

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: <b>2004.02.27</b>	(73) Titular(es): <b>JOANNE MCLAURIN</b> <b>181 MORTIMER AVENUE EAST YORK,</b> <b>ONTARIO M4J 2C4</b> <b>CA</b>
(30) Prioridade(s): <b>2003.02.27 US 451363 P</b> <b>2003.11.17 US 520958 P</b> <b>2003.11.19 US 523534 P</b> <b>2004.02.26 US 787621</b>	(72) Inventor(es): <b>JOANNE MCLAURIN</b> <b>CA</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2010.02.17</b>	(74) Mandatário: <b>NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO</b> <b>RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA</b> <b>PT</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2014.08.13</b> <b>199/2014</b>	

(54) Epígrafe: **MÉTODOS PARA PREVENIR, TRATAR E DIAGNOSTICAR DISTÚRBIOS DA AGREGAÇÃO DE PROTEÍNAS**

(57) Resumo:

ESTÃO DIVULGADOS MÉTODOS PARA PREVENIR, TRATAR, OU DIAGNOSTICAR NUM INDIVÍDUO UM DISTÚRBO NO DOBRAMENTO OU AGREGAÇÃO DE PROTEÍNAS, OU NA FORMAÇÃO, DEPOSIÇÃO, ACUMULAÇÃO, OU PERSISTÊNCIA AMILOIDE CONSISTINDO NA ADMINISTRAÇÃO AO REFERIDO INDIVÍDUO DE UMA QUANTIDADE FARMACEUTICAMENTE EFICAZ DE ESTEREOISÓMEROS, ENANTIÓMEROS OU RESPETIVOS DERIVADOS DE INOSITOL.

## **RESUMO**

### **"MÉTODOS PARA PREVENIR, TRATAR E DIAGNOSTICAR DISTÚRBIOS DA AGREGAÇÃO DE PROTEÍNAS"**

Estão divulgados métodos para prevenir, tratar, ou diagnosticar num indivíduo um distúrbio no dobramento ou agregação de proteínas, ou na formação, deposição, acumulação, ou persistência amiloide consistindo na administração ao referido indivíduo de uma quantidade farmacologicamente eficaz de estereoisômeros, enantiômeros ou respectivos derivados de inositol.

## DESCRIÇÃO

### **"MÉTODOS PARA PREVENIR, TRATAR E DIAGNOSTICAR DISTÚRBIOS DA AGREGAÇÃO DE PROTEÍNAS"**

#### PEDIDOS DE PATENTE RELACIONADOS

Este pedido de patente reivindica a prioridade dos Pedidos de Patente Provisórios N°s de Série 60/451,363, 60/520,958 e 60/523,534, apresentado a 27 de fevereiro de 2003, 17 de novembro de 2003 e 19 de novembro de 2003, respetivamente.

#### CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção refere-se a compostos para serem utilizados em métodos para o tratamento da Doença de Alzheimer e outras amiloidoses; mais particularmente, a métodos para a inibição e a redução da formação de fibrilhas amiloides na intervenção terapêutica na doença de Alzheimer e outras amiloidoses.

#### DESCRIÇÃO DA TÉCNICA RELACIONADA

A doença de Alzheimer é caracterizada neuropatologicamente por depósitos amiloides, emaranhados neurofibrilhares, e perda neuronal seletiva. O componente principal dos depósitos amiloides é amiloide- $\beta$  (A $\beta$ ), um péptido de 39-43 resíduos. As formas solúveis de A $\beta$  geradas a partir da clivagem da proteína precursora de amiloide são produtos normais do metabolismo. A importância dos resíduos 1-42 (A $\beta$ 42) na doença de Alzheimer foi evidenciada na descoberta de que as mutações no codão 717 do gene da proteína precursora de amiloide, genes presenilina 1 e

presenilina 2 resultam num aumento da produção de A $\beta$ 42 em relação a A $\beta$ 1-40. Estes resultados, em conjunto com a presença de A $\beta$ 42 tanto em placas maduras como em amiloide difusa encaminham para a hipótese de que esta espécie mais amiloidogénica pode ser o elemento crítico na formação da placa. Esta hipótese foi corroborada pelo facto de a deposição de A $\beta$ 42 preceder a de A40 na síndrome de Down nas mutações PS1 e na hemorragia cerebral hereditária com amiloidose.

Muitos estudos *in vitro* têm demonstrado que A $\beta$  pode ser neurotóxica ou pode aumentar a suscetibilidade dos neurónios para agressões excitotóxicas, metabólicas ou oxidativas. Inicialmente pensava-se que apenas a forma fibrilhar de A era tóxica para os neurónios, mas a caracterização mais minuciosa das estruturas de A $\beta$  demonstrou que os dímeros e os pequenos agregados de A $\beta$  também são neurotóxicos. Estes dados sugeriram que a prevenção da oligomerização de A $\beta$  seria uma estratégia provável para impedir a neurodegeneração relacionada com a DA. Vários estudos têm demonstrado que a neurotoxicidade induzida por A $\beta$  *in vitro* pode ser eliminada por compostos que podem aumentar a resistência neuronal, visando vias celulares envolvidas na apoptose, bloquear vias a jusante depois da indução por A $\beta$  de rotas destrutivas, ou bloquear a oligomerização de A $\beta$  e finalmente, a formação de fibrilhas. O local em que a A $\beta$  atua para induzir neurotoxicidade ainda tem de ser esclarecida, mas os seus efeitos tóxicos têm sido bloqueados por uma variedade de agentes diferentes.

A fixação de fibrilhas de A $\beta$  a membranas de células neuronais e gliais pode ser um passo inicial e passível de intervenção durante a progressão da DA. A formação de placas amiloides, bem como a neurotoxicidade e a inflamação

podem ser consequências diretas ou indiretas da interação de A com moléculas contendo porções de açúcares. Estudos anteriores demonstraram que a interação de A $\beta$  com glicosaminoglicanos resulta na agregação de A $\beta$  possivelmente adicionando à sua insolubilidade e persistência das placas. Os glicosaminoglicanos também têm sido implicados na toxicidade neuronal e na ativação microglial. Alternativamente, a interação com os glicolípidos tais como gangliósidos resulta na estabilização e prevenção da formação de fibrilhas A $\beta$ , bem como, o local de produção de A $\beta$ . A família de fosfatidilinositóis, por outro lado, resulta na aceleração da formação de fibrilhas. O grupo principal de fosfatidilinositol é o *mio*-inositol, um açúcar simples de ocorrência natural envolvido na biossíntese de lípidos, na transdução de sinais, e no controle da osmolaridade.

É também digno de nota que uma variedade de outras doenças humanas demonstram também a deposição de amiloide e geralmente envolvem órgãos sistêmicos (isto é, órgãos ou tecidos que se encontram fora do sistema nervoso central), com a acumulação de amiloide levando à disfunção ou à falha de órgãos. Na doença de Alzheimer e doenças amiloides "sistêmicas", não há atualmente uma cura ou um tratamento eficaz, e o paciente morre geralmente dentro de 3 a 10 anos após o início da doença.

A patente U.S. No. 4,847,082 divulga a utilização de ácido fítico, de um sal fitato, de um isômero ou hidrolisado do ácido fítico para o tratamento da doença de Alzheimer. Também divulga que os isômeros do ácido fítico ou sal fitato compreendem as conformações de hexaquisfosfato de *mio*-inositol, hexaquisfosfato de *cilo*-inositol, hexaquisfosfato de *D-quiro*-inositol, hexaquisfosfato de *L-quiro*-inositol, hexaquisfosfato de

neo-inositol e hexaquisfosfato de *muco*-inositol. O ácido fítico é hexaquisfosfato de inositol (IP6).

A Patente U.S. No. 5,112,814 divulga a utilização de ácido fítico e dos isómeros respetivos para o tratamento da doença de Parkinson. Tal como no caso da Patente U.S. No. 4,847,082, os isómeros de ácido fítico divulgados nesta patente retêm os seis grupos fosfato no açúcar de inositol de seis átomos de carbono.

É digno de nota que em publicações posteriores, a capacidade do monofosfato de inositol, 1,4-bifosfato de inositol e 1,4,5-trifosfato de inositol para inibir a fibrilogénese do péptido beta-amiloide foi investigada e que se verificou não ser eficaz (J. Mol. Biol. 278: 183-194, 1998).

Barak et al. divulgam a utilização de inositol para o tratamento da Doença de Alzheimer (DA). (Prog Neuropsychopharmacol & Biol Psychiat. 20: 729-735, 2000). No entanto, esta referência não divulga a utilização de isómeros de inositol. Os doentes tratados com inositol não apresentaram quaisquer diferenças significativas em resultados da função cognitiva global (índice CAMCOG) entre inositol e placebo (dextrose) em pacientes com DA, enquanto duas subescalas específicas do índice CAMCOG demonstraram melhoria significativa (orientação e linguagem).

Levine J. faz a revisão do artigo de Barak et al. acima referido e afirma especificamente que o tratamento com inositol não é benéfico em DA ou no défice cognitivo induzido por ECT (Eur Neuropsychopharm. 1997; 7, 147-155, 1997).

Colodny L, et al. sugerem estudos adicionais quanto à utilidade do inositol na doença de Alzheimer, referindo-se ao artigo acima mencionado de Barak et al. e, portanto, não divulgam nem sugerem tal utilização para os isômeros de inositol (Altern Med Rev 3(6):432-47, 1998).

McLaurin et al. divulgaram que o *mio*-inositol estabiliza uma pequena micela de A $\beta$ 42 (J. Mol. Biol. 278,183-194, 1998). Além disso, McLaurin et al. divulgam que *epi*- e *cilo*- mas não *quiro*-inositol eram capazes de induzir uma transição estrutural de forma aleatória para estrutura  $\beta$  no A $\beta$ 42 (J Biol Chem. Jun 16; 275 (24):18495-502, 2000; e J Struct Biol 130: 259-270, 2000). Em alternativa, nenhum dos estereoisômeros foram capazes de induzir uma transição estrutural no A $\beta$ 40. A microscopia eletrônica demonstrou que o inositol estabiliza pequenos agregados de A $\beta$ 42. Estas referências também divulgam que as interações inositol-A $\beta$  resultam num complexo que é não tóxico para células PC-12 diferenciadas por fator de crescimento do nervo e culturas neuronais humanas primárias.

Tem sido realizado muito trabalho sobre a doença de Alzheimer, mas pouco é convencionalmente conhecido sobre compostos ou agentes para regimes terapêuticos para parar ou inverter a formação, deposição, acumulação e/ou persistência de amiloide que ocorre na doença de Alzheimer e outras amiloidoses.

Há portanto uma necessidade desesperada de novos compostos ou agentes para regimes terapêuticos para parar ou inverter a formação, deposição, acumulação e/ou persistência de amiloide que ocorre na doença de Alzheimer e outras amiloidoses.

## SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona *cilo-inositol* em associação com outro tratamento para utilização no tratamento ou prevenção de uma patologia do sistema nervoso central ou periférico ou órgão sistémico associado a um distúrbio do dobramento ou agregação de proteínas, ou formação, deposição, acumulação ou persistência de amiloide, em que esse outro tratamento é selecionado do grupo de inibidores de beta-secretase, inibidores de gama-secretase, inibidores de épsilon-secretase, outros inibidores da agregação de folhas beta/fibrillogénese/formação de ADDL, antagonistas de NMDA, compostos anti-inflamatórios não-esteroides, antioxidantes, hormonas, nutrientes e suplementos alimentares; inibidores de acetilcolinestérise, agonistas muscarínicos, antipsicóticos; antidepressivos, terapia genética e/ou abordagens à base de fármacos para regular positivamente a neprilisina; terapia genética e/ou abordagens à base de fármacos para regular positivamente a enzima de degradação da insulina, vacinas, agentes imunoterapêuticos e anticorpos contra A $\beta$ , estatinas e outros fármacos de redução do colesterol, terapias à base de células estaminais e outras células, inibidores de quinases que fosforilam a proteína TAU e inibidores de quinases que modulam a produção de A $\beta$ .

A patologia do sistema nervoso central ou periférico ou órgão sistémico pode ser selecionada do grupo de: doença de Alzheimer, formas pré-senis e senis; angiopatia amiloide; deterioração cognitiva ligeira; demência relacionada com a doença de Alzheimer; taupatia;  $\alpha$ -sinucleinopatia; doença de Parkinson; Esclerose Lateral Amiotrófica; doença do neurónio motor; Paraplegia espástica; doença de Huntington; ataxia espinocerebelar;



doenças neurodegenerativas associadas a agregados intracelulares e/ou intraneuronais de proteínas com poliglutamina, polialanina ou outras repetições decorrentes de expansões patológicas de elementos tri- ou tetra-nucleótidos com genes correspondentes; doenças cerebrovasculares; síndrome de Down; traumatismo craniano com acumulação pós-traumática de péptido beta-amiloide; doença relacionada com Priões; Demência Familiar Britânica; Demência Pré-senil com Ataxia Espástica; angiopatia Amiloide Cerebral, tipo Britânico; Demência Pré-senil com Ataxia espástica Angiopatia Amiloide Cerebral, Tipo Dinamarquês; Encefalopatia com corpos de inclusão de neuroserpina, forma familiar (FENIB); Polineuropatia amiloide; Miosite de Corpos de Inclusão devido ao péptido beta-amiloide; Amiloidose do tipo Familiar e Finlandês; Amiloidose sistêmica associada ao mieloma múltiplo; Febre Familiar do Mediterrâneo; infecções e inflamações crônicas; e Diabetes Mellitus Tipo II associado ao polipeptídeo amiloide dos ilhéus.

A patologia do sistema nervoso central ou periférico ou órgão sistêmico pode ser a síndrome de Down.

A patologia do sistema nervoso central ou periférico ou órgão sistêmico pode ser a doença de Alzheimer.

A patologia do sistema nervoso central ou periférico ou órgão sistêmico pode ser a deterioração cognitiva ligeira.

O outro tratamento pode ser um inibidor de acetilcolinestérase, tal como donepezil.

O outro tratamento pode ser um antagonista de NMDA, tal como memantina.

A presente invenção também proporciona uma composição para utilização no tratamento ou prevenção de uma patologia do sistema nervoso central ou periférico ou órgão sistêmico associada a um distúrbio no dobramento ou agregação de proteínas, ou formação, deposição, acumulação ou persistência de amiloide compreendendo *cilo*-inositol e outro tratamento como definido acima.

O *cilo*-inositol pode ser para administração oral.

O *cilo*-inositol pode estar na forma de uma comprimido oral, líquido ou suspensão oral.

O outro tratamento pode ser selecionado do grupo de: inibidores de gama-secretase ou inibidores de épsilon-secretase específicos ou não específicos de APP, Alzhemed, memantina, Ibuprofeno, Celebrex, Vitamina E, estrogénios, Gingo biloba, donepezil, AF102B, Cevimelina, EVOXAC, AF150(S), AF247B, haloperidol, clozapina, olanzapina, Sertralina, Citalopram Hbr, ELAN AN-1792, Lovastatina, Sinvastatina e cloreto de lítio.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1A mostra a estrutura de *mio*-, *epi*- e *cilo*-inositol enquanto as Figuras 1B-1H mostram a versão de memória de referência espacial do teste do labirinto de água de Morris em ratinhos TgCRND8. O tratamento com *mio*-inositol não alterou a função cognitiva (1B). Aos 6 meses de idade, os TgCRND8 não-tratados (n=10) mostram diminuição cognitiva em relação aos controlos não Tg e ratinhos tratados com *epi*- (1C) e *cilo*-inositol (1D) (n=10 por grupo, p<0,02 não tratados vs. tratados). O desempenho dos

ratinhos TgCRND8 tratados com *epi*-inositol permaneceu deficitário no que diz respeito a crias da mesma ninhada não-Tg (1E), enquanto que o desempenho dos ratinhos TgCRND8 com *cilo*-inositol aproximou-se do das crias da mesma ninhada não Tg (1F). O comportamento das crias da mesma ninhada não Tg não foi afetado tanto pelo tratamento *epi*- (1G) como pelo *cilo*-inositol (1H). As barras verticais representam S.E.M.

As Figuras 2A-2I mostram aos 6 meses de idade, a carga da placa e astrogliose em ratinhos TgCRND8 tratados com *epi*- e *cilo*-inositol. Os animais de controlo têm uma elevada carga de placa e astrogliose no hipocampo (2A) e córtex cerebral (2B). Uma ampliação maior demonstra que a ativação astrocitária não está associado apenas à carga de placa (2C). O tratamento com *epi*-inositol tem um efeito modesto sobre a carga amiloide com uma diminuição da astrogliose (2D, 2E e 2F). O tratamento com *cilo*-inositol diminuiu significativamente a carga amiloide e a gliose (2G, 2H, e 2I). Uma ampliação maior ilustra o menor tamanho de placa médio em ratinhos tratados com *cilo*-inositol (2I). Os astrócitos foram rotulados com anticorpo anti-GFAP e a carga de placa foi identificada utilizando anticorpo anti-A $\beta$ . Barras com escala 450 micra (A, B, D, E, G, H) e 94 micra (C, F, I).

As Figuras 3A-3D mostram que a espécie A $\beta$ , 1-42, 1-40 e 1-38, em ratinhos TgCRND8 de controlo e tratados foi indistinguível (3A), como foi o grau de processamento de APP (3B). A carga amiloide vascular foi quantificada em secções sagitais em série em ratinhos TgCRND8 tratados e não tratados. Os ratinhos TgCRND8 têm uma carga amiloide vascular significativa que está associada a vasos de tamanho pequeno e médio, a carga está diminuída em ratinhos

TgCRND8 tratados com *cilo*-inositol (3A). O tratamento com *cilo*-inositol diminuiu significativamente a carga vascular total, em comparação com ratinhos TgCRND8 não tratados e tratados com *epi*-inositol (3C). O *cilo*-inositol diminui a deposição de placas como ilustrado pela diminuição significativa no tamanho médio da placa (3D).

A Figura 4 mostra o efeito da água sobre a função cognitiva de ratinhos TgCRND8 e não Tg utilizando a versão de memória de referência espacial do Labirinto Aquático de Morris num paradigma de ensaio de três dias.

A Figura 5 mostra o efeito de *cilo*-inositol na função cognitiva dos ratinhos TgCRND8 e não Tg utilizando a versão de memória de referência espacial do Labirinto Aquático de Morris num paradigma de ensaio de três dias.

A Figura 6 mostra o efeito de *epi*-inositol na função cognitiva dos ratinhos TgCRND8 e não Tg utilizando a versão de memória de referência espacial do Labirinto Aquático de Morris num paradigma de ensaio de três dias.

A Figura 7 mostra o efeito de *mio*-inositol na função cognitiva dos ratinhos TgCRND8 e não Tg utilizando a versão de memória de referência espacial do Labirinto Aquático de Morris num paradigma de ensaio de três dias.

A Figura 8 mostra o efeito de *cilo*-inositol, *epi*-inositol e *mio*-inositol na função cognitiva dos TgCRND8 (fase de aprendizagem e teste de memória), e em comparação com ratinhos de tipo selvagem utilizando a versão de memória de referência espacial do Labirinto Aquático de Morris num paradigma de ensaio de três dias.

A Figura 9 mostra a porcentagem de área do cérebro coberta com placas em ratinhos TgCRND8 não tratados em comparação com ratos tratados com *cilo*-inositol, *epi*-inositol ou *mio*-inositol.

As Figuras 10A e 10B mostram as taxas de sobrevivência de ratinhos TgCRND8 tratados com água em comparação com *epi*-inositol ou *mio*-inositol (10A) ou em comparação com *cilo*-inositol (10B).

As Figuras 11 A-D mostram os resultados da versão de memória de referência espacial do teste de Labirinto Aquático de Morris em ratinhos TgCRND8 com 6 meses de idade, não-tratados ou tratados com manitol (A, B). Os ratinhos TgCRND8 tratados com manitol não foram significativamente diferentes dos ratinhos TgCRND8 não tratados ( $p=0,89$ ; A). O desempenho dos ratinhos TgCRND8 tratados com manitol era significativamente diferente de crias não Tg da mesma ninhada tratadas com manitol ( $p=0,05$ ; B). A carga de placa foi analisada aos 6 meses de idade, utilizando as análises de imagem quantitativas (C). Os ratinhos TgCRND8 tratados com manitol eram indistinguíveis dos ratinhos TgCRND8 não tratados quando a contagem da placa foi utilizada como uma medida da carga total de placas ( $p=0,87$ ). As barras verticais representam S.E.M.. Gráficos de Sobrevivência Cumulativos de Kaplan-Meier para ratinhos TgCRND8 tratados e não tratados com manitol (D). Os dois grupos de animais,  $n=35$  por grupo, não eram significativamente diferentes, conforme determinado pelo teste estatístico de Tarone-Ware,  $p=0,87$ .

As Figuras 12A e B mostram os resultados de um teste de memória de referência espacial em estudos de tratamento quando realizados num paradigma experimental de 3 dias. O

desempenho de ratinhos TgCRND8 tratados com *cilo*-inositol era comparável ao de crias não Tg da mesma ninhada tratadas com *cilo*-inositol ( $p = 0,38$ ; A). Em concordância, os ratinhos TgCRND8 tratados com *cilo*-inositol permaneceram indistinguíveis de crias não Tg da mesma ninhada depois de dois meses de tratamento ( $p=0,67$ , B).

As Figuras 13A e B mostram níveis de A $\beta$  dentro do SNC após a administração de várias doses de *cilo*-inositol que foram administradas uma vez por dia durante um mês a ratinhos TgCRND8 com cinco meses de idade. Os níveis de A $\beta$ 42 solúvel estavam reduzidos em todas as doses e eram significativamente diferentes dos controlos não tratados (A). Em contraste, o A $\beta$ 42 insolúvel não era significativamente diferente em todas as condições (B). As barras verticais representam S.E.M.

Figura 14. Ratinhos TgCRND8 a quem foram administradas várias doses de *cilo*-inositol, uma vez por dia durante um mês, foram analisados quanto aos níveis de A $\beta$ 40 cerebral. Nenhuma diferença foi detetada nos níveis de A $\beta$ 40 solúvel (A) e insolúvel (B) em ratinhos TgCRND8 não tratados e tratados com *cilo*-inositol em todas as doses analisadas.

A Figura 15 mostra o desempenho cognitivo de ratinhos TgCRND8 com 6 meses de idade tratados com *alo*-inositol em comparação com o das suas crias não transgênicas da mesma ninhada.

As Figuras 16A-D mostram que aos 2 meses de idade, a carga de placa em ratinhos TgPS1xAPP está diminuída em ratinhos tratados com *cilo*-inositol. Os animais de controlo têm uma carga de placa elevada no hipocampo (A) e no córtex cerebral (B). O tratamento com *cilo*-inositol diminuiu

significativamente a carga de amiloide (C, D). A carga de placa identificada utilizando anticorpo anti-A $\beta$  (castanho). Barra de escala 300  $\mu$ m.

As Figuras 17A-C mostram a quantificação da carga de placa em ratinhos TgPS1xAPP após o tratamento com *cilo*-inositol. A percentagem de área do cérebro coberta de placas (A), o tamanho médio das placas (B) e a contagem de placas (C) estavam significativamente reduzidas. As barras verticais são S.E.M.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção divulga propriedades novas, imprevisíveis e inesperadas de certos estereoisómeros de inositol em relação ao tratamento de distúrbios relacionados com a amiloide, tais como a doença de Alzheimer.

Verificou-se surpreendentemente que certos estereoisómeros de inositol e compostos relacionados bloqueiam o declínio cognitivo progressivo induzido por A $\beta$  e a patologia da placa de amiloide cerebral, e melhoram a sobrevivência, quando administrados a um modelo de ratinho transgênico da Doença de Alzheimer humana durante a fase incipiente de deposição de A $\beta$ .

Como divulgado acima, os dados anteriores sugeriram que alguns, mas não todos, os estereoisómeros de inositol podem ter um efeito sobre a agregação de amiloide em células neuronais de cultura *in vitro* (McLaurin et al., J. Biol. Chem. 275 (24):18495-18502 (2000)). Essas observações não forneceram qualquer método para prever quais, se algum, dos estereoisómeros estudados (*mio*-, *epi*-, *cilo*- e *quiro*-inositóis) teriam esses efeitos, nem se quaisquer outros

estereoisómeros teriam esses efeitos. Além disso, esses estudos não poderiam prever se quaisquer estereoisómeros de inositol teriam efeitos sobre a deposição de amiloide, defeitos cognitivos ou expectativa de vida *in vivo*. Os resultados imprevisíveis aqui apresentados mostram que apenas determinados estereoisómeros de inositol, em particular *cilo-* e *alo-*inositóis, reduzem a carga de placa amiloide, melhoram a cognição e aumentam a expectativa de vida em modelos animais de distúrbios relacionados com a amiloide, enquanto outros estudados não tiveram esses efeitos.

Estudos anteriores também sugeriram que apenas certos estereoisómeros de inositol (por exemplo, *epi-* e *cilo-*inositóis) poderão inibir a agregação *de novo* de amiloide *in vitro*. Os resultados inesperados aqui apresentados mostram que o *cilo-*inositol inibe a deposição de amiloide cerebral já estabelecida, e fá-lo no cérebro vivo. Isto não está implícito em dados *in vitro* publicados anteriormente, que consideraram apenas determinados tipos de células neuronais em cultura, e não os tecidos complexos do cérebro vivo, e apenas sugeriram que os inositóis podem inibir a agregação *de novo*, não tendo, assim, relevância para a doença estabelecida.

Dados *in vitro* anteriores também sugerem que a administração de *epi-* e *cilo-*inositol afeta os níveis de amiloide A $\beta$ 40, bem como os níveis de A $\beta$ 42. O estudo de dosagem *in vivo* aqui apresentado revelou o resultado imprevisível de que a administração de *alo-* ou *cilo-*inositol reduziu especificamente os níveis de A $\beta$ 42, enquanto que os níveis de A $\beta$ 42 insolúvel e de A $\beta$ 40 solúvel ou insolúvel não foram afetados.



A observação que mostra alterações na atividade da glia e inflamação é nova e surpreendente e não poderia ter sido prevista pelos dados *in vitro* previamente publicados.

A observação que demonstra que o *cilo*-inositol melhora a expectativa de vida em modelos animais transgênicos também é nova e surpreendente, uma vez que não foi demonstrado anteriormente que qualquer fármaco para a Doença de Alzheimer aumentasse a sobrevivência e prolongasse a expectativa de vida *in vivo*.

A presente invenção relaciona-se com a utilização de *cilo*-inositol em associação com outro tratamento.

Mesmo quando administrado depois de a patologia amiloide estar bem instalada há vários meses, o *cilo*-inositol inverte eficazmente a acumulação de A $\beta$  cerebral e a patologia amiloide.

Por conseguinte, este composto é considerado útil no tratamento ou prevenção num indivíduo de uma doença do sistema nervoso central ou periférico ou num órgão sistémico associada com um distúrbio no dobramento ou agregação de proteínas, ou na formação, deposição, acumulação, ou persistência de amiloide. Este composto é também considerado útil na prevenção do dobramento anormal de proteína, agregação anormal de proteína, na formação, deposição, acumulação ou persistência de amiloide, ou interações amiloide lípidos, originando também a dissociação de proteínas anormalmente agregadas e/ou a dissolução ou rutura de fibrilha de amiloide ou amiloide pré-formado ou pré-depositado num indivíduo.

De um modo preferido, a patologia do sistema nervoso central ou periférico ou órgão sistémico resulta na deposição de proteínas, fragmentos de proteínas e péptidos em lâminas e/ou fibrilhas e/ou agregados beta-pregueados. De um modo mais preferido, a patologia do sistema nervoso central ou periférico ou órgão sistémico é selecionada do grupo de: doença de Alzheimer, formas pré-senis e senis; angiopatia amiloide; deterioração cognitiva ligeira; demência relacionada com a doença de Alzheimer; taupatia;  $\alpha$ -sinucleinopatia; doença de Parkinson; Esclerose Lateral Amiotrófica; doença do neurónio motor; Paraplegia espástica; doença de Huntington, ataxia espinocerebelar, Ataxia de Friedrich; doenças neurodegenerativas associadas a agregados intracelulares e/ou intraneuronais de proteínas com poliglutamina, polialanina ou outras repetições decorrentes de expansões patológicas de elementos tri- ou tetra-nucleótidos no seio de genes correspondentes; doenças cerebrovasculares; Síndrome de Down; traumatismo craniano com acumulação pós-traumática de péptido beta-amiloide; doença relacionada com Priões; Demência Familiar Britânica; Demência Familiar Dinamarquesa; Demência Pré-senil com Ataxia Espástica; Angiopatia Amiloide Cerebral, tipo Britânico; Demência Pré-senil com Ataxia Espástica Angiopatia Amiloide Cerebral, Tipo Dinamarquês; Encefalopatia com corpos de inclusão de neuroserpina, forma familiar (FENIB); Polineuropatia amiloide; Miosite de Corpos de Inclusão devido ao péptido beta-amiloide; Amiloidose do tipo Familiar e Finlandês; Amiloidose sistémica associada ao mieloma múltiplo; Febre Familiar do Mediterrâneo; infeções e inflamações crónicas; e Diabetes Mellitus Tipo II associado ao polipeptídeo amiloide dos ilhéus (IAPP).

Também, de um modo preferido, as demências relacionadas com a doença de Alzheimer são vasculares ou a

demência de Alzheimer e taupatia selecionadas a partir do grupo de demência com grãos argirofílicos, degeneração corticobasal, demência pugilística, emaranhados neurofibrilhares difusos com calcificação, demência frontotemporal com parkinsonismo, doença relacionada com Priões, doença de Hallervorden-Spatz, distrofia miotónica, doença de Niemann-Pick do tipo C, doença do Neurónio Motor não de Guam com emaranhados neurofibrilhares, doença de Pick, parkinsonismo pós-encefalítico, angiopatia amiloide cerebral por proteínas de priões, gliose subcortical progressiva, paralisia supranuclear progressiva, panencefalite esclerosante subaguda e demência apenas com emaranhados.

Também de um modo preferido, a  $\alpha$ -sinucleinopatia é selecionada a partir do grupo de demência com corpos de Lewy, atrofia de múltiplos sistemas com inclusões citoplasmáticas gliais, síndrome de Shy-Drager, degeneração do estriado negro, atrofia olivopontocerebelar, neurodegeneração com acumulação de ferro cerebral do tipo I, disfunção olfativa e esclerose lateral amiotrófica.

Novamente, de um modo preferido, a Doença do Neurónio Motor está associada a filamentos e agregados de neurofilamentos e/ou proteínas de superóxido dismutase, a paraplegia Espástica está associada ao funcionamento defeituoso de proteínas chaperones e/ou triplo A e a ataxia espinocerebelar é DRPLA ou Doença de Machado-Joseph.

Também, de um modo preferido, a doença relacionada com Priões é selecionada de entre o grupo da doença de Creutzfeldt-Jakob, doença de Gerstmann-Straussler-Scheinker, e variante da doença de Creutzfeldt-Jakob e a Polineuropatia Amiloide é polineuropatia amiloide Senil ou Amiloidose Sistémica.

De um modo mais preferido, a patologia do sistema nervoso central ou periférico ou órgão sistémico é a doença de Parkinson, incluindo tipos familiares e não familiares. De um modo muito preferido, a patologia do sistema nervoso central ou periférico ou órgão sistémico é a doença de Alzheimer.

De um modo preferido, o composto é administrado ao indivíduo a uma dose de cerca de 1 mg a cerca de 1 g por kg, de um modo preferido 1 mg a cerca de 200 mg por kg, de um modo mais preferido 10 mg a cerca de 100 mg por kg, e de um modo muito preferido cerca de 30 mg a 70 mg por kg do peso do referido indivíduo. A administração pode ser realizada por uma variedade de modos, tais como por via oral (comprimido oral, líquido ou suspensão oral), por via intravenosa, por via intramuscular, por via intraperitoneal, por via intradérmica, por via transcutânea, por via subcutânea, por via intranasal, por via sublingual, por supositório retal ou por inalação, sendo a administração oral a mais preferida. A administração dos compostos da presente invenção pode ser realizada em vários intervalos, tais como uma vez por dia, duas vezes por dia, uma vez por semana, uma vez por mês, ou de forma contínua.

O *cilo*-inositol é administrado em associação com outros tratamentos tais inibidores de beta-secretase, inibidores de gama-secretase (específicos ou não específicos de APP), inibidores de épsilon-secretase (específicos ou não específicos de APP), outros inibidores da formação de folhas beta/fibrilogénese/formação de ADDL (por exemplo Alzhemed), antagonistas de NMDA (por exemplo, memantina), compostos anti-inflamatórios não-esteroides (por exemplo, Ibuprofeno, Celebrex), antioxidantes (por

exemplo, Vitamina E), hormonas (por exemplo, estrogénios), nutrientes e suplementos alimentares (por exemplo, Ginkgo biloba); inibidores de acetilcolinesterase (por exemplo donezepil), agonista muscarínico (por exemplo, AF102B (Cevimelina, EVOXAC), AF150(S), e AF267B), antipsicóticos (por exemplo, haloperidol, clozapina, olanzapina); antidepressivos incluindo tricíclicos e inibidores de reabsorção de serotonina (por exemplo, Sertralina e Citalopram Hb), terapia genética e/ou abordagens à base de fármacos para regular positivamente a neprilisina (uma enzima que degrada A $\beta$ ); terapia genética e/ou abordagens à base de fármacos para regular positivamente a enzima de degradação da insulina (uma enzima que degrada A $\beta$ ), vacinas, agentes imunoterapêuticos e anticorpos para A $\beta$  (por exemplo ELAN AN-1792), as estatinas e outros fármacos para diminuir o colesterol (por exemplo, Lovastatina e Sinvastatina), terapias à base de células estaminais e outras células, inibidores de quinases (CDK5, GSK3 $\alpha$ , GSK3 $\beta$ ) que fosforilam a proteína TAU (por exemplo, cloreto de lítio) ou inibidores de quinases que modulam a produção de A $\beta$  (quinases GSK3 $\alpha$ , GSK3 $\beta$ , Rho/ROCK) (por exemplo, cloreto de lítio e ibuprofeno).

Crê-se que estas outras terapias atuam através de um mecanismo diferente e possam ter efeitos aditivos/sinérgicos com a presente invenção. Além disso, muitas destas outras terapias terão efeitos secundários baseados no mecanismo e/ou outros que limitam a dose ou o período em que podem ser administrados sozinhos.

O *cilo*-inositol é também útil no diagnóstico da presença de proteína anormalmente dobrada ou agregada e/ou fibrilhas de amiloide ou amiloide num indivíduo utilizando um método que compreende a administração ao referido indivíduo de um composto radioativo ou composto marcado com

uma substância que emite um sinal detetável, numa quantidade suficiente e sob condições que permitam a ligação do referido composto à proteína anormalmente dobrada ou agregada e/ou às fibrilas ou amiloide, caso estejam presentes; e a detecção da radioatividade ou do sinal a partir do composto ligado à proteína anormalmente dobrada ou agregada e/ou às fibrilas ou amiloide, diagnosticando assim a presença de proteína anormalmente dobrada ou agregada e/ou fibrilas de amiloide ou amiloide.

Alternativamente, uma amostra suspeita de conter proteína anormalmente dobrada ou agregada e/ou fibrilas de amiloide ou amiloide é recolhida de um indivíduo e faz-se contactar com um composto radioativo ou com um composto marcado com uma substância que emite um sinal detetável sob condições que permitam a ligação do referido composto à proteína anormalmente dobrada ou agregada e/ou às fibrilas de amiloide ou amiloide, caso estejam presentes; e posteriormente detetar a radioatividade ou o sinal a partir do composto ligado à proteína anormalmente dobrada ou agregada e/ou às fibrilas ou amiloide, diagnosticando assim a presença de proteína anormalmente dobrada ou agregada e/ou fibrilas de amiloide ou amiloide no referido indivíduo.

De um modo preferido, o referido sinal detetável é um sinal fluorescente ou de um ensaio de imunoabsorção enzimática e a referida amostra é sangue total (incluindo todos os componentes celulares) ou plasma.

Tal como aqui demonstrado abaixo, o *cilo*-inositol pode abolir a acumulação cerebral de A $\beta$ , a deposição de placas amiloides cerebrais, e o declínio cognitivo num modelo de ratinho transgénico da Doença de Alzheimer quando administrado durante a fase "pré-sintomática tardia", antes

do aparecimento de défices cognitivos declarados e neuropatologia amiloide nestes ratinhos. Além disso, mesmo quando administrado após o início dos défices cognitivos e da neuropatologia da placa amiloide, o *cilo*-inositol pode inverter eficazmente a deposição de amiloide e a neuropatologia. É importante ressaltar que o mecanismo de ação deste composto segue uma conceção racional com base na sua capacidade para modular a montagem de monómeros de A $\beta$  em oligómeros e/ou protofibrilhas neurotóxicos.

Os exemplos são apenas para referência.

### **Exemplo 1 - Desenvolvimento do modelo de ratinho de Alzheimer e métodos de administração dos compostos**

Os ratinhos TgCRND8 são um modelo murino robusto da doença de Alzheimer, tal como descrito por Janus et al. (Nature 408: 979-982 (2000)). Eles expressam um transgene de proteína precursora de amiloide humana (APP695) sob a regulação do promotor do prião de cobaio Sírio numa base não consanguínea C3H/B6. O transgene APP695 tem duas mutações que causam DA em humanos (K670N/M671L e V717F). Com início a cerca dos 3 meses de idade, os ratinhos TgCRND8 têm défices de aprendizagem espacial progressivos que são acompanhados pelo aumento dos níveis cerebrais de A $\beta$  e por um número crescente de placas de amiloide extracelular cerebral que são semelhantes às observadas nos cérebros de seres humanos com DA (C. Janus et al, Nature 408: 979-982 (2000)).

Grupos de ratinhos TgCRND8 agrupados por idade e sexo e crias não transgénicas da mesma ninhada (n=35 em cada grupo) ou não foram tratados ou foi-lhes administrado um composto da presente invenção tal como indicado abaixo a 30

mg/dia/ratinho com início nas cerca de 6 semanas de idade. Os ratinhos foram acompanhados para obter resultados das determinações da função cognitiva, níveis cerebrais de A $\beta$ , patologia cerebral e sobrevivência aos 4 e 6 meses de idade.

#### Métodos dos Estudos de Prevenção

**Ratinhos** - Grupos experimentais de ratinhos TgCRND8 foram alimentados com *mio-*, *epi-* e *cilo-*inositol a 30 mg/ratinho/dia. Dois grupos entraram no estudo às 6 semanas de idade e os resultados foram analisados aos 4 e 6 meses de idade. O peso corporal, as características da pelagem e o comportamento na gaiola foram monitorizados. Todas as experiências foram realizadas de acordo com as orientações do Canadian Council on Animal Care.

**Testes comportamentais** - Após treino prévio não espacial, os ratinhos foram submetidos a treino de discriminação de local durante 5 dias com 4 ensaios por dia. Os dados comportamentais foram analisados utilizando um modelo misto de análise fatorial da variância (ANOVA) com fármaco ou genótipo e sessões de treino como fatores de medidas repetidas.

**Carga cerebral de amiloide** - Os cérebros foram removidos e um hemisfério foi fixo em paraformaldeído a 4% e embebidos em cera de parafina no plano sagital médio. Para gerar conjuntos de secções aleatórias uniformes sistemáticas, foram recolhidos cortes em série de 5 $\mu$ m em todo o hemisfério. Foram utilizados conjuntos de secções em intervalos de 50 $\mu$ m para análises (10-14 secções/conjunto). As placas foram identificadas após recuperação do antigénio com ácido fórmico, e incubadas com o anticorpo primário



anti-A $\beta$  (Dako M-0872), seguido pelo anticorpo secundário (conjunto de Dako StreptABCcomplex /rábano). Os produtos finais foram visualizados com DAB contracolorados com hematoxilina. A carga de placa amiloide foi avaliada utilizando o *software* de análise de imagem Leco IA-3001 em interface com um microscópio Leica ligado a uma câmara de vídeo Hitachi KP-MIU CCD. A carga vascular foi analisada de forma semelhante e foi utilizado um dissecador para medir o diâmetro dos vasos afetados.

**Conteúdo de A $\beta$  Cerebral e Plasmático** - Amostras de metades de cérebro foram homogeneizadas numa solução de sacarose tamponada, seguido de ou dietilamina a 0,4%/NaCl 100 mM para níveis de A $\beta$  solúvel, ou ácido fórmico frio para o isolamento da A $\beta$  total. Após neutralização, as amostras foram diluídas e analisadas quanto a A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 utilizando *kits* disponíveis no mercado (BIOSOURCE International). Cada hemisfério foi analisado em triplicado com indicação da média  $\pm$  S.E.M.. Foram realizadas análises por transferência de Western em todas as frações utilizando géis de ureia para as análises de espécies de A $\beta$ . A A $\beta$  foi detetada utilizando 6E10 (BIOSOURCE International) e Quimioluminescência Intensificada (Amersham).

**Análise de APP no cérebro** - Amostras de metades de cérebro de ratinho foram homogeneizadas em Tris 20 mM pH 7,4, sacarose 0,25 M, EDTA 1 mM e EGTA 1 mM, e uma mistura de inibidores de protease, misturada com DEA (dietilamina) a 0,4%/NaCl 100 mM e centrifugada a 109.000 Xg. Os sobrenadantes foram analisados quanto aos níveis de APP por transferência de Western utilizando mAb 22C11, enquanto que os sedimentos foram analisados quanto à holoproteína APP utilizando mAb C1/6.1.

**Quantificação da Gliose** - Cinco secções sagitais, espaçadas uniformemente, selecionadas aleatoriamente, foram recolhidas de hemisférios fixos com paraformaldeído e congelados de ratinhos tratados e de controlo. As secções foram imunomarcadas para astrócitos com anti-IgG<sub>2a</sub> GFPA de rato (Dako, diluído 1:50) e para microglia com anti-IgG<sub>2b</sub> CD68 de rato (Dako; 1:50). As imagens digitais foram obtidas com uma câmara fotográfica digital CoolSnap (Photometrics, Tuscon, Arizona) montado num microscópio Zeiss Axioscope 2 Plus. As imagens foram analisadas utilizando o *software* de imagem Openlab 3.08 (Improvision, Lexington MA).

**Censo de Sobrevivência** - A probabilidade de sobrevivência foi avaliada pela técnica de Kaplan-Meier, calculando a probabilidade de sobrevivência a cada ocorrência de morte, tornando-a assim adequada para tamanhos de amostra pequenos. Para as análises de sobrevivência, foram utilizados 35 ratinhos em cada grupo de tratamento. A comparação entre os tratamentos foi descrita utilizando o teste de Tarone-Ware.

### **Exemplo 2 - Prevenção de défices cognitivos**

A função cognitiva de ratinhos TgCRND8 foi avaliada utilizando a versão de memória de referência espacial do Labirinto Aquático de Morris utilizando um paradigma de ensaio de cinco dias (Figuras 1C-1H). Os dados dos ratinhos TgCRND8 tratados e não tratados, e de crias não Tg tratadas e não tratadas da mesma ninhada (n = 10 para todas as combinações) foram analisados utilizando um modelo misto de análise de variância (ANOVA) com tratamento (não tratados, *epi*- ou *cilo*-inositol) e genótipo (TgCRND8 versus não Tg) como fatores "entre indivíduo". Os ratinhos TgCRND8

tratados com *epi*- ou *cilo*-inositol tiveram um desempenho significativamente melhor do que os ratinhos TgCRND8 não tratados ( $p < 0,02$ ; Figs. 1C e D). Quando comparados com crias não Tg da mesma ninhada tratadas ou não tratadas, os ratinhos TgCRND8 tratados com *epi*-inositol tiveram uma curva de aprendizagem ligeiramente mais lenta durante os três primeiros dias de treino. No entanto, após 4 dias de treino, os ratinhos TgCRND8 tratados com *epi*-inositol não eram estatisticamente diferentes das crias não Tg da mesma ninhada (Fig. 2E). Em contraste, os ratinhos TgCRND8 tratados com *cilo*-inositol eram indistinguíveis das crias não Tg da mesma ninhada em todos os dias. Assim, ambos os estereoisómeros inibiram o desenvolvimento de défices cognitivos, e o *cilo*-inositol realmente impediu os défices a um tal grau que os ratinhos TgCRND8 tratados com *cilo*-inositol eram indistinguíveis dos ratinhos normais. Este desempenho melhorado não foi devido a um efeito não específico sobre sistemas comportamentais, motores ou perceptuais porque o tratamento com *epi*- e *cilo*-inositol não teve qualquer efeito sobre o desempenho dos ratinhos não Tg (figuras 2G e 2H). O desempenho melhorado também não foi devido aos efeitos nutricionais ou calóricos porque o peso do corpo, a atividade e a condição de pelagem não eram diferentes entre os grupos tratados e não tratados. Além disso, o tratamento com manitol (um açúcar de peso molecular semelhante) não teve nenhum efeito sobre o comportamento. Os efeitos de género não eram significativos entre qualquer grupo de tratamento ( $p=0,85$ ).

### **Exemplo 3 - Redução da Carga cerebral de A $\beta$ e Neuropatologia Amiloide**

Aos quatro meses de idade, os ratinhos TgCRND8 não tratados têm uma expressão robusta de A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 (Tabela

1). O tratamento com *epi*-inositol, tal como descrito no Exemplo 1, reduziu os níveis tanto de A $\beta$ 40 (redução de  $43 \pm 2\%$  em ambos os conjuntos solúveis e insolúveis,  $p \leq 0,05$ ) como de A $\beta$ 42 (redução de 69% no conjunto solúvel,  $p=0,05$ ; redução de 28% no conjunto insolúvel,  $p=0,02$ ) aos 4 meses de idade. No entanto, estas melhorias não foram sustentadas, e aos 6 meses de idade, os níveis cerebrais de A $\beta$  aumentaram para níveis semelhantes aos observados em ratinhos TgCRND8 não tratados (Tabela 1).

Em contraste, aos quatro meses de idade, o tratamento com *cilo*-inositol diminuiu o A $\beta$ 40 cerebral total em 62% ( $p=0,0002$ ) e o A $\beta$ 42 cerebral total em 22% ( $p=0,0096$ ; Tabela 1). Aos 6 meses de idade, o tratamento com *cilo*-inositol causou uma redução de 32% dos níveis de A $\beta$ 40 ( $p=0,04$ ) e 20% de redução de A $\beta$ 42 ( $p=0,02$ ) em comparação com ratinhos TgCRND8 não tratados.

Uma vez que as concentrações diminuídas de A $\beta$  detetadas após o tratamento com inositol poderiam ter resultado do efluxo alterado de A $\beta$  para o plasma, níveis de A $\beta$ - $\beta$  no plasma foram examinados aos 4 e 6 meses de idade (Tabela 1). Os ratinhos TgCRND8 têm concentrações plasmáticas elevadas de A $\beta$  aos 4 meses de idade e permanecem constantes aos 6 meses de idade, apesar da carga de placa no SNC estar ainda a aumentar aos 6 meses de idade (Tabela 1). Nem o tratamento com *epi*-inositol nem com *cilo*-inositol teve qualquer efeito sobre os níveis plasmáticos de A $\beta$  em comparação com ratinhos TgCRND8 não tratados ( $p=0,89$ ). A explicação mais parcimoniosa para esta observação é que o inositol alterou seletivamente a fibrilhação de A $\beta$  no SNC, mas não afetou a atividade de  $\beta$ - ou  $\gamma$ -secretase, ou os mecanismos normais de eliminação do A $\beta$  para o plasma. No entanto, esta observação é

significativa por duas razões. Primeiro, uma queda nos níveis de A $\beta$  no plasma e CSF é normalmente detetada à medida que o percurso clínico progride em pacientes com DA não tratados (Mayeux et al., Ann., Neurol. 46, 412, 2001). Em segundo lugar, os pacientes do estudo de imunização com AN1792 que desenvolveram uma forte resposta ao anticorpo e uma resposta clínica aparente não tiveram níveis plasmáticos de A $\beta$ - $\beta$  alterados (Hock et al., Neuron 38: 547 2003). Portanto, estes resultados indicam que não é necessário alterar os níveis plasmáticos de A $\beta$  para se obter um resultado terapêutico eficaz.

Para confirmar que os estereoisômeros do inositol não tiveram qualquer efeito sobre a expressão ou o processamento proteolítico da APP, foram examinados os níveis de holoproteína APP, sAPP- $\alpha$ , e várias espécies de A $\beta$  no cérebro de ratinhos TgCRND8 tratados com inositol e não tratados. De acordo com os nossos dados reportados anteriormente (McLaurin, et al., Nat. Med. 8, 1263, 2002), A $\beta$ 42, A $\beta$ 40 e A $\beta$ 38 são as espécies predominantes no cérebro de ratinhos TgCRND8 (Figura 3A), e os níveis no SNC de APP glicosilado imaturo e maduro (Figura 3B), e de sAPP- $\alpha$  eram indistinguíveis, independentemente do tratamento. Em conjunto, estes resultados indicam que o *epi*- e o *cilo*-inositol têm um efeito direto e seletivo na oligomerização de A $\beta$  e não no processamento de APP.

As alterações da carga de péptido A $\beta$ - $\beta$  foram acompanhadas por uma diminuição significativa na carga de placa (Tabela 1, Figuras 2A-2I). Nos ratinhos TgCRND8 tratados com *epi*-inositol, houve uma redução significativa no tamanho médio de placa aos 4, mas não aos 6 meses de idade em comparação com ratinhos TgCRND8 não tratados ( $95 \pm 4,3 \mu\text{m}^2$  versus  $136 \pm 15 \mu\text{m}^2$ ,  $p = 0,04$ ;  $370 \pm 9 \mu\text{m}^2$  versus  $423 \pm 22 \mu\text{m}^2$ ,  $p = 0,06$ , respetivamente). Estes resultados

indicam que a níveis de A $\beta$  modestos, o *epi*-inositol impede a oligomerização de A $\beta$ , mas uma vez iniciada a concentrações mais elevadas de A $\beta$ , o *epi*-inositol é incapaz de inibir a fibrilogénese. O tratamento com *cilo*-inositol diminuiu o tamanho médio de placa de  $136 \pm 15 \mu\text{m}^2$  para  $103 \pm 4 \mu\text{m}^2$  ( $p = 0,01$ ) aos 4 meses de idade. Em ratinhos TgCRND8 tratados com *cilo*-inositol aos 6 meses de idade, a diminuição dos níveis de péptido A $\beta$  foi acompanhada por uma redução de 20% no número de placas ( $p = 0,005$ ), uma diminuição de 35% na área cerebral coberta com placas ( $p = 0,015$ ) e uma diminuição do tamanho de placa médio ( $339 \pm 10$  vs.  $423 \pm 21 \mu\text{m}^2$ ,  $p = 0,009$ ). Estes resultados demonstram que por cada medida, houve uma redução na carga de placa após o tratamento com *cilo*-inositol.

Tabela 1. O tratamento com inositol diminui os Níveis de A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42

	Aβ40 (ng/g cérebro húmido ± s.e.m.)		Aβ42 (ng/g cérebro húmido ± s.e.m.)		Aβ Total	Contagem da Placa	Área de Placa (µm <sup>2</sup> )	Área Total de Placa / Área Total de Cérebro (%)
	Solúvel	Insolúvel	Solúvel	Insolúvel				
4 meses de prevenção								
Controlo	75±6	1163±9	273±18	5658±248	7169±284	696±25	100766±7564	0,026±0,004
Epi- Inositol	43±7*	615±32†	85±7†	4059±179*	4802±176	678±64	65042±5199	0,020±0,001
Cilo- Inositol	37±5*	437±80†	206±8*	4409±135*	5089±173	598±19*	63847±2895	0,015±0,001*
6 meses de prevenção								
Controlo	187±29	3576±172	626±87	15802±237	20191±211	960±44	411288±11912	0,120±0,001
Epi- Inositol	188±24	3668±149	665±39	13943±277†	18464±229	979±32	380456±13498	0,096±0,04
Cilo- Inositol	105±8*	2453±251*†	475±26*	12588±82†	15621±151	774±10*†	262379±5373†	0,079±0,013†
	Níveis Plasmáticos de Aβ (pg/mL)							
	4 meses de			6 meses de				

Aβ40 (ng/g cérebro húmido ± s.e.m.)		Aβ42 (ng/g cérebro húmido ± s.e.m.)		Aβ Total	Contagem da Placa	Área de Placa (µm <sup>2</sup> )	Área Total de Placa / Área Total de Cérebro (%)
Solúvel	Insolúvel	Solúvel	Insolúvel				
4 meses de prevenção							
		prevenção		prevenção			
Controlo		1018±27		915±59			
Epi-Inositol		1082±164		952±56			
Cilo-Inositol		952±49		905±55			
Anova com PLSD de Fisher, † p<0,001 e * p<0,05							

#### **Exemplo 4 - Redução da atividade da glia e da inflamação**

As reações astrogliais e microgliais são características neuropatológicas da DA tanto humana como de todos os modelos de ratinho amiloide (Irizarry et al., J Neuropathol Exp Neurol. 56, 965, 1997; KD. Bornemann et al. Ann N Y Acad Sci 908 260 2000). Portanto, o efeito do tratamento com *epi*- e *cilo*-inositol foi investigado na astrogliose e microgliose nos cérebros de ratinhos TgCRND8 (Figuras 3A-3D). Secções sagitais em série foram coradas com o marcador astrocítico de proteína ácida fibrilhar glial (GFAP) e quantificadas quanto à percentagem de área do cérebro coberta por astrogliose. Os ratinhos TgCRND8 têm uma astrogliose basal elevada aos 4 meses de idade (0,459 $\pm$ 0,048%), que aumenta ligeiramente pelos 6 meses de idade (0,584 $\pm$ 0,089%), e que não é limitada às áreas da placa (Figuras 2A-C). O *epi*-inositol diminuiu a resposta astrogliótica para 0,388 $\pm$ 0,039% aos 6 meses de idade (p=0,04; Fig. 2D-F). O *cilo*-inositol, por outro lado, diminuiu a astrogliose muito mais eficazmente para 0,269 $\pm$ 0,028% aos 6 meses de idade (p=0,006) (Fig. 2G-I). A ativação da microglia também foi atenuada significativamente em ratinhos TgCRND8 tratados com *cilo*-

inositol ( $0,20 \pm 0,008\%$  de área cerebral), quando comparado com ratinhos TgCRND8 não tratados agrupados por idade e sexo ( $0,31 \pm 0,01\%$ ,  $p < 0,001$ ). No entanto, os ratinhos tratados com *epi*-inositol não demonstraram redução significativa na ativação da microglia aos 6 meses ( $0,248 \pm 0,02\%$ ,  $p = \text{NS}$ ). Tomados em conjunto, estes dados indicam que o tratamento com *cilo*-inositol diminui a resposta inflamatória induzida por A $\beta$  no SNC.

### **Exemplo 5 - Redução da carga de amiloide vascular**

A doença de Alzheimer é caracterizada pela presença de depósitos parenquimatosos e vasculares de amiloide. Em ratinhos TgCRND8 não tratados com seis meses de idade aproximadamente  $0,03\%$  da área do cérebro está associada a amiloide vascular. Não foi possível detetar diferença na carga amiloide vascular após o tratamento com *epi*-inositol aos 6 meses de idade (Figura 3C). Em contraste, o tratamento com *cilo*-inositol diminuiu significativamente a carga amiloide vascular ( $p = 0,05$ ) (Fig. 3C), e a deposição amiloide estava predominantemente localizada em vasos mais pequenos,  $< 25 \mu\text{m}^2$  de diâmetro ( $56 \pm 2\%$  versus  $70 \pm 8\%$ , em pequenos vasos em ratinhos TgCRND8 não tratados). O tamanho médio das placas cerebrovasculares foi significativamente diminuído nos ratinhos tratados com *cilo*-inositol em comparação com os ratinhos não tratados ( $154 \pm 16$  versus  $363 \pm 34$ ,  $p = 0,008$ ; Figura 3D).

### **Exemplo 6 - Melhoria da Sobrevivência**

Os ratinhos TgCRND8 têm uma sobrevivência de 50% aos 175 dias, que após o tratamento foi melhorada para 72% com *cilo*-inositol ( $n=35$  por grupo,  $p < 0,02$  para *cilo*-inositol versus controlo, Figura 10B). O tratamento com *mio*-inositol



não afetou significativamente a sobrevivência global (Figura 10A). Experiências de controle confirmaram que a sobrevivência melhorada dos ratinhos tratados com *cilo*-inositol não foi um efeito indireto do aumento da ingestão calórica. Assim, o tratamento de ratinhos de tipo selvagem com *cilo*-inositol não teve qualquer efeito na sobrevivência ou noutros parâmetros, tais como o peso, o estado da pelagem ou o comportamento na gaiola. Além disso, o peso, o estado da pelagem e o comportamento na gaiola de alojamento dos ratinhos TgCRND8 tratados com inositol não variaram dos de ratinhos TgCRND8 não tratados. Experiências simultâneas com manitol, um açúcar simples de peso molecular semelhante, também não tiveram nenhum efeito sobre a sobrevivência de ratinhos TgCRND8.

#### **Exemplo 7 - Tratamento e Inversão da deposição de amiloide**

Tomados em conjunto, os estudos de prevenção demonstraram que o *cilo*-inositol inibe a deposição de amiloide parenquimatosa cerebrovascular e resulta em melhoria na sobrevivência e função cognitiva no modelo de rato TgCRND8 da doença de Alzheimer. No entanto, a maioria dos doentes com doença de Alzheimer, provavelmente só irá procurar tratamento quando têm sintomas e quando a oligomerização, deposição, toxicidade e formação de placas A $\beta$  estão já bastante avançados no SNC. Um estudo piloto foi, portanto, iniciado em ratinhos TgCRND8 com 5 meses de idade. Estes ratinhos têm cargas de placa e A $\beta$  significativas que são comparáveis às do cérebro dos seres humanos com a DA.

### Métodos de Estudo dos Tratamentos

**Ratinhos** - A grupos experimentais de ratinhos TgCRND8 foram administrados *mio-*, *epi-* e *cilo-*inositol a 30 mg/ratinho/dia. Um grupo entrou no estudo aos 5 meses de idade e os resultados foram analisados aos 6 meses de idade. O peso corporal, as características da pelagem e o comportamento na gaiola foram monitorizados. Todas as experiências foram realizadas sobre as orientações do Canadian Council on Animal Care.

**Censo de Sobrevivência** - A probabilidade de sobrevivência foi avaliada pela técnica de Kaplan-Meier, calculando a probabilidade de sobrevivência em cada ocorrência de morte, tornando-a assim adequada para tamanhos de amostra pequenos. Para as análises de sobrevivência, foram utilizados 35 ratinhos para cada grupo de tratamento. A comparação entre os tratamentos foi descrita utilizando o teste de Tarone-Ware.

**Teste Comportamental** - Estudo de Inversão - Os ratinhos participaram no teste do Labirinto Aquático de Morris com uma plataforma escondida no dia um sem treino prévio. Os ratinhos foram testados durante 3 dias com seis ensaios por dia. Ao quarto dia, a plataforma foi removida da piscina e cada ratinho recebeu um ensaio de natação de 30 s. No último dia, os animais foram submetidos a um teste indicativo, a fim de avaliar a capacidade para nadar, a visão e a cognição em geral. O teste indicativo é constituído pela plataforma colocada num quadrante diferente do que o utilizado no ensaio e é identificada com uma bandeira. Os animais são deixados 60 s para encontrar a plataforma. Os animais que não encontram a plataforma não são utilizados nas análises finais de memória espacial. Os

dados sobre o comportamento foram analisados utilizando um modelo misto de análise fatorial de variância (ANOVA) com fármacos ou genótipo e sessões de treino como fatores de medidas repetidas.

**Carga cerebral de amiloide** - Os cérebros foram removidos e um hemisfério foi fixo em paraformaldeído a 4% e embebidos em cera de parafina no plano sagital médio. Para gerar conjuntos de secções aleatórias uniformes sistemáticas, foram recolhidos cortes em série de 5µm em todo o hemisfério. Foram utilizados conjuntos de secções em intervalos de 50mm para análises (10-14 secções/conjunto). As placas foram identificadas após recuperação do antigénio com ácido fórmico, e incubadas com o anticorpo primário anti-Aβ (Dako M-0872), seguido pelo anticorpo secundário (conjunto de Dako StreptABCcomplex /rábano). Os produtos finais foram visualizados com DAB contracolorados com hematoxilina. A carga de placa amiloide foi avaliada utilizando o *software* de análise de imagem Leco IA-3001 em interface com um microscópio Leica ligado a uma câmara de vídeo Hitachi KP-M1U CCD.

**Conteúdo de Aβ Cerebral e Plasmático** - Amostras de metades de cérebro foram homogeneizadas numa solução de sacarose tamponada, seguido de ou dietilamina a 0,4%/NaCl 100 mM para níveis de Aβ solúvel, ou ácido fórmico frio para o isolamento da Aβ total. Após neutralização, as amostras foram diluídas e analisadas quanto a Aβ40 e Aβ42 utilizando kits disponíveis no mercado (BIOSOURCE International). Cada hemisfério foi analisado em triplicado com indicação da média ± S.E.M..

**Resultados e Significância** - Todos os animais que entraram no estudo de inversão sobreviveram e não

apresentaram sinais exteriores de angústia ou toxicidade. A função cognitiva dos ratinhos TgCRND8 foi avaliada utilizando a versão de memória de referência espacial do Labirinto Aquático de Morris utilizando um paradigma de ensaio de três dias (Figuras 4-8). Os dados dos ratinhos TgCRND8 tratados e não tratados, e de crias não Tg tratadas e não tratadas da mesma ninhada ( $n = 10$  para todas as combinações) foram analisados utilizando um modelo misto de análise de variância (ANOVA) com tratamento (não tratados, *mio*-, *epi*- ou *cilo*-inositol) e genótipo (TgCRND8 versus não Tg) como fatores "entre indivíduo". Neste paradigma, os ratinhos TgCRND8 estavam significativamente prejudicados em comparação com crias da mesma ninhada de tipo selvagem (Figura 4). Em contraste, os ratinhos TgCRND8 tratados com *cilo*-inositol eram indistinguíveis de crias não Tg da mesma ninhada em todos os dias. ( $p=0,38$ ; Figura 5). Quando comparados com crias não Tg tratadas da mesma ninhada, os ratinhos TgCRND8 tratados com *epi*-inositol eram praticamente significativamente diferentes ( $p=0,07$ ; Figura 6). Da mesma forma, os ratinhos TgCRND8 tratados com *mio*-inositol eram significativamente diferentes de crias não Tg tratadas da mesma ninhada ( $p=0,05$ , Figura 7). Quando a fase de aprendizagem do teste do Labirinto Aquático de Morris é comparada entre os tratamentos, todos os ratinhos apresentaram comportamento semelhante (Figura 8). Em contraste, apenas o *cilo*-inositol era indistinguível de crias não Tg da mesma ninhada (Figura 8). Assim, o *cilo*-inositol realmente inverteu os défices cognitivos de tal forma que os ratinhos TgCRND8 tratados com o *cilo*-inositol eram indistinguíveis dos ratos normais. Este desempenho melhorado não foi devido a um efeito não específico sobre sistemas comportamentais, motores ou perceptuais porque o tratamento com *epi*- e *cilo*-inositol não teve qualquer efeito sobre o desempenho dos ratinhos não Tg. O desempenho

melhorado também não foi devido aos efeitos nutricionais ou calóricos porque o peso do corpo, a atividade e a condição de pelagem não eram diferentes entre os grupos tratados e não tratados.

De forma a determinar se a cognição melhorada estava associada com a diminuição da carga de placa e carga de A $\beta$ , o tecido cerebral foi examinado *post mortem*. As alterações na cognição foram acompanhadas por uma mudança correspondente na carga de placa e na carga de A $\beta$  (Figura 9 e Tabela 2). O tratamento com *mio*-inositol não afetou a carga da placa ou a carga A $\beta$  (Figura 9 e Tabela 2). Nos ratinhos TgCRND8 tratados *epi*-inositol, não houve uma diminuição significativa no tamanho médio de placa em comparação com ratos TgCRND8 não tratados (Figura 9), mas a carga de A $\beta$  diminuiu significativamente (Tabela 2). Estes resultados sugerem que a níveis modestos de A $\beta$ , o *epi*-inositol impede a oligomerização de A $\beta$ , mas a concentrações mais elevadas de A $\beta$  o *epi*-inositol é incapaz de inibir completamente a fibrilogénese. O tratamento com *cilo*-inositol diminuiu significativamente a carga da placa e a carga A $\beta$ . Estes resultados demonstram que por cada medida, houve uma redução na carga de placa após o tratamento com *cilo*-inositol. Estes resultados são comparáveis em termos de dimensão do efeito aos estudos de profilaxia de 6 meses, e apoiam ainda mais o potencial do *cilo*-inositol.

Uma vez que a diminuição das concentrações de A $\beta$  detetadas após tratamento com inositol podiam ter resultado do efluxo alterado de A $\beta$  para o plasma, foram examinados os níveis de A $\beta$  no plasma (Tabela 2). Os ratinhos TgCRND8 têm concentrações plasmáticas de A $\beta$  elevadas aos 6 meses de idade. Nem o tratamento com *mio*-inositol, o *epi*-inositol ou o *cilo*-inositol teve qualquer efeito sobre os níveis

plasmáticos de A $\beta$  em comparação com ratinhos TgCRND8 não tratados ( $p=0,89$ ). A explicação mais parcimoniosa para esta observação é que o inositol alterou seletivamente a fibrilhação de A $\beta$  no SNC, mas não afetou a atividade de  $\beta$ - ou  $\gamma$ -secretase, ou os mecanismos normais de eliminação do A $\beta$  para o plasma. No entanto, esta observação é significativa por duas razões. Primeiro, uma queda nos níveis de A $\beta$  no plasma e CSF é normalmente detetada à medida que o percurso clínico progride em pacientes com DA não tratados. Em segundo lugar, os pacientes do estudo de imunização com AN1792 que desenvolveram uma forte resposta ao anticorpo e uma resposta clínica aparente não tiveram níveis plasmáticos de A $\beta$ - $\beta$  alterados. Portanto, estes resultados indicam que não é necessário alterar os níveis plasmáticos de A $\beta$  para se obter um resultado terapêutico eficaz.

Em conjunto, estes dados revelam que o *cilo*-inositol selecionado pode abolir a acumulação cerebral de A $\beta$ , a deposição de placas amiloides cerebrais e o declínio cognitivo num modelo de ratinho transgênico da Doença de Alzheimer, quando administrado durante a fase "presintomática tardia", antes do aparecimento de défices cognitivos declarados e neuropatologia amiloide nestes ratinhos. Além disso, mesmo quando o *cilo*-inositol é administrado após o início dos défices cognitivos e neuropatologia da placa amiloide, estes compostos podem inverter eficazmente a deposição de amiloide, a neuropatologia e os défices cognitivos. Portanto, estes resultados indicam que o *cilo*-inositol é eficaz na prevenção da doença e no tratamento da doença existente em doentes já diagnosticados com AD.

\_\_\_\_\_  $\alpha\beta 40$   $\alpha\beta 42$  Area Total

---

### **Exemplo 8 - Estudo do tratamento durante dois meses com *cilo-inositol***

De forma a determinar as gamas de eficácia mais alargadas do *cilo-inositol* para o tratamento da doença, ratinhos TgCRND8 com 5 meses de idade foram alimentados com *cilo-inositol* ou não tratados durante dois meses (n=10 por grupo). A função cognitiva dos ratinhos TgCRND8 com 7 meses de idade tratados com *cilo-inositol* foi comparada com a de TgCRND8 não tratados e crias não Tg da mesma ninhada tratadas no paradigma de três dias do Labirinto Aquático de Morris. Os dados sobre o comportamento foram analisados utilizando um modelo misto de análise fatorial de variância (ANOVA) com fármaco e genótipo como variáveis entre indivíduos e sessões de treino como variável intra-indivíduos. Como foi observado com o tratamento de 1 mês com *cilo-inositol* (Fig. 12A), os ratinhos TgCRND8 tratados durante dois meses com *cilo-inositol* eram indistinguíveis das crias não Tg da mesma ninhada tratadas com *cilo-inositol* (Fig. 12B). De forma a correlacionar a melhoria da cognição com a patologia, os níveis de A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 foram analisados no cérebro (Tabela 3). Os níveis de A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 insolúveis foram reduzidos em 20% após o tratamento com *cilo-inositol*. Estes resultados demonstram que os efeitos do *cilo-inositol* persistem durante a progressão da doença.



Tabela 3. O tratamento com inositol diminui os níveis de A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42

	A $\beta$ 40 Cerebral (ng/g cérebro húmido $\pm$ s.e.m.)		A $\beta$ 42 Cerebral (ng/g cérebro húmido $\pm$ s.e.m.)		Níveis Plasmáticos de A $\beta$ (pg/mL)	
	Solúvel	Insolúvel	Solúvel	Insolúvel	A $\beta$ 40	A $\beta$ 42
2 meses de tratamento						
Controlo	487 $\pm$ 14	6924 $\pm$ 287	764 $\pm$ 51	25827 $\pm$ 1238	5212 $\pm$ 219	3455 $\pm$ 331
Cilo- inositol	395 $\pm$ 60	5703 $\pm$ 612*	688 $\pm$ 28	20818 $\pm$ 1404*	4507 $\pm$ 207	3035 $\pm$ 236
ANOVA com PLSD de Fisher, * p<0,05.						

**Exemplo 9 - Efeito da Dose no Resultado Patológico em ratinhos TgCRND8 com a Doença.**

A ratinhos TgCRND8 de 5 meses de idade foi administrado por sonda, uma vez por dia, *cilo*-inositol em água em doses de 10 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg ou não tratados. Os animais foram sacrificados depois de um mês de tratamento e analisados quanto aos resultados patológicos. A análise dos níveis de A $\beta$  no cérebro de todos os grupos demonstrou que todas as doses de fármaco foram eficazes na mesma medida em baixar os níveis de A $\beta$ 42 solúvel em comparação com ratinhos TgCRND8 não tratados (20% de redução,  $F_{3,15} = 3,1$ ,  $p=0,07$ ; Fig. 13A). As análises de dose individual demonstram que doses de 10mg/kg e 30 mg/kg foram significativamente diferentes dos controlos não tratados ( $p=0,03$  e  $p=0,02$ , respetivamente). Nenhuma das doses escolhidas eram significativamente diferentes umas das outras ( $F_{2,11} = 0,6$ ,  $p = 0,57$ ; Fig. 13A). A administração por sonda não teve nenhum efeito significativo sobre o A $\beta$ 42 insolúvel ( $F_{3,15} = 0,69$ ,  $p=0,58$ ; Fig. 13B), ou o A $\beta$ 42 solúvel e insolúvel ( $F_{3,15} = 0,04$ ,  $p=0,99$  e  $F_{3,15} = 0,36$ ,  $p=0,79$ , respetivamente; Fig. 14A e 14B).

**Exemplo 10 - Eficácia de alo-inositol para o tratamento de ratinhos TgCRND8 portadores da doença.**

Para avaliar se o alo-inositol pode também ser eficaz na prevenção da progressão adicional e/ou se pode inverter parcialmente um fenótipo semelhante a DA bem estabelecido, o início do tratamento dos ratinhos TgCRND8 foi atrasado até aos 5 meses de idade. Grupos de crias TgCRND8 e não transgênicas da mesma ninhada foram tratadas durante 28 dias com alo-inositol, ou não foram tratadas. Nestas experiências, a dosagem e a administração oral de compostos, e os ensaios comportamentais e neuroquímicos foram os mesmos que os utilizados nas experiências de tratamento descritas acima.

O grupo de ratinhos TgCRND8 de 6 meses de idade tratados com alo-inositol teve um desempenho significativamente melhor do que o de ratinhos TgCRND8 não tratados ( $F_{1,13} = 0,45$ ,  $p=0,05$ ; dados não ilustrados). O desempenho cognitivo de ratinhos TgCRND8 de 6 meses de idade, tratados com alo-inositol ainda era significativamente diferente do de outras crias não transgênicas da mesma ninhada ( $F_{1,13} = 5,9$ ,  $p=0,05$ ; Fig. 15). O efeito benéfico do tratamento com inositol não foi devido a efeitos não específicos sobre sistemas comportamentais, motores, ou perceptuais porque o tratamento com inositol não teve qualquer efeito sobre o desempenho cognitivo de ratinhos não Tg ( $F_{1,12} = 0,98$ ,  $p=0,49$ ). Os níveis cerebrais de A $\beta$  foram analisados para ratinhos TgCRND8 com tratamento versus não tratados para determinar se o comportamento melhorado pode ser correlacionado com as alterações de A $\beta$  (Tabela 4). O tratamento com alo-inositol reduziu o A $\beta$ 42 solúvel (redução de 20%,  $p < 0,05$ ), um efeito semelhante ao observado para o *cilo*-inositol. O alo-

inositol não alterou significativamente o A $\beta$ 42 insolúvel ou A $\beta$ 42 (frações solúveis e insolúveis). Uma possível explicação para a diminuição da A $\beta$ 42 é a eliminação de A $\beta$ 42 na periferia com um consequente aumento do A $\beta$ 42 plasmático. Os níveis de A $\beta$ 42 no plasma após o tratamento com alo-inositol eram indistinguíveis dos níveis plasmáticos de TgCRND8 não tratados (Tabela 5). De acordo com os outros estereoisômeros do inositol, estes resultados demonstram que os níveis plasmáticos de A $\beta$  não são afetados pelo tratamento com alo-inositol.

Tabela 4. O tratamento com alo-inositol diminui os níveis de A $\beta$ 42

	A $\beta$ 40 Cerebral (ng/g cérebro húmido $\pm$ s.e.m.)		A $\beta$ 42 Cerebral (ng/g cérebro húmido $\pm$ s.e.m.)		Níveis Plasmáticos de A $\beta$ (pg/mL)
	Solúvel	Insolúvel	Solúvel	Insolúvel	
1 mês de tratamento					
Controlo	252 $\pm$ 48	4105 $\pm$ 851	666 $\pm$ 39	16448 $\pm$ 2120	2359 $\pm$ 147
Alo- inositol	281 $\pm$ 21	3787 $\pm$ 342	547 $\pm$ 47*	16336 $\pm$ 910	2458 $\pm$ 95
ANOVA com PLSD de Fisher, * p<0,05.					

Tabela 5. Bioquímica do Sangue - Estudo da Dose de cilo-inositol

	Não tratados n=4	100 mg/kg n=4	30 mg/kg n=3	10 mg/kg n=5	Níveis de Referência (Vita- Tech & CCAC)
Bioquímica					
Proteína total	46 $\pm$ 2 g/L	49 $\pm$ 2	50 $\pm$ 2.6	50 $\pm$ 3	35-72
Albumina	35 $\pm$ 0 g/L	31 $\pm$ 1	33 $\pm$ 2	33 $\pm$ 4	25-48
Globulina	12 $\pm$ 1 g/L	19 $\pm$ 2	17 $\pm$ 1	17 $\pm$ 2	18-82
Bilirrubina	2,4 $\pm$ 1 $\mu$ mol/L	1,9 $\pm$ 0	2,0 $\pm$ 1	1,9 $\pm$ 0,6	2-15
ALP	81 $\pm$ 10 U/L	76 $\pm$ 11	81 $\pm$ 10	73 $\pm$ 22	28-94
ALT	42 $\pm$ 4 U/L	38 $\pm$ 4	42 $\pm$ 4	51 $\pm$ 20	28-184
Glicose.	11 $\pm$ 2 mmol/L	11 $\pm$ 2	12 $\pm$ 2	7 $\pm$ 2	9,7-18,6
Ureia	9 $\pm$ 3 mmol/L	7,4 $\pm$ 1	9 $\pm$ 3	10 $\pm$ 2	12,1-20,6

	Não tratados n=4	100 mg/kg n=4	30 mg/kg n=3	10 mg/kg n=5	Níveis de Referência (Vita- Tech & CCAC)
<b>Bioquímica</b>					
Creatinina	36±5 umol/L	31±4	35±5	40±5	26-88
Hemólise	Normal	Normal	Normal	Normal	
Icteria	Normal	Normal	Normal	Normal	
Lipemia	Normal	Normal	Normal	Normal	

### **Exemplo 11 - O Tratamento com Inositol não afeta a Química do Sangue**

De forma a excluir quaisquer efeitos nocivos do tratamento com inositol na química do sangue e na função dos órgãos, o sangue foi analisado após o tratamento de um mês com *cilo-* e *alo-*inositol (Tabela 5,6). A proteína total, albumina, globulina, bilirrubina, fosfatase alcalina, glicose, ureia e creatinina não foram significativamente diferentes entre os grupos de tratamento ou de ratinhos TgCRND8 não tratados. Todos os níveis estavam dentro da normalidade, conforme determinado para ratinhos de tipo selvagem não transgênicos. Além disso a hemólise, ictericia e lipemia estavam todas normais. Estes resultados sugerem que o *alo-* e *cilo-*inositol não exibem efeitos nocivos evidentes na química do sangue ou na função dos órgãos.

Tabela 6. Bioquímica do Sangue - Estudo de Tratamento de 1 Mês

	Não tratados n=4	Alo-Inositol n=4	Níveis de Referência (Vita-Tech & CCAC)
<b>Bioquímica</b>			
Proteína total	46±2 g/L	48±2	35-72
Albumina	35±0 g/L	32±2	25-48
Globulina	12±1 g/L	17±3	18-82
Bilirrubina	2,4±1 umol/L	2,9±3	2-15

	Não tratados	Alo-Inositol	Níveis de Referência (Vita-Tech & CCAC)
	n=4	n=4	
Bioquímica			
ALP	81±10 U/L	95±16	28-94
ALT	42±4 U/L	44±4	28-184
Glicose	11±2 mmol/L	10±3	9,7-18,6
Ureia	9±3 mmol/L	18,6±13	12,1-20,6
Creatinina	36±5 umol/L	69±64	26-88
Hemólise	Normal	Normal	
Icteria	Normal	Normal	
Lipemia	Normal	Normal	

**Exemplo 12 - A eficácia de *cilo*-inositol na prevenção de patologia semelhante a DA num modelo de ratinho transgénico duplo da doença de Alzheimer, PS1 x APP**

Os ratinhos Tg PS1 x APP são um modelo acentuado da doença de Alzheimer, que expressam um transgene PS1 humano mutante que codifica duas mutações familiares (M146L e L286V) em conjunto com o transgene APP humano que codifica as mutações familiares Indiana e Sueca. Estes animais desenvolvem uma expressão robusta de níveis de A $\beta$  cerebral e deposição de amiloide aos 30-45 dias de idade. Num ensaio profilático, os ratinhos TgPS1xAPP foram tratados com *cilo*-inositol desde o desmame e foram avaliados quanto aos efeitos sobre a neuropatologia aos 2 meses de idade (Figuras 16 e 17). Em comparação com ratinhos TgPS1xAPP não tratados, os ratinhos TgPS1xAPP tratados com *cilo*-inositol exibiram uma diminuição significativa em todas as determinações de carga da placa aos 2 meses de idade. (% área do cérebro coberto de placas = 0,157±0,007 vs. 0,065±0,016,  $p < 0,001$ ; tamanho médio da placa = 177±8  $\mu\text{m}^2$  vs. 149±5  $\mu\text{m}^2$ ,  $p < 0,05$ ; contagem das placas 3054±324 vs. 1514±510,  $p < 0,01$ ; (Fig. 17). Estes resultados demonstram

que o *cilo*-inositol impede a deposição de amiloide em dois modelos robustos da doença de Alzheimer.

**Exemplo 13 - Efeito do aumento da ingestão calórica em ratinhos TgCRND8**

De modo a excluir a contribuição do aumento da ingestão calórica ou efeitos não específicos, os ratinhos TgCRND8 foram tratados com um açúcar simples de peso molecular semelhante, o manitol. Aos 6 meses de idade, os ratinhos TgCRND8 tratados com manitol eram indistinguíveis dos ratinhos TgCRND8 não tratados (Fig.11A) e eram significativamente diferentes de crias não Tg da mesma ninhada tratadas com manitol (Fig. 11B). O manitol não teve efeito sobre o comportamento dos ratinhos não Tg, uma vez que os ratinhos não Tg tratados com manitol eram indistinguíveis dos ratinhos não Tg não tratados. Estes resultados correlacionam-se com os estudos patológicos que indicam que o manitol não alterou a carga de placa em ratinhos TgCRND8 (Fig. 11C). A monitorização simultânea da sobrevivência demonstrou que o manitol não teve efeito sobre a sobrevivência de ratinhos TgCRND8 (Fig. 11D).

Embora a presente invenção tenha sido descrita em relação a formas de realização particulares respetivas, muitas outras variações e modificações e outras utilizações serão evidentes para os peritos na técnica. A presente invenção, portanto, não está limitada pela divulgação específica aqui presente, mas apenas pelas reivindicações anexas.

Lisboa, 09 de Outubro de 2014

## **REIVINDICAÇÕES**

1. *Cilo-inositol* em associação com outro tratamento para utilização no tratamento ou prevenção de uma patologia do sistema nervoso central ou periférico ou órgão sistémico associada a um distúrbio no dobramento ou agregação de proteínas, ou na formação, deposição, acumulação ou persistência amiloide em que esse outro tratamento é selecionado do grupo de inibidores de beta-secretase, inibidores de gama-secretase, inibidores de épsilon-secretase, outros inibidores da agregação de folhas beta/fibrillogénese/formação de ADDL, antagonistas de NMDA, compostos anti-inflamatórios não-esteroides, antioxidantes, hormonas, nutrientes e suplementos alimentares; inibidores de acetilcolinestérise, agonistas muscarínicos, antipsicóticos; antidepressivos, terapia genética e/ou abordagens à base de fármacos para regular positivamente a neprilisina; terapia genética e/ou abordagens à base de fármacos para regular positivamente a enzima de degradação da insulina, vacinas, agentes imunoterapêuticos e anticorpos contra A $\beta$ , estatinas e outros fármacos de redução do colesterol, terapias à base de células estaminais e outras células, inibidores de quinases que fosforilam a proteína TAU e inibidores de quinases que modulam a produção de A $\beta$ .

2. *Cilo-inositol* para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a patologia do sistema nervoso central ou periférico ou órgão sistémico é selecionada do grupo de: doença de Alzheimer, formas pré-senis e senis; angiopatia amiloide; deterioração cognitiva

ligeira; demência relacionada com a doença de Alzheimer; taupatia;  $\alpha$ -sinucleinopatia; doença de Parkinson; Esclerose Lateral Amiotrófica; doença do neurónio motor; Paraplegia espástica; doença de Huntington; ataxia espinocerebelar; doenças neurodegenerativas associadas a agregados intracelulares e/ou intraneuronais de proteínas com poliglutamina, polialanina ou outras repetições decorrentes de expansões patológicas de elementos tri- ou tetra-nucleótidos com genes correspondentes; doenças cerebrovasculares; síndrome de Down; traumatismo craniano com acumulação pós-traumática de péptido beta-amiloide; doença relacionada com Priões; Demência Familiar Britânica; Demência Pré-senil com Ataxia Espástica; angiopatia Amiloide Cerebral, tipo Britânico; Demência Pré-senil com Ataxia espástica Angiopatia Amiloide Cerebral, Tipo Dinamarquês; Encefalopatia com corpos de inclusão de neuroserpina, forma familiar (FENIB); Polineuropatia amiloide; Miosite de Corpos de Inclusão devido ao péptido beta-amiloide; Amiloidose do tipo Familiar e Finlandês; Amiloidose sistémica associada ao mieloma múltiplo; Febre Familiar do Mediterrâneo; infeções e inflamações crónicas; e Diabetes Mellitus Tipo II associado ao polipeptídeo amiloide dos ilhéus.

3. *Cilo-inositol* para utilização de acordo com a reivindicação 2, em que a patologia do sistema nervoso central ou periférico ou órgão sistémico é a síndrome de Down.
4. *Cilo-inositol* para utilização de acordo com a reivindicação 2, em que a patologia do sistema nervoso central ou periférico ou órgão sistémico pode ser a doença de Alzheimer.



5. *Cilo*-inositol para utilização de acordo com a reivindicação 2, em que a patologia do sistema nervoso central ou periférico ou órgão sistémico pode ser a deterioração cognitiva ligeira.
6. *Cilo*-inositol para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 2 ou 4, em que o outro tratamento é um inibidor da acetilcolinestérase.
7. *Cilo*-inositol para utilização de acordo com a reivindicação 6, em que o inibidor da acetilcolinestérase é o donepezil.
8. *Cilo*-inositol para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 2 ou 4, em que o outro tratamento é um antagonista de NMDA.
9. *Cilo*-inositol para utilização de acordo com a reivindicação 8, em que o antagonista de NMDA é memantina.
10. Composição para utilização no tratamento ou prevenção de uma patologia do sistema nervoso central ou periférico ou órgão sistémico associada a um distúrbio no dobramento ou agregação de proteínas, ou formação, deposição, acumulação ou persistência de amiloide compreendendo *cilo*-inositol e outro tratamento como definido em qualquer uma das reivindicações 1 ou 6 a 9.
11. *Cilo*-inositol para utilização de acordo com qualquer reivindicação precedente para administração oral.

12. *Cilo-inositol* para utilização de acordo com a reivindicação 11, na forma de um comprimido oral, líquido ou suspensão oral.
13. *Cilo-inositol* para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 4, em que o referido outro tratamento é selecionado do grupo de: inibidores de gama-secretase ou inibidores de épsilon-secretase específicos ou não específicos de APP, Alzhemed, memantina, Ibuprofeno, Celebrex, Vitamina E, estrogénios, Gingo biloba, donepezil, AF102B, Cevimelina, EVOXAC, AF150(S), AF247B, haloperidol, clozapina, olanzapina, Sertralina, Citalopram Hbr, ELAN AN-1792, Lovastatina, Sinvastatina e cloreto de lítio.

Lisboa, 09 de Outubro 2014

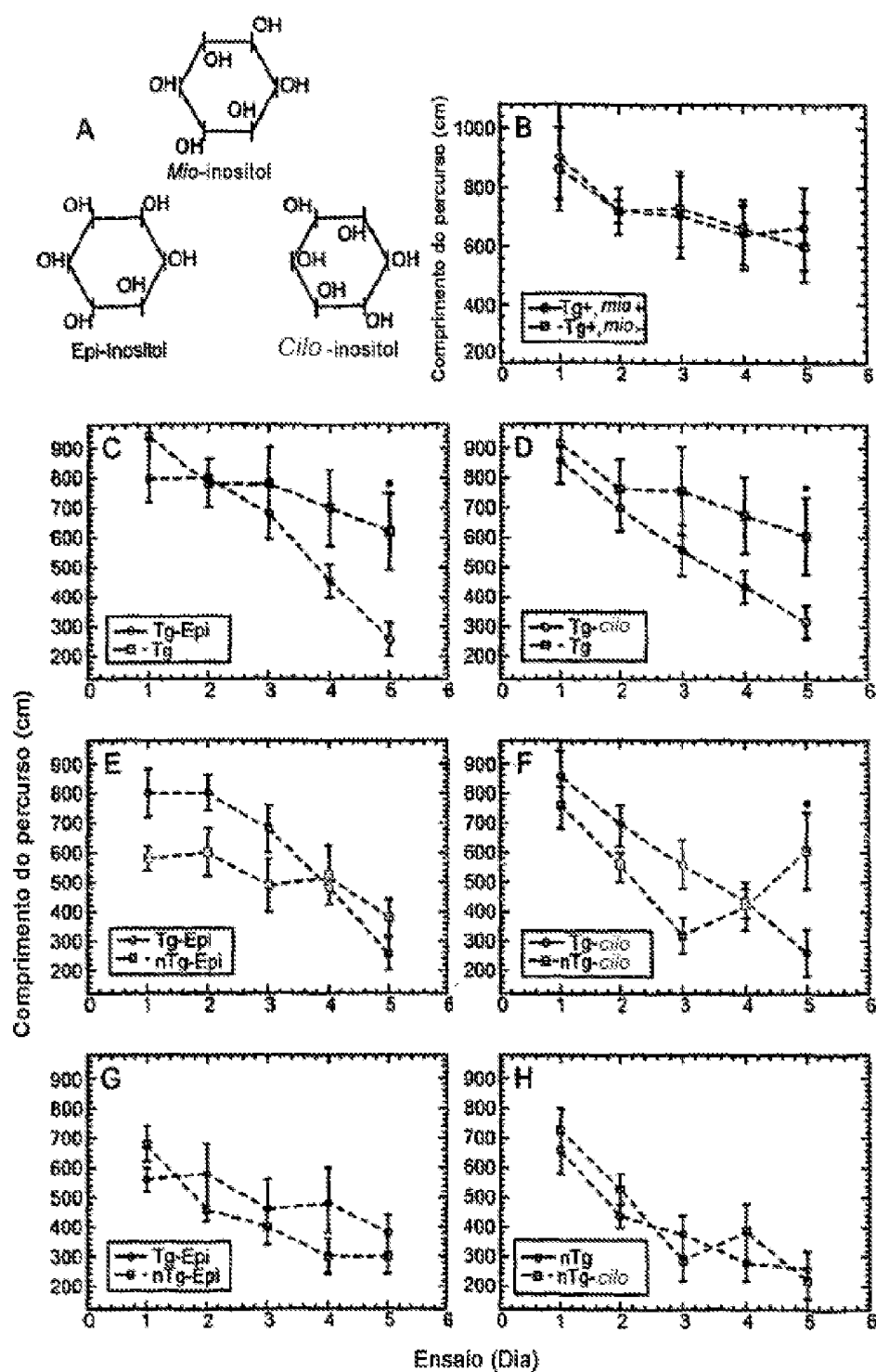


Figura 1A-1H

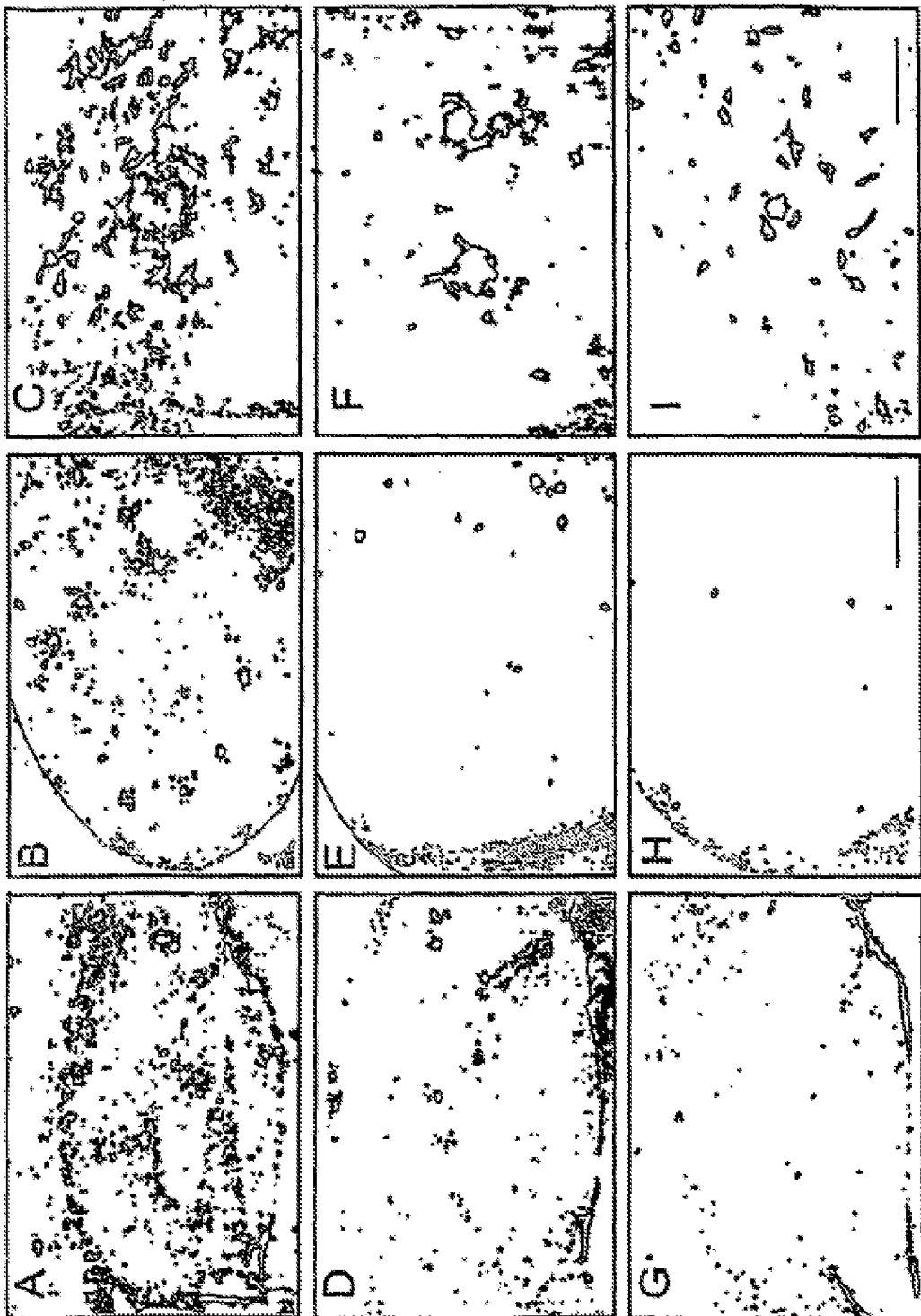


Figura 2A-2I

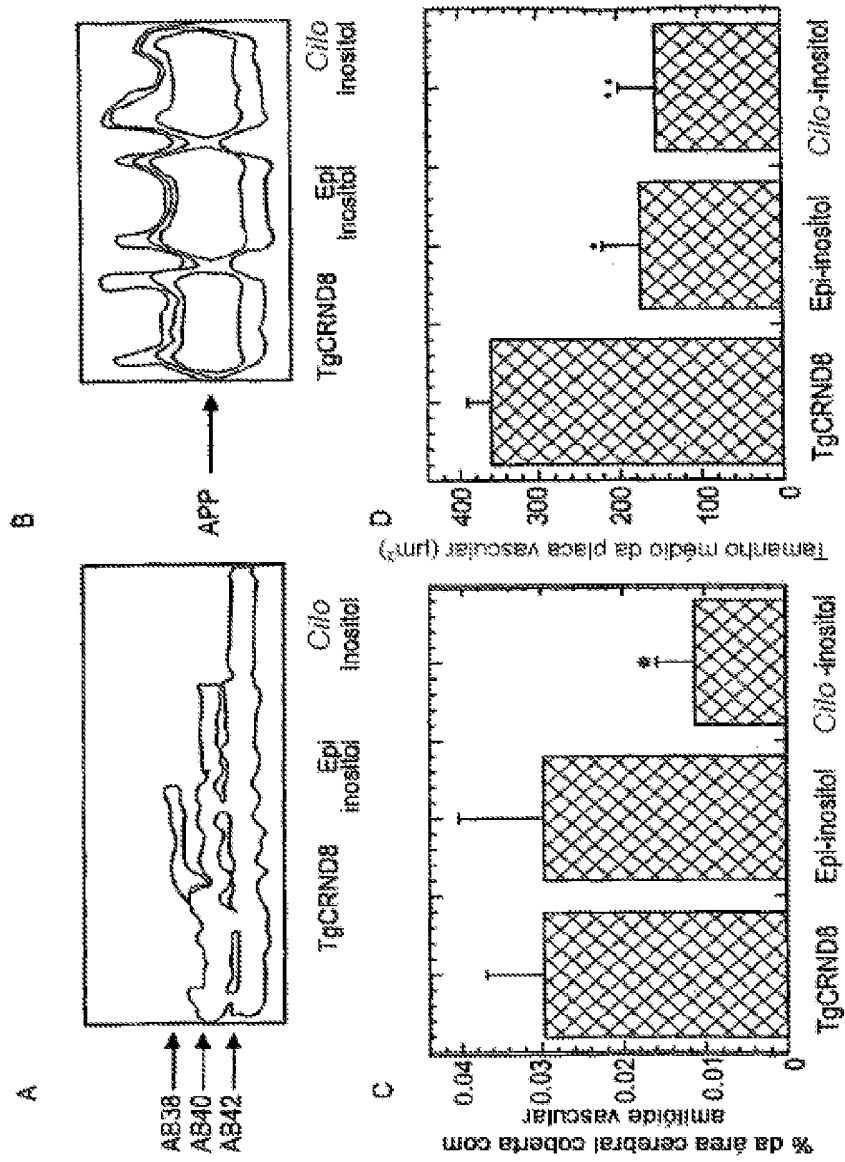


Figura 3A-3D

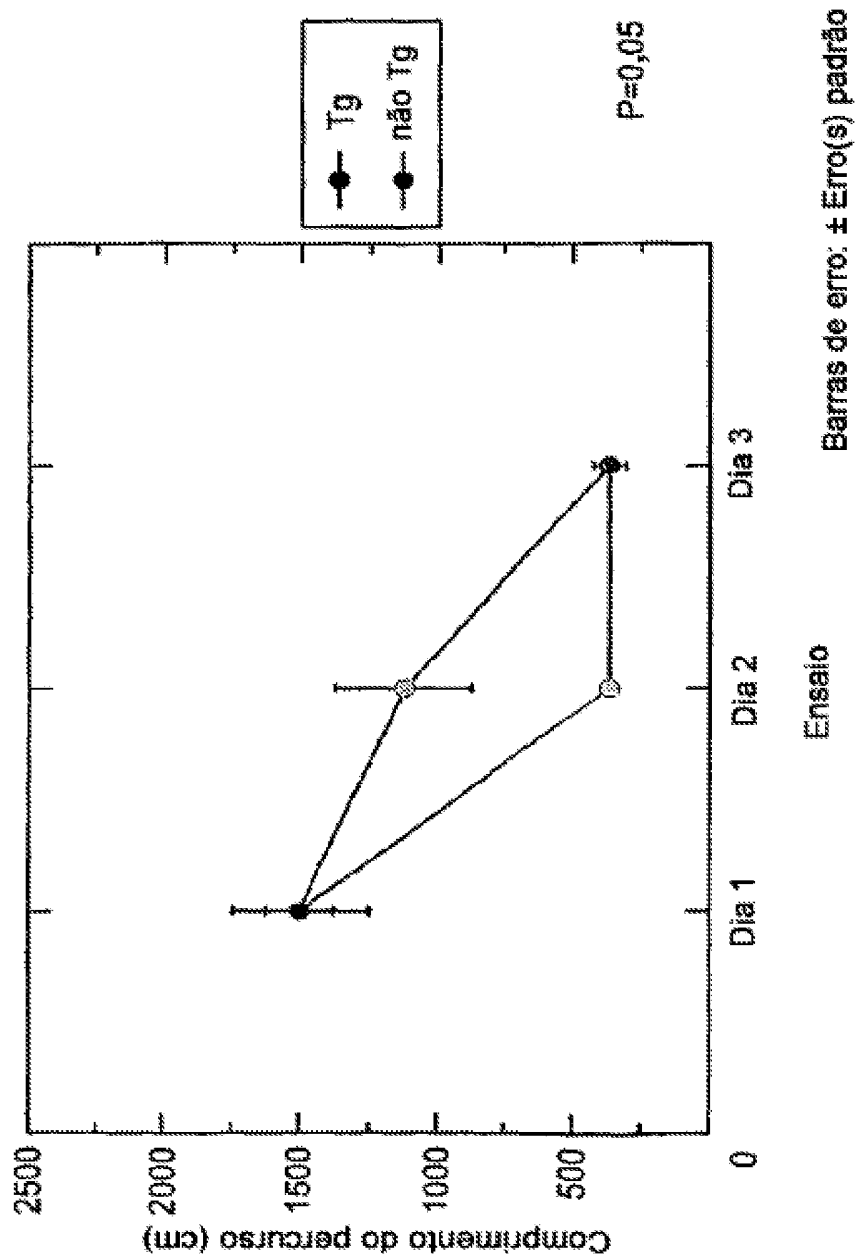


Figura 4

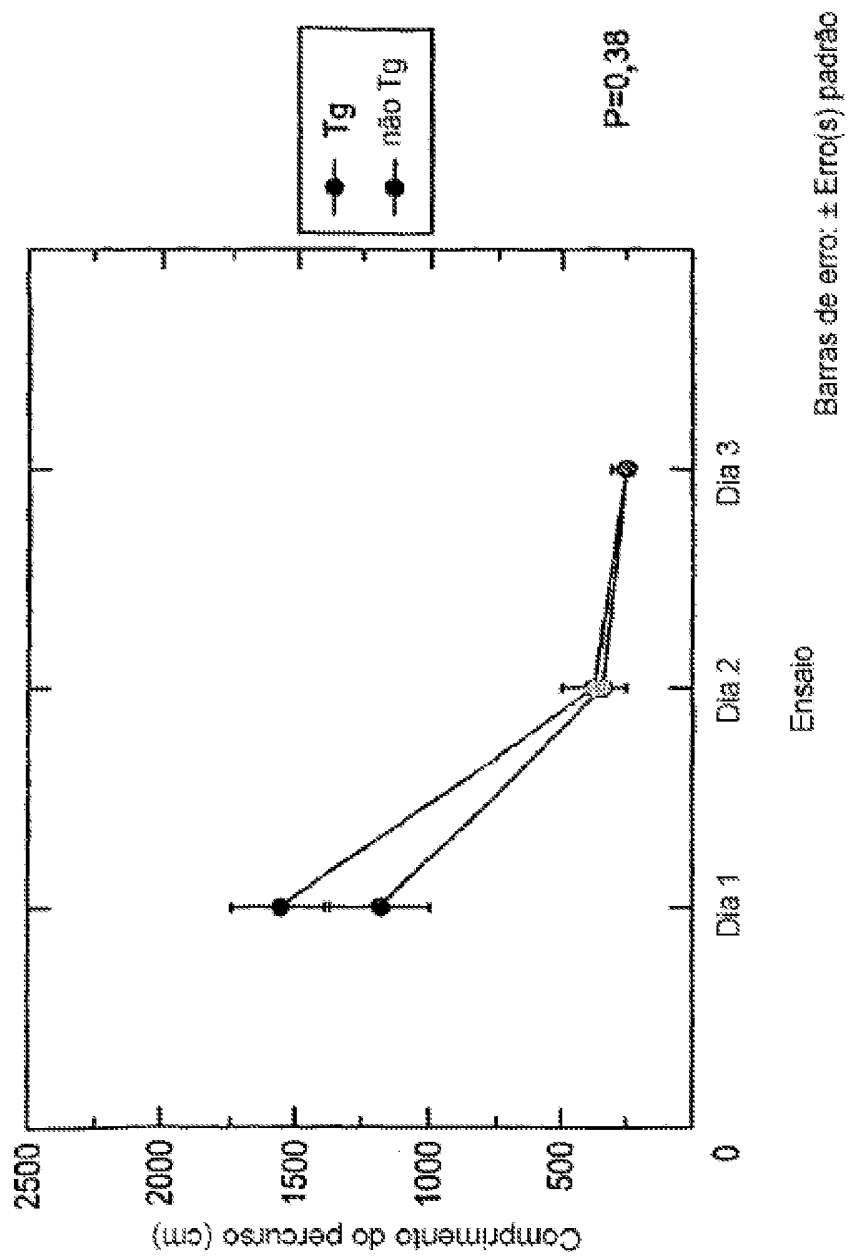


Figura 5

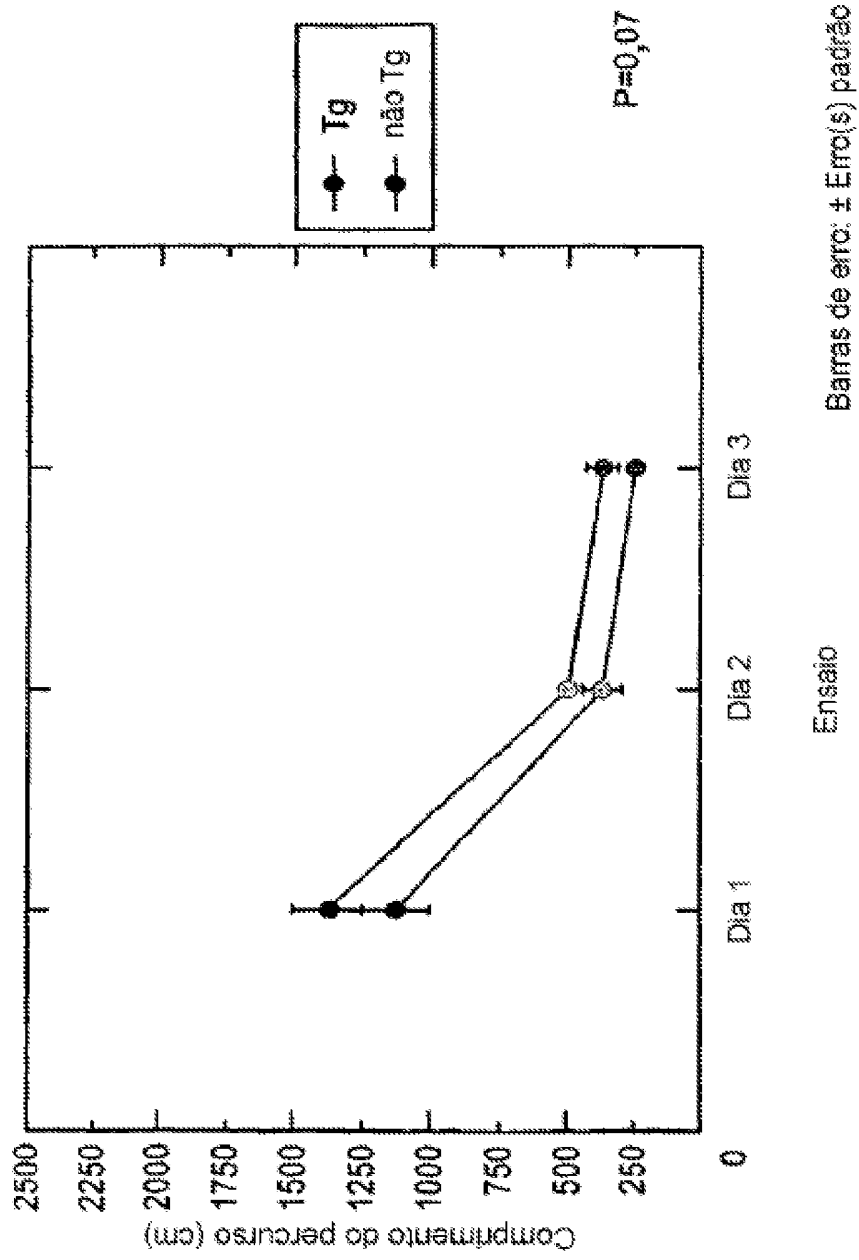


Figura 6



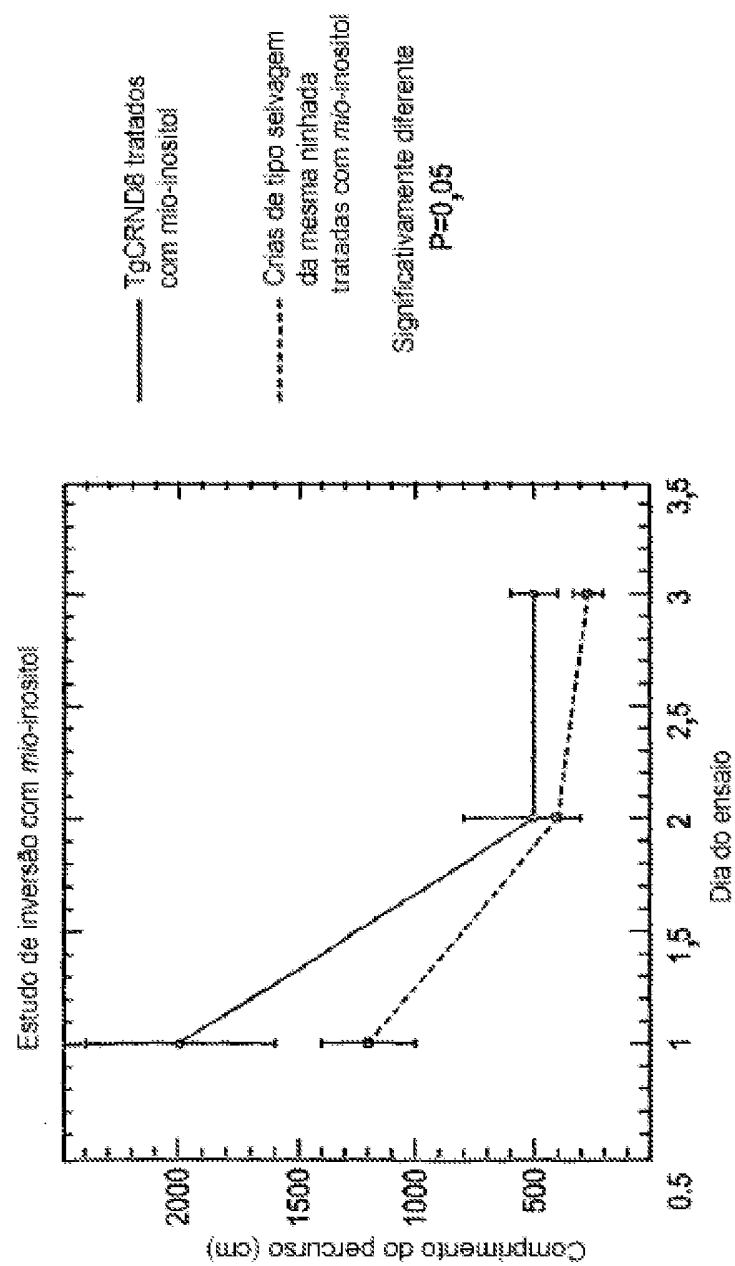


Figura 7

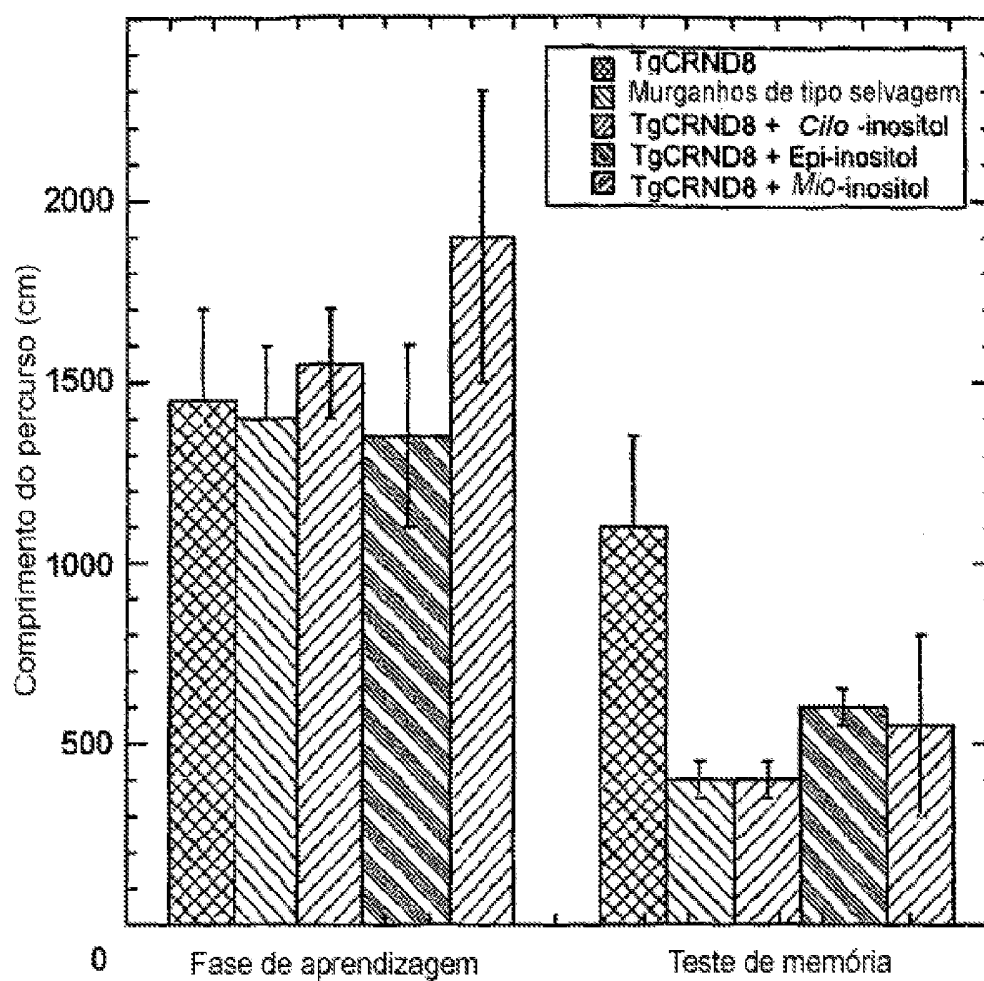


Figura 8

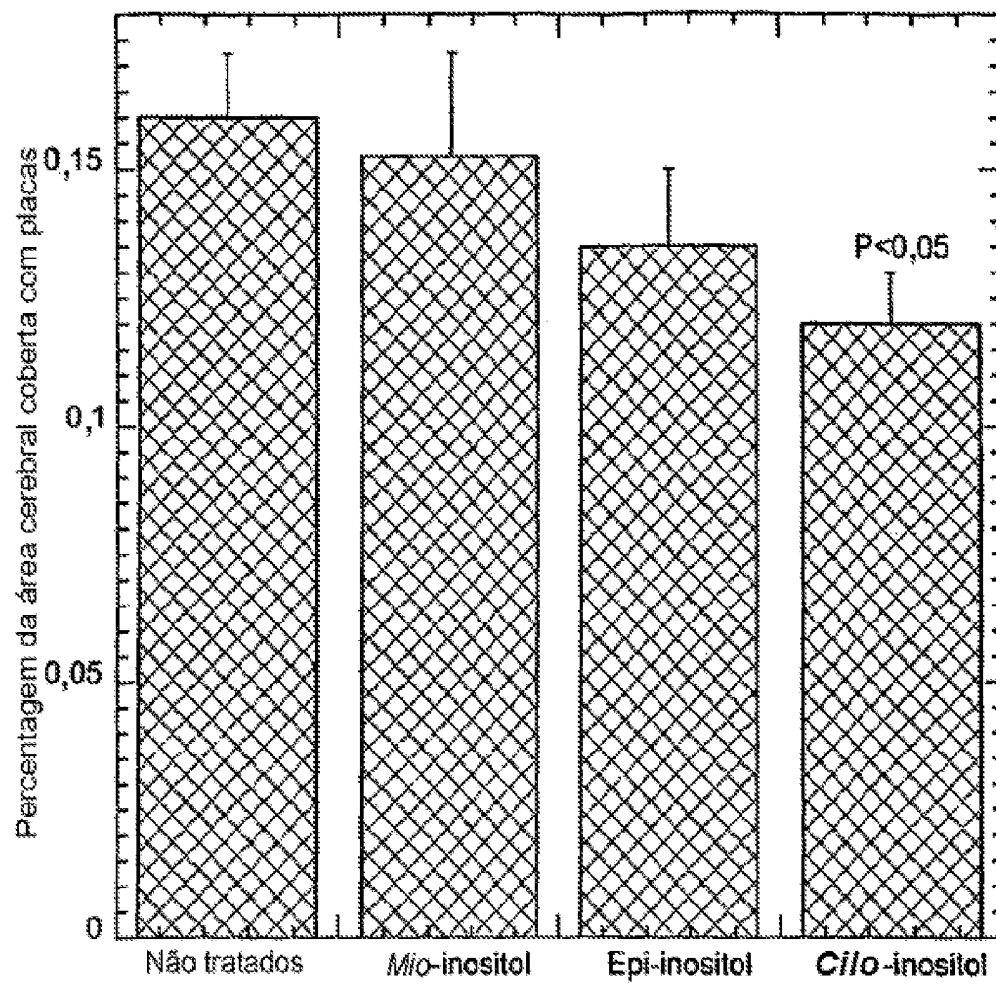


Figura 9

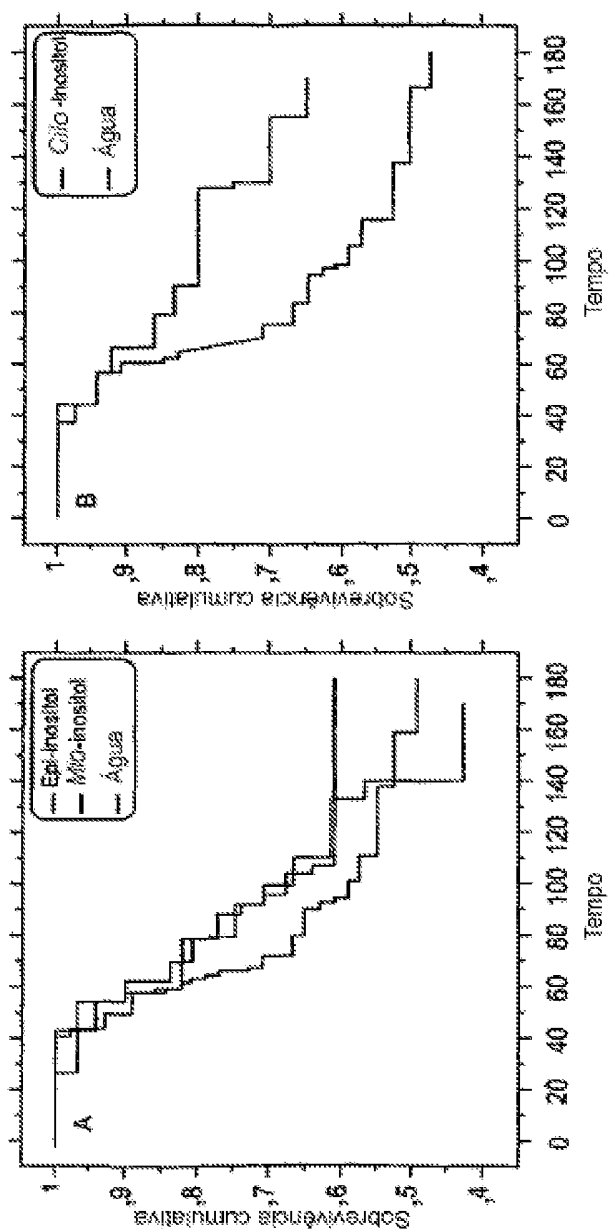


Figura 10A e 10B

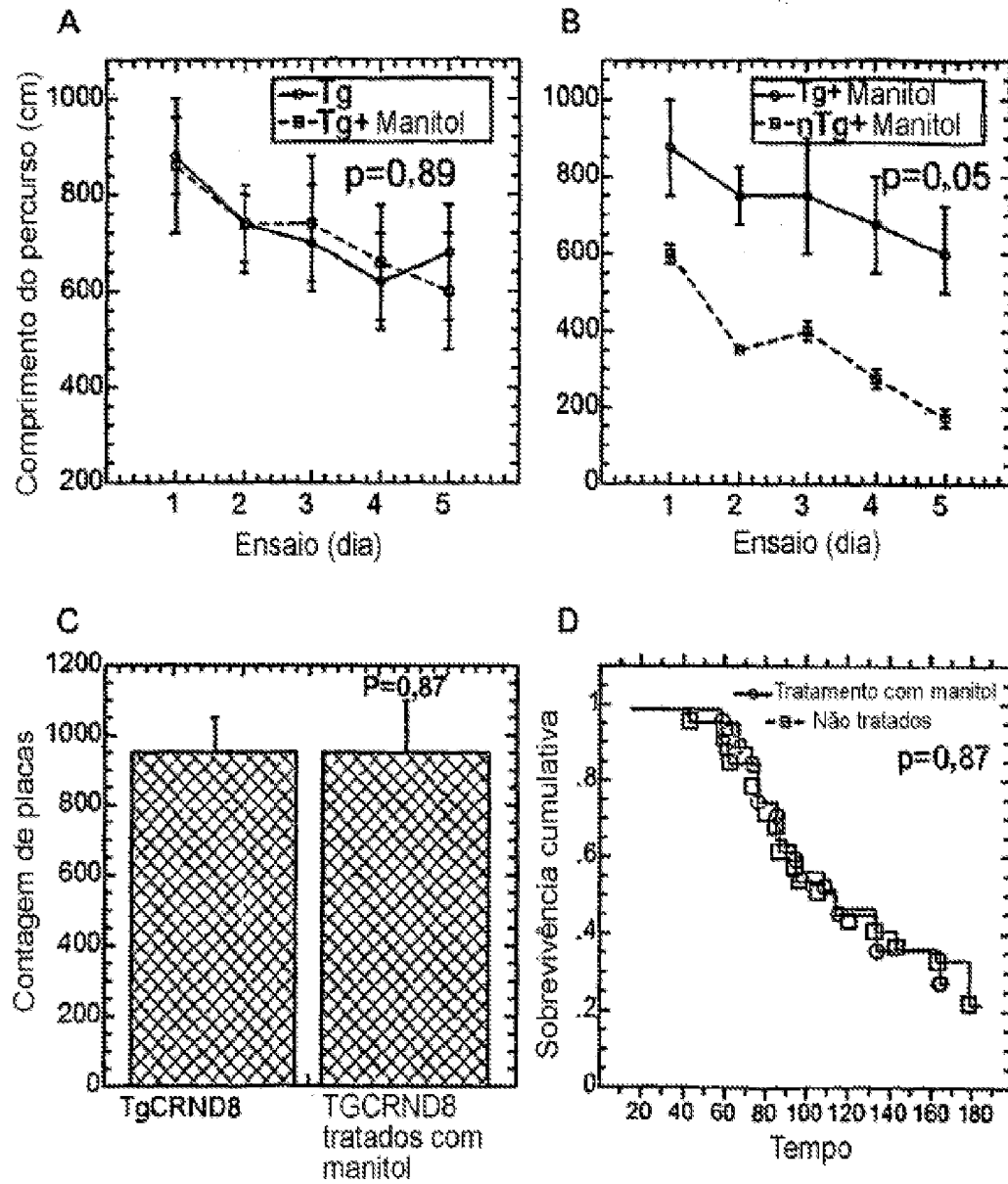


Figura 11A-11D

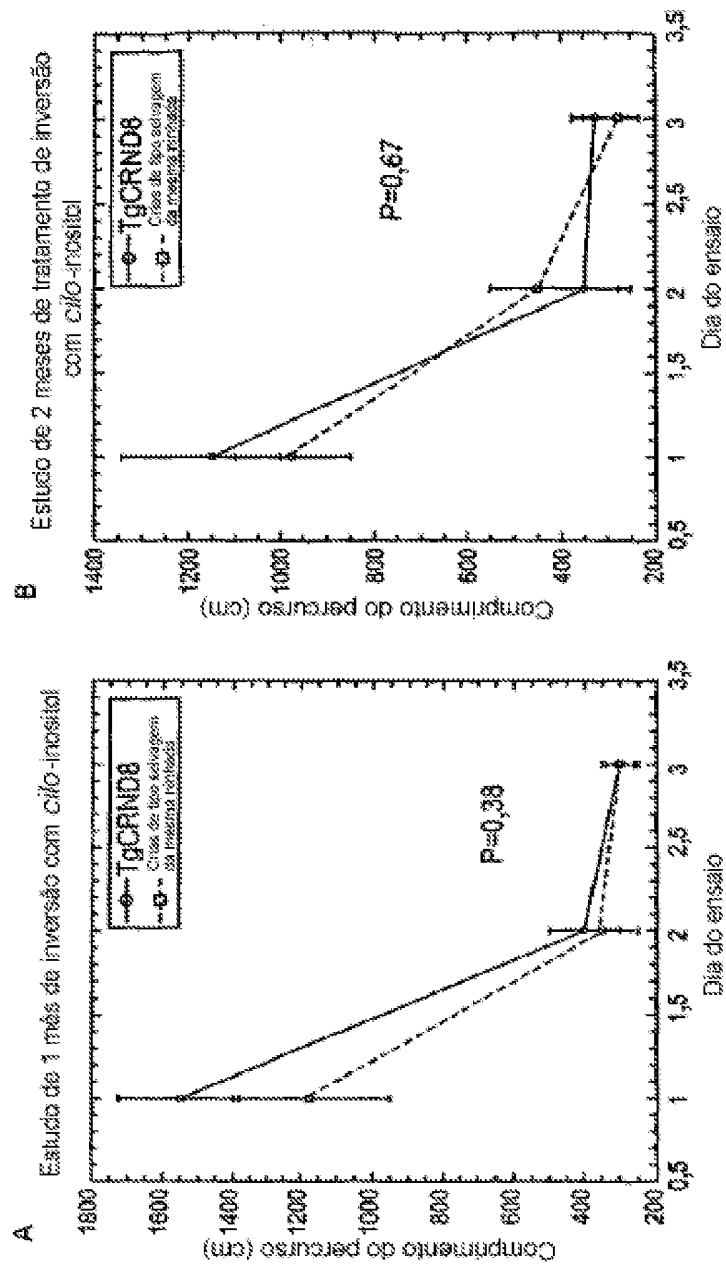


Figura 12A e 12B

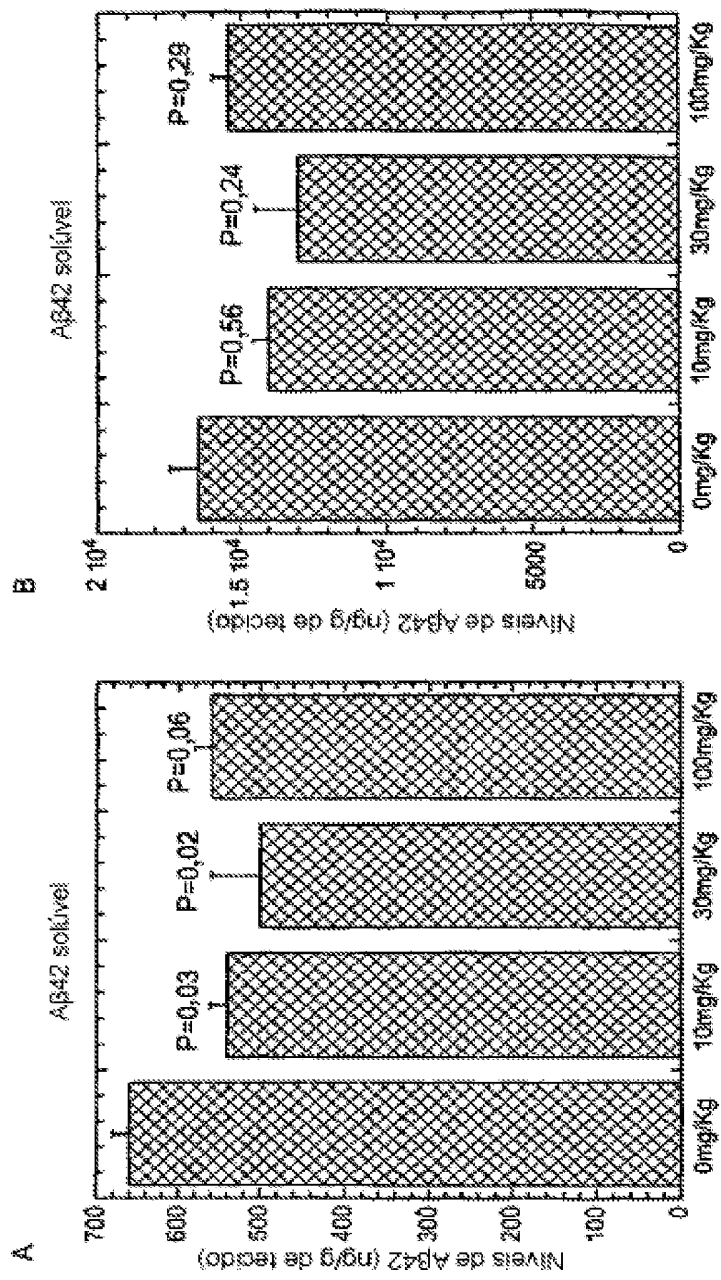


Figura 13A e 13B

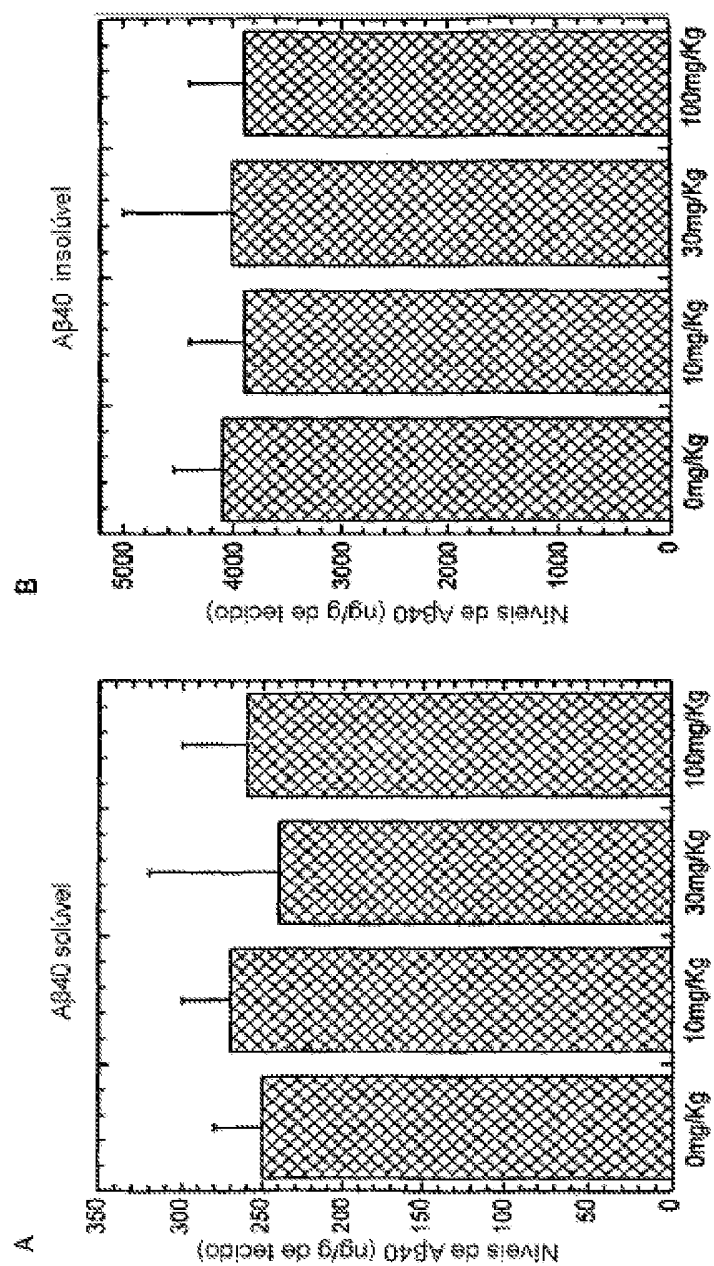


Figura 14A e 14B



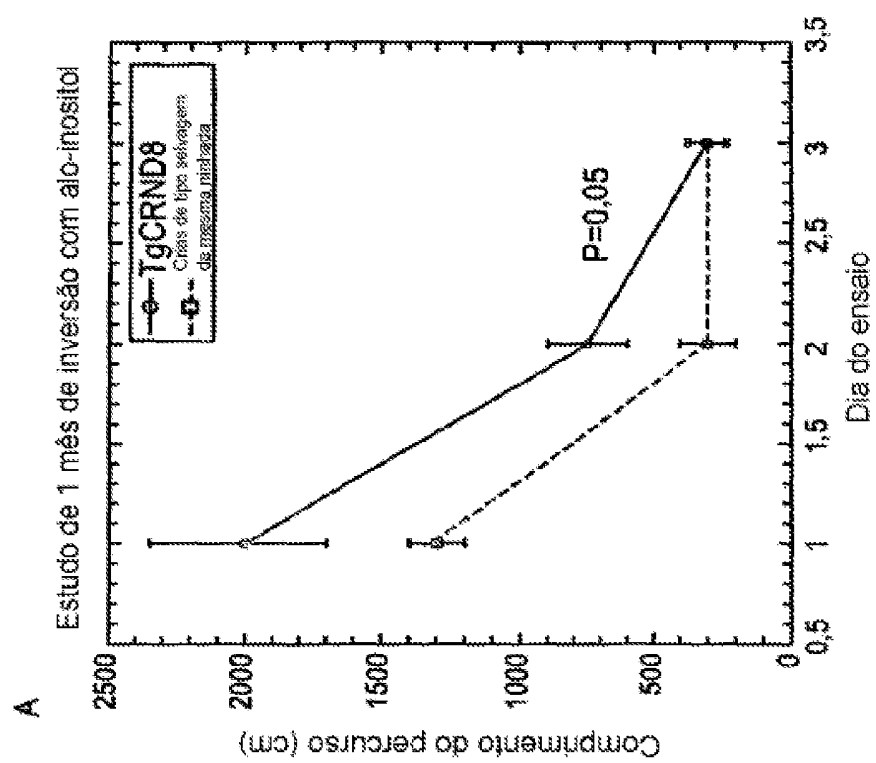


Figura 15

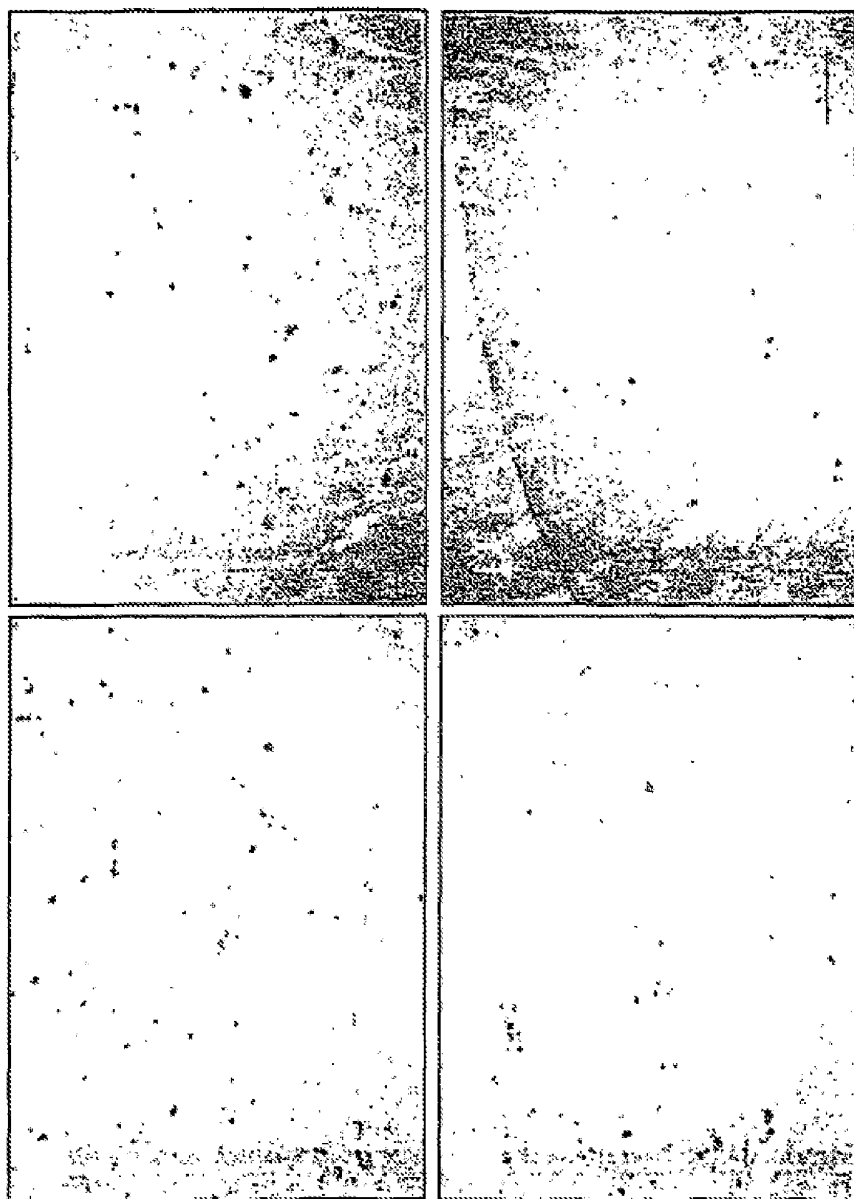


Figura 16A-16D

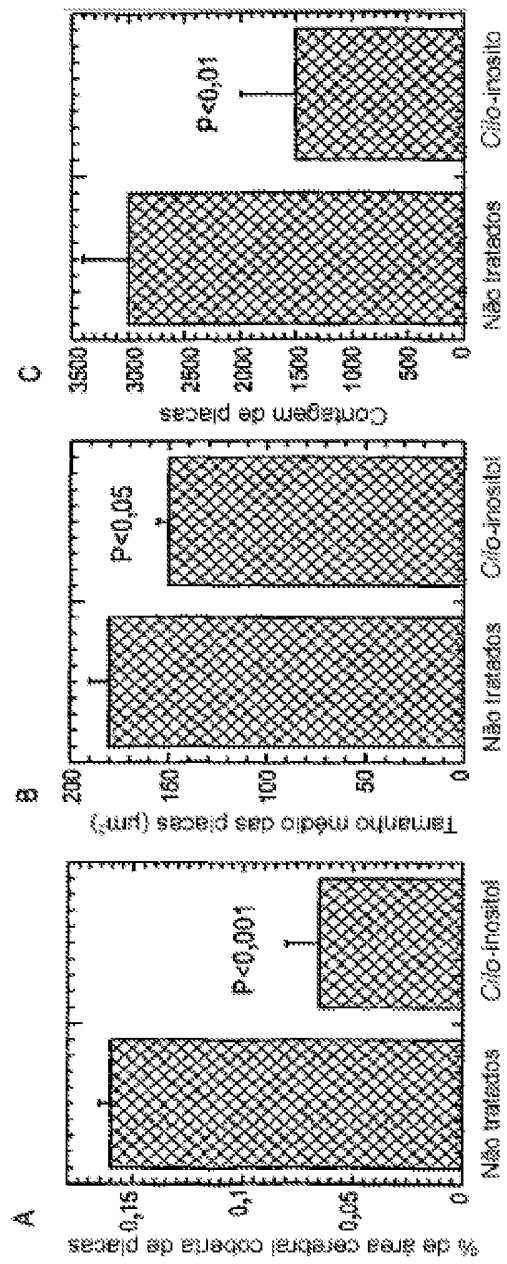


Figura 17A-17C