

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

(21) **PI0709446-9 A2**

(22) Data de Depósito: 30/03/2007
(43) Data da Publicação: 12/07/2011
(RPI 2114)



(51) Int.Cl.:

A61K 31/52 2006.01
A61K 45/06 2006.01
A61P 25/00 2006.01
A61P 25/08 2006.01
A61P 25/14 2006.01
A61P 25/16 2006.01
A61P 25/28 2006.01
A61P 7/04 2006.01
A61P 9/10 2006.01

(54) Título: **USO DO 6-(BENZILAMINO)-2 (s)- [[1-(IDROXIMETIL)PROPI]AMINO]-9-ISOPROPILPURINA)**

(30) Prioridade Unionista: 30/03/2006 FR 0602773

(73) Titular(es): NEUROKIN

(72) Inventor(es): BÉNÉDICTE MENN, Laurent Meijer , SERGE TIMSIT

(74) Procurador(es): Ana Paula Santos Celidonio

(86) Pedido Internacional: PCT FR2007000558 de 30/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/118984 de 25/10/2007

(57) Resumo: USO DO 6-(BENZILAMINO)-2(s)-[[1-(HIDROXIMETIL)PROPI]AMINO]-9-ISOPROPILPURINA)A presente invenção trata do uso de 6-(benzilamino)-2(S)- [[1 (hidroximetil) propil] amino]-9-isopropilpurina) ou, pelo menos, um dos seus sais farmacêuticamente aceitáveis para a fabricação de um medicamento destinado à prevenção e/ou ao tratamento de doenças neurológicas, particularmente associadas a lesões neurológicas.

“USO DO 6-(BENZILAMINO)-2(S)-[[1-(HIDROXIMETIL)PROPIL]AMINO]-9-ISOPROPILPURINA)”

A presente invenção está relacionada com o campo de tratamento e da prevenção de doenças neurológicas em particular associadas às lesões neurológicas ligadas, em particular, ao fenômeno de excitotoxicidade. Ela trata, muito particularmente, de uma nova aplicação terapêutica da (S)-roscovitina, cujo nome químico é 6(benzilamino)2(S)[[1(hidroxi metil)propil]amino]-9-isopropilpurina).

A excitotoxicidade corresponde a um acúmulo de ácidos aminados excitadores que ativam excessivamente os receptores de glutamato que conduzem a uma morte neuronal (Olney JW and Ishimaru MJ. 1999; Excitotoxic cell death. Cell death and diseases of the nervous system. Humana Press Inc: 197-219). Os ácidos aminados excitadores representam um grupo de análogos estruturais do glutamato que compreende numerosos membros, entre os quais o aspartato, o cainato e alguns de seus derivados conhecidos por representar potentes excitadores neuronais. O glutamato é incontestavelmente o ácido aminado excitador mais bem caracterizado. O efeito dos ácidos aminados excitadores é transmitido pelos receptores do glutamato metabotrópicos e ionotrópicos do tipo NMDA, AMPA e cainato.

A excitotoxicidade representa assim um papel importante no desenvolvimento de lesões neurológicas associadas a inúmeras doenças, em particular, agudas e crônicas. (Choi, 1988, Trends Neurosci, vol. 11, páginas 465-459; Coyle and Puttfarcken, 1993, Science, vol. 262, pages 689-695; Lipton and Rosenberg, 1994, New Engl J Med, vol. 330, pages 613-622).

Portanto, é de interesse identificar e caracterizar os compostos neuroprotetores que permitem prevenir e/ou tratar as lesões neurológicas, em particular, ligadas ao fenômeno de excitotoxicidade.

O uso do isômero R e da mistura racêmica da roscovitina no

tratamento de apoptose neuronal foi descrito anteriormente na patente europeia EP 0 874 847. Essa patente evidencia as propriedades antimitóticas da roscovitina e, em particular, sua ação inibidora sobre diferentes proteínas quinases ciclino-dependentes (cdk) implicadas no ciclo de divisão celular ou a apoptose. Baseados nesses resultados e apoiando-se nas relações conhecidas entre o ciclo de divisão celular e a apoptose (Vermeulen *et al.*, Cell Prolif. 2003 vol. 36(3), pages 131-49), os autores da presente patente sugeriram um efeito eventual da roscovitina sobre a apoptose neuronal.

Embora alguns compostos já sejam utilizados para tratar as lesões neurológicas, eles podem apresentar efeitos colaterais, como certa toxicidade ou uma eficácia insuficiente.

Persiste, então, a necessidade de encontrar compostos que apresentam propriedades melhoradas para tratar as lesões neurológicas.

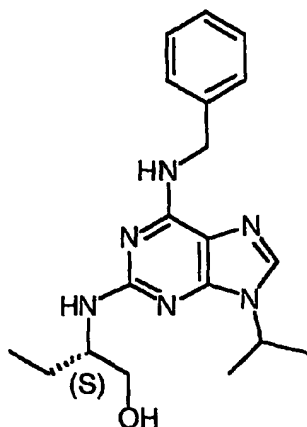
De modo surpreendente, os inventores descobriram que o isômero S da roscovitina permite resolver totalmente ou em parte os problemas evocados acima e apresenta uma eficácia neuroprotetora melhor do que a apresentada pelo isômero R. Assim, os inventores agora identificaram e caracterizaram um composto particular, a (S)-roscovitina que permite prevenir e/ou tratar eficazmente as lesões neurológicas particularmente ligadas ao fenômeno da excitotoxicidade.

Esse efeito neuroprotetor da (S)-roscovitina é particularmente inesperado. De fato, a (S)-roscovitina inibe mais fracamente diferentes proteínas quinases ciclino-dependentes (cdk) implicadas no ciclo de divisão celular ou apoptose do que a (R)-roscovitina. Em particular, a atividade inibidora da (S)-roscovitina sobre as proteínas quinases cdk-5, cdk-1/ciclino B e a cdc2/ciclino B, é menos elevada do que a da (R)-roscovitina (De Azevedo *et al.*, Eur. J. Biochem, 243, 518-526, 1997; Bach *et al.*, *The Journal of Biochemical Chemistry*, 280, 35, 31208-31219). Ora, essas proteínas

quinases, em particular a cdk-5 e a cdc2/ciclino B, são conhecidas por seu papel na morte neuronal (Dhavan and Tsai; Busser *et.al.*, 1998).

De acordo com um primeiro aspecto, a invenção tem por objeto a utilização da (S)-roscovitina ou 6-(benzil-amino)-2(S)-[[1-hidroximetil)propil]amino]-9-isopropilpurina) ou, pelo menos, um dos seus sais farmacêuticamente aceitáveis para a fabricação de um medicamento destinado à prevenção e/ou ao tratamento de doenças neurológicas.

Entende-se por "(S)-roscovitina" o composto com a seguinte fórmula:



6-(benzil-amino)-2(S)-[[1-hidroximetil)propil]amino]-9-isopropilpurina), em particular com um excesso enantiomérico superior ou igual a 90%, em particular, superior ou igual a 95%, mais particularmente superior ou igual a 99%, até mesmo superior ou igual a 99,5%.

O excesso enantiomérico pode ser definido pela fórmula (S)-roscovitina – (R)-roscovitina / (S)-roscovitina + (R)-roscovitina) x 100.

A (S)-roscovitina pode ser obtida de acordo com técnicas bem conhecidas do técnico no assunto, por exemplo, por uma síntese em três etapas a partir da 2,6-dicloropurina tal como descrita por Havlicek *et. al.* (J. Med. Chem, 1997, 40, 408) e por Wang *et al.* (Tetrahefron: Asymetry, 2001, 12, 2891).

A (S)-roscovitina está também disponível na Alexis Corporation,

com a referência ALX-350-293-M001.

Entende-se por “sais farmaceuticamente aceitáveis”, sais apropriados para uso farmacêutico. A título de exemplos de sais farmaceuticamente aceitáveis, podem ser citados o benzeno sulfonato, o bromidrato, o cloridrato, o citrato, o etano-sulfonato, o fumarato, o gluconato, o iodato, o isetionato, o maleato, o metano-sulfonato, o metileno-bis-oxinaftoato, o nitrato, o oxalato, o pamoato, o fosfato, o salicilato, o succinato, o sulfato, o tartarato, o teofilinacetato e o p-tolueno-sulfato.

Os sais farmaceuticamente aceitáveis da (S)-roscovitina podem ser obtidos por técnicas bem conhecidas do técnico no assunto.

Geralmente, entende-se por “doença neurológica”, doenças caracterizadas por “lesões neurológicas”. Entende-se por “lesões neurológicas” uma alteração estrutural do sistema nervoso em suas características anatômicas e fisiológicas. A lesão pode ser microscópica ou macroscópica. A lesão pode ser de origem traumática ou causada por uma doença, particularmente, pelas doenças neurológicas agudas ou crônicas. Essas lesões neurológicas podem afetar diferentes tipos celulares, os neurônios, os astrócitos, os oligodendrócitos, a micróglia e os progenitores dessas células.

Em certos casos, as lesões neurológicas estão ligadas ao fenômeno da excitotoxicidade.

Mais particularmente, a prevenção e/ou o tratamento das lesões neurológicas está ligado à atividade de neuroproteção da (S)-roscovitina.

Entende-se por “neuroproteção” a capacidade de um composto de prevenir a morte das células neurais saudáveis e/ou doentes. Entende-se por células neurais, as células do sistema nervoso e, em particular, do cérebro. As células neurais podem, em particular, ser escolhidas entre os neurônios, os astrócitos e os oligodendrócitos.

A neuroproteção é particularmente interessante no caso das

doenças neurológicas particularmente agudas ou crônicas. De fato, essas doenças podem ser associadas a uma degeneração das células neurais, conduzindo-as à morte. Isso pode, pois, tornar possível a utilização de compostos que permitem prevenir e/ou retardar a morte dessas células neurais ou de, pelo menos, uma parte dessas células neurais, saudáveis ou doentes.

Por exemplo, após um acidente vascular cerebral, certas células neurais morrem imediatamente, ou quase imediatamente, definindo uma zona chamada de "núcleo necrótico". Todavia, existe, também, uma zona chamada de "penumbra", nas proximidades do núcleo necrótico, na qual as células podem ser progressivamente afetadas antes de chegar à morte celular.

O uso de determinados agentes terapêuticos neuroprotetores pode permitir que se evite a evolução de pelo menos uma parte dessas células para uma morte neural.

De acordo com um modo de realização particular de uso de acordo com a presente invenção, as doenças neurológicas são doenças neurológicas crônicas.

Entende-se por "doenças neurológicas crônicas", doenças neurológicas cujos sintomas podem ser inicialmente pouco marcados, mas que, posteriormente, podem evoluir progressivamente e se agravarem, por exemplo, em vários anos.

Entre as doenças neurológicas crônicas, podem ser citadas:

- as doenças neurodegenerativas (Adams & Victor, Third edition; McGraw-Hill book company; 1985) que compreendem:
 - as doenças com síndrome extrapiramidal, particularmente a doença de Parkinson, a paralisia supranuclear progressiva (doenças de Steel-Richardson e Olzewski), a atrofia multissistematizada e a degeneração estriato-nígrica;
 - as demências, particularmente a doença de Alzheimer, as

demências vasculares, a doença por corpos de Lewy, as demências fronto-temporais, a degeneração córtico-basal, a coreia de Huntington, e

- as outras doenças neurodegenerativas, em particular, a esclerose lateral amiotrófica, a doença de Creutzfeldt-Jakob, (Choi, 1988;

5 Coyle and Puttfarcken, 1993; Lipton and Rosenberg, 1994);

- as doenças desmielinizantes, em particular, a esclerose múltipla, a encefalite alérgica aguda disseminada, a doença de Devic (neuromielopatia) e as doenças genéticas com lesão da mielina, em particular, a doença de Pelizaeus-Merzbacher.

10 De acordo com outro modo de realização particular, as doenças neurológicas são doenças neurológicas agudas, em particular o acidente vascular cerebral isquêmico.

Entende-se por “doenças neurológicas agudas”, doenças neurológicas cujos sintomas e sinais clínicos podem ser inicialmente muito
15 marcados e que podem se estabilizar rapidamente, por exemplo, depois de alguns dias.

As doenças neurológicas agudas compreendem:

- a epilepsia;

- o estado de mal epilético;

20 - o acidente vascular cerebral, em particular, isquêmico;

- as hemorragias cerebrais;

- as hipóxias cerebrais durante as paradas cardíacas;

- os traumatismos cranianos, e

- as doenças neurológicas que acarretam uma hipóxia cerebral
25 focal e/ou global, que ocorre, em particular, durante circulações extracorpóreas, particularmente, durante intervenções cardíacas e/ou vasculares e cirurgia das carótidas.

Entende-se por hemorragia cerebral as hemorragias

intraparenquimatosas e as hemorragias meníngeas. Após a hemorragia meníngea, pode ocorrer uma isquemia relacionada com o vasoespasmó. A (S)-roscovitina poderia prevenir ou diminuir a isquemia cerebral consecutiva a uma hemorragia meníngea.

5 Mais particularmente, determinadas hemorragias cerebrais podem estar ligadas ao uso de um agente trombolítico, em particular, o ativador tecidual de plasminogênio (t-PA). De fato, os agentes trombolíticos utilizados nas primeiras horas da ocorrência do acidente vascular cerebral isquêmico podem provocar hemorragias cerebrais. Essas hemorragias
10 cerebrais representam um efeito colateral importante da trombólise durante o acidente isquêmico. A (S)-roscovitina poderia, então, ser interessante em associação com um agente trombolítico para diminuir o risco de surgimento de uma hemorragia cerebral, protegendo a barreira hematoencefálica. A (S)-roscovitina poderia agir como agente antiapoptótico contra as células
15 endoteliais cerebrais. As células endoteliais cerebrais são um dos principais componentes da barreira hematoencefálica.

O medicamento de acordo com a presente invenção pode compreender, também, pelo menos um agente antineurodegenerativo, em particular um agente destinado a combater e/ou prevenir as doenças
20 neurológicas crônicas e/ou agudas e, mais particularmente, o acidente vascular cerebral isquêmico.

Entende-se por “agente antineurodegenerativo” um composto que permite combater e/ou prevenir a degeneração do sistema nervoso. A título de exemplos de agente antineurodegenerativo, podem ser citados os
25 inibidores da acetilcolinesterase como o donepezil, a selegina, a rivastigmina, a galantina, antiglutamatérgicos como a memantina e o riluzol. Assim, a (S)-roscovitina pode ser usada em associação com um medicamento anticolinesterásico (donepezil, rivastigmina, galantamina) ou antiglutamatérgico

(memantina) na doença de Alzheimer ou em outras demências, como a demência vascular, a doença por corpos de Lewy, as demências fronto-temporais, a degeneração córtico-basal, a coreia de Huntington, a demência parkinsoniana... A (S)-roscovitina poderia ser usada em associação com o riluzol na esclerose lateral amiotrófica.

A (S)-roscovitina e o agente antineurodegenerativo podem ser administrados simultaneamente, separadamente ou seqüencialmente.

A (S)-roscovitina e o agente antineurodegenerativo podem estar presentes no medicamento de acordo com a presente invenção de acordo com uma relação molar que varia de 10/1 a 1/10.

O medicamento de acordo com a presente invenção pode compreender, também, pelo menos um agente trombolítico.

Entende-se por "agente trombolítico" uma substância capaz de promover uma lise nos coágulos de sangue, tal como o ativador de tecido plasminogênico (t-PA), a estreptoquinase, a uroquinase e a desmoteplase.

A (S)-roscovitina e o agente trombolítico podem ser administrados simultaneamente, separadamente ou seqüencialmente.

A (S)-roscovitina e o agente trombolítico podem estar presentes no medicamento de acordo com a presente invenção de acordo com uma relação molar que varia de 100/1 a 1/100.

Os agentes trombolíticos podem apresentar efeitos colaterais; eles podem, por exemplo, causar hemorragias cerebrais. O uso de (S)-roscovitina em associação com pelo menos um agente trombolítico, particularmente o t-PA, pode permitir a diminuição de alguns desses efeitos colaterais e, em particular, o risco de hemorragia cerebral.

O medicamento de acordo com a presente invenção pode compreender, também, pelo menos um agente antiagregante plaquetário.

A título de exemplo de "agente antiagregante plaquetário" podem

ser citados o ácido acetilsalicílico, o cloridrato de ticlopidina, o clopidogrel, o dipiridamol, o abciximab, o flurbiprofeno.

A (S)-roscovitina pode ser utilizada em associação com um agente antiagregante plaquetário no acidente vascular cerebral isquêmico.

5 A (S)-roscovitina e o agente antiagregante plaquetário podem ser administrados simultaneamente, separadamente ou seqüencialmente.

A (S)-roscovitina e o antiagregante plaquetário podem estar presentes no medicamento de acordo com a presente invenção de acordo com uma relação molar que varia de 10/1 a 1/10.

10 Os referidos medicamentos de acordo com a presente invenção são administráveis por diferentes vias. A título de exemplos de vias de administração utilizáveis para os medicamentos de acordo com a presente invenção, podem ser citadas as vias oral, retal, cutânea, pulmonar, nasal, sublingual, a via parenteral, particularmente, intradérmica, subcutânea,
15 intramuscular, intravenosa, intra-arterial, intra-raquidiana, intra-articular, intrapleural, intraperitoneal.

Em particular, quando as doenças neurológicas são doenças neurológicas agudas, as vias de administração preferidas para os medicamentos de acordo com a presente invenção são as vias intravenosa,
20 intramuscular, sublingual, cutânea e, mais preferencialmente, a via intravenosa e a via intramuscular e de modo preferido entre todos, a via intravenosa.

Em particular, quando as doenças neurológicas são doenças neurológicas crônicas, a via de administração preferida para os medicamentos de acordo com a presente invenção é a via oral.

25 Os medicamentos de acordo com a presente invenção podem ser administrados em uma ou várias vezes ou em liberação contínua, em particular, em perfusão contínua.

Os medicamentos de acordo com a presente invenção podem

apresentar-se em diversas formas, em particular, em uma forma escolhida no grupo que compreende os comprimidos, as cápsulas, as drágeas, os xaropes, as suspensões, as soluções, os pós, os granulados, as emulsões, as micro-esferas e as soluções injetáveis, de preferência os comprimidos, as soluções
5 injetáveis, os sprays sublinguais e os adesivos cutâneos.

Essas diferentes formas podem ser obtidas por técnicas bem conhecidas pelo técnico no assunto.

As formulações apropriadas a uma administração por via parenteral, os veículos farmacologicamente aceitáveis apropriados para essa
10 via de administração e as técnicas de formulação e de administração correspondentes podem ser realizados de acordo com os métodos bem conhecidos pelo técnico no assunto, em particular os descritos no manual Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 20^a edição, 2000).

15 De acordo com outro modo de realização particular, o 6-(benzilamino)-2(S)-[[1-hidroximetil]propil]amino]9-isopropilpurina) ou pelo menos um dos seus sais farmacologicamente aceitáveis está presente no medicamento em uma quantidade que varia de 50 mg a 5 g por unidade de dose, em particular de 100 mg a 2 g.

20 O medicamento de acordo com a presente invenção pode ser administrado em uma ou várias doses por dia, de preferência de 1 a 4 doses por dia.

Vantajosamente, a (S)-roscovitina pode ser administrada em uma quantidade que varia de 1 a 200 mg/kg por dia.

25 Vantajosamente, o medicamento compreende uma quantidade de 6-(benzilamino)-2(S)-[[1-hidroximetil]propil]amino]9-isopropilpurina) ou de pelo menos um dos seus sais farmacologicamente aceitáveis que varia de 50 mg a 5 g.

De acordo com outro modo de realização particular do referido uso de acordo com a presente invenção, o referido medicamento compreende, também, um suporte farmacêuticamente aceitável.

Entende-se por “suporte farmacêuticamente aceitável” qualquer
5 matéria que seja apropriada a um uso em um produto farmacêutico.

A título de exemplos de suportes farmacêuticamente aceitáveis, podem ser citados: a lactose, o amido, eventualmente modificado, a celulose, a hidroxipropil-celulose, a hidroxipropilmetil-celulose, o manitol, o sorbitol, o xilitol, a dextrose, o sulfato de cálcio, o fosfato de cálcio, o lactato de cálcio, os
10 dextratos, o inositol, o carbonato de cálcio, a glicina, a bentonita, a polivinilpirrolidona e suas misturas.

O medicamento de acordo com a presente invenção pode compreender um teor de suporte farmacêuticamente aceitável que varia de 5 a 99% em peso, especialmente, de 10 a 90% em peso e, em particular, de 20 a
15 75% em peso, em relação ao peso total da composição.

Outras vantagens e características da presente invenção poderão ser vistas nas figuras e nos exemplos que se seguem.

As figuras e os exemplos que se seguem são dados a título ilustrativo e não limitativo.

20 A Figura 1 ilustra, em forma de histograma, o efeito neuroprotetor da (S)-roscovitina em um modelo *in vitro* de excitotoxicidade: uma cultura neural mista (astrócitos, neurônios, oligodendrócitos) de células do hipocampo exposta ao cainato. (** $p < 0,05$; * $p < 0,01$ pelo teste T de Student).

- A Figura 2 ilustra, em forma de um gráfico, a concentração de
25 neuroproteção (CN50) da (S)-roscovitina em uma cultura neural mista de células do hipocampo exposta ao cainato.

- A Figura 3 ilustra, em forma de um histograma, o efeito da (S)-roscovitina em diferentes tempos de incubação sobre uma cultura mista de

células do hipocampo exposta ao cainato. (** $p < 0,05$; * $p < 0,01$ pelo teste T de Student).

A Figura 4 (A e B) ilustra o efeito neuroprotetor da (S)-roscovitina em um modelo *in vitro* complexo de excitotoxicidade: uma cultura de fatias organotípicas do hipocampo de rato. (A) Observação da morte celular na região CA3 do hipocampo de rato, após marcação com iodeto de propídio e incubação, seja com DMSO e H₂O (controle), seja com cainato, seja com cainato e (S)-roscovitina. (B) Representação em forma de histograma da morte neural relativa (MNR) na região CA3 do hipocampo de rato, após marcação com iodeto de propídio e incubação seja com DMSO e H₂O (controle), seja com cainato, seja com cainato e (S)-roscovitina. (* $p < 0,01$ pelo teste T de Student).

- A Figura 5 (A e B) ilustra a caracterização das regiões de “núcleo necrótico” e de “zona de penumbra” em cérebros de camundongos em um modelo *in vivo* de isquemia focal permanente. (A) Fotografia de cortes coronais de um cérebro de camundongo adulto, corados com 2, 3, 5 cloreto de trifetil tetrazólio (TTC), 3 horas após MCAo. Três regiões coronais podem ser identificadas e delimitadas em função de sua intensidade de coloração: “o núcleo necrótico”, “a zona de penumbra” e o tecido sadio. (B) Medida, por meio do *software* ImageJ, das intensidades relativas de coloração do “núcleo necrótico”, da “zona de penumbra” e do tecido sadio corados com 2, 3, 5 TTC, três horas após MCAo. (* $p < 0,01$ pelo teste T de Student).

- A Figura 6 (A e B) ilustra, em forma de histograma, o efeito neuroprotetor da (S)-roscovitina em um modelo *in vivo* murino de isquemia focal permanente. A (S)-roscovitina foi administrada por via intracerebroventricular (IVC) (A) ou por via sistêmica (IP) (B). A morte celular foi avaliada pela medida das intensidades relativas de coloração no núcleo necrótico e da zona de penumbra. (* $p < 0,01$ pelo teste T de Student).

- A Figura 7 ilustra a comparação do índice de neuroproteção (IN) da (S)-roscovitina e da (R)-roscovitina em um modelo *in vitro* de excitotoxicidade: uma cultura neural mista de células do hipocampo exposta ao cainato.

5 - A Figura 8 ilustra a morte neuronal seletiva induzida pelo cainato a partir de culturas mistas de hipocampus:

(a-c): Células de hipocampo isoladas de embrião de rato E18 e cultivadas durante 10 e 15 dias foram caracterizadas por imunocitoquímica com anticorpos específicos de diferentes tipos celulares e registro "patch-clamp".

10 (a) Fotografia ao microscópio de contraste de fase de células mantidas em cultura durante 10 dias.

(b) Fotografia ao microscópio confocal de fluorescência de células mantidas em cultura durante 10 dias e marcadas com os anticorpos anti-GFAP (vermelho), anti-beta-tubulina de classe III (verde) e anti-04 (azul).
15 As culturas de hipocampus contêm, ao mesmo tempo, células neuronais e gliais.

(c) Traçado que mostra os registros em voltagem-clamp em uma configuração de célula inteira de neurônios mantidos em cultura durante 10 dias (traçado de cima) e 15 dias (traçado de baixo).
20

(d) Um modelo de excitotoxicidade neuronal foi desenvolvido por meio de culturas mistas de hipocampo de 10 dias submetido a um tratamento com cainato. Fotografia ao microscópio de fluorescência de culturas em condição controle (à esquerda) ou tratadas com 200 μ M de cainato (à direita) e imunomarcadas com o anticorpo anti-beta-tubulina de classe III (acima) ou pelo marcador de morte celular, o iodeto de propídio (PI, embaixo).
25 Notar a diminuição da densidade celular caracterizada pela beta-tubulina e o aumento de células marcadas pelo iodeto de propídio nas culturas tratadas com o

cainato em comparação com as culturas controles.

(e) Porcentagem relativa de células que expressam a beta-tubulina de classe III nas culturas controles ou tratadas com o cainato.

(f) Excitotoxicidade neuronal dose-dependente do cainato. Nas condições da presente invenção, o tratamento com 200 μ M de cainato durante 5 horas é necessário para obter-se, aproximadamente, 50% de morte neuronal ($p < 0,01$, teste T).

EXEMPLOS

I. ESTUDO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA (S)-ROSCOVITINA SOBRE A MORTE NEURONAL.

I.1. ESTUDO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA (S)-ROSCOVITINA SOBRE UM MODELO *IN VITRO* DE EXCITOTOXICIDADE: UMA CULTURA NEURAL MISTA DE CÉLULAS DO HIPOCAMPO.

Esse modelo corresponde a uma cultura mista de células neuronais e gliais extraídas do hipocampo de ratos com 18 dias embrionários (E18) e exposta ao cainato (KA), um análogo do glutamato. Esse sistema de cultura mista foi preferido a um sistema de cultura exclusiva de neurônios, a fim de melhor refletir o ambiente das células *in vivo*. Nessas condições de cultura, os astrócitos e os oligodendrócitos não foram afetados pelo tratamento com cainato. A figura 8 ilustra a morte neuronal que pôde assim ser observada em um modelo celular complexo de excitotoxicidade estritamente neuronal.

O cainato, um agonista glutamatérgico foi escolhido *in vitro* como agente excitotóxico nas presentes experimentações. Essa escolha foi fundamentada, entre outros, nos estudos *in vivo* que mostraram que o cainato induz uma morte celular programada em comparação com aos agonistas NMDA que induzem uma morte do tipo necrótico (Portera-Cailliau; 1997). Essa morte programada é também visível nas doenças neurológicas agudas e crônicas. A importância e a relevância do glutamato foram recentemente

sublinhadas pelo fato de esses medicamentos antiglutamatérgicos comercializados serem atualmente utilizados no Homem, na doença de Alzheimer (memantina, Reisberg 2003; N. Eng. J. Med; 348:1333-1341) e na esclerose lateral amiotrófica (Riluzol).

5

I.1.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Culturas de células de hipocampo foram preparadas a partir de ratos Wistar com 18 dias embrionários (E18), tal como descrito por Medina *et al.* (1994, *J. Neurophysiol.*, 72, 456-465). Após 10 dias de cultura *in vitro*, as células foram incubadas em presença de cainato e/ou de (S)-roscovitina. As

10 culturas foram expostas durante 5 horas a uma concentração de 200 μ M de cainato. Essas condições permitem obter a morte de 40% a 50% dos neurônios em cultura. A (S)-roscovitina foi testada em cinco concentrações diferentes (0, 05 μ M; 0,1 μ M; 0,5 μ M; 1 μ M e 5 μ M), sozinha ou em combinação com o cainato. A (S)-roscovitina foi adicionada às células em

15 cultura, tanto simultaneamente com o cainato, como em diferentes tempos antes (1 hora) ou depois (1, 2 ou 3 horas) da adição do cainato.

As células em cultura foram incubadas durante 5 horas com o cainato e/ou com os compostos a serem testados antes da observação da morte neuronal. As testemunhas foram incubadas unicamente com os veículos

20 DMSO e H₂O.

A morte neuronal foi avaliada por observação ao microscópio de contraste de fase e pelo uso do iodeto de propídio (IP) que é um marcador de morte celular. O iodeto de propídio é um marcador vermelho, que se liga especificamente com os ácidos nucleicos das células mortas. Os neurônios de

25 campos representativos foram contados. Pelo menos 5 campos por condição (o número total de neurônios era, aproximadamente, 150) foram examinados a partir de 3 culturas independentes.

Para cada condição experimental, a porcentagem de morte

neuronal foi expressa pela relação entre o número de neurônios marcados com iodeto de propídio e o número total de neurônios visualizados por microscopia de contraste de fase.

A fim de determinar o efeito neuroprotetor dos compostos testados, a morte neuronal relativa (MNR) foi calculada e o índice de neuroproteção (IN) foi definido como a seguir:

$$\text{MNR} = \% \text{ de morte neuronal (KA + compostos a serem testados)} - \% \text{ de morte neuronal (testemunha)} / \% \text{ de morte neuronal (KA)} - \% \text{ de morte neuronal (testemunha)}$$
 e

$$\text{IN} = 100\% - \text{MNR}.$$

Por definição, a porcentagem de morte neuronal relativa (MNR) nas células tratadas com apenas o cainato era de 100% e o índice de neuroproteção (IN) era de 0.

A concentração de compostos testados necessária para obter um índice de neuroproteção (IN) de 50% foi designada por CN50: concentração de neuroproteção.

I.1.2 RESULTADOS

I.1.2.1 EFEITO NEUROPROTETOR DA (S)-ROSCOVITINA

O efeito da (S)-roscovitina sobre a morte neuronal, apresentado na Figura 1, foi avaliado quando a (S)-roscovitina foi adicionada ao meio de cultura ao mesmo tempo que o cainato. Enquanto a porcentagem de morte neuronal (MNR) era de 100% no grupo tratado com o cainato, esta era de, respectivamente, 81,5%, 50,8%, 27,9%, 21,6% e 15,3% em presença de 0,05 μM , 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM e 5 μM de (S)-roscovitina.

O índice de neuroproteção (IN) tal como anteriormente definido era respectivamente de 18,5%, 49,2%, 72,18%, 78,4% e 84,7% para doses de (S)-roscovitina de 0,05 μM , 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM e 5 μM .

O efeito neuroprotetor da (S)-roscovitina é, portanto, dose-

dependente.

A concentração de neuroproteção tal como definida anteriormente foi determinada a 0,19 μM para a (S)-roscovitina (Figura 2).

I.1.2.2. DETERMINAÇÃO DA JANELA TERAPÊUTICA DO EFEITO NEUROPROTETOR DA

(S)-ROSCOVITINA

A janela terapêutica do efeito neuroprotetor da (S)-roscovitina, apresentada na figura 3, foi determinada medindo-se sua capacidade de proteger os neurônios quando o composto foi adicionado ao meio de cultura seja ao mesmo tempo, seja em diferentes tempos antes (1 hora, T-1) ou depois (1 hora, 2 horas ou 3 horas; T+1, T+2, T+3) da adição de cainato. Diferentes concentrações de (S)-roscovitina foram estudadas (0,5 μM , 1 μM e 5 μM). Enquanto a porcentagem de morte neuronal (MNR) era de 100% nos grupos tratados com o cainato em diferentes tempos testados, esta era de, respectivamente, 23,3%, -10,4%, -14,4% em T-1, 27,9%, 21,6%, 15,3% em T0, 64,9%, 30,7%, 19,5% em T+1, 66,4%, 44,8%, 14,7% em T+2 e de 71,0%, 71,78%, 65,3% em T+3, em presença de 0,5 μM , 1 μM e 5 μM de (S)-roscovitina.

O índice de neuroproteção (IN) tal como definido anteriormente era de, respectivamente, 76,6%, 110,4%, 114,4% em T-1, 72,1%, 78,4%, 84,7% em T0, 35,1%, 69,3%, 80,5% em T+1, 33,6%, 55,2%, 85,3% em T+2, e de 29,0%, 28,3%, 34,7% em T+3 para doses de (S)-roscovitina de 0,05 μM , 1 μM e 5 μM .

O efeito neuroprotetor da (S)-roscovitina é observado quando o composto é adicionado às culturas até 2 horas após o agente tóxico. Além disso, o efeito da (S)-roscovitina é dose-dependente. Por outro lado, a (S)-roscovitina tem um efeito preventivo sobre a morte neuronal induzida pelo cainato.

I.2 ESTUDO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA (S)-ROSCOVITINA EM UM MODELO IN

VITRO COMPLEXO DE EXCITOTOXICIDADE: UMA CULTURA ORGANOTÍPICA DE
HIPOCAMPO DE RATO.

As culturas organotípicas são explantes de órgãos colocados em culturas. Essas culturas têm a vantagem de associar o controle das condições *in vitro* com a complexidade do tecido que se aproxima do ambiente *in situ*. De fato, a arquitetura organotípica do tecido nervoso é mantida nessas culturas (Stoppini *et al.*, 1991, J Neurosci Methods, vol. 37, pages 173-182). As culturas espalham-se consideravelmente, mas permanecem tridimensionais e a morfologia típica dos neurônios piramidais é conservada. A organização sináptica e os percursos das fibras hipocâmpicas intrínsecas se desenvolvem de um modo similar à situação *in vivo*. Do mesmo modo, os processos de maturação e de formação de sinapses em cultura refletem aqueles descritos *in vivo* (Muller *et al.*, 1993, Dev Brain Res, vol. 71, pages 93-100; Buchs *et al.*, 1993, Dev Brain Res, vol. 71, pages 81-91).

I.2.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

As culturas organotípicas foram realizadas a partir de hipocampos de ratos com 2 dias de idade (P2), utilizando-se o método de Stoppini *et al.* (1991, J Neurosci Methods, vol. 37, pages 173-182). Os ratos são sacrificados por decapitação. O cérebro é dissecado em um meio de dissecação (PBS 1X, glicose 5,85 g/l) a 4 °C. Cortes transversais de 400 µm de espessura são realizados por meio de um "tissue chopper" (Mc Ilwain). Uma vez separadas, as fatias são colocadas em cultura sobre insertos com membranas porosas (0,4 µm) e transparentes (com 30 mm de diâmetro), em um meio de cultura (MEM 1X, 20% soro de cavalo, insulina 1 mg/l). A integralidade do meio de cultura é substituída a cada dois dias. As culturas são mantidas a 37 °C em uma incubadora em que a atmosfera é enriquecida com CO₂ (5%) e úmida.

Após 17 dias em cultura, o meio de cultura que contém o soro é

substituído pelo meio fresco, desprovido de soro, e em presença de iodeto de propídio (IP; 7,5 μ M). Vinte e quatro horas após a adição de IP, o meio é substituído pelo meio fresco, desprovido de soro, e que contém IP e cainato (5 μ M) e/ou (S)-roscovitina (20 μ M). As testemunhas foram incubadas
 5 unicamente com os veículos (DMSO e H₂O). As culturas são fixadas ao fim de 24 horas com uma solução de paraformaldeído a 4%.

A morte celular é quantificada com a ajuda do marcador de iodeto de propídio com o software ImageJ (NIH). A intensidade do PI é medida na região CA3 para cada condição de tratamento.

10 O efeito neuroprotetor é examinado, determinando-se a morte neuronal relativa como parâmetro (MNR), tal como definido no parágrafo anterior (I.1.1.).

I.2.2 RESULTADOS

A intensidade de fluorescência do PI é extremamente diminuída
 15 na região CA3 das culturas tratadas, ao mesmo tempo, com o cainato e a (S)-roscovitina, em relação àquelas tratadas unicamente com o cainato (Figura 4a). A morte celular induzida pelo cainato foi também quantificada por meio do *software* ImageJ. Nossos resultados mostraram que o MNR é de 30,7% em presença de KA/(S)-roscovitina, ao passo que ele é, arbitrariamente, de 100%
 20 em presença unicamente de KA (Figura 4b).

Esses resultados mostraram, por um lado, a ausência de efeito tóxico da (S)-roscovitina sobre as culturas organotípicas de hipocampo de rato e, por outro lado, o efeito neuroprotetor da (S)-roscovitina sobre a morte neuronal.

I.3. ESTUDO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA (S)-ROSCOVITINA SOBRE UM MODELO *IN VIVO* DE ISQUEMIA: UM MODELO DE ISQUEMIA FOCAL PERMANENTE NO CAMUNDONGO.

Esse modelo consiste na oclusão unilateral por eletrocoagulação

da artéria cerebral média do animal adulto (MCAo; método modificado de Tamura *et al.*, 1981, J Cereb Blood Flow Metab, vol. 1, pages 53-60). No camundongo, esse modelo acarreta uma lesão quase exclusiva do córtex têmporo-parietal do hemisfério ipsi-lateral. Essas lesões são visíveis a partir de 3 horas após MCAo e seu tamanho aumenta com o tempo para atingir um máximo em 24 horas (Guegan *et al.*, 1998, Exp Neurol, vol. 154, pages 371-380). Nesse estágio, a maioria das células localizadas nas regiões isquemiadas apresenta as características morfológicas e bioquímicas de células apoptóticas (Guegan *et al.*, 1998, Exp Neurol, vol. 154, pages 371-380; Guegan *et al.*, 1998, Mol Brain Res, vol. 55, pages 133-140).

I.3.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

As isquemias foram realizadas em camundongos C57b/6 com 6 dias de idade e pesando entre 20-25 g, de acordo com o protocolo modificado de Tamura *et al.* (1981, J Cereb Blood Flow Metab, vol. 1, pages 53-60) (Guegan *et al.*, 1998, Exp Neurol, vol. 154, pages 371-380). Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (500 mg/kg). A artéria cerebral média (ACM) foi cirurgicamente exposta e, a seguir, eletrocoagulada por meio de uma pinça bipolar. A temperatura corporal dos animais foi mantida a 37 °C durante toda a cirurgia. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 3 horas após a oclusão da ACM.

A (S)-roscovitina foi administrada de acordo com dois modos: intracerebroventricular e sistêmico. Por via intracerebroventricular (ICV), a (S)-roscovitina foi administrada à concentração de 500 µM em uma solução de Krebs's Ringer por meio de uma microbomba osmótica (Alzet) implantada, 48 horas antes da oclusão da MCA, no ventrículo lateral direito do animal, com as seguintes coordenadas estereotáticas: ântero-posterior = 0, lateral = -0,8, profundidade = 2 (em relação ao Bregma). Por via sistêmica, a (S)-roscovitina foi administrada à concentração de 25 mg/kg em uma solução de HCl 0,05 M,

realizando-se 2 injeções intraperitoneais 15 minutos antes e 1 hora após a oclusão da MCA. Os animais testemunhas receberam unicamente os veículos (DMSO 1% por via ICV e HCl 0,05 por via (IP).

O volume das lesões cerebrais foi estimado graças a uma coloração com 2, 3, 5 cloreto de trifênil tetrazólio (TTC). Essa coloração baseia-se no bom funcionamento das enzimas mitocondriais. A intensidade da coloração reflete o número de mitocôndrias funcionais. Essa coloração permite, assim, diferenciar as regiões lesadas das regiões sadias. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 3 horas após a oclusão da MCA.

Os cérebros foram dissecados e seccionados em fatias coronais de 1 mm de espessura. As fatias foram, a seguir, coradas com uma solução de 1% TTC durante 10 minutos e analisadas por meio do *software* NIH ImageJ. Três regiões puderam ser determinadas em 3 horas, baseadas na intensidade da coloração TTC: um núcleo necrótico incolor, uma zona de penumbra ligeiramente corada e um tecido sadio fortemente corado (Figura 5). Os volumes do núcleo necrótico, da zona de penumbra e da lesão total (núcleo + penumbra) foram assim determinados.

I.3.2 RESULTADOS

Os resultados são apresentados na Figura 6. A administração da (S)-roscovitina por via intracerebroventricular (ICV) provocou uma redução de 27,7% do volume total da lesão, 3 horas após a oclusão da MCA, em relação ao controle (18,74 mm³ para o grupo controle e 13,54 mm³ para o grupo que recebeu a (S)-roscovitina). Embora o volume do núcleo necrótico tenha se mantido inalterado entre os 2 grupos (6,06 mm³ no grupo controle e 5,39 mm³ no grupo que recebeu a (S)-roscovitina), uma grande redução (35,8%) do tamanho da zona de penumbra foi observada no grupo que recebeu a (S)-roscovitina, em relação ao grupo controle (12,68 mm³ no grupo controle e 8,14 mm³ no grupo que recebeu a (S)-roscovitina) (Figura 6A).

A administração da (S)-roscovitina por via sistêmica (IP) causou uma redução de 30,7% do volume total da lesão 3 horas após a oclusão da MCA, em relação ao controle (20,34 mm³ no grupo controle e 14,10 mm³ no grupo que recebeu a (S)-roscovitina). Embora o volume do núcleo necrótico tenha permanecido inalterado entre os dois grupos (5,03 mm³ no grupo controle e 4,88 mm³ no grupo que recebeu a (S)-roscovitina), uma grande redução (38,9%) do tamanho da penumbra foi observada no grupo que recebeu a (S)-roscovitina, em relação ao grupo controle (15,31 mm³ no grupo controle e 9,22 mm³ no grupo que recebeu a (S)-roscovitina) (Figura 6B).

Esses resultados mostraram que a (S)-roscovitina possui um efeito neuroprotetor sobre o volume da lesão em um modelo severo de isquemia focal permanente no camundongo. A (S)-roscovitina age sobre o volume da zona de penumbra e não sobre o núcleo necrótico da lesão. Por outro lado, esses resultados mostram que a (S)-roscovitina é eficaz após uma administração sistêmica do composto, o que sugere que a (S)-roscovitina é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica.

II COMPARAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA (S)-ROSCOVITINA E DA (R)-ROSCOVITINA

O efeito da (S)-roscovitina sobre a morte neuronal foi comparado com o da (R)-roscovitina no sistema de estudo *in vitro* tal como definido anteriormente em I.1.

A porcentagem de morte neuronal (MNR) em presença da (R)-roscovitina é apresentada na Figura 7.

A (S)-roscovitina a uma concentração de 0,5 µM permite obter um MNR de 27,9% ao passo que uma concentração de 0,5 µM de (R)-roscovitina permite obter um MNR de 62%. Assim, nessas condições, a (S)-roscovitina permite prevenir a morte de duas vezes mais neurônios do que a (R)-roscovitina.

A concentração de neuroproteção (CN50) da (R)-roscovitina é de 0,65 μM , enquanto ela é de 0,19 μM para a (S)-roscovitina. Então, é preciso três vezes mais (R)-roscovitina do que (S)-roscovitina para prevenir a morte de um mesmo número de neurônios.

- 5 Essas experiências mostram bem que o efeito neuroprotetor da (S)-roscovitina é maior do que o da (R)-roscovitina.

REIVINDICAÇÕES

1. USO DO 6-(BENZILAMINO)-2(S)-[[1-(HIDROXIMETIL)PROPIL]AMINO]-9-ISOPROPILPURINA), ou pelo menos um dos seus sais farmacêuticamente aceitáveis para a fabricação de um medicamento destinado à prevenção e/ou ao tratamento de doenças neurológicas.

2. USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de as referidas lesões neurológicas estarem ligadas ao fenômeno de excitotoxicidade.

3. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de as referidas doenças neurológicas serem doenças neurológicas crônicas ou agudas.

4. USO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de as referidas doenças neurológicas crônicas serem escolhidas no grupo constituído por:

- as doenças neurodegenerativas que compreendem:

as doenças com síndrome extrapiramidal, em particular, a doença de Parkinson, a paralisia supranuclear progressiva (doenças de Steel-Richardson e Olzewski), a atrofia multissistematizada e a degeneração estriato-nígrica;

- as demências, em particular, a doença de Alzheimer, as demências vasculares, a doença por corpos de Lewy, as demências fronto-temporais, a degeneração córtico-basal, a coreia de Huntington e,

- as outras doenças neurodegenerativas, em particular, a esclerose lateral amiotrófica, a doença de Creutzfeld-Jacob, e

- as doenças desmielinizantes, em particular, a esclerose múltipla, a encefalite alérgica aguda disseminada, a doença de Devic e as

doenças genéticas com ataque à mielina, em particular, a doença de Pelizaeus-Merzbacher.

5. USO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de as referidas doenças neurológicas agudas serem escolhidas no grupo constituído por:

- a epilepsia;
- o estado de mal epilético;
- o acidente vascular cerebral, em particular, isquêmico;
- as hemorragias cerebrais;
- as hipóxias cerebrais durante as paradas cardíacas;
- os traumatismos cranianos, e
- as doenças neurológicas que acarretam uma hipóxia cerebral

focal e/ou global, que advém, em particular, durante circulações extracorpóreas, particularmente, durante intervenções cardíacas e/ou vasculares e cirurgia das carótidas.

6. USO, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de as hemorragias cerebrais estarem ligadas ao uso de um agente trombolítico, em particular, o ativador tecidual do plasminogênio.

7. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de o referido medicamento compreender, também, pelo menos um agente antineurodegenerativo escolhido no grupo que compreende o donepezil, a selegilina, a rivastigmina, a galantamina, a memantina e o riluzol.

8. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de o referido medicamento compreender, também, pelo menos um agente trombolítico escolhido no grupo que compreende o ativador de tecido plasminogênico, a estreptoquinase, a uroquinase e a desmoteplase.

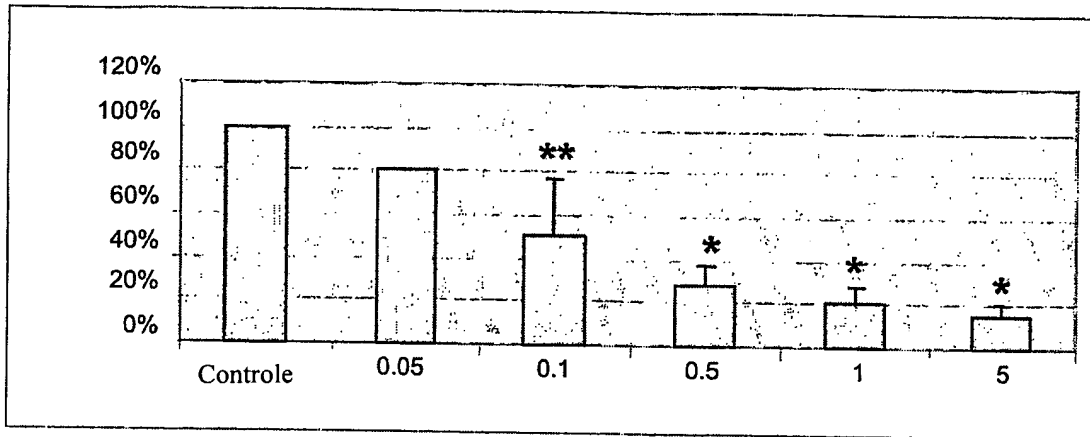
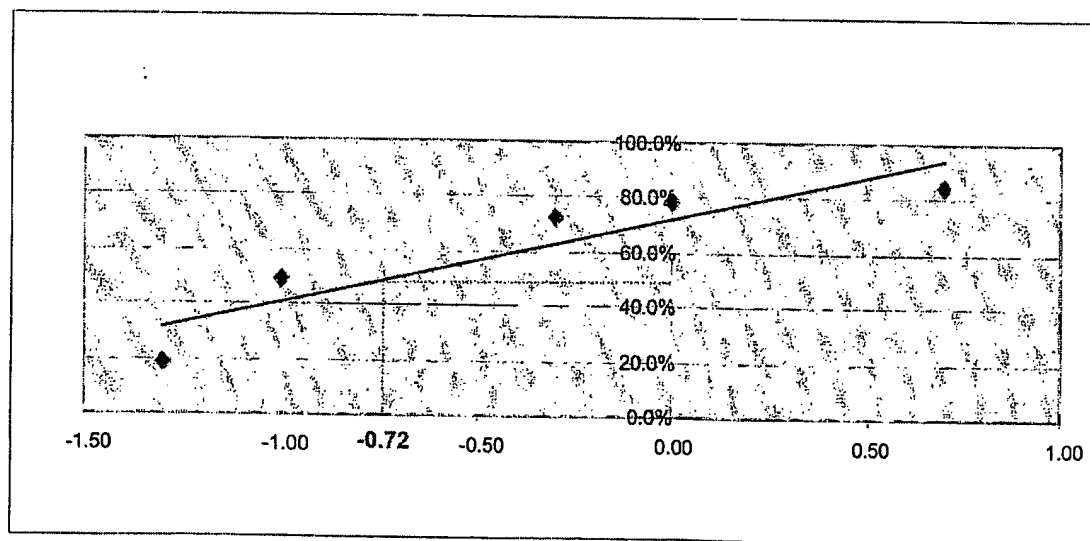
9. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de o referido medicamento compreender, também, pelo menos um agente antiagregante plaquetário escolhido no grupo que compreende a aspirina, a ticlopidina, o clopidogrel, a persantina, o abciximab e o flurbiprofeno.

10. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de o referido medicamento ser administrável por via oral, retal, cutânea, pulmonar, nasal, sublingual, via parenteral, em particular, intradérmica, subcutânea, intramuscular, intravenosa, intra-arterial, intra-raquidiana, intra-articular, intrapleural, intraperitoneal.

11. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de o referido medicamento se apresentar em uma forma escolhida no grupo que compreende os comprimidos, as cápsulas, as drágeas, os xaropes, as suspensões, as soluções, os pós, os granulados, as emulsões, as micro-esferas, as soluções injetáveis, os sprays sublinguais e os adesivos cutâneos.

12. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de o referido 6-(benzilamino)-2(S)-[[1-(hidroximetil)propil]amino]-9-isopropilpurina) ou um dos seus sais farmacêuticamente aceitáveis estar presente no referido medicamento em uma quantidade que varia de 100 mg a 5 g por unidade de ingestão, de preferência, de 100 mg a 2 g.

13. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de o referido medicamento compreender, também, um suporte farmacêuticamente aceitável.

**Fig. 1****Fig. 2**

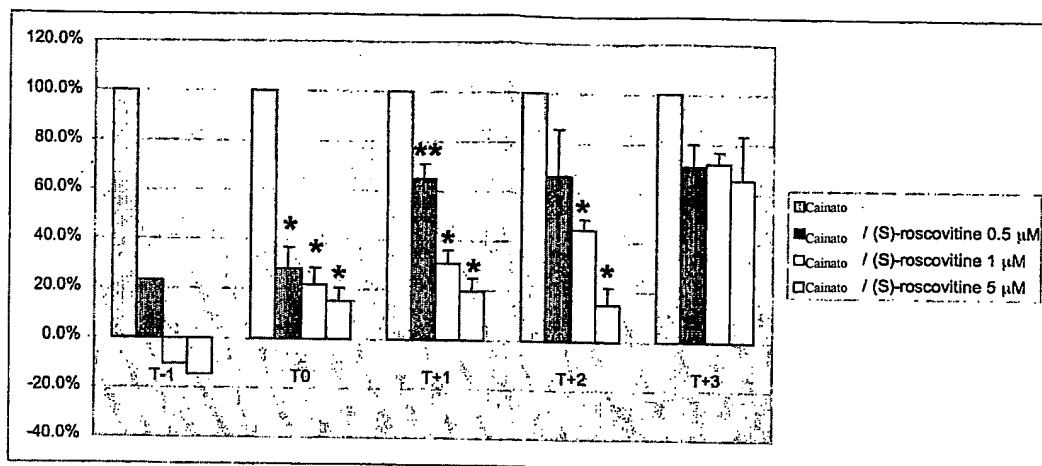


Fig. 3

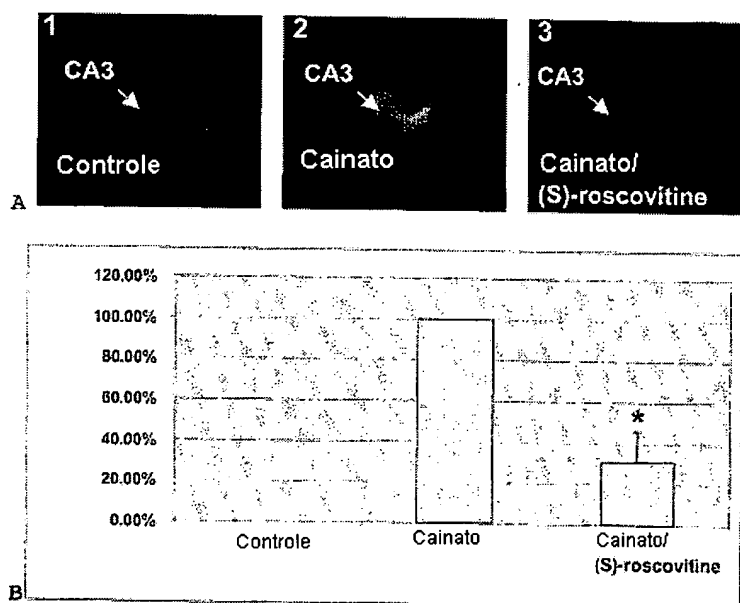
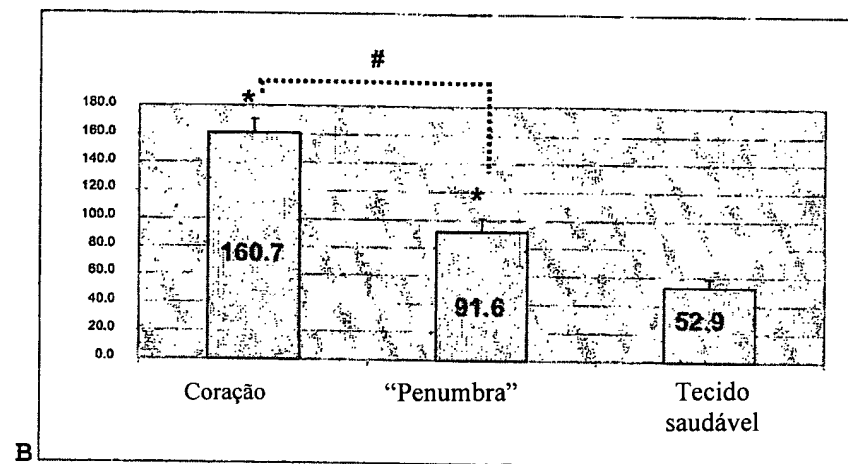
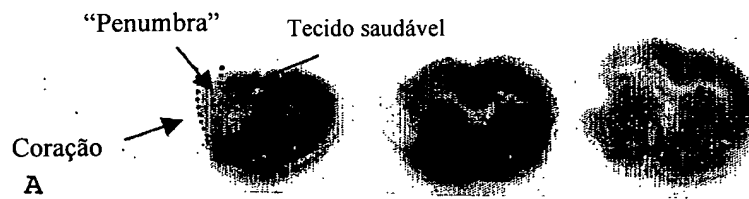
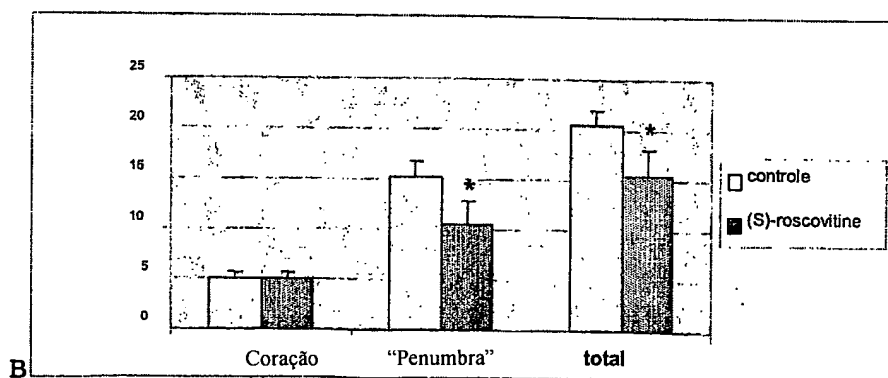
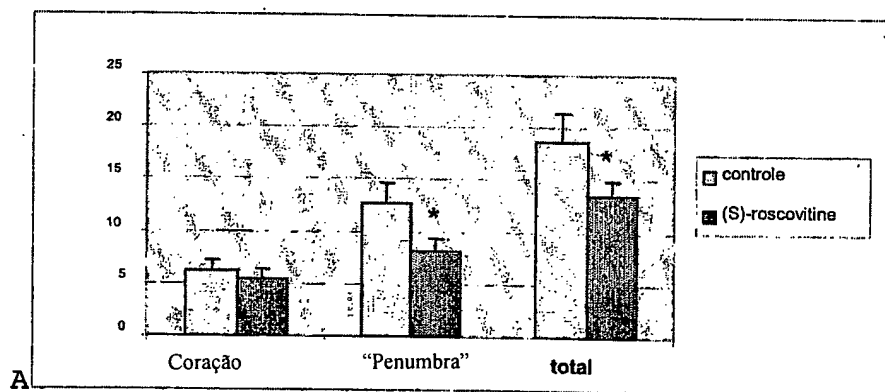
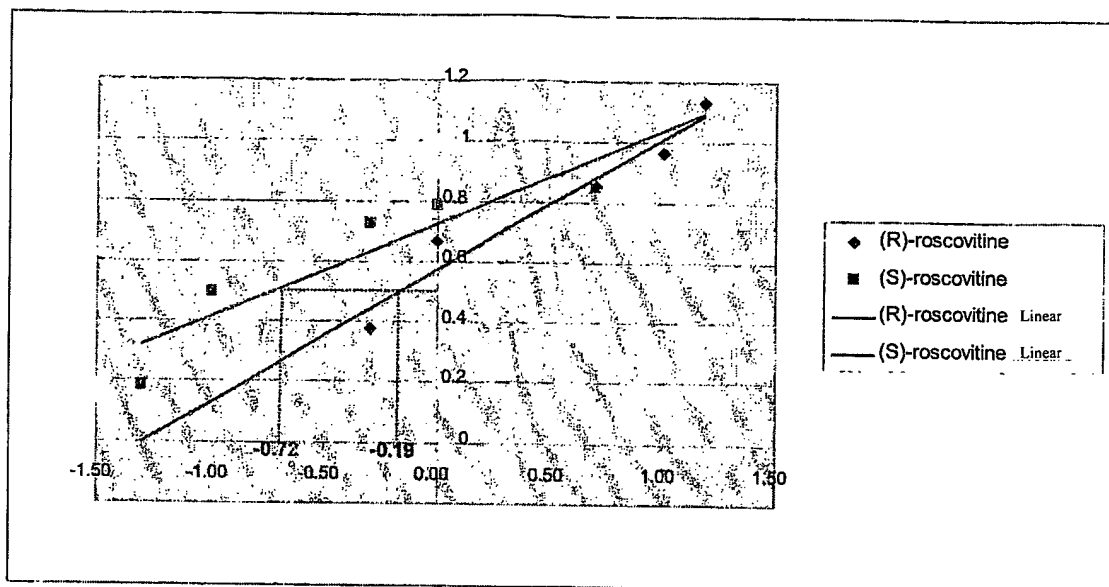
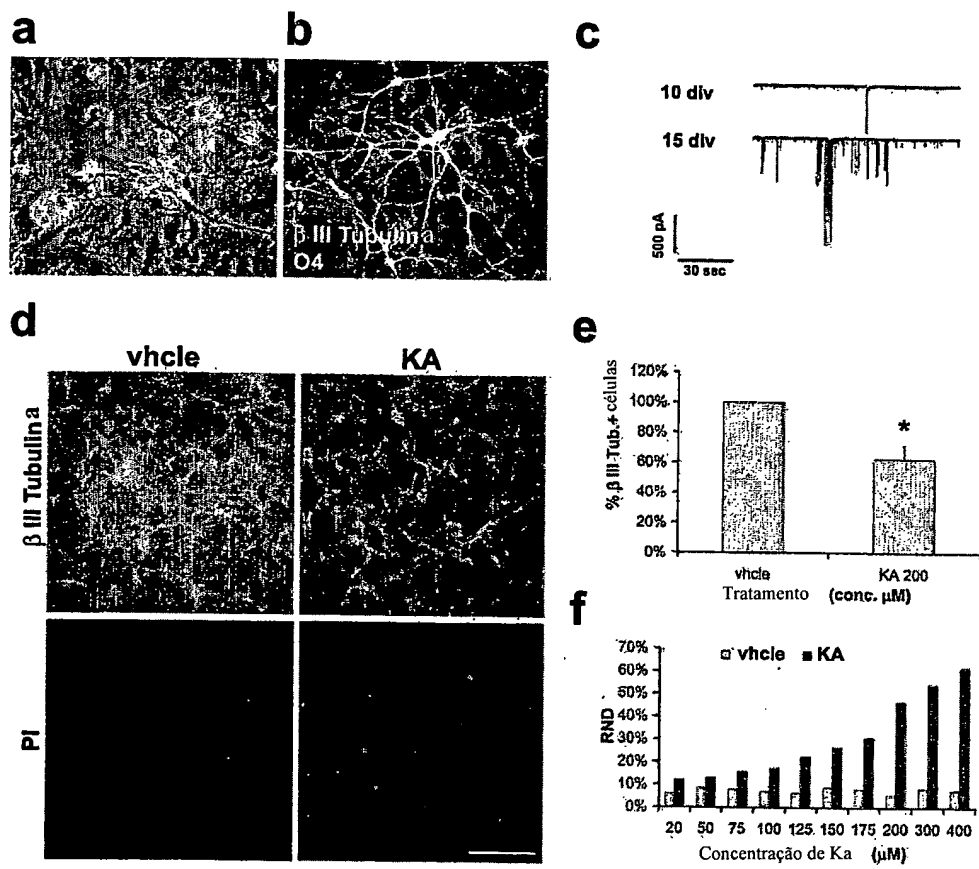


Fig. 4

**Fig. 5****Fig. 6**

**Fig. 7**

**Fig. 8**

RESUMO**“USO DO 6-(BENZILAMINO)-2(S)-[[1-(HIDROXIMETIL)PROPIL]AMINO]-9-ISOPROPILPURINA)”**

A presente invenção trata do uso de 6-(benzilamino)-2(S)-
5 [[1(hidroximetil) propil] amino]-9-isopropilpurina) ou, pelo menos, um dos seus
sais farmacêuticamente aceitáveis para a fabricação de um medicamento
destinado à prevenção e/ou ao tratamento de doenças neurológicas,
particularmente associadas a lesões neurológicas.