

Judite Raquel Martins Coimbra

## Alvos terapêuticos na Doença de Alzheimer - relevância da BACE 1 e o desenvolvimento de inibidores desta secretase

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Armanda Emanuela Castro Santos e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Judite Raquel Martins Coimbra

# Alvos terapêuticos na Doença de Alzheimer - relevância da BACE I e o desenvolvimento de inibidores desta secretase

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,  
orientada pela Professora Doutora Armanda Emanuela Castro Santos e apresentada à Faculdade de  
Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Judite Raquel Martins Coimbra, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011168377, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 1 de julho de 2016.

---

(Judite Raquel Martins Coimbra)

|                                                          |           |
|----------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ÍNDICE</b>                                            |           |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>                             | <b>2</b>  |
| <b>RESUMO E PALAVRAS-CHAVE</b>                           | <b>3</b>  |
| <b>ABSTRACT AND KEYWORDS</b>                             | <b>4</b>  |
| <b>INTRODUÇÃO</b>                                        | <b>5</b>  |
| <b>I DOENÇA DE ALZHEIMER</b>                             | <b>6</b>  |
| 1.1 EPIDEMIOLOGIA                                        | 6         |
| 1.2 FATORES DE RISCO                                     | 7         |
| 1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS                               | 7         |
| 1.4 DIAGNÓSTICO                                          | 8         |
| <b>2 MECANISMO FISIOPATOLÓGICO</b>                       | <b>9</b>  |
| 2.1 PATOLOGIA AMILÓIDE                                   | 9         |
| 2.2 PATOLOGIA TAU                                        | 10        |
| 2.3 BIOMARCADORES.                                       | 13        |
| <b>3 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO</b>                        | <b>14</b> |
| 3.1 TERAPÊUTICA FARMACOLÓGICA COLINÉRGICA                | 14        |
| 3.2 ANTAGONISTAS DOS RECETORES NMDA                      | 14        |
| <b>4 SECRETASES COMO ALVOS TERAPÊUTICOS</b>              | <b>15</b> |
| 4.1 BACE I                                               | 15        |
| 4.1.1 CARACTERÍSTICAS                                    | 15        |
| 4.1.2 SÍNTESE                                            | 16        |
| 4.1.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA                               | 17        |
| 4.2 POSSÍVEIS EFEITOS SECUNDÁRIOS DA INIBIÇÃO DA BACE I  | 18        |
| <b>5 DESIGN DE INIBIDORES DA BACE I</b>                  | <b>19</b> |
| 5.1 DESIGN DE INIBIDORES PEPTIDOMIMÉTICOS DA BACE I      | 20        |
| 5.2 DESIGN DE INIBIDORES NÃO PÉPTIDOS DA BACE I          | 21        |
| 5.3 PRODUTOS NATURAIS COM ATIVIDADE INIBITÓRIA DA BACE I | 21        |
| <b>6 DESENVOLVIMENTO CLÍNICO DE INIBIDORES DA BACE I</b> | <b>22</b> |
| 6.1 MK-8931                                              | 23        |
| 6.2 AZD3839                                              | 24        |
| 6.3 AZD3293                                              | 25        |
| 6.4 LY28113676 & LY2886721                               | 26        |
| 6.5 E2609                                                | 27        |
| <b>CONCLUSÃO</b>                                         | <b>29</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b>                                      | <b>30</b> |

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecimento especial à Professora Armanda Santos pela simpatia e disponibilidade com que me orientou na realização desta monografia.

Aos meus pais e irmã, pelo amor, apoio e carinho um sincero Muito Obrigado, sem vós nada disto teria sido possível!

Aos amigos, por toda a energia, paciência e preocupação.

A Coimbra, e tudo que ela significa.

A todos, muito obrigada,

Judite

## LISTA DE ABREVIATURAS

**A $\beta$**  -  $\beta$ -Amilóide

**ADAS-Cog** - *Alzheimer's Disease Assessment Scale – Cognitive*

**ADCS-ADL** - *The US National Institutes of Health's Alzheimer's Disease Cooperative Study Activities of Daily Living*

**DA** - Doença de Alzheimer

**ADME** - Absorção, Distribuição, Metabolização e Excreção

**APOE** - Apolipoproteína E

**APP** - Proteína Percursora Amilóide

**BACE I** - Enzima I de clivagem proteolítica da APP no sítio  $\beta$  ( $\beta$ -site *APP* *cleaving enzyme* I)

**BBB** - Barreira hematoencefálica

**CSF** - Fluido Cerebroespinal

**CDR-SB** - *Clinical Dementia Rating Scale-Sum of Boxes*

**FAD** - Forma familiar da Doença de Alzheimer

**FDG** - Fluorodesoxiglicose

**IMR** - Imagiologia de Ressonância Magnética

**MAD** - Dose múltipla ascendente

**MCI** - Défice Cognitivo Ligeiro

**MMSE** - *Mini-Mental State Examination*

**NMDA** - N-metil-D-aspartato

**NFTs** - Tranças neurofibrilares

**NRG-I** - *Neuregulin-1*

**P-gP** - Glicoproteína P

**PET** - Tomografia de Emissão de Positrões

**PS1** - Presenilina 1

**PS2** - Presenilina 2

**p-tau** - tau fosforilada

**RMN** - Ressonância Magnética Nuclear

**SAD** - Dose única ascendente

**sAPP $\beta$**  - Fragmento solúvel APP $\beta$

**sAPP $\alpha$**  - Fragmento solúvel APP $\alpha$

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**SPECT** - Tomografia Computorizada por emissão de fóton único

**t-tau** - tau total

## RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva e irreversível que apresenta duas lesões características: depósitos  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) e tranças neurofibrilares (NFTs). Clinicamente, a DA é caracterizada por perda progressiva e gradual de memória e de outras funções cognitivas. A hipótese globalmente aceita para a patogênese da DA baseia-se na teoria da cascata amilóide e subsequente patologia de tau, uma vez que a toxicidade amilóide induz a hiperfosforilação da proteína tau. A descoberta recente de biomarcadores pré-clínicos é importante para o diagnóstico da DA em fases precoces da doença. Ao longo dos anos as investigações para a cura da DA têm sido incessantes, contudo ainda não existem terapêuticas capazes de impedir a progressão da doença. A BACE I ( $\beta$ -secretase) é a enzima que inicia a produção de  $A\beta$ , e é apontada como um alvo terapêutico primordial no tratamento da DA. A inibição da BACE I apresenta consequências benéficas na diminuição das concentrações  $A\beta$ . Durante a última década o foco tem sido o desenvolvimento de inibidores com boas propriedades farmacológicas que inibam eficazmente a BACE I. Alguns inibidores mostraram-se eficazes nos estudos pré-clínicos e entraram recentemente em ensaios clínicos, sendo o MK-8931 o que se encontra em fase mais avançada. O potencial terapêutico da inibição de BACE I pode ser a chave para um tratamento eficaz da DA no futuro.

**Palavras-chave:** Doença de Alzheimer,  $\beta$ -amilóide, BACE I,  $\beta$ -secretase, inibidores.

## **ABSTRACT**

Alzheimer's Disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease and its hallmarks consist in amyloid- $\beta$  deposits ( $A\beta$ ) and neurofibrillary tangles (NFTs). Clinically, AD is characterized by progressive memory loss and other cognitive deficits. The globally accepted hypothesis to explain DA is based on the amyloid- $\beta$  cascade theory and subsequent tau pathology, since amyloid toxicity induces tau protein hyper-phosphorylation. The recent discovery of pre-clinical biomarkers can be used to diagnose AD at an early stage. Over the years, the research for AD cure has been relentless, however there are still no effective therapies available to prevent the advance of the disease. BACE I ( $\beta$ -secretase), the enzyme that leads to the production of  $A\beta$  in the brain, is considered to be a major therapeutic target in treating Alzheimer 's Disease. Inhibition of BACE I shows beneficial effects in lowering cerebral  $A\beta$  concentrations. During the last decade the focus has been in the development of inhibitors with drug-like properties that can effectively inhibit BACE I. Some BACE I inhibitors have shown safety and efficacy in preclinical studies, and have recently entered human clinical trials. Thus far, MK-8931 has advanced the farthest and is in phase 3. The therapeutic potential of inhibiting BACE I may be the key to an effective treatment of AD in the future.

**Keywords:** Alzheimer's disease, amyloid- $\beta$ , BACE I,  $\beta$ -secretase, inhibitors.



## INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer é uma desordem neurodegenerativa progressiva e irreversível, caracterizada por perda de memória e por um declínio cognitivo que afeta severamente as atividades diárias dos doentes. O processo da neurodegeneração, que parece ser dependente da idade, conduz a disfunção sináptica e danos neuronais no córtex cerebral e hipocampo, áreas essenciais para os processos cognitivos.<sup>1,2</sup>

A DA, que representa a forma mais comum de todas as demências presentes na população mundial, tem um impacto médico, social e económico notável, sendo um dos grandes desafios de saúde do Séc XXI.<sup>3,4</sup>

As características neuropatológicas da DA estão associadas à acumulação de agregados insolúveis de  $\beta$ -amilóide no espaço extracelular e a agregação da proteína tau em tranças neurofibrilares intracelulares.<sup>1,2</sup> A hipótese da cascata amilóide sugere que a acumulação de  $A\beta$  tem um papel central na patogénese da DA.<sup>2</sup>

As terapêuticas farmacológicas atuais para o tratamento da DA apenas atenuam os sintomas sem impedir a progressão da doença. A investigação de novos alvos terapêuticos procura prevenir a neurodegeneração nas fases precoces da doença anteriores à manifestação sintomática.<sup>5</sup>

Um exemplo de alvos terapêuticos muito estudados são as enzimas  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretase que medeiam a clivagem proteolítica da proteína precursora amilóide (APP). A inibição da  $\beta$ -secretase (BACE I) impede a formação de  $A\beta$ , sendo por isso apontada como um potencial alvo terapêutico no tratamento da DA.<sup>6</sup>

A epidemiologia, fatores de risco, manifestações clínicas, diagnóstico, mecanismo fisiopatológico e tratamento farmacológico são os aspetos abordados no presente trabalho sobre a Doença de Alzheimer. Compreende a apresentação da BACE I como alvo terapêutico no tratamento da DA, elucida a sua síntese celular, características e mecanismo de ação, assim como as estratégias adotadas para a descoberta e otimização de moléculas inibidoras e quais se encontram presentemente em ensaios clínicos.

O principal objetivo é demonstrar a evidência da intervenção da BACE I na patogénese da DA e de que forma a sua inibição pode ser benéfica na prevenção da progressão da Doença de Alzheimer.

## **I DOENÇA DE ALZHEIMER**

A Doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa em que as alterações e destruição do tecido nervoso são graduais e progressivas, iniciando-se a partir de um momento indeterminado da vida adulta.<sup>1</sup> A DA desenvolve-se ao longo de um período pré-clínico de duas décadas antes de se manifestar sintomaticamente. Na fase prodromal da DA já se notam algumas manifestações clínicas, como um déficit de memória mais severo do que se verifica no processo normal de envelhecimento associado à idade, contudo, as capacidades de conduzir uma vida normal permanecem inalteradas.<sup>2</sup>

Uma condição denominada de Déficit Cognitivo Ligeiro (MCI) é caracterizada por queixas de memória e deficiências leves de cognição, com condição geral intata, preservando as capacidades para desenvolver as atividades diárias e ausência de demência evidente. MCI não é forçosamente uma fase da doença de Alzheimer pois nalguns casos não se verifica posteriormente o desenvolvimento da doença de Alzheimer, embora a probabilidade seja maior.<sup>7</sup>

Consideram-se dois subgrupos da Doença de Alzheimer, a forma esporádica da doença, que é caracterizada por um aparecimento tardio (média 80 anos), e a forma Familiar da Doença de Alzheimer (FAD) ou formas genéticas autossômicas dominantes, caracterizadas por um aparecimento precoce (média 45 anos).<sup>2</sup> Na maioria dos casos estas formas de DA são bastante idênticas e os aspetos clínicos são comparáveis, assim como a taxa da progressão da doença.<sup>8</sup>

### **I.1 EPIDEMIOLOGIA**

A Doença de Alzheimer tem sido alvo de estudos epidemiológicos nos últimos 30 anos. Porém, a estimativa e análise da sua incidência, prevalência e fatores de risco é condicionada pela complexidade do seu diagnóstico e pelas co-morbilidades que causam défices cognitivos.<sup>2</sup>

A DA é a demência mais comum na população, representando 75% de todos os tipos de demência. Tem uma prevalência estimada de 10 a 30% na população acima de 65 anos, com uma incidência anual de 1 a 3%. À semelhança do que acontece em geral com outras demências a prevalência da DA duplica a cada 5 anos, após os 65 anos de idade.<sup>7</sup> A maioria dos pacientes com DA, 95%, têm a forma esporádica, e cerca de 1% têm inerentes mutações genéticas que conduzem ao aparecimento da doença da forma precoce, a FAD.<sup>2</sup>

A DA e outras demências não especificadas afetam os homens e as mulheres de igual forma, contudo, a prevalência é superior nas mulheres, uma vez que estas vivem mais tempo, em média, do que os homens. Não há relatos acerca de diferenças étnicas ou raciais.<sup>2,7</sup>

## **1.2 FATORES DE RISCO**

A idade é o maior fator de risco associado à Doença de Alzheimer. Com o aumento da esperança média de vida e do resultante incremento da população idosa, estima-se que 100 milhões de pessoas irão padecer da DA em 2050.<sup>9</sup>

Foram determinados outros potenciais fatores de risco, tais como: Diabetes *Mellitus*, hipertensão, obesidade, inatividade física, traumatismos cranianos, depressão, tabaco e baixa escolaridade.<sup>2,9</sup> A maioria dos fatores de risco estão associados às doenças cardiovasculares.<sup>2</sup>

Apesar da incerteza associada à existência de outros fatores de risco ambientais que contribuam para a DA de forma esporádica, destaca-se um fator de risco comum a todos os estudos: o polimorfismo associado ao gene que codifica para a apolipoproteína E – *APOE*, uma proteína envolvida no transporte lipídico.<sup>2</sup> Este gene, situado no cromossoma 19q13.2, possui três alelos, *APOE*  $\epsilon$ 2, *APOE*  $\epsilon$ 3 e *APOE*  $\epsilon$ 4. O alelo *APOE*  $\epsilon$ 4 parece ter um efeito major na determinação da idade do aparecimento da DA; *APOE*  $\epsilon$ 3 é considerado neutro na DA; e o *APOE*  $\epsilon$ 2 parece ter ação protetora.<sup>9</sup> O mecanismo pelo qual *APOE* afeta a DA ainda não está totalmente esclarecido, mas uma série de estudos indica que estas proteínas medeiam o *clearance* de  $A\beta$ , sendo que a *APOE*  $\epsilon$ 4 é muito menos eficaz que as outras formas.<sup>7, 9</sup> A presença do alelo *APOE*  $\epsilon$ 4 aumenta o risco de desenvolver a DA, porém, a presença deste alelo não implica que se desenvolva sempre a doença.<sup>2,7</sup>

## **1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS**

Geralmente, o doente é trazido à atenção do médico por uma pessoa de família, sem que ele próprio se mostre muito preocupado com o que se passa. Na realidade, o doente vai perdendo progressivamente capacidade de introspeção e crítica e vai negando ou minimizando as suas incapacidades.<sup>1</sup>

Os primeiros sinais são normalmente de falha de memória: o doente começa a ter cada vez mais dificuldades em recordar fatos recentes, embora se lembre, até com vivos detalhes, de eventos antigos. Primeiramente mostra dificuldade em evocar pormenores dos acontecimentos, com ajuda pode ir reconstruindo a recordação, mas sempre com alguma insegurança. Nesta fase a DA é caracterizada pela amnésia anterógrada, isto é, perda de memória para eventos que ocorrem posteriormente ao acontecimento da doença.<sup>1,7</sup>

Nas fases iniciais da doença é notável também uma desorientação por parte do doente, que pode perder-se na rua, em lugares onde não vai muito, ou até em sítios familiares. A linguagem altera-se pouco a pouco e o doente apresenta dificuldade na resolução de problemas, como por exemplo, em fazer cálculos. O arranjo pessoal reflete a despreocupação pelo vestir e pela higiene. As perturbações do humor e alterações da personalidade estão presentes na maior parte dos casos. É frequente que o doente mostre certo grau de ansiedade e insegurança, como se se apercebesse da sua incapacidade crescente. O humor torna-se geralmente pessimista, podendo a depressão instalar-se com gravidade. O doente pode ainda demonstrar uma apatia progressiva, desinteressando-se por tudo o que antes lhe interessava.<sup>1</sup>

Com a passagem do tempo as alterações cognitivas vão-se acentuando e acabam por impedir qualquer forma de autonomia pessoal, carecendo os doentes de cuidados permanentes de terceiros. O doente sofre de apraxia, ou seja, sente dificuldade em organizar atos motores intencionais. Apresenta igualmente agnosia, que consiste na dificuldade em interpretar informações sensoriais, levando à incapacidade de reconhecer objetos e os lugares, de identificar os sons e cheiros e de identificar corretamente as pessoas que o rodeiam. Além disto, a afasia acentua-se, ficando a linguagem restrita a poucas palavras.<sup>1,7</sup>

Na fase terminal da doença todas as capacidades de comunicação são perdidas e, com o avanço do processo demencial, a agitação diminui e a inércia aumenta. O doente raramente dá sinal que reconhece as pessoas, a alimentação torna-se difícil, a incontinência, se ainda não surgiu, instala-se agora. As complicações médicas aparecem ou acentuam-se: obstipação, infeções respiratórias ou urinárias. Por fim, deixa de reagir a estímulos e a vida torna-se praticamente vegetativa. O doente normalmente morre por doenças que atingem outros idosos debilitados, como sépsis, pneumonia e insuficiência cardíaca congestiva.<sup>1,7</sup>

A DA conduz à morte num período de tempo entre 8 a 10 anos após o diagnóstico.<sup>2</sup>

#### **1.4 DIAGNÓSTICO**

É importante distinguir as alterações cognitivas consideradas normais no envelhecimento daquelas que caracterizam um quadro demencial progressivo e incapacitante, como aquele que resulta da DA. Para tal é necessário fazer uma avaliação clínica correta da demência, que deve incluir a história clínica do doente, os exames físicos e neurológicos, testes de avaliação cognitiva e testes laboratoriais, incluindo técnicas de neuro-imagem.<sup>1</sup>

Alguns instrumentos clínicos podem ser usados para analisar os pacientes da DA. A maioria dos médicos utiliza testes breves de despiste cognitivo, como por exemplo o *Mini-Mental State Examination* - MMSE e o *Alzheimer's Disease Assessment Scale – Cognitive* – ADAS-Cog. Estes testes avaliam as funções cognitivas através de uma escala de pontuações.<sup>3,9</sup>

A imagiologia cerebral, que permite efetuar estudos da atividade funcional do cérebro, ajuda a compreender as funções cerebrais e a detetar as alterações que ocorrem em situações patológicas. A imagiologia de Ressonância Magnética (IMR) permite detetar a perda de tecido cerebral típica da DA. Por outro lado, a Tomografia de Emissão de Positrões (PET) e a Tomografia Computorizada por emissão de fóton único (SPECT) usam substâncias radioativas e medem a atividade metabólica das células cerebrais. O composto <sup>11</sup>C -PiB, molécula marcada com um isótopo radioativo do carbono, liga-se às placas  $\beta$ -amilóide permitindo o diagnóstico da DA através da PET.<sup>2</sup> O uso do radionuclídeo <sup>18</sup>F-FDG (Fluorodesoxiglicose) permite medir o consumo de glicose pelos neurónios e células da glia, observando-se hipometabolismo na DA. É possível ainda, através da PET, detetar a neuroinflamação (microgliose) verificada na DA.<sup>10</sup>

O conhecimento da função cerebral resulta da combinação de todas estas técnicas e ainda de estudos bioquímicos *in vivo*. Posteriormente, pode-se acrescentar os conhecimentos oriundos dos estudos *post mortem* de natureza bioquímica ou de análise histológica sendo este o único método que estabelece o diagnóstico definitivo da DA.<sup>1</sup>

## **2 MECANISMO FISIOPATOLÓGICO**

O mecanismo fisiopatológico da DA está associado à acumulação de formas insolúveis de placas  $\beta$ -amilóide no espaço extracelular e a agregação da proteína tau hiperfosforilada em tranças neurofibrilares intracelulares.<sup>1, 2</sup> Estas alterações conduzem a uma perda gradual da comunicação neuronal, disfunção sináptica, morte neuronal e atrofia cerebral, eventos que contribuem subsequentemente para o estado de demência.

### **2.1 PATOLOGIA AMILÓIDE**

Uma das principais teorias que tentam explicar a origem da DA é a hipótese da cascata amilóide. Esta teoria assume que um péptido denominado  $\beta$ -amilóide se acumula no cérebro formando placas, e desencadeia uma cascata de eventos - patologia de tau, disfunção sináptica, inflamação, morte neuronal, e por fim, a demência que caracteriza a DA.<sup>2, 9, 11</sup>

O péptido A $\beta$  é um produto normal do metabolismo da proteína precursora amilóide, gerado a níveis bastante elevados nos neurónios. É derivado da clivagem

proteolítica da APP por um complexo de enzimas denominadas de secretases -  $\beta$ -secretase e  $\gamma$ -secretase.<sup>2, 8, 12</sup>

Os péptidos A $\beta$  são monómeros constituídos por 36 a 43 aminoácidos e as placas amilóide são depósitos insolúveis de  $\beta$ -amilóide no parênquima cerebral. Se estas placas estiverem associadas a distrofia e degeneração neuronal são frequentemente denominadas placas neuríticas ou placas senis.<sup>9,12</sup> As placas senis são constituídas por agregados A $\beta$ , constituídos maioritariamente por 40 a 42 aminoácidos, que podem adotar numerosas conformações.<sup>1</sup>

APP é uma proteína transmembranar tipo I com um grande ectodomínio, contém 23 resíduos hidrofóbicos no domínio transmembranar e 47 resíduos no domínio citoplasmático. A região A $\beta$  constitui apenas uma pequena porção da APP, nomeadamente 28 resíduos do domínio extracelular mais os primeiros 12 a 14 resíduos do domínio transmembranar.<sup>8, 13</sup>

A deslocação de APP até à membrana celular ocorre através da via secretória do aparelho de Golgi e de endossomas. Durante esta deslocação a APP é sujeita a diferentes eventos proteolíticos, o que resulta na libertação de uma variedade de fragmentos solúveis e de fragmentos ligados à membrana. Estas clivagens proteolíticas são realizadas por enzimas denominadas de  $\alpha$ -secretase,  $\beta$ -secretase, e  $\gamma$ -secretase (Figura 1).<sup>8, 13</sup>

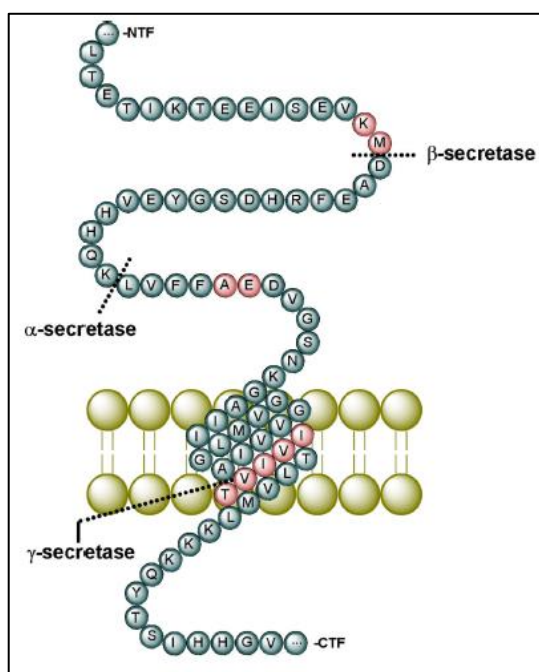


FIGURA 1 | Processamento proteolítico de APP pelas enzimas  $\alpha$ -secretase,  $\beta$ -secretase e  $\gamma$ -secretase.<sup>8</sup>

## 2.1.1 VIA NÃO-AMILOIDOGÉNICA

A  $\alpha$ -secretase cliva na região extracelular da APP, libertando um fragmento do ectodomínio solúvel denominado de sAPP $\alpha$  e originando um fragmento ligado à membrana C-terminal com 83 resíduos (C83). Esta clivagem ocorre entre os resíduos 16 e 17 da região do A $\beta$ . Desta forma, a clivagem realizada pela  $\alpha$ -secretase impede a formação de A $\beta$ , eliminando a possibilidade da formação de agregados e placas. Assim, a atividade de  $\alpha$ -secretase é considerada não-amiloidogénica (Figura 2a).<sup>8, 13</sup>

## 2.1.2 VIA AMILOIDOGÉNICA

A  $\beta$ -secretase ou BACE 1 (Enzima 1 de clivagem proteolítica da APP no sítio  $\beta$ ) cliva na região extracelular da APP, entre o resíduo de metionina 671 e o ácido aspártico 672 da APP, distando 16 resíduos da zona de corte da  $\alpha$ -secretase, o que resulta na formação de um fragmento do ectodomínio solúvel sAPP $\beta$  de tamanho menor mas de um fragmento C-terminal maior (C99). O primeiro resíduo do fragmento C99 é o primeiro resíduo de A $\beta$ . A atividade da  $\beta$ -secretase é por isso considerada de amiloidogénica (Figura 2b).<sup>8, 13</sup>

O processamento posterior dos fragmentos C-terminal, C83 e C99, ocorre por ação da  $\gamma$ -secretase, clivando o C-terminal da região A $\beta$ .<sup>6</sup> No caso do fragmento C83, a  $\gamma$ -secretase origina um péptido denominado de p3. No caso do fragmento C99, é originado A $\beta$ . Independentemente de se originar A $\beta$  ou p3, a clivagem ocorre na região transmembranar da APP, ou seja, esta clivagem ocorre na região dentro da membrana.<sup>8, 13</sup>

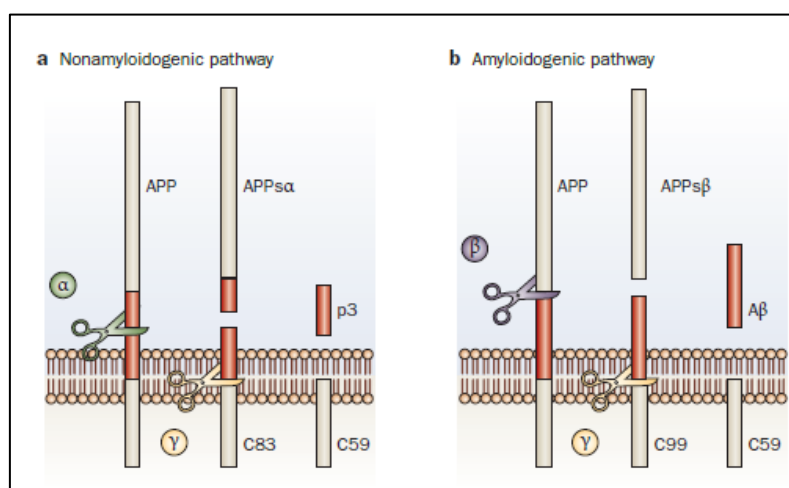


FIGURA 2 | Processamento proteolítico de APP - a) Via não amiloidogénica, b) Via amiloidogénica.<sup>13</sup>

A sequência proteolítica de clivagem de APP pela  $\beta$ -secretase e pela  $\gamma$ -secretase conduz à formação de A $\beta$  no cérebro.<sup>8</sup> Na DA ocorre um desequilíbrio gradual crónico

entre a produção e a remoção dos fragmentos de A $\beta$ , o que provoca um aumento dos seus níveis no cérebro que, com o decorrer do tempo, leva a alterações celulares e moleculares típicas da doença.<sup>12</sup>

As mutações genéticas da forma Familiar da DA são uma forte defesa da hipótese amiloidogénica.<sup>8</sup> Há três genes envolvidos na FAD que estão diretamente relacionados com a produção de A $\beta$ . O primeiro - é o gene que codifica para a APP, localizado no cromossoma 21q21.3. Algumas mutações presentes em APP, como é caso da mutação Sueca, aumentam a eficiência do processo proteolítico da BACE I, uma vez que tornam APP um substrato com mais afinidade, aumentando a produção de A $\beta$  cerca de 6 vezes mais do que no APP normal.<sup>8, 14</sup> Estão descritas dezoito mutações neste gene que levam a uma produção excessiva de A $\beta$ , associadas ao aparecimento precoce da doença.<sup>7</sup> Outra evidência da implicação do gene de APP na DA é o aparecimento do processo patológico da DA nos indivíduos portadores de Síndrome de Down (trissomia 21), que têm uma cópia extra do gene do APP em resultado da trissomia.<sup>2, 8, 14</sup>

Foi também identificada uma mutação em APP que leva a uma diminuição na afinidade para a BACE I, diminuindo a produção de A $\beta$ , apresentando efeito protetor contra a DA.<sup>15</sup>

Os outros dois genes associados são os genes que codificam para a presenilina 1 (PS1) e presenilina 2 (PS2) localizados nos cromossomas 14q24.3 e 1q31.42. As presenilinas constituem as subunidades catalíticas de  $\gamma$ -secretase, que estão envolvidas na clivagem de APP no local  $\gamma$ . Estas presenilinas mutadas, que apresentam atividade catalítica superior, levam à produção excessiva de A $\beta$  e estão associadas à forma precoce da DA.<sup>7</sup>

As mutações nos genes que codificam APP, PS1 e PS2 causam sobreprodução das formas aberrantes de A $\beta$  - especificamente a isoforma A $\beta$ 42, que apresenta características amiloidogénicas tóxicas, por ser mais propensa para agregação.<sup>2, 14</sup>

## 2.2 PATOLOGIA TAU

A proteína tau liga-se à tubulina e, em conjunto, estão envolvidas na associação e estabilização dos microtúbulos, componentes do citoesqueleto necessários ao transporte axonal e tráfego intracelular entre o corpo celular e as sinapses. As formações neurofibrilares, constituídas por agregados de tau hiperfosforilada, são indicativas de alterações graves no citoesqueleto, e estão presentes em grandes quantidades no cérebro e no fluido cérebroespinal (CSF) dos pacientes com a DA. Adicionalmente, as NFTs podem deslocar organelos celulares contribuindo para a desorganização celular. A patologia de tau está correlacionada com a perda neuronal e a atrofia cerebral verificada nas situações de



demência. Porém, o mecanismo que leva ao aumento e agregação da tau ainda não é conhecido.<sup>2,9</sup>

## 2.3 BIOMARCADORES

Devido à passagem de proteínas do parênquima cerebral para o CSF, é possível a detecção de biomarcadores que refletem os processos metabólicos do cérebro neste fluido.<sup>10</sup> Os marcadores fisiopatológicos da DA são aqueles que permitem identificar especificamente a patologia amilóide e a patologia de tau e podem ser detetados no CSF, plasma e através de imagiologia cerebral.<sup>5</sup>

A patologia amilóide deteta-se através da medição dos níveis de A $\beta$  (A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42) e a patologia de tau através dos níveis de t-tau (todas as isoformas), e de tau fosforilada, p-tau (fosforilada nos resíduos 181 ou 231).<sup>2,5</sup>

Outros marcadores da DA incluem as alterações de volume cerebral, nomeadamente atrofia do hipocampo, diminuição da espessura cortical e o aumento dos ventrículos, passíveis de detetar por IMR.

Estes biomarcadores podem ser usados para diagnosticar DA em fases precoces da doença e definir as fases pré-clínicas.<sup>5,10</sup> Através de estudos validados em indivíduos portadores de mutações autossómicas dominantes da DA foi possível detetar alterações dos níveis de tau no CSF até 15 anos antes da fase clínica e dos níveis de A $\beta$ 42 no CSF até 20 anos antes do aparecimento de sintomas (Figura 3).<sup>5</sup>

Os estudos das fases pré-clínicas da DA, com recurso à análise dos níveis dos biomarcadores, são importantes para a prevenção do aparecimento e da progressão da doença (caso se consiga descobrir um fármaco com capacidades para alterar o curso da doença) e aplicação de terapias em fases precoces da doença, bem como para avaliar a sua eficácia.<sup>5</sup>

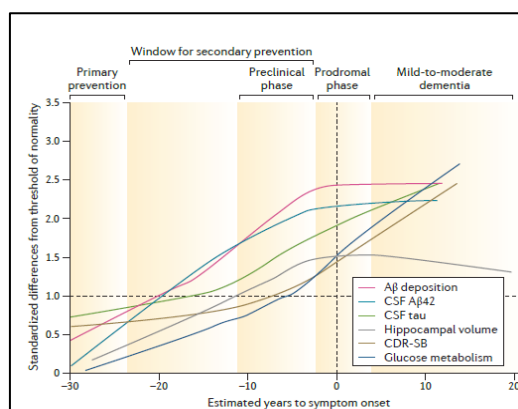


FIGURA 3 | Representação esquemática das mudanças dos parâmetros patológicos: cognitivos, metabólicos, estruturais e moleculares relativamente aos anos estimados para o início sintomático da DA.<sup>2</sup>

### **3 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO**

A Doença de Alzheimer tem sido extensamente estudada, contudo, apesar do progresso feito na investigação da doença, ainda não há cura ou tratamento farmacológico eficaz para esta patologia. Os objetivos clínicos do tratamento da DA consistem em aliviar os sintomas cognitivos, comportamentais e psicológicos e diminuir a progressão da doença. Atualmente só existem disponíveis fármacos com vista a atenuar alguns sintomas da doença, com efeito modesto e temporário e sem qualquer influência na progressão da doença.

#### **3.1 TERAPÊUTICA FARMACOLÓGICA COLINÉRGICA**

As vias colinérgicas são constituídas por neurónios que têm os corpos celulares sediados em núcleos da base do cérebro e se projetam em vastas áreas do neocórtex cerebral e do hipocampo, onde se liberta o neurotransmissor acetilcolina. A acetilcolina contribui para as funções de memória e aprendizagem.<sup>16</sup> Uma estratégia terapêutica para compensar as alterações na neurotransmissão colinérgica, verificadas na DA, é facilitar a transmissão das células remanescentes, ou seja, intervir na sinapse colinérgica no sentido de aumentar a eficiência da neurotransmissão. A estratégia mais bem-sucedida consiste em utilizar inibidores da enzima que degrada a acetilcolina, a acetilcolinesterase, levando assim ao aumento do neurotransmissor disponível na fenda sináptica. Três inibidores, pertencentes a famílias químicas distintas, o donepezilo, a rivastigmina e a galantamina, são os mais utilizados no tratamento da DA.<sup>1,9</sup>

#### **3.2 ANTAGONISTAS DOS RECETORES NMDA**

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central (SNC). A ativação dos recetores do glutamato de subtipo *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA) é fundamental para os fenómenos de modificação da eficiência sináptica que são a base neurofisiológica da memória e da aprendizagem. Por outro lado, os recetores NMDA quando excessivamente ativados estão implicados na lesão e morte neuronal em várias condições como a hipóxia, a isquémia, e o traumatismo cerebral, e a exposição a substâncias tóxicas. A utilização terapêutica de um antagonista dos recetores NMDA como a memantina poderá ser interpretada como visando repor o equilíbrio no funcionamento destes recetores. A eficácia da memantina foi demonstrada em fases da DA moderadamente grave a grave, sendo capaz de melhorar a vida diária do doente.<sup>1,9</sup>

## 4 SECRETASES COMO ALVOS TERAPÊUTICOS

Tendo em conta a função desempenhada pelas enzimas secretases no processamento proteolítico de APP, estas têm vindo a ser apontadas como possíveis alvos terapêuticos na Doença de Alzheimer.

A  $\beta$ - e  $\gamma$ - secretase são essenciais para a produção de  $A\beta$ . Desta forma, a inibição ou modulação destas duas enzimas leva à redução das concentrações de  $A\beta$  em pacientes com a DA. Por outro lado, a  $\alpha$ -secretase cliva a APP dentro da região  $A\beta$ , não conduzindo à formação das placas  $\beta$ -amilóide, o que sugere que o aumento da atividade de  $\alpha$ -secretase pode levar à diminuição de  $A\beta$ .

A inibição da  $\beta$ -secretase, nomeadamente da BACE 1, é apontada como uma estratégia terapêutica primordial na diminuição das concentrações cerebrais das placas  $\beta$ -amilóide, impedindo a progressão da DA. Os inibidores da BACE 1 são considerados atualmente como potenciais fármacos, sendo intensamente investigados tendo alguns entrado, recentemente, em ensaios clínicos.<sup>8, 13, 14</sup>

### 4.1 BACE 1

A proteína responsável pela atividade da  $\beta$ -secretase foi denominada de diferentes formas pelos cinco grupos de investigação que simultaneamente identificaram a mesma sequência polipeptídica - Asp2, BACE 1,  $\beta$ -secretase e memapsina 2. A  $\beta$ -secretase ficou identificada principalmente pela designação de BACE 1.<sup>8,14</sup> As proteases ou enzimas proteolíticas, como é o caso de BACE 1, são enzimas que quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas, denominando-se este processo de clivagem proteolítica.

#### 4.1.1 CARATERÍSTICAS

A BACE 1, que está presente em altas concentrações nos neurónios do SNC, é uma protease transmembranar de ácido aspártico tipo I constituída por 501 aminoácidos, pertencente à família das pepsinas e proteases retrovirais de ácido aspártico. Contém as características típicas das proteases de ácido aspártico, nomeadamente um único domínio transmembranar que atravessa a bicamada lipídica da membrana celular apenas uma vez, ficando a extremidade N-terminal de um lado da membrana e a extremidade C-terminal do outro e ainda a orientação do seu domínio catalítico para o espaço extracelular ou luminal (Figura 4). O seu domínio catalítico contém duas formas de ácido aspártico (*Asp-Thr/Ser-Gly-*

Ser/Thr), nas posições 92-95 e 289-292, que formam a zona ativa da enzima (assinalado com a letra D a vermelho na Figura 4).<sup>6, 14, 17</sup>

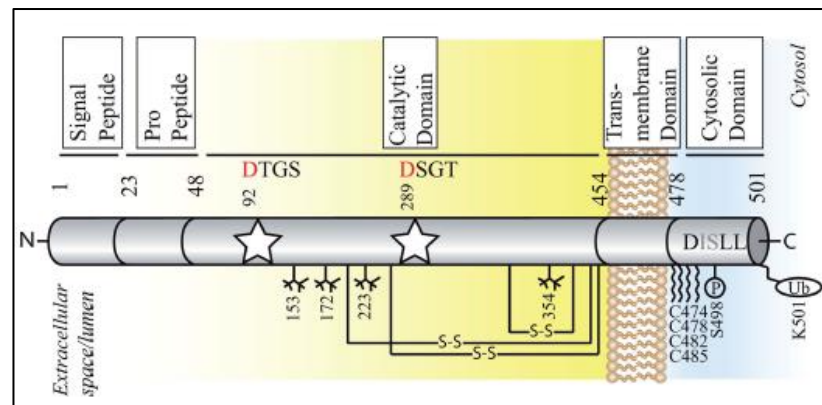


FIGURA 4 | Organização estrutural de BACE I.<sup>17</sup>

#### 4.1.2 SÍNTESE

A síntese de BACE I é iniciada no retículo endoplasmático na forma de pró-peptido - pró-BACE I - local onde sofre N-glicosilação, palmitoilação, acetilação transitória, formação de pontes dissulfeto, entre outras alterações pós-tradução. A pró-BACE I apresenta seis resíduos de cisteína que podem formar três pontes de dissulfeto, estas ligações são muito importantes para uma correta conformação e atividade enzimática, em particular os resíduos Cys330/Cys380 encontrados no local ativo da BACE I, contribuindo para a sua estabilidade e atividade. Posteriormente sofre maturação complexa no aparelho de Golgi, nomeadamente uma clivagem no pró-domínio que permite a BACE I apresentar atividade enzimática integral, uma vez que o local catalítico fica completamente acessível ao substrato, dando origem à forma madura BACE I, uma proteína monomérica.<sup>8, 17</sup>

A BACE I é transportada através do sistema endossomal para a superfície celular. Neste organelo a BACE I apresenta atividade enzimática máxima, uma vez que o pH é mais ácido relativamente ao citosol e a BACE I é mais ativa neste ambiente (apresenta como pH ótimo cerca de 5.5). Desta forma, a BACE tem atividade preferencialmente dentro do endossoma em direção à superfície celular.

A BACE I apresenta duas conformações, a forma aberta e fechada (Figura 5). A conformação aberta é a energeticamente mais estável, sustentada por pontes de hidrogénio, mas, quando ligada ao substrato, a BACE I adota a forma fechada. Esta destabilização é justificada pela interação da enzima e do substrato.<sup>8, 17</sup>

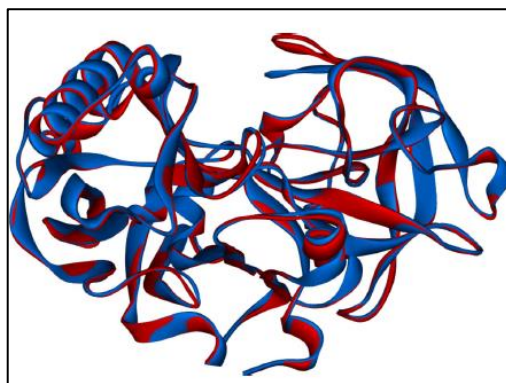


FIGURA 5 | Conformação aberta (vermelha) e fechada (azul) da BACE I.<sup>8</sup>

### 4.1.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Baseado nos estudos de estruturas através de cristalografia de raios-X, alta resolução de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e difração de neutrões, foi possível elucidar o mecanismo catalítico atualmente aceite para as proteases de ácido aspártico dos seres eucariotas, na qual se inclui a BACE I.<sup>8</sup>

A BACE I é caracterizada por possuir um local que reconhece 6 a 8 resíduos de aminoácidos do domínio extracelular da APP. Após a internalização de APP da membrana celular num endossoma, a BACE I, que tem atividade ótima em pH ácido, cliva o substrato maioritariamente nos endossomas iniciais e em compartimentos trans-golgi.<sup>6, 17</sup>

A BACE I tem também função de clivar e ativar a neuregulín-1 (NRG-1), contribuindo para a mielinização pós-natal, em particular nos neurónios do sistema nervoso periférico. A BACE I cliva o tipo 3 de NRG-1 e liberta um fragmento que contém um fator de crescimento epidermal que interage com as células de Schwann iniciando o sinal de mielinização (Figura 6).<sup>14</sup>

A BACE I tem também função enzimática noutros substratos, embora ainda não se tenha um conhecimento completo de todas as funções fisiológicas desta enzima.<sup>14, 17</sup>

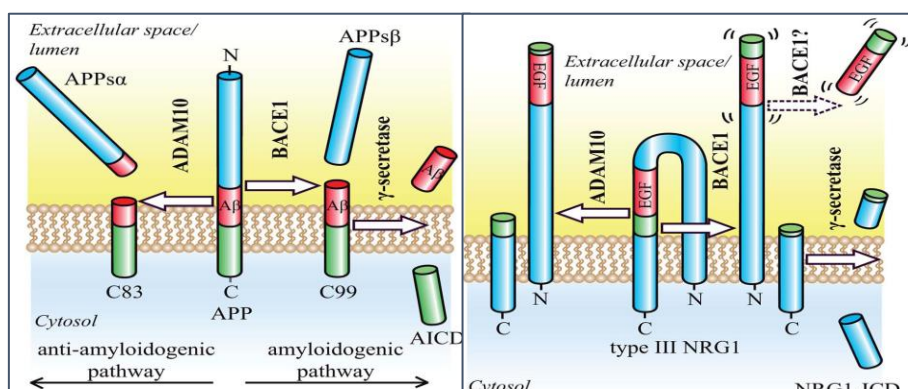


FIGURA 6 | Atividade enzimática da BACE I no substrato APP e NRG-1.<sup>1</sup>

## 4.2 POSSÍVEIS EFEITOS SECUNDÁRIOS DA INIBIÇÃO DA BACE I

Entender as funções da BACE I e as suas implicações em potenciais mecanismos responsáveis por efeitos colaterais na terapêutica de inibição é um objetivo a ter em consideração. Desta forma, identificam-se de seguida os fenótipos descritos em animais geneticamente desprovidos de BACE I - BACE I *knockout* (Tabela I).<sup>14, 17</sup> Estes murganhos provaram ser viáveis com poucas anormalidades fenotípicas, sugerindo que a inibição desta enzima pode ser clinicamente viável com poucos efeitos colaterais.<sup>14</sup>

Dado que que BACE I tem intervenção na mielinização, esta pode ficar comprometida com a inibição, no entanto verificou-se que nos murganhos BACE I *knockout* a mielinização não é totalmente impedida, observando-se bainhas de mielina mais finas comparando com as do grupo controlo. Os murganhos BACE I *knockout* demonstraram também uma probabilidade maior de exibir atividade convulsiva e um risco aumentado de comportamento esquizofrénico.<sup>14</sup>

|                                              | Putative substrate |
|----------------------------------------------|--------------------|
| <b>BACE1 knockout mouse phenotypes</b>       |                    |
| Astrogenesis increase, neurogenesis decrease | JAG1               |
| Axon guidance defects                        | CHL1               |
| Hyperactivity                                | NRG1               |
| Hypomyelination                              | NRG1               |
| Memory deficits                              | Unknown            |
| Insulin sensitivity enhanced                 | Unknown            |
| Muscle spindle reduction                     | NRG1               |
| Neurochemical deficits                       | Unknown            |
| Neurodegeneration with age                   | Unknown            |
| Postnatal lethality, growth retardation      | Unknown            |
| Retinal abnormalities                        | FLT1               |
| Schizophrenia endophenotypes                 | NRG1               |
| Seizures                                     | SCN2B              |
| Spine density reduction                      | NRG1               |

TABELA I | Fenótipos de murganhos BACE I *knockout* associados a possíveis substratos.<sup>14</sup>

BACE 2, também designada de Asp I e memapsina I é homóloga de BACE I, possuindo 64% de homologia. Ambas pertencem à família de proteases transmembranares de ácido aspártico. Ao contrário de BACE I, a BACE 2 é pouco expressa no cérebro, sendo encontrada maioritariamente no cólon, rins, pâncreas, placenta próstata, estômago e traqueia. Inicialmente, pensava-se que a homologia entre as duas proteases indicassem que a BACE 2 também fosse uma  $\beta$ -secretase, contudo, além da sua baixa expressão neuronal, a BACE 2 apresenta o seu local preferencial de corte de APP dentro da zona  $A\beta$ , impedindo a sua formação, não desempenhando por isso nenhum papel patológico na DA.<sup>8, 14</sup>

Desta forma, é necessário ter em consideração a seletividade dos inibidores da BACE I relativamente a BACE 2 e a outras proteases homólogas como é o caso da pepsina, renina, catépsina D e E, uma vez que estes podem causar inibição cruzada e causar efeitos colaterais.<sup>8,14</sup>

Para a aplicação de inibidores BACE I na clínica é necessário a determinação prévia da janela terapêutica para que estes sejam aplicados com menores efeitos secundários possíveis.

## **5 DESIGN DE INIBIDORES DA BACE I**

Para que as moléculas inibidoras da BACE I sejam clinicamente eficazes é necessário que reúnam determinadas características que permitam o alcance do alvo terapêutico. A BACE I cliva APP dentro dos endossomas dos neurónios cerebrais, desta forma, os inibidores têm que conseguir penetrar a barreira hematoencefálica (BBB) e a membrana celular dos neurónios, sendo necessário ter em consideração determinados aspetos, um dos quais é o peso molecular máximo para atravessar a BBB que é cerca de 550Da e outro é a permeabilidade celular para atravessar as barreiras lipídicas.

Por outro lado, é necessário que os inibidores da BACE I alcancem concentrações cerebrais adequadas. Por esta razão, outro obstáculo a ultrapassar é o transporte de efluxo provocado pela glicoproteína P (Pg-P). Os inibidores quando são substratos da Pg-P não conseguem penetrar eficazmente a BBB e são expulsos de dentro das células. Este fato demonstrou que quando a permeabilidade cerebral é ultrapassada o efluxo provocado pela Pg-P é outro fator limitante da eficácia dos inibidores de BACE I.

Estes inibidores devem também possuir boas propriedades farmacocinéticas - absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME).<sup>6, 8, 14, 18</sup>

Outro aspeto importante a ter em consideração no desenvolvimento destes inibidores é a seletividade relativamente a outras proteases de ácido aspártico. Os dois resíduos catalíticos de ácido aspártico são conservados dentro dessa classe de proteases, desta forma, para o desenvolvimento da seletividade, a potência da inibição da BACE I é comparada à potência de inibição de outras proteases de ácido aspártico humanas, nomeadamente à homóloga BACE 2 e à catépsina D, protease de ácido aspártico mais abundante nas células humanas.<sup>8, 18</sup>

Estas limitações inerentes ao *design* de inibidores da BACE I deverão ser ultrapassadas de modo a que estes inibidores possuam boas propriedades farmacológicas e farmacocinéticas para um desenvolvimento clínico adequado.

Os inibidores podem ser classificados em duas categorias principais, peptidomiméticos e não péptidos. A subclassificação pode ser feita em função da estrutura química do inibidor (Tabela 2).<sup>8, 14</sup>

| <b>INIBIDORES PEPTIDOMIMÉTICOS</b>                                    | <b>INIBIDORES NÃO PÉPTIDOS</b>                             |
|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| <i>Statine- and norstatine-based inhibitors</i>                       | <i>Acyl Guanidine-based Inhibitors</i>                     |
| <i>Inhibitors with tert-hydroxyl groups to mimic transition-state</i> | <i>2-Aminopyridine-based Inhibitors</i>                    |
| <i>Hydroxyethylene isostere-based inhibitors</i>                      | <i>Aminoimidazole-based Inhibitors</i>                     |
| <i>Hydroxyethylamine-based inhibitors</i>                             | <i>Amino/Iminohydantoin-based Inhibitors</i>               |
| <i>Carbinamine-derived inhibitors</i>                                 | <i>Aminothiazoline and Aminooxazoline-based inhibitors</i> |
| <i>Reduced amide-based inhibitors</i>                                 | <i>Dihydroquinazoline-based Inhibitors</i>                 |
| <i>Macrocyclic inhibitors</i>                                         | <i>Aminoquinoline-based Inhibitors</i>                     |
|                                                                       | <i>Pyrrolidine-based Inhibitors</i>                        |
|                                                                       | <i>Macrocyclic Nonpeptide Inhibitors</i>                   |
|                                                                       | <i>Miscellaneous Nonpeptide Scaffolds</i>                  |

TABELA 2 | Subclasses dos inibidores peptidomiméticos e não péptidos de BACE I.<sup>8</sup>

## 5.1 DESIGN DE INIBIDORES PEPTIDOMIMÉTICOS DA BACE I

A primeira geração de inibidores da BACE I consistia em péptidos não cliváveis que mimetizavam a conformação do substrato na fase de transição – inibidores análogos de transição.<sup>8</sup>

Os dados obtidos através da técnica de cristalografia de Raios-x das ligações dos inibidores peptidomiméticos com a BACE I demonstrou que as interações inibidor-enzima representam um papel crucial no mecanismo de inibição, permitindo um avanço no desenvolvimento e *design* de inibidores modelos.<sup>8, 14</sup>

Os inibidores peptidomimético são desenhados de modo a mimetizar o substrato natural da enzima e através da escolha das cadeias laterais dos inibidores é possível conservar ou aumentar a especificidade pelo local ativo. Quando a BACE I está na presença de um inibidor, o grupo hidroxilo do isótero do estado de transição, característica que dá a estas moléculas poder inibitório, forma ligações de hidrogénio estreitas com os resíduos catalíticos de ácido aspártico, impedindo desta forma a atividade catalítica da BACE I.<sup>8</sup>



Estas moléculas peptidomiméticas de grande dimensão são potentes inibidores da BACE I *in vitro* devido à grande abertura do local ativo da BACE I envolvido nas ligações de grande afinidade ao substrato. Contudo, devido ao elevado peso molecular, à presença de numerosas ligações peptídeas e às características inerentes das proteínas, estes fármacos não possuem boas propriedades *in vivo*, como a biodisponibilidade oral, tempo de semi-vida adequado ou penetração da barreira hematoencefálica.<sup>8, 14, 18, 19</sup>

De modo a otimizar estes inibidores procura-se diminuir o peso molecular e as características peptídicas, manter as interações de ligação e otimizar as propriedades farmacocinéticas ADME.<sup>8</sup>

## 5.2 DESIGN DE INIBIDORES NÃO PÉPTIDOS DA BACE I

Para colmatar os problemas que os inibidores péptidomiméticos apresentavam procedeu-se ao desenvolvimento de inibidores da BACE I não péptidos, grandes o suficiente para estabelecer interações de alta afinidade com o sítio ativo da BACE I, mas pequenos o suficiente para apresentar farmacocinética satisfatória e alcançar adequada concentração cerebral.<sup>14</sup> Moléculas mais pequenas têm uma melhor capacidade de atravessar a BBB e menor taxa de transporte de efluxo pela Pg-p, podem, no entanto, apresentar problemas em estabelecer ligações com a BACE I devendo-se por isso aumentar a afinidade dos inibidores não péptidos para o local ativo através do aumento de interações neste local.

O desenvolvimento de moléculas inibitórias pequenas não peptídeas envolveu um *screening* de alto rendimento ou *screening* baseado em fragmentos seguido de otimização química.<sup>8</sup>

Os inibidores da BACE I podem ser desenvolvidos com base em métodos computacionais que decorrem do *screening in silico* de alto rendimento de bibliotecas de compostos. Através de um método de modelação a gigantesca biblioteca de compostos é restringida para apenas algumas centenas de compostos com uma maior probabilidade de serem fiáveis, diminuindo os recursos e o tempo necessário para testar esses compostos. Nestes estudos podem ser adotadas diferentes estratégias de pesquisa, nomeadamente a investigação de apenas um único *scaffold* ou uma funcionalidade particular, ou ainda a verificação integral da biblioteca.<sup>8</sup>

## 5.3 PRODUTOS NATURAIS COM ATIVIDADE INIBITÓRIA DA BACE I

Há uma enorme variedade de produtos naturais isolados de plantas (chá verde, rizoma de salsaparrilha, casca do caule de *Morus lhou*, fruto do *Ficus benjamina*, etc.) que

demonstraram ter atividade inibitória da BACE I. Para muitos deles é improvável que se tornem candidatos a fármacos, contudo, elucidar a estrutura de cada composto é importante para se obter informações sobre as ligações que ocorrem e fornecer novos modelos mais potentes e seletivos que podem ser explorados para a obtenção de novos fármacos.<sup>8</sup>

## 6 DESENVOLVIMENTO CLÍNICO DE INIBIDORES DA BACE I

A nível académico e industrial têm sido executadas diversas investigações para avaliar a potência, seletividade e biodisponibilidade dos inibidores da BACE I. Como resultado desta intensa investigação, uma dezena de compostos da última geração de inibidores da BACE I entraram em ensaios clínicos.<sup>8, 14, 20</sup>

Os ensaios clínicos com inibidores da BACE I são delineados de forma a avaliar a segurança e eficácia em indivíduos saudáveis, indivíduos com DA e numa etapa posterior em indivíduos em fases pré-clínicas da DA.<sup>14</sup> Consistem, na sua maioria, em ensaios randomizados no qual se avalia o benefício do inibidor em relação ao placebo em dois testes primários: o primeiro mede as funções cognitivas e o segundo mede as atividades do dia-a-dia. Para medir os níveis de cognição recorre-se a testes frequentemente utilizados, como por exemplo o ADAS-cog. Para avaliar as atividades diárias pode-se recorrer a vários testes, sendo um deles o *The US National Institutes of Health's Alzheimer's Disease Cooperative Study Activities of Daily Living* (ADCS-ADL).

Além de ser necessário a obtenção de resultados positivos na função cognitiva e nas atividades diárias, são necessários dados que comprovem que o agente terapêutico modifica realmente a progressão da doença. Desta forma avalia-se estatisticamente o benefício do agente terapêutico recorrendo-se aos biomarcadores que refletem a evolução do curso da doença – redução da atrofia cerebral medida através de IRM, redução dos níveis de t-tau ou p-tau, de A $\beta$  total ou A $\beta$ 42 no CSF e no plasma (que sugerem redução da morte neuronal).<sup>9</sup>

Alguns inibidores avançaram para desenvolvimento clínico (Tabela 3), como é o caso do inibidor MK-8931 da Merck, do AZD3293 e AZD3839 da AstraZeneca e do E2609 da Eisai. Houve também alguns insucessos como foi o caso de dois compostos da Eli Lilly, LY2811376 e LY2886721. Os resultados dos ensaios clínicos que estão a decorrer têm validado não só a hipótese amiloidogénica mas também o potencial da inibição de BACE I como terapêutica viável para o tratamento da DA. Indicando-se, de seguida, os aspetos clínicos das moléculas supracitadas.

## 6.1 MK-8931

MK-8931 é uma pequena molécula inibitória da BACE I desenvolvida pela Farmacêutica Merck testada em 88 indivíduos saudáveis (entre os 18 e 45 anos) num ensaio randomizado de duas partes, duplo-cego, controlado por placebo em fase Ia de ensaios clínicos. Foi avaliada a segurança, tolerabilidade, farmacocinética e farmacodinâmica do MK-8931 após administração oral de dose única ou de doses múltiplas, diariamente, durante 14 dias.

O principal objetivo deste estudo foi determinar se o MK-8931 apresenta a capacidade de penetrar no cérebro e atingir o alvo terapêutico. Para isso, os biomarcadores da atividade de BACE I foram medidos no CSF, nomeadamente A $\beta$ 40, A $\beta$ 42, assim como o sAPP $\beta$ , um produto obtido diretamente da clivagem de APP pela BACE I.

A administração de uma dose única de 100 mg e de 550 mg de MK-8931 reduziu as concentrações de A $\beta$ 40 no CSF em 75% e 92% respetivamente após 36h. Observou-se reduções similares das concentrações de A $\beta$ 42 e sAPP $\beta$  no CSF. Administrações de doses múltiplas de MK-893 alcançaram mais de 90% de redução das concentrações de A $\beta$  no CSF. O MK-8931 reduziu significativamente as concentrações de A $\beta$  no CSF de forma sustentada e dependente da dose. O tempo de semi-vida do MK-8931 é cerca de 20 h, demonstrando que uma única dose diária parecer ser suficiente para manter a concentração do fármaco *in vivo*.

Foi também realizado um ensaio randomizado, duplo-cego e controlado por placebo fase Ib do inibidor MK-8931 em 32 pacientes com DA na fase ligeira a moderada com idade média de 73 anos de forma a avaliar a segurança, tolerabilidade, farmacocinética e farmacodinâmica. Uma das três doses, 12 mg, 40 mg ou 60 mg, de MK-8931 foi administrada oralmente uma vez por dia durante 7 dias e as concentrações de A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 e sAPP $\beta$  foram medidas. A administração diária de 12 mg, 40 mg ou 60 mg, reduziu respetivamente em 57%, 79% ou 84% de A $\beta$ 40 no CSF, e reduções similares foram observadas de A $\beta$ 42 e sAPP $\beta$ . De forma semelhante ao que aconteceu nos indivíduos saudáveis a administração de MK-8931 levou a uma redução considerável de A $\beta$  no CSF de forma sustentada e dependente da dose.

Tanto nos indivíduos saudáveis como nos indivíduos com a DA o MK-8931 foi bem tolerado sem grandes efeitos adversos observados. Os resultados do ensaio fase Ib foram importantes, particularmente porque demonstram que as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas do inibidor da BACE I não são substancialmente alteradas pela presença de altas concentrações de A $\beta$  no cérebro dos indivíduos com DA.

Os resultados positivos de MK-8931 dos estudos de fase Ia e Ib levaram a que este entrasse num ensaio clínico combinado de fase 2/3 em 2012 - estudo EPOCH.

O estudo EPOCH é um ensaio realizado durante 78 semanas, randomizado, em grupo paralelo, controlado por placebo, duplo-cego que avalia a segurança e eficácia de doses de 12 mg, 40 mg ou 60 mg por dia de MK-8931 em 200 pacientes com DA na fase ligeira a moderada. Os resultados avaliam-se através das pontuações obtidas no teste cognitivo ADASCog e no teste das atividades diárias ADCS-ADL.

Adicionalmente, um novo ensaio de MK-8931 foi iniciado, o estudo APECS, com duração de 104 semanas, randomizado, controlado por placebo, grupo paralelo, duplo-cego, em fase 3 do ensaio clínico, que avalia a segurança e eficácia da administração diária de 12 mg ou 40 mg de MK-8931 em 1500 pacientes em fase prodromal da DA. De forma a avaliar os resultados de eficácia recorre-se aos testes cognitivos *Clinical Dementia Rating Scale-Sum of Boxes (CDR-SB)*.

Ambos os ensaios EPOCH e APECS incluem dois subestudos. O primeiro consiste na avaliação imagiológica das mudanças de amiloide no cérebro usando o exame PET e o segundo na medição de biomarcadores da DA no CSF, ou seja, as concentrações de A $\beta$ , t-tau, p-tau e ainda o volume do hipocampo.

Os estudos de eficácia de fase 3 de EPOCH e APECS deverão estar concluídos em 2017 e 2018 respetivamente.<sup>8, 14, 19, 21-23</sup>

## 6.2 AZD3839

O inibidor da BACE 1, AZD3839, foi concebido e desenvolvido pela Farmacêutica AstraZeneca. A estrutura líder 1 (Figura 10) foi identificada através de RMN, e a subsequente otimização da molécula líder e o *design* de novas classes estruturais através de *scaffold hopping* permitiu obter potentes inibidores de BACE 1. Uma das características notáveis destes inibidores (2 a 4) é que o átomo flúor pode ser introduzido nos anéis aromáticos de forma a controlar as propriedades farmacológicas. A introdução de um grupo difluorometil na piridina do inibidor 4 conduziu ao derivado 5 (AZD3839).

A forma de ligação do composto AZD3839 à BACE 1, formando o complexo inibitório, foi determinada pelos estudos estruturais através de raios-X, demonstrando que o inibidor se liga à enzima na conformação aberta.

Os estudos pré-clínicos com AZD3839 em diversas espécies, murganhos, porcos e primatas, demonstraram uma diminuição de A $\beta$  no plasma, cérebro e CSF. A análise farmacocinética e farmacodinâmica em murganhos e porcos revelaram uma boa correlação

entre a potência de AZD3839 e os efeitos *in vivo*. Em diversos desses estudos os resultados sugeriram que AZD3839 reduz eficazmente os níveis de A $\beta$ , tendo entrado posteriormente em estudos de fase I de ensaios clínicos em 2012.<sup>8, 24</sup>

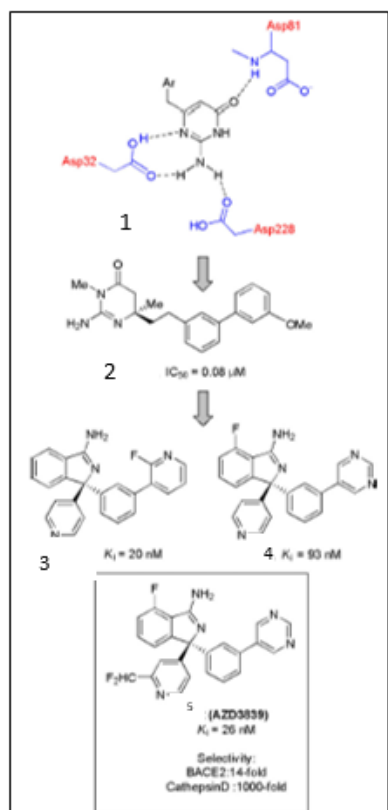


FIGURA 7 | Estrutura e atividade dos inibidores 1-5.<sup>8</sup>

### 6.3 AZD3293

O inibidor AZD3293, da Farmacêutica AstraZeneca, entrou num ensaio clínico de forma a testar a segurança, tolerabilidade, farmacocinética, farmacodinâmica e ainda os efeitos nos níveis de A $\beta$  no plasma e no CSF em indivíduos com idades compreendidas entre os 18 e 55 anos. O estudo consistiu num ensaio de fase I, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo e com administração dose única ascendente (SAD) e dose múltipla ascendente (MAD). AZD3293 foi bem tolerado, sem eventos adversos graves reportados até à dose mais alta administrada (750 mg no estudo SAD). O tempo de semi-vida de AZD3293 é de 11 a 20 horas, sendo compatível com uma dose única diária. No estudo MAD, doses de 15 ou 50 mg reduziam as concentrações A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 no CSF em 50% e 75% respetivamente. A administração de AZD3293 levou de forma dependente da dose, à redução da concentração de sAPP $\beta$ , A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 no CSF e ao aumento de sAPP $\alpha$  no CSF.

O estudo de fase I com AZD3293 em indivíduos saudáveis e em indivíduos com DA foi completo e combinado num ensaio de fase 2/3 - estudo AMARANTH. Este ensaio

envolve mais 1500 pacientes com MCI e DA na fase ligeira, com administração de doses de 20 mg ou 50 mg, durante 104 semanas.

Em 2014, as Farmacêuticas AstraZeneca e Eli Lilly criaram uma *partnership* e juntas então a desenvolver clinicamente o AZD3293.<sup>19, 25-27</sup>

#### **6.4 LY28113676 & LY2886721**

A Farmacêutica Eli Lilly foi a primeira a desenvolver e testar a biodisponibilidade de inibidores BACE I não péptidos em humanos. A estrutura líder inicial amino-benzotiazina obteve-se através da técnica de *screening* baseada em fragmentos. A determinação através de raios-x da estrutura do inibidor e da forma de ligação a BACE I demonstrou que o grupo amino-tiazina forma uma rede de ligações de hidrogénio com os resíduos catalíticos de ácido aspártico da BACE I em conformação aberta. A subsequente otimização química, com a introdução de flúor, que permitiu estabilidade metabólica e aumentar a lipofília do inibidor, conduziu a um aumento da atividade inibitória.

LY2811376 é um inibidor de BACE I não péptido, que exibiu propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas satisfatórias em modelos animais de forma a passar à fase I dos ensaios clínicos. Contudo, os estudos clínicos desta molécula foram descontinuados depois de se observar efeitos toxicológicos crónicos em murganhos, demonstrando efeitos não clínicos e *non-target* causadores de problemas na retina e no cérebro.

Uma segunda geração, LY2886721, avançou para a fase I e fase 2 dos ensaios clínicos de modo a determinar a segurança, tolerabilidade, efeitos farmacocinéticos e farmacodinâmicos. Tanto LY2811376 como LY2886721 provaram ter biodisponibilidade oral para inibir a BACE I e reduzir as concentrações cerebrais de A $\beta$  de forma robusta em ensaios pré-clínicos em modelos animais. Contudo, ao contrário de LY2811376, LY2886721 não causou patologias na retina e no cérebro.

Nos ensaios de fase I, LY2886721 ou placebo foram administrados oralmente a 47 indivíduos saudáveis durante 14 dias. O inibidor LY2886721 foi reportado como seguro e bem tolerado neste estudo e com um tempo de semi-vida de 12 h, permitindo a administração de uma única dose diária. A segunda parte do ensaio de fase I consistiu em estudos MAD (5 mg, 15 mg e 35 mg) ou de uma única dose (70 mg) seguida de MAD. A administração de LY2886721 resultou numa diminuição dependente da dose da concentração de A $\beta$ 40 no CSF. As concentrações de A $\beta$ 40 foram reduzidas em 74% com a

dose mais alta e são verificadas diminuições similares de A $\beta$ 42 e sAPP $\beta$  no CSF e um aumento de sAPP $\alpha$ .

Foi também conduzido um ensaio clínico de fase I em indivíduos com a DA. De seguida conduziu-se um ensaio de fase 2, de 6 meses, com LY2886721, com uma administração única oral com doses de 35 mg e 70 mg, em 130 pacientes com DA prodromal ou DA na fase ligeira.

Em junho de 2013 a fase 2 dos ensaios foi terminada devido a um pequeno número de casos que reportaram atividade bioquímica anormal do fígado associado à administração de LY2886721. Esta alteração da função hepática parece não estar relacionada com o mecanismo de BACE I, uma vez que, os murganhos BACE I *knockout* apresentavam fenótipos com fígado normal. Esta alteração dever-se-á a um efeito adverso comum observado em muitas moléculas pequenas em desenvolvimento clínico para diversas indicações.

Atendendo a esta explicação, o fim destes ensaios com LY2886721 não corresponde à desconsideração da BACE I como um alvo terapêutico viável.<sup>8, 14, 19, 28</sup>

## 6.5 E2609

O inibidor E2609, desenvolvido pela Farmacêutica Eisai, é uma molécula pequena com biodisponibilidade oral que demonstrou robusta redução de A $\beta$  em estudos pré-clínicos. E2609 avançou para um ensaio randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, num ensaio clínico de fase I, em indivíduos saudáveis.

Conduziram-se, de forma separada, dois estudos de fase I, um estudo SAD em 73 indivíduos, com doses que variaram de 5 mg a 800 mg, e um estudo MAD durante 14 dias em 50 indivíduos com doses que variaram de 25 mg a 400 mg. No estudo SAD foram avaliadas as concentrações de A $\beta$  no plasma e no estudo MAD foram avaliadas no plasma e no CSF. O tempo de semi-vida de E2609 é de 12 a 16 h, permitindo uma administração única diária. Ambos os estudos demonstraram uma redução dos níveis de A $\beta$  no plasma e no CSF, de sAPP $\beta$  no CSF e um aumento das concentrações de sAPP $\alpha$ . A dose mais alta de E2609 administrada no estudo MAD (400 mg) diminui a concentração de A $\beta$  em 85% no CSF. E2609 parece ser bem tolerado e não foram reportados efeitos adversos em nenhum dos dois estudos.

E2609 completou a fase I do ensaio clínico em indivíduos com MCI ou com DA na fase ligeira. A fase 2 dos ensaios pretende avaliar a segurança, tolerabilidade e eficácia de

E2609, começou em novembro de 2014, envolvendo 700 voluntários com idades compreendidas entre os 50 e 85 anos portadores de MCI e DA na fase prodromal.

A Eisai e a Biogen Idec criaram uma *partnership* e juntas então a desenvolver clinicamente o E2609.<sup>14, 19, 29</sup>

| <b>DRUG</b>        | <b>COMPANY</b>    | <b>PHASE</b> | <b>NCT TRIAL NUMBER</b>          |
|--------------------|-------------------|--------------|----------------------------------|
| <b>AZD3293</b>     | AstraZeneca/Lily  | Phase I      | 01739647<br>01795339             |
| <b>CTS-21166</b>   | CoMentis          | Phase I      | 00621010<br>01294540             |
| <b>E2609</b>       | Eisai/Biogen Idec | Phase I / II | 01511783<br>01600859             |
| <b>HPP854</b>      | High Point        | Phase I      | 01482013<br>01227252             |
| <b>LY2886721</b>   | Lily              | Phase 2*     | 01534273<br>01561430             |
| <b>MK-8931</b>     | Merck             | Phase 2/3    | 01496170<br>01739348<br>01953601 |
| <b>PF-05297909</b> | Pfizer            | Phase I      | 01462851                         |
| <b>RG7129</b>      | Roche             | Phase I †    | Not Available                    |
| <b>TAK-070</b>     | Takeda            | Phase I      | Not Available                    |

\*TERMINATED DUE TO ABNORMAL LIVER BIOCHEMISTRY  
†REMOVED FROM PIPELINE

TABELA 3 | Moléculas inibidoras de BACE I em desenvolvimento clínico.<sup>8, 14, 19</sup>



## CONCLUSÃO

O número de casos de doença de Alzheimer tem vindo a aumentar como consequência do envelhecimento da população. A eficácia da terapêutica farmacológica presentemente disponível para o tratamento da DA ainda é bastante modesta. Assim, a descoberta de novos fármacos com alívio sintomático eficaz e suscetíveis de retardar a progressão da doença, é por isso prioritária.

A validação *in vitro* e *in vivo* das potencialidades da inibição de BACE I no tratamento da DA, justifica a intensificação dos esforços para desenvolver moléculas inibidoras da BACE I.

Devido à localização da BACE I no cérebro, é necessário que os inibidores para atingirem o alvo terapêutico e serem clinicamente eficazes reúnam determinadas características, nomeadamente a capacidade de atravessar membranas celulares e a BBB. Os principais objetivos no desenvolvimento destas moléculas é diminuir o peso molecular, reduzir a suscetibilidade de sofrer efluxo pela Pg-P e melhorar a estabilidade metabólica. Os inibidores devem também ter alta seletividade para BACE I em relação a outras proteases homólogas de ácido aspártico.

Os inibidores podem ser classificados em peptidomiméticos e não péptidos e, dentro destes, em subclasses conforme a sua estrutura química. A evolução das diversas estruturas químicas dos inibidores de BACE I decorre desde o ano 2000 com mais de centena e meia de publicações sobre o assunto até à data.

Nos últimos anos alguns inibidores avançaram para desenvolvimento clínico, como é o caso do E2609, da Eisai, já em fase II, do AZD3293, da AstraZeneca, a iniciar os estudos fase 2/3 e do inibidor MK-8931 da Merck em fase mais avançada dos ensaios clínicos, fase 3. Se os resultados continuarem a ser positivos é possível que a Merck seja a primeira Farmacêutica a lançar para o mercado um inibidor da BACE I. Paralelamente, houve também alguns insucessos como foi o caso dos dois compostos da Eli Lilly, LY2811376 e LY2886721.

Apesar do vasto leque de inibidores da BACE I que estão a ser testados em ensaios clínicos, permanecem muitas questões acerca desses fármacos, nomeadamente - a concentração ótima desses inibidores para uma eficácia máxima; o estágio da doença a que corresponderá a maior eficácia do tratamento; e que mecanismos colaterais poderão decorrer devido à inibição de BACE I.

Alguns dos resultados das investigações indicam que inibidores da BACE I constituem uma esperança para o futuro do tratamento da Doença de Alzheimer, todavia ainda são as primeiras etapas de um longo percurso que se adivinha bastante promissor.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – CASTRO-CALDAS, A; Mendonça, A - A DOENÇA DE ALZHEIMER E OUTRAS DEMÊNCIAS EM PORTUGAL. LIDEL. ISBN 978-972-757-359-2 (2005).
- 2 – MASTERS, C *et al.* - Alzheimer's disease. **NATURE REVIEWS**. 1 (2015) 1-18.
- 3 – JALBERT, J *et al.* - Dementia of the Alzheimer Type. **Epidemiologic Reviews**. 30 (2008) 15-34.
- 4 – SCHELTENS, P *et al.* - Alzheimer's disease. **The Lancet**. 15 (2016) 1-13.
- 5 – DUBOIS, B *et al.* - Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. **Alzheimer's and Dementia**. 12 (2016) 292-323.
- 6 – O'NEILL, B *et al.* -  $\beta$ -Secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association**. 6 (2010) 534.
- 7 – KNOPMAN, David S. - Alzheimer Disease and Other Dementias. **Goldman-Cecil Medicine**. 402 (2016) 2388-2398.
- 8 – GHOSH, A; OSSWALD, H - BACE1 ( $\beta$ -Secretase) Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease. **Chem Soc Rev**. 43 (2014) 6765-6813.
- 9 – KARRAN, E *et al.* - The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. **Nature reviews Drug discovery**. 10 (2011) 698-712.
- 10 – REITZ, C; MAYEUX, R - Alzheimer Disease: Epidemiology, Diagnostic Criteria, Risk Factors and Biomarkers. **Biochemical Pharmacology** 88 (2014) 640-651.
- 11 – STROOPER, B; KARRAN, E - The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. **Cell**. 164 (2016) 603-615.
- 12 – QUERFURTH, H; LAFERLA, F - Alzheimer's Disease. **The New England Journal of Medicine**. 362 (2010) 329-344.
- 13 – STROOPER, B *et al.* - The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. **Nature reviews. Neurology**. 6 (2010) 99-107.
- 14 – YAN, R; VASSAR, R - Targeting the  $\beta$ -secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. **The Lancet Neurology**. 13 (2014) 319-329.

- 15 – JONSSON, T *et al.* - A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. **Nature** 488 (2012) 96-99.
- 16 – HASSELMO, M - The Role of Acetylcholine in Learning and Memory. **Curr Opin Neurobiol.** 16 (2006) 710-715.
- 17 – DISLICH, B; LICHTENTHALER, S - The membrane-bound aspartyl protease BACE1: Molecular and functional properties in Alzheimer's disease and beyond. **Frontiers in Physiology.** 3 (2012) 1-16.
- 18 – GHOSH, A *et al.* - Developing  $\beta$ -secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry.** 120 (2012) 71-83.
- 19 – VASSAR, R - BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease. **Alzheimer's Research & Therapy.** 6 (2014) 1-14.
- 20 – OEHLRICH, D *et al.* - The evolution of amidine-based brain penetrant BACE1 inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters.** 24 (2014) 2033-2045.
- 21 – FORMAN, M *et al.* - The novel BACE inhibitor MK-8931 dramatically lowers cerebrospinal fluid A $\beta$  peptides in healthy subjects following single- and multiple-dose administration. **Alzheimer's & Dementia.** 8 (2012) 704.
- 22 – U.S. Department of Health and Human Services. Alzheimer's Disease Education and Referral Center. *MK-8931 for Mild to Moderate Alzheimer's Disease (EPOCH Study)* Acedido a 13 junho de 16, Disponível em <https://www.nia.nih.gov/alzheimers/clinical-trials/mk-8931-mild-moderate-alzheimers-disease-epoch-study>
- 23 – The APECS study MK-8931. Acedido a 13 junho de 16, Disponível em <https://www.apecsstudy.com/>
- 24 – JEPPSSON, F *et al.* - Discovery of AZD3839, a potent and selective BACE1 inhibitor clinical candidate for the treatment of alzheimer disease. **Journal of Biological Chemistry.** 287 (2012) 41245-1257.
- 25 – AstraZeneca (2014) *AstraZeneca and Eli Lilly and Company initiate pivotal clinical trial for patients with early Alzheimer's disease.* Acedido a 13 junho de 16, Disponível em <https://www.astrazeneca.com/media-centre/press-releases/2014/astrazeneca-eli-lilly-clinical-trial-early-alzheimers-disease-patients-01122014.html>
- 26 – U.S. Department of Health and Human Services. Alzheimer's Disease Education and Referral Center. *AZD3293 in Early Alzheimer's Disease (AMARANTH).* Acedido a 13 junho de 16, Disponível em <https://www.nia.nih.gov/alzheimers/clinical-trials/azd3293-early-alzheimers-disease-amaranth>

**27** – EKETJÄLL, S *et al.* - AZD3293: A Novel, Orally Active BACE1 Inhibitor with High Potency and Permeability and Markedly Slow Off-Rate Kinetics. **Journal of Alzheimer's Disease**. 50 (2016) 1109-1123.

**28** – Biomedical Research Forum, LLC. ALZFORUM NETWORKING FOR A CURE. *THERAPEUTICS LY2886721*. Acedido a 13 junho de 16, Disponível em <http://www.alzforum.org/therapeutics/ly2886721>

**29** – U.S. Department of Health and Human Services. Alzheimer's Disease Education and Referral Center. *E2609 for Mild Cognitive Impairment Due to Alzheimer's Disease*. Acedido a 13 junho de 16, Disponível em <https://www.nia.nih.gov/alzheimers/clinical-trials/e2609-mild-cognitive-impairment-due-alzheimers-disease>