2H, 2xt), 2,5-2,65 (2H, m), 2,95-3,1 (2H, m), 3,3 (3H, s), 3,45-3,55 (2H, m), 3,9-4,05 + 4,4-4,5 (1H, 2xm), 4,37 + 4,48 (2H, 2xs), 4,71 + 4,87 (2H, 2xbr s), 5,31 + 5,68 (2H, 2xs), 6,44 + 6,52 (1H, 2xs), 6,95-7,3 (3H, m), 7,35-7,85 (11H, m), 8,2-8,35 (1H, m); MS (APCI+) encontrado (M+1) 736; $\text{C}_{40}\text{H}_{38}\text{F}_5\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ requer 735.

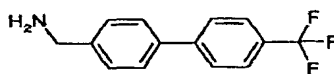
Síntese da Fórmula (IV)

O diagrama de fluxo a seguir ilustra um processo para preparar os compostos desta invenção.



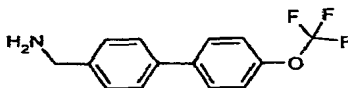
Adicionalmente, o leitor é remetido ao pedido PCT publicado WO 03/016287 para químicas que podem ser úteis na preparação de alguns dos intermediários apresentados neste diagrama de fluxo. Aquelas químicas, na medida em que são úteis neste caso, são incorporadas aqui por referência como se fossem apresentadas plenamente aqui. Adicionalmente, faz-se referência às sínteses apresentadas em pedidos PCT publicados WO 01/60805, WO 02/30911, WO 02/30904, WO 03/042218, WO 03/042206, WO 03/041712, WO 03/086400, e WO 03/87088, e pedidos provisionais copendentes dos E.U.A. 60/829.328 e 60/829.327, ambas depositadas em 13 de outubro de 2006, como indicado acima. Na medida em que o leitor deseja preparar os compostos de fórmula (IV) por meio do uso de intermediários, reagentes, solventes, tempos, temperaturas, etc., diferentes daqueles na via indicada na página precedente, estes pedidos PCT publicados e pedidos copendentes dos E.U.A. podem proporcionar orientação útil. Na medida em que as químicas nestes pedidos são pertinentes à preparação dos presentes compostos, aqueles materiais são incorporados aqui por referência.

Intermediário (IV)-A1 {[4'-(Trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amina



A preparação deste composto foi descrita no WO 02/30911 como Intermediário D7.

Intermediário (IV)-A2 cloridrato de ({4'-[(Trifluorometil)óxi]-4-bifenilil}metil)amina



Uma solução de 4'-[(trifluorometil)óxi]-4-bifenilcarbonitrila (preparado a partir de ácido {4'-[(trifluorometil)óxi]fenil}borônico por meio de um método análogos àquele descrito para o análogo de 4'-trifluorometila, Intermediário D6 do WO 02/30911) (66,6 g) em etanol (2000 ml) e ácido clorídrico concentrado (100 ml) foi hidrogenado sobre catalisador de

Pearlman (10 g) a 25 psi [172,5 kPa]) até a redução completar-se. O catalisador foi removido por meio de filtração através de celite, depois o solvente foi removido em vácuo para se obter o produto desejado.

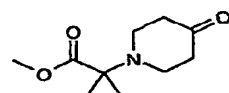
LCMS Rt = 2,212 minutos; m/z [M+H]⁺ = 251,0

5

Intermediários para preparar a fórmula (IV)

Intermediário (IV)-A3

2-metil-2-(4-oxo-1-piperidinil)propanoato de metila



10

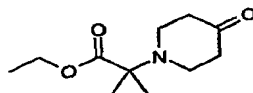
Uma mistura de 2-bromo-2-metilpropanoato de metila (80,87 ml, 5 equiv), monohidrato de cloridrato de 4-piperidona (19,6 g, 1 equiv), acetonitrilo (200 ml) e carbonato de potássio (69,1 g, 4 equiv) foi aquecida em refluxo sob nitrogênio com agitação mecânica durante 17,5 h, depois resfriada em um banho de gelo antes de se adicionar éter de dietila (100 ml). Filtração através de celite seguida de cromatografia de flash (sílica, de 10 a 50 % de acetato de etila em hexano) e evaporação das frações de produto deram o produto desejado como um óleo amarelo (14,28 g).

15

RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,41 (6H,s), 2,47 (4H,m), 2,88 (4H,m), 3,73 (3H,s).

Intermediário (IV)-A4

2-metil-2-(4-oxo-1-piperidinil)propanoato de etila



20

Uma mistura de 2-bromo-2-metilpropanoato de etila (48,3 ml, 5 equiv), monohidrato de cloridrato de 4-piperidona (100 g, 1 equiv), acetonitrilo (1216 ml) e carbonato de potássio (353 g, 4 equiv) foi aquecida em refluxo sob nitrogênio com agitação mecânica durante 20 h, depois resfriada em um banho de gelo antes de se adicionar éter de dietila (aprox. 1400 ml). A mistura foi filtrada através de celite, evaporada em vácuo, depois

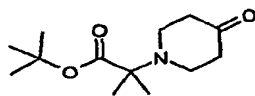
25

o excesso de bromoéster foi removido por destilação (50°C temperatura do topo inerte/10 Torr). Cromatografia de flash (sílica, de 5 a 30 % de acetato de etila em hexano) e evaporação das frações de produto deu o produto bruto como um óleo amarelo. Para remover algum contaminante de bromoéster remanescente, isto foi repartido entre acetato de etila e ácido clorídrico aquoso 2M. A camada orgânica foi descartada e a camada aquosa foi basificada com carbonato de sódio, saturada com cloreto de sódio e extraída com acetato de etila. Secagem e evaporação dos extratos orgânicos deu o produto desejado como um óleo amarelo (54,7 g).

RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,27 (3H,t), 1,40 (6H,s), 2,47 (4H,m), 2,90 (4H,m), 4,20 (2H,q).

Intermediário (IV)-A5

2-metil-2-(4-oxo-1-piperidinil)propanoato de 1,1-dimetiletila

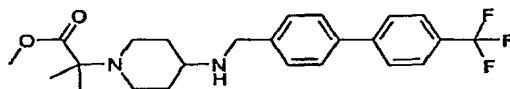


Uma mistura de 1,1-dimetil etil 2-bromo-2-metilpropanoato (8,0 g, 1,1 equiv), cloridrato de 4-piperidona (5,0 g, 1 equiv), acetona (50 ml) e carbonato de potássio (13,0 g, 3 equiv) foi aquecida em refluxo com agitação durante 24 h, depois filtrada e o filtrado foi evaporado. O resíduo bruto foi usado na etapa seguinte sem purificação.

ES+MS m/z [M+H-tBu]⁺ =186,1

Intermediário (IV)-B1

2-metil-2-[4-({[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]propanoato de metila



Uma mistura de 2-metil-2-(4-oxo-1-piperidinil)propanoato de metila (Int. A3) (14,28 g, 1 equiv), {[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amina (Int. A1) (19,6 g, 0,85 equiv), DCE (300 ml), ácido

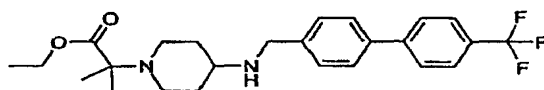
acético (3,8 ml, 0,90 equiv) e triacetoxiboroidreto de sódio (20,7 g, 1,25 equiv) foi agitada à temperatura ambiente sob nitrogênio durante 17,5 h. Adicionou-se carbonato de sódio aquoso (solução 2M, excesso) e isto foi agitado durante 4 h, depois a mistura foi extraída com uma mistura de éter de dietila e THF. Os extratos orgânicos foram retrolavados com água e salmoura, secados sobre sulfato de sódio e filtrados através de um leito de sílica-gel que foi enxaguado com 2,5 % de metanol em DCM. Após evaporação em vácuo, o produto bruto foi cristalizado de éter/hexano, finalmente à temperatura do banho de gelo, que, após secagem, deu um sólido branco (20,9 g).

LCMS Rt = 2,070 minutos; m/z [M+H]⁺ = 435,2

RMN ¹H (d₆-DMSO) δ 1,15-1,32 (8H, m), 1,75-1,87 (2H, m), 1,97-2,12 (2H, m), 2,27- 2,40 (1H, m), 2,77-2,90 (2H, m), 3,60 (3H, s), 3,76 (2H, s), 7,46 (2H, d, J=8,03Hz), 7,67 (2H, d, J=8,28Hz), 7,80 (2H, d, J=8,53Hz), 7,88 (2H, d, 8,03Hz)

Intermediário (IV)-B2

2-metil-2-[4-({[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]propanoato de etila



Uma mistura de 2-metil-2-(4-oxo-1-piperidinil)propanoato de etila (Int. A4) (25,6 g, 1,2 equiv), {[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amina (Int. A1) (31,1 g, 1,0 equiv), DCE (400 ml) e ácido acético (6,3 ml, 1,1 equiv) foi agitada à temperatura ambiente sob nitrogênio. Adicionou-se triacetoxiboro-hidreto de sódio (33,5 g, 1,5 equiv) e continuou-se agitando durante 19 horas. Adicionou-se carbonato de sódio aquoso (solução 2M, excesso) e isto foi agitado durante 1,5 h, então a mistura foi extraída com uma mistura de éter de dietila e THF. Os extratos orgânicos foram retrolavados com água e salmoura, filtrados através de um leito de sílica-gel, secados sobre sulfato de sódio e evaporados em vácuo. O produto desejado foi obtido como

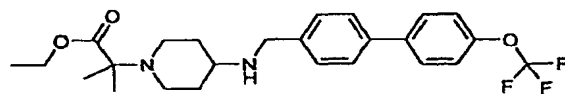
um sólido branco (44,2 g) que foi usado sem purificação adicional.

LCMS Rt = 2,194 minutos; m/z [M+H]⁺ = 449,3

RMN ¹H (d₆-DMSO) δ 1,06-1,32 (11H,m), 1,74-1,89 (2H,m),
1,99-2,14 (2H, m), 2,25-2,39 (1H, m), 2,69-2,89 (2H, m), 3,75 (2H, s), 4,01-
5 4,12 (2H, m), 7,45 (2H, d, J=7,55 Hz), 7,67 (2H, d, J=7,81 Hz), 7,79 (2H, d,
J=8,06 Hz), 7,88 (2H, d, J=8,06Hz)

Intermediário (IV)-B3

2-metil-2-{4-[(4'-[(trifluorometil)óxi]-4-bifenilil}metil)amino]-1-piperidinil}propanoato de etila

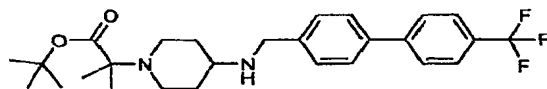


10 Uma mistura de 2-metil-2-(4-oxo-1-piperidinil)propanoato de etila (Int. A4) (1,09 g, 1,2 equiv), cloridrato de ({4'-[(trifluorometil)óxi]-4-bifenilil}metil)amina (Int. A2) (1,28g, 1,0 equiv), DCE (21ml) e ácido acético (0,27 ml, 1,1 equiv) foi agitada à temperatura ambiente sob nitrogênio. Adicionou-se triacetoxiboro-hidreto de sódio (1,42 g, 1,5 equiv) e continuo-se
15 agitando durante 3 horas. Adicionou-se carbonato de sódio aquoso (solução 2M, excesso) e isto foi agitado durante 45 min, então a mistura foi repartida com uma mistura de éter de dietila/THF e água. Os extratos orgânicos foram retrolavados com água e salmoura, e secados sobre sulfato de sódio e evaporados em vácuo. O produto desejado foi obtido como um sólido amarelo
20 claro (2,14 g) que foi usado sem purificação adicional.

LCMS Rt = 2,244 minutos; m/z [M+H]⁺ = 465,3

Intermediário (IV)-B4

2-metil-2-[4-({[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil} amino)-1-piperidinil]propanoato de 1,1-dimetiletila



25 Uma mistura de 2-metil-2-(4-oxo-1-piperidinil)propanoato de

1,1-dimetiletila (Int. A6) (370 mg, 1,2 equiv), {[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amina (Int. A1) (397 mg, 1 equiv), triacetoxiboro-hidreto de sódio (400 mg, 1,5 equiv), DCM (10 ml) e ácido acético (0,076 ml, 1 equiv) foi combinada e agitada à temperatura ambiente até LCMS confirmar o desaparecimento do material de partida amina (aprox. 18 horas). Adicionou-se carbonato de sódio aquoso e então isto foi extraído com DCM. Os orgânicos foram secados sobre sulfato de sódio e concentrados dando um sólido (420 mg) que foi usado sem purificação adicional.

LCMS Rt = 2,24 minutos; m/z [M+H]⁺ = 477,3

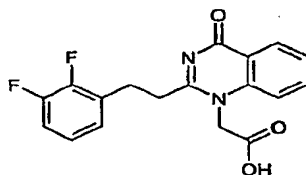
10

Intermediário (IV)-C1

ácido

[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-

quinazolinil]acético



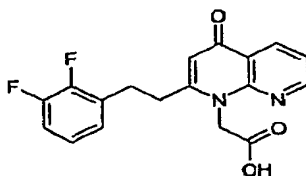
A preparação deste composto foi descrita no WO 02/30911 como Intermediário C43.

15

Intermediário (IV)-C2

ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1,8-naftiridin-1(4H)-

il]acético



A preparação deste composto foi descrita no WO 02/30904 como Intermediário E21.

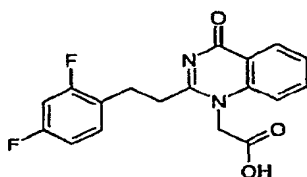
20

Intermediário (IV)-C3

ácido

[2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-

quinazolinil]acético

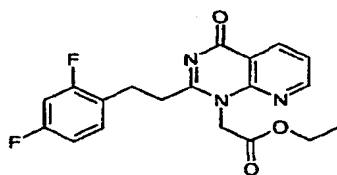


A preparação deste composto foi descrita no WO 02/30911 como Intermediário C45.

Intermediário (IV)-C4

[2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1

5 (4H)-il]acetato de etila



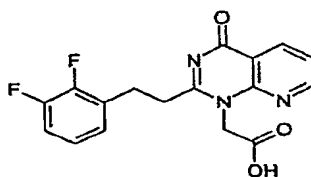
Uma mistura de (2,4-dioxo-3,4-diidropirido[2,3-d]pirimidin-1(2H)-il)acetato de etila (WO 02/30911, Intermediário B52) (40,8 g, 1,2 equiv) e 3-(2,4-difluorofenil)-propanimidamida (preparada por meio de métodos análogos àqueles descritos para o isômero 2,3-difluor, Intermediários de A1 a A3 do WO 02/30911) (30,0 g, 1 equiv) foi fundida em um banho de óleo a 150°C durante 25 min, depois resfriada rapidamente à temperatura ambiente em um banho de água. Cromatografia (sílica, produto bruto carregado em DCM e eluído com de 50 a 100 % de acetato de etila em hexano) deu o produto desejado (43,56 g).

15 LCMS Rt = 2,521 minutos; m/z [M+H]⁺ = 374,1

RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,31 (3H, t), 3,13 (2H, m), 3,26 (2H, m), 4,28 (2H, q), 5,27 (2H, s), 6,82 (2H, m), 7,34 (1H, m), 7,50 (1H, m), 8,65 (1H, m), 8,74 (1H, m).

Intermediário (IV)-C5

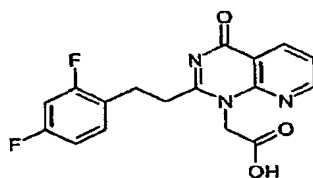
20 ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acético



A preparação deste composto foi descrita no WO 02/30911 como Intermediário C35.

Intermediário (IV)-C5

ácido [2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acético

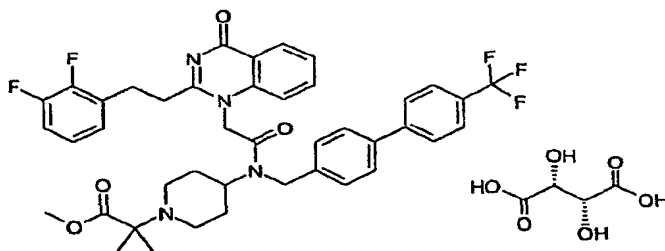


[2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetato de etila (Int. C1) (32,76 g, 1 equiv) foi dissolvido em etanol (350 ml) e água (70 ml), resfriado em gelo, depois adicionou-se hidróxido de lítio aquoso (solução 2M, 43,42 ml, 0,99 equiv). A agitação continuou durante 2 h à temperatura ambiente. A solução foi concentrada em vácuo e o resíduo foi redissolvida em água (700 ml) e bicarbonato de sódio aquoso saturado (50 ml), depois lavada com acetato de etila (200 ml). A camada aquosa foi acidificada a pH 2 com ácido clorídrico 2M, e o precipitado foi removido por filtração, lavado com água gelada (50 ml) e secado em vácuo (50°C, 16 h) para se obter o produto desejado (23,2 g).

RMN ^1H ($\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 2,4-2,6 (4H, m), 5,24 (2H, s), 7,04 (1H, m), 7,22 (1H, m), 7,48 (1H, m), 7,60 (1H, m), 8,47 (1H, m), 8,84 (1H, m).

Exemplo (IV)-1

2,3-diidroxibutanodioato de 2-[4-([2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil){[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metila (sal)



Uma mistura de ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil] acético (Int. C1) (100 mg, 1 equiv), 2-metil-2-[4-([4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]propanoato de metila (Int. B1) (130 mg, 1,03 equiv), DIPEA (0,1 ml, 3,6 equiv), acetonitrilo (2 ml) e HATU (130 mg, 1,4 equiv) foi agitada à temperatura ambiente durante 1 h, depois evaporada e redissolvida em acetonitrilo. Purificação por meio de HPLC de fase invertida (Método Preparativo A) deu 2-[4-([2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metila (128 mg).

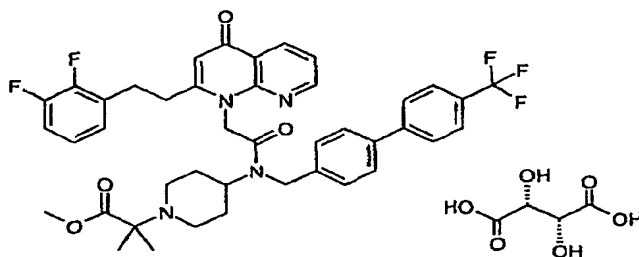
LCMS Rt = 2,686 minutos; m/z $[M+H]^+ = 761,3$

RMN ^1H ($CDCl_3$) δ 1,33 (3H, s), 1,36 (3H, s), 1,83-2,02 (4H, m), 2,36-2,48 (2H, m), 2,87-2,91 (1H, m), 3,06-3,09 (2H, m), 3,16-3,20 (2H, m), 3,26-3,29 (1H, m), 3,71-3,73 (3H, m), 4,02/4,51 (1H, 2x br m), 4,74 (1H, s), 4,92 (1H, s), 5,12 (1H, s), 5,56 (1H, s), 7,00-7,19 (3H, m), 7,32-7,37 (1H, m), 7,48-7,62 (5H, m), 7,72-7,81 (5H, m), 8,22-8,28 (1H, m).

A base livre foi convertida ao sal de bitartrato por meio de adição de ácido L-tartárico (1,675 g, 1,0 equiv) de uma só vez e agitada durante 30 minutos à temperatura ambiente. A solução foi concentrada em vácuo a um pó branco-sujo que foi secado em uma estufa a vácuo à temperatura ambiente.

Exemplo de Abordagem de Síntese (IV)-2

2,3-diidroxibutanodioato de 2-[4-([2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1,8-naftiridin-1(4H)-il]acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metila (sal)



Uma mistura de ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1,8-naftiridin-1 (4H)-il]acético (Int. C2) (100 mg, 1 equiv), carbonildiimidazol (50 mg, 1,05 equiv) e dimetil acetamida (4 ml) foi agitada a 60°C durante 30 min, depois adicionou-se 2-metil-2-[4-({[4'-(trifluoro-metil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]propanoato de metila (Int. B1) (132 mg, 1,05 equiv) e a temperatura foi elevada a 80°C durante 2 h. Adicionou-se uma porção adicional de carbonildiimidazol (0,5 equiv) e continuou-se agitando a 80°C durante 15 h. Após resfriamento, a mistura bruta foi submetida a HPLC de fase invertida (Método Preparativo A) para se obter 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1,8-naftiridin-1(4H)-il]-acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metila (99 mg).

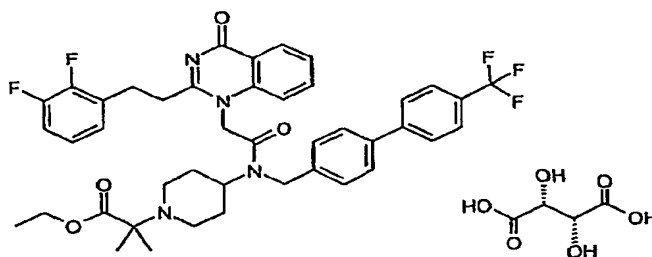
LCMS Rt = 2,845 minutos; m/z [M+H]⁺ = 761,3

RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,28 (3H, s), 1,31 (3H, s), 1,73-2,05 (4H, m), 2,25 (1H, t), 2,39-2,46 (1H, m), 2,96-2,99 (1H, m), 3,00-3,12 (4H, m), 3,19 (1H, s), 3,68-3,73 (3H, m), 4,11/4,41 (1H, 2x br m), 4,73 (1H, s), 4,97 (1H, s), 5,51 (1H, s), 6,29-6,34 (1H, m), 7,06-7,20 (2H, m), 7,35-7,41 (1H, m), 7,48-7,58 (2H, m), 7,68-7,84 (6H, m), 8,60-8,68 (1H, m), 8,87-8,91 (1H, m).

Isto foi convertido ao sal de bitartrato por meio de um método análogo àquele descrito para o Exemplo de Abordagem de Síntese (I).

Exemplo de Abordagem de Síntese (IV)-3

2,3-diidroxibutanodioato de 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de etila (sal)



Uma mistura de ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acético (Int. C1) (115 mg, 1 equiv), 2-metil-2-[4-({[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]propanoato de etila (Int. B2) (150 mg, 1 equiv), HATU (151 mg, 1,2 equiv), DMF (2,7 ml) e DIPEA (0,17 ml, 3 equiv) foi agitada à temperatura ambiente durante 5 h. A mistura de reação foi repartida entre acetato de etila/metanol e bicarbonato de sódio aquoso, então a camada orgânica foi lavada com salmoura e secada. Cromatografia de flash (sílica, metanol a de 3 a 4 % em DCM) deu 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de etila como um sólido branco (190 mg).

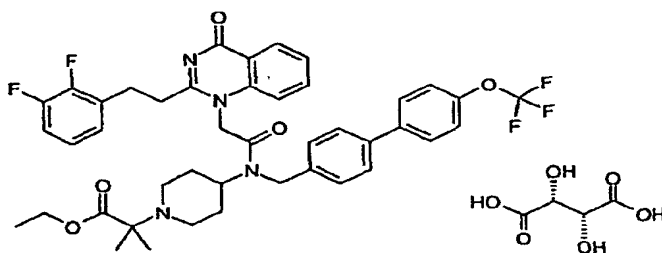
LCMS Rt = 2,55 minutos; m/z [M+H]⁺ = 775,3

RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,18-1,40 (9H, m), 1,61-2,09 (4H, m), 2,22-2,45 (2H, m), 2,75-2,85 (1H, m), 2,90-3,34 (5H, m), 3,71/4,66 (1H, 2x m), 4,12-4,26 (2H, m), 4,70-4,85 (3H, m), 5,08 (1H, s), 6,80-6,88 (1H,m), 6,95-7,13 (3H, m), 7,27-7,33 (1H, m), 7,34-7,52 (3H, m), 7,56-7,62 (1H, m), 7,63-7,77 (4H, m), 8,29-8,44 (2H, m).

Isto foi convertido ao sal de bitartrato por meio de um método análogo àquele descrito no Exemplo de Abordagem de Síntese (I).

Exemplo de Abordagem de Síntese (IV)-4

2,3-diidroxibutanodioato de 2-{4-[{[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil}({4'-[(trifluorometil)óxi]-4-bifenilil}metil)amino]-1-piperidinil}-2-metilpropanoato de etila (sal)



Uma mistura de ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acético (Int. C1) (124 mg, 1,2 equiv), 2-metil-2-{4-[(4'-(trifluorometil)óxi]-4-bifenilil}metil)amino]-1-piperidinil}propanoato de etila (Int. B3) (139 mg, 1 equiv), DMF (1,2 ml) e DIPEA (0,16 ml, 3 equiv) foi agitada à temperatura ambiente durante 30 min, depois adicionou-se HATU (176 mg, 1,5 equiv) e continuou-se agitando durante 4 h. HPLC de fase reversa (Método Preparativo B) deu 2-{4-[[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil]}{(4'-(trifluorometil)óxi)-4-bifenilil}metil)amino]-1-piperidinil}-2-metilpropanoato de etila como um sólido branco (174 mg).

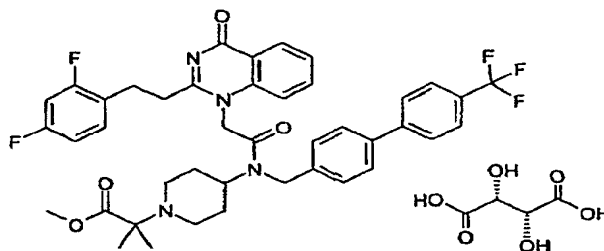
LCMS Rt = 2,77 minutos; m/z [M+H]⁺ = 791,3

RMN ¹H (CDCl₃) Picos característicos: δ 1,21 -1,42 (9H, m), 1,58-2,08 (4H, m), 2,20- 2,48 (2H, m), 2,71-5,1 (13H, br m), 6,79-6,87 (1H, d), 6,92-7,11 (3H, m), 7,30-7,46 (5H, m), 7,48-7,63 (5H, m), 8,26-8,40 (1H, m).

Isto foi convertido ao sal de bitartrato por meio de um método análogo àquele descrito no Exemplo de Abordagem de Síntese (I).

Exemplo de Abordagem de Síntese (IV)-5

2,3-diidroxibutanodioato de 2-[4-([2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil)}{[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metila (sal)



Uma mistura de ácido [2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acético (Int. C3) (100 mg, 1 equiv), 2-metil-2-[4-({[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]propanoato de metila (Int. B1) (130 mg, 1,03 equiv), DIPEA (0,1 ml, 2 equiv), acetonitrilo (2 ml) e HATU (130 mg, 1,4 equiv) foi agitada à temperatura ambiente durante 1 h, depois evaporada e redissolvida em acetonitrilo. Purificação por meio de HPLC de fase invertida (Método Preparativo B) deu 2-[4-({[2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil}{[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metila (126 mg).

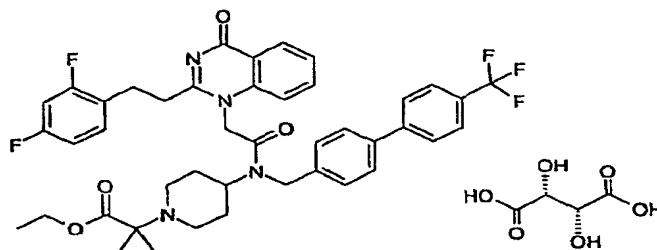
LCMS Rt = 2,698 minutos; m/z [M+H]⁺ = 761,3

RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,30 (3H, s), 1,34 (3H s), 1,81-2,03 (4H, m), 2,29-2,35 (1H, m), 2,39-2,45 (1H, m), 2,82-2,87 (1H, m), 3,00-3,14 (4H, m), 3,19-3,24 (1H, m), 3,70-3,73 (3H, m), 4,00/4,51 (1H, 2x br m), 4,74 (1H, s), 4,91 (1H, s), 5,10 (1H, s), 5,54 (1H, s), 6,77-6,84 (1H, m), 6,87-6,98 (1H, m), 7,28-7,43 (2H, m), 7,48-7,61 (5H3 m), 7,73-7,81 (5H, m), 8,23-8,29 (1H, m).

Isto foi convertido ao sal de bitartrato por meio de um método análogo àquele descrito no Exemplo de Abordagem de Síntese (I).

Exemplo de Abordagem de Síntese (IV)-6

2,3-diidroxibutanodioato de 2-[4-({[2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil}{[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de etila (sal)



Uma mistura de ácido [2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acético (Int. C3) (120 mg, 1 equiv), 2-metil-2-[4-({4'-(trifluorometil)-4-bifenilil}metil)-amino]-1-piperidinil]propanoato de etila (Int. B2) (204 mg, 1,3 equiv), DMF (1,4 ml) e DIPEA (0,183 ml, 3 equiv) foi agitada à temperatura ambiente, depois adicionou-se HATU (206 mg, 1,5 equiv) com agitação vigorosa e continuou-se agitando durante 1,5 h. Adicionou-se uma porção adicional de Intermediário D5 (12 mg, 0,1 equiv), depois continuou-se agitando durante 2 dias. HPLC de fase reversa (Método Preparativo B) deu 2-[4-({2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil}{[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]-metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de etila como um sólido branco (173 mg).

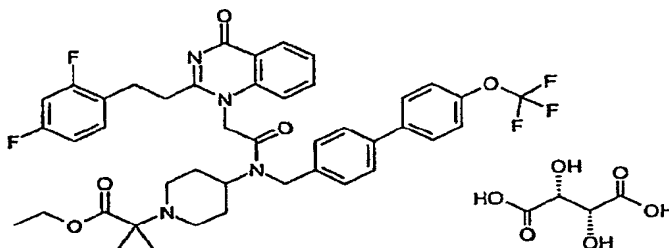
LCMS Rt = 2,751 minutos; m/z [M+H]⁺ = 775,3

RMN ¹H (CDCl₃) δ (mistura de rotômeros) Picos característicos: 1,22-1,47 (9H, m), 1,63-2,10 (4H, m), 2,16-5,11 (15H, br m), 6,75-6,88 (2H, m), 7,14-7,80 (12H, m), 8,26-8,40 (1H, m).

Isto foi convertido ao sal de bitartarato por meio de um método análogo àquele descrito no Exemplo de Abordagem de Síntese (I).

Exemplo de Abordagem de Síntese (IV)-7

2,3-diidroxitubanoato de 2-{4-[{2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil}{[4'-(trifluorometil)óxi]-4-bifenilil}metil)amino]-1-piperidinil}-2-metilpropanoato de etila (sal)



Uma mistura de ácido [2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil] acético (Int. C3) (114 mg, 1,1 equiv), 2-metil-2-{4-[(4'-[(trifluorometil)óxi]-4-bifenilil}metil)amino]-1-piperidinil}propanoato de etila (Int. B3) (139 mg, 1 equiv), DMF (1,2 ml) e DIPEA (0,16 ml, 3 equiv) foi agitada à temperatura ambiente, depois adicionou-se HATU (176 mg, 1,5 equiv) com agitação vigorosa e continuou-se agitando durante 30 min. Adicionou-se uma porção adicional do Intermediário D5 (21 mg, 0,2 equiv), seguido 1 h mais tarde por mais HATU (23 mg, 0,2 equiv), depois continuou-se agitando durante 18 h. HPLC de fase reversa (Método Preparativo B) deu 2-{4-[[2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]-acetil]}(4'-[(trifluorometil)óxi]-4-bifenilil}metil)amino]-1-piperidinil}-2-metilpropanoato de etila como um sólido branco (149 mg).

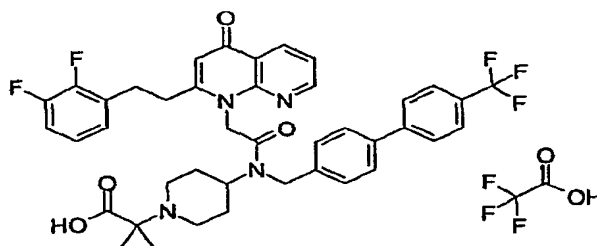
LCMS Rt = 2,793 minutos; m/z [M+H]⁺ = 791,3

RMN ¹H (CDCl₃) Picos característicos: δ 1,20-1,45 (9H, m), 1,58-2,12 (4H, m), 2,14- 2,48 (2H,m), 2,620-5,11 (11H, m), 6,59-6,72 (1H, m), 6,73-6,90 (2H, m), 7,16-7,64 (11H, m), 8,25-8,40 (1H, m).

Isto foi convertido ao sal de bitartarato por meio de um método análogo àquele descrito no Exemplo de Abordagem de Síntese (II).

Exemplo de Abordagem de Síntese (IV)-8

trifluoroacetato de ácido 2-[4-([2-[2-(2,3-Difluorofenil)etil]-4-oxo-1,8-naftiridin-1(4H)-il]acetil)}{[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanóico



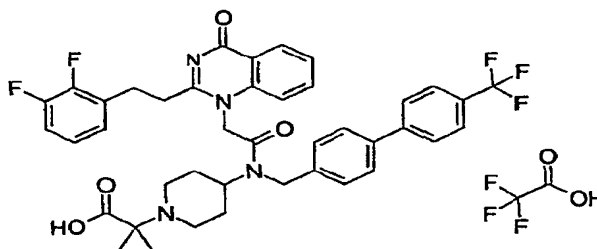
Uma mistura de 1,1-dimetiletila 2-metil-2-[4-({[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]propanoato (Int. B4) (1 equiv), ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1,8-naftiridin-1(4H)-il]acético (Int. C2) (1,2 equiv), DIPEA (3 equiv) e DMF (1,0ml) é agitada à temperatura ambiente durante 5 min. Adicionou-se HATU (1,5 equiv) de uma só vez e isto foi agitado durante mais 5 min. A mistura de reação bruta é concentrada, filtrada através de um plugue de sílica eluído com acetona e evaporada para se obter 1,1-dimetiletil 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1,8-naftiridin-1(4H)-il]acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metil propanoato bruto.

O propanoato, sem isolamento, é dissolvido em uma mistura a 1:1 mistura de TFA e DCM e agitada à temperatura ambiente durante 4 h. Evaporação e HPLC preparativa (Método A) dá o composto do título.

Outros sais podem ser preparados via meios convencionais. A base livre também pode ser preparada por meios convencionais.

Exemplo de Abordagem de Síntese (IV)-9

trifluoroacetato de ácido 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil} amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanóico



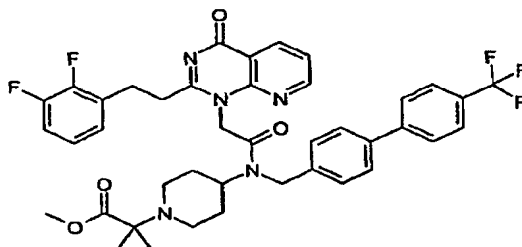
Uma mistura de 2-metil-2-[4-({[4'-(trifluorometil)-4-

bifenilil]metil} amino)-1-piperidinil]propanoato de 1,1-dimetiletila (Int. B4) (1 equiv), ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1 (4H)-quinazolinil]acético (Int. C1) (1,2 equiv), DIPEA (3 equiv) e DMF (1,0ml) é agitada à temperatura ambiente durante 5 min. Adicionou-se HATU (1,5 equiv) de uma só vez e isto foi agitado durante mais 5 min. A mistura de reação bruta é concentrada, filtrada através de um plugue de sílica eluído com acetona e evaporada para se obter 1,1-dimetiletil 2-[4-([2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil}{[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil} amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato bruto.

O propanoato, sem isolamento, é dissolvido em uma mistura a 1:1 de TFA e DCM e agitado à temperatura ambiente durante 4 h. Evaporação e HPLC preparativa (Método A) dá o composto do título.

Exemplo de Abordagem de Síntese (IV)-10

2-[4-([2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil}{[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil} amino)-1-piperidinil]-2-metil-propanoato de metila



Uma mistura de ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acético (Int. D1) (20,7 g, 1,3 equiv), 2-metil-2-[4-([4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil} amino)-1-piperidinil]propanoato de metila (Int. B1) (20,0 g, 1,3 equiv), DIPEA (24,0 ml, 3 equiv) e DMF (184 ml) foi agitada mecanicamente, depois adicionou-se HATU (27,1 g, 1,5 equiv) de uma só vez e continuou-se agitando durante 2 h. A mistura de reação foi repartida entre éter de dietila/THF (1:1) e carbonato de sódio (1M, excesso). A camada orgânica foi lavada com água e salmoura,

secada e evaporada. Cromatografia foi realizada sequencialmente em três colunas de sílica (primeiramente 3:1 de EtOAc/hexanos; em segundo lugar 2 % de MeOH em DCM; em terceiro lugar 1:1 de EtOAc/hexanos a 100 % de EtOAc). Frações de produto foram evaporadas para se obter o produto
 5 desejado como um sólido rosa amorfo (27,5 g).

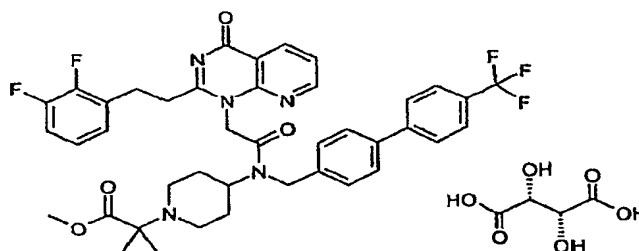
LCMS Rt = 2,702 minutos; m/z [M+H]⁺ = 762,3

Cristalização: Uma mistura de 2-[4-([2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}-amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metila (8,0 g) e etanol (200 ml) foi aquecida até dissolver-se totalmente. A
 10 solução foi agitada magneticamente durante 24 h à temperatura ambiente, depois filtrada, e coletou-se 7,5 g de sólido. Estes cristais solvatados foram colocados em uma estufa a vácuo a 60°C com uma sangria de nitrogênio para manter o vácuo em aproximadamente 630 Torr durante 24 h para
 15 proporcionar o composto do título cristalino não-solvatado (7,15 g), p.f. 150°C.

RMN ¹H (CD₃OD) S 1,25 (3H, s), 1,30 (3H, s), 1,63-1,99 (4H, m), 2,16-2,28 (1H, m), 2,3-2,43 (1H, m), 2,89-2,98 (1H, m), 2,98-3,08 (2H, m), 3,16-3,30 (3H, m), 3,66-3,69 (3H, m), 4,02/4,38 (1H, 2x br m), 4,69 (1H, s),
 20 4,87 (1H, s), 5,4/5,73 (2H, 2x s), 6,99-7,19 (3H, m), 7,29-7,35 (1H, m), 7,50-7,61 (3H, m), 7,64-7,82 (5H, m), 8,48-8,57 (1H, m), 8,80- 8,89 (1H, m)
 Ver figura 1 abaixo.

Exemplo de Abordagem de Síntese (IV)-11

2,3-diidroxibutanodioato de 2-[4-([2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}-amino)-1-piperidinil]-2-metil-propanoato de metila (sal)
 25



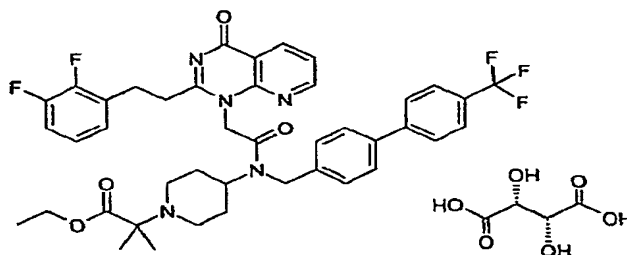
2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metila (8,5 g, 1 equiv) foi suspenso em metanol (100 ml) e aquecido a 50°C até o sólido dissolver-se. Adicionou-se
 5 ácido L-tartárico (1,675 g, 1,0 equiv) de uma só vez e isto foi agitado durante 30 minutos à temperatura ambiente. A solução foi concentrada em vácuo a um sólido branco-sujo que foi secado em uma estufa a vácuo à temperatura ambiente.

LCMS Rt = 2,697 minutos; m/z [M+H]⁺ = 762,3

10 RMN ¹H (d₆-DMSO) □ 1,17 (3H, s), 1,23 (3H, s), 1,47-1,91 (4H, m), 1,98-2,41 (1H, m), 2,16-2,33 (1H, m), 2,80-3,26 (6H, m), 3,50-3,67 (3H, m), 3,95/4,17 (1H, 2x br m), 4,61 (1H, s), 4,85 (1H, s), 5,39/5,69 (2H, 2x s), 7,08-7,39 (4H, m), 7,53-7,70 (3H, m), 7,72-7,97 (5H, m), 8,42-8,54 (1H, m), 8,85-8,95 (1H, m)

15 Exemplo de Abordagem de Síntese (IV)-12

2,3-diidroxibutanodioato de 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]-acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de etila (sal)



20 Uma mistura de ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-

oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acético (Int. D1) (116 mg, 1 equiv), 2-metil-2-[4-({[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]propanoato de etila (Int. B2) (150 mg, 1 equiv), HATU (151 mg, 1,2 equiv), DMF (2,72 ml) e DIPEA (0,17 ml, 3 equiv) foi agitada à temperatura ambiente durante 3,25 h. A mistura de reação foi repartida entre acetato de etila/metanol e bicarbonato de sódio aquoso, a camada orgânica foi lavada com salmoura, secada e tratada com carvão ativado (250 mg). Cromatografia de flash (sílica, metanol a de 3 a 4 % em DCM) deu 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]-acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de etila como um sólido branco (178 mg).

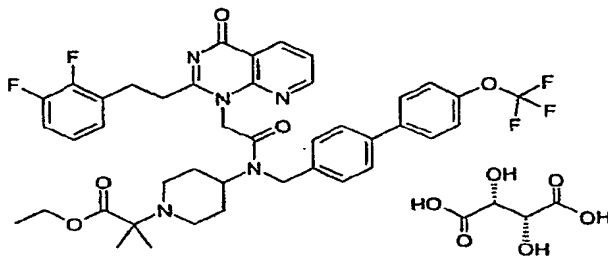
LCMS Rt = 2,58 minutos; m/z [M+H]⁺ = 776,3

RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,20-1,40 (9H, m), 1,56-2,02 (4H, m), 2,19-2,44 (2H, m), 2,88-3,20, (4H, m), 3,22-3,40 (2H, m), 3,81/4,58 (1H, 2x m), 4,11-4,27 (2H, m), 4,69/4,84 (2H, 2x s), 5,17/5,49 (2H, 2x s), 6,95-7,14 (3H, m), 7,25-7,31 (1H, m), 7,38-7,54 (3H, m), 7,54, 7,61 (1H, m), 7,62-7,79 (4H, m), 8,57-8,75 (2H, m)

Isto foi convertido ao sal de bitartarato por meio de um método análogo àquele descrito, por exemplo, de Abordagem de Síntese (II).

Exemplo de Abordagem de Síntese (IV)-13

2,3-diidroxibutanodioato de 2-{4-[[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil}({4'-[(trifluorometil)óxi]-4-bifenilil}metil)amino]-1-piperidinil}-2-metilpropanoato de etila (sal)



Uma mistura de ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acético (Int. D1) (114 mg, 1,1 equiv), 2-metil-2-{4-[(4'-[(trifluorometil)óxi]-4-bifenilil}metil)amino]-1-piperidinil}propanoato de etila (Int. B4) (139 mg, 1 equiv), DMF (1,2 ml) e DIPEA (0,16 ml, 3 equiv) foi agitada à temperatura ambiente durante 30 min, depois adicionou-se HATU (176 mg, 1,5 equiv) e continuou-se agitando durante 3 h. HPLC de fase reversa (Método Preparativo B) deu 2-{4-[[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil]}(4'-[(trifluorometil)óxi]-4-bifenilil}metil)amino]-1-piperidinil}-2-metilpropanoato de etila como um sólido branco (166 mg).

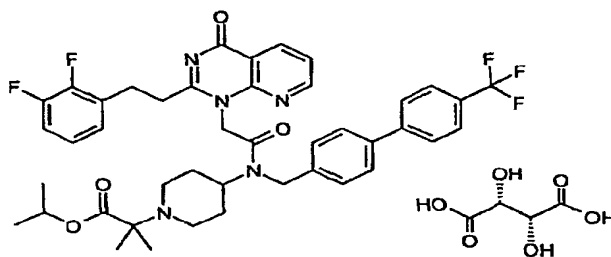
LCMS Rt = 2,87 minutos; m/z $[M+H]^+ = 792,3$

RMN ^1H ($CDCl_3$) δ 1,18-1,42 (9H, m), 1,54-2,04 (4H, m), 2,12-2,46 (2H, m), 2,86-3,21 (4H, m), 3,21-3,41 (2H, m), 3,79/4,57 (1H, 2x m), 4,10-4,27 (2H, m), 4,68 (1H, s), 4,82 (1H, s), 5,17 (1H, s), 5,47 (1H, s), 6,94-7,16 (3H, m), 7,20-7,36 (3H, m), 7,37-7,48 (3H, m), 7,48-7,61 (3H, m), 8,56-8,76 (2H, m).

Isto foi convertido ao sal de bitartarato por meio de um método análogo àquele descrito para o Exemplo de Abordagem de Síntese (II).

Exemplo de Abordagem de Síntese (IV)-14

2,3-diidroxibutanodioato de 1-metiletil 2-[4-([2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil)}(4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil)amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato (sal)



Uma mistura de 1-metiletil 2-metil-2-[4-([4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]-metil)amino)-1-piperidinil]propanoato (Int. B3) (420 mg, 1

equiv), ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acético (Int. D1) (300 mg, 1 equiv), HATU (396 mg, 1,2 equiv), DIPEA (0,22 ml, 1,5 equiv) e DMF (3,0 ml) foi agitada à temperatura ambiente durante 30 min. A mistura de reação bruta foi aplicada diretamente em HPLC de fase reversa (Método Preparativo A) para se obter 1-metiletil 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil} {4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil} amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato (171 mg).

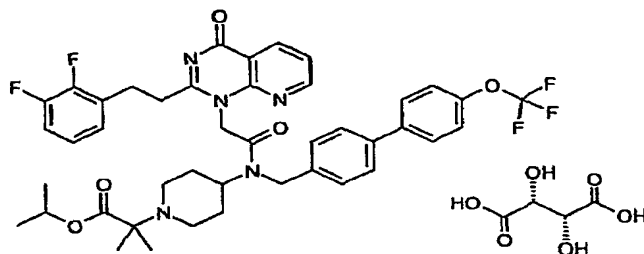
LCMS Rt = 2,837 minutos; m/z [M+H]⁺ = 790,3

RMN ¹H (CD₃OD) δ 1,16-1,37 (12H, m), 1,62-2,01 (4H, m), 2,27-2,55 (2H, m), 2,95- 3,12 (3H, m), 3,12-3,29 (3H, m), 4,06/4,40 (1H, 2x br m), 4,71 (1H, s), 4,89 (1H, s), 4,92-5,07 (1H, m), 5,43/5,76 (2H, 2x s), 7,00-7,21 (3H, m), 7,29-7,38 (1H, m), 7,49-7,65 (3H, m), 7,65-7,87 (5H, m), 8,48-8,58 (1H, m), 8,81-8,90 (1H, m).

Isto foi convertido ao sal de bitartarato por meio de um método análogo àquele descrito para o Exemplo de Abordagem de Síntese (II).

Exemplo de Abordagem de Síntese (IV)-15

2,3-diidroxibutanodioato de 1-metiletil 2-{4-{{[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil}({4'-[(trifluorometil)óxi]-4-bifenilil}metil)amino]-1-piperidinil}-2-metilpropanoato (sal)



Uma mistura de 1-metiletil 2-metil-2-{4-[[{4'-[(trifluorometil)óxi]-4-bifenilil}metil)amino]-1-piperidinil}propanoato (Int. B5) (80 mg, 1 equiv), ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-

d]pirimidin-1(4H)-il]acético (Int. D1) (67 mg, 1 equiv), HATU (400 mg, 5 equiv), DIPEA (0,22 ml, 1,5 equiv) e DMF (2,0 ml) foi agitada à temperatura ambiente durante 30 min. A mistura de reação bruta foi aplicada diretamente em HPLC de fase reversa (Método Preparativo A) para se obter 1-metiletil 2-
 5 {4-[{2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil}{(4'-[(trifluorometil)óxi]-4-bifenilil}metil)amino]-1-piperidinil}-2-metilpropanoato (25 mg).

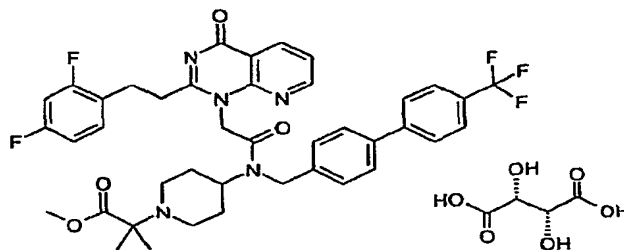
LCMS Rt = 2,952 minutos; m/z [M+H]⁺ = 806,4

RMN ¹H (DMSO-d₆) δ 1,09-1,25 (12H, m), 1,47-1,91 (4H, m), 2,05-2,20 (1H, m), 2,21-2,38 (1H, m), 2,87-3,07 (3H, m), 3,08-3,22 (3H, m), 3,95/4,17 (1H, 2x br m), 4,59 (1H, s), 4,75-4,97 (2H, m), 5,38/5,68 (2H, 2x s), 7,90-7,21 (1H, m), 7,21-7,36 (3H, m), 7,42-7,55 (3H, m), 7,55-7,64 (2H, m), 7,66-7,77 (2H, m), 7,77-7,85 (1H, m), 8,43-8,52 (1H, m), 8,86-8,95 (1H, m)

15 Isto foi convertido ao sal de bitartarato por meio de um método análogo àquele descrito por exemplo, de Abordagem de Síntese (II).

Exemplo de Abordagem de Síntese (IV)-16

2,3-diidroxibutanodioato de 2-[4-({2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil}{(4'-
 20 (trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metila (sal)



Uma mistura de ácido [2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,4-d]pirimidin-1(4H)-il]acético (Int. D2) (100mg, 1 equiv), 2-metil-2-[4-({(4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]propanoato de metila (Int. B1) (130 mg, 1,03 equiv), DIPEA (0,16
 25

ml, 3 equiv), acetonitrilo (2 ml) e HATU (130 mg, 1,2 equiv) foi agitada à temperatura ambiente durante 1 h, depois evaporada e redissolvida em acetonitrilo. Purificação por meio de HPLC de fase reversa (Método Preparativo B) deu 2-[4-([2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil}{[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metila (145 mg).

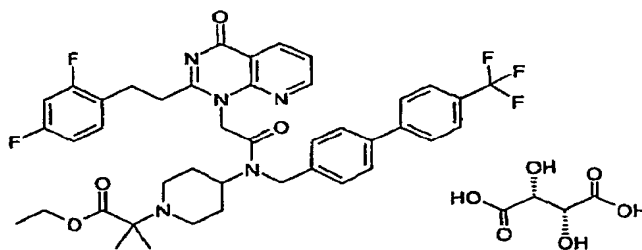
LCMS Rt = 2,716 minutos; m/z [M+H]⁺ = 762,3

RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,27 (3H, s), 1,33 (3H, s), 1,69-1,98 (4H, m), 2,22-2,29 (1H, m), 2,36-2,43 (1H, m), 2,96-3,08 (3H, m), 3,13-3,24 (3H, m), 3,69-3,72 (3H, m), 4,04/4,41 (1H, 2x br m), 4,72 (1H, s), 4,91 (1H, s), 5,41/5,73 (2H, 2x s), 6,84-6,97 (2H, m), 7,34-7,44 (2H, m), 7,54-7,63 (3H, m), 7,69-7,83 (5H, m), 8,55-8,60 (1H, m), 8,86-8,91 (1H, m).

Isto foi convertido ao sal de bitartarato por meio de um método análogo àquele descrito por exemplo, de Abordagem de Síntese (II).

Exemplo de Abordagem de Síntese (IV)-17

2,3-diidroxibutanodioato de 2-[4-([2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil){[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de etila (sal)



Uma mistura de ácido [2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,4-d]pirimidin-1 (4H)-il]acético (Int. D2) (120 mg, 1 equiv), 2-metil-2-[4-([4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]propanoato de etila (Int. B2) (198 mg, 1,3 equiv), DMF (1,4 ml) e DIPEA (0,178 ml, 3 equiv) foi agitada à temperatura ambiente durante 1,5 h,

depois adicionou-se HATU (200 mg, 1,5 equiv) com agitação vigorosa e continuou-se agitando durante 1,5 h. Adicionou-se uma porção adicional do Intermediário D2 (12 mg, 0,1 equiv), depois continuou-se agitando durante 2 dias. HPLC de fase reversa (Método Preparativo B) deu 2-[4-({[2-[2-(2,4-

5 difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil}{[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de etila como um sólido branco (170 mg).

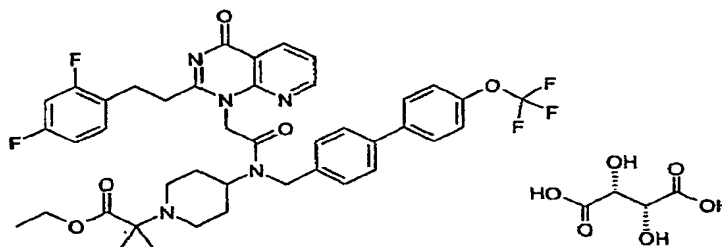
LCMS Rt = 2,827 minutos; m/z [M+H]⁺ = 776,3

10 RMN ¹H (CDCl₃) Picos característicos: δ 1,14-1,43 (9H, m), 1,57-2,05 (4H, m), 2,10- 2,46 (2H, m), 2,84-3,11 (3H, m), 3,12-3,34 (3H, m), 3,65/3,85 (1H, m), 4,06-4,27 (2H, m), 4,65/4,85 (2H, s), 5,15/5,45 (2H, s), 6,62-6,89 (2H, m), 7,18-7,34 (1H, m), 7,37-7,82-(9H,m), 8,59-8,77 (2H, m).

Isto foi convertido ao sal de bitartarato por meio de um método análogo àquele descrito para o Exemplo de Abordagem de Síntese (II).

15 Exemplo de Abordagem de Síntese (IV)-18

2,3-diidroxibutanodioato de 2-{4-{{[2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil}}(4'-[(trifluorometil)óxi]-4-bifenilil}metil)amino]-1-piperidinil}-2-metilpropanoato de etila (sal)



20 Uma mistura de ácido [2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,4-d]pirimidin-1(4H)-il]acético (Int. D2) (114 mg, 1,1 equiv), 2-metil-2-{4-[(4'-[(trifluorometil)óxi]-4-bifenilil}metil)amino]-1-piperidinil}propanoato de etila (Int. B4) (139 mg, 1 equiv), DMF (1,2 ml) e DIPEA (0,16 ml, 3 equiv) foi agitada à temperatura ambiente, depois

25 adicionou-se HATU (176 mg, 1,5 equiv) com agitação vigorosa e continuou-

se agitando durante 2 h. HPLC de fase reversa (Método Preparativo B) deu 2-{4-[{2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil}({4'-[(trifluorometil)óxi]-4-bifenilil}-metil)amino)-1-piperidinil}-2-metilpropanoato de etila como um sólido branco (149 mg).

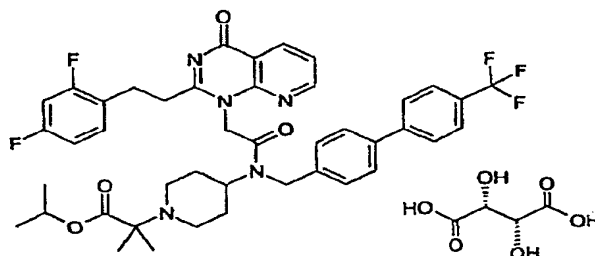
5 LCMS Rt = 2,801 minutos; m/z [M+H]⁺ = 792,3

RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,18-1,40 (9H, m), 1,61-2,02 (4H, m), 2,20-2,44 (2H, m), 2,83- 3,35 (6H, br m), 3,79/4,57 (1H, 2x br m), 4,07-4,27 (2H, m), 4,68/4,81 (2H, 2x s), 5,14/5,46 (2H, 2x br m), 6,62-6,90 (2H, 2x m), 7,18-7,63 (10H, m), 8,59-8,75 (2H, m).

10 Isto foi convertido ao sal de bitartarato por meio de um método análogo àquele descrito por exemplo, de Abordagem de Síntese (II).

Exemplo de Abordagem de Síntese (IV)-19

2,3-diidroxibutanodioato de 1-metiletil 2-[4-({2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil} {4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil} amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato (sal)



Uma mistura de 1-metiletil 2-metil-2-[4-({4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil} amino)-1-piperidinil]propanoato (Int. B3) (70 mg, 1 equiv), ácido [2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,4-d]pirimidin-1(4H)-il]acético (Int. D2) (52,2 mg, 1 equiv), HATU (69 mg, 1,2 equiv), DIPEA (0,04 ml, 1,5 equiv) e DMF (1,0 ml) foi agitada à temperatura ambiente durante 10 min. A mistura de reação bruta foi aplicada diretamente em HPLC de fase reversa (Método Preparativo A) para se obter 1-metiletil 2-[4-({2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il] acetil} {4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil} amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato

(20mg).

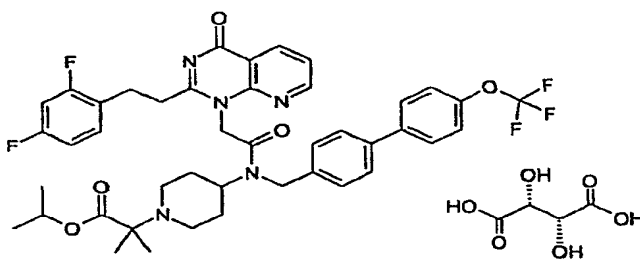
LCMS Rt = 2,910 minutos; m/z [M+H]⁺ = 790,4

RMN ¹H (d₆-DMSO) δ 1,08-1,27 (12H, m), 1,40-1,90 (4H, m),
2,03-2,35 (2H, m), 2,85-3,24 (6H, m), 3,95/4,17 (1H, 2x br m), 4,61 (1H, s),
5 4,80-4,97 (2H, m), 5,36/5,67 (2H, 2x s), 6,96-7,10 (1H, m), 7,13-7,28 (1H,
m), 7,28-7,38 (1H, m), 7,39-7,54 (1H, m), 7,54-7,68 (3H, m), 7,72-7,98 (5H,
m), 8,43-8,52 (1H, m), 8,86-8,95 (1H, m)

Isto foi convertido ao sal de bitartarato por meio de um método análogo àquele descrito por exemplo, de Abordagem de Síntese (II).

10 Exemplo de Abordagem de Síntese (IV)-20

2,3-diidroxibutanodioato de 1-metiletil 2-{4-[[2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil]}(4'-[(trifluorometil)óxi]-4-bifenilil}metil)amino]-1-piperidinil}-2-metilpropanoato (sal)



15 Uma mistura de 1-metiletil 2-metil-2-{4-[[2-[(4'-[(trifluorometil)óxi]-4-bifenilil}metil)amino]-1-piperidinil]propanoato (Int. B5) (80 mg, 1 equiv), ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,4-d]pirimidin-1(4H)-il]acético (Int. D2) (57 mg, 1 equiv), HATU (76 mg, 1,2 equiv), DIPEA (0,04 ml, 1,5 equiv) e DMF (1,0 ml) foi agitada à temperatura
20 ambiente durante 10 min. A mistura de reação bruta foi aplicada diretamente em HPLC de fase reversa (Método Preparativo A) para se obter 1-metiletil 2-{4-[[2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil]}(4'-[(trifluorometil)óxi]-4-bifenilil}metil)amino]-1-piperidinil}-2-metilpropanoato (47 mg).

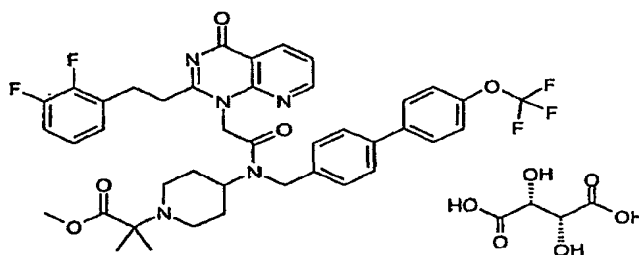
25 LCMS Rt = 2,909 minutos; m/z [M+H]⁺ = 806,4

RMN ^1H (d_6 -DMSO) δ 1,09-1,27 (12H, m), 1,50-1,90 (4H, m), 2,03-2,17 (1H, m), 2,20-2,37 (1H, m), 2,88-3,18 (6H, m), 3,94/4,17 (1H, 2x m), 4,60 (1H, s), 4,74-4,96 (2H, m), 5,36/5,66 (2H, 2x br s), 6,96-7,09 (1H, m), 7,14-7,32 (2H, m), 7,39-7,55 (4H, m), 7,55-7,66 (2H, m), 7,66-7,87 (3 H, m), 8,43-8,54 (1H, m), 8,85-8,96 (1H, m).

Isto foi convertido ao sal de bitartarato por meio de um método análogo àquele descrito por exemplo, de Abordagem de Síntese (II).

Exemplo de Abordagem de Síntese (IV)-21

diidroxibutanodioato de 2-{4-[[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil}({4'-[(trifluorometil)óxi]-4-bifenilil}metil)amino]-1-piperidinil}-2-metilpropanoato de metila (sal)



Uma mistura de 2-metil-2-{4-[[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil}({4'-[(trifluorometil)óxi]-4-bifenilil}metil)amino]-1 piperidinil}propanoato de metila (Int. B6) (145 mg, 1 equiv), ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il] acético (Int. D1) (122 mg, 1 equiv), DIPEA (0,084 ml, 1,5 equiv) e DMF (2,0 ml) foi agitada à temperatura ambiente durante 5 min. O HATU (160 mg, 1,3 equiv) foi adicionado de uma só vez e agitado durante mais 1 hora sob nitrogênio. A mistura de reação bruta foi aplicada diretamente em HPLC de fase reversa (Método Preparativo A) para se obter 2-{4-[[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil}({4'-[(trifluorometil)óxi]-4-bifenilil}metil)amino]-1-piperidinil}-2-metilpropanoato de metila (116 mg).

LCMS Rt = 2,721 minutos; m/z $[\text{M}+\text{H}]^+ = 778,3$

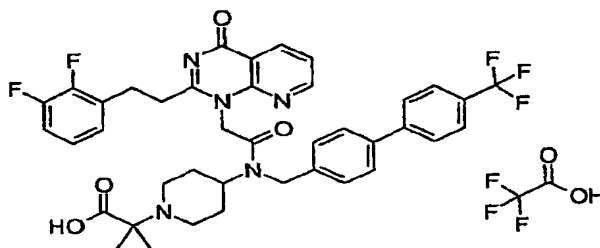
RMN ^1H (CDCl_3) Picos característicos: δ 1,53-1,62 (6H, m), 3,46-5,99 (22H, m), 7,01-7,21 (3H, m), 7,30-7,43 (3H, m), 7,50-7,78 (6H, m),

8,54-8,60 (1H, m), 8,86-8,94 (1H, m).

Isto foi convertido ao sal de bitartarato por meio de um método análogo àquele descrito para o Exemplo de Abordagem de Síntese (II).

Exemplo de Abordagem de Síntese (IV)-22

5 trifluoroacetato de ácido 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil} amino)-1-piperidinil]-2- metilpropanóico



Uma mistura de 1,1-dimetil etil 2-metil-2-[4-({[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil} amino)-1-piperidinil]propanoato (Int. B7) (150 mg, 1 equiv), ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acético (Int. D1) (130 mg, 1,2 equiv), DIPEA (0,164 ml, 3 equiv) e DMF (1,0 ml) foi agitada à temperatura ambiente durante 5 min. Adicionou-se HATU (180 mg, 1,5 equiv) de uma só vez e isto foi agitado durante mais 5 min. A mistura de reação bruta foi concentrada, filtrada
15 através de um plugue de sílica eluído com acetona e evaporado para se obter 1,1-dimetil etil 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil} amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato bruto.

LCMS Rt = 2,823 minutos; m/z [M+H]⁺ = 804,4

20 Este intermediário, sem isolamento, foi dissolvido em uma mistura a 1:1 de TFA e DCM e foi agitado à temperatura ambiente durante 4 h. Evaporação e HPLC preparativa (Método A) deu o desejado trifluoroacetato de ácido 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil} amino)-1-piperidinil]-2-metila propanóico (70 mg).
25

LCMS Rt = 2,554 minutos; m/z [M+H]⁺ = 748,2

RMN ¹H (d₆-DMSO) δ 1,44 (3H, s), 1,51 (3H, s), 1,70-2,30 (4H, m), 2,41-2,56 (2H, m), 2,94-3,54 (6H, m), 4,44-4,95 (3H, m), 5,42/5,76 (2H, 2x br s), 7,07-7,38 (4H, m), 7,54-7,75 (3H, m), 7,76-7,99 (5H, m), 8,42-
5 8,54 (1H, m), 8,85-8,98 (1H, m).

Outros sais podem ser preparados por meios convencionais. A base livre também pode ser preparada por meios convencionais.

Em algumas concretizações, compostos úteis como inibidores de Lp-P LA2 úteis nos métodos como revelado aqui são:

10 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)benzil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobenzil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona, também referido como "SB480848" ou o nome USAN "darapladib" que é um composto à base de pirimidinona e um inibidor reversível da Lp-PLA₂ e é usado nos Exemplos aqui indicados,

15 N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetraidro-ciclopentapirimidin-1-il]-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;

N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida; e

20 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil}{[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metila.

Sais farmaceuticamente aceitáveis de 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)benzil)-aminocarbonilmetil)-2-
25 (4-fluorobenzil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona, AKA SB480848, e usados nos Exemplos aqui indicados; N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetraidro-ciclopentapirimidin-1-il]-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida; N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-

trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida; e 2-[4-([2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-oxopirido[2,3-d]-pirimidin-1(4H)-il]acetil){[4'-trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metila também são úteis como inibidores de Lp-PLA₂ para uso nos métodos como revelado aqui.

Inibidores de ácido nucleico de Lp-PLA₂

Em algumas concretizações, agentes que inibem Lp-PLA₂ são ácidos nucleicos. Inibidores de ácido nucleico de Lp-PLA₂ são, por exemplo, embora sem limitação, moléculas indutoras de interferência de RNA, por exemplo, embora sem limitação, siRNA, dsRNA, stRNA, shRNA e versões modificadas dos mesmos, sendo que a moléculas de interferência de RNA silencia a expressão gênica da Lp-PLA₂. Em algumas concretizações, o inibidor de ácido nucleico de Lp-PLA₂ é um ácido oligonucleotídeo anti-sentido, ou um análogo de ácido nucleico, por exemplo, embora sem limitação, DNA, RNA, peptídio-ácido nucleico (PNA), PNA pseudo-complementar (pc-PNA), ou ácido nucleico 'travado' (LNA) e análogos. Em concretizações alternativas, o ácido nucleico é DNA ou RNA, e análogos de ácido nucleico, por exemplo, PNA, pcPNA e LNA. Um ácido nucleico pode ser de filamento simples ou de filamento duplo, e pode ser selecionado de um grupo compreendendo ácido nucleico codificando uma proteína de interesse, oligonucleotídeos, PNA, etc. Referidas sequências de ácido nucleico incluem, por exemplo, embora sem limitação, proteínas codificantes de sequências de ácidos nucleicos que atuam como repressores transcricionais, moléculas anti-sentido, ribozimas, sequências de ácido nucleico inibidoras pequenas, por exemplo, embora sem limitação, RNAi, shRNAi, siRNA, micro RNAi (mRNAi), oligonucleotídeos anti-sentido etc.

Em algumas concretizações RNA de filamento simples (ssRNA), uma forma de RNA encontrado endogenamente em células eucariontes pode ser usado para formar uma molécula de RNAi. Moléculas de

ssRNA celular incluem RNAs mensageiros (e os RNAs pré-mensageiros progenitores), RNAs nucleares pequenos, RNAs nucleares pequenos, RNAs de transferência e RNAs ribossômicos. RNA de filamento duplo (dsRNA) induz uma resposta imune dependente do tamanho, de tal forma que dsRNA maior que 30bp ativa a resposta ao interferon, enquanto que dsRNAs mais curtos alimentados no maquinário de interferência de RNA endógeno da célula a jusante da enzima Dicer.

Lp-PLA₂ pode ser reduzida por meio de inibição da expressão do polipeptídeo de Lp-PLA₂ ou por meio de métodos de "silenciamento gênico" comumente conhecidos por pessoas com prática ordinária na arte.

Interferência de RNA (RNAi) proporciona uma abordagem potente para inibir a expressão de polipeptídeos-alvos selecionados. RNAi usa pequenos cópias de RNA interferente (siRNA) que objetivam o RNA mensageiro que codifica o polipeptídeo-alvo para a degradação seletiva. O silenciamento pós-transcricional dependente de siRNA da expressão gênica envolve cortar a molécula de RNA mensageiro-alvo em um sítio orientado pelo siRNA.

Interferência de RNA (RNAi) é um processo conservado evolutivamente em que a expressão ou introdução de RNA de uma sequência que é idêntica ou altamente similar a um gene-alvo resulta na degradação específica para sequência ou silenciamento gênico pós-transcricional específico (PTGS) de RNA mensageiro (mRNA) transcrito do gene objetivado (ver Coburn, G. e Cullen, B. (2002) *J. of Virology* 76(18):9225), inibindo com isto a expressão do gene-alvo. Em uma concretização, o RNA é RNA de filamento duplo (dsRNA). Este processo foi descrito em plantas, invertebrados, e células mamíferas. Na natureza, RNAi é iniciado pelo Dicer de endonuclease específico para dsRNA, que promove a clivagem processiva de dsRNA longo em fragmentos de filamento duplo denominados siRNAs. siRNAs são incorporados em um complexo de proteína

(denominado "complexo de silenciamento induzido por RNA" ou "RISC ") que reconhece e cliva mRNAs-alvos. RNAi também pode ser iniciado por meio de introdução de moléculas de ácido nucleico, p. ex., siRNAs sintéticos ou agentes de interferência de RNA, para inibir ou silenciar a expressão de genes-alvos. Como usado aqui, "inibição da expressão de gene-alvo" inclui qualquer diminuição da expressão ou atividade da proteína ou nível do gene-alvo ou proteína codificada pelo gene-alvo em comparação com uma situação em que não se induziu interferência de RNA. A diminuição pode ser de pelo menos 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % ou 99 % ou mais em comparação com a expressão do gene-alvo ou com a atividade ou o nível da proteína codificada por um gene-alvo que não foi objetivado por um agente interferente de RNA.

"RNA interferente curto" (siRNA), também referido aqui como "RNA interferente pequeno" é definido como um agente que funciona inibindo a expressão de um gene-alvo, p. ex., por RNAi.

Um siRNA pode ser sintetizado quimicamente, pode ser produzido por meio de transcrição *in vitro*, ou pode ser produzida no interior da célula hospedeira. Em uma concretização, siRNA é uma molécula de RNA de filamento duplo (dsRNA) com cerca de 15 a cerca de 40 nucleotídeos de comprimento, de preferência, cerca de 15 a cerca de 28 nucleotídeos, mais preferivelmente de cerca de 19 a cerca de 25 nucleotídeos de comprimento, e mais preferivelmente cerca de 19, 20, 21, 22, ou 23 nucleotídeos de comprimento, e pode conter um *overhang* [n.t.: tipo de projeção de pares de bases na extremidade da molécula de DNA] a 3' e/ou 5' em cada filamento apresentando um comprimento de cerca de 0, 1, 2, 3, 4, ou 5 nucleotídeos. O comprimento do *overhang* é independente entre os dois filamentos, i.e., o comprimento do *overhang* em um filamento não é dependente do comprimento do *overhang* no segundo filamento. De preferência, o siRNA é capaz de promover interferência de RNA através da degradação ou

silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) do RNA mensageiro-alvo (mRNA).

siRNAs também incluem RNAs de grampo-de-cabelo pequeno (também denominado *stem loop*) (shRNAs). Em uma concretização, estes shRNAs são constituídos de um filamento anti-sentido curto (p. ex., de cerca de 19 a cerca de 25 nucleotídeos), seguido de uma alça de nucleotídios de cerca de 5 a cerca de 9 nucleotídeos, e o filamento *sense* análogo. Alternativamente, o filamento no-sentido pode preceder a estrutura de alça de nucleotídeos e o filamento anti-sentido pode seguir-se. Estes shRNAs podem estar contidos em plasmídeos, retrovírus, e lentivírus expressos de, por exemplo, o promotor pol III U6, ou outro promotor (ver, p. ex., Stewart, *et al.* (2003) RNA Apr;9(4):493-501, incorporada aqui integralmente por referência).

O gene-alvo ou sequência do agente interferente de RNA pode ser um gene celular ou sequência genômica, p. ex., a sequência de Lp-PLA₂. Um siRNA pode ser substancialmente homólogo ao gene-alvo ou sequência genômica, ou um fragmento do mesmo. Como usado neste contexto, o termo "homólogo" é definido como sendo substancialmente idêntico, suficientemente complementar, ou similar ao mRNA-alvo, ou um fragmento do mesmo, para efetuar a interferência de RNA do alvo. Adicionalmente às moléculas de RNA nativas, RNA vantajoso para inibir ou interferir com a expressão de uma sequência-alvo incluem análogos e derivados de RNA. De preferência, o siRNA é idêntico a seu alvo.

O siRNA objetiva, de preferência, apenas uma sequência. Cada um dos agentes interferentes de RNA, como siRNAs, pode ser selecionado quanto a efeitos potenciais fora-do-alvo [off-target] por meio de, por exemplo, formação de perfil da expressão. Referidos métodos são conhecidos por alguém com prática na arte e encontram-se descritos, por exemplo, em Jackson *et al.*, *Nature Biotechnology* 6:635-637, 2003.

Adicionalmente à formação de perfil da expressão, também é possível selecionar as sequências-alvos potenciais quanto a sequências similares nos bancos de dados de sequências para identificar sequências potenciais que apresentam efeitos fora-do-alvo. Por exemplo, de acordo com Jackson *et al.* (Id.) 15, ou talvez meramente 11 nucleotídios contíguos de identidade de sequência são suficientes para dirigir o silenciamento de transcrições não-objetivadas. Portanto, é possível selecionar inicialmente os siRNAs propostos para evitar potencial silenciamento fora do alvo usando-se a análise de identidade de sequências por meio de quaisquer métodos de comparação de sequências, como BLAST.

Moléculas de siRNA não precisam ser limitadas àquelas moléculas contendo apenas RNA, mas compreendem, por exemplo, adicionalmente não-nucleotídios e nucleotídios modificados quimicamente, e também incluem moléculas em que uma molécula de açúcar ribose é substituída por outra molécula de açúcar ou uma molécula que realiza uma função similar. Além disso, é possível usar uma ligação não-natural entre radicais de nucleotídios, como uma ligação de fosforotioato. Por exemplo, siRNA contendo estruturas de D-arabinofuranosila em lugar dos D-ribonucleotídeos naturalmente ocorrentes encontrados em RNA pode ser usado em moléculas de RNAi de acordo com a presente invenção (Patente US nº 5.177.196). Outros exemplos incluem moléculas de RNA contendo a o-ligação entre o açúcar e a base heterocíclica do nucleosídeo, que confere resistência à nuclease e ligação estreita do filamento complementar às moléculas de oligonucleotídeos similares aos oligonucleotídeos contendo 2'-O-metil ribose, arabinose e particularmente D-arabinose (Patente US nº 5.177.196).

O filamento de RNA pode ser derivatizado com um grupo funcional reativo de um grupo-repórter, como um fluoróforo. Derivados particularmente úteis são modificados em uma ponta ou em pontas de um

filamento de RNA, tipicamente a ponta 3' do filamento no-sentido. Por exemplo, a 2'-hidroxila na ponta 3' pode ser facilmente e seletivamente derivatizada com uma variedade de grupos.

Outros derivados de RNA úteis incorporam nucleotídeos apresentando porções de carboidrato modificadas, como radicais 2'-O-alquilados ou derivados de 2'-O-metil ribosila e derivados de 2'-O-floro ribosila. As bases de RNA também podem ser modificadas. Qualquer base modificada útil para inibir ou interferir com a expressão de uma sequência-alvo pode ser usada. Por exemplo, bases halogenadas, como 5-bromouracila e 5-iodouracila podem ser incorporadas. As bases também podem ser alquiladas, por exemplo, 7-metilguanosina pode ser incorporada em lugar de um radical guanosina. É possível incorporar também bases não-naturais que proporcionam inibição bem sucedida.

As modificações de siRNA mais preferidas incluem 2'-desóxi-2'-fluorouridina ou nucleotídeos de ácido nucleico 'travado' (LNA) e cópias de RNA contendo fosfodiéster ou números variáveis de ligações de fosforotioato. Referidas modificações são conhecidas por alguém com prática na arte e encontram-se descritas, por exemplo, em Braasch *et al*, *Biochemistry*, 42: 7967-7975, 2003. A maior parte das modificações úteis nas moléculas de siRNA pode ser introduzida usando-se químicas estabelecidas na tecnologia de oligonucleotídeos anti-sentido. De preferência, as modificações envolvem modificação mínima de 2'-O-metila, de preferência, excluindo referida modificação. Modificações também excluem, de preferência, modificações dos grupos 5'-hidroxila livres do siRNA.

Moléculas de siRNA e miRNA apresentando várias "caudas" ligadas covalentemente a suas caudas 3' ou a suas caudas 5', ou a ambas, também são conhecidas na arte e podem ser usadas para estabilizar as moléculas de siRNA e miRNA fornecidas usando-se os métodos da presente invenção. De uma forma geral, grupos intercalantes, vários tipos de grupos

repórter e grupos lipofílicos ligados às pontas 3' ou 5' das moléculas de RNA são bem conhecidos por alguém com prática na arte e são úteis de acordo com os métodos da presente invenção. Descrições de sínteses de oligonucleotídeos modificados com 3'-colesterol ou 3'-acridina aplicáveis na preparação de moléculas de RNA modificadas úteis de acordo com a presente invenção podem ser encontradas, por exemplo, nos artigos: Gamper, H. B., Reed, M. W., Cox, T., Virosco, J. S., Adams, A. D., Gall, A., Scholler, J. K., e Meyer, R. B. (1993) *Facile Preparation and Exonuclease Stability of 3'-Modified Oligodeoxynucleotides*, Nucleic Acids Res. 21 145-150; e Reed, M. W., Adams, A. D., Nelson, J. S., e Meyer, R. B., Jr. (1991) *Acridine and Cholesterol-Derivatized Solid Supports for Improved Synthesis of 3'-Modified Oligonucleotides*. Bioconjugate Chem. 2 217-225 (1993).

Outros siRNAs úteis para objetivar a expressão de Lp-PLA₂ pode ser facilmente projetada e testada. Assim, siRNAs úteis para os métodos aqui descritos incluem moléculas de siRNA com cerca de 15 a cerca de 40 ou cerca de 15 a cerca de 28 nucleotídeos de comprimento, que são homólogas a um gene de Lp-PLA₂. De preferência, as moléculas de siRNA que objetivam Lp-PLA₂ apresentam um comprimento de cerca de 19 a cerca de 25 nucleotídeos. Mais preferivelmente, as moléculas de siRNA que objetivam Lp-PLA₂ apresentam um comprimento de cerca de 19, 20, 21, ou 22 nucleotídeos. As moléculas de siRNA que objetivam Lp-PLA₂ também podem compreender um grupo 3' hidroxila. As moléculas de siRNA que objetivam Lp-PLA₂ podem ser de filamento simples ou de filamento duplo; referidas moléculas podem ser de ponta rombuda ou podem compreender pontas *overhanging* (p. ex., 5', 3'). Em concretizações específicas, a molécula de RNA é de filamento duplo e são, ou de pontas rombudas ou compreendem pontas *overhanging*.

Em uma concretização, pelo menos um filamento da molécula de RNA que objetiva Lp-PLA₂ apresenta um *overhang* a 3' com um

comprimento de cerca de 0 a cerca de 6 nucleotídeos (p. ex., nucleotídios de pirimidina, nucleotídios de purina). Em outras concretizações, o *overhang* em 3' é de cerca de 1 a cerca de 5 nucleotídeos, de cerca de 1 a cerca de 3 nucleotídeos e de cerca de 2 a cerca de 4 nucleotídeos de comprimento. Em

5 uma concretização a molécula de RNA que objetiva Lp-PLA₂ é de filamento duplo - um filamento tem a *overhang* em 3' e o outro filamento pode ser ponta rombuda ou apresentar um *overhang*. Na concretização em que a molécula de RNA que objetiva Lp-PLA₂ é de filamento duplo, e ambos os filamentos compreendem um *overhang*, o comprimento dos *overhangs* podem ser iguais

10 ou diferentes para cada filamento. Em uma concretização particular, o RNA da presente invenção compreende cerca de 19, 20, 21, ou 22 nucleotídeos que são pareados e que apresentam *overhangs* com cerca de 1 a cerca de 3, particularmente cerca de 2, nucleotídeos em ambas as pontas 3' do RNA. Em uma concretização, os *overhangs* em 3' podem ser estabilizados contra

15 degradação. Em uma concretização preferida, o RNA é estabilizado incluindo nucleotídios de purina, como nucleotídios de adenosina ou guanosina. Alternativamente, a substituição de nucleotídeos de pirimidina por análogos modificados, p. ex., substituição do nucleotídio de uridina 2 em 3' por 2'-desoxitimidina é tolerada e não afeta a eficiência de RNAi. A ausência de

20 uma 2' hidroxila aumenta significativamente a resistência à nuclease do *overhang* em meio de cultura de tecido.

mRNA de Lp-PLA₂ foi objetivado com êxito usando siRNAs e referido siRNA ou vetores para a preparação dos mesmos são comercialmente

obteníveis, por exemplo, da Invitrogen. Em algumas concretizações, a

25 avaliação da expressão e/ou *knock down* da proteína Lp-PLA₂ usando referidos siRNAs de Lp-PLA₂ pode ser determinada usando-se kits comercialmente obteníveis, por exemplo, mas sem limitação, ensaio PLAC de diaDexus. Outros também podem ser facilmente preparados por aqueles com prática na arte com base na própria sequência do mRNA-alvo. Para dirimir

dúvidas, a sequência de um cDNA de Lp-PLA₂ humana é fornecida, por exemplo, em números de acesso GenBank nums.: U20157 (SEQ ID NO:1) ou NM_005084 (SEQ ID NO:2). A sequência em U20157 é a seguinte (SEQ ID NO:1):

```

1  gctgggtcggg ggctcgcagt gctgtcggcg agaagcagtc gggtttggag cgcttgggtc
61  gcggttggtgc gcggtggaac gcgcccaggg accccagttc ccgcgagcag ctccgcgcgcg
121 cgcttgagag actaagctga aactgctgct cagctcccaa gatggtgcca cccaaattgc
181 atgtgctttt ctgcctctgc ggctgcctgg ctgtggttta tccttttgac tggcaataca
241 taaatcctgt tgcccatatg aaatcatcag catgggtcaa caaaatataa gtactgatgg
301 ctgctgcaag ctttggccaa actaaaatcc cccggggaaa tgggccttat tccgttgggt
361 gtacagactt aatgtttgat cacactaata agggcacctt cttgcgttta tattatccat
421 cccaagataa tgatcgctt gacacccttt ggatcccaaa taaagaatat ttttggggtc
481 ttagcaaat tcttggaaac cactggctta tgggcaacat tttgaggtta ctctttgggt
541 caatgacaac tcctgcaaac tgggaattccc ctctgaggcc tggtgaaaaa tatccacttg
601 ttgttttttc tcatggtctt ggggcattca ggacacttta ttctgctatt ggcattgacc
661 tggcatctca tgggtttata gttgctgctg tagaacacag agatagatct gcatctgcaa
721 cttactattt caaggaccaa tctgctgcag aaatagggga caagtcttgg ctctacctta
781 gaacctgaa acaagaggag gagacacata tacgaaatga gcaggtagcg caaagagcaa
841 aagaatgttc ccaagctctc agtctgattc ttgacattga tcatggaaag ccagtgaaga
901 atgcattaga tttaaagttt gatatggaac aactgaagga ctctattgat agggaaaaaa
961 tagcagtaat tggacattct tttggtggag caacggttat tcagactctt agtgaagatc
1021 agagattcag atgtggtatt gccctggatg catggatggt tccactgggt gatgaagtat
1081 attccagaat tcctcagccc ctctttttta tcaactctga atatttccaa tatcctgcta
1141 atatcataaa aatgaaaaaa tgctactcac ctgataaaga aagaaagatg attacaatca
1201 ggggttcagt ccaccagaat tttgctgact tcacttttgc aactggcaaa ataattggac
1261 acatgctcaa attaaagggg gacatagatt caaatgtagc tattgatctt agcaacaaag
1321 cttcattagc attcttataa aagcatttag gacttcataa agattttgat cagtgggact
1381 gcttgattga aggagatgat gagaatctta ttccagggac caacattaac acaaccaatc
1441 aacacatcat gttacagaac tcttcaggaa tagagaaata caattagat taaaataggt
1501 ttttt

```

5 Sequências de siRNA são selecionadas de forma a maximizar a absorção do filamento anti-sentido (guia) do siRNA em RISC e, com isto, maximizar a capacidade de RISC em objetivar mRNA de Lp-PLA₂ humana para degradação. Isto pode ser realizado pesquisando-se sequências que apresentam a menor energia livre de ligação na ponta 5' do filamento anti-sentido. A menor energia livre leva a um aumento do desenrolamento da

10 ponta 5' do filamento anti-sentido do dúplice de siRNA, assegurando com isto que o filamento anti-sentido será absorvido por RISC e dirigirá a clivagem específica para sequência do mRNA de Lp-PLA₂ humana.

Em uma concretização preferida, o siRNA ou siRNA

15 modificado é fornecido em um veículo farmacologicamente aceitável. Agentes de veículo adicionais, como liposomas, podem ser adicionados ao veículo farmacologicamente aceitável.

Em outra concretização, o siRNA é fornecido por meio de fornecimento de um vetor que codifica RNA de grampo-de-cabelo pequeno (shRNA) em um veículo farmacologicamente aceitável para as células em um órgão de um indivíduo. O shRNA é convertido pelas células após transcrição em siRNA capaz de objetivar, por exemplo, Lp-PLA₂. Em uma concretização, o vetor pode ser um vetor regulável, como vetor induzível por tetraciclina.

Em uma concretização, os agentes interferentes de RNA usados nos métodos descritos aqui são absorvidos ativamente por células *in vivo* após injeção intravenosa, p. ex., injeção hidrodinâmica, sem o uso de um vetor, ilustrando eficiente fornecimento *in vivo* dos agentes interferentes de RNA, p. ex., os siRNAs usados nos métodos da invenção.

Outras estratégias para o fornecimento dos agentes interferentes de RNA, p. ex., os siRNAs ou shRNAs usados nos métodos da invenção, também podem ser usados, como, por exemplo, fornecimento por um vetor, p. ex., um plasmídeo ou vetor viral, p. ex., um vetor lentiviral. Referidos vetores podem ser usados como descrito, por exemplo, em Xiao-Feng Qin *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100: 183-188. Outros métodos de fornecimento incluem o fornecimento dos agentes interferentes de RNA, p. ex., os siRNAs ou shRNAs da invenção, usando-se um peptídeo básico por meio de conjugação ou misturação do agente interferente de RNA com um peptídeo básico, p. ex., um fragmento de um peptídeo TAT, misturação com lipídeos catiônicos, ou formulação em partículas.

Conforme indicado, o dsRNA, como siRNA ou shRNA, pode ser fornecido usando-se um vetor induzível, como um vetor induzível por tetraciclina. É possível usar métodos descritos, por exemplo, em Wang *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 5103-5106, usando vetores pTet-On (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA). Em algumas concretizações, um vetor pode ser um vetor de plasmídeo, um vetor viral, ou qualquer outro veículo vantajoso adaptado para a inserção e sequência estranha e para a introdução

em células eucarióticas. O vetor pode ser um vetor de expressão capaz de direcionar a transcrição da sequência de DNA das moléculas de ácido nucleico agonistas ou antagonistas no RNA. Vetores de expressão virais podem ser selecionados de um grupo compreendendo, por exemplo, reterovírus, lentivírus, vírus de Epstein Barr, vírus do papiloma bovino, vetores à base de adenovírus e adeno-associados ou vírus híbridos de quaisquer dos acima. Em uma concretização, o vetor é epissômico. O uso de um vetor epissômico vantajoso proporciona um meio de manter a molécula de ácido nucleico antagonista no sujeito em DNA cromossômico extra com grande número de cópias, eliminando com isto efeitos potenciais de integração cromossômica.

Moléculas de interferência de RNA e inibidores de ácido nucleico úteis nos métodos como revelado aqui podem ser produzidos usando-se quaisquer técnicas conhecidas, como síntese química direta, por meio de processamento de RNAs de filamento duplo mais longos por meio de exposição a proteína Dicer recombinante ou lisados de embrião de *Drosophila*, através de um sistema *in vitro* derivado de células S2, usando-se RNA polimerase de fago, RNA polimerase dependente de RNA, e vetores à base de DNA. O uso de lisados de células ou processamento *in vitro* pode envolver adicionalmente o isolamento subsequente do nucleotídeo curto, por exemplo, com cerca de 21 a 23 nucleotídeos, siRNAs do lisado, etc. Síntese química procede usualmente mediante a preparação de dois oligômeros de RNA de filamento simples, seguida de recombinação dos dois oligômeros de filamento simples em um RNA de filamento duplo. Outros exemplos incluem métodos revelados no WO 99/32619 e WO 01/68836, sendo que cada um destes ensina a síntese química e enzimática do siRNA. Além disso, numerosos serviços comerciais encontram-se disponíveis para o projeto e a fabricação de siRNAs específicos (ver, p. ex., QIAGEN Inc., Valencia, CA e AMBION Inc., Austin, TX)

Em algumas concretizações, um agente é proteína ou polipeptídeo ou agente de RNAi que inibe a expressão de Lp-PLA e/ou atividade da proteína Lp-PLA₂. Em referidas concretizações células podem ser modificadas (p. ex., por meio de recombinação homóloga) para proporcionar expressão incrementada de um agente do tipo referido, por exemplo, por meio de substituição, em todo ou em parte, do promotor naturalmente ocorrente por todo ou parte de um promotor heterólogo, de tal forma que as células expressem o agente inibidor natural de Lp-PLA₂, por exemplo, proteína ou inibidor de miRNA de Lp-PLA₂ em níveis mais elevados. O promotor heterólogo é inserido de tal forma que é ligado operacionalmente ao ácido nucleico desejado que codifica o agente. Ver, por exemplo, Publicação Internacional PCT n° WO 94/12650 pela Transkaryotic Therapies, Inc., Publicação Internacional PCT n° WO 92/20808 pela Cell Genesys, Inc., e Publicação Internacional PCT n° WO 91/09955 pela Applied Research Systems. Células também podem ser manipuladas para expressar um gene endógeno compreendendo o agente sob o controle de elementos reguladores induzíveis, sendo que, neste caso, as sequências reguladoras do gene endógeno podem ser substituídas por recombinante homóloga. Técnicas de ativação gênica são descritas na Patente US n° 5.272.071 para Chappel; Patente US n° 5.578.461 para Sherwin *et al.*; PCT/US92/09627 (W093/09222) por Selden *et al.*; e PCT/US90/06436 (WO91/06667) por Skoultchi *et al.* O agente pode ser preparado cultivando-se células hospedeiras transformadas em condições de cultura vantajosas para expressar o miRNA. O gene expresso resultante pode ser então purificado de referida cultura (i.e., de meio de cultura ou de extratos de células) usando-se processos de purificação conhecidos, como filtração em gel e cromatografia de troca de íon. A purificação do inibidor do agente de peptídeo ou ácido nucleico de Lp-PLA₂ também pode incluir uma coluna de afinidade contendo agentes que se ligarão à proteína; uma ou mais etapas de coluna sobre referidas resinas de

afinidade como concanavalina A-agarose, heparina-toyopearl™ ou Cibacrom blue 3GA Sepharose; uma ou mais etapas envolvendo cromatografia de interação hidrofóbica usando resinas como fenil éter, butil éter, ou propil éter; cromatografia de imunoafinidade, ou cromatografia de afinidade de cDNA complementar.

Em uma concretização, os inibidores de ácido nucleico de Lp-PLA₂ podem ser obtidos sinteticamente, por exemplo, por meio de sintetização química de um ácido nucleico por meio de qualquer método de síntese conhecido pela pessoa versada na arte. Os inibidores de ácido nucleico sintetizados de Lp-PLA₂ podem ser então purificados por meio de qualquer método conhecido na arte. Métodos para a síntese química de ácidos nucleicos incluem, embora sem limitação, síntese química *in vitro* usando química do fosfotriéster, fosfato ou fosforamidita e técnicas de fase sólida, ou via intermediários de desoxinucleosídeo H-fosfonato (ver Patente US nº 5.705.629 para Bhongle).

Em alguns casos, por exemplo, onde se deseja estabilidade incrementada à nuclease, pode-se preferir ácidos nucleicos apresentando análogos de ácido nucleico e/ou ligações internucleosídeos modificadas. Ácidos nucleicos contendo ligações internucleosídeos modificadas também podem ser sintetizadas usando-se reagentes e métodos que são bem conhecidos na arte. Por exemplo, métodos de sintetizar ácidos nucleicos contendo fosfonato fosforotioato, fosforoditioato, fosforamidato metoxietil fosforamidato, formacetal, tioformacetal, diisopropilsilila, acetamidato, carbamato, sulfeto de dimetileno (-CH₂-S-CH₂), sulfóxido de dimetileno (-CH₂-SO-CH₂), dimetileno-sulfona (-CH₂-SO₂-CH₂), 2'-O-alquila, e ligações internucleosídeos 2'-desóxi-2'-flúor ' fosforotioato são bem conhecidas na arte (ver Uhlmann *et al.*, 1990, *Chem. Rev.* 90:543-584; Schneider *et al.*, 1990, *Tetrahedron Lett.* 31:335 e referências ali indicadas). Patentes dos Estados Unidos nums. 5.614.617 e 5.223.618 para Cook, *et al.*, 5.714.606 para

Acevedo, *et al*, 5.378.825 para Cook, *et al*, 5.672.697 e 5.466.786 para Buhr, *et al*, 5.777.092 para Cook, *et al.*, 5.602.240 para De Mesmacker, *et al.*, 5.610.289 para Cook, *et al.* e 5.858.988 para Wang, também descrevem análogos de ácido nucleico para estabilidade incrementada de nuclease e absorção celular.

Moléculas de siRNA sintéticas, incluindo moléculas de shRNA, podem ser obtidas usando-se uma variedade de técnicas conhecidas por aqueles com prática na arte. Por exemplo, a molécula de siRNA pode ser sintetizada quimicamente ou produzida recombinantemente usando-se métodos conhecidos na arte, como usando ribonucleosídeo fosforamiditas apropriadamente protegidas e um sintetizador de DNA/RNA convencional (ver, p. ex., Elbashir, S.M. *et al.* (2001) *Nature* 411:494-498; Elbashir, S.M., W. Lendeckel e T. Tuschl (2001) *Genes & Development* 15: 188-200; Harborth, J. *et al* (2001) *J. Cell Science* 114:4557-4565; Masters, J.R. *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 98:8012-8017; e Tuschl, T. *et al.* (1999) *Genes & Development* 13:3191-3197). Alternativamente, diversos fornecedores de síntese de RNA comercial encontram-se disponíveis incluindo, embora sem limitação, Proligo (Hamburg, Alemanha), Dharmacon Research (Lafayette, CO, E.U.A.), Pierce Chemical (parte de Perbio Science, Rockford, IL, E.U.A.), Glen Research (Sterling, VA, E.U.A.), ChemGenes (Ashland, MA, E.U.A.), e Cruachem (Glasgow, Reino Unido). Assim,, moléculas de siRNA não são exageradamente difíceis de sintetizar e são facilmente obtidas numa qualidade vantajosa para RNAi. Adicionalmente, dsRNAs podem ser expressos como estruturas de *stem loop* codificadas por vetores plasmídicos retrovírus e lentivírus (Paddison, P.J. *et al.* (2002) *Genes Dev.* 16:948-958; McManus, M.T. *et al.* (2002) *RNA* 8:842-850; Paul, CP. *et al.* (2002) *Nat. Biotechnol.* 20:505-508; Miyagishi, M. *et al.* (2002) *Nat. Biotechnol.* 20:497-500; Sui, G. *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 99:5515-5520; Brummelkamp, T. *et al.* (2002) *Cancer Cell* 2:243; Lee, N.S.,

et al. (2002) *Nat. Biotechnol.* 20:500-505; Yu, J.Y., *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 99:6047-6052; Zeng, Y., *et al.* (2002) *Mol. Cell* 9:1327-1333; Robinson, D.A., *et al.* (2003) *Nat. Genet.* 33:401-406; Stewart, S.A., *et al.* (2003) *RNA* 9:493-501). Estes vetores apresentam geralmente um promotor *polIII* a montante do dsRNA e pode expressar filamentos de RNA no-sentido e anti-sentido separadamente e/ou como estruturas de grampo-de-cabelo. Nestas células, Dicer processa RNA de grampo-de-cabelo curto (shRNA) em siRNA efetivo.

A região objetivada da molécula de siRNA da presente invenção pode ser selecionada de uma dada sequência gênica-alvo, p. ex., uma sequência codificante de Lp-PLA₂, começando de cerca de 25 a 50 nucleotídeos, de cerca de 50 a 75 nucleotídeos, ou de cerca de 75 a 100 nucleotídeos a jusante do códon iniciador. Sequências de nucleotídeos podem conter UTRs a 5' ou 3' e regiões próximas do códon iniciador. Um método de projetar uma molécula de siRNA da presente invenção envolve a identificação da unidade repetitiva de sequência de 23 nucleotídeos AA(N19)TT (sendo que N pode ser qualquer nucleotídeo), e a seleção de acertos com teor de pelo menos 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % ou 75 % de G/C. A porção "TT" da sequência é opcional. Alternativamente, se nenhuma sequência do tipo referido for encontrada, a busca pode ser estendida usando-se a unidade repetitiva NA(N21), em que N pode ser qualquer nucleotídeo. Nesta situação, a ponta 3' do siRNA no-sentido pode ser convertida a TT para permitir a geração de um dúplice simétrico com *overhangs* anti-sentido em 3'. A molécula de siRNA anti-sentido pode ser sintetizada então como o complemento para as posições de nucleotídeos de 1 a 21 da unidade repetitiva de sequência de 23 nucleotídeos. O uso de *overhangs* TT simétricos em 3' pode ser vantajoso para assegurar que as partículas pequenas de ribonucleoproteína interferente (siRNPs) são formadas com relações aproximadamente iguais de siRNPs clivando RNA-alvo no-sentido e

anti-sentido (Elbashir *et al.* (2001) acima e Elbashir *et al.* 2001 acima). Análise dos bancos de dados de sequências incluindo, embora sem limitação, o NCBI, BLAST, Derwent e GenSeq e também programas de oligossíntese comercialmente obteníveis, como Oligoengine®, também podem ser usados
 5 para selecionar sequências de siRNA contra bibliotecas EST para assegurar que apenas um gene é objetivado.

Fornecimento de agentes interferentes de RNA: Métodos de fornecimento de agentes interferentes de RNA, p. ex., um siRNA, ou vetores contendo um agente interferente de RNA, às células-alvo (p. ex., células do
 10 cérebro ou outras células-alvos desejadas, para células no sistema nervoso central e no periférico), podem incluir, por exemplo, (i) injeção de uma composição contendo o agente interferente de RNA, p. ex., um siRNA, ou (ii) contacto direto da célula, p. ex., uma célula do cérebro, com uma composição compreendendo um agente interferente de RNA, p. ex., um siRNA. Em outra
 15 concretização, agentes interferentes de RNA, p. ex., um siRNA pode ser injetado diretamente em qualquer vaso sanguíneo, como veia, artéria, vênula ou arteríola, via, p. ex., injeção hidrodinâmica ou cateterização. Em algumas concretizações, agentes de Lp-PLA₂, como siRNA de Lp-PLA₂, podem ser fornecidos a órgãos específicos, por exemplo, o fígado, medula óssea ou
 20 administração sistêmica.

A administração pode ser por meio de injeções simples ou em duas ou mais injeções. O agente interferente de RNA é fornecido em um veículo farmacologicamente aceitável. É possível um ou mais agentes interferentes de RNA simultaneamente. Os agentes interferentes de RNA, p.
 25 ex., os siRNAs objetivando mRNA de Lp-PLA₂, podem ser fornecidos de forma simples, ou em combinação com outros agentes interferentes de RNA, p. ex., siRNAs, como, por exemplo, siRNAs dirigidos a outros genes celulares. siRNAs de Lp-PLA₂ também podem ser administrados em combinação com outros agentes farmacêuticos que são usados para tratar ou

prevenir doenças ou distúrbios neurodegenerativas.

Em uma concretização, células específicas são objetivadas com interferência de RNA, efeitos secundários limitantes potenciais da interferência de RNA causados por objetivação não-específica da interferência de RNA. O método pode usar, por exemplo, um complexo ou uma molécula de fusão compreendendo uma porção objetivadora de células e uma porção de ligação de interferência de RNA que é usada para fornecer interferência de RNA de forma eficaz nas células. Por exemplo, uma proteína de fusão anticorpo-protamina quando misturada com um siRNA, liga siRNA e fornece seletivamente o siRNA em células que expressam um antígeno reconhecido pelo anticorpo, resultando no silenciamento da expressão gênica apenas naquelas células que expressam o antígeno. A porção de ligação de molécula indutora de interferência de RNA ou siRNA é uma proteína ou um domínio de ligação de ácido nucleico ou fragmento de uma proteína, e a porção de ligação é fundida a uma porção da porção objetivadora. A localização da porção objetivadora pode ser na ponta carboxi ou na ponta amino da construção, ou no meio da proteína de fusão.

Um mecanismo de fornecimento mediado com vírus também pode ser usado para fornecer siRNAs às células *in vitro* e *in vivo* como descrito por Xia, H. *et al* (2002) *Nat Biotechnol* 20(10): 1006). Mecanismos de fornecimento de shRNA via plasmídios ou vírus também podem ser usados para fornecer shRNAs às células *in vitro* e *in vivo* como descrito por Robinson, D.A., *et al.* ((2003) *Nat. Genet.* 33:401-406) e Stewart, S.A., *et al.* ((2003) *RNA* 9:493-501).

Agentes interferentes de RNA para, p. ex., um siRNA, também podem ser introduzidos em células através da circulação vascular ou extravascular, do sangue ou sistema linfático, e do fluido cérebro-espinhal.

A dose do agente interferente de RNA particular será numa quantidade necessária para efetuar a interferência de RNA, p. ex.,

silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS), do gene-alvo particular, levando com isto à inibição da expressão do gene-alvo ou atividade ou nível da proteína codificada pelo gene-alvo.

Também é de conhecimento geral que moléculas de RNAi não
5 precisam equiparar-se perfeitamente a sua sequência-alvo. De preferência, contudo, a parte em 5' e média do filamento anti-sentido (guia) do siRNA é perfeitamente complementar à sequência de ácido nucleico alvo.

Assim, as moléculas de RNAi que funcionam como inibidores de ácido nucleico de Lp-PLA₂ na presente invenção são, por exemplo, embora
10 sem limitação, moléculas de RNA de filamento duplo (ds em inglês, ou fd em português) não modificadas ou modificadas incluindo RNA temporal curto RNA (stRNA), RNA interferente pequeno (siRNA), RNA de grampo-de-cabelo curto (shRNA), microRNA (miRNA), RNA de filamento duplo (dsRNA), (ver, p. ex., Baulcombe, *Science* 297:2002-2003, 2002). As
15 moléculas de dsRNA, p. ex., siRNA, também podem conter *overhangs* em 3', de preferência, *overhangs* 3'UU ou 3'TT. Em uma concretização, as moléculas de siRNA da presente invenção não incluem moléculas de RNA que compreendem ssRNA maior do que cerca de 30 a 40 bases, cerca de 40 a 50 bases, cerca de 50 bases ou mais. Em uma concretização, as moléculas de
20 siRNA da presente invenção são de filamento duplo em mais de cerca de 25 %, mais de cerca de 50 %, mais de cerca de 60 %, mais de cerca de 70 %, mais de cerca de 80 %, mais de cerca de 90 % de seu comprimento. Em algumas concretizações, um inibidor de ácido nucleico de Lp-PLA₂ é qualquer agente que se liga a, e inibe, a expressão de mRNA de Lp-PLA₂,
25 sendo que a expressão de mRNA de Lp-PLA₂ ou um produto da transcrição de ácido nucleico codificado pela SEQ ID NO: 1 ou 2 é inibido.

Em outra concretização da invenção, agentes que inibem Lp-PLA₂ são construções de ácido nucleico catalíticas, como por exemplo, ribozimas, que são capazes de clivar transcrições de RNA e, com isto,

prevenir a produção de proteína de tipo selvagem. Ribozimas são objetivadas a, e recombina-se com, uma sequência particular em virtude de duas regiões de sequência complementares a alvo que flanqueia o sítio catalítico de ribozima. Após a ligação, a ribozima cliva o alvo de uma maneira específica para o sítio. O projeto e a testagem de ribozimas que reconhecem especificamente e clivam sequências dos produtos gênicos aqui descritos, por exemplo, para clivagem de Lp-PLA₂ ou homólogos ou variantes dos mesmos podem ser obtidos por meio de técnicas bem conhecidas por aqueles com prática na arte (por exemplo, Lleber e Strauss, (1995) *Mol Cell Biol* 15:540,551, cuja revelação é incorporada aqui por referência).

Proteínas e inibidores de peptídios de Lp-PLA₂

Em algumas concretizações, agente[s] que inibem Lp-PLA₂ são inibidores de peptídios e/ou proteínas ou fragmentos de inibidores de Lp-PLA₂, por exemplo, embora sem limitação, proteínas mutadas; proteínas terapêuticas e proteínas recombinantes. Proteínas e peptídios inibidores também podem incluir, por exemplo, proteínas mutadas, proteínas geneticamente modificadas, peptídios, peptídios sintéticos, proteínas recombinantes, proteínas quiméricas, anticorpos, proteínas humanizadas, anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos, proteínas modificadas e fragmentos dos mesmos.

Em algumas concretizações, os agentes que inibem Lp-PLA₂ são variantes negativas dominantes de Lp-PLA₂, por exemplo, uma variante não-funcional de Lp-PLA₂.

Anticorpos

Em algumas concretizações, inibidores de genes e/ou produtos gênicos úteis nos métodos da presente invenção incluem, por exemplo, anticorpos, incluindo anticorpos monoclonais, quiméricos humanizados, e anticorpos recombinantes e fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos. Em algumas concretizações, anticorpos neutralizadores podem ser usados

como inibidores da enzima de Lp-PLA₂. Anticorpos são facilmente desenvolvidos em animais, como coelhos ou camundongos por meio de imunização com o antígeno. Camundongos imunizados são particularmente úteis para fornecer fontes de células B para a fabricação de hibridomas, que, por sua vez, são cultivados para produzir grandes quantidades de anticorpos monoclonais.

Em uma concretização desta invenção, o inibidor para os produtos gênicos aqui identificados pode ser uma molécula de anticorpo ou a porção de ligação de epitopo de uma molécula de anticorpo e análogos. Anticorpos proporcionam elevada avidéz de ligação e especificidade única para uma ampla faixa de haptenos e antígenos-alvos. Anticorpos monoclonais úteis na prática da presente invenção incluem anticorpo integral e fragmentos do mesmo, e são gerados de acordo com técnicas convencionais, como síntese de hibridoma, técnicas de DNA recombinante e síntese de proteína.

Anticorpos monoclonais úteis e fragmentos podem ser derivados de qualquer espécie (incluindo humanos) ou podem ser formados como proteínas quiméricas que usam sequências de mais de uma espécie. Anticorpos monoclonais humanos ou anticorpo murino "humanizado" também são usados de acordo com a presente invenção. Por exemplo, anticorpo monoclonal murino pode ser "humanizado" por meio de recombinação genética da sequência de nucleotídeos que codifica a região Fv murina (i.e., contendo os sítios de ligação de antígeno) ou as suas regiões determinadoras de complementaridade com a sequência de nucleotídeos codificando uma região Fc e uma região de domínio constante humana. Porções objetivadoras humanas são reconhecidas como causando a diminuição da imunorreatividade do anticorpo ou polipeptídio no recipiente hospedeiro, permitindo um aumento da meia-vida e uma possível redução de reações imunes adversas de uma maneira similar àquela revelada no Pedido de Patente Européia nº 0.411.893 A2. Os anticorpos monoclonais murinos

deveriam ser usados, de preferência, em forma humanizada. A atividade de ligação de antígeno é determinada pelas sequências e conformação dos aminoácidos das seis regiões determinadoras de complementaridade (CDRs) que se encontram localizadas (três cada) nas cadeias leve e pesada da porção variável (Fv) do anticorpo. A molécula de Fv de cadeia simples (scFv) com 25 kDa, constituída de uma região variável (VL) de cadeia leve, e de uma região variável (VH) de cadeia pesada conjugadas via uma sequência espaçadora curta de peptídios, é o menor fragmento de anticorpo desenvolvido até hoje. Desenvolveu-se técnicas para apresentar moléculas de scFv sobre a superfície de fagos filamentosos que contêm o gene para a scFv. Moléculas de scFv com uma ampla faixa de especificidades antigênicas podem estar presentes em um combinado grande simples de biblioteca de fago de scFv. Alguns exemplos de anticorpos monoclonais com alta afinidade e derivados quiméricos dos mesmos, útil nos métodos da presente invenção, encontram-se descritos no Pedido de Patente Européia EP 186.833; Pedido de Patente PCT WO 92/16553; e Patente US nº 6.090.923.

Anticorpos quiméricos são moléculas de imunoglobulina caracterizadas por dois ou mais segmentos ou porções derivadas de diferentes espécies animais. De uma maneira geral, a região variável do anticorpo quimérico é derivada de um anticorpo mamífero não-humano, como anticorpo monoclonal murino, e a região constante de imunoglobulina é derivada de uma molécula de imunoglobulina humana. De preferência, ambas as regiões e a combinação apresentam baixa imunogenicidade conforme determinado rotineiramente.

Uma limitação de moléculas de scFv é sua interação monovalente com antígeno-alvo. Um dos métodos mais fáceis de melhorar a ligação de um scFv a seu antígeno-alvo consiste em aumentar sua afinidade funcional através da criação de um multímero. A associação de moléculas de scFv idênticas para formar *diabodies*, *triabodies* e *tetrabodies* pode

compreender uma quantidade de módulos de Fv idênticos. Portanto, estes reagentes são multivalentes, porém monoespecíficos. A associação de duas moléculas de scFv diferentes, cada uma compreendendo um domínio VH e VL derivado de Ig parental diferente formará um *diabody* biespecífico

5 totalmente funcional. Uma aplicação única de scFvs biespecíficos consiste em ligar dois sítios simultaneamente na mesma molécula-alvo via dois epitopos de superfície (adjacentes). Estes reagentes ganham uma vantagem significativa de avidez sobre um scFv simples ou fragmentos Fab. Manipulou-se uma quantidade de estruturas à base de scFv multivalentes, incluindo por

10 exemplo, minianticorpos, minianticorpos diméricos, *minibodies*, (ScFv)₂, *diabodies* e *triabodies*. Estas moléculas compreendem uma faixa de valência (de dois a quatro sítios de ligação), tamanho (de 50 a 120 kDa), flexibilidade e facilidade de produção. Fragmentos de anticorpo Fv de cadeia simples (scFvs) são predominantemente monoméricos quando os domínios VH e VL são

15 conjugados por meio de ligantes polipeptídicos de pelo menos 12 radicais. O monômero scFv é termodinamicamente estável com ligantes apresentando comprimento de 12 e 25 aminoácidos em todas as condições. As moléculas de *triabody* e *diabody* não-covalentes são fáceis de manipular e são produzidas encurtando-se o ligante peptídico que conecta as cadeias variável pesada e

20 variável leve de uma molécula de scFv simples. Os dímeros de scFv são conjugados por meio de hélices anfifáticas que oferecem um alto grau de flexibilidade e a estrutura de minianticorpo pode ser modificada para criar um minianticorpo biespecífico dimérico (DiBi) que contém dois minianticorpos (quatro moléculas de scFv) conectados via uma hélice dupla. Dímeros de scFv

25 ligados com dissulfeto ou fundidos com gene proporcionam um grau intermediário de flexibilidade e são gerados por meio de técnicas diretas de clonagem mediante a adição de uma sequência Gly4Cys C-terminal. *Minibodies* scFv-CH3 são constituídos de duas moléculas de scFv conjugadas a um domínio IgG CH3, seja diretamente (*minibody* LD) ou via uma região de

dobradiça muito flexível (*minibody* Flex). Com um peso molecular de aproximadamente 80 kDa, estas construções divalentes são capazes de ligação significativa a antígenos. O *minibody* Flex apresenta localização impressiva de tumor em camundongos. Multímeros bi- e tri-específicos podem ser

5 formados por meio de associação de diferentes moléculas de scFv. O aumento da afinidade funcional pode ser atingido quando Fab ou fragmentos de anticorpos Fv de cadeia simples (scFv) são complexados a dímeros, trímeros ou agregados maiores. A vantagem mais importante de scFvs multivalentes sobre fragmentos Fab e scFv monovalentes é o ganho de afinidade de ligação

10 funcional (avidez) por antígenos-alvos. Alta avidez requer que multímeros de scFv sejam capazes de se ligarem simultaneamente para separar antígenos-alvos. O ganho de afinidade funcional por *diabodies* de scFv em comparação com monômeros de scFv é significativo e é observado primariamente em *off-rates* reduzidas, que resultam de ligação múltipla de dois ou mais antígenos-

15 alvos e religação quando um Fv se dissocia. Quando referidas moléculas de scFv se associam em multímeros, elas podem ser projetadas com alta avidez por um antígeno-alvo simples ou com múltiplas especificidades por diferentes antígenos-alvos. A ligação múltipla a antígenos é dependente do alinhamento e orientação corretos nos módulos de Fv. Para plena avidez em alvo de scFvs

20 multivalentes, os sítios de ligação de antígeno precisam indicar na mesma direção. Se a ligação múltipla não for estericamente possível, então ganhos aparentes de afinidade funcional devem-se provavelmente ao efeito de religação incrementada, que é dependente de taxa de difusão e concentração de antígeno. Anticorpos conjugados com porções que melhoram suas

25 propriedades também são considerados para a presente invenção. Por exemplo, conjugados de anticorpos com PEG, que aumenta sua meia-vida *in vivo*, podem ser usados para a presente invenção. Prepara-se bibliotecas imunes submetendo-se os genes que codificam fragmentos de anticorpos variáveis dos linfócitos B de animais ou pacientes não-tratados ou imunizados

a amplificação com PCR. Usa-se combinações de oligonucleotídeos que são específicos para genes de imunoglobulina ou para as famílias de genes de imunoglobulina. Genes de linha germinal de imunoglobulina podem ser usados para preparar repertórios de anticorpos semissintéticos, sendo que a região determinadora de complementaridade dos fragmentos variáveis é amplificada por meio de PCR usando-se iniciadores degenerados. Estas bibliotecas *single-pot* têm a vantagem de que fragmentos de anticorpos contra um grande número de antígenos podem ser isolados de uma única biblioteca. A técnica de apresentação de fago pode ser usada para incrementar a afinidade dos fragmentos de anticorpos, sendo que novas bibliotecas são preparadas a partir de fragmentos de anticorpos já existentes por meio de mutagênese randômica, baseada em códon, ou baseada em sítio, por meio de embaralhamento das cadeias dos domínios individuais com aqueles fragmentos de repertórios não-tratados ou por meio do uso de cepas bacterianas mutator.

Alternativamente, um camundongo SCID-hu, por exemplo, o modelo desenvolvido pela Genpharm, pode ser usado para produzir anticorpos, ou fragmentos dos mesmos. Em uma concretização, considera-se um novo tipo de molécula de ligação de elevada avidéz, denominada *peptabody*, criada por meio de aproveitamento do efeito da interação multivalente. Um ligante peptídico curto foi fundido via uma região de dobradiça semirrígida com o domínio de conjunto de espiral helicoidal da proteína de matriz oligomérica da cartilagem, resultando em uma molécula de ligação multivalente pentamérica. Em concretização preferida desta invenção, ligantes e/ou inibidores quiméricos podem ser objetivados para alvos específicos para tecido ou para tumor por meio do uso de anticorpos biespecíficos, por exemplo, produzidos por meio de ligação química de um anticorpo anti-ligante (Ab) e um Ab direcionado para um alvo específico. Para evitar as limitações de conjugados químicos, é possível usar conjugados moleculares de anticorpos para a produção de Abs de cadeia única

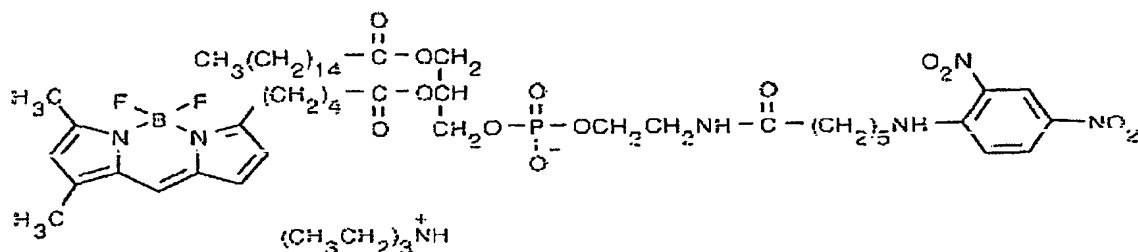
biespecíficos recombinantes que dirigem ligantes e/ou inibidores quiméricos nas moléculas da superfície celular. Alternativamente, dois ou mais agentes ativos e ou inibidores ligados a porções de objetivação podem ser administrados, sendo que cada conjugado inclui uma porção de objetivação, por exemplo, um anticorpo diferente. Cada anticorpo é reativo com um epitopo de sítio-alvo diferente (associado com o mesmo antígeno de sítio-alvo diferente, ou com um diferente). Os diferentes anticorpos com os agentes ligados acumulam-se aditivamente no sítio-alvo desejado. É possível usar porções objetivadoras baseadas em anticorpo ou não-baseadas em anticorpo para fornecer um ligante ou o inibidor em um sítio-alvo. De preferência, usa-se para tal fim um agente de ligação natural para um antígeno não-regulado ou associado com doença.

Ensaio biológico para identificação de inibidores de Lp-PLA₂:

Seleção quanto à inibição da proteína Lp-PLA₂

Em algumas concretizações, os métodos da presente invenção referem-se ao uso de inibidores de Lp-PLA₂ para o tratamento de demência vascular, por exemplo, mal de Alzheimer e/ou tratamento de distúrbios associadas com permeabilidade da BBB. Onde necessário, agentes que inibem proteína Lp-PLA₂ são avaliados com o uso de um ensaio biológico, como revelado na Patente US nº 5.981.252 que é incorporada aqui integralmente por referência. Um ensaio do tipo referido consiste em testar o efeito do agente sobre a proteína Lp-PLA₂ recombinante. Neste ensaio, por exemplo, Lp-PLA₂ recombinante é purificada à homogeneidade a partir de células Sf9 infectadas com baculovírus, usando uma coluna queladora de zinco, cromatografia de afinidade de sefarose azul e uma coluna de troca de ânion. Após purificação e ultrafiltração, a enzima pode ser armazenada a 6 mg/ml a 4°C. Tamponador de ensaio compreende Tris-HCl (50 mM), NaCl (150 mM) e 1 mM de CHAPS, pH 7,4 à temperatura ambiente. A atividade é medida por meio de um aumento da emissão a 535 nm em hidrólise de N-((6-(2,4-

dinitrofenil)amino)hexanoil)-2-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-pentanoil)-1-hexadecanoil-sn-glycero-S-fosfoetanolamina, sal de trietilamônio (PED6, Molecular Probes, referência do catálogo D-23739) como substrato, usando uma leitora de placas fluorométrica com placas de microtitulação de 384 poços. A reação é iniciada por meio da adição de enzima (aprox 400 pM final em peso) e substrato (5 µM final) ao inibidor em um volume total de 10 microlitros.



Os compostos como revelados aqui, por exemplo, como revelados nas seções intituladas de Exemplos de síntese foram testados e verificou-se que apresentam valores IC₅₀ na faixa de 0,1 a 10 nM.

Usos de agentes que inibem Lp-PLA₂ para o tratamento de doenças ou distúrbios neurodegenerativas

Distúrbios associados com permeabilidade da BBB:

Sem desejar ater-nos à teoria, a BBB, uma barreira funcional adicionalmente a uma barreira anatômica, é de grande importância para a manutenção de um ambiente constante para função ótima do SNC. A maior parte dos substratos metabólicos (i.e. açúcares e aminoácidos) é hidrofílica, e só atravessa a BBB por meio de sistemas de transporte mediados por veículo específicos, que são expressos em ambos os lados, luminal e abluminal, de células endoteliais da BBB. Há diferenças apicais/basais marcantes na distribuição de veículos e enzimas, o que diferencia o endotélio de BBB especializado do endotélio periférico. Ocorreu progresso substancial na compreensão da patofisiologia e mecanismos envolvidos na atenuação da permeabilidade da BBB. Implicações clínicas da "BBB doente" ocorrem em muitas doenças que afetam o cérebro, sendo que a BBB torna-se disrompida,

ou modificada, de tal forma que há um aumento drástico da permeabilidade vascular. Sem desejar ater-nos à teoria, existem várias maneiras em que várias moléculas podem atravessar o endotélio. Estas incluem vias intercelulares, transporte vesicular, ou penetração transcelular direta através do endotélio danificado.

Uma BBB anormal ou disfunção da BBB pode ser uma causa ou consequência de um processo de doença particular, por exemplo, doenças e distúrbios neurodegenerativos. Doenças em que a permeabilidade incrementada da BBB foi reportada incluem a neoplasia, isquemia, hipertensão, demência, epilepsia, infecção, esclerose múltipla, e trauma. O efeito de uma doença sobre a função da BBB afetará secundariamente o fluxo sanguíneo cerebral e o tono vascular no cérebro, o que influencia adicionalmente o transporte através da BBB.

Como revelado aqui, a inibição da Lp-PLA₂ usando os agentes como revelados aqui é útil para o tratamento de distúrbios ou doenças em que ocorre a permeabilidade da BBB e/ou em que ocorre a disrupção da BBB. A inibição da Lp-PLA₂ usando-se os agentes, por exemplo, agentes como revelados aqui, é útil para o tratamento ou prevenção de distúrbios ou doenças em que se deseja a manutenção de uma BBB intacta.

Em algumas concretizações, agentes que inibem a Lp-PLA₂ como revelado aqui são úteis na prevenção e no tratamento de doenças e distúrbios neurodegenerativos. Exemplos de doenças neurológicas e doenças e distúrbios neurodegenerativos incluem, embora sem limitação, mal de Alzheimer (AD), mal de Parkinson (PD), doença de Huntington (HD), demência vascular, envelhecimento e deficiência cognitiva branda.

Em outras concretizações, agentes que inibem Lp-PLA₂ como revelado aqui são úteis na prevenção e no tratamento de doenças em que a permeabilidade da BBB foi determinada, ou pode ser determinada, como desempenhando um papel, como por exemplo, embora sem limitação:

hiperosmolaridade; pH ácido; encefalopatia por queimadura; encefalopatia por chumbo; encefalopatia autoimune; esclerose múltipla; reperfusão pós-isquemia; hipertensão aguda; irradiação de microondas; encefalopatia hepática; ataques apopléticos; tumores; desenvolvimento; hipervolemia; 5 hipotermia; pós-irradiação; condições hiperbáricas; meningite; encefalopatia linfostática; diabetes; síndrome de Wernickes-Korsakoff; retardo mental familiar e esclerose lateral amiotrófica (ALS).

Sujeitos passíveis de tratamento por meio de agentes que inibem Lp-PLA₂ como revelado aqui incluem sujeitos em risco de doença 10 mas que não apresentam sintomas (por exemplo, sujeitos assintomáticos), e também sujeitos que presentemente apresentam sintomas. No caso do mal de Alzheimer, virtualmente qualquer um encontra-se em risco de sofrer de mal de Alzheimer se ele ou ela viver o suficiente. Portanto, os presentes métodos podem ser administrados profilaticamente à população geral sem qualquer 15 avaliação do risco do sujeito paciente. Os métodos como revelados aqui são particularmente úteis para indivíduos que eficazmente apresentam um risco genético conhecido de mal de Alzheimer. Referidos indivíduos incluem aqueles apresentando familiares que experimentaram esta doença, e aqueles cujo risco é determinado por meio de análise de marcadores genéticos ou 20 bioquímicos, como revelado aqui.

Doenças de demência vascular

A demência vascular constitui-se de uma quantidade de condições patológicas heterogêneas, que resulta de lesões cerebrais isquêmicas ou hemorrágicas e também de lesões que se desenvolvem durante 25 a hipoperfusão prolongada.

A forma isquêmica subcortical de demência vascular é um tipo comum de deficiência cognitiva e demência vascular, e uma das principais causas do declínio cognitivo em pessoas mais velhas. A demência vascular isquêmica subcortical resulta principalmente de doença dos vasos pequenos,

que causa lacunas e lesões extensivas da matéria branca, e pode ser comparada com demência dos vasos grandes ou demência vascular cortical (Roman GC, *Neurology*. 1993;43:250-260, Roman GC *Lancet Neurol*. 2002;1:426-436). As lesões isquêmicas na demência vascular isquêmica subcortical afetam particularmente os circuitos frontais-subcorticais, uma observação que explica os principais efeitos neurológicos cognitivos e clínicos da demência vascular (Ishii N, *Neurology* 1986; 36: 340-45, Cummings JL, *Arch Neurol* 1993; 50:873-80). Demência vascular isquêmica subcortical também é causada por hipertensão persistente (de Leeuw FE, *Brain*, 2002; 125:765-772) e hipoperfusão devida a falha cardíaca congestiva (Roman GC. *Neurol Res*. 2004;26:454-458), fibrilação atrial (de Leeuw FE, *Neurology*. 2000;54:1795- 1801), e apnéia obstrutiva do sono (Kamba M, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2001; 71; 334-339).

Lesões isquêmicas da matéria branca, uma constatação comum em pessoas idosas, são as alterações patológicas características na demência vascular isquêmica subcortical e deficiência cognitiva, e disfunções cognitivas estão relacionadas com a severidade da lesão (Hachinski VC, *Arch Neurol*. 1987;4:21-23, Pantoni L, *Alzheimer Dis. Assoc. Disord*. 1999;13(supl. 3):S49-S54, de Groot JC, *Neurology* 2001; 56: 1539-1545). Lesões da matéria branca cerebrovascular constituem a patologia central em vários tipos de demência vascular, como a doença de Binswanger, angiopatia amilóide cerebral, e arteriopatia dominante autossômica cerebral com infartos subcorticais e leucoencefalopatia (CADASIL). Estas lesões na matéria branca cerebrovascular são causadas por hipoperfusão cerebral crônica, que resulta da estenose severa de várias artérias ou arteríolas, principalmente na matéria branca profunda (Pantoni L, *Stroke* 1997;28:652-659, de Groot JC, *Neurology* 2001; 56:1539-1545, Roman GC, *Neurol. Res*. 2004;26:454-458, Capizzano AA, *Am J Neuroradiol* 2000;21:621-630).

Mal de Alzheimer

O mal de Alzheimer (AD, *Alzheimer disease*) é uma doença progressiva que resulta em demência senil. Ver geralmente Selkoe, TINS 16, 403-409 (1993); Hardy *et al.*, WO 92/13069; Selkoe, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 438-447 (1994); Duff *et al.*, *Nature* 373, 476-477 (1995); Games
 5 *et al.*, *Nature* 373, 523 (1995). De uma maneira geral, a doença enquadra-se em duas categorias: início tardio, que ocorre na idade avançada (+ de 65 anos) e início precoce, que se desenvolve bem antes do período senil, i.e, entre 35 e 60 anos. Em ambos os tipos de doença, a patologia é a mesma, mas as anormalidades β tendem a ser mais graves e disseminadas em casos que se
 10 iniciam em um estágio mais precoce. A doença é caracterizada no nível macroscópico por encolhimento significativo do cérebro afastando-se da caixa craniana, como observado em imagens de MRI como um resultado direto da perda neuronal e por dois tipos de lesões macroscópicas no cérebro, placas senis e embaralhamentos neurofibrilares. Placas senis são áreas
 15 compreendendo processos neuronais desorganizados até 150 μ m de seção transversal e depósitos de amilóide extracelular, que se encontram concentrados tipicamente no centro e são visíveis por meio de análise microscópica de seções do tecido cerebral. Embaralhamentos neurofibrilares são depósitos intracelulares de proteína tau consistindo de dois filamentos
 20 torcidos em torno um do outro, em pares.

O principal constituinte das placas é um peptídeo denominado A β ou peptídeo β -amilóide. O peptídeo A β é um fragmento interno com de 39 a 43 aminoácidos de uma proteína precursora denominada proteína precursora do amilóide (APP). Diveras mutações na proteína APP foram correlacionadas
 25 com a presença do mal de Alzheimer. Ver, p. ex., Goate *et al.*, *Nature* 349, 704 (1991) (valina⁷¹⁷ por isoleucina); Chartier Harlan *et al.* *Nature* 353, 844 (1991) (valina⁷¹⁷ por glicina); Murrell *et al.*, *Science* 254, 97 (1991) (valina⁷¹⁷ por fenilalanina); Mullan *et al.*, glicina); Murrell *et al.*, *Science* 254, 97 (1991) (valina⁷¹⁷ por fenilalanina); Mullan *et al.*, *Nature Genet.* 1, 345 (1992)

(uma mutação dupla alterando lisina⁵⁹⁵-metionina⁵⁹⁶ por asparagina⁵⁹⁵-leucina⁵⁹⁶). Considera-se que referidas mutações ocasionam que o mal de Alzheimer seja incrementada pelo processamento incrementado ou alterado da APP a A β , particularmente o processamento da APP a quantidades incrementadas da forma longa de A β (i.e., A β 1-42 e A β 1-43). Considera-se que mutações em outros genes, como os genes da presenilina, PS1 e PS2, afetam indiretamente o processamento da APP para gerar quantidades incrementadas da forma longa A β (ver Hardy, TINS 20, 154 (1997)). Estas observações indicam que A β , e particularmente sua forma longa, é um elemento causativo no mal de Alzheimer.

A β , também conhecido como peptídeo β -amilóide, ou peptídeo A4 (ver Patente US nº 4.666.829; Glenner & Wong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 1131 (1984)), é um peptídeo com de 39 a 43 aminoácidos, é o componente principal de placas características do mal de Alzheimer. A β é gerado pelo processamento de uma proteína maior APP por duas enzimas, denominadas β e γ secretases (ver Hardy, TINS 20, 154 (1997)). Mutações conhecidas na APP associadas com mal de Alzheimer ocorrem próximas do sítio de β ou γ -secretase, ou no A β . Por exemplo, a posição 717 é próxima do sítio de clivagem de γ -secretase da APP em seu processamento a A β , e posições 670/671 são próximas ao sítio de clivagem de β -secretase. Acredita-se que as mutações causam doença de AD [n.t.: Alzheimer] mediante a interação com as reações de clivagem por meio das quais A β é formado de forma a incrementar a quantidade da forma de aminoácido 42/43 do A β gerado.

A β possui a propriedade incomum de poder fixar-se e ativar cascatas de complemento tanto clássica como alternativa. Em particular, ele liga-se a C1q e por fim a C3bi. Esta associação facilita a ligação a macrófagos levando à ativação de células B. Adicionalmente, C3bi degrada-se adicionalmente e, então, liga-se a CR² em células B de uma maneira

dependente de células T levando a um aumento de 10.000 na ativação destas células. Este mecanismo ocasiona que A β gera uma resposta imune excedente com relação a outros antígenos.

5 A maior parte das estratégias terapêuticas para o mal de Alzheimer é objetivada a reduzir ou eliminar a deposição de A β 42 no cérebro, tipicamente via a redução na geração de A β 42 de APP e/ou alguns meios de diminuir níveis existentes de A β 42 de fontes que contribuem diretamente para a deposição deste peptídeo no cérebro (De Felice e Ferreira, 2002). Uma lista parcial de fatores causativos associados com o envelhecimento no
10 desenvolvimento de doença esporádica de Alzheimer inclui um desvio do balanço entre a produção do peptídeo A β e sua eliminação dos neurônios que favorece o acúmulo intracelular, secreção incrementada de peptídeos A β por neurônios para o espaço extracelular circundante, níveis incrementados de dano oxidativo para estas células, e hipoperfusão global no cérebro e os
15 desvios metabólicos compensatórios associados em neurônios afetados (Cohen *et al.*, 1988; Higgins *et al.*, 1990; Kalaria, 2000; Nalivaeva *et al.*, 2004; Teller *et al.*, 1996; Wen *et al.*, 2004).

O A β 42 que se deposita em neurônios e placas também poderia originar-se de fora dos neurônios (A β 42 exógeno) durante a
20 patogênese do mal de Alzheimer. Níveis de peptídeos A β solúveis no sangue são conhecidos por serem muito mais elevados do que no espaço intersticial e CSF nos cérebros de indivíduos saudáveis (Seubert *et al.*, 1992) com sangue como uma fonte de peptídeos A β exógenos que eventualmente se depositam no cérebro com o mal de Alzheimer (Zlokovic *et al.*, 1993). No entanto,,
25 exceto quanto a quantidades em traços de A β que são transportadas ativamente através de células endoteliais, é de conhecimento geral que o acesso de peptídeos A β transportados pelo sangue até o tecido cerebral em indivíduos saudáveis normais é bloqueado eficazmente pela integridade da barreira hematoencefálica (BBB) (Kandimalla *et al.*, 2005; Poduslo *et al.*,

1999). A BBB é uma estrutura complexa constituída de células endoteliais cerebrais que repousam sobre uma lâmina basal que é suportada adicionalmente pelos processo de pé de astrócitos locais (Gloor *et al.*, 2001; Risau *et al.*, 1998). Ela regula estritamente a passagem de componentes do sangue para o tecido cerebral e é altamente impermeável a quase todas as proteínas e outras macromoléculas ao mesmo tempo que permite a entrada seletiva de moléculas essenciais (Mayhan, 2001). Muita evidência revelou que o envelhecimento está associado com alterações degenerativas nos vasos sangüíneos que podem comprometer a integridade da BBB. Por exemplo, um numero de doenças neurodegenerativas relativamente comuns nos idosos, incluindo demência vascular, e AD origina-se, pelo menos em parte, de patologias cerebrovasculares que se desenvolvem na microvasculatura do cérebro (Breteler, 2000; Buee *et al.*, 1997; de la Torre, 1997; Esiri *et al.*, 1999; Kalaria *et al.*, 1996). Uma ligação entre a neurovasculatura e a doença neurodegenerativa é o fato bem conhecido de que a patologia de Alzheimer, incluindo placas amilóides e embaralhamentos neurofibrilares, desenvolve-se subsequentemente nas imediações de lesões por acidente vascular (Jellinger, 2002; Kalaria, 1996; Kalaria, 2002; Natte *et al.*, 1998).

Marcadores genéticos de risco para mal de Alzheimer incluem mutações no gene de APP, particularmente mutações na posição 717 e posições 670 e 671 referidas como as mutações de Hardy e Swedish, respectivamente (ver Hardy, TINS, *supra*). Outros marcadores de risco são mutações nos genes da presenilina, PS1 e PS2, e ApoE4, história familiar de mal de Alzheimer, hipercolesterolemia ou aterosclerose. Sujeitos que presentemente sofrem de mal de Alzheimer podem ser reconhecidos da demência característica, e também como a presença de fatores de risco descritos acima. Adicionalmente, diversos testes diagnósticos encontram-se disponíveis para identificar sujeitos que apresentam mal de Alzheimer. Estes incluem a medição dos níveis de tau de CSF e A β 42. Níveis elevados de tau e

incrementados de A β 42 significam a presença de mal de Alzheimer. Indivíduos que sofrem de mal de Alzheimer também podem ser diagnosticados por critérios ADRDA ou MMSE. A amostra de tecido para análise é tipicamente sangue, plasma, soro, muco ou fluido cérebro-espinhal do paciente. A amostra é analisada quanto a indícios de uma resposta imune a quaisquer formas de peptídeo A β , tipicamente A β 42. A resposta imune pode ser determinada a partir da presença, p. ex., de anticorpos ou células T que se ligam especificamente ao peptídeo A β . Métodos ELISA de detectar anticorpos específicos para A β encontram-se descritos na seção de Exemplos.

Em pacientes assintomáticos, o tratamento pode começar em qualquer idade (p. ex., 10, 20, 30). Usualmente, contudo, não é necessário começar o tratamento até que o paciente atinja 40, 50, 60 ou 70. O tratamento acarreta tipicamente múltiplas dosagens ao longo do tempo. O tratamento pode ser monitorado analisando-se a presença de peptídeo A β no fluido cérebro-espinhal (CSF) ou a permeabilidade da BBB ao longo do tempo. Se o peptídeo A β ainda estiver presente no CSF ou a BBB permanecer permeável ou defectiva, recomenda-se tratamento adicional com agentes que inibem Lp-PLA₂ como revelado aqui, e/ou tratamento de terapias adicionais para o mal de Alzheimer. No caso de pacientes com síndrome de Down em potencial, o tratamento pode começar antenatalmente por meio da administração de agente terapêutico à mãe ou pouco após o nascimento.

Em algumas concretizações, agentes que inibem Lp-PLA₂ como revelado aqui também são úteis no tratamento de outras distúrbios neurodegenerativas ou deficiência cognitiva distúrbios em geral:

por exemplo, demência, depressão, confusão, Creutzfeldt-Jakob ou doença da vaca-louca, doença de Huntington, perda de coordenação motora, esclerose múltipla, mal de Parkinson, doença de Pick e outras distúrbios de armazenamento do cérebro (p. ex., amilóideose, gangliosidose, distúrbios do armazenamento de lipídeos, mucopolisacaridose), síncope, e

demência vascular. Assim, o tratamento pode ser dirigido a um sujeito que é acometido de forma não-sintomática pela doença neurodegenerativa; ele pode melhorar a função cognitiva. A eficiência do tratamento pode ser determinada monitorando-se o fluxo sanguíneo cerebral (CBF) e/ou a função da barreira hematencefálica (barreira hematoencefálica) ou BBB. Por exemplo, medindo-se a presença de Tau ou A β no fluido cérebro-espinhal (CSF). Em algumas concretizações, é possível usar marcadores para a função de BBB, por exemplo, como revelado na Patente US nº 6.884.591, que é incorporada integralmente por referência. Em algumas concretizações, a função da BBB pode ser monitorada usando-se técnicas de formação de imagem conhecidas por pessoas com prática ordinária na arte, por exemplo, usando-se máquinas de diagnóstico por imagem de ressonância magnética (MRI) com elevada capacidade de contraste. Em referidas concretizações, realiza-se injeção vascular de agentes de contraste específicos para MRI imediatamente antes de se realizar uma MRI, sendo que o agente de contraste permanece nos vasos sangüíneos em um sujeito com uma BBB normal, enquanto que o agente de contraste penetra no tecido cerebral e aparece como um "núvem" no MRI em indivíduos com uma BBB permeável. Usando-se este método, com *software* de MRI é possível determinar medições quantitativas da localização e extensão da degradação da BBB. Assim, é possível determinar a eficácia do tratamento com um inibidor de Lp-PLA₂ mediante a detecção de uma redução mensurável na "nuvem" e/ou redução da extensão da degradação da BBB após a administração dos inibidores de Lp-PLA₂ em comparação com a administração prévia como revelado aqui.

Alguns métodos carregam a determinação de um valor de linha-de-base, por exemplo, do nível de beta amilóide no fluido cérebro-espinhal (CSF) de um sujeito antes da administração de uma dosagem de agente, e comparação disto com um valor para beta amilóide no CSF após o tratamento. Um decréscimo, por exemplo, um decréscimo de 10 % no nível

de beta amiloide no CSF indica um resultado positivo do tratamento (i.e., que a administração do agente proporcionou ou aumentou um decréscimo de beta amiloide no CSF). Se o valor para o nível de beta amiloide no CSF não se altera significativamente, ou aumenta, um resultado negativo do tratamento é indicado. De uma forma geral, espera-se que sujeitos submetidos a um curso de tratamento inicial com um agente venham a apresentar uma diminuição de beta amiloide no CSF com sucessivas dosagens de um agente como aqui descrito.

Em outros métodos para determinar a eficácia do tratamento, determina-se, para uma população de controle, um valor de controle (i.e., uma média e desvio padrão) de beta amiloide. Tipicamente, os indivíduos na população de controle não receberam tratamento prévio e não sofrem de mal de Alzheimer. Valores medidos de beta amiloide no CSF em um sujeito após a administração de um agente inibidor de Lp-PLA₂ como revelado aqui são então comparados com o valor de controle. Um decréscimo no beta amiloide no CSF do sujeito relativamente ao valor de controle (i.e. uma diminuição de pelo menos 10 % do beta amiloide em um sujeito) sinaliza um resultado positivo do tratamento. Uma falta de diminuição significativa sinaliza um resultado negativo do tratamento.

Em outros métodos, um valor de controle de, por exemplo, beta amiloide no CSF, é determinado a partir de uma população de controle de sujeitos que foram submetidos a tratamento com um agente terapêutico que é efetivo para reduzir o beta amiloide no CSF. Valores medidos de beta amiloide no CSF no sujeito são comparados com o valor de controle.

Em outros métodos, um sujeito que não está recebendo presentemente tratamento com agentes que inibem Lp-PLA₂ como revelado aqui, mas que foi submetido a um curso prévio de tratamento, é monitorado quanto ao beta amiloide no CSF para determinar se é necessário uma retomada do tratamento. O valor medido de beta amiloide no CSF no sujeito

de teste pode ser comparado com um nível do beta amiloide no CSF previamente obtido no sujeito após um curso de tratamento prévio. Uma diminuição significativa do beta amiloide no CSF relativamente à medição prévia (i.e., uma diminuição de pelo menos 10 %) é uma indicação de que o tratamento pode ser reiniciado. Alternativamente, o nível de beta amiloide no CSF no sujeito pode ser comparado com um nível de controle de beta amiloide no CSF determinado em uma população de sujeitos após ser submetido a um curso de tratamento. Alternativamente, o nível de beta amiloide no CSF em um sujeito pode ser comparado com um valor de controle em populações de sujeitos tratados profilaticamente que permanecem livres de sintomas de doença, em particular livres de sintomas da permeabilidade da BBB, ou populações de sujeitos tratados terapeuticamente que apresentam melhora dos sintomas de doença.

Métodos para identificar sujeitos em risco de, ou apresentando mal de Alzheimer.

Sujeitos passíveis de tratamento usando-se os métodos como revelado aqui incluem sujeitos em risco de uma doença neurodegenerativa, por exemplo, mal de Alzheimer, mas não apresentando sintomas, e também sujeitos que apresentam sintomas da doença neurodegenerativa, por exemplo, sujeitos com sintomas de mal de Alzheimer.

Sujeitos podem ser selecionados quanto a sua probabilidade de apresentar ou desenvolver mal de Alzheimer com base em uma quantidade de marcadores bioquímicos e genéticos.

Também é possível diagnosticar um sujeito com risco aumentado de desenvolver mal de Alzheimer usando-se marcadores genéticos para mal de Alzheimer. Anormalidade genética em algumas poucas famílias foi rastreada ao cromossomo 21 (St. George-Hyslop *et al.*, *Science* 235:885-890, 1987).

Um marcador genético compreende, por exemplo, mutações

no gene da APP, particularmente mutações na posição 717 e posições 670 e 671 referidas como as mutações de Hardy e Swedish respectivamente (ver Hardy, TINS, *supra*). Outros marcadores de risco são mutações nos genes de presenilina, PS1 e PS2, e ApoE4, história familiar de mal de Alzheimer, 5 hipercolesterolemia ou aterosclerose. Sujeitos com mutações APP, PS1 ou PS2 apresentam elevada probabilidade de desenvolver mal de Alzheimer. ApoE é um gene de suscetibilidade, e sujeitos com a isoforma e4 de ApoE (isoforma ApoE4) apresentam um risco incrementado de desenvolver mal de Alzheimer. Testes em sujeitos com isoforma ApoE4 são revelados na Patente 10 US nº 6.027.896, que é incorporada aqui integralmente por referência. Outros ligantes genéticos têm sido associados com risco incrementado de mal de Alzheimer, por exemplo, variâncias no receptor relacionado com sortilina neuronal SORL1 pode apresentar probabilidade incrementada de desenvolver mal de Alzheimer de início tardio (Rogaeva *et al*, *Nat Genet.*, fevereiro de 15 2007;39(2): 168-77). Outros genes de suscetibilidade potenciais para o mal de Alzheimer incluem, por exemplo, ACE, CHRNA2, CST3, ESR1, GAPDH, IDE, MTHFR, NCSTN, PRNP, PSEN1, TF, TFAM e TNF e ser usados para identificar sujeitos com risco incrementado de desenvolver mal de Alzheimer (Bertram *et al*, *Nat Genet.* janeiro de 2007;39(1): 17-23), e também variâncias 20 no gene de alfa-T catenina (VR22) (Bertram *et al*, *J Med Genet.* janeiro de 2007;44(1):e63) e enzima degradadora de insulina (IDE) e Kim *et al*, *J Biol Chem.* 2007;282:7825-32).

Também é possível diagnosticar um sujeito com risco incrementado de desenvolver mal de Alzheimer baseado em um simples teste 25 de olho, sendo que a presença de cataratas e/ou Abeta na lente identifica um sujeito com risco incrementado de desenvolver mal de Alzheimer. Métodos para detectar mal de Alzheimer incluem o uso de um dispositivo de difração de luz quase-elástico (Goldstein *et al.*, *Lancet.* 2003;12;361:1258-65) da Neuroptix, usando técnica de espalhamento de luz quase elástico (QLS,) e

varredura de ligante fluorescente (FLS) e um dispositivo de varredura QEL Neuroptix™, para permitir medições quantitativas não-invasivas de agregados amilóides no olho, para examinar e medir depósitos em áreas específicas da lente como um diagnóstico precoce para mal de Alzheimer. Método para

5 diagnosticar um sujeito em risco de desenvolver mal de Alzheimer com o uso de um método do tipo referido de teste não invasivo do olho são revelados na Patente US nº 7.107.092, que é incorporada aqui integralmente por referência.

Indivíduos que sofrem presentemente de mal de Alzheimer podem ser reconhecidos de demência característica, e também a presença de

10 fatores de risco descritos acima. Adicionalmente, diversos testes diagnósticos encontram-se disponíveis para identificar indivíduos que apresentam AD [mal de Alzheimer]. Estes incluem a medição dos níveis de Ax3b242 e tau no CSF. Níveis elevados de tau e diminuídos de Ax3b242 significam a presença de mal de Alzheimer.

Há dois "critérios" alternativos que são usados para

15 diagnosticar clinicamente mal de Alzheimer: os critérios de DSM-III-R e os critérios de NINCDS-ADRDA (que é um acrônimo para o *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke* (NINCDS) e a *Alzheimer Disease and Related Disorders Association* (ADRDA); ver

20 McKkann *et al.*, *Neurology* 34:939-944, 1984). Em resumo, os critérios para diagnóstico do mal de Alzheimer sob DSM-III-R incluem (1) demência, (2) início insidioso com um curso de deterioração geralmente progressivo, e (3) exclusão de todas as causas específicas de demência por história, exame físico, e testes de laboratório. No contexto dos critérios de DSM-III-R, a

25 demência é compreendida como envolvendo "uma perda multifacetada de capacidades intelectuais, como memória, julgamento, pensamento abstrato, e outras funções corticais superiores, e alterações na personalidade e comportamento". (DSM-III-R, 1987).

Em contraste, os critérios da NINCDS-ADRDA apresentam

três categorias de mal de Alzheimer, incluindo mal de Alzheimer "provável", "possível" e "definida". O diagnóstico clínico de mal de Alzheimer pode ser realizado com base em uma síndrome de demência, na ausência de outras distúrbios neurológicas, psiquiátricas ou sistêmicas suficientes para causar demência. Critérios para o diagnóstico clínico de mal de Alzheimer "provável" incluem (a) demência estabelecida por meio de exame clínico e documentada por um teste, como o teste Mini-Mental (Foldstein *et al.*, *J. Psych. Res.* 12:189-198, 1975); (b) déficits em duas ou mais áreas da cognição; (c) piora progressiva da memória e outras funções cognitivas; (d) nenhuma perturbação da consciência; (e) início entre as idades de 40 e 90, o mais frequentemente após a idade de 65; e (f) ausência de ordens sistêmicas ou outras doenças do cérebro que poderiam contribuir para a demência. Os critérios para o diagnóstico definitivo de mal de Alzheimer incluem evidência histopatológica obtida de uma biópsia, ou após a autópsia. Como a confirmação de mal de Alzheimer definida requer exame histológico de uma amostra de biópsia do cérebro (que frequentemente é difícil de se obter), ela raramente é usada para o diagnóstico precoce de mal de Alzheimer.

Também é possível usar diagnóstico neuropatológico de mal de Alzheimer, sendo que se analisa os números de placas e emaranhados no neuro-córtex (lobos frontal, temporal, e parietal), hipocampo e amígdala (Khachaturian, *Arch. Neurol.* 42:1097-1105; Esiri, "Anatomical Criteria for the Biopsy diagnosis of Alzheimer disease", *Alzheimer Disease, Current Research in Early Diagnosis*, Becker e Giacobini (eds.), pp. 239-252, 1990).

Também é possível usar análise eletroencefalográfica (EEG,) quantitativa para diagnosticar mal de Alzheimer. Este método usa análise de Fourier das bandas beta, alfa, teta, e delta (Riekkinen *et al.*, "EEG in the Diagnosis of Early Alzheimer Disease", *Alzheimer Disease, Current Research in Early Diagnosis*, Becker e Giacobini (eds.), pp. 159-167, 1990) para o diagnóstico de mal de Alzheimer.

Também é possível diagnosticar mal de Alzheimer por meio de quantificação do grau de atrofia neural, porque referida atrofia é geralmente aceita como uma consequência do mal de Alzheimer. Exemplos destes métodos incluem varredura tomográfica computadorizada (CT), e diagnóstico por imagem de ressonância magnética (MRI) (Leedom e Miller, "CT, MRI, and NMR Spectroscopy in Alzheimer Disease", mal de Alzheimer, *Current Research in Early Diagnosis*, Becker e Giacobini (eds.), pp. 297-313, 1990).

Também é possível diagnosticar mal de Alzheimer por meio de avaliação do fluxo sanguíneo cerebral diminuído ou metabolismo diminuído no córtex cerebral temporoparietal posterior por meio de medição do fluxo sanguíneo diminuído ou metabolismo diminuído por meio de tomografia de emissão de pósitron (PET) (Parks e Becker, "Positron Emission Tomography and Neuropsychological Studies in Dementia", Alzheimer's Disease, *Current Research in Early Diagnosis*, Becker e Giacobini (eds.), pp. 315-327, 1990), tomografia computacional de emissão de fóton simples (SPECT) (Mena *et al.*, "SPECT Studies in Alzheimer's Type Dementia Patients", *Alzheimer Disease, Current Research in Early Diagnosis*, Becker e Giacobini (eds.), pp. 339-355, 1990), e métodos de inalação de xenônio (Jagust *et al.*, *Neurology* 38:909-912; Prohovnik *et al.*, *Neurology* 38:931-937; e Waldemar *et al.*, *Senile Dementias: II International Symposium*, pp. 399-407, 1988).

Também é possível diagnosticar imunologicamente o mal de Alzheimer (Wolozin, "Immunochemical Approaches to the Diagnosis of Alzheimer disease", *Alzheimer disease, Current Research in Early Diagnosis*, Becker e Giacobini (eds.), pp. 217-235, 1990). Wolozin e colaboradores (Wolozin *et al.*, *Science* 232:648-650, 1986) produziram um anticorpo monoclonal "Alz50", que reage com uma proteína com 68 kDa "A68", que é expressa nas placas e emaranhados de neurônios de pacientes com mal de

Alzheimer. Usando o anticorpo Alz50 e análise de *Western blot*, A68 foi detectado no fluido cérebro-espinhal (CSF) de alguns pacientes de Alzheimer e não no CSF de pacientes idosos normais (Wolozin e Davies, *Ann. Neurol.* 22:521-526, 1987).

5 Também é possível diagnosticar mal de Alzheimer usando marcadores neuroquímicos de mal de Alzheimer. Marcadores neuroquímicos que foram associados com mal de Alzheimer incluem níveis reduzidos de acetilcolinesterase (Giacobini e Sugaya, "Markers of Cholinergic Dysfunction in Alzheimer Disease", *Alzheimer disease, Current Research in Early*
 10 *Diagnosis*, Becker e Giacobini (eds.), pp. 137-156, 1990), somatostatina reduzida (Tamminga *et al.*, *Neurology* 37:161-165, 1987), uma relação negativa entre a serotonina e ácido 5-hidroxiindoleacético (Volicer *et al.*, *Arch Neurol.* 42:127-129, 1985), maior elevação induzida por probenecida no ácido homovanílico (Gibson *et al.*, *Arch. Neurol.* 42:489-492, 1985) e
 15 reduzida enolase específica para neurônio (Cutler *et al.*, *Arch. Neurol.* 43:153-154, 1986).

Métodos para identifica sujeitos em risco de, ou apresentando demência e/ou métodos para avaliação de memória.

É possível usar prática convencional corrente para diagnosticar
 20 os diversos tipos de demência e, uma vez diagnosticados, monitorar a progressão da doença durante um período de tempo estendido. Um método do tipo referido inclui pelo menos um dos seguintes; (i) uma avaliação de memória, (ii) um exame neuropsicológico extensivo, (iii) um exame por um neurologista geriátrico e (iv) diagnóstico por imagem MRI do cérebro. A
 25 progressão da doença é documentada por alterações nestes parâmetros ao longo do tempo. Em algumas concretizações, é possível usar alterações dos parâmetros de pelo menos uma destas avaliações para avaliar a eficácia do inibidor de Lp-PLA₂ no sujeito ao longo do tempo.

É possível usar uma avaliação da memória, como o programa

do UMDNJ New Jersey Institute para o Envelhecimento Bem Sucedido. Pacientes adultos com queixas de memória de curto prazo e/ou declínio positivo são observados no Programa de Avaliação de Memória, compreendendo a avaliação por parte de serviços de Neurologia Geriátrica, Neuropsicologia e Serviços Sociais. Pacientes podem ser auto-referidos ou orientados por médicos ou clínicos comunitários sobre a suspeita de uma possível ou provável distúrbio ou demência. Em uma avaliação de memória do tipo referido, no momento da avaliação inicial, todas as avaliações, como (i) avaliação de memória (ii) um exame neuropsicológico extensivo, (iii) um exame por um neurologista geriátrico e (iv) diagnóstico por imagem MRI do cérebro são realizados no mesmo dia. A avaliação de neuropsicologia captura uma amplo inventário de função cognitiva que auxilia na determinação do conjunto e da severidade dos déficits. Estes incluem avaliações de Julgamento, Compreensão, Comportamento, Orientação, Controle Exectuvio, Funcionamento Intelectual Geral, Função Visual-espacial, Memória e Nova Capacidade de Aprendizado. Depressão, se presente, é identificada. A avaliação neurológica captura a história da alteração cognitiva e também a história clínica geral, e tipicamente realiza-se um exame neurológico completo. O exame neurológico também pode compreender estudos de laboratório para excluir causas reversíveis de demência incluindo Vitamina B12, Folato, Perfil Metabólico Básico, CBC, TSH, ALT, AST, proteína C-reativa, homocisteína do soro, e RPR. O diagnóstico por imagem do cérebro proporciona uma imagem cerebral estrutural, como MRI do cérebro, embora se possa usar outros métodos de diagnóstico por imagem do cérebro conhecidos por pessoas com prática ordinária na arte. A matriz de dados da história, testes neuropsicológicos, exame neurológico, estudos de laboratório e diagnóstico por imagem do cérebro é usado para formular o diagnóstico.

O diagnóstico de demência pode basear-se nas diretrizes dos Parâmetros da Prática da Neurologia da Academia Americana publicado em

2001. O diagnóstico de mal de Alzheimer pode basear-se nos critérios da NINDS-ADRDA. O diagnóstico de demência vascular pode basear-se nos critérios dos Centros de Diagnóstico e Tratamento de AD do Estado da Califórnia. É possível comunicar a conclusão do diagnóstico ao paciente e à família em um encontro subsequente. Se a conclusão do diagnóstico indicar que o paciente ou sujeito apresenta ou provavelmente apresentará demência e/ou perda de memória, um clínico poderá recomendar a administração do tratamento com uma quantidade eficaz de um agente inibidor de Lp-PLA₂ como revelado aqui. Frequentemente a presença de um trabalhador social em um encontro subsequente também pode auxiliar e orientar o paciente e sua família com relação a necessidades correntes e futuras.

Outros métodos para diagnosticar um paciente em risco de ou apresentando uma doença ou distúrbio neurodegenerativa, como demência vascular ou mal de Alzheimer inclui medição da atividade e/ou expressão de Lp-PLA₂ usando-se os métodos como revelado aqui, por exemplo, usando o teste PLAC comercialmente obtível da diaDexus.

Métodos para identificar sujeitos em risco de, ou apresentado degradação de BBB ou permeabilidade da BBB.

Detecção direta da degradação da BBB pode ser avaliada usando MRI e injeção de agente de contraste. Melhoramentos na resolução de MRIs e no uso de agente de contrastes especiais podem ser usados para detectar permeabilidade da BBB. Em um método, sujeitos recebem a administração de um agente de contraste imediatamente antes da diagnóstico por imagem do cérebro, como diagnóstico por imagem MRI. Em casos de BBB intacta, os agentes de contrastes são confinados aos vasos sanguíneos do cérebro, enquanto que, em sujeitos com uma BBB disrompida, o agente de contraste é "pulverizado" no tecido cerebral, que pode ser visualizado. Assim, os locais no cérebro, o tamanho da degradação da BBB e a extensão do comprometimento da BBB, como extensão do vazamento vascular em

sujeitos podem ser avaliados diretamente e quantitativamente como parâmetros mensuráveis da permeabilidade da BBB. Adicionalmente, referidos métodos podem ser usados para avaliar quaisquer melhoramentos nestes parâmetros resultantes do tratamento do sujeito com um agente que inibe Lp-PLA₂. A visualização direta da degradação da BBB e seu vazamento vascular associado no cérebro é útil nos métodos, como revelado aqui, para o monitoramento dos efeitos benéficos do tratamento de um sujeito com permeabilidade da BBB com inibidores de Lp-PLA₂. Um melhoramento em pelo menos um parâmetro mensurável de permeabilidade da BBB, como localicazão, tamanho da degradação da BBB e extensão do vazamento vascular em sujeitos que receberam administração de um inibidor de Lp-PLA₂ indica um resultado positivo da administração de um inibidor de Lp-PLA₂. Parâmetros de permeabilidade da BBB podem ser monitorados por meio de visualização direta e quantificados por meio de análise de imagem associada com MRI [diagnóstico por imagem de ressonância magnética] e são úteis nos métodos como revelado aqui.

Avaliação de inibidores da Lp-PLA₂ em modelos de demência vascular e mal de Alzheimer.

Em algumas concretizações, agentes que inibem a Lp-PLA₂ podem ser avaliados em modelos animais quanto ao efeito sobre o alívio da permeabilidade da BBB. Por exemplo, é possível usar o modelo porcino de hiperglicemia e hipercolesterolemia (HG/HC) como revelado aqui, em que a permeabilidade da BBB é prejudicada, por exemplo, em que a BBB é permeável, sendo que a permeabilidade da BBB pode ser avaliada quanto à presença e ausência de inibidores de Lp-PLA₂ por meio de métodos comumente conhecidos por pessoas versadas na arte. Em algumas concretizações, é possível usar marcadores para a função da BBB, por exemplo, como revelado na Patente US nº 6.884.591, que é incorporada aqui integralmente por referência.

Em algumas concretizações, agentes que inibem a Lp-PLA₂ podem ser avaliados em modelos animais quanto à demência vascular, permitindo a análise dos efeitos dos agentes inibidores de Lp-PLA₂ sobre o desenvolvimento e tratamento da demência vascular, e também a avaliação de dosagens de drogas sobre o desenvolvimento, prognóstico e recuperação da demência vascular.

Modelos animais de demência vascular incluem, por exemplo, a oclusão de artérias carótidas em ratos. Ver, p. ex., Sarti *et al.*, *Persistent impairment of gait performances e working memory after bilateral common carotid artery occlusion in the adult Wistar rat* [Deficiência persistente de desempenhos de andadura e memória de trabalho após oclusão bilateral da artéria carótida comum no rato Wistar adulto], BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH 136: 13-20 (2002). Assim, lesões da matéria branca cerebrovascular podem ser induzidas experimentalmente no cérebro de rato como um resultado de hipoperfusão cerebral crônica. Este modelo é criado por meio da oclusão permanente de ambas as artérias carótidas comuns. Por exemplo, ratos Wistar podem ser anestesiados, as artérias carótidas comuns bilaterais são expostas por meio de uma incisão cervical de linha mediana e as artérias carótidas comuns são duplamente ligadas com suturas de seda bilateralmente. O fluxo sanguíneo cerebral (CBF) diminui então inicialmente em cerca de 30 a 50 % do controle após a ligação. Os valores de CBF compreendem mais tarde de 40 a 80 % do controle após cerca de 1 semana a cerca de 1 mês. Também se observou disrupções da barreira hematoencefálica, e também atividade incrementada de metaloproteinase de matriz em lesões da matéria branca. Estas alterações parecem ser muito similares àquelas em lesões da matéria branca cerebrovascular humana. Além disso, estes resultados sugerem que reações inflamatórias e imunológicas desempenham um papel na patogênese das alterações da matéria branca.

Referidas alterações fisiológicas são correlacionadas com

problemas do aprendizado e da memória no modelo em rato de artéria carótida ocluída. Assim, o desempenho da andadura de ratos com artérias ocluídas declina ao longo do tempo em comparação com a linha-de-base, por exemplo, a e 90 dias, ratos com oclusão bilateral da artéria carótida comum
5 apresentam desempenhos diminuídos relativamente ao reconhecimento de objetos e no teste de alternância espontânea de labirinto Y, em comparação com ratos operados ficticiamente. Assim, este modelo de rato de hipoperfusão cerebral crônica experimental por meio de oclusão permanente das artérias carótidas comuns bilaterais é útil como um modelo para deficiências
10 significativas do aprendizado juntamente com a rarefação da matéria branca. Este modelo é uma ferramenta útil para avaliar a afetividade de agentes que inibem a Lp-PLA₂ sobre a patofisiologia de hipoperfusão cerebral crônica, e para proporcionar dados para a determinação de dosagens ótimas e de regimes de dosagem para a prevenção de deficiência cognitiva e lesões na matéria
15 branca em pacientes com doença cerebrovascular.

A eficácia dos agentes que inibem a Lp-PLA₂ para o tratamento ou a prevenção de demência vascular pode ser determinada, portanto, por meio de observação do desempenho da andadura, memória, de capacidades de aprendizado e da incidência e severidade de lesões da matéria
20 branca em ratos com oclusões da artéria carótida. De maneira análoga, a dosagem e o programa de administração de inibidores de Lp-PLA₂ podem ser ajustados de acordo com as capacidades de memória e de aprendizado de pacientes humanos que estão sendo tratados para demência vascular.

Em algumas concretizações, a dosagem ótima de agentes que
25 inibem Lp-PLA₂ é uma que reduz a atividade e/ou expressão de Lp-PLA₂, por exemplo, expressão reduzida de ácido nucleico, por exemplo, mRNA codificado por gene de Lp-PLA₂ ou expressão reduzida ou atividade da proteína Lp-PLA₂. Em outras concretizações, a dosagem ótima de agentes que inibem Lp-PLA₂ é uma que gera o efeito protetor máximo na prevenção de

uma doença ou distúrbio neurodegenerativa, ou na redução de sintoma de uma doença ou distúrbio neurodegenerativa.

Em outras concretizações, a dosagem ótima de agentes que inibem Lp-PLA₂ é uma que gera o efeito benéfico máximo sobre tecido danificado causado por oclusão arterial. Uma dosagem eficaz causa pelo menos uma atenuação estatisticamente ou clinicamente significativa de pelo menos um marcador, sintoma, ou evidência histológica característica de demência vascular. Marcadores, sintomas e evidência histológica característicos de demência vascular incluem perda de memória, confusão, perturbações do transporte axonal, desmielinação, indução de metaloproteinases (MMPs), ativação de células gliais, infiltração de linfócitos, edema e reações imunológicas que levam a dano tissular e lesão vascular adicional. A estabilização de sintomas ou a diminuição de dano tissular, em condições em que animais ou pacientes de controle experimentam uma piora de sintomas ou dano tissular, é um indicador da eficácia de um tratamento supressivo.

Outras doenças neurodegenerativas com permeabilidade da BBB:

Em algumas concretizações, agentes inibidores da Lp-PLA₂ usando os agentes como revelados aqui são úteis na prevenção e no tratamento de doenças e distúrbios neurodegenerativos. Exemplos adicionais de doenças neurológicas e neurodegenerativas incluem, por exemplo, distúrbios da repetição de poliglutamina, como doença de Huntington, ataxias Espinocerebelares (p. ex., tipos 1, 2, 3, 6, 7 e 17), doença de Machado-Joseph, atrofia muscular espinhal e bulbar (SBMA ou doença de Kennedy), atrofia dentatorubral-palidoluisiana (DRPLA) e outras condições neurológicas provenientes de expansões de poliglutamina, ou doença proveniente de expansões de repetição de DNA não-codificantes, como síndrome do X frágil, retardo mental do XE frágil, ataxia de Friedreich, distrofia miotônica, ataxias

espinocerebelares (tipos 8, 10 e 12) ou outras doenças neurodegenerativas, como atrofia espinhal muscular (doença de Werdnig-Hoffman, doença de Kugelberg-Welander), doença de Pick, e encefalopatias espongiformes.

Doenças neurodegenerativas adicionais para as quais são úteis agentes que inibem Lp-PLA₂ usando-se os agentes como revelados aqui incluem, por exemplo, deficiência da memória relacionada com a idade, demência por grão argirofílico, Parkinsonism-demência complexo de Guam, condições auto-imunes (p. ex., síndrome de Guillain-Barre, lúpus), doença de Biswanger, tumores cerebrais e espinhais (incluindo neurofibromatose), angiopatias amilóides cerebrais (*Journal of Alzheimer disease* vol. 3, 65-73 (2001)), paralisia cerebral, síndrome da fadiga crônica, degeneração corticobasal, condições devidas a disfunção desenvolvimental do parênquima do SNC [sistema nervoso central], condições devidas a disfunção desenvolvimental da cerebrovasculatura, demência por multi-infartos, demência - subcortical, demência com corpos de Lewy, demência do vírus da imunodeficiência humana (HIV), demência sem histologia distinta, Dementia Pugilistica, emaranhados neurofibrilares difíceis com calcificação, doenças do olho, ouvido e sistemas vestibulares envolvendo neurodegeneração (incluindo degeneração macular e glaucoma), síndrome de Down, discinesias (paroxísmicas), distonias, tremor essencial, síndrome de Fahr, demência fronto-temporal e Parkinsonismo ligado ao cromossomo 17 (FTDP-17), degeneração lobar frontotemporal, demência do lobo frontal, encefalopatia hepática, paraplegia espástica hereditária, hidrocéfalo, pseudotumor cerebral e outras condições envolvendo disfunção do fluido cérebro-espinhal (CSF), doença de Gaucher, doença de Hallervorden-Spatz, síndrome de Korsakoff, deficiência cognitiva branca, amiotrofia monomélica, doenças dos neurônios motores, atrofia de sistemas múltiplos, esclerose múltipla e outras condições desmielinizantes (p. ex., leucodistrofias), encefalomielite miálgica, mioclonia, neurodegeneração induzida por químicos, drogas e toxinas, manifestações

neuroológicas da AIDS incluindo demência da AIDS, manifestações neuroológicas/cognitivas e consequências de infecções bacterianas e/ou por vírus, incluindo, mas sem restrição, enterovírus, doença de Niemann-Pick, doença de neurônios motores não-Guamanianos com emaranhados neurofibrilares, hiperglicinemia não-cerótica, atrofia olivo-ponto cerebelar, distrofia muscular oculofaríngea, manifestações neuroológicas da poliomielite incluindo síndrome de pólio não-paralítico e pós-pólio, esclerose lateral primária, doenças de príons incluindo doença de Creutzfeldt-Jakob (incluindo forma variante), kuru, insônia familiar fatal, doença de Gerstmann-Straussler-Scheinker e outras encefalopatias espongiformes transmissíveis, angiopatia de amiloide cerebral de proteína prion, Parkinsonismo pós-encefálico, atrofia muscular progressiva, paralisia bulbar progressiva, gliose subcortical progressiva, paralisia supranuclear progressiva, síndrome de perna inquieta, síndrome de Rett, doença de Sandhoff, espasticidade, demências fronto-temporais esporádicas, degeneração estratonigral, panencefalite esclerosante aguda, deficiência de sulfito oxidase, coreia de Sydenham, demência apenas de emaranhados, doença de Tay-Sach's, síndrome de Tourette, demência vascular, e doença de Wilson.

Doenças neurodegenerativas adicionais, para as quais agentes que inibem Lp-PLA₂ usando os agentes como revelado aqui são úteis, incluem outras demências não listadas acima, como, embora sem limitação, outra demência mista, demência frontotemporal, doença de Pick, paralisia supranuclear progressiva (PSP), mal de Parkinson com demência associada, degeneração corticobasal, atrofia de múltiplos sistemas, demência induzida por HIV, demências associadas com doença da matéria branca, deficiência cognitiva branca (MCI).

Em algumas concretizações, agentes que inibem Lp-PLA₂ usando-se os agentes como revelado aqui são úteis na prevenção e tratamento da permeabilidade da BBB em um sujeito. Exemplos adicionais de doenças e

distúrbios em que ocorre a permeabilidade da BBB incluem, por exemplo, esclerose múltipla, angiopatia amilóide cerebral, retinopatia diabética, distúrbios de príons, esclerose lateral amiotrófica (ALS), síndrome de Stiff-person, ataxias espinocerebelares, ataxia de Friedreich, Ataxia

5 Telangiectasia/ataxia telangiectasia, doenças de armazenamento neuronal (lipofuscinoses), encefalomiopatias mitocondriais, leucodistrofias, sequelas neurais por trauma contundente/choque espinhal, doença cerebrovascular hipertensiva, como infartos lacunares, micro-hemorragias subcorticais, encefalopatia hipertensiva. permeabilidade da BBB também ocorre em

10 tumores do cérebro, como aqueles com fornecimento vascular 'senoidal' (ou de elevado teor de nutrientes).

A permeabilidade da BBB também ocorre em sequelas neurológicas associadas com infecções estreptocócicas; distúrbios neuropsiquiátricos auto-imunes pediátricos associadas com infecções

15 estreptocócicas (PANDAS), síndrome de Tourette, doença obsessiva compulsiva (OCD). A permeabilidade da BBB também ocorre nas seguintes doenças e distúrbios; disfunção neuropsicológica pós-anestesia e distúrbios neuropsiquiátricos associadas com qualquer vasculopatia (p. ex., lúpus, hipertensão, etc.). A permeabilidade da BBB também ocorre em sujeitos com

20 infecções (seja entrada no SNC, propagação no SNC, ou saída do SNC após infecção estabelecida), por exemplo, HIV, sífilis terciária, neuroborreliose (doença de Lyme), vírus do herpes simples de tipo 1 (HSV-I) / vírus do herpes simples de tipo 2 (HSV-2), Varicella-Zóster vírus (Herpes Zoster), citomegalovírus, poliomielite, raiva, leuco encefalopatia multifocal,

25 panencefalite esclerosante subaguda (pós-sarampo), doenças por protozoários (toxoplasmose, amebíase, e tripanosomíase), infecção por Rickettsia (tifo e febre pintada das Montanhas Rochosas), doenças metazoárias, malária, e encefalite/meningite. Em algumas concretizações, a encefalite/meningite resulta de sepsia.

Em algumas concretizações, agentes que inibem a Lp-PLA₂ usando os agentes como revelado aqui são úteis para prevenir e/ou tratar a permeabilidade da BBB que ocorre em sujeitos com autismo ou em risco de autismo. O autismo é uma distúrbio em grande parte hereditária que é caracterizada pela expressão de déficits sociais, anormalidades da fala e comportamentos estereotipados e repetitivos (*American Psychiatric Association*, 1994). Estudos neuropatológicos e de diagnóstico por imagem neurológica reportaram tamanho e peso cerebrais incrementados (Bailey *et al.*, 1998; Kemper e Bauman, 1998; Sparks *et al.*, 2002; Herbert *et al.*, 2003; Palmén *et al.*, 2004). Muitos estudos de cérebros autísticos reportaram uma redução global no tamanho das células e uma densidade incrementada do empacotamento celular, particularmente no hipocampo, *subiculum* e amígdala (Kemper e Bauman, 1993), indicando que neurônios residentes apresentam pequenas árvores dendríticas e possível maturação incompleta ou desenvolvimento interrompido.

A autoimunidade pode contribuir para a patogênese do autismo, sendo que a ligação de autoanticorpos a neurônios rompe o padrão normal de neurodesenvolvimento em estágios críticos. Autoanticorpos para o cérebro foram reportados em crianças autísticas (Singh *et al.*, 1988) e vários fatores auto-imunes incluindo autoanticorpos específicos para o cérebro (Gupta *et al.*, 1996; Singh e Rivas, 2004), função prejudicada de linfócitos (Warren *et al.*, 1996), regulação anormal de citocinas e associações virais (Singh, 2001). Singh e Rivas (2004) mostraram que o soro de crianças autísticas compreende autoanticorpos específicos para o cérebro, e em 68 crianças autísticas com idades entre 4 a 12 anos, anticorpos para núcleo caudado, córtex cerebral e cerebelo foram detectados em 49 %, 18 % e 9 %, respectivamente, das crianças autísticas, mas não em crianças normais.

Outro estudo mostrou que crianças com síndrome de Tourette apresentam anticorpos anti- estriatais, e infusão experimental destes

anticorpos no estriado de rato causou disfunção neuronal similar à síndrome de Tourette em ratos (Hallet *et al.*, 2000). Mostrou-se de forma mui drástica uma forte ligação entre a presença de autoanticorpos anti-neuroniais e doença neurológica, em crianças, nos casos após infecções estreptocócicas, como na
 5 desordem obsessiva compulsiva (OCD), coreia de Sydenham, síndrome de Tourette, distúrbios neuropsiquiátricos auto-imunes pediátricos associadas com estreptococo (PANDAS), paraneoplasia e em pacientes idosos com lúpus eritematoso sistêmico que mostram tanto perda cognitiva e perda de memória (Swedo *et al.*, 1989; Kalume *et al.*, 2004; Tanaka *et al.* 2004).

10 O acesso de autoanticorpos a neurônios no cérebro poderia ser restrito naturalmente pela integridade da barreira hematencefálica (barreira hematoencefálica) ou BBB, pelo menos em indivíduos saudáveis normais. Para anticorpos obterem acesso a neurônios do cérebro, a barreira hematencefálica pode ser defectiva ou ter desenvolvimento retardado. Uma
 15 ligação entre o estabelecimento da BBB aos seis meses de vida, ou em torno disto, o desenvolvimento do repertório imune normal do neonato e perturbações no neurodesenvolvimento pode levar, finalmente, ao autismo. Durante o último período fetal e os primeiros meses de vida está se estabelecendo e refinando vias neuronais críticas que controlam a recepção
 20 de sinais ambientais e vias de resposta individuais e apropriadas a estes sinais. Um defeito ou retardo desenvolvimental na formação da BBB neste momento pode permitir a exposição de neurônios a autoanticorpos antineuroniais presentes no sangue que poderiam prejudicar o padrão normal de conexão neuronal, levando ao autismo.

25 Avaliação de inibidores de Lp-PLA₂ em modelos de doenças neurodegenerativas e/ou permeabilidade da BBB.

A adequabilidade de um inibidor de Lp-PLA₂ para o tratamento de uma doença neurodegenerativa pode ser avaliada em qualquer um de vários modelos animais para doença neurodegenerativa. Por exemplo,

camundongos transgênicos para um mutante de repetição de poliglutamina expandida de ataxina-1 desenvolvem ataxia típica da ataxia espinocerebelar de tipo 1 (SCA-1) [e] são de conhecimento geral (Burright *et al.*, 1995, *Cell* 82: 937-948; Lorenzetti *et al.*, 2000, *Hum. Mol. Genet.* 9: 779-785; Watase, 2002, *Neuron* 34: 905- 919), e podem ser usados para determinar a eficácia de um agente inibidor de Lp-PLA₂ para o tratamento ou prevenção de doença neurodegenerativa. Modelos animais adicionais, por exemplo, para doença de Huntington (ver, p. ex., Mangiarini *et al.*, 1996, *Cell* 87: 493- 506, Lin *et al.*, 2001, *Hum. Mol. Genet.* 10: 137-144), mal de Alzheimer (Hsiao, 1998, *Exp. Gerontol.*, 33: 883-889; Hsiao *et al.*, 1996, *Science* 274: 99-102), mal de Parkinson (Kim *et al.*, 2002, *Nature* 418: 50-56), esclerose lateral amiotrófica (Zhu *et al.*, 2002, *Nature* 417: 74-78), doença de Pick (Lee & Trojanowski, 2001, *Neurology* 56 (Supl. 4): S26-S30, e encefalopatias espongiformes (He *et al.*, 2003, *Science* 299: 710-712) podem ser usados para avaliar a eficácia dos agentes que inibem Lp-PLA₂ como revelado aqui de uma maneira similar.

Modelos animais não são limitados a modelos mamíferos. Por exemplo, cepas de *Drosophila* fornecem modelos aceitos para uma variedade de distúrbios neurodegenerativas (revisto por Fortini & I Bonini, 2000, *Trends Genet.* 16: 161-167; Zoghbi & Botas, 2002, *Trends Genet.* 18: 463-471). Estes modelos incluem não só moscas portando genes de mosca mutados, mas também moscas que portam transgenes humanos, opcionalmente com mutações objetivadas. Entre os modelos de *Drosophila* disponíveis encontram-se, por exemplo, ataxias espinocerebelares (p. ex., SCA-I (ver, p. ex., WO 02/058626), SCA:3 (Warrick *et al.*, 1998, *Cell* 93: 939-949)), doença de Huntington (Kazemi-Esfarjani & Benzer, 2000, *Science* 287: 1837-1840), mal de Parkinson (Feany *et al.*, 2000, *Nature* 404: 394-398; Auluck *et al.*, 2002, *Science* 295: 809-8 10), neurodegeneração relacionada com a idade (*Genetics*, 2002,161:4208), mal de Alzheimer (Selkoe *et al.*, 1998, *Trends Cell Biol.* 8: 447-453; Ye *et al.*, 1999, *J. Cell Biol.* 146: 1351-1364), esclerose

lateral amiotrófica (Parkes *et al.*, 1998, *Nature Genet.* 19: 171-174), e adrenoleucodistrofia.

O uso da *Drosophila* como um organismo-modelo mostrou ser uma ferramenta importante na elucidação de vias neurodegenerativas humanas, porque o genoma de *Drosophila* contém muitos ortólogos humanos relevantes que são extremamente bem conservados no que se refere à função (Rubin, G. M., *et al.*, *Science* 287: 2204-2215 (2000)). Por exemplo, *Drosophila melanogaster* porta um gene que é homólogo à APP humana que está envolvida na função do sistema nervoso. O gene, similar a APP (APPL, *APP-like*), é aproximadamente 40 % idêntico à APP695, a isoforma neural (Rosen *et al.*, *Proc. Nati. Acad. Sci. U.S.A.* 86:2478-2482 (1988)), e APP695 humana similar é expressa exclusivamente no sistema nervoso. Moscas com deficiência no gene APPL mostram defeitos comportamentais que podem ser recuperados pelo gene de APP humano, sugerindo que os dois genes apresentam funções similares nos dois organismos (Luo *et al.*, *Neuron* 9:595-605 (1992)). Modelos de *Drosophila* para mal de Alzheimer são revelados nos Pedidos de Patentes dos Estados Unidos num. 2004/0244064, 2005/0132425, 2005/0132424, 2005/0132423, 2005/0132422, 2005/0132421, 2005/0108779, 2004/0255342, 2004/0255341, 2004/0250302 que são incorporados aqui integralmente por referência.

Adicionalmente, modelos de *Drosophila* de doenças de repetição de poliglutamina (Jackson, G. R., *et al.*, *Neuron* 21:633-642 (1998); Kazemi-Esfarani, P. e Benzer, S., *Science* 287:1837-1840 (2000); Fernandez-Funez *et al.*, *Nature* 408: 101-6 (2000)), mal de Parkinson (Feany, M.B. e Bender, W.W., *Nature* 404:394-398 (2000)) e outras doenças foram estabelecidas que emulam estreitamente o estado de doença em humanos nos níveis celular e fisiológico, e foram empregados com êxito na identificação de outros genes que podem estar envolvidos nestas doenças. As moscas transgênicas apresentam neurodegeneração progressiva que podem levar a

uma variedade de fenótipos alterados, incluindo fenótipos locomotores, fenótipos comportamentais (p. ex., apetite, comportamento de acasalamento, e/ou duração de vida), e fenótipos morfológicos (p. ex., forma, tamanho, ou localicazão de uma célula, órgão, ou apêndices; ou tamanho, forma, ou taxa
5 de crescimento da mosca).

Animais que receberam os compostos são avaliados quanto a sintomas relativos a animais que não receberam a administração dos compostos. Uma alteração mensurável na severidade de um sintoma (i.e., uma redução de pelo menos um sintoma, i.e. redução de 10 % ou mais), ou um
10 retardo do início de um sintoma, em animais tratados com um inibidor de Lp-PLA₂ versus animais não-tratados é indicativa da eficácia terapêutica.

É possível avaliar os animais quanto à memória e aprendizado, por exemplo, mediante realização de testes comportamentais. É possível usar qualquer teste comportamental para memória e aprendizado comumente
15 conhecido pela pessoa com prática ordinária na arte, como, mas sem limitação, o teste do labirinto em água de Morris para modelos animais roedores. Um aumento mensurável na capacidade de realizar o teste do labirinto em água de Morris em animais que receberam um inibidor de Lp-PLA₂ versus animais não-tratados é indicativo da eficácia terapêutica.

A adequabilidade de um inibidor de Lp-PLA₂ para o tratamento de uma doença ou distúrbio da BBB pode ser avaliada em qualquer um de vários modelos animais em que ocorre a anormalidade e/ou permeabilidade da BBB. Um método que pode ser usado consiste em avaliar a capacidade de componentes presentes no sangue, como Ig ou peptídeos
25 amilóide beta (A β), de atravessar a BBB e interagir com neurônios no cérebro. Um método útil nos métodos, como revelado aqui, para avaliar componentes presentes no sangue, como Ig ou peptídeos beta amilóides (A β) que atravessam a BBB, usa Abeta42 marcado fluorescentemente, e é descrito por Clifford *et al.*, 2007, *Brain Research* 1 142: 223-236, que é incorporado

aqui integralmente por referência. Neste método, a capacidade de peptídios A β presentes no sangue de atravessarem uma BBB defectiva foi avaliada usando A β 42 e A β 40 marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) introduzidos via injeção caudal em camundongos com uma BBB que se tornou permeável por meio de tratamento com a toxina pertussis. Ambos, A β 40 e A β 42, mostraram atravessar a BBB permeabilizada e ligaram-se seletivamente a determinados subtipos neuroniais, mas não célula glial, com disseminação de neurônios positivos para A β 42 no cérebro 48 h após a injeção. Como um controle, animais com BBB intacta (controles que receberam injeção de solução salina) bloquearam a entrada de peptídios A β presentes no sangue no cérebro. É possível usar um modelo animal do tipo referido para avaliar a capacidade de um inibidor de Lp-PLA₂ na prevenção ou tratamento da degradação da BBB ou permeabilidade da BBB por meio de avaliação de neurônios positivos para A β 42 no cérebro, 48 horas após a injeção da toxina pertussis e A β 42 marcado com FITC na presença ou ausência de um inibidor de Lp-PLA₂. Uma diminuição de neurônios positivos para A β 42 no cérebro em animais que receberam a administração de um inibidor de Lp-PLA₂ em comparação com animais que não receberam a administração de um inibidor de Lp-PLA₂ indica que o inibidor de Lp-PLA₂ é efetivo para tratar e/ou prevenir permeabilidade da BBB.

Também é possível usar outras moléculas presentes em traços em modelos animais de permeabilidade da BBB. É possível detectar componentes presentes no sangue, marcados, no tecido cerebral, por exemplo, peptídios A β marcados com ³⁵S ou marcados fluorescentemente, imunoglobulina marcada com ¹²⁵I ou ³⁵S (Ig), peroxidase de rabanete (HRP), azul evans, micropérolas fluorescentes ou magnéticas (Molecular Probes) e dextranos com pesos moleculares diferentes.

A toxina pertussis é derivada de *Bordetella pertussis*, é conhecida por aumentar eficazmente a permeabilidade da BBB em

camundongos desde 24 horas após a injeção e durante um período de até várias semanas (Amiel, 1976; Bruckener *et al.*, 2003), e provavelmente está envolvida no desenvolvimento de sequelas neurológicas associadas com tosse ladrante que estão ligadas à disrupção da integridade da BBB no epitélio do plexo coróide e/ou endotélio capilar cerebral. A toxina pertussis também foi usada para acentuar o desenvolvimento da encefalomielite auto-imune experimental (EAE), um modelo de camundongo amplamente usado para esclerose múltipla (Ben-Nun *et al.*, 1997; Linthicum *et al.*, 1982; Yong *et al.*, 1993).

Formulações de composições

Compostos, por exemplo, agentes inibidores de Lp-PLA₂ como revelado aqui, podem ser usados como uma droga, ou usados para formular uma composição farmacêutica com uma ou mais das utilidades reveladas aqui. Eles podem ser administrados *in vitro* a células em cultura, *in vivo* a células no corpo, ou *ex vivo* a células fora de um indivíduo que podem mais tarde ser devolvidas ao corpo do mesmo indivíduo ou de outro. Referidas células podem ser desagregadas ou fornecidas como tecido sólido.

Compostos, por exemplo, agentes inibidores de Lp-PLA_a como revelado aqui podem ser usados para produzir uma droga ou outras composições farmacêuticas. O uso de agentes inibidores de Lp-PLA₂ que também compreendem um veículo farmacêuticamente aceitável e composições que também compreendem componentes úteis para o fornecimento da composição a um indivíduo são conhecidos na arte. A adição de referidos veículos e outros componentes aos agentes como revelado aqui encontra-se bem dentro da capacidade de alguém com prática nesta arte.

Composições farmacêuticas podem ser administradas como uma formulação adaptada para passagem através da barreira hematoencefálica ou contato direto com o endotélio. Em algumas concretizações, as composições podem ser administradas como uma formulação adaptada para

fornecimento sistêmico. Em algumas concretizações, as composições podem ser administradas como uma formulação adaptada para fornecimento em órgãos específicos, por exemplo, embora sem limitação, o fígado, medula óssea, ou fornecimento sistêmico.

5 Alternativamente, composições farmacêuticas podem ser adicionadas ao meio de cultura de células *ex vivo*. Adicionalmente ao composto ativo, referidas composições podem conter veículos farmaceuticamente aceitáveis e outros ingredientes conhecidos por facilitarem a administração e/ou incrementarem a absorção (p. ex., solução salina, sulfóxido de dimetila, lipídeo, polímero, sistemas de objetivação específicos
10 para células baseados em afinidade). A composição pode ser incorporada em um gel, esponja, ou outra matriz permeável (p. ex., formada como pellets ou um disco) e disposta na proximidade do endotélio para liberação sustentada local. A composição pode ser administrada em uma dose única ou em doses
15 múltiplas que são administradas em momentos diferentes.

 Composições farmacêuticas podem ser administradas por meio de qualquer via conhecida. Como exemplo, a composição pode ser administrada por via mucosal, pulmonar, tópica, ou outra via localizada ou sistêmica (p. ex., enteral e parenteral). As expressões "administração
20 parenteral" e "administrada parenteralmente" como usadas aqui significam modos de administração diferentes da administração enteral e tópica, usualmente por meio de injeção, e inclui, sem limitação, [administração] intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intraventricular, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal,
25 transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnóide, intraspinal, intracerebro-espinhal, e injeção intraesternal, infusão e outras técnicas de injeção ou infusão, sem limitação. As expressões "administração sistêmica", "administrada sistemicamente", "administração periférica" e "administrada perifericamente" como usado aqui significa a

administração dos agentes, como revelado aqui, de tal forma que adentram o sistema animal e, assim, estão sujeitos ao metabolismo e outros processos similares, por exemplo, administração subcutânea.

A expressão "farmaceuticamente aceitável" é usada aqui para referir àqueles compostos, materiais, composições, e/ou formas de dosagem que, dentro do escopo da avaliação médica abalizada, são vantajosas para uso em contato com os tecidos de seres humanos e animais sem excessiva toxicidade, irritação, resposta alérgica, ou outro problema ou complicação, proporcionalmente à relação risco/benefício.

A expressão "veículo farmaceuticamente aceitável" como usado aqui significa um material, composição ou veículo farmaceuticamente aceitável, como uma carga líquida ou sólida, diluente, excipiente, solvente ou material encapsulante, envolvido no suporte ou no transporte dos agentes em pauta de um órgão, ou porção do corpo, para outro órgão, ou porção do corpo. Cada veículo precisa ser "aceitável" no sentido de ser compatível com os outros ingredientes da formulação, por exemplo, o veículo não diminui o impacto do agente sobre o tratamento. Em outras palavras, um veículo é farmaceuticamente inerte.

Escolhas vantajosas relativas às quantidades e ao timing das doses, formulação, e vias de administração podem ser realizadas com os objetivos de obter uma resposta favorável no sujeito com demência vascular, por exemplo, um sujeito com mal de Alzheimer ou um risco disso (i.e., eficácia), e evitar indevida toxicidade ou outro dano ao mesmo (i.e., segurança). Portanto, "efetivo" refere-se a escolhas do tipo que envolvem manipulação rotineira de condições para se obter um efeito desejado.

Um bolo da formulação administrada a um indivíduo ao longo de um curto período uma vez por dia é um programa de dosagem conveniente. Alternativamente, a dose diária eficaz pode ser dividida em múltiplas doses para fins de administração, por exemplo, de duas a doze doses por dia. Níveis

de dosagem de ingredientes ativos em uma composição farmacêutica também podem ser variados de forma a se obter uma concentração transiente ou sustentada do composto ou derivado do mesmo em um indivíduo, particularmente no endotélio vascular do cérebro e em torno do mesmo, resultando na resposta terapêutica desejada ou proteção. Mas também se encontra na capacidade de alguém com prática na arte iniciar doses em níveis menores do que o requerido para se obter o efeito terapêutico desejado e incrementar gradualmente a dosagem até se obter o efeito desejado.

A quantidade administrada de agentes que inibem Lp-PLA₂ é dependente de fatores conhecidos por uma pessoa versada na arte, como bioatividade e biodisponibilidade do composto (p. ex., meia-vida no corpo, estabilidade, e metabolismo); propriedades químicas do composto (p. ex., peso molecular, hidrofobicidade, e solubilidade); via e programa de administração, e análogos. Deve-se compreender também que o nível de dosagem específico a ser obtido para qualquer indivíduo particular pode depender de diversos fatores, incluindo idade, sexo, saúde, história clínica, peso, combinação com uma ou mais outras drogas, e severidade da doença.

O termo "tratamento", com relação a tratamento de demência vascular, ou mal de Alzheimer ou uma doença associada com BBB defectiva refere-se, *inter alia*, à prevenção do desenvolvimento da doença, ou alteração do curso da doença (por exemplo, mas sem limitação, desaceleração da progressão da doença), ou reversão de um sintoma da doença ou redução de um ou mais sintomas e um ou mais marcadores bioquímicos em um sujeito, prevenção de que um ou mais sintomas venham a piorar ou progredir, promoção da recuperação ou melhoramento do prognóstico, e/ou prevenção da doença em um sujeito que está livre da mesma, e também desaceleração ou redução da progressão de doença existente. Para um dado sujeito, o melhoramento de um sintoma, sua piora, regressão, ou progressão pode ser determinada por meio de uma medida objetiva ou subjetiva. É possível medir

a modificação de um ou mais marcadores bioquímicos, por exemplo, permeabilidade, presença de Ig extravascular no cérebro, ou beta amiloide no CSF, por exemplo.

Em algumas concretizações, a eficácia do tratamento pode ser medida como um melhoramento na morbidez ou mortalidade (p. ex., prolongação da curva de sobrevivência para uma população selecionada). Métodos profiláticos (p. ex., prevenção ou redução da incidência de recidiva) também são considerados como tratamento.

Em algumas concretizações, o tratamento também pode envolver a combinação com outros modos de tratamento existentes, por exemplo, agentes existentes para o tratamento de mal de Alzheimer, por exemplo, embora sem limitação, ARICEPT ou donepezila, COGNEX ou tacrina, EXELON ou rivastigmina, REMINILA ou galantamina, vacina anti-amiloide, terapias diminuidoras de Abeta, exercício ou estimulação mental; ver para revisão Zlokovic, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54: 1533-1660, 2002).

Em algumas concretizações, agentes que inibem Lp-PLA₁ como revelado aqui podem ser combinados com outro agente, por exemplo, agente terapêutico para prevenir e/ou tratar doenças neurodegenerativas. Referidos agentes podem ser qualquer agente correntemente em uso ou que está sendo desenvolvido para o tratamento e/ou a prevenção de uma doença ou distúrbio neurodegenerativo, sendo que o agente pode apresentar um efeito profilático e/ou curativo, e/ou reduzir um sintoma de uma distúrbio ou doença neurodegenerativa.

Em concretizações em que agentes inibidores de Lp-PLA₂ como revelado aqui são usados para a prevenção e/ou tratamento de mal de Alzheimer e/ou demência vascular, os agentes inibidores de Lp-PLA₂, como revelado aqui, podem ser usados em combinação com drogas comumente conhecidas por pessoa com prática ordinária na arte que são reivindicados

como sendo úteis como tratamentos sintomáticos de demência. Exemplos de referidas drogas incluem, embora sem limitação, agentes conhecidos por modificarem a transmissão colinérgica, como agonistas do receptor muscarínico M1 ou moduladores alostéricos, antagonistas muscarínicos M2, inibidores de acetilcolinesterase (como tetraidroaminoacridina, donepezila, galantamina e rivastigmina), agonistas de receptor nicotínico ou moduladores alostéricos (como agonistas de $\alpha 7$ ou moduladores alostéricos ou agonistas de $\alpha 4\beta 2$ ou moduladores alostéricos), receptores ativados por proliferador de peroxisa (PPAR) (como agonistas de PPAR γ), agonistas parciais de receptor 5-HT $_4$, antagonistas de histamina H $_3$ e agonistas invertidos, antagonistas de receptor de 5-HT $_6$ ou antagonistas de receptor de 5HT1A, moduladores positivos de AMPA (alfa-amino-3-hidróxi-5- metilisoxazol-4-propionato, um subtipo do receptor de glutamato) e antagonistas de receptor de ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) ou moduladores (como memantina).

Em algumas concretizações, onde os agentes inibidores de Lp-PLA $_2$ como revelado aqui são usados para o tratamento de mal de Alzheimer, os agentes inibidores de Lp-PLA $_2$ como revelado aqui podem ser usados em combinação com aquelas drogas indicadas acima que são reivindicadas como sendo úteis como tratamentos sintomáticos de demência e/ou agentes modificadores da doença. Agentes modificadores da doença incluem, por exemplo, embora sem limitação, moduladores e inibidores de gama secretase, e inibidores de beta-secretase humana (BACE). Agentes modificadores da doença também são, por exemplo, embora sem limitação, moduladores e inibidores de gama secretase, inibidores de beta-secretase (BACE) e quaisquer outras abordagens anti-amilóide incluindo imunização ativa e passiva, por exemplo, agentes identificados pelos métodos como revelado no Pedido de Patente US nº 2005/0170359, e também agentes como revelado nos Pedidos de Patentes Internacionais WO05/07277, WO03/104466 e WO07/028133, e Patente US nº 6.866.849, 6.913.745, que são incorporadas

integralmente aqui por referência.

Assim, é possível praticar tratamento de combinação com um ou mais agentes que inibem Lp-PLA₂ com um ou mais outros procedimentos médicos.

5 Adicionalmente, tratamento também pode compreender múltiplos agentes para inibir expressão ou atividade de Lp-PLA₂. Por exemplo, outros agentes incluem o uso de estatinas com Niacina (ver <http://www.genengnews.com/news/bnitem.aspx?name=6724568>) e fenofibrato (ver <http://www.genengnews.com/news/bnitem.aspx?name=14817756&taxid=19>).
10

De maneira análoga, o diagnóstico de acordo com a invenção pode ser praticado com outros procedimentos diagnósticos. Por exemplo, o endotélio do sistema vascular, cérebro, ou medula espinhal (p. ex., vasos sanguíneos ou leptomenínges) pode ser avaliado quanto a uma alteração nos perfis de expressão gênica usando kits diagnósticos moleculares específicos para doença (p. ex., conjuntos personalizados, QPCR multiplex, conjuntos proteômicos multiplexados). Adicionalmente, é possível usar um procedimento diagnóstico não-invasivo (p. ex., CAT, MRI, SPECT, ou PET) em combinação para melhorar a precisão e/ou a sensibilidade do diagnóstico.
15
20 Diagnóstico precoce e confiável é particularmente útil para tratamentos que só são efetivos para mal de Alzheimer de branda a moderada ou apenas retardar sua progressão.

A quantidade que é administrada a um sujeito é, de preferência, uma quantidade que não induz efeitos tóxicos que superem as vantagens que resultam de sua administração. Objetivos adicionais consistem da redução do número, diminuição da severidade, e/ou, de outra forma, do alívio do sofrimento dos sintomas da doença no indivíduo em comparação com padrões de tratamento reconhecidos.
25

A produção de compostos de acordo com as presentes

regulações será regulada para boas práticas de laboratório (GLP) e boas práticas de fabricação (GMP) por agências governamentais (p. ex., *U.S. Food and Drug Administration* [Administração Federal de Drogas e Alimentos dos E.U.A.]). Isto requer registros precisos e completos, e também monitoramento de QA/QC. A supervisão de protocolos de pacientes por agências e quadros institucionais também é considerada para assegurar que o consentimento informado foi obtido; segurança, bioatividade, dosagem apropriada, e eficácia de produtos são estudados em fases; resultados são estatisticamente significativos; e segue-se diretrizes éticas. Exige-se protocolos de supervisão similares usando modelos animais, e também o uso de químicos tóxicos, e adesão às regulações.

Dosagens, formulações, volumes de dosagens, regimes, e métodos para analisar resultados objetivados à inibição da expressão e/ou atividade de Lp-PLA₂ podem variar. Assim, dosagens eficazes mínimas e máximas variam dependendo do método de administração. A supressão das alterações clínicas e histológicas associadas com demência vascular pode ocorrer dentro de uma faixa de dosagem específica que, no entanto, varia dependendo do organismo que recebe a dosagem, da via de administração, se agentes que inibem Lp-PLA₂ são administrados em conjunto com outras moléculas coestimuladoras, e o regime específico da administração do inibidor de Lp-PLA₂. Por exemplo, em geral, a administração nasal requer uma dosagem menor do que a administração oral, enteral, retal, ou vaginal.

Para formulações orais ou enterais para uso com a presente invenção, é possível formular tabletes de acordo com procedimentos convencionais usando veículos sólidos bem conhecidos na arte. Cápsulas usadas para formulações orais a serem usadas com os métodos da presente invenção podem ser preparadas a partir de material farmacologicamente aceitável, como gelatina ou derivados de celulose. Sistemas de fornecimento oral de liberação sustentada e/ou revestimentos entéricos para formas de

dosagem administradas oralmente também são consideradas, como aquelas descritas na Patente US nº 4.704.295, "Enteric Film-Coating Compositions", expedida em 3 de novembro de 1987; Patente US nº 4.556.552, "Enteric Film-Coating Compositions", expedida em 3 de dezembro de 1985; Patente US nº 4.309.404, "Sustained Release Farmaceutical Compositinos", expedida em 5 de janeiro de 1982; e Patente US nº 4.309.406, "Sustained Release Farmaceutical Compositions", expedida em 5 de janeiro de 1982.

Exemplos de veículos sólidos incluem amido, açúcar, bentonita, sílica, e outros veículos comumente usados. Exemplos não-limitantes adicionais de veículos e diluentes que podem ser usados nas formulações da presente invenção incluem solução salina, xarope, dextrose, e água.

Formulação revestida entérica

No que se refere a formulações para administração das pequenas entidades químicas para inibidores de Lp-PLA₂ dos análogos de fórmulas de (I) a (IV) como revelado aqui, uma concretização particularmente útil é uma formulação de tablete compreendendo o inibidor de Lp-PLA com um revestimento de polímero entérico. Um exemplo de uma preparação do tipo referido pode ser encontrado no WO2005/021002. O material ativo no núcleo pode estar presente em uma forma micronizada ou solubilizada. Adicionalmente a materiais ativos, o núcleo pode conter aditivos convencionais na arte dos tabletes comprimidos. Aditivos apropriados em um tablete do tipo referido podem compreender diluentes, como lactose anidra, monoidrato de lactose, carbonato de cálcio, carbonato de magnésio, fosfato de dicálcio, ou misturas dos mesmos; ligantes, como celulose microcristalina, hidroxipropilmetilcelulose, hidroxipropilcelulose, polivinilpirrolidona, amido pré-gelatinizado ou goma acácia ou misturas dos mesmos; desintegrantes, como celulose microcristalina (preenchendo ambas as funções, de ligante e desintegrante) polivinilpirrolidona reticulada, glicolato de amido sódico,

sódio croscarmelose ou misturas dos mesmos; lubrificantes, como estearato de magnésio ou ácido esteárico, deslizantes ou auxiliares de fluxo, como sílica coloidal, talco ou amido, e estabilizadores, como sílica amorfa dessecante, agentes corantes, aromatizantes etc. De preferência, o tablete
5 compreende lactose como diluente. Quando um aglutinante está presente, ele é, de preferência, hidroxipropilmetil celulose. De preferência, o tablete compreende estearato de magnésio como lubrificante. De preferência, o tablete compreende sódio croscarmelose como desintegrante. De preferência, o tablete compreende celulose microcristalina.

10 O diluente pode estar presente numa faixa de 10 a 80 % em peso do núcleo. O lubrificante pode estar presentes numa faixa de 0,25 a 2 % em peso do núcleo. O desintegrante pode estar presentes numa faixa de 1 a 10 % em peso do núcleo. Celulose microcristalina, se presente, pode estar presente numa faixa de 10 a 80 % em peso do núcleo.

15 O ingrediente ativo compreende, de preferência, entre 10 e 50 % do peso do núcleo, mais preferivelmente entre 15 e 35 % do peso do núcleo, (calculado como equivalente de base livre). O núcleo pode conter qualquer nível de dosagem terapeuticamente vantajoso do ingrediente ativo, mas contém, de preferência, até 150 mg como base livre do ingrediente ativo.
20 De forma particularmente preferível, o núcleo contém 20, 30, 40, 50, 60, 80 ou 100 mg como base livre do ingrediente ativo. O ingrediente ativo pode estar presente como a base livre, ou como qualquer sal farmacologicamente aceitável. Se o ingrediente ativo estiver presente como um sal, o peso é ajustado de tal forma que o tablete contenha a quantidade desejada de
25 ingrediente ativo, calculado como base livre do sal. De preferência, o ingrediente ativo está presente como um sal de cloridrato.

O núcleo pode ser preparado a partir de uma mistura compactada de seus componentes. Os componentes podem ser comprimidos diretamente, ou podem ser granulados antes da compressão. Referidos

grânulos podem ser formados por meio de um processo de granulação convencional como é de conhecimento na arte. Em uma concretização alternativa, os grânulos podem ser revestidos individualmente com um revestimento entérico, e, depois, encerrados em um revestimento de cápsula padrão.

O núcleo é envolvido por um revestimento do tipo referido que compreende um polímero entérico. Exemplos de polímeros entéricos são ftalato de acetato de celulose, succinato de acetato de celulose, ftalato de metilcelulose, ftalato de etil-hidroxicelulose, ftalato de acetato de polivinila, acetato de polivinilbutirato, copolímero de acetato de vinila-anidrido maléico, copolímero de estireno-monoéster maléico, copolímero de acrilato de metila - ácido metacrílico ou copolímero de metacrilato - ácido metacrílico - acrilato de octila. Estes podem ser usados sozinhos ou em combinação, ou juntamente com outros polímeros do que aqueles mencionados acima. O revestimento também pode incluir substâncias insolúveis que nem são decompostas nem solubilizadas em corpos vivos, como derivados de alquila celulose, como etil celulose, polímeros reticulados, como copolímero de estireno - divinilbenzeno, polissacarídeos apresentando grupos hidroxila, como dextrano, derivados de celulose que são tratados com agentes de reticulação difuncionais, como epicloridrina, dicloroidrina ou 1, 2-, 3, 4-diepoxibutano. O revestimento também inclui amido e/ou dextrina.

Materiais de revestimento entérico preferidos são os polímeros entéricos Eudragit® comercialmente obteníveis, como Eudragit® L, Eudragit® S e Eudragit® NE usados sozinhos ou com um plastificante. Referidos revestimentos são aplicados normalmente usando-se um meio líquido, e a natureza do plastificante depende de se o meio é aquoso ou não-aquoso. Plastificantes para uso com meio aquoso incluem propileno glicol, trietil citrato, acetil trietil citrato ou Citrotlex® ou Citrotlex® A2. Plastificantes não-aquosos incluem estes, e também ftalato de dietila e

dibutíla e sebacato de dibutíla. Um plastificante preferido é citrato de trietil. A quantidade de plastificante incluída será perceptível por aqueles com prática na arte.

O revestimento também pode incluir um agente anti-pegajosidade, como talco, sílica ou monoestearato de glicerila. De preferência o agente anti-pegajosidade é monoestearato de glicerila. Tipicamente, o revestimento pode incluir em torno de 5 a 25 % em peso de plastificante e até aproximadamente 50 % em peso de agente anti-pegajosidade, de preferência, de 1 a 10 % em peso de agente anti-pegajosidade.

Se desejado, um tensoativo pode ser incluído para auxiliar com a formação de uma suspensão aquosa do polímero. Muitos exemplos de tensoativos possíveis são conhecidos pela pessoa versada na arte. Exemplos preferidos de tensoativos são o polissorbato 80, polissorbato 20, ou lauril sulfato de sódio. Se presente, um tensoativo pode formar de 0,1 a 10 % do revestimento, de preferência, de 0,2 a 5 % e, de forma particularmente preferível, de 0,5 a 2 %.

Em uma concretização, há um revestimento de vedação incluído entre o núcleo e o revestimento entérico. Um revestimento de vedação é um material de revestimento que pode ser usado para proteger o revestimento entérico de possível ataque químico por quaisquer ingredientes alcalinos no núcleo. O revestimento de vedação também pode proporcionar uma superfície mais lisa, permitindo com isto ligação mais fácil do revestimento entérico. Uma pessoa versada na arte terá conhecimento de revestimentos vantajosos. De preferência, o revestimento de vedação é feito de um revestimento Opadry, e, de forma particularmente preferível, é um Opadry White OY-S-28876.

Em uma concretização, o ingrediente farmacêuticamente ativo é 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)benzil)aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobenzil)tio-5,6-

trimetilenopirimidin-4-ona, ou um sal do mesmo.

Um exemplo de referida formulação revestida entericamente, como descrito no WO2005/021002, compreende quantidades variáveis de 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-

5 trifluorometilfenil)benzil)aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobenzil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona (denominado "ativo" neste exemplo) como sal de cloridrato.

Naquele exemplo, monidrato de lactose, celulose microcristalina, o ingrediente ativo, a hidroxipropil metil celulose e metade do

10 sódio croscarmelose foram selecionados em um misturador de alto cisalhamento Fielder de 10 litros (é possível usar qualquer misturador com alto cisalhamento vantajoso) e misturados durante 5 minutos a 300 rpm com o picador removido. A mistura foi então granulada por meio da adição de cerca de 750 ml de água enquanto se continuava a misturar. Os grânulos foram

15 secados em um secador de leito fluido Glatt 3/5, selecionados por meio de Comil em um misturador de caixa Pharmatec de 5 litros e então misturados com qualquer lactose anidra dada na fórmula acrescida do restante da croscarmelose de sódio ao longo de 5 minutos a 20 rpm. O estearato de magnésio foi selecionado no misturador e o processo de misturação continuou

20 durante mais 1 minuto a 10 rpm. A mistura lubrificada foi comprimida usando uma prensa de tabletes rotativa Riva Piccola equipada com vazador es convexos normais redondos de 9,5 mm (é possível usar qualquer prensa de tablete vantajosa). O revestimento de vedação e, subsequentemente, o revestimento entérico, são aplicados por meio de pulverização de uma

25 suspensão aquosa dos ingredientes de revestimento em um revestidor Manesty 10 usando-se parâmetros para o processo de revestimento como recomendados pelos fabricantes dos polímeros de revestimento (novamente, é possível usar qualquer revestidor vantajoso).

Outras preparações revestidas entericamente deste tipo podem

ser preparadas por alguém com prática na arte usando estes materiais ou seus equivalentes.

Exemplos

Os exemplos apresentados aqui relacionam-se com os métodos e composições para a prevenção e/ou o tratamento de distúrbios neurodegenerativas, por exemplo, mas sem limitação, demência vascular e distúrbios da barreira hematoencefálica, por exemplo, mal de Alzheimer, doença de Huntington, mal de Parkinson, por meio de inibição de Lp-PLA₂. Em todo este pedido faz-se referência a várias publicações. As revelações de todas as publicações e das referências indicadas naquelas publicações são incorporadas integralmente por referência aqui neste pedido para descrever mais plenamente o estado da arte a que esta invenção se refere. Os exemplos a seguir não se destinam a limitar o escopo das reivindicações da invenção, mas, ao invés, devem ser apenas exemplares de determinadas concretizações. Quaisquer variações nos métodos exemplificados que podem ocorrer à pessoa versada na arte devem enquadrar-se no escopo da presente invenção.

Métodos

Modelo animal: desenvolveu-se um modelo de porco diabético / hipercolesterolêmico diabético (DM/HC) que emula aterosclerose similar à humana. Porcos de fazenda pesando de 25 a 30 kg e com idades inferiores a 4 meses foram tornados diabéticos com uma única injeção intravenosa de 125 mg/kg de estreptozotocina (Sicor Pharmaceuticals, Irvine, CA). Após a estabilização durante 1 a 2 semanas, os animais com níveis elevados de glicose no plasma (>150 mg/dl) foram alimentados com dieta aterogênica (alto teor de gordura) como mostrado na Tabela 1 (*Animal Specialties*, Quakertown, PA) para se obter um nível de colesterol de aproximadamente 250 a 800 mg/dl. A manutenção do nível de colesterol foi determinada por meio do método como mostrado na Tabela 2.

Tabela 1. Dieta a 2,0 % de colesterol - os componentes são:

Componente	% peso/peso
farinha de criação de porcos Purina*	47,5 %
banha	25,0 %
caseína	11,1 %
leite em pó integral	7,9 %
óleo de amendoim	2,37 %
colesterol	2,0 %
mistura de sal de Wesson	2,37 %
mistura de vitamina Purina*	1,58 %
colato de sódio	1,58 %
carbonato de cálcio	0,4 %
cloreto de colina	0,2 %

*Purina Mills, LLC, Checkerboard Square, St. Louis, Missouri, 63164, E.U.A. Estas rações foram preparadas pela *Animal Specialties and Provisions*, LLC, Quakertown, PA, E.U.A.

- 5 Para a dieta a 0,5 % de colesterol os componentes são similares, com exceção de 0,5 % de colesterol e 20 % de banha. Os animais eram porcos Yorkshire, machos castrados com a idade de 3 a 5, e foram obtidos da Archer Farms, Darlington, MD. Estas rações foram preparadas pela *Animal Specialties and Provisions*, LLC, Quakertown, PA, E.U.A.
- 10 Nos dias 1-2, animais foram alimentados com ração normal, em seguida, nos dias de 3 a 14, animais foram alimentados com uma dieta de 0,5 % colesterol, 2 % de banha e, no dia 14, mediu-se os níveis de colesterol e a dieta foi ajustada correspondentemente para incrementar o colesterol a 2 %, a gordura a 10 % se o colesterol for <300 mg/dl. Após a indução de DM/HC,
- 15 o colesterol foi medido até que os níveis de colesterol se mantivessem estáveis entre 300 e 800 mg/dl, e após a estabilização do colesterol, o colesterol foi medido mensalmente. Se os níveis de colesterol fossem instáveis após a fase de estabilização inicial, a dieta do animal seria retornada ao programa de medição inicial de 2 semanas. Determinamos mensalmente os
- 20 níveis de colesterol, incluindo níveis de colesterol total, LDL, HDL, VLDL e triglicerídeos. O ajuste da dieta do animal a um nível de colesterol estável foi determinado de acordo com as indicações mostradas na Tabela 2.

Tabela 2. Ajuste dietético e do colesterol.

nível do colesterol	ajuste dietético	próxima medição	nível do colesterol	ajuste dietético	próxima medição do colesterol
<250 mg/dl	alterar para dieta a 25 % de banha	2 semanas	<300 mg/dl	continuar dieta a 25 % de banha	2 semanas
			300-800 mg/dl	alterar para 75 % de gordura (25 % de gordura): 25 % de dieta normal	2 semanas
			>800 mg/dl	alterar para 100 %, dieta a 10 % de gordura	2 semanas
			>1000 mg/dl	alterar para mistura a 50:50 de dieta a 10 % de gordura	2 semanas
			>1500 mg/dl	alterar para dieta normal	2 semanas*

300-800	nenhuma alteração. dieta a 10 % de gordura	2 semanas	<300 mg/dl	alterar para dieta a 25 % de gordura	2 semanas
			300-800 mg/dl	nenhuma alteração	programa regular
			>800 mg/dl	alterar para mistura a 50:50 com 10 % de gordura	2 semanas
			>1000 mg/dl	alterar para mistura a 25:75 com 10 % de gordura	2 semanas
			>1500 mg/dl	ração normal	2 semanas

800-1000	alterar para mistura a 50:50 de dieta a 10 % de gordura e ração normal	2 semanas	<300 mg/dl	alterar para mistura a 25:75 com dieta a 10 % de gordura	2 semanas
			300-800 mg/dl	nenhuma alteração na dieta (50:50) a 10 % de gordura	2 semanas
			>800 mg/dl	alterar para mistura a 25:75 (10 % de gordura)	2 semanas
			>1000 mg/dl	alterar para mistura a 25:75 (10 % de gordura)	2 semanas
			>1500 mg/dl	ração normal	2 semanas*

>1000 mg/dl	25:75 mix of 10 % de gordura e normal chow diet.	2 semanas	<300 mg/dl	alterar para mistura a 50:50 de dieta a 10 % de gordura e ração normal	2 semanas
			300-800 mg/dl	nenhuma alteração na dieta mistura a 25:75 de dieta a 10 % de gordura e ração normal	2 semanas
			>800 mg/dl	nenhuma alteração na dieta	2 semanas
			>1000 mg/dl	ração normal	2 semanas*
			>1500 mg/dl	ração normal	2 semanas*

>1500 mg/dl	dieta de ração normal	2 semanas	<300 mg/dl	alterar para 100 % de dieta a 10 % de gordura.	2 semanas
			300-800 mg/dl	ração normal	2 semanas
			>800 mg/dl	ração normal	2 semanas*
			>1000 mg/dl	ração normal	2 semanas*
			>1500 mg/dl	ração normal	2 semanas*

Um mês após a estabilização do colesterol a de 250 a 800mg/dl, os animais foram randomizados em dois grupos experimentais, grupo DM/HC (hiperglicemia e hipercolesterolemia) sem tratamento e grupo de tratamento (10 mg/kg/dia de SB-480848, também referido como 1-(N-(2-(dictilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)benzil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobenzil)tio-5,6- trimetilenopirimidin-4-ona). Os animais foram sacrificados 6 meses após a randomização. O protocolo animal foi aprovado pelo *Institutional Animal Care and Use Committee* [comitê institucional para uso e cuidados animais] da Universidade da Pennsylvania.

Dois grupos diabético/hipercolesterotêmico foram avaliados: 1. grupo DM/HC e 2. animais DM/HC recebendo inibidores de Lp-PLA₂. Os experimentos incluíram: o grupo de controle (grupo DM/HC - 17 porcos) e o grupo experimental (animais DM/HC que receberam inibidores de Lp-PLA₂ - 20 porcos). Adicionalmente, os níveis de colesterol no sangue foram mantidos entre 300 e 800 mg/dl em animais experimentais, sendo que esta faixa foi determinada de forma a proporcionar um modelo de teste melhor. Os níveis de colesterol no sangue foram monitorados em todos os animais bimestralmente, como mostrado na Tabela 4, e realizou-se correspondentemente ajustes no teor de gordura da ração, como mostrado na Tabela 2. Os percentuais de colesterol e banha foram na faixa de 0,5 a 2 % e de 10 a 25 %, respectivamente, e todos os animais receberam ração que continha concentração de colesterol e banha dentro da referida faixa. Amostras de sangue foram obtidas na linha-de-base, 1 mes, 3 meses, e 6 meses. Obteve-se em cada momento menos de 1 ml/kg de sangue. Nos testes bimestrais de níveis de colesterol no sangue, níveis de colesterol total, LDL,

HDL, VLDL e triglicerídeos, glicose no sangue, Lp-PLA₂ e células primárias de sangue da medula (PBMC) foram testados (ver Tabela 4).

O número de animais, selecionado para justificar a exigência mínima para validação estatística, foi de 2 grupos de animais por experimento como a seguir: 1. Grupo de controle (n=17); Diabéticos e hiperlipidêmicos; 2. Grupo experimental (n=20) Diabéticos, hiperlipidêmicos recebendo 10 mg/kg de inibidor de Lp-PLA₂, como mostrado na Tabela 3.

Porcos domésticos de fazenda, javalis Yorkshire, compreendendo pesos entre 25 e 35 kg, foram adquiridos de uma fazenda local e alojados em abrigos interiores sob os cuidados de um veterinário. Eles foram castrados de 3 a 5 dias previamente à data de início do estudo. Porcos de teste foram tornados diabéticos por meio de infusão de uma dose de estreptozocina (125 mg/kg) IV em um período de 30 min. Se os animais não se tornaram diabéticos, administrou-se uma segunda dose de (50 mg/kg). Para evitar o início possível da hipoglicemia inicial, adicionou-se 20 g de pó de glucose à ração para os primeiros 2. A glucose no sangue foi medida usando-se um glucômetro diariamente antes da alimentação durante os primeiros 14 dias e, depois, uma vez por semana.

Animais de teste foram alojados separadamente de animais de controle para evitar transferência de droga inter-animais em virtude da coprofagia. Todos os animais foram alimentados com dieta aterogênica duas vezes ao dia com acesso livre à água. A dieta personalizada continha 0,5 e 2 % colesterol e 10 e 25 % de gordura, cujos componentes são mostrados na Tabela 1.

Tabela 3. Programa de animais e procedimentos (divididos em 2 grupos):

	número de animais	linha do tempo
grupo 1: DM/HC	N=20	7 meses
grupo 2: DM/HC receber inibidores de LP-PLA ₂	N=17	7 meses
Total	N=37	7 meses

Tabela 4. Sumário dos procedimentos

	Início	28 d	57 d	85 d	113 d	141 d	168 d	196 d
Glicose, LDL, HDL, Triglicerídeos no soro	X	X	X	X	X	X	X	X
Lp-PLA ₂ (soro congelado -EDTA)	X	X	X	X	X	X	X	X
PBMCs	X		X		X			X
Coleta de tecido								X

A dosagem diária começou no dia 29, sendo que neste momento cada animal de teste recebeu uma dose diária de 10 mg/kg de SB-4S0848 (dada como equivalente de bolo em ração para cães). Animais foram NPO da meia-noite da noite anterior. Animais foram eutanizados no dia 196 e tecidos coletados imediatamente.

Preparação de tecido cerebral. Todo o cérebro foi removido no prazo de uma hora após os animais terem sido eutanizados. O hemisfério direito foi fixado em 10 % de formalina durante pelo menos uma semana. Os tecidos cerebrais foram então fatiados e embutidos em parafina. De cada animal, gerou-se um total de ~11 blocos de tecidos (ver ilustração) para a imuno-histoquímica (IHC). Do hemisfério esquerdo, o córtex cerebral (de múltiplos locais), hipocampo e base do cérebro foram preservados para análises de RNA e proteína.

Tecido cerebral humano post-mortem usado para comparar com tecido cerebral de porco. O hipocampo e o córtex entorrinal de pacientes com AD [mal de Alzheimer] esporádica, diagnosticada clinicamente (n=21, faixa de idades = de 72 a 84) e tecidos de controle de indivíduos neurologicamente normais, de idades semelhantes (n=13, faixa de idades = de 69 a 81) foram obtidos do centro de recursos de tecidos cerebrais de Harvard [Harvard Brain Tissue Resource Center] (Belmont, MA) e da Rede Cooperativa para Tecidos Humanos [Cooperative Human Tissue Network] (Philadelphia, PA). Intervalos *post-mortem* para estes cérebros foram de <24 h e a confirmação patológica da AD para cada amostra de cérebro foi realizada de acordo com os critérios definidos pelo instituto nacional sobre o

envelhecimento [*National Institute on Aging*] e pelo grupo de trabalho do instituto Reagan sobre critérios diagnósticos para a avaliação neuropatológica do mal de Alzheimer [*Reagan Institute Working Grupo on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assessment of AD*] (1997). Amostras de

5 cérebro de controles de idades similares foram selecionadas usando os mesmos critérios. Tecidos foram caracterizados imuno-histoquimicamente quanto à presença de placas neuríticas (amilóides) e emaranhados neurofibrilares como descrito previamente (D'Andrea *et al.*, 2001; Nagele *et al.*, 2002). Tecidos de controle não apresentaram qualquer patologia e mínima

10 neuropatologia similar a AD microscópica localizada. Tecidos foram processados com relação a embutimento rotineiro em parafina e seccionamento de acordo com protocolos estabelecidos. Cortou-se serialmente seções de cinco micrômetros, que foram montadas sobre micro-lâminas SuperFrost Plus+ (Fisher Scientific. Pittsburgh. PA), e secados de um

15 dia para o outro.

Histologia e Imuno-histoquímica (IHC) de tecido cerebral humano e de porco. A imuno-histoquímica foi realizada sobre tecidos embutidos em parafina conforme descrito previamente (D'Andrea *et al.*, 2001; Nagele *et al.*, 2002). Em resumo, após a remoção da parafina com xileno e

20 reidratação por meio de uma série graduada de concentrações decrescentes de etanol, a antigenicidade de proteína foi incrementada submetendo-se seções a microondas em Tamponador Alvo [*Target Buffer*] (Dako, Carpenturia, CA) durante 2 min. Alternativamente, seções congeladas foram tratadas durante 2 min em acetona, e novamente secadas ao ar. Após uma incubação de 30 min

25 em 0,3 % de H₂O₂, seções foram tratadas durante 30 min em soro de bloqueio normal e, então, incubadas com anticorpos primários em diluições apropriadas durante 1 h à temperatura ambiente. Após um enxágue cuidadoso em PBS, aplicou-se um anticorpo secundário marcado com biotina durante 30 min. Imunorreações foram tratadas com o complexo de biotina marcado com

avidina-peroxidase (ABC, *avidin-peroxidase- labeled biotin complex*, Vector Labs, Foster City, CA) e visualizadas por meio de tratamento de seções com 3-3-diaminobenzidina-4 HCl (DAB)/H₂O₂ (Biomeda, Foster City, CA). Seções foram ligeiramente contra-manchadas com hematoxilina, desidratadas por meio de uma série graduada de concentrações crescentes de etanóis, eliminadas com xileno e montadas em Permunt. Controles consistiram de seções de cérebro tratadas com soro não-imune, anticorpo pré-absorvido ou omissão do anticorpo primário. Amostras foram examinadas e fotografadas com um microscópio Nikon FXA, e imagens digitais foram registradas usando uma câmera digital Nikon DXM1200F e processadas usando *software* de diagnóstico por imagem Image Pro Plus (Phase 3 Imaging, Glen Mills, PA).

Seções histológicas seriais de córtex frontal foram manchadas como a seguir: Hematoxilina e eosina (H&E) para revelar estrutura vascular e hemorragia; IHC para revelar vazamento da BBB (imunoglobulina de porco como um marcador para vazamento vascular e permeabilidade da BBB), ativação de astrócitos (proteína ácida fibrilar glial) e o aspecto morfológico e integridade estrutural de neurônios (proteína 2 associada com microtúbulos). Placa amilóide (Abeta-42).

EXEMPLO 1

A inibição da atividade de Lp-PLA₂ previne demência vascular e mal de Alzheimer: hemorragia intracerebral induzida com DM/HC e comprometimento da barreira hematencefálica (BBB).

A função primária da BBB consiste em manter controle preciso sobre substâncias que adentram ou deixam o cérebro, de tal forma que o ambiente em que neurônios funcionam permanece homeostático. Se a BBB estiver comprometida, componentes do sangue que normalmente são excluídos poderiam adentrar no tecido cerebral, interferir com a função de neurônios, disparar uma resposta imune e elicitar neuroinflamação, sendo que

todos estes contribuem para a demência vascular e o desenvolvimento de mal de Alzheimer. Como mostrado na Figura 1, em contraste com o vaso de controle (Lett), hemorragia (no alto à direita, H&E 200x) e vazamento da BBB (em baixo à direita, IHC para imunoglobulina de porco 100x) foram observados no cérebro DM/HC. As setas pretas indicam células inflamatórias fora do vaso sanguíneo (topo) e névoas de vazamento perivascular (em baixo á direita, BV: vaso sanguíneo). Adicionalmente, há adesão incrementada de células inflamatórias sobre a superfície de células endoteliais (seta branca, no alto à direita). Usou-se IHC para (i) detectar vazamentos vasculares resultantes de uma BBB defectiva e (ii) rastrear o destino do material vazado no tecido cerebral. De forma similar ao que se observa no cérebro humano com mal de Alzheimer (AD), imunoglobulina (Ig) vazada liga-se a neurônios e causa colapso da árvore de dendritos, como demonstrado pelo reenrolamento e torção dos troncos de dendritos principais (i.e., aspecto de "dendrito sacarolhas") (Figura 2).

Durante o período de estudo, observou-se que animais que receberam administração do inibidor de Lp-PLA₂ foram mais responsivos a estímulos externos, demonstraram maior atividade na gaiola, e tenderam a responder de forma mais alerta à alimentação e ao manuseio em comparação com os animais não-tratados de controle. Da mesma forma, apesar de níveis séricos similares de glicose e colesterol, animais tratados com o inibidor de Lp-PLA₂ demonstraram um aumento do peso em comparação com animais de controle (62,5 kg versus 50,9 kg para animais de controle) com relação a uma linha-de-base de 26,9 kg e 30,3 kg em peso, respectivamente. O peso em animais que receberam administração do inibidor de Lp-PLA₂ é um reflexo direto de seu estado de bem estar geral, na medida em que animais mais adoecidos (i.e. os animais não-tratados de controle) não comem. Observou-se que a inibição de inflamação pelo inibidor de Lp-PLA₂ resulta em maior bem estar e saúde no cenário de inflamação sistêmica.

EXEMPLO 2

Animais DM/HC demonstraram patologia de mal de Alzheimer em estado precoce

A ativação de astrócitos e o acúmulo intracelular de A β 42 em neurônios foi reconhecido como eventos precoces e chave na patogênese do mal de Alzheimer (AD) e foram bem documentados nos cérebros de pacientes com AD. Como mostrado na Figura 3, já 7 meses após a exposição a fatores de risco CV [cardiovascular], DM/HC induziu ativação de astrócitos, como indicado pela expressão elevada de proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Astrócitos apresentando intenso imuno-manchamento de GFAP foram observados na proximidade imediata de neurônios apresentando morfologia anormal. Adicionalmente, neurônios e células de músculos lisos vasculares (SMCs) demonstraram uma reatividade imune incrementada com anticorpos contra A β 42 (Figure 4). É digno de nota que astrócitos apresentaram reatividade imune negativa contra A β 42, demonstrando que o acúmulo de A β 42 ocorre de forma relativamente seletiva em neurônios e SMCs vasculares. Estas verificações demonstram que neurônios e SMCs vasculares são as células que são mais vulneráveis para acumular A β 42, que é comparável com o que é observado nos cérebros de pacientes em estágios precoces do mal de Alzheimer. É importante observar que neurônios positivos para A β 42 também demonstraram características de neurônios doentes, sendo que alguns destes apresentam "troncos de dendritos sacarolha", uma indicação de que a árvore de dendritos do neurônio encontra-se no processo de colapsar (Figura 5). Em contraste com os neurônios A β 42(+), os neurônios negativos para A β 42 pareceram saudáveis.

EXEMPLO 3

Inibição da atividade de Lp-PLA₂ diminuiu o vazamento da BBB induzido por DM/HC

Como mostrado na Figura 5, DM/HC induziu vazamento

disseminado da BBB em todos os 6 animais, enquanto que animais tratados com inibidor de Lp-PLA₂ mostraram vazamento desprezível da BBB. Manchamento castanho indica que componentes do sangue (neste caso Ig) vazaram de artérias pequenas para o tecido cerebral circundante, e ligação
 5 extensiva de Ig ao neurônios. Em contraste, em animais tratados, não há vazamento de Ig dos vasos sanguíneos, nenhuma ligação de Ig a neurônios, e nenhum colapso de dendritos (Figura 5 e Figura 6).

EXEMPLO 4

A inibição da atividade de Lp-PLA₂ preveniu o acúmulo de Abeta-42
 10 induzido por DM/HC em neurônios e minimizou a amiloidose
cerebrovascular.

Animais DM/HC demonstraram grau variável de acúmulo de Abeta 42 em neurônios e também dano a neurônios (Figura 7, quadro à esquerda), enquanto que animais tratados com inibidor de Lp-PLA₂ (Figura 7,
 15 quadro à direita) não apresentaram imunorreatividade neuronal a Abeta-42. Adicionalmente, neurônios doentes raramente foram observados em animais tratados em comparação com animais não-tratados. De maneira análoga, inibidor de Lp-PLA₂ também preveniu o acúmulo de Abeta42 em SMCs vasculares e, assim, minimizaram a amiloidose cerebrovascular (Figura 8).

Em resumo, a inibição de Lp-PLA₂ previne a degradação da
 20 BBB induzida por fatores de risco metabólicos, ligação de Ig a neurônios e acúmulo de Abeta42 em neurônios. A inibição de Lp-PLA₂ também reduziu células glia ativadas (por exemplo, ativação de astrócitos) e minimizou a deposição de Abeta42 em vasos sanguíneos cerebrais (i.e. amiloidose
 25 cerebrovascular).

REFERÊNCIAS

As referências aqui indicadas e em todo o pedido são incorporadas aqui por referência.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para tratar e/ou prevenir uma doença ou distúrbio neurodegenerativo em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende identificar um indivíduo com, ou em risco de desenvolver uma
5 doença ou distúrbio neurodegenerativo, e administrar ao indivíduo que disto necessita uma composição farmacêutica compreendendo uma agente que inibe a atividade e/ou a expressão da proteína Lp-PLA₂.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a doença ou distúrbio neurodegenerativo é selecionado de um
10 grupo que consiste de: mal de Alzheimer, demência vascular, mal de Parkinson e doença de Huntington.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é humano.

4. Método para tratar e/ou prevenir um indivíduo com ou em
15 risco de demência vascular, caracterizado pelo fato de que compreende identificar um indivíduo com, ou em risco de desenvolver uma demência vascular, e administrar a um indivíduo que disto necessita uma composição farmacêutica compreendendo um agente que inibe a atividade e/ou a expressão de proteína Lp-PLA₂, sendo que a inibição da proteína Lp-PLA₂
20 reduz ou interrompe um sintoma de demência vascular.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a demência vascular é associada com mal de Alzheimer.

6. Método para tratar e/ou prevenir uma doença ou distúrbio associado com uma barreira hematoencefálica anormal em um indivíduo,
25 caracterizado pelo fato de que compreende identificar um indivíduo com, ou em risco de uma barreira hematoencefálica anormal, e administrar ao indivíduo que disto necessita uma composição farmacêutica compreendendo um agente que inibe a expressão e/ou atividade da proteína Lp-PLA₂.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo

fato de que a BBB anormal é uma barreira hematoencefálica permeável.

8. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a doença ou distúrbio é uma doença ou distúrbio neurodegenerativo.

5 9. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a doença ou distúrbio é demência vascular.

10. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a doença ou distúrbio neurodegenerativo é mal de Alzheimer.

10 11. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a doença ou distúrbio neurodegenerativo é selecionado de um grupo que consiste de: mal de Alzheimer, demência vascular, mal de Parkinson e doença de Huntington.

15 12. Método para diminuir o acúmulo de beta amiloide no cérebro de um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreendendo identificar um indivíduo com, ou em risco de acúmulo de beta amiloide no cérebro, e administrar ao indivíduo que disto necessita uma composição farmacêutica compreendendo um agente que inibe a expressão e/ou atividade da proteína Lp-PLA₂, sendo que a inibição da proteína Lp-PLA₂ reduz ou interrompe um sintoma de acúmulo de beta amiloide no cérebro.

20 13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o beta amiloide é Abeta1-42.

14. Método para tratar e/ou prevenir mal de Alzheimer em um indivíduo em necessidade do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende:

25 (i) selecionar o indivíduo quanto à probabilidade de apresentar ou desenvolver mal de Alzheimer,

(ii) administrar ao indivíduo uma composição farmacêutica compreendendo um agente que inibe a expressão e/ou atividade da proteína Lp-PLA₂, sendo que a inibição da proteína Lp-PLA₂ reduziu um sintoma de

mal de Alzheimer, sendo que o indivíduo é identificado como apresentando um risco ou probabilidade incrementada de desenvolver mal de Alzheimer determinada pela etapa (i).

15. Método para prevenir ou reduzir o risco de desenvolver mal de Alzheimer, caracterizado pelo fato de que o método compreende avaliar o risco de um indivíduo desenvolver mal de Alzheimer, sendo que um clínico dirige o indivíduo a ser tratado com um agente que inibe a expressão e/ou atividade da proteína Lp-PLA₂ se o indivíduo se encontrar em risco de desenvolver mal de Alzheimer.

16. Método de acordo com as reivindicações 1, 4, 6, 12, 14 ou 15, caracterizado pelo fato de que o agente é uma molécula pequena, ácido nucleico, análogo de ácido nucleico, proteína, anticorpo, peptídeo, aptâmero ou variantes ou fragmentos dos mesmos.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o agente de ácido nucleico é um agente de RNAi.

18. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o agente de RNAi é um siRNA, shRNA, miRNA, dsRNA ou ribozima ou variantes dos mesmos.

19. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a molécula pequena é 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)benzil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobenzil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona ou SB480848 ou um sal do mesmo.

20. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a molécula pequena é N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetraidro-ciclopentapirimidin-1-il]-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida ou um sal do mesmo.

21. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a molécula pequena é N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenziltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-

ilmetil)acetamida; ou um sal do mesmo.

22. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a molécula pequena é 2-[4-([2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil}{[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metila ou um sal do mesmo.

23. Método de acordo com as reivindicações 1, 4, 6, 12, 14 ou 15, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente avaliar a função cognitiva de referido indivíduo após a administração da composição farmacêutica compreendendo agentes que inibem Lp-PLA₂.

24. Método de acordo com as reivindicações 1, 4, 6, 12, 14 ou 15, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente monitorar o tratamento por meio de avaliação do fluxo de sangue cerebral ou da função de barreira hematoencefálica.

25. Método de acordo com as reivindicações 1, 4, 6, 12, 14 ou 15, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente administrar ao indivíduo agentes terapêuticos adicionais.

26. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que agentes terapêuticos adicionais são ARICEPT ou donepezila, COGNEX ou tacrina, EXELON ou rivastigmina, REMINYL ou galantamina, vacina anti-amilóide, terapias diminuidoras de Abeta, estímulo ou exercício mental.

27. Método de acordo com as reivindicações 1, 4, 6, 12, 14 ou 15, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é mamífero.

28. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é humano.

29. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é humano.

30. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado

pelo fato de que o indivíduo é humano.

31. Método de acordo com as reivindicações 14 ou 15, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é humano.

5 32. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o mamífero é um humano.

33. Uso de um agente que inibe a expressão e/ou atividade da proteína Lp-PLA₂ caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para o tratamento e/ou a prevenção de uma doença ou distúrbio neurodegenerativo.

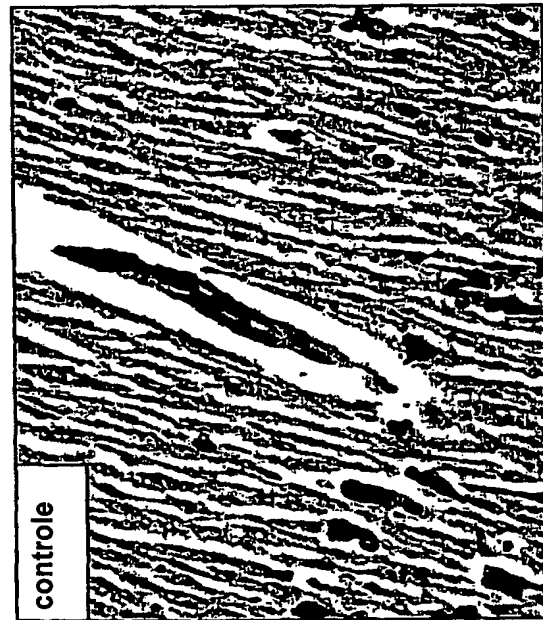


FIG. 1A

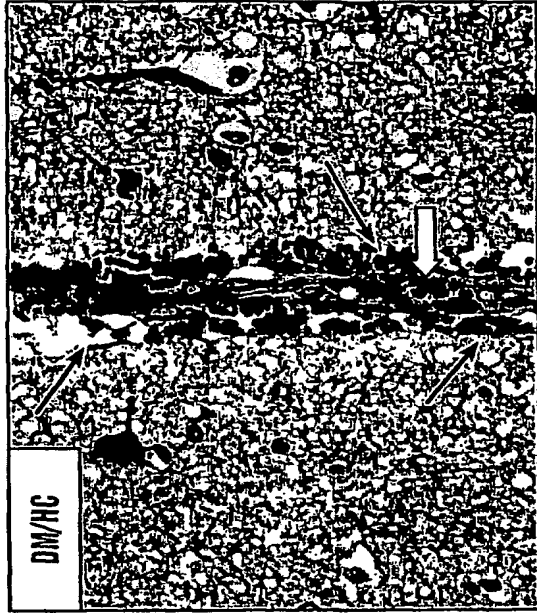


FIG. 1B

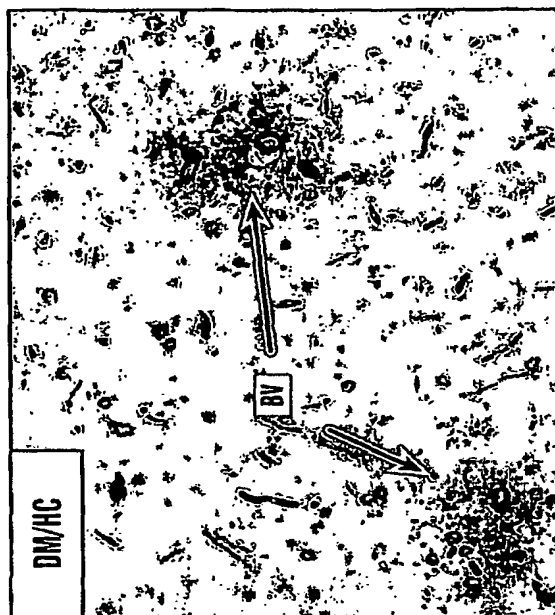


FIG. 1D

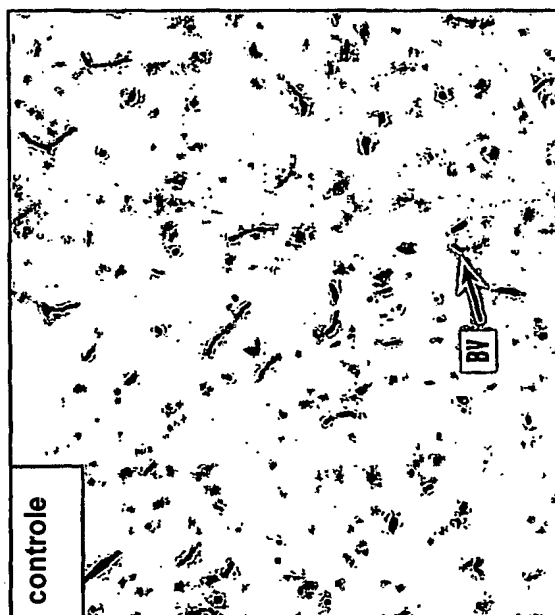


FIG. 1C

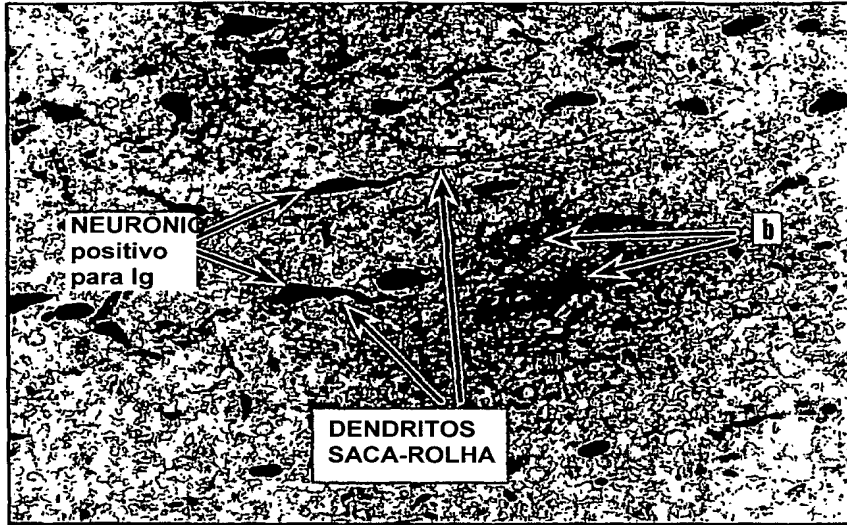


FIG. 2A

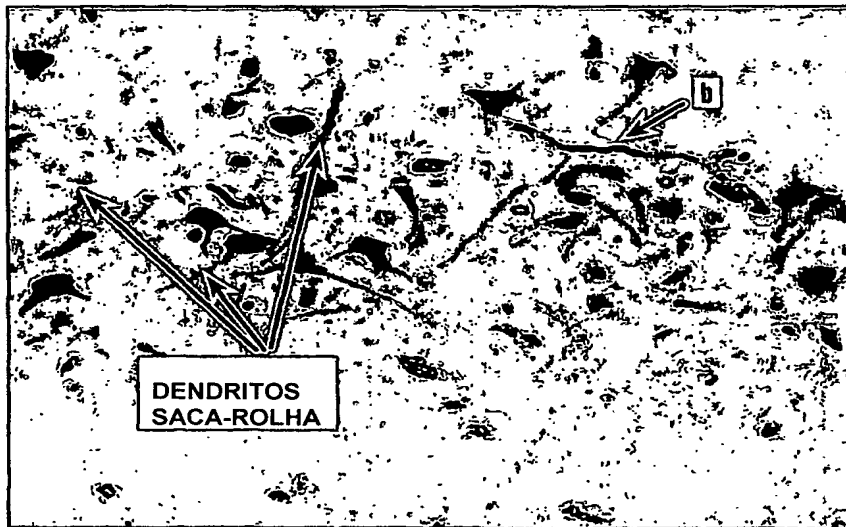


FIG. 2B

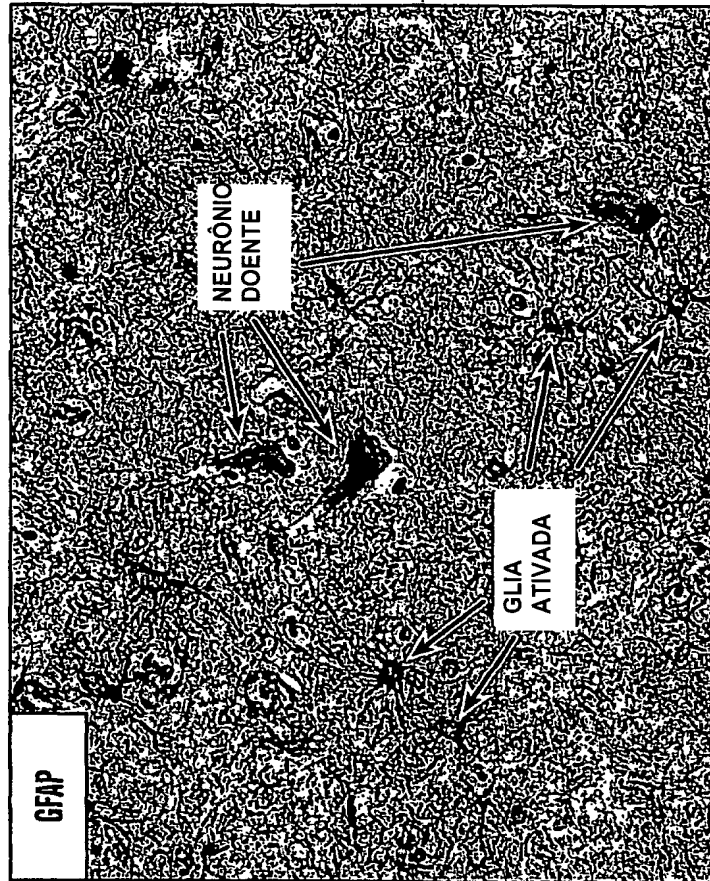


FIG. 3

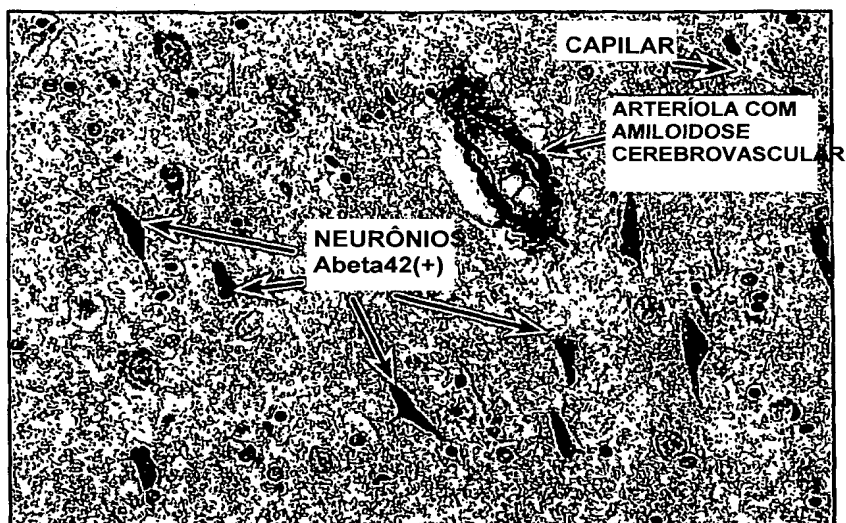


FIG. 4A

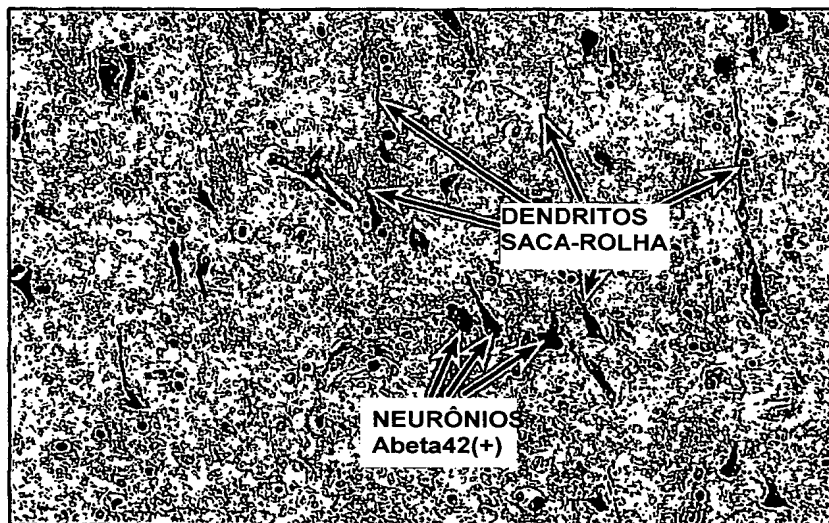


FIG. 4B



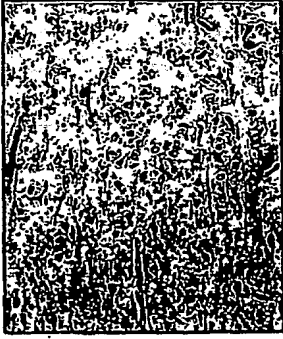
DM/HC N=6

FIG. 5A



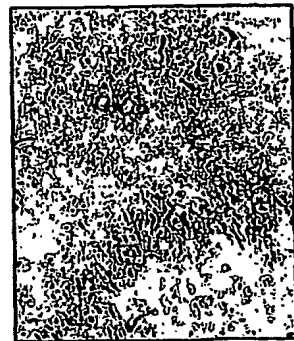
DM/HC N=6

FIG. 5B



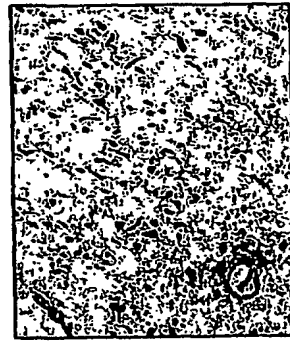
DM/HC N=6

FIG. 5C



DM/HC N=6

FIG. 5D



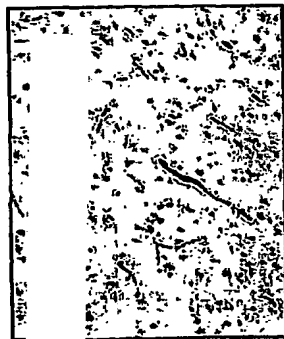
DM/HC N=6

FIG. 5E



DM/HC N=6

FIG. 5F



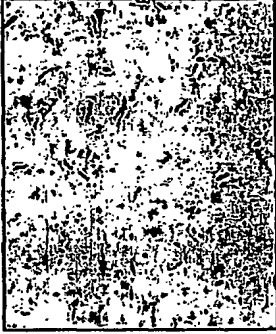
TRATADO N=6

FIG. 5G



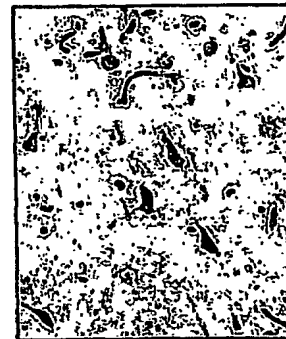
TRATADO N=6

FIG. 5H



TRATADO N=6

FIG. 5I



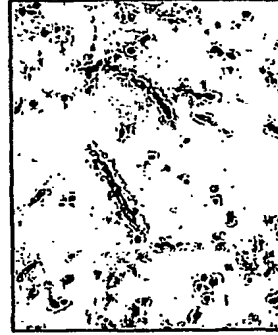
TRATADO N=6

FIG. 5J



TRATADO N=6

FIG. 5K



TRATADO N=6

FIG. 5L

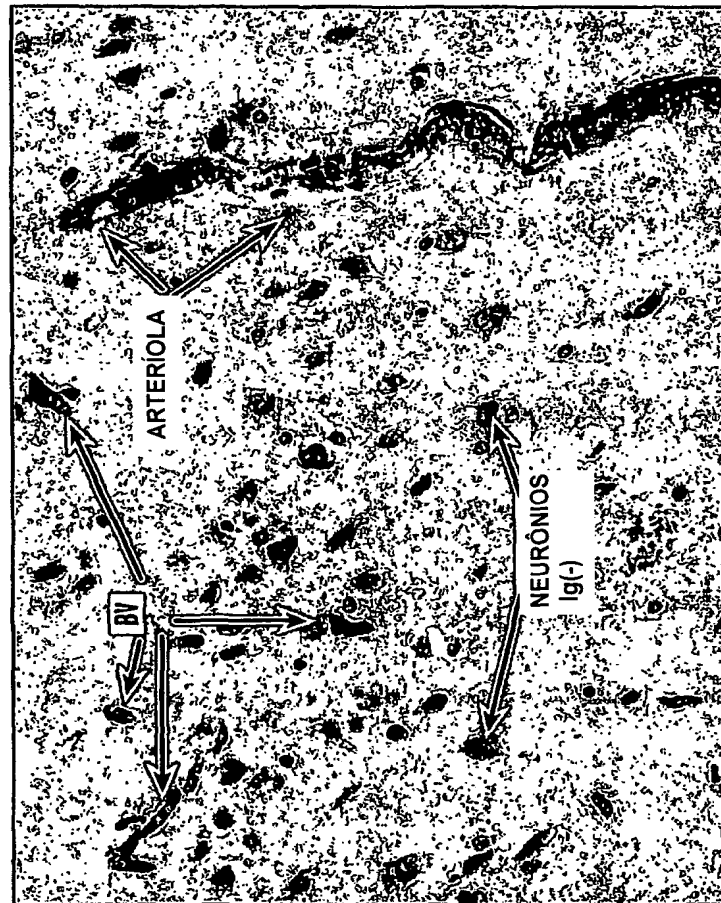
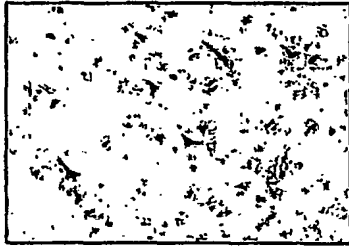
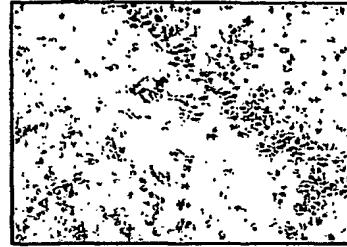


FIG. 6



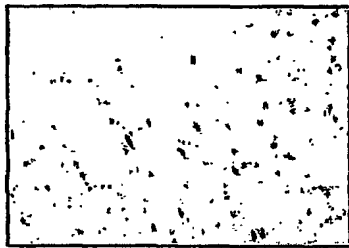
DM/HC

FIG. 7A



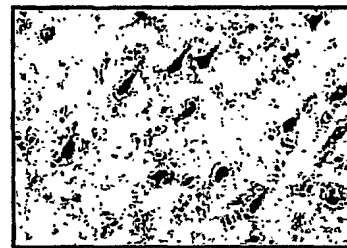
DM/HC

FIG. 7B



DM/HC

FIG. 7C



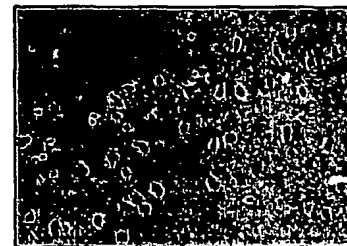
DM/HC

FIG. 7D



DM/HC

FIG. 7E



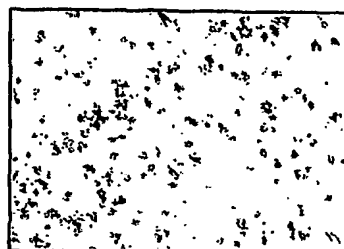
DM/HC

FIG. 7F



TRATADO

FIG. 7G



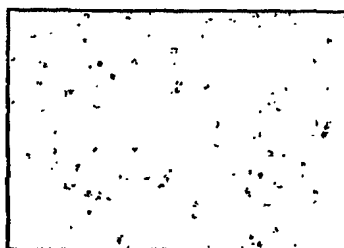
TRATADO

FIG. 7H



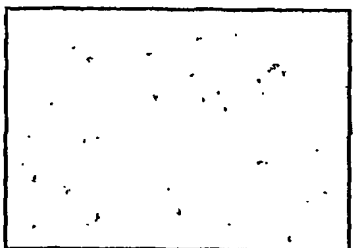
TRATADO

FIG. 7I



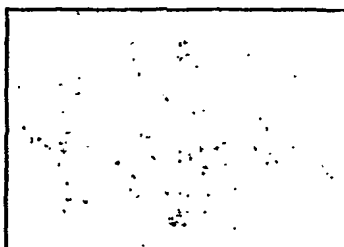
TRATADO

FIG. 7J



TRATADO

FIG. 7K



TRATADO

FIG. 7L

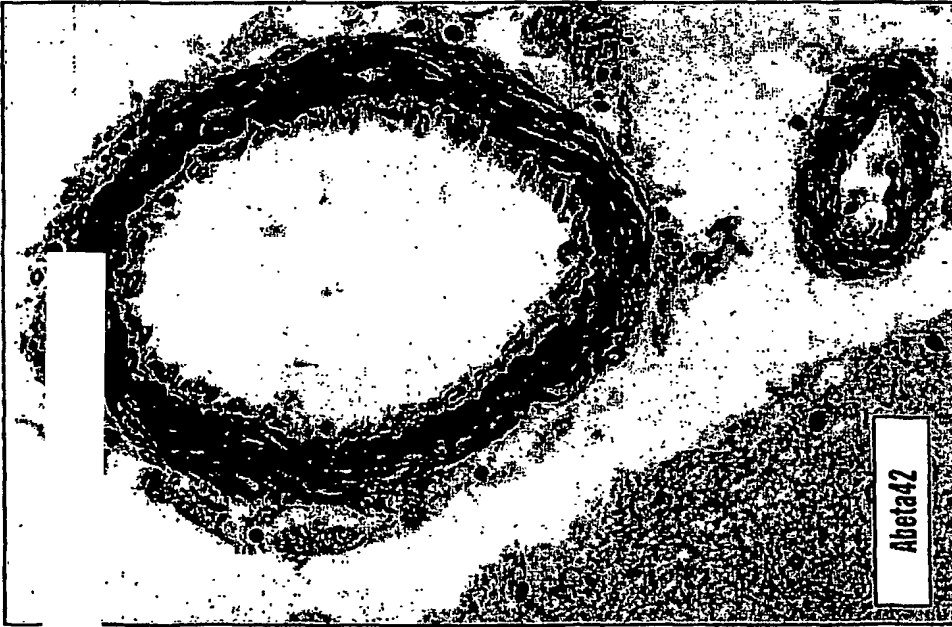


FIG. 8A

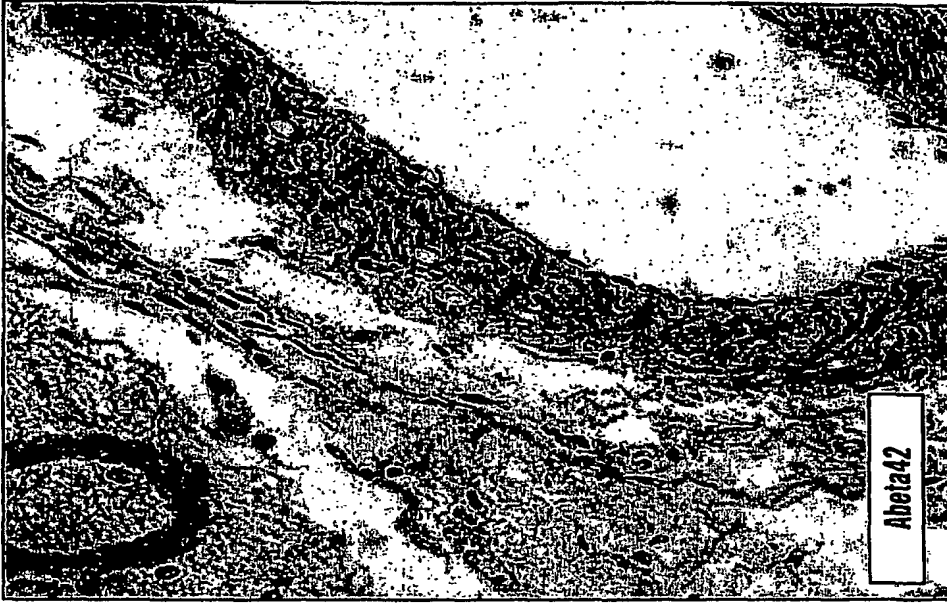


FIG. 8B



FIG. 9A

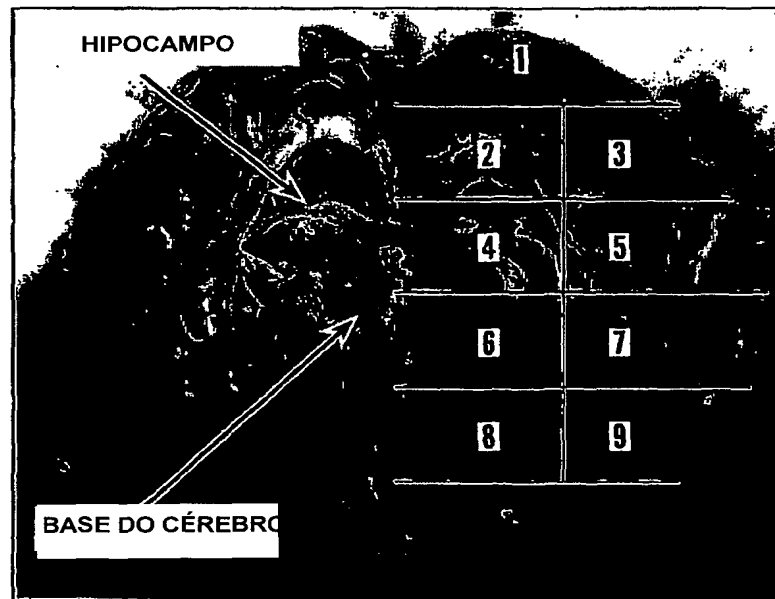


FIG. 9B

RESUMO

“MÉTODOS PARA TRATAR E/OU PREVENIR UMA DOENÇA OU
DISTÚRBIO NEURODEGENERATIVO EM UM INDIVÍDUO, PARA
TRATAR E/OU PREVENIR UM INDIVÍDUO COM OU EM RISCO DE
5 DEMÊNCIA VASCULAR, PARA TRATAR E/OU PREVENIR UMA
DOENÇA OU DISTÚRBIO ASSOCIADO COM UMA BARREIRA
HEMATOENCEFÁLICA ANORMAL EM UM INDIVÍDUO, PARA
DIMINUIR O ACÚMULO BETA AMILÓIDE NO CÉREBRO DE UM
INDIVÍDUO, PARA TRATAR E/OU PREVENIR MAL DE ALZHEIMER
10 EM UM INDIVÍDUO E PARA PREVENIR OU REDUZIR O RISCO DE
DESENVOLVER MAL DE ALZHEIMER, E, USO DE UM AGENTE QUE
INIBE A EXPRESSÃO E/OU ATIVIDADE DA PROTEÍNA Lp-PLA₂”

A presente invenção proporciona composições e métodos úteis
para tratar e prevenir doença neurodegenerativa e distúrbios relacionados
15 neurologicamente por meio da inibição de Lp-PLA₂. As composições e
métodos são úteis para tratar e prevenir doenças e distúrbios com função
anormal da barreira hematoencefálica ou BBB, por exemplo, doenças
neurodegenerativas com uma BBB permeável, como, embora sem limitação,
mal de Alzheimer, doença de doença de Huntington, mal de Parkinson e
20 demência vascular.