

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 520 047**

51 Int. Cl.:

**A61K 51/04** (2006.01)

**G01N 33/60** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**A61K 31/047** (2006.01)

**A61K 31/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2004 E 09005295 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2153829**

54 Título: **Métodos de prevención, tratamiento y diagnóstico de trastornos de la agregación de proteínas**

30 Prioridad:

**27.02.2003 US 451363 P**

**17.11.2003 US 520958 P**

**19.11.2003 US 523534 P**

**26.02.2004 US 787621**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.11.2014**

73 Titular/es:

**MCLAURIN, JOANNE (100.0%)**  
**181 MORTIMER AVENUE**  
**EAST YORK, ONTARIO M4J 2C4, CA**

72 Inventor/es:

**MCLAURIN, JOANNE**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 520 047 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Métodos de prevención, tratamiento y diagnóstico de trastornos de la agregación de proteínas

**5 Solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica la prioridad de las solicitudes provisionales estadounidenses con números de serie 60/451.363, 60/520.958 y 60/523.534, presentadas el 27 de febrero de 2003, el 17 de noviembre de 2003 y el 19 de noviembre de 2003, respectivamente.

10

**Campo de la invención**

La invención se refiere a compuestos para uso en métodos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras amiloidosis; más particularmente a métodos para inhibir y reducir la formación de fibrilla amiloide en la intervención terapéutica en la enfermedad de Alzheimer y otras amiloidosis.

15

**Descripción de la técnica relacionada**

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza neuropatológicamente por depósitos de amiloide, marañas neurofibrilares y pérdida neuronal selectiva. El componente principal de los depósitos de amiloide es  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), un péptido de 39-43 residuos. Las formas solubles de  $A\beta$  generadas a partir de la escisión de la proteína precursora amiloide son productos normales del metabolismo. La importancia de los residuos 1-42 ( $A\beta_{42}$ ) en la enfermedad de Alzheimer se puso de relieve con el descubrimiento de que las mutaciones en el codón 717 del gen de la proteína precursora amiloide, los genes de presenilina 1 y presenilina 2 dan como resultado un aumento de la producción de  $A\beta_{42}$  con respecto a  $A\beta_{1-40}$ . Estos resultados, junto con la presencia de  $A\beta_{42}$  tanto en placas maduras como amiloide difuso condujeron a la hipótesis de que esta especie más amiloidogénica puede ser el elemento crítico en la formación de placas. Esta hipótesis estaba apoyada por el hecho de que la deposición de  $A\beta_{42}$  precede a la de  $A\beta_{40}$  en el síndrome de Down en mutaciones de PS1 y en la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis.

20

25

30

Muchos estudios *in vitro* han demostrado que el  $A\beta$  puede ser neurotóxico o potenciar la susceptibilidad de las neuronas a agresiones excitotóxicas, metabólicas u oxidativas. Inicialmente, se pensó que sólo la forma de fibrilla de A era tóxica para las neuronas, pero una caracterización más concienzuda de las estructuras de  $A\beta$  demostró que los dímeros y los pequeños agregados de  $A\beta$  son también neurotóxicos. Estos datos sugirieron que la prevención de la oligomerización de  $A\beta$  sería una estrategia probable para prevenir la neurodegeneración relacionada con la EA. Varios estudios han demostrado que la neurotoxicidad inducida por  $A\beta$  *in vitro* puede suprimirse mediante compuestos que pueden aumentar la resistencia neuronal seleccionando como diana rutas celulares implicadas en la apoptosis, el bloqueo de rutas aguas abajo tras la inducción por  $A\beta$  de vías destructivas, o el bloqueo de la oligomerización de  $A\beta$  y finalmente la formación de fibrillas. El sitio en el que actúa  $A\beta$  para inducir neurotoxicidad no se ha dilucidado todavía pero sus efectos tóxicos se han bloqueado mediante una variedad de agentes dispares.

35

40

El acoplamiento de fibrillas de  $A\beta$  a membranas de células gliales y neuronales puede ser una etapa temprana e intermedia durante la evolución de la EA. La formación de placas de amiloide, así como la neurotoxicidad e inflamación, pueden ser consecuencias directas o indirectas de la interacción de A con moléculas que contienen restos de azúcar. Estudios previos han demostrado que la interacción de  $A\beta$  con glicosaminoglicanos da como resultado la agregación de  $A\beta$ , añadiéndose posiblemente a su insolubilidad y persistencia de placas. Los glicosaminoglicanos se han implicado también en la toxicidad neuronal y la activación de la microglia. Alternativamente, la interacción con glicolípidos tales como gangliósidos da como resultado la estabilización y prevención de la formación de fibrillas de  $A\beta$ , así como, el sitio de producción de  $A\beta$ . La familia de fosfatidilinositoles, por otra parte, da como resultado la aceleración de la formación de fibrillas. El grupo principal del fosfatidilinositol es el mio-inositol, un azúcar sencillo que se produce de manera natural implicado en la biosíntesis de lípidos, la transducción de señales y el control de la osmolaridad.

45

50

Asimismo, es de interés que una variedad de otras enfermedades humanas demuestran también la deposición de amiloide y habitualmente implican a órganos sistémicos (es decir, órganos o tejidos que se encuentran fuera del sistema nervioso central), con la acumulación de amiloide conduciendo a fallo o disfunción orgánica. En la enfermedad de Alzheimer y enfermedades amiloides "sistémicas", no hay actualmente cura ni tratamiento eficaz, y habitualmente el paciente muere en el plazo de 3 a 10 años desde la aparición de la enfermedad.

55

La patente estadounidense nº 4.847.082 da a conocer el uso de ácido fítico, una sal de fitato, un isómero o hidrolizado de ácido fítico para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. También da a conocer que los isómeros del ácido fítico o sal de fitato comprenden las conformaciones de mio-inositol-hexakisfosfato, *scyllo*-inositol-hexakisfosfato, D-qui-ro-inositol-hexakisfosfato, L-qui-ro-inositol-hexakisfosfato, neo-inositol-hexakisfosfato y muco-inositol-hexakisfosfato. El ácido fítico es inositol-hexakisfosfato (IP6).

60

65

La patente estadounidense nº 5.112.814 da a conocer el uso de ácido fítico e isómeros del mismo para el

tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Como en el caso de la patente estadounidense nº 4.847.082, los isómeros del ácido fítico dados a conocer en esta patente conservan los seis grupos fosfato en el azúcar inositol de seis carbonos.

5 Es de interés que en publicaciones posteriores se investigó la capacidad de inositol-monofosfato, inositol-1,4-bisfosfato e inositol-1,4,5-trifosfato para inhibir la fibrillogénesis del péptido beta-amiloide, y se encontró que no eran eficaces (J. Mol. Biol. 278: 183-194, 1998).

10 Barak *et al.* dan a conocer el uso de inositol para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA). (Prog Neuro-psychopamacol & Biol Psychiat. 20: 729-735, 2000). Sin embargo, esta referencia no da a conocer el uso de isómeros del inositol. Los pacientes tratados con inositol no mostraron ninguna diferencia significativa en las puntuaciones de la función cognitiva global (índice CAMCOG) entre inositol y placebo (dextrosa) en pacientes con EA mientras que dos subescalas específicas del índice CAMCOG sí mostraron mejora significativa (orientación y lenguaje).

15 Levine J. revisa el artículo de Barak *et al.* anterior y establece específicamente que el tratamiento con inositol no es beneficioso en la EA o disfunción cognitiva inducida por ECT (Eur Neuropsychopharm. 1997; 7,147-155, 1997).

20 Colodny L, *et al.* sugieren estudios adicionales para determinar la utilidad del inositol en la enfermedad de Alzheimer haciendo referencia al artículo de Barak *et al.* anterior y por tanto no dan a conocer ni sugieren tal uso para los isómeros del inositol (Altern Med Rev 3(6):432-47, 1998).

25 McLaurin *et al.* dieron a conocer que el mio-inositol estabiliza una pequeña micela de A $\beta$ 42 (J. Mol. Biol. 278,183-194, 1998). Además, McLaurin *et al.* dan a conocer que el epi- y *scyllo*- pero no el quiro-inositol podían inducir una transición estructural desde una estructura al azar hasta una en  $\beta$  en A $\beta$ 42 (J Biol Chem. Jun 16; 275 (24):18495-502, 2000; y J Struct Biol 130: 259-270, 2000). Alternativamente, ninguno de los estereoisómeros pudo inducir una transición estructural en A $\beta$ 40. La microscopía electrónica mostró que el inositol estabiliza pequeños agregados de A $\beta$ 42. Estas referencias también dan a conocer que las interacciones inositol-A $\beta$  dan como resultado un complejo que no es tóxico para células PC-12 diferenciadas mediante el factor de crecimiento nervioso y cultivos neuronales humanos primarios.

35 Se ha llevado a cabo mucho trabajo en la enfermedad de Alzheimer, pero poco se sabe de manera convencional sobre compuestos o agentes para regímenes terapéuticos para detener o revertir la formación, deposición, acumulación y/o persistencia de amiloide que se produce en la enfermedad de Alzheimer y otras amiloidosis.

Por tanto, se necesitan urgentemente nuevos compuestos o agentes para regímenes terapéuticos para detener o revertir la formación, deposición, acumulación y/o persistencia de amiloide que se produce en la enfermedad de Alzheimer y otras amiloidosis.

#### 40 **Sumario de la invención**

45 La presente invención proporciona *scyllo*-inositol en combinación con otro tratamiento para uso en el tratamiento o la prevención de un estado del sistema nervioso central o periférico u órgano sistémico asociado con un trastorno de la agregación o plegado de proteínas, o formación, deposición, acumulación o persistencia de amiloide donde el otro tratamiento de este tipo se selecciona del grupo de: inhibidores de la beta-secretasa, inhibidores de gamma-secretasa, inhibidores de  $\epsilon$ -secretasa, otros inhibidores de la agregación en lámina beta/fibrillogénesis/formación de ADDL, antagonistas de NMDA, compuestos antiinflamatorios no esteroideos, antioxidantes, hormonas, nutrientes y complementos alimenticios; inhibidores de acetilcolinesterasa, agonistas muscarínicos, antipsicóticos; antidepresivos, terapia génica y/o enfoques basados en fármacos para regular por incremento la neprilisina; terapia génica y/o enfoques basados en fármacos para regular por incremento la enzima que degrada la insulina, vacunas, compuestos inmunoterapéuticos y anticuerpos frente a A $\beta$ , estatinas y otros fármacos hipocolesteromiantes, células madre y otras terapias basadas en células, inhibidores de cinasas que fosforilan la proteína TAU e inhibidores de cinasas que modulan la producción de A $\beta$ .

55 El estado del sistema nervioso central o periférico u órgano sistémico puede seleccionarse del grupo de: enfermedad de Alzheimer, formas presenil y senil; angiopatía amiloide; disfunción cognitiva leve; demencia relacionada con la enfermedad de Alzheimer; tauopatía;  $\alpha$ -sinocleionopatía; enfermedad de Parkinson; esclerosis lateral amiotrófica; enfermedad de motoneuronas; paraplejía espástica; enfermedad de Huntington; ataxia espinocerebelar; enfermedades neurodegenerativas asociadas a agregados intracelulares y/o intraneuronales de proteínas con poliglutamina, polialanina u otras repeticiones que surgen de expansiones patológicas de elementos de tri o tetra-nucleótido con genes correspondientes; enfermedades cerebrovasculares; síndrome de Down; traumatismo craneal con acumulación postraumática de péptido beta-amiloide; enfermedad relacionada con priones; demencia británica familiar; demencia presenil con ataxia espástica; angiopatía amiloide cerebral, tipo británico; demencia presenil con angiopatía amiloide cerebral con ataxia espástica, tipo danés; encefalopatía familiar con cuerpos de inclusión de neuroserpina (FENIB); polineuropatía amiloide; miositis por cuerpos de inclusión debida a péptido beta-amiloide;

amiloidosis de tipo familiar y finlandés; amiloidosis sistémica asociada a mieloma múltiple; fiebre mediterránea familiar; infecciones e inflamaciones crónicas; y diabetes mellitus tipo II asociada a polipéptido amiloide de los islotes.

5 El estado del sistema nervioso central o periférico u órgano sistémico puede ser síndrome de Down.

El estado del sistema nervioso central o periférico u órgano sistémico puede ser enfermedad de Alzheimer.

El estado del sistema nervioso central o periférico u órgano sistémico puede ser deterioro cognitivo moderado.

10

El otro tratamiento puede ser un inhibidor de acetilcolinesterasa, tal como donepezil.

El otro tratamiento puede ser un antagonista de NMDA, tal como memantina.

15 La presente invención también proporciona una composición para uso en el tratamiento o la prevención de un estado del sistema nervioso central o periférico u órgano sistémico asociado con un trastorno en la agregación o plegado de proteínas, o la formación, deposición, acumulación o persistencia de amiloide que comprende *scyllo*-inositol y otro tratamiento tal como se ha definido anteriormente.

20 El *scyllo*-inositol puede ser para administración oral.

El *scyllo*-inositol puede estar en forma de una pastilla oral, suspensión o líquido oral.

25 El otro tratamiento se puede seleccionar del grupo de: inhibidores de gamma-secretasa específicos o no específicos de APP o inhibidores de épsilon-secretasa, Alzhemed, memantina, Ibuprofeno, Celebrex, vitamina E, estrógenos, *Gingko biloba*, donepezil, AF102B, Cevimelina, EVOXAC, AF150(S), AF247B, haloperidol, clozapina, olanzapina, Sertralina, Citalopram Hbr, ELAN AN-1792, Lovastatina, Simvastatina y cloruro de litio.

#### Breve descripción de los dibujos

30

La figura 1A muestra la estructura de *mio*-, *epi*- y *scyllo*-inositol mientras que las figuras 1B-1H muestran la versión de memoria de referencia espacial de la prueba de laberinto de agua de Morris en ratones TgCRND8. Los tratamientos con *mio*-inositol no alteraron la función cognitiva (1B). A los 6 meses de edad, los TgCRND8 no tratados (n=10) muestran una disfunción cognitiva en relación con controles no-Tg y ratones tratados con *epi*- (1C) y *scyllo*-inositol (1D) (n=10 por grupo, p <0,02 no tratados frente a tratados). El rendimiento de ratones TgCRND8 tratados con *epi*-inositol se mantuvo alterado con respecto a compañeros de camada no-Tg (1E) mientras que el rendimiento de TgCRND8 tratados con *scyllo*-inositol se aproximó al de compañeros de camada no-Tg (1F). El comportamiento de compañeros de camada no-Tg no estaba afectado por el tratamiento o bien con *epi*- (1G) o bien con *scyllo*-inositol (1H). Las barras verticales representan el EEM.

40

Las figuras 2A-2I muestran, a los 6 meses de edad, la carga de placas y astrogliosis en ratones TgCRND8 tratados con *epi*- y *scyllo*-inositol. Los animales control tienen una astrogliosis y carga de placas altas en el hipocampo (2A) y la corteza cerebral (2B). Un mayor aumento demuestra que la activación astrocítica no sólo está asociada a la carga de placas (2C). El tratamiento con *epi*-inositol tiene un efecto modesto sobre la carga de amiloide con una disminución en la astrogliosis (2D, 2E y 2F). El tratamiento con *scyllo*-inositol redujo significativamente la carga de amiloide y la gliosis (2G, 2H y 2I). Un mayor aumento ilustra el tamaño de placa medio más pequeño en ratones tratados con *scyllo*-inositol (2I). Los astrocitos se marcaron usando anticuerpo anti-GFAP y se identificó la carga de placas usando anticuerpo anti-A $\beta$ . Barra de escala de 450 micrómetros (A, B, D, E, G, H) y 94 micrómetros (C, F, I).

45

50 Las figuras 3A-3D muestran que las especies de A $\beta$ , 1-42, 1-40 y 1-38, en ratones TgCRND8 tratados y control, eran indistinguibles (3A) como lo era el grado de procesamiento de APP (3B). Se cuantificó la carga de amiloide vascular sobre secciones sagitales en serie en ratones TgCRND8 tratados y no tratados. Los ratones TgCRND8 tienen una carga de amiloide vascular significativa que está asociada a vasos de tamaño medio y pequeño, la carga se reduce en ratones TgCRND8 tratados con *scyllo*-inositol (3A). El tratamiento con *scyllo*-inositol redujo significativamente la carga vascular total en comparación con ratones TgCRND8 tratados con *epi*-inositol y no tratados (3C). El *scyllo*-inositol reduce la deposición de placas tal como se ilustra mediante la reducción significativa en el tamaño de placa medio (3D).

55

60 La figura 4 muestra el efecto del agua sobre la función cognitiva de ratones TgCRND8 y no-Tg usando la versión de memoria de referencia espacial del laberinto de agua de Morris en un modelo de ensayo de tres días.

La figura 5 muestra el efecto de *scyllo*-inositol sobre la función cognitiva de ratones TgCRND8 y no-Tg usando la versión de memoria de referencia espacial del laberinto de agua de Morris en un modelo de ensayo de tres días.

65 La figura 6 muestra el efecto de *epi*-inositol sobre la función cognitiva de ratones TgCRND8 y no-Tg usando la versión de memoria de referencia espacial del laberinto de agua de Morris en un modelo de ensayo de tres días.

La figura 7 muestra el efecto de *mio*-inositol sobre la función cognitiva de ratones TgCRND8 y no-Tg usando la versión de memoria de referencia espacial del laberinto de agua de Morris en un modelo de ensayo de tres días.

5 La figura 8 muestra el efecto de *scyllo*-inositol, *epi*-inositol y *mio*-inositol sobre la función cognitiva de TgCRND8 (fase de aprendizaje y prueba de memoria) y en comparación con ratones de tipo natural usando la versión de memoria de referencia espacial del laberinto de agua de Morris en un modelo de ensayo de tres días.

10 La figura 9 muestra el porcentaje de área del cerebro cubierta con placas en ratones TgCRND8 no tratados frente a ratones tratados con *scyllo*-inositol, *epi*-inositol o *mio*-inositol.

Las figuras 10A y 10B muestran las tasas de supervivencia de ratones TgCRND8 tratados con agua frente a *epi*-inositol o *mio*-inositol (10A) o frente a *scyllo*-inositol (10B).

15 Las figuras 11A-D muestran los resultados de la versión de memoria de referencia espacial de la prueba del laberinto de agua de Morris en ratones TgCRND8 de 6 meses de edad no tratados o tratados con manitol (A, B). Los ratones TgCRND8 tratados con manitol no eran significativamente diferentes de los ratones TgCRND8 no tratados ( $p=0,89$ ; A). El rendimiento de ratones TgCRND8 tratados con manitol era significativamente diferente de  
20 compañeros de camada no-Tg tratados con manitol ( $p=0,05$ ; B). Se analizó la carga de placas a los 6 meses de edad usando análisis de imágenes cuantitativos (C). Los ratones TgCRND8 tratados con manitol eran indistinguibles de los ratones TgCRND8 no tratados cuando se usó el recuento de placas como una medida de la carga de placas total ( $p=0,87$ ). Las barras verticales representan el EEM. Gráficas de supervivencia acumulativa de Kaplan-Meier para ratones TgCRND8 tratados y no tratados con manitol (D). Las dos cohortes de animales,  $n=35$  por grupo, no eran significativamente diferentes tal como se determinó mediante la prueba estadística de Tarone-Ware,  $p=0,87$ .

25 Las figuras 12A y B muestran los resultados de una prueba de memoria de referencia espacial en los estudios de tratamiento cuando se realizó en un modelo de ensayo de tres días. El rendimiento de ratones TgCRND8 tratados con *scyllo*-inositol era comparable al de compañeros de camada no-Tg tratados con *scyllo*-inositol ( $p=0,38$ ; A). En concordancia, los ratones TgCRND8 tratados con *scyllo*-inositol seguían siendo indistinguibles de los compañeros  
30 de camada no-Tg tras dos meses de tratamiento ( $p=0,67$ ; B).

Las figuras 13A y B muestran los niveles de A $\beta$  dentro del SNC tras la administración de diversas dosis de *scyllo*-inositol que se administraron una vez al día durante un mes a ratones TgCRND8 de cinco meses de edad. Se redujeron los niveles de A $\beta$ 42 soluble a todas las dosis y eran significativamente diferentes de los controles no  
35 tratados (A). En cambio, A $\beta$ 42 insoluble no era significativamente diferente en todas las condiciones (B). Las barras verticales representan el EEM.

Figura 14. Se analizaron ratones TgCRND8 a los que se administraron diversas dosis de *scyllo*-inositol una vez al día durante un mes para determinar los niveles de A $\beta$ 40 cerebral. No se detectaron diferencias en los niveles de  
40 A $\beta$ 40 soluble (A) e insoluble (B) de ratones TgCRND8 no tratados y tratados con *scyllo*-inositol a todas las dosis examinadas.

La figura 15 muestra el rendimiento cognitivo de ratones TgCRND8 tratados con *alo*-inositol de 6 meses de edad en comparación con el de sus compañeros de camada no transgénicos.

45 Las figuras 16A-D muestran que a los 2 meses de edad, la carga de placas en ratones TgPS1 x APP disminuye en ratones tratados con *scyllo*-inositol. Los animales control tienen una carga de placas alta en el hipocampo (A) y la corteza cerebral (B). El tratamiento con *scyllo*-inositol redujo significativamente la carga de amiloide (C, D). La carga de placas se identificó usando anticuerpo anti-A $\beta$  (marrón). Barra de escala de 300  $\mu$ m.

50 Las figuras 17A-C muestran la cuantificación de la carga de placas en ratones TgPS1xAPP tras el tratamiento con *scyllo*-inositol. El porcentaje de área del cerebro cubierta con placas (A), el tamaño de placa medio (B) y el recuento de placas (C) se redujeron significativamente. Las barras verticales son el EEM.

## 55 Descripción detallada de la invención

La presente invención da a conocer propiedades nuevas, impredecibles e inesperadas de determinados estereoisómeros del inositol en relación con el tratamiento de trastornos relacionados con el amiloide tales como la  
60 enfermedad de Alzheimer.

Se ha descubierto sorprendentemente que determinados estereoisómeros del inositol y compuestos relacionados bloquean el deterioro cognitivo progresivo inducido por A $\beta$  y la patología de placas de amiloide cerebrales, y mejoran la supervivencia cuando se administran a un modelo de ratón transgénico de la enfermedad de Alzheimer humana durante la fase incipiente de la deposición de A $\beta$ .

65

Tal como se dio a conocer anteriormente, los datos previos sugerían que algunos, pero no todos los estereoisómeros del inositol podrían presentar un efecto sobre la agregación del amiloide en células neuronales en cultivo *in vitro* (McLaurin *et al.*, J. Biol. Chem. 275 (24): 18495-18502 (2000)). Esas observaciones no proporcionaban ningún método para predecir cuál, si es que había alguno, de los estereoisómeros estudiados (*mio-*, *epi-*, *scyllo* y *quiro*-inositales) tenía tales efectos, ni si algún otro estereoisómero tenía tales efectos. Además, esos estudios no pudieron predecir si algún estereoisómero del inositol tenía efectos sobre la deposición de amiloide, los defectos cognitivos o la duración de la vida *in vivo*. Los resultados impredecibles mostrados en la presente muestran que únicamente ciertos estereoisómeros del inositol, en particular *scyllo-* y *alo-*inositales reducen la carga de placas de amiloide, mejoran la cognición y aumentan la duración de la vida en modelos animales de trastornos relacionados con el amiloide, mientras que otros estudiados no tenían tales efectos.

Los estudios previos también sugerían que sólo ciertos estereoisómeros del inositol (por ejemplo, *epi-* y *scyllo-*inositales) podrían inhibir la agregación de amiloide *de novo in vitro*. Los resultados inesperados presentados en la presente muestran que el *scyllo-*inositol inhibe la deposición de amiloide cerebral ya establecida, y lo hace en el cerebro vivo. Esto no está implícito en los datos *in vitro* publicados anteriormente que consideraban sólo determinados tipos de células neuronales en cultivo, no los complejos tejidos del cerebro vivo, y sólo sugerían que los inositales podrían inhibir la agregación *de novo*, no presentando de ese modo relevancia para la enfermedad establecida.

Los datos *in vitro* previos también sugerían que la administración de *epi-* y *scyllo-*inositol afecta a los niveles de amiloide A $\beta$ 40 así como a los niveles de A $\beta$ 42. El estudio de dosificación *in vivo* presentado aquí reveló el resultado impredecible de que la administración de *alo-* o *scyllo-*inositol reducía específicamente los niveles de A $\beta$ 42, mientras que los niveles de A $\beta$ 42 insoluble y de A $\beta$ 40 o bien soluble o bien insoluble permanecían inalterados.

La observación que muestra cambios en la inflamación y actividad glial es novedosa y sorprendente, y no podía haberse predicho mediante los datos *in vitro* anteriormente publicados.

La observación que demuestra que el *scyllo-*inositol mejora la duración de la vida en animales modelo transgénicos es también novedosa y sorprendente, dado que no se había mostrado anteriormente ningún fármaco para la enfermedad de Alzheimer que aumentase la supervivencia y prolongase la duración de la vida *in vivo*.

La presente invención se refiere al uso de *scyllo-*inositol en combinación con otro tratamiento.

Incluso cuando se administra tras haberse establecido bien la patología amiloide durante varios meses, el *scyllo-*inositol revierte de manera eficaz la acumulación de A $\beta$  cerebral y la patología amiloide.

Por consiguiente, se encontró que este compuesto es útil en el tratamiento o la prevención en un sujeto de un estado del sistema nervioso central o periférico u órgano sistémico asociado a un trastorno en la agregación o el plegado de proteínas, o la formación, deposición, acumulación o persistencia de amiloide. También se ha observado que este compuesto es útil en la prevención del plegado de proteínas anómalo, agregación de proteínas anómala, formación, deposición, acumulación o persistencia de amiloide o interacciones amiloide lípidos así como también para provocar la disociación de proteínas agregadas de manera anómala y/o para disolver o disgregar fibrilla amiloide o amiloide preformado o predepositado en un sujeto.

Preferiblemente, el estado del sistema nervioso central o periférico u órgano sistémico da como resultado la deposición de proteínas, fragmentos de proteínas y péptidos en agregados y/o fibrillas y/o láminas plegadas en beta. Más preferiblemente, el estado del sistema nervioso central o periférico u órgano sistémico se selecciona del grupo de: enfermedad de Alzheimer, formas presenil y senil; angiopatía amiloide; disfunción cognitiva leve; demencia relacionada con la enfermedad de Alzheimer; tauopatía;  $\alpha$ -sinucleinopatía; enfermedad de Parkinson; esclerosis lateral amiotrófica; enfermedad de motoneuronas; paraplejía espástica; enfermedad de Huntington, ataxia espinocerebelar, ataxia de Freidrich; enfermedades neurodegenerativas asociadas a agregados intracelulares y/o intraneuronales de proteínas con poliglutamina, polialanina u otras repeticiones que surgen de expansiones patológicas de elementos de tri o tetra-nucleótido dentro de genes correspondientes; enfermedades cerebrovasculares; síndrome de Down; traumatismo craneal con acumulación postraumática de péptido beta-amiloide; enfermedad relacionada con priones; demencia británica familiar; demencia danesa familiar; demencia presenil con ataxia espástica; angiopatía amiloide cerebral, tipo británico; demencia presenil con angiopatía amiloide cerebral con ataxia espástica, tipo danés; encefalopatía familiar con cuerpos de inclusión de neuroserpina (FENIB); polineuropatía amiloide; miositos por cuerpos de inclusión debida a péptido beta-amiloide; amiloidosis de tipo familiar y finlandés; amiloidosis sistémica asociada a mieloma múltiple; fiebre mediterránea familiar; infecciones e inflamaciones crónicas; y diabetes mellitus tipo II asociada a polipéptido amiloide de los islotes (IAPP).

También preferiblemente, las demencias relacionadas con la enfermedad de Alzheimer son demencia por Alzheimer o vascular y tauopatía seleccionadas del grupo de demencia con gránulos argirófilos, degeneración corticobasal, demencia pugilística, marañas neurofibrilares difusas con calcificación, demencia frontotemporal con parkinsonismo, enfermedad relacionada con priones, enfermedad de Hallervorden-Spatz, distrofia miotónica, enfermedad de

Niemann-Pick tipo C, enfermedad de motoneuronas no de Guam con marañas neurofibrilares, enfermedad de Pick, parkinsonismo posencefalítico, angiopatía amiloide cerebral de proteína priónica, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda y demencia sólo por marañas.

- 5 También preferiblemente, la  $\alpha$ -sinucleinopatía se selecciona del grupo de demencia con cuerpos de Lewy, atrofia sistémica múltiple con inclusiones citoplasmáticas gliales, síndrome de Shy-Drager, degeneración estriatonigral, atrofia olivopontocerebelosa, neurodegeneración con acumulación de hierro en el cerebro, tipo I, disfunción olfativa y esclerosis lateral amiotrófica.
- 10 De nuevo preferiblemente, la enfermedad de motoneuronas está asociada a filamentos y agregados de neurofilamentos y/o proteínas superóxido dismutasa, la paraplejía espástica está asociada a una función defectuosa de las chaperonas y/o las proteínas A triples y la ataxia espinocerebelosa es DRPLA o enfermedad de Machado-Joseph.
- 15 También preferiblemente, la enfermedad relacionada con priones se selecciona del grupo de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker y variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y la polineuropatía amiloide es polineuropatía amiloide senil o amiloidosis sistémica.

- 20 Más preferiblemente, el estado del sistema nervioso central o periférico u órgano sistémico es enfermedad de Parkinson incluyendo los tipos familiar y no familiar. Lo más preferiblemente, dicho estado del sistema nervioso central o periférico u órgano sistémico es enfermedad de Alzheimer.

- 25 Preferiblemente, el compuesto se administra al sujeto en una dosis de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1 g por kg, preferiblemente de 1 mg a aproximadamente 200 mg por kg, más preferiblemente de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 100 mg por kg y lo más preferiblemente de aproximadamente 30 mg a 70 mg por kg del peso de dicho sujeto. La administración puede lograrse mediante una variedad de vías tal como por vía oral (pastilla oral, suspensión o líquido oral), por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intradérmica, por vía transcutánea, por vía subcutánea, por vía intranasal, por vía sublingual, mediante supositorio rectal o inhalación, siendo la administración oral la más preferida. La administración de los compuestos de la presente invención puede emprenderse a diversos intervalos tales como una vez al día, dos veces al día, una vez a la semana, una vez al mes o de manera continua.
- 30

- El *scyllo-inositol* se administra en combinación con otro tratamiento tal como inhibidores de beta-secretasa, inhibidores de gamma-secretasa (específicos o no específicos de APP), inhibidores de épsilon-secretasa (específicos o no específicos de APP), otros inhibidores de la agregación en lámina beta/fibrillogénesis/formación de ADDL (por ejemplo Alzhemed), antagonistas de NMDA (por ejemplo memantina), compuestos antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo Ibuprofeno, Celebrex), antioxidantes (por ejemplo vitamina E), hormonas (por ejemplo estrógenos), nutrientes y complementos alimenticios (por ejemplo *Gingko biloba*); inhibidores de acetilcolinesterasa (por ejemplo donezepilo), agonista muscarínico (por ejemplo AF102B (Cevimelina, EVOXAC), AF150(S) y AF267B), antipsicóticos (por ejemplo haloperidol, clozapina, olanzapina); antidepresivos, incluyendo inhibidores tricíclicos y de la recaptación de serotonina (por ejemplo Sertralina y Citalopram Hbr), terapia génica y/o enfoques basados en fármacos para regular por incremento la neprilisina (una enzima que degrada el A $\beta$ ); terapia génica y/o enfoques basados en fármacos para regular por incremento la enzima que degrada la insulina (una enzima que degrada el A $\beta$ ), vacunas, compuestos inmunoterapéuticos y anticuerpos frente a A $\beta$  (por ejemplo ELAN AN-1792), estatinas y otros fármacos hipocolesteromiantes (por ejemplo Lovastatina y Simvastatina), células madre y otras terapias basadas en células, inhibidores de cinasas (CDK5, GSK3 $\alpha$ , GSK3 $\beta$ ) que fosforilan la proteína TAU (por ejemplo cloruro de litio) o inhibidores de cinasas que modulan la producción de A $\beta$  (cinasas GSK3 $\beta$ , GSK3 $\beta$ , Rho/ROCK) (por ejemplo cloruro de litio e Ibuprofeno).
- 35
- 40
- 45

- 50 Se cree que estas otras terapias actúan mediante un mecanismo diferente y pueden tener efectos aditivos/sinérgicos con la presente invención. Además, muchos de estas otras terapias tendrán efectos secundarios basados en el mecanismo y/u otros efectos secundarios que limitan la dosis o duración en la que pueden administrarse solos.

- 55 El *scyllo-inositol* es útil también en el diagnóstico de la presencia de una proteína agregada o plegada de manera anómala y/o fibrilla amiloide o amiloide en un sujeto usando un método que comprende administrar a dicho sujeto un compuesto radiactivo o compuesto marcado con una sustancia que emite una señal detectable en una cantidad suficiente y en condiciones que permiten la unión de dicho compuesto a la proteína agregada o plegada de manera anómala y/o fibrillas o amiloide, si están presentes; y detectar la radiactividad o la señal del compuesto unido a la proteína agregada o plegada de manera anómala y/o fibrillas o amiloide, diagnosticando así la presencia de la proteína agregada o plegada de manera anómala y/o fibrilla amiloide o amiloide.
- 60

- Alternativamente, se recoge de un sujeto una muestra sospechosa de contener proteína agregada o plegada de manera anómala y/o fibrilla amiloide o amiloide y se pone en contacto con un compuesto radiactivo o compuesto marcado con una sustancia que emite una señal detectable en condiciones que permiten la unión de dicho compuesto a la proteína agregada o plegada de manera anómala y/o fibrilla amiloide o amiloide si están presentes; y
- 65

después de eso detectar la radiactividad o la señal del compuesto unido a la proteína agregada o plegada de manera anómala y/o fibrillas o amiloide, diagnosticando así la presencia de proteína agregada o plegada de manera anómala y/o fibrilla amiloide o amiloide en dicho sujeto.

- 5 Preferiblemente, dicha señal detectable es una señal fluorescente o de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas y dicha muestra es sangre completa (incluyendo todos los constituyentes celulares) o plasma.

10 Tal como se muestra a continuación el *scyllo-inositol* puede suprimir la acumulación cerebral de A $\beta$ , la deposición de placas de amiloide cerebrales y el deterioro cognitivo en un modelo de ratón transgénico de la enfermedad de Alzheimer cuando se administra durante la fase "presintomática tardía", antes de la aparición de déficits cognitivos manifiestos y neuropatología amiloide en estos ratones. Además, incluso cuando se administra tras la aparición de déficits cognitivos y neuropatología de placas de amiloide, el *scyllo-inositol* puede revertir de manera eficaz la deposición de amiloide y la neuropatología. De manera importante, el mecanismo de acción de este compuesto sigue un diseño racional basado en su capacidad para modular el ensamblaje de monómeros de A $\beta$  en protofibrillas y/u oligómeros neurotóxicos.

Los ejemplos se presentan únicamente a modo de referencia.

20 **Ejemplo 1 - Desarrollo de un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer y métodos de administración de compuestos**

Los ratones TgCRND8 son un modelo murino robusto de la enfermedad de Alzheimer tal como se describe por Janus *et al.* (Nature 408: 979-982 (2000)). Expresan un transgén de la proteína precursora amiloide humana (APP695) bajo la regulación del promotor de priones de hámster sirio en un antecedente no cosanguíneo C3H/B6. El transgén APP695 humano lleva dos mutaciones que provocan EA en seres humanos (K670N/M671L y V717F). Comenzando a aproximadamente 3 meses de edad, los ratones TgCRND8 tienen déficits de aprendizaje espacial progresivos que están acompañados por niveles crecientes de A $\beta$  cerebral y por un número creciente de placas de amiloide extracelulares cerebrales que son similares a las observadas en los cerebros de seres humanos con EA (C. Janus *et al.*, Nature 408: 979-982 (2000)).

30 Las cohortes emparejadas por sexo y edad de ratones TgCRND8 y compañeros de camada no transgénicos (n=35 en cada cohorte) estaban o bien sin tratar, o bien se les administró un compuesto de la presente invención tal como se indica a continuación a 30 mg/día/ratón comenzando a la edad de aproximadamente 6 semanas. Se hizo un seguimiento de los ratones para obtener medidas de los desenlaces de la función cognitiva, los niveles de A $\beta$  cerebrales, la patología cerebral y la supervivencia a los 4 meses y 6 meses de edad.

Métodos de los estudios de prevención

40 Ratones - Se alimentaron grupos experimentales de ratones TgCRND8 con *mio*-, *epi*- y *scyllo*-inositol a 30 mg/ratón/día. Dos cohortes entraron en el estudio a las 6 semanas de edad y se analizaron los desenlaces a los 4 y 6 meses de edad. Se monitorizó el peso corporal, las características del pelaje y el comportamiento en la jaula. Se realizaron todos los experimentos según las directrices del Consejo Canadiense para el Cuidado de Animales ("Canadian Council on Animal Care guidelines").

45 Pruebas de comportamiento - Tras el entrenamiento previo no espacial, se sometió a los ratones a entrenamiento de discriminación de lugares durante 5 días con 4 ensayos por día. Se analizaron los datos de comportamiento usando un modelo mixto de análisis factorial de la varianza (ANOVA) con fármaco o genotipo o sesiones de entrenamiento como factores de medida repetidos.

50 Carga de amiloide cerebral - Se extirparon los cerebros y se fijó un hemisferio en paraformaldehído al 4% y se incrustó en cera de parafina en el plano sagital medio. Para generar conjuntos de secciones al azar uniformes sistemáticas, se recogieron secciones en serie de 5  $\mu$ m a través de todo el hemisferio. Se usaron conjuntos de secciones a intervalos de 50  $\mu$ m para los análisis (10-14 secciones/conjunto). Se identificaron las placas tras la recuperación del antígeno con ácido fórmico, y se incubaron con anticuerpo primario anti-A $\beta$  (Dako M-0872), seguido por anticuerpo secundario (kit Dako StreptABCcomplex/peroxidasa del rábano). Se visualizaron los productos finales con DAB teñido por contraste con hematoxilina. Se evaluó la carga de placas de amiloide usando el software de análisis de imágenes Leco IA-3001 conectado con un microscopio Leica y una cámara de vídeo Hitachi KIP-MU CCD. Se analizó la carga vascular de manera similar y se usó un disector para medir el diámetro de los vasos afectados.

60 Contenido en A $\beta$  plasmático y cerebral - Se homogeneizaron muestras de hemicerebro en una disolución de sacarosa tamponada, seguido por o bien dietilamina al 0,4%/NaCl 100 mM para los niveles de A $\beta$  soluble o bien ácido fórmico frío para el aislamiento de A $\beta$  total. Tras la neutralización, se diluyeron las muestras y se analizaron para detectar A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 usando kits disponibles comercialmente (BIOSOURCE International). Se analizó cada hemisferio por triplicado notificándose la media  $\pm$  EEM. Se realizaron análisis de inmunotransferencia de tipo

Western en todas las fracciones usando geles de urea para los análisis de la especie de A $\beta$ . Se detectó A $\beta$  usando 6E10 (BIOSOURCE International) y quimioluminiscencia potenciada (Amersham).

5 Análisis de APP en el cerebro - Se homogeneizaron muestras de hemiserebro de ratón en Tris 20 mM pH 7,4, sacarosa 0,25 M, EDTA 1 mM y EGTA 1 mM, y un cóctel de inhibidor de proteasas, se mezcló con DEA (dietilamina) al 0,4%/NaCl 100 mM y se centrifugó a 109.000 Xg. Se analizaron los sobrenadantes para determinar los niveles de APP mediante inmunotransferencia de tipo Western usando Acm 22C11, mientras que se analizaron los sedimentos para detectar la holoproteína APP usando Acm C1/6.1.

10 Cuantificación de la gliosis - Se recogieron cinco secciones sagitales espaciadas de manera uniforme, seleccionadas al azar de hemisferios congelados y fijados con paraformaldehído de ratones tratados y control. Se inmunomarcaron secciones para detectar astrocitos con IgG<sub>2a</sub> anti-GFAP de rata (Dako; diluida 1:50) y para detectar la microglia con IgG2b anti-CD68 de rata (Dako; 1:50). Se capturaron imágenes digitales usando una cámara digital Coolsnap (Photometrics, Tuscon, Arizona) montada en un microscopio Axioscope 2 Plus de Zeiss. Se analizaron las imágenes usando el software de procesamiento de imágenes Openlab 3.08 (Improvision, Lexington MA).

15 Censo de supervivencia - Se evaluó la probabilidad de supervivencia mediante la técnica de Kaplan-Meier, que calcula la probabilidad de supervivencia en cada caso de muerte, lo que la hace adecuada para tamaños de muestra pequeños. Para los análisis de la supervivencia, se usaron 35 ratones para cada grupo de tratamiento. Se notificó la comparación entre tratamientos usando la prueba de Tarone-Ware.

### Ejemplo 2 - Prevención de los déficits cognitivos

25 Se evaluó la función cognitiva de ratones TgCRND8 usando la versión de memoria de referencia espacial del laberinto de agua de Morris usando un modelo de ensayo de cinco días (figuras 1C-1H). Se analizaron datos de ratones TgCRND8 tratados y no tratados, y de compañeros de camada no-Tg tratados y no tratados (n= 10 para todas las combinaciones) usando un modelo mixto de análisis de la varianza (ANOVA) con el tratamiento (no tratado, *epi*- o *scyllo*-inositol) y el genotipo (TgCRND8 frente a no-Tg) como factores "entre sujetos". Los ratones TgCRND8 tratados o bien con *epi*- o bien con *scyllo*-inositol tuvieron un rendimiento significativamente mejor que los ratones TgCRND8 no tratados ( $p < 0,02$ ; figuras 1C y D). En comparación con compañeros de camada no-Tg tratados o no tratados, los ratones TgCRND8 tratados con *epi*-inositol presentaron una curva de aprendizaje ligeramente más lenta durante los primeros tres días de entrenamiento. Sin embargo, tras 4 días de entrenamiento, los ratones TgCRND8 tratados con *epi*-inositol no eran estadísticamente diferentes de sus compañeros de camada no-Tg (figura 2E). En cambio, los ratones TgCRND8 tratados con *scyllo*-inositol eran indistinguibles de sus compañeros de camada no-Tg en todos los días. Por tanto, ambos estereoisómeros inhibieron el desarrollo de déficits cognitivos, y el *scyllo*-inositol previno realmente los déficits hasta tal grado que los ratones TgCRND8 tratados con *scyllo*-inositol eran indistinguibles de los ratones normales. Este rendimiento mejorado no se debía a un efecto no específico sobre los sistemas de comportamiento, motores o de percepción debido a que el tratamiento con *epi*- y *scyllo*-inositol no tuvo efecto sobre el rendimiento de ratones no-Tg (figuras 2G y 2H). El rendimiento mejorado tampoco se debía a efectos nutricionales o calóricos porque el peso corporal, la actividad y el estado del pelaje no eran diferentes entre las cohortes tratada y no tratada. Además, el tratamiento con manitol (un azúcar de peso molecular similar) no tuvo efectos sobre el comportamiento. Los efectos del género no eran significativos entre ningún grupo de tratamiento ( $p=0,85$ ).

### 45 Ejemplo 3 - Reducción de la carga de A $\beta$ cerebral y neuropatología amiloide

A los cuatro meses de edad, los ratones TgCRND8 no tratados tienen una expresión robusta tanto de A $\beta$ 40 como de A $\beta$ 42 (tabla 1). El tratamiento con *epi*-inositol tal como se describió en el ejemplo 1 redujo tanto los niveles de A $\beta$ 40 (reducción del  $43 \pm 2\%$  tanto en los conjuntos solubles como insolubles;  $p \leq 0,05$ ) como los niveles de A $\beta$ 42 (reducción del 69% en el conjunto soluble,  $p=0,05$ ; reducción del 28% en el conjunto insoluble,  $p=0,02$ ) a los 4 meses de edad. Sin embargo, estas mejoras no se mantuvieron, y a los 6 meses de edad, los niveles de A $\beta$  cerebrales se elevaron hasta niveles similares a los observados en ratones TgCRND8 no tratados (tabla 1).

55 En cambio, a los cuatro meses de edad, el tratamiento con *scyllo*-inositol redujo el A $\beta$ 40 cerebral total en un 62% ( $p=0,0002$ ) y el A $\beta$ 42 cerebral total en un 22% ( $p=0,0096$ ; tabla 1). A los 6 meses de edad, el tratamiento con *scyllo*-inositol provocó una reducción del 32% en los niveles de A $\beta$ 40 ( $p=0,04$ ) y una reducción del 20% en A $\beta$ 42 ( $p=0,02$ ) en comparación con ratones TgCRND8 no tratados.

60 Debido a que la disminución de las concentraciones de A $\beta$  detectada tras el tratamiento con inositol podía haber resultado de un flujo de salida alterado de A $\beta$  hacia el plasma, se examinaron los niveles de A $\beta$ - $\beta$  en el plasma a los 4 y 6 meses de edad (tabla 1). Los ratones TgCRND8 tienen altas concentraciones plasmáticas en la EA a los 4 meses de edad y se mantienen constantes a los 6 meses de edad aún cuando la carga de placas del SNC está aumentando todavía a los 6 meses de edad (tabla 1). Ni el tratamiento con *epi*-inositol ni el tratamiento con *scyllo*-inositol tuvieron ningún efecto sobre los niveles de A $\beta$  plasmáticos en comparación con ratones TgCRND8 no tratados ( $p=0,89$ ). La explicación más simple para esta observación es que el inositol ha alterado selectivamente la

- fibrilización de Aβ en el SNC, pero no han afectado a la actividad β- o -secretasa, o a los mecanismos normales de aclaramiento de Aβ en el plasma. No obstante, esta observación es significativa por dos motivos. En primer lugar, se detecta habitualmente una caída en los niveles de Aβ plasmáticos y en LCR a medida que avanza la evolución clínica en pacientes con EA no tratados (Mayeux, *et al.*, Ann. Neurol. 46, 412, 2001). En segundo lugar, los pacientes en el estudio de inmunización AN1792 que desarrollaron una fuerte respuesta de anticuerpos y una respuesta clínica evidente no tenían niveles de Aβ-β plasmáticos alterados (Hock *et al.*, Neuron 38, 547 2003). Por tanto, estos resultados indican que no es necesario cambiar los niveles de Aβ plasmáticos para obtener un desenlace terapéutico eficaz.
- 10 Para confirmar que los estereoisómeros del inositol no tenían efecto o bien sobre la expresión o bien sobre el procesamiento proteolítico de APP, se examinaron los niveles de holoproteína APP, sAPP-β y diversas especies de Aβ dentro del cerebro de ratones TgCRND8 tratados y no tratados con inositol. De manera consecuente con los datos anteriormente notificados (McLaurin, *et al.*, Nat. Med. 8,1263, 2002), Aβ42, Aβ40 y Aβ38 son las especies predominantes en el cerebro de ratones TgCRND8 (figura 3A), y los niveles en el SNC de APP inmadura y madura glicosilada (figura 3B) y de sAPP-α eran indistinguibles independientemente del tratamiento. En combinación, estos resultados indican que el *epi*- y *scyllo*-inositol tienen un efecto directo y selectivo sobre la oligomerización de Aβ y no sobre el procesamiento de APP.
- 20 Los cambios en la carga de péptido Aβ-β estaban acompañados por una disminución significativa en la carga de placas (tabla 1; figuras 2A-2I). En ratones TgCRND8 tratados con *epi*-inositol, hubo una disminución significativa en el tamaño de placa medio a los 4 pero no a los 6 meses de edad en comparación con ratones TgCRND8 no tratados ( $95 \pm 4,3 \mu\text{m}^2$  frente a  $136 \pm 15 \mu\text{m}^2$ ,  $p = 0,04$ ;  $370 \pm 9 \mu\text{m}^2$  frente a  $423 \pm 22 \mu\text{m}^2$ ,  $p = 0,06$ , respectivamente). Estos resultados indican que a niveles de Aβ modestos, el *epi*-inositol previene la oligomerización de Aβ pero una vez iniciada a concentraciones de Aβ superiores, el *epi*-inositol no puede inhibir la fibrillogénesis. El tratamiento con *scyllo*-inositol redujo el tamaño de placa medio desde  $136 \pm 15 \mu\text{m}^2$  hasta  $103 \pm 4 \mu\text{m}^2$  ( $p = 0,01$ ) a los 4 meses de edad. En ratones TgCRND8 tratados con *scyllo*-inositol a los 6 meses de edad, la disminución en los niveles de péptido Aβ estaba acompañada por una reducción del 20% en el número de placas ( $p = 0,005$ ), una disminución del 35% en el área del cerebro cubierta con placas ( $p = 0,015$ ) y una disminución en el tamaño de placa medio ( $339 \pm 10$  frente a  $423 \pm 21 \mu\text{m}^2$ ,  $p = 0,009$ ). Estos resultados demuestran que en cada medida hubo una reducción en la carga de placas tras el tratamiento con *scyllo*-inositol

Tabla 1. El tratamiento con inositol disminuye los niveles de Aβ40 y Aβ42

	Aβ40 (ng/g de cerebro húmedo ± EEM)		Aβ42 (ng/g de cerebro húmedo ± EEM)		Aβ total	Recuento de placas	Área con placas (μm <sup>2</sup> )	Área total con placas/área total del cerebro (%)
	Soluble	Insoluble	Soluble	Insoluble				
Prevención a los 4 meses								
Control	75±6	116±69	273±18	5658±248	7169±284	696±25	100766±7564	0,026±0,004
<i>Epi</i> -Inositol	43±7*	615±32†	85±7†	4059±179*	4802±176	678±64	65042±5199	0,020±0,001
<i>Scyllo</i> -Inositol	37±5*	437±80†	206±8*	4409±135*	5089±173	598±19*	63847±2895	0,015±0,001*
Prevención a los 6 meses								
Control	187±29	3576±172	626±87	15802±237	20191±211	960±44	411288±11912	0,120±0,001
<i>Epi</i> -Inositol	188±24	3668±149	665±39	13943±277†	18464±229	979±32	380456±13498	0,096±0,04
<i>Scyllo</i> -Inositol	105±8*	2453±251*†	475±26*	12588±82†	15621±151	774±10*†	262379±5373†	0,079±0,013†
Niveles de Aβ plasmáticos (pg/ml)								
	Prevención a los 4 meses				Prevención a los 6 meses			
Control	1018±27				915±59			
<i>Epi</i> -Inositol	1082±164				952±56			
<i>Scyllo</i> -Inositol	952±49				905±55			

Anova con PLSD de Fisher, †  $p < 0,001$  y \*  $p < 0,05$

### 35 Ejemplo 4 - Reducción de la inflamación y actividad gliales

Las reacciones de la astrogliya y microglia son características neuropatológicas tanto de la EA humana como de todos los modelos de ratón con amiloide (Irizarry *et al.*, J Neuropathol Exp Neurol. 56, 965, 1997; KD. Bornemann *et al.* Ann N Y Acad Sci, 908, 260, 2000). Por tanto, se investigó el efecto del tratamiento con *epi*- y *scyllo*-inositol sobre

la astrogliosis y microgliosis en los cerebros de ratones TgCRND8 (figuras 3A-3D). Se tiñeron secciones sagitales en serie con el marcador astrocítico proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y se cuantificaron para determinar el tanto por ciento de área del cerebro cubierta por astrogliosis. Los ratones TgCRND8 tienen una alta astrogliosis basal a los 4 meses de edad ( $0,459 \pm 0,048\%$ ), que aumenta ligeramente a los 6 meses de edad ( $0,584 \pm 0,089\%$ ) y que no está limitada a las áreas con placas (figuras 2A-C). El *epi*-inositol redujo la respuesta astrogliótica hasta el  $0,388 \pm 0,039\%$  a los 6 meses de edad ( $p=0,04$ ; figuras 2D-F). El *scyllo*-inositol, por otra parte, redujo la astrogliosis de manera mucho más eficaz hasta el  $0,269 \pm 0,028\%$  a los 6 meses de edad, ( $p=0,006$ ) (figuras 2G-I). Se atenuó también significativamente la activación de la microglia en ratones TgCRND8 tratados con *scyllo*-inositol ( $0,20 \pm 0,008\%$  del área del cerebro) en comparación con ratones TgCRND8 no tratados emparejados por sexo y edad ( $0,31 \pm 0,01\%$ ;  $p < 0,001$ ). Sin embargo, los ratones tratados con *epi*-inositol no mostraron una reducción significativa en la activación de la microglia a los 6 meses ( $0,248 \pm 0,02\%$ ;  $p=NS$ ). Tomados juntos, estos datos indican que el tratamiento con *scyllo*-inositol reduce la respuesta inflamatoria inducida por A $\beta$  dentro del SNC.

#### Ejemplo 5 - Reducción de la carga de amiloide vascular

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la presencia de depósitos de amiloide tanto vascular como parenquimatoso. En ratones TgCRND8 de 6 meses de edad no tratados, aproximadamente el 0,03% del cerebro está asociado a amiloide vascular. No pudieron detectarse diferencias en la carga de amiloide vascular tras el tratamiento con *epi*-inositol a los 6 meses de edad (figura 3C). En cambio, el tratamiento con *scyllo*-inositol redujo significativamente la carga de amiloide vascular ( $p=0,05$ ) (figura 3C), y la deposición de amiloide se localizaba predominantemente en vasos más pequeños,  $< 25 \text{ m}^2$  de diámetro ( $56 \pm 2\%$  frente a  $70 \pm 8\%$  en vasos pequeños en ratones TgCRND8 no tratados). El tamaño medio de las placas cerebrovasculares se redujo significativamente en los ratones tratados con *scyllo*-inositol en comparación con ratones no tratados ( $154 \pm 16$  frente a  $363 \pm 34$ ,  $p=0,008$ ; figura 3D).

#### Ejemplo 6 - Mejora de la supervivencia

Los ratones TgCRND8 tienen una supervivencia del 50% a los 175 días, que tras el tratamiento mejoró hasta el 72% con *scyllo*-inositol ( $n=35$  por grupo,  $p < 0,02$  para *scyllo*-inositol frente al control, figura 10B). El tratamiento con *mio*-inositol no afectó a la supervivencia global significativamente (figura 10A). Experimentos control confirmaron que la supervivencia potenciada de ratones tratados con *scyllo*-inositol no era un efecto indirecto del aumento de la ingesta calórica. Por tanto, el tratamiento de ratones de tipo natural con *scyllo*-inositol no tuvo efecto o bien sobre la supervivencia o bien sobre otros parámetros tales como el peso, el estado del pelo o el comportamiento en la jaula. Además, el peso, el estado del pelo y el comportamiento en la jaula de ratones TgCRND8 tratados con inositol no variaron de los de ratones TgCRND8 no tratados. Experimentos simultáneos con manitol, un azúcar sencillo de peso molecular similar, tampoco tuvieron efecto sobre la supervivencia de ratones TgCRND8.

#### Ejemplo 7 - Tratamiento y reversión de la deposición de amiloide

Tomados juntos, los estudios de prevención demuestran que el *scyllo*-inositol inhibe la deposición de amiloide tanto parenquimatoso como cerebrovascular y da como resultado una función cognitiva y supervivencia mejoradas en el modelo de ratón TgCRND8 de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, la mayoría de los pacientes con enfermedad de Alzheimer buscarán probablemente un tratamiento sólo una vez que tienen síntomas, y cuando la oligomerización, deposición, toxicidad y formación de placas de A $\beta$  están ya muy avanzadas dentro del SNC. Por tanto, se inició un estudio piloto en ratones TgCRND8 de 5 meses de edad. Estos ratones tienen cargas de placas y A $\beta$  significativas que son comparables a las del cerebro de seres humanos con EA.

#### Métodos del estudio de tratamiento

50 Ratones - Se alimentaron grupos experimentales de ratones TgCRND8 con *mio*-, *epi*- y *scyllo*-inositol a 30 mg/ratón/día. Una cohorte entró en el estudio a los 5 meses de edad y se analizaron los desenlaces a los 6 meses de edad. Se monitorizaron el peso corporal, las características del pelaje y el comportamiento en la jaula. Se realizaron todos los experimentos según las directrices del Consejo Canadiense para el Cuidado de Animales.

55 Censo de supervivencia - Se evaluó la probabilidad de supervivencia mediante la técnica de Kaplan-Meier, que calcula la probabilidad de supervivencia en cada caso de muerte, lo que la hace adecuada para tamaños de muestra pequeños. Para los análisis de supervivencia, se usaron 35 ratones para cada grupo de tratamiento. Se notificó la comparación entre tratamientos usando la prueba de Tarone-Ware.

60 Prueba de comportamiento - Estudio de reversión - Se introdujo a los ratones en la prueba del laberinto de agua de Morris con una plataforma escondida en el día uno sin entrenamiento previo. Se sometió a prueba a los ratones durante 3 días con seis ensayos por día. En el cuarto día, se quitó la plataforma de la piscina y cada ratón recibió un ensayo de prueba de natación de 30 s. El último día, se sometió a los animales a una prueba de indicios con el fin de evaluar la capacidad de nadar, la vista y la cognición general. La prueba de indicios se realiza colocando la plataforma en un cuadrante diferente al usado para las pruebas y marcándola con una bandera. Se les deja a los

animales 60 s para que encuentren la plataforma. Los animales que no encuentran la plataforma no se usan en los análisis finales de la memoria espacial. Se analizaron los datos de comportamiento usando un modelo mixto de análisis factorial de la varianza (ANOVA) con el fármaco o el genotipo y las sesiones de entrenamiento como factores de medida repetidos.

5 Carga de amiloide cerebral - Se extirparon los cerebros y se fijó un hemisferio en paraformaldehído al 4% y se incrustó en cera de parafina en el plano sagital medio. Para generar conjuntos de secciones al azar uniformes sistemáticas, se recogieron secciones en serie de 5  $\mu$ m por todo el hemisferio. Se usaron conjuntos de secciones a intervalos de 50  $\mu$ m para los análisis (10-14 secciones/conjunto). Se identificaron las placas tras la recuperación del antígeno con ácido fórmico, y se incubó con anticuerpo primario anti-A $\beta$  (Dako M-0872), seguido por anticuerpo secundario (kit Dako StreptABCcomplex/peroxidasa del rábano). Se visualizaron los productos finales con DAB teñido por contraste con hematoxilina. Se evaluó la carga de placas de amiloide usando el software de análisis de imágenes Leco IA-3001 conectado con un microscopio Leica y una cámara de vídeo Hitachi KIP-MU CCD.

15 Contenido en A $\beta$  plasmático y cerebral - Se homogeneizaron muestras de hemicerebro en una disolución de sacarosa tamponada, seguido por o bien dietilamina al 0,4%/NaCl 100 mM para los niveles de A $\beta$  soluble o bien ácido fórmico frío para el aislamiento de A $\beta$  total. Tras la neutralización, se diluyeron las muestras y se analizaron para detectar A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 usando kits disponibles comercialmente (BIOSOURCE International). Se analizó cada hemisferio por triplicado notificándose la media  $\pm$  EEM.

20 Resultados y relevancia - Todos los animales que entraron en el estudio de reversión sobrevivieron y no tenían signos externos de molestia o toxicidad. Se evaluó la función cognitiva de ratones TgCRND8 usando la versión de memoria de referencia espacial del laberinto de agua de Morris usando un modelo de ensayo de tres días (figuras 4-8). Se analizaron los datos de ratones TgCRND8 tratados y no tratados, y de compañeros de camada no-Tg tratados y no tratados (n=10 para todas las combinaciones) usando un modelo mixto de análisis de la varianza (ANOVA) con el tratamiento (no tratado, *mio*-, *epi*- o *scyllo*-inositol) y el genotipo (TgCRND8 frente a no-Tg) como factores "entre sujetos". En este modelo, los ratones TgCRND8 estaban significativamente alterados en comparación con los compañeros de camada de tipo natural (figura 4). En cambio, los ratones TgCRND8 tratados con *scyllo*-inositol eran indistinguibles de los compañeros de camada no-Tg en todos los días. (p=0,38; figura 5). En comparación con los compañeros de camada no-Tg tratados, los ratones TgCRND8 tratados con *epi*-inositol eran casi significativamente diferentes (p=0,07; figura 6). De manera similar, los ratones TgCRND8 tratados con *mio*-inositol eran significativamente diferentes de los compañeros de camada no-Tg tratados (p=0,05, figura 7). Cuando se compara la fase de aprendizaje de la prueba del laberinto de agua de Morris entre tratamientos, todos los ratones se comportaron de manera similar (figura 8). En cambio, sólo los tratados con *scyllo*-inositol eran indistinguibles de los compañeros de camada no-Tg (figura 8). Por tanto, el *scyllo*-inositol revirtió realmente los déficits cognitivos en tal grado que los ratones TgCRND8 tratados con *scyllo*-inositol eran indistinguibles de los ratones normales. Este rendimiento mejorado no se debía a un efecto no específico sobre los sistemas de comportamiento, motores o de percepción porque el tratamiento con *epi*-y *scyllo*-inositol no tenía ningún efecto sobre el rendimiento de ratones no-Tg. El rendimiento mejorado tampoco se debía a efectos nutricionales o calóricos porque el peso corporal, la actividad y el estado del pelaje no eran diferentes entre las cohortes tratada y no tratada.

45 Con el fin de determinar si la mejora de la cognición estaba asociada a una disminución en la carga de placas y la carga de A $\beta$ , se examinó post-mortem tejido cerebral. Los cambios en la cognición estaban acompañados por un cambio correspondiente en la carga de placas y la carga de A $\beta$  (figura 9 y tabla 2). El tratamiento con *mio*-inositol no afectó a la carga de placas ni a la carga de A $\beta$  (figura 9 y tabla 2). En ratones TgCRND8 tratados con *epi*-inositol, no hubo una disminución significativa en el tamaño de placas medio en comparación con ratones TgCRND8 no tratados (figura 9), aunque la carga de A $\beta$  disminuyó significativamente (tabla 2). Estos resultados sugieren que a niveles de A $\beta$  modestos, el *epi*-inositol previene la oligomerización de A $\beta$  3 pero a concentraciones de A $\beta$  superiores, el *epi*-inositol no puede inhibir la fibrillogénesis completamente. El tratamiento con *scyllo*-inositol redujo significativamente la carga de placas y la carga de A $\beta$ . Estos resultados demuestran que en cada medida hubo una reducción en la carga de placas tras el tratamiento con *scyllo*-inositol. Estos resultados son comparables en el tamaño del efecto a los estudios profilácticos de 6 meses, y apoyan adicionalmente el potencial del *scyllo*-inositol.

55 Debido a que la disminución de las concentraciones de A $\beta$  detectada tras el tratamiento con inositol podía haber resultado de un flujo de salida alterado de A $\beta$  hacia el plasma, se examinaron los niveles de A $\beta$  en el plasma (tabla 2). Los ratones TgCRND8 tienen altas concentraciones plasmáticas de A $\beta$  a los 6 meses de edad. Ni el tratamiento con *mio*-inositol ni con *epi*-inositol ni con *scyllo*-inositol tuvieron ningún efecto sobre los niveles de A $\beta$  plasmáticos en comparación con ratones TgCRND8 no tratados (p=0,89). La explicación más simple para esta observación es que los inositoles han alterado selectivamente la fibrilización de A $\beta$  en el SNC, pero no han afectado a la actividad  $\beta$ - o  $\gamma$ -secretasa, o a los mecanismos normales de aclaramiento de A $\beta$  en el plasma. No obstante, esta observación es significativa por dos motivos. En primer lugar, se detecta habitualmente una caída en los niveles de A $\beta$  plasmáticos y en LCR a medida que avanza la evolución clínica en pacientes con EA no tratados. En segundo lugar, los pacientes en el estudio de inmunización AN1792 que desarrollaron una fuerte respuesta de anticuerpos y una respuesta clínica evidente no tenían niveles de A $\beta$  plasmáticos alterados. Por tanto, estos resultados indican además que no es

necesario cambiar los niveles de A $\beta$  plasmáticos para obtener un desenlace terapéutico eficaz.

Tomados juntos, estos datos revelan que el *scyllo*-inositol seleccionado puede suprimir la acumulación cerebral de A $\beta$ , la deposición de placas de amiloide cerebrales y el deterioro cognitivo en un modelo de ratón transgénico de la enfermedad de Alzheimer cuando se administra durante la fase "presintomática tardía", antes de la aparición de déficits cognitivos manifiestos y neuropatología amiloide en estos ratones. Además, incluso cuando se administra *scyllo*-inositol tras la aparición de déficits cognitivos y neuropatología por placas de amiloide, estos compuestos pueden revertir eficazmente los déficits cognitivos, la neuropatología y la deposición de amiloide. Por tanto, estos resultados indican que el *scyllo*-inositol es eficaz tanto en la prevención de la enfermedad como en el tratamiento de la enfermedad existente en pacientes a los que ya se les ha diagnosticado la EA.

Tabla 2. El tratamiento con inositol disminuye los niveles de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 A $\beta$ 40

	A $\beta$ 40 (ng/g de cerebro húmedo $\pm$ EEM)		A $\beta$ 42 (ng/g de cerebro húmedo $\pm$ EEM)		A $\beta$ total	Recuento de placas	Área con placas ( $\mu$ m <sup>2</sup> )	Área total con placas/área total del cerebro (%)
	Soluble	insoluble	soluble	insoluble				
Prevenición a los 4 meses								
Control	75 $\pm$ 6	1163 $\pm$ 9	273 $\pm$ 18	5658 $\pm$ 248	7169 $\pm$ 284	696 $\pm$ 25	100766 $\pm$ 7564	0,026 $\pm$ 0,004
<i>Myo</i> -Inositol	42 $\pm$ 6	485 $\pm$ 143	174 $\pm$ 9	4268 $\pm$ 308	4969 $\pm$ 434	649 $\pm$ 50	91902 $\pm$ 7453	0,023 $\pm$ 0,004
<i>Epi</i> -Inositol	43 $\pm$ 7*	615 $\pm$ 32†	85 $\pm$ 7†	4059 $\pm$ 179*	4802 $\pm$ 176	678 $\pm$ 64	65042 $\pm$ 5199	0,020 $\pm$ 0,001
<i>Scyllo</i> -Inositol	37 $\pm$ 5*	437 $\pm$ 80†	206 $\pm$ 8*	4409 $\pm$ 135*	5089 $\pm$ 173	598 $\pm$ 19*	63847 $\pm$ 2895	0,015 $\pm$ 0,001*
Prevenición a los 6 meses								
Control	187 $\pm$ 29	3576 $\pm$ 172	626 $\pm$ 87	1580 $\pm$ 237	20191 $\pm$ 211	960 $\pm$ 44	411288 $\pm$ 11912	0,120 $\pm$ 0,001
<i>Myo</i> -Inositol	221 $\pm$ 19	3436 $\pm$ 189	543 $\pm$ 71	13289 $\pm$ 535	17489 $\pm$ 354	927 $\pm$ 78	400013 $\pm$ 19638	0,100 $\pm$ 0,005
<i>Epi</i> -Inositol	188 $\pm$ 24	3668 $\pm$ 149	665 $\pm$ 39	13943 $\pm$ 277†	18464 $\pm$ 229	979 $\pm$ 32	380456 $\pm$ 13498	0,096 $\pm$ 0,04
<i>Scyllo</i> -Inositol	105 $\pm$ 8*	2453 $\pm$ 251*†	475 $\pm$ 26*	12588 $\pm$ 82†	15621 $\pm$ 151	774 $\pm$ 10*†	262379 $\pm$ 53373†	0,079 $\pm$ 0,013†
Tratamiento de 1 mes								
Control	207 $\pm$ 16	4965 $\pm$ 457	426 $\pm$ 14	14503 $\pm$ 1071	20101 $\pm$ 854	1441 $\pm$ 29	486002 $\pm$ 16156	0,159 $\pm$ 0,014
<i>Myo</i> -Inositol	194 $\pm$ 12	4187 $\pm$ 226	487 $\pm$ 25	15622 $\pm$ 675	20490 $\pm$ 526	1324 $\pm$ 69	469968 $\pm$ 35664	0,153 $\pm$ 0,088
<i>Epi</i> -Inositol	264 $\pm$ 11	3637 $\pm$ 113	540 $\pm$ 14	12830 $\pm$ 330	17271 $\pm$ 415	1342 $\pm$ 114	459706 $\pm$ 49966	0,134 $\pm$ 0,017
<i>Scyllo</i> -Inositol	178 $\pm$ 11	3527 $\pm$ 241	374 $\pm$ 23	11115 $\pm$ 647	15194 $\pm$ 579	1260 $\pm$ 27*	420027 $\pm$ 14986*	0,119 $\pm$ 0,010*
Niveles de A $\beta$ plasmáticos (pg/ml)								
	Prevenición a los 4 meses		Prevenición a los 6 meses		1 mes de tratamiento			
Control	1018 $\pm$ 27		915 $\pm$ 59		2287 $\pm$ 151			
<i>Myo</i> -Inositol	942 $\pm$ 30		969 $\pm$ 67		2110 $\pm$ 174			
<i>Epi</i> -Inositol	1082 $\pm$ 164		952 $\pm$ 56		2158 $\pm$ 157			
<i>Scyllo</i> -Inositol	952 $\pm$ 49		905 $\pm$ 55		1980 $\pm$ 146			

Anova con PLSD de Fisher, t p<0,01 y \* p<0,05; IP=en curso

### 15 Ejemplo 8 - Estudio de tratamiento de dos meses con *scyllo*-inositol

Con el fin de determinar intervalos de eficacia más largos de *scyllo*-inositol para el tratamiento de la enfermedad, se alimentaron ratones TgCRND8 de 5 meses de edad con *scyllo*-inositol o no se trataron durante dos meses (n=10 por grupo). Se comparó la función cognitiva de los ratones TgCRND8 de 7 meses de edad tratados con *scyllo*-inositol con TgCRND8 no tratados y compañeros de camada no-Tg tratados en el modelo de tres días del laberinto de agua de Morris. Se analizaron los datos de comportamiento usando un modelo mixto de análisis factorial de la varianza (ANOVA) con el fármaco y el genotipo como variables entre sujetos y las sesiones de entrenamiento como variable dentro de los sujetos. Tal como se observa con el tratamiento de 1 mes de *scyllo*-inositol (figura 12A), los ratones TgCRND8 tratados durante dos meses con *scyllo*-inositol eran indistinguibles de los compañeros de camada no-Tg tratados con *scyllo*-inositol (figura 12B). Con el fin de correlacionar la mejora de la cognición con la patología, se analizaron los niveles de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 en el cerebro (tabla 3). Los niveles tanto de A $\beta$ 42 como de A $\beta$ 40 insoluble disminuyeron en un 20% tras el tratamiento con *scyllo*-inositol. Estos resultados demuestran que los efectos del

*scyllo*-inositol persisten durante la evolución de la enfermedad.

Tabla 3. El tratamiento con inositol disminuye los niveles de Aβ40 y Aβ42

	Aβ40 cerebral (ng/g de cerebro húmedo ± EEM)		Aβ42 cerebral (ng/g de cerebro húmedo ± EEM)		Niveles de Aβ plasmáticos (pg/ml)	
	Soluble	Insoluble	Soluble	Insoluble	Aβ40	Aβ42
Tratamiento de 2 meses						
Control	487±14	6924±287	764±51	25827±1238	5212±219	345±331
<i>Scyllo</i> -inositol	395±60	5703±612*	688±28	20818±1404*	4507±207	3035±236

ANOVA con PLSD de Fisher, \* p<0,05.

5 **Ejemplo 9 - Efecto de la dosis sobre el desenlace patológico de ratones TgCRND8 que portan la enfermedad**

Se alimentaron con sonda ratones TgCRND8 de 5 meses de edad una vez al día con *scyllo*-inositol en agua a dosis de 10 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg o no se trataron. Se sacrificaron los animales tras un mes de tratamiento y se analizaron para determinar los desenlaces patológicos. El análisis de los niveles de Aβ dentro del cerebro de todas las cohortes demuestra que todas las dosis de fármaco eran eficaces en el mismo grado en la reducción de los niveles de Aβ42 soluble en comparación con ratones TgCRND8 no tratados (reducción del 20%,  $F_{3,15}=3,1$ ,  $p=0,07$ ; figura 13A). Los análisis de dosis individuales demuestran que las dosis de 10 mg/kg y 30 mg/kg eran significativamente diferentes de los controles no tratados ( $p=0,03$  y  $p=0,02$ , respectivamente). Ninguna de las dosis elegidas eran significativamente diferentes entre sí ( $F_{2,11}=0,6$ ,  $p=0,57$ ; figura 13A). La dosificación con sonda nasogástrica no tuvo ningún efecto significativo sobre Aβ42 insoluble ( $F_{3,15}=0,69$ ,  $p=0,58$ ; figura 13B) o Aβ40 soluble e insoluble ( $F_{3,15}=0,04$ ,  $p=0,99$  y  $F_{3,15}=0,36$ ,  $p=0,79$ , respectivamente; figura 14A y 14B).

20 **Ejemplo 10 - Eficacia del *alo*-inositol para el tratamiento de ratones TgCRND8 que portan la enfermedad (sólo como referencia)**

Para evaluar si el *alo*-inositol podría ser también eficaz en la prevención de la evolución adicional y/o podría revertir parcialmente un fenotipo de tipo EA bien establecido, se retrasó el comienzo del tratamiento de los ratones TgCRND8 hasta los 5 meses de edad. Se trataron las cohortes de compañeros de camada no transgénicos y TgCRND8 o bien durante 28 días con *alo*-inositol, o bien no se trataron. En estos experimentos, la dosificación y la administración oral de los compuestos, y los ensayos neuroquímicos y de comportamiento fueron los mismos que los empleados en los experimentos de tratamiento anteriores.

La cohorte de ratones TgCRND8 tratados con *alo*-inositol de 6 meses de edad tuvo un rendimiento significativamente mejor que los ratones TgCRND8 no tratados ( $F_{1,13}=0,45$ ,  $p=0,05$ ; datos no mostrados). El rendimiento cognitivo de ratones TgCRND8 tratados con *alo*-inositol de 6 meses de edad era todavía significativamente diferente del de sus compañeros de camada no transgénicos ( $F_{1,13}=5,9$ ,  $p=0,05$ ; figura 15). El efecto beneficioso del tratamiento con inositol no se debía a efectos no específicos sobre los sistemas de comportamiento, motores o de percepción porque el tratamiento con inositol no tuvo ningún efecto sobre el rendimiento cognitivo de ratones no-Tg ( $F_{1,12}=0,98$ ;  $p=0,49$ ). Se analizaron los niveles de Aβ cerebrales para el tratamiento frente a ratones TgCRND8 no tratados para determinar si la mejora del comportamiento podía correlacionarse con cambios en Aβ (tabla 4). El tratamiento con *alo*-inositol redujo el Aβ42 soluble (reducción del 20%,  $p<0,05$ ), un efecto similar al observado para el *scyllo*-inositol. El *alo*-inositol no alteró significativamente el Aβ40 o Aβ42 insoluble (conjuntos soluble e insoluble). Una posible explicación para la disminución de Aβ42 es el aclaramiento de Aβ42 en la periferia con un aumento posterior en el Aβ42 plasmático. Los niveles de Aβ42 en plasma tras el tratamiento con *alo*-inositol eran indistinguibles de los niveles plasmáticos de TgCRND8 no tratados (tabla 5). De acuerdo con los otros estereoisómeros del inositol, estos resultados demuestran que los niveles de Aβ plasmáticos no se ven afectados por el tratamiento con *alo*-inositol.

Tabla 4. El tratamiento con *alo*-inositol disminuye los niveles de Aβ42

	Aβ340 cerebral (ng/g de cerebro húmedo ± EEM)		Aβ42 cerebral (ng/g de cerebro húmedo ± EEM)		Niveles de Aβ plasmáticos (pg/ml)
	Soluble	Insoluble	Soluble	Insoluble	
Tratamiento de 1 mes					
Control	252±48	4105±851	666±39	16448±2120	2359±147
<i>Alo</i> -inositol	281±21	3787±342	547±47*	16336±910	2458±95

ANOVA con PLSD de Fisher, \* p<0,05.

Tabla 5. Características bioquímicas sanguíneas – Estudio de la dosis de *scyllo*-inositol

	No tratados n=4	100 mg/kg n=4	30 mg/kg n=3	10 mg/kg n=5	Niveles de referencia (Vita-Tech & CCAC)
Bioquímica					
Proteína total	46±2 g/l	49±2	50±2,6	50±3	35-72
Albúmina	35±0 g/l	31±1	33±2	33±4	25-48
Globulina	12±1 g/l	19±2	17±1	17±2	18-82
Bilirrubina	2,4±1 umol/l	1,9±0	2,0±1	1,9±0,6	2-15
ALP	81±10 U/l	76±11	81±10	73±22	28-94
ALT	42±4 U/l	38±4	42±4	51±20	28-184
Glucosa	11±2 mmol/l	11±2	12±2	7±2	9,7-18,6
Urea	9±3 mmol/l	7,4±1	9±3	10±2	12,1-20,6
Creatinina	36±5 umol/l	31±4	35±5	40±5	26-88
Hemolisis	Normal	Normal	Normal	Normal	
Ictericia	Normal	Normal	Normal	Normal	
Lipemia	Normal	Normal	Normal	Normal	

**Ejemplo 11 - El tratamiento con inositol no afecta a las características químicas sanguíneas**

- 5 Con el fin de descartar cualquier efecto perjudicial del tratamiento con inositol sobre las características químicas sanguíneas y la función orgánica, se analizó la sangre tras un tratamiento de un mes tanto con *scyllo*- como *alo*-inositol (tabla 5, 6). La proteína total, albúmina, globulina, bilirrubina, fosfatasa alcalina, glucosa, urea y creatinina no eran significativamente diferentes entre los grupos de tratamiento o con respecto a los ratones TgCRND8 no tratados. Todos los niveles se encontraban dentro del intervalo normal tal como se determinó para ratones de tipo natural no transgénicos. Además la hemolisis, la ictericia y la lipemia eran todas normales. Estos resultados sugieren que el *alo*- y *scyllo*-inositol no tienen efectos perjudiciales obvios sobre las características químicas sanguíneas o la función orgánica.
- 10

Tabla 6. Características bioquímicas sanguíneas – Estudio de tratamiento de 1 mes

	No tratados n=4	<i>Alo</i> -Inositol n=4	Niveles de referencia (Vita-Tech & CCAC)
Bioquímica			
Proteína total	46±2 g/l	48±2	35-72.
Albúmina	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
ALP	81±10 U/l	95±16	28-94
ALT	42±4 U/l	44±4	28-184
Glucosa	11±2 mmol/l	10±3-	9,7-18,6
Urea	9±3 mmol/l	18,6±13	12,1-20,6
Creatinina	36±5 umol/l	69±64	26-88
Hemolisis	Normal	Normal	
Ictericia	Normal	Normal	
Lipemia	Normal	Normal	

- 15 **Ejemplo 12 - Eficacia del *scyllo*-inositol en la prevención de una patología de tipo EA en un modelo de ratón transgénico doble de la enfermedad de Alzheimer, PS1 x APP**

Los ratones Tg PS1 x APP son un modelo potenciado de la enfermedad de Alzheimer que expresan un transgén PS1 humano mutante que codifica para dos mutaciones familiares (M146L y L286V) junto con el transgén APP humano que codifica para las mutaciones familiares Indiana y sueca. Estos animales desarrollan una expresión robusta de niveles de A $\beta$  cerebrales y deposición de amiloide a los 30-45 días de edad. En un ensayo profiláctico, se trataron los ratones TgPS1xAPP con *scyllo*-inositol desde el destete y se evaluaron para detectar efectos sobre la neuropatología a los 2 meses de edad (figuras 16 y 17). En comparación con ratones TgPS1xAPP no tratados, los ratones TgPS1xAPP tratados con *scyllo*-inositol mostraron una disminución significativa en todas las medidas de la carga de placas a los 2 meses de edad. (% de área del cerebro cubierta de placas =  $0,157 \pm 0,007$  frente a  $0,065 \pm 0,016$ ,  $p < 0,001$ ; tamaño de placas medio =  $177 \pm 8 \mu\text{m}^2$  frente a  $149 \pm 5 \mu\text{m}^2$ ,  $p < 0,05$ ; recuento de placas  $3054 \pm 324$  frente a  $1514 \pm 510$ ,  $p < 0,01$ ; (figura 17). Estos resultados demuestran que el *scyllo*-inositol previene la deposición de amiloide en dos modelos robustos de la enfermedad de Alzheimer.

### **Ejemplo 13 - Efecto del aumento de la ingesta calórica sobre ratones TgCRND8**

Con el fin de descartar la contribución del aumento de la ingesta calórica o efectos no específicos, se trataron los ratones TgCRND8 con un azúcar sencillo de peso molecular similar, manitol. A los 6 meses de edad, los ratones TgCRND8 tratados con manitol eran indistinguibles de los ratones TgCRND8 no tratados (figura 11A) y eran significativamente diferentes de los compañeros de camada no-Tg tratados con manitol (figura 11B). El manitol no tenía ningún efecto sobre el comportamiento de ratones no-Tg, dado que los ratones no-Tg tratados con manitol eran indistinguibles de los ratones no-Tg no tratados. Estos resultados se correlacionan con los estudios patológicos que indican que el manitol no alteraba la carga de placas en ratones TgCRND8 (figura 11C). La monitorización simultánea de la supervivencia demostró que el manitol no tenía ningún efecto sobre la supervivencia de ratones TgCRND8 (figura 11D).

Aunque la presente invención se ha descrito en relación con realizaciones particulares de la misma, muchas otras variaciones y modificaciones y otros usos resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Por tanto, la presente invención no está limitada por la descripción específica en el presente documento, sino sólo por las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

1. *Scyllo*-inositol en combinación con otro tratamiento para el uso en el tratamiento o la prevención de un estado del sistema nervioso central o periférico u órgano sistémico asociado con un trastorno de la agregación o plegado de proteínas, o formación, deposición, acumulación o persistencia de amiloide donde el otro tratamiento de este tipo se selecciona del grupo de: inhibidores de la beta-secretasa, inhibidores de gamma-secretasa, inhibidores de épsilon-secretasa, otros inhibidores de la agregación en lámina beta/fibrillogénesis/formación de ADDL, antagonistas de NMDA, compuestos antiinflamatorios no esteroideos, antioxidantes, hormonas, nutrientes y complementos alimenticios; inhibidores de acetilcolinesterasa, agonistas muscarínicos, antipsicóticos; antidepressivos, terapia génica y/o enfoques basados en fármacos para regular por incremento la neprilisina; terapia génica y/o enfoques basados en fármacos para regular por incremento la enzima que degrada la insulina, vacunas, compuestos inmunoterapéuticos y anticuerpos frente a A $\beta$ , estatinas y otros fármacos hipocolesteromiantes, células madre y otras terapias basadas en células, inhibidores de cinasas que fosforilan la proteína TAU e inhibidores de cinasas que modulan la producción de A $\beta$ .
2. *Scyllo*-inositol para uso según la reivindicación 1, en el que el estado del sistema nervioso central o periférico u órgano sistémico se selecciona del grupo de: enfermedad de Alzheimer, formas presenil y senil; angiopatía amiloide; disfunción cognitiva leve; demencia relacionada con la enfermedad de Alzheimer; tauopatía;  $\alpha$ -sinocleionopatía; enfermedad de Parkinson; esclerosis lateral amiotrófica; enfermedad de motoneuronas; paraplejía espástica; enfermedad de Huntington; ataxia espinocerebelar; enfermedades neurodegenerativas asociadas a agregados intracelulares y/o intraneuronales de proteínas con poliglutamina, polialanina u otras repeticiones que surgen de expansiones patológicas de elementos de tri o tetranucleótidos con genes correspondientes; enfermedades cerebrovasculares; síndrome de Down; traumatismo craneal con acumulación postraumática de péptido beta-amiloide; enfermedad relacionada con priones; demencia británica familiar; demencia presenil con ataxia espástica; angiopatía amiloide cerebral, tipo británico; demencia presenil con angiopatía amiloide cerebral con ataxia espástica, tipo danés; encefalopatía familiar con cuerpos de inclusión de neuroserpina (FENIB); polineuropatía amiloide; miositis por cuerpos de inclusión debida a péptido beta-amiloide; amiloidosis de tipo familiar y finlandés; amiloidosis sistémica asociada a mieloma múltiple; fiebre mediterránea familiar; infecciones e inflamaciones crónicas; y diabetes mellitus tipo II asociada a polipéptido amiloide de los islotes.
3. *Scyllo*-inositol para uso según la reivindicación 2, en el que el estado del sistema nervioso central o periférico u órgano sistémico es síndrome de Down.
4. *Scyllo*-inositol para uso según la reivindicación 2, en el que el estado del sistema nervioso central o periférico u órgano sistémico es enfermedad de Alzheimer.
5. *Scyllo*-inositol para uso según la reivindicación 2, en el que el estado del sistema nervioso central o periférico u órgano sistémico es deterioro cognitivo moderado.
6. *Scyllo*-inositol para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4, en el que el otro tratamiento es un inhibidor de acetilcolinesterasa.
7. *Scyllo*-inositol para uso según la reivindicación 6, en el que el inhibidor de acetilcolinesterasa es donepezil.
8. *Scyllo*-inositol para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4, en el que el otro tratamiento es un antagonista de NMDA.
9. *Scyllo*-inositol para uso según la reivindicación 8, donde el antagonista de NMDA es memantina.
10. Una composición para uso en el tratamiento o la prevención de un estado del sistema nervioso central o periférico u órgano sistémico asociado con un trastorno de la agregación o plegado de proteínas, o formación, deposición, acumulación o persistencia de amiloide que comprende *scyllo*-inositol y otro tratamiento tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 6 a 9.
11. *Scyllo*-inositol para uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para la administración oral.
12. *Scyllo*-inositol para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en forma de una pastilla oral, suspensión o líquido oral.
13. *Scyllo*-inositol para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4, en el que dicho otro tratamiento se selecciona del grupo de: inhibidores de gamma-secretasa específicos o no específicos de APP o inhibidores de épsilon-secretasa, Alzhemed, memantina, Ibuprofeno, Celebrex, vitamina E, estrógenos, *Gingko biloba*, donepezil, AF102B, Cevimelina, EVOXAC, AF150(S), AF247B, haloperidol, clozapina, olanzapina, Sertralina, Citalopram Hbr, ELAN AN-1792, Lovastatina, Simvastatina y cloruro de litio.

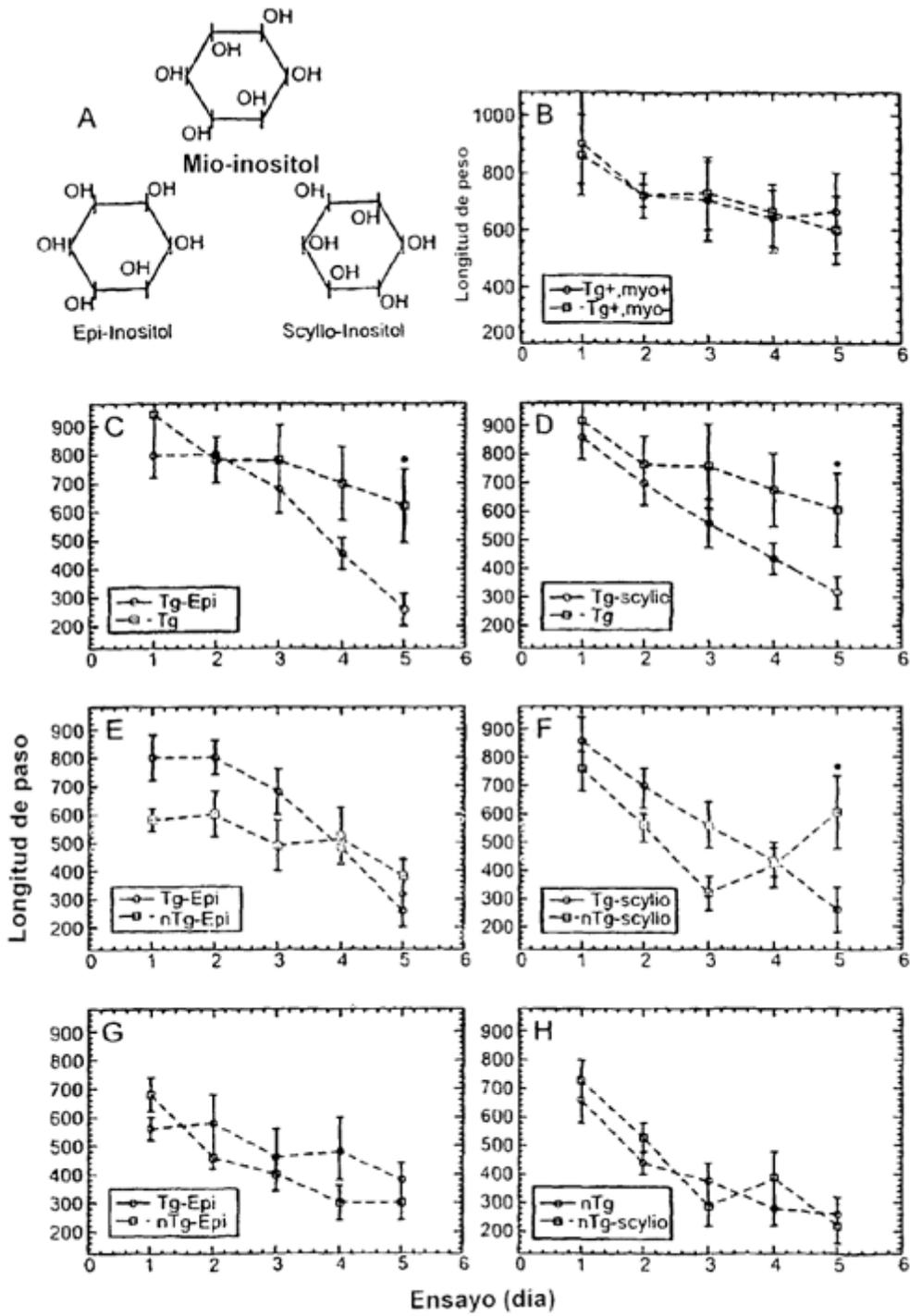


Figura 1A-1H

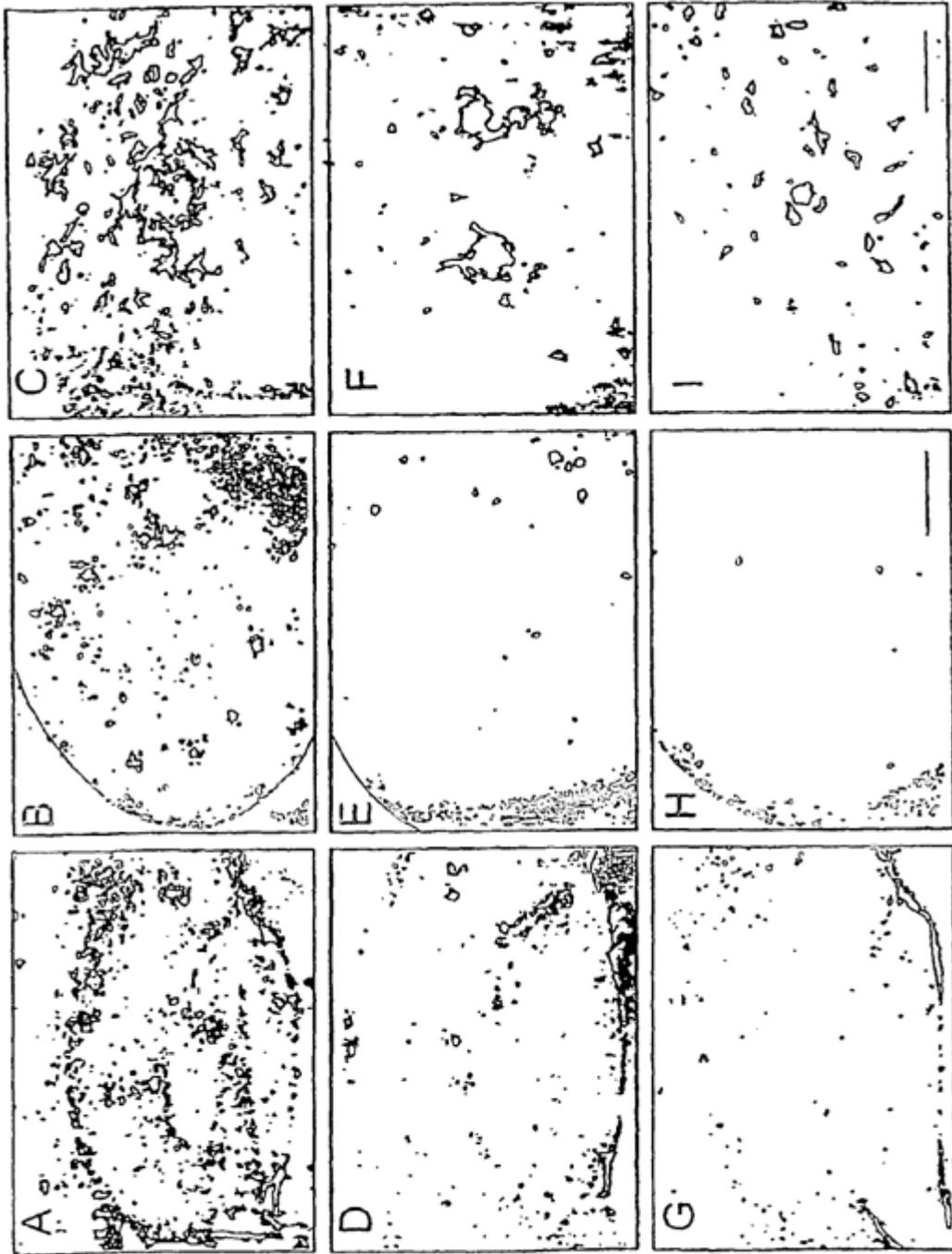


Figura 2-2I

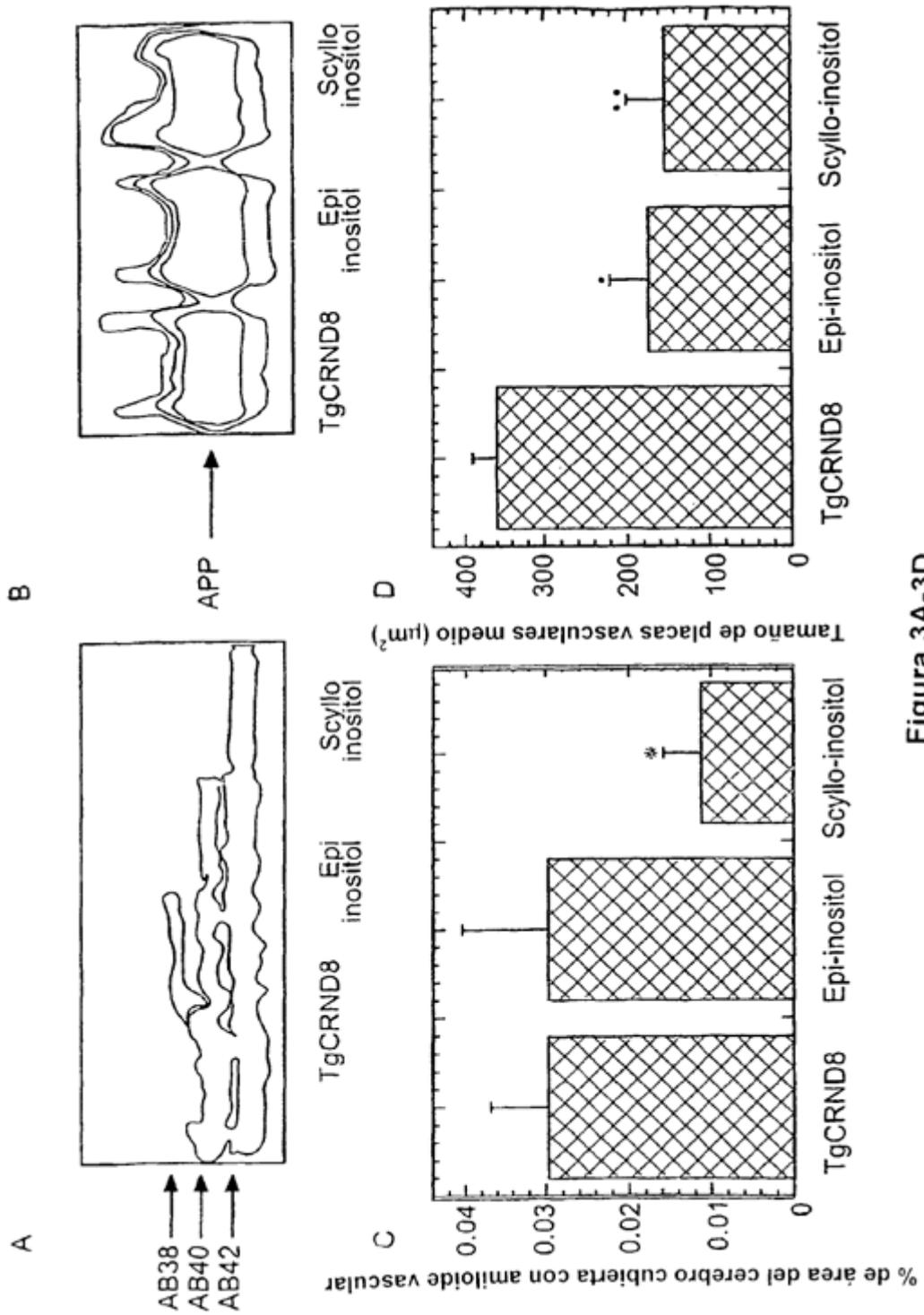


Figura 3A-3D

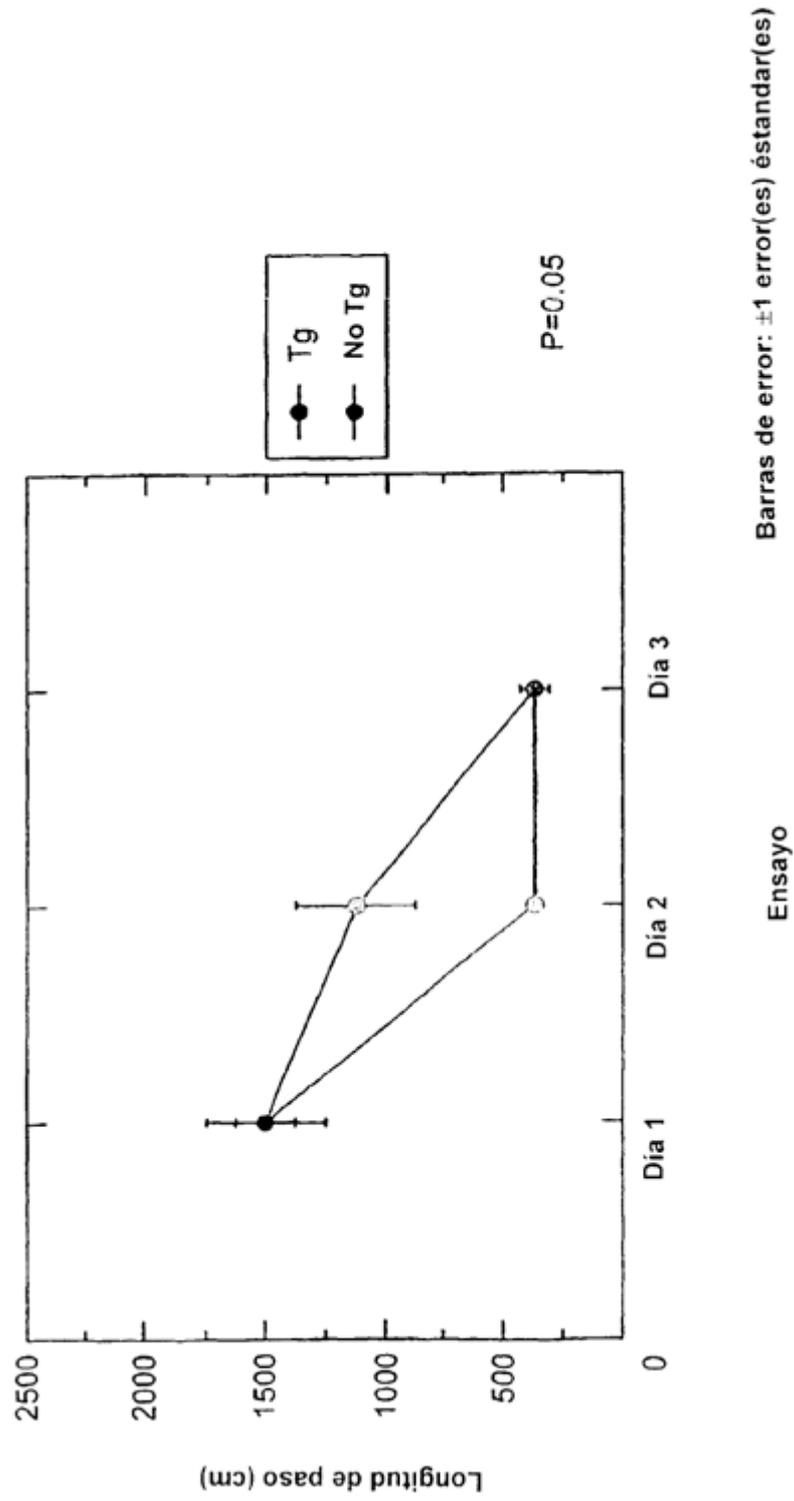
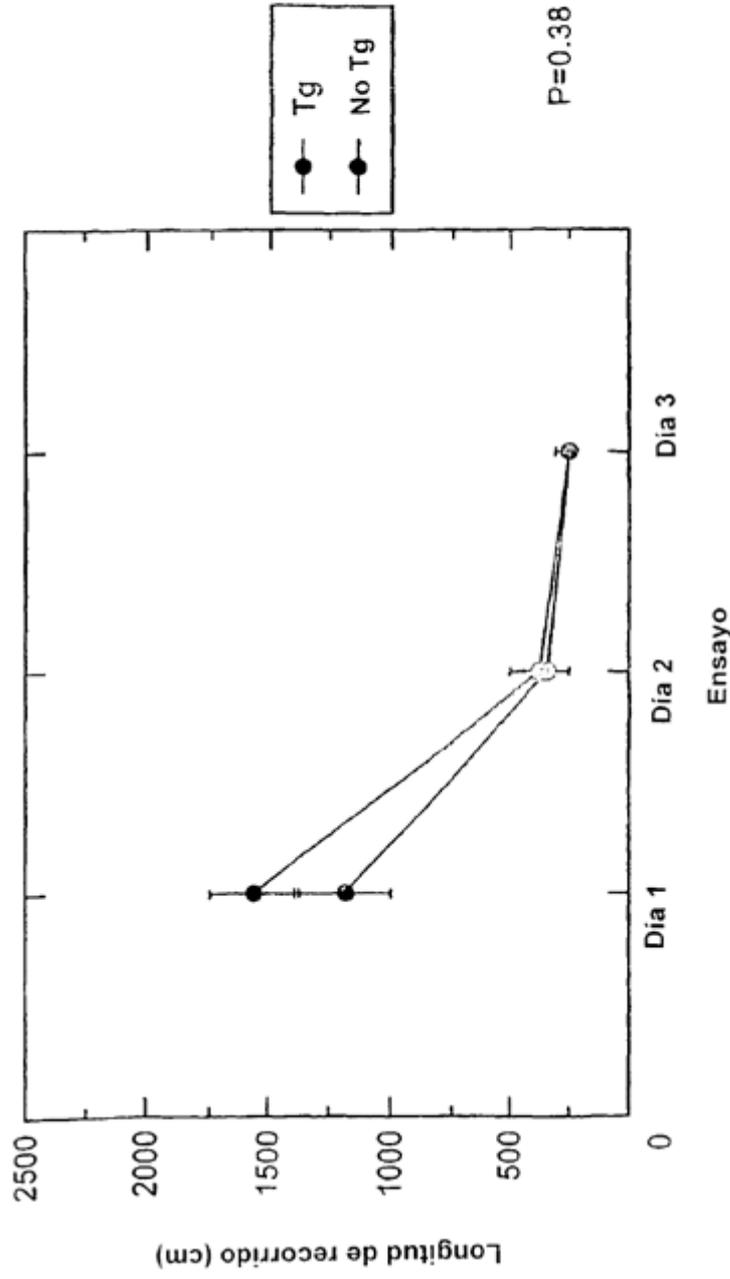


Figura 4



Barras de error:  $\pm 1$  error(es) estándar(es)

Figura 5

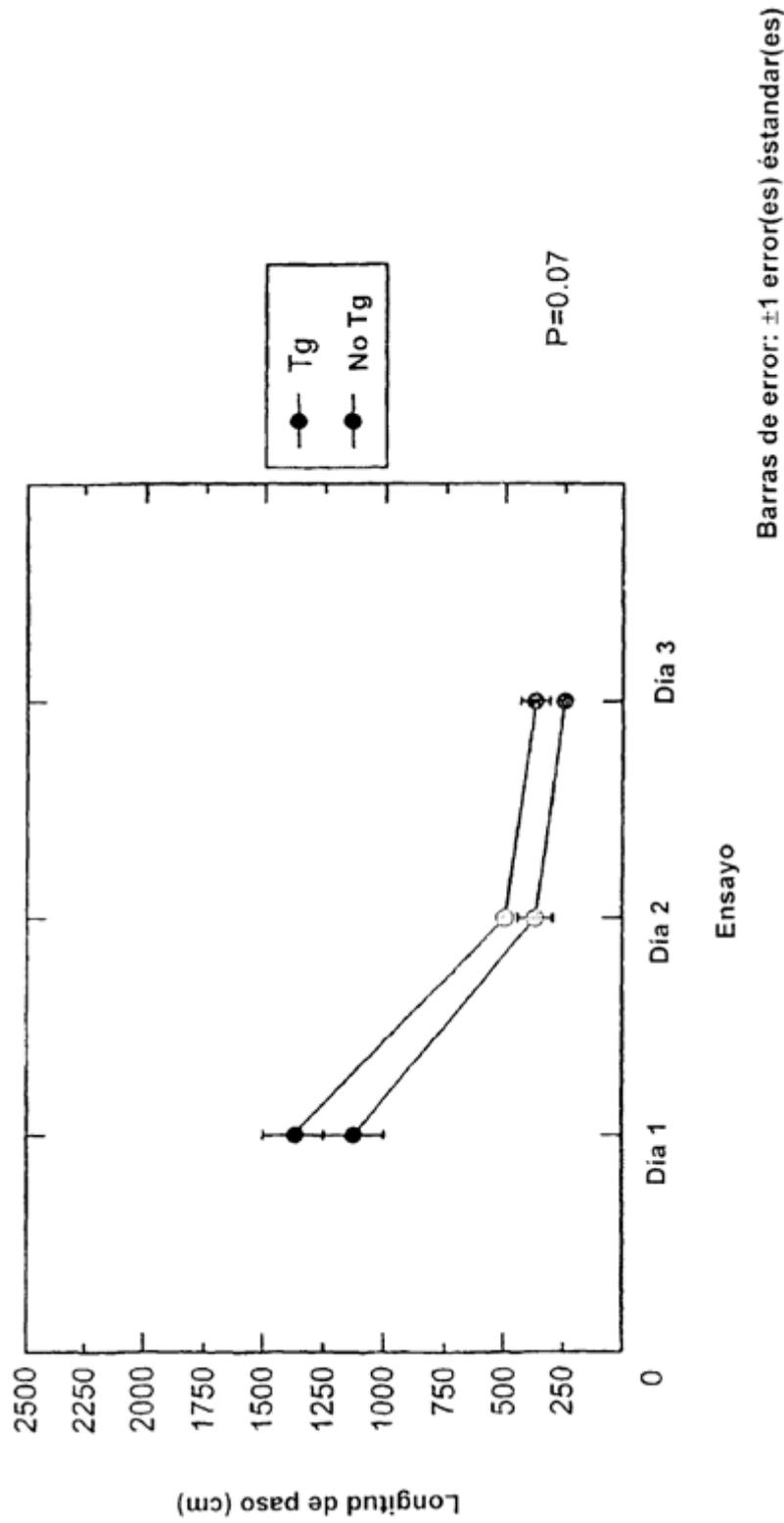


Figura 6

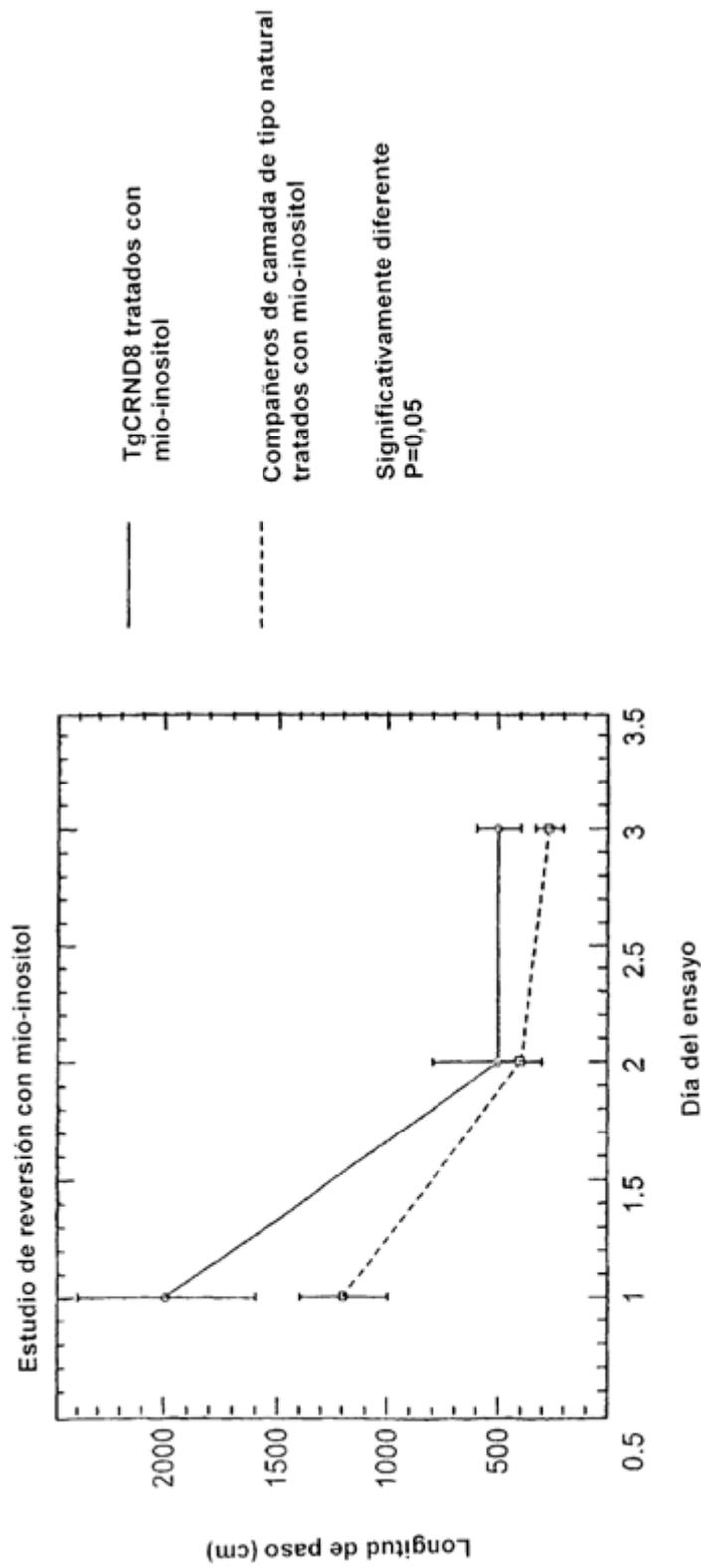


Figura 7

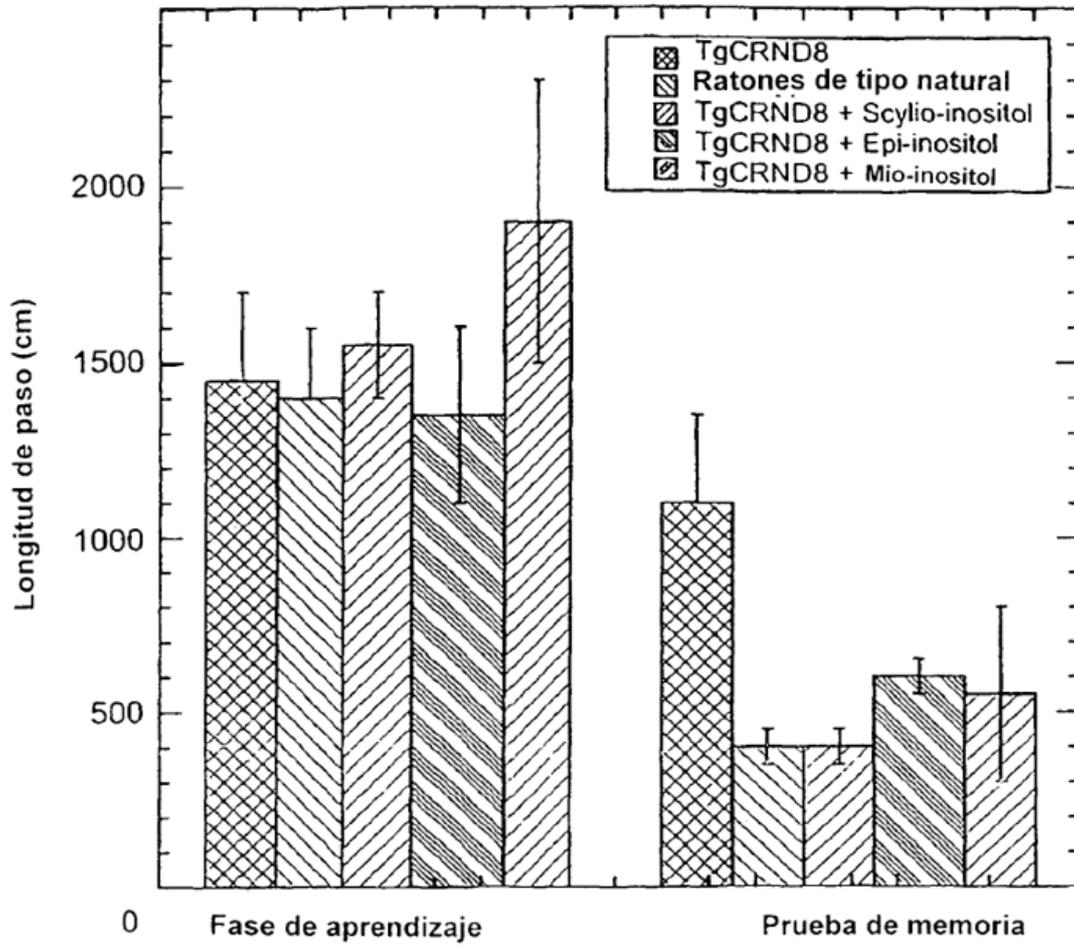


Figura 8

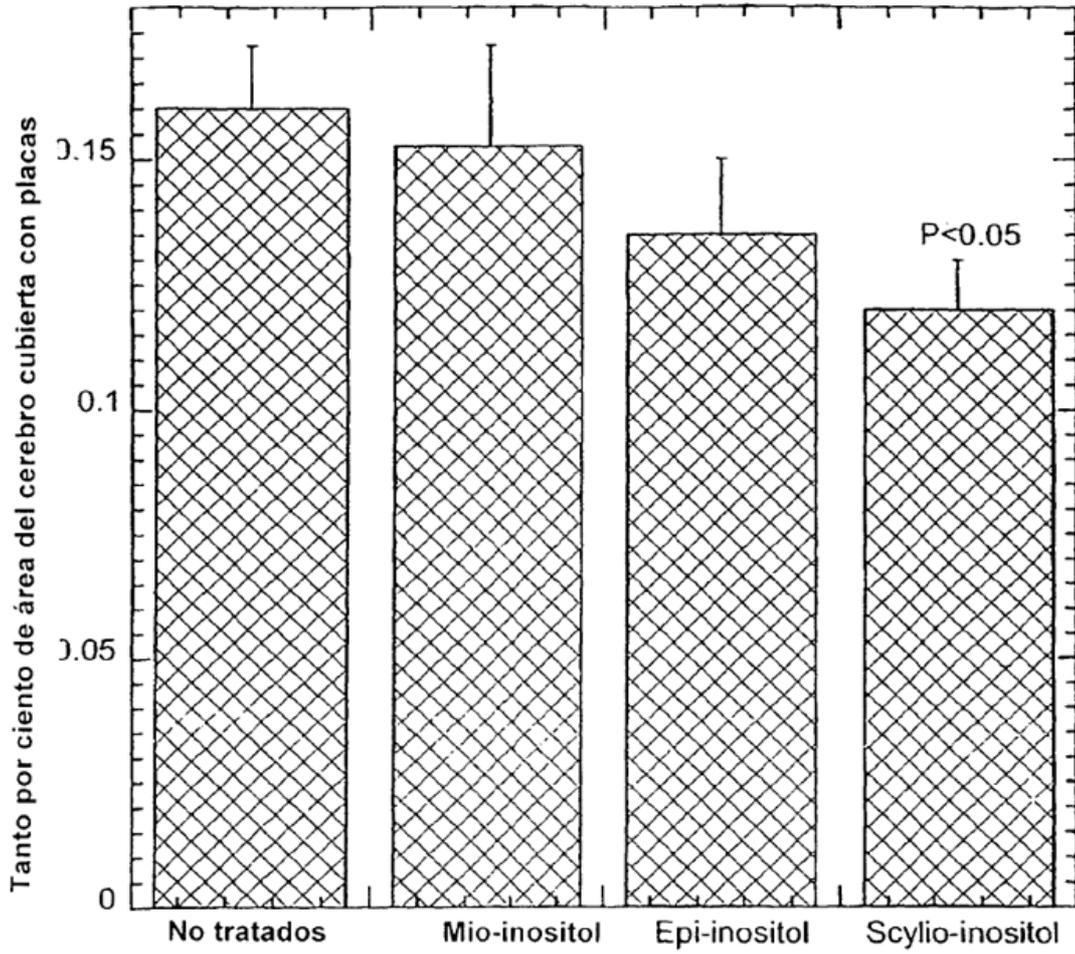


Figura 9

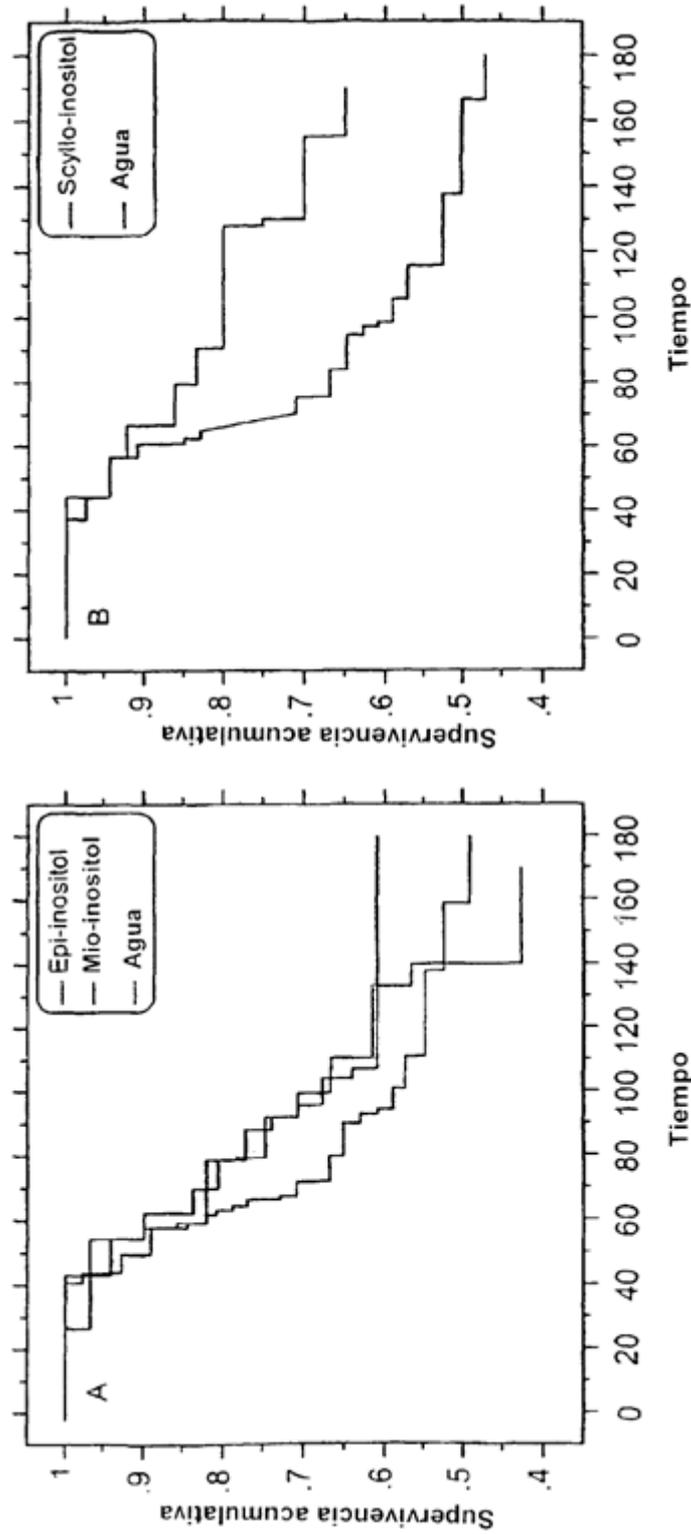


Figura 10A y 10B

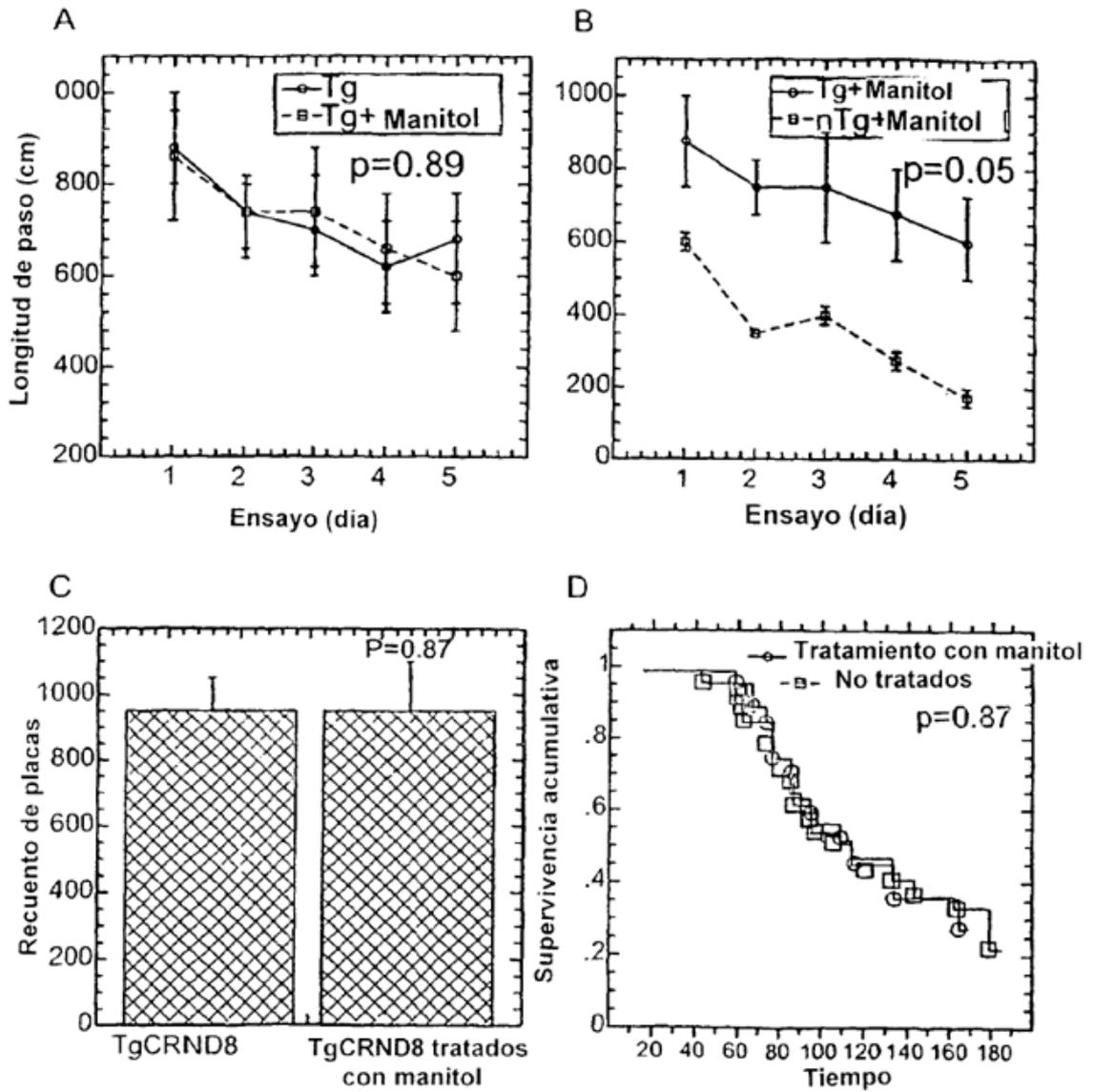


Figura 11A-11D

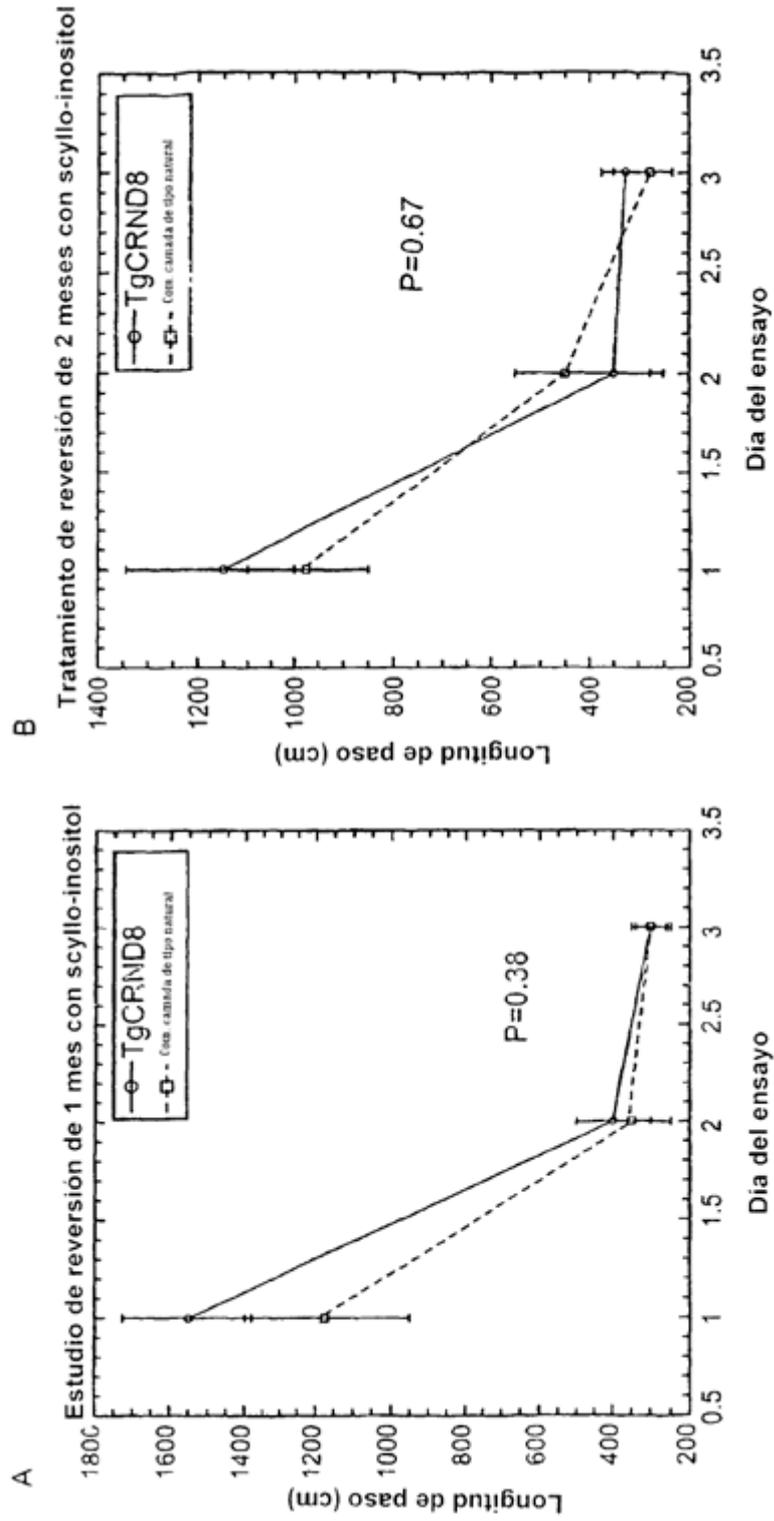


Figura 12A y 12B

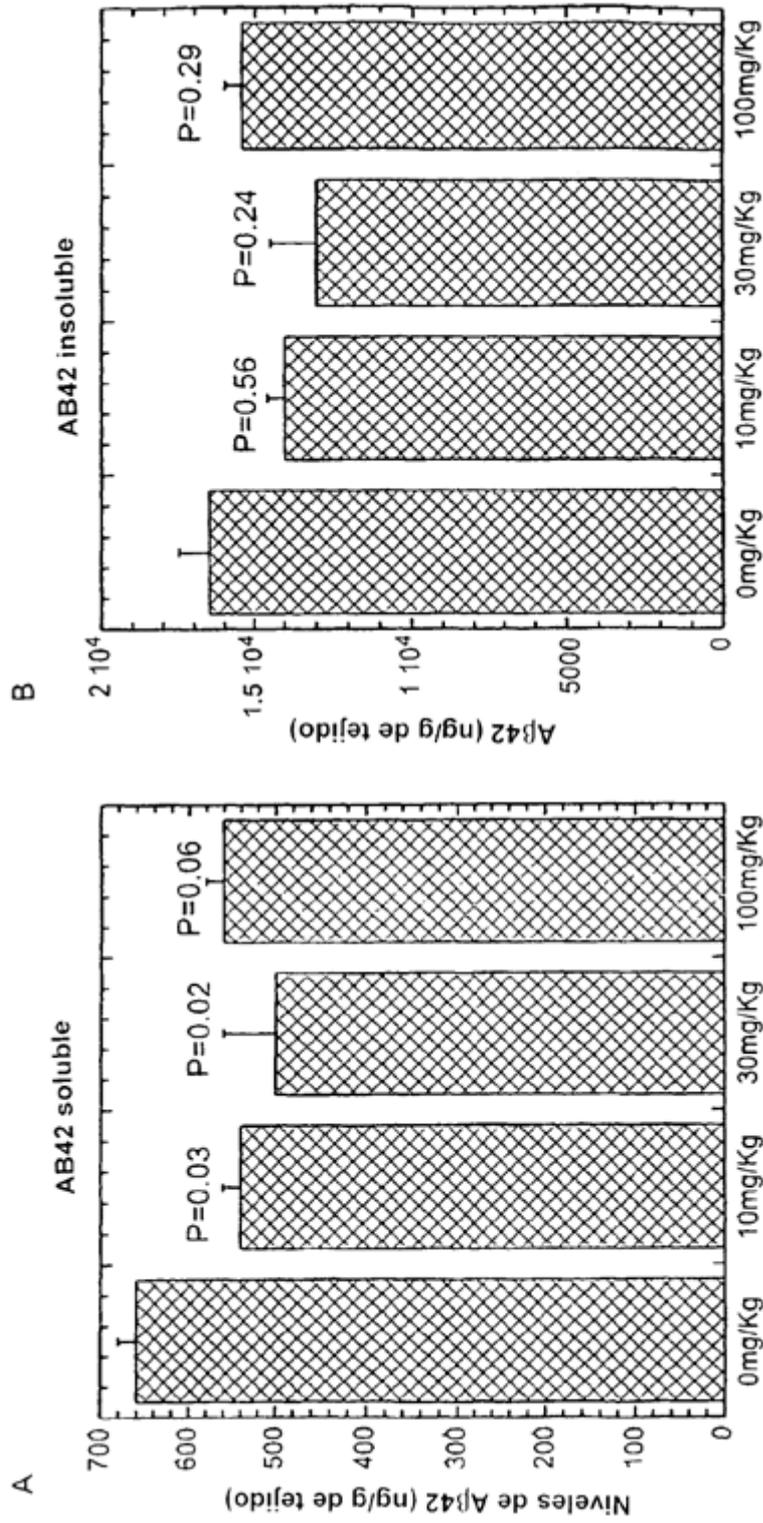


Figura 13A y 13B

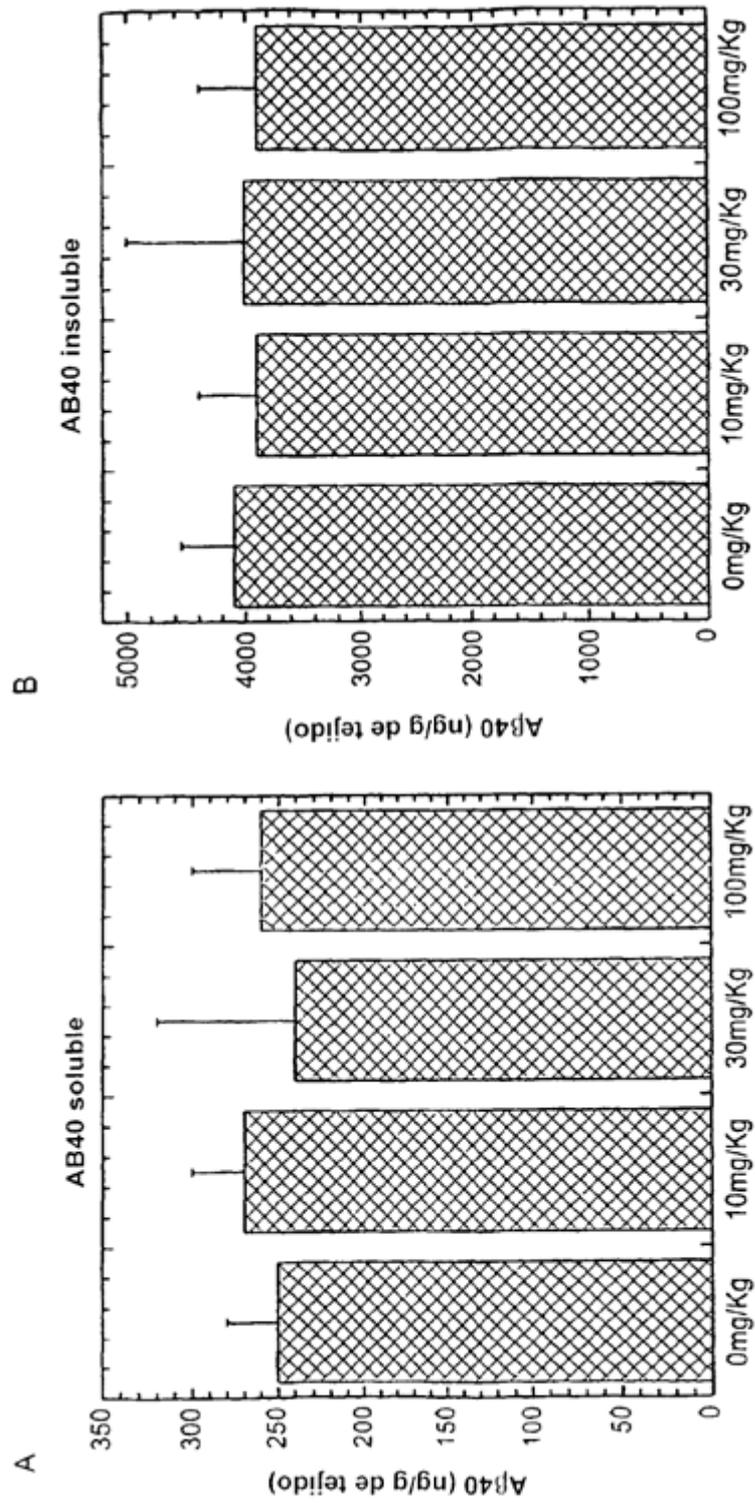


Figura 14A y 14B

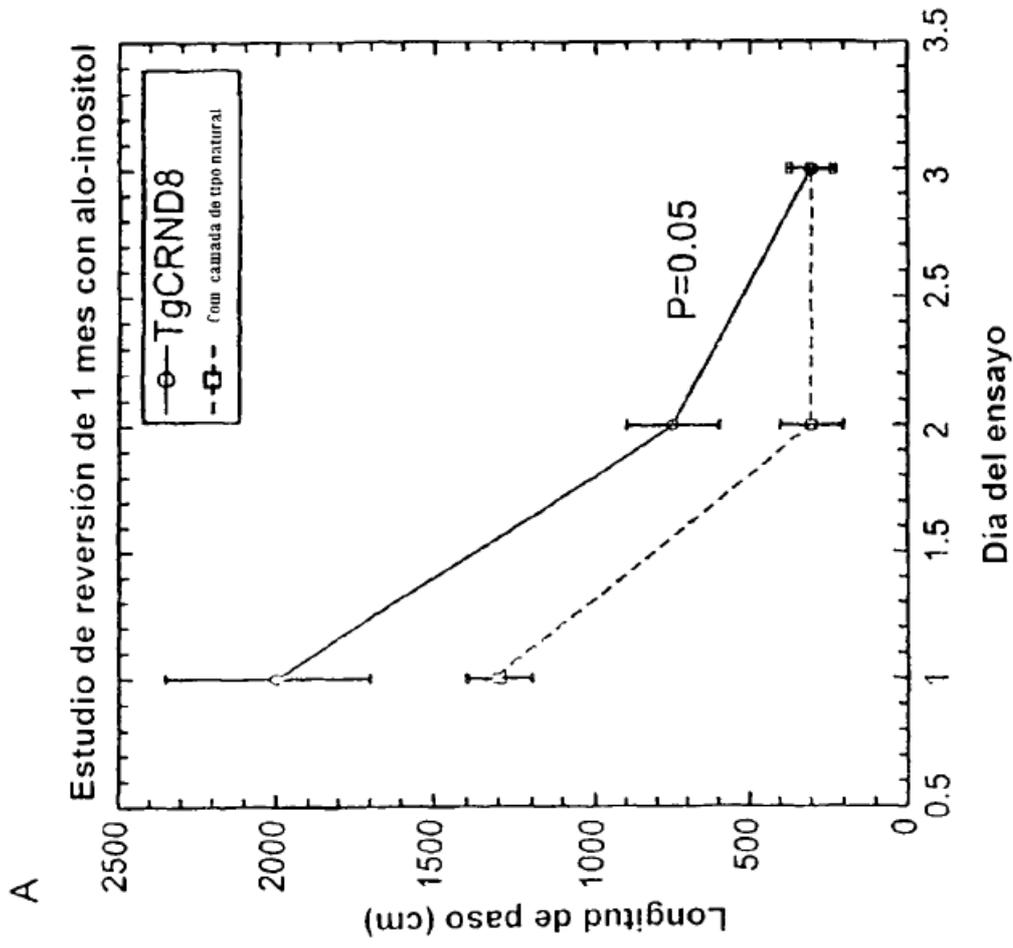


Figura 15

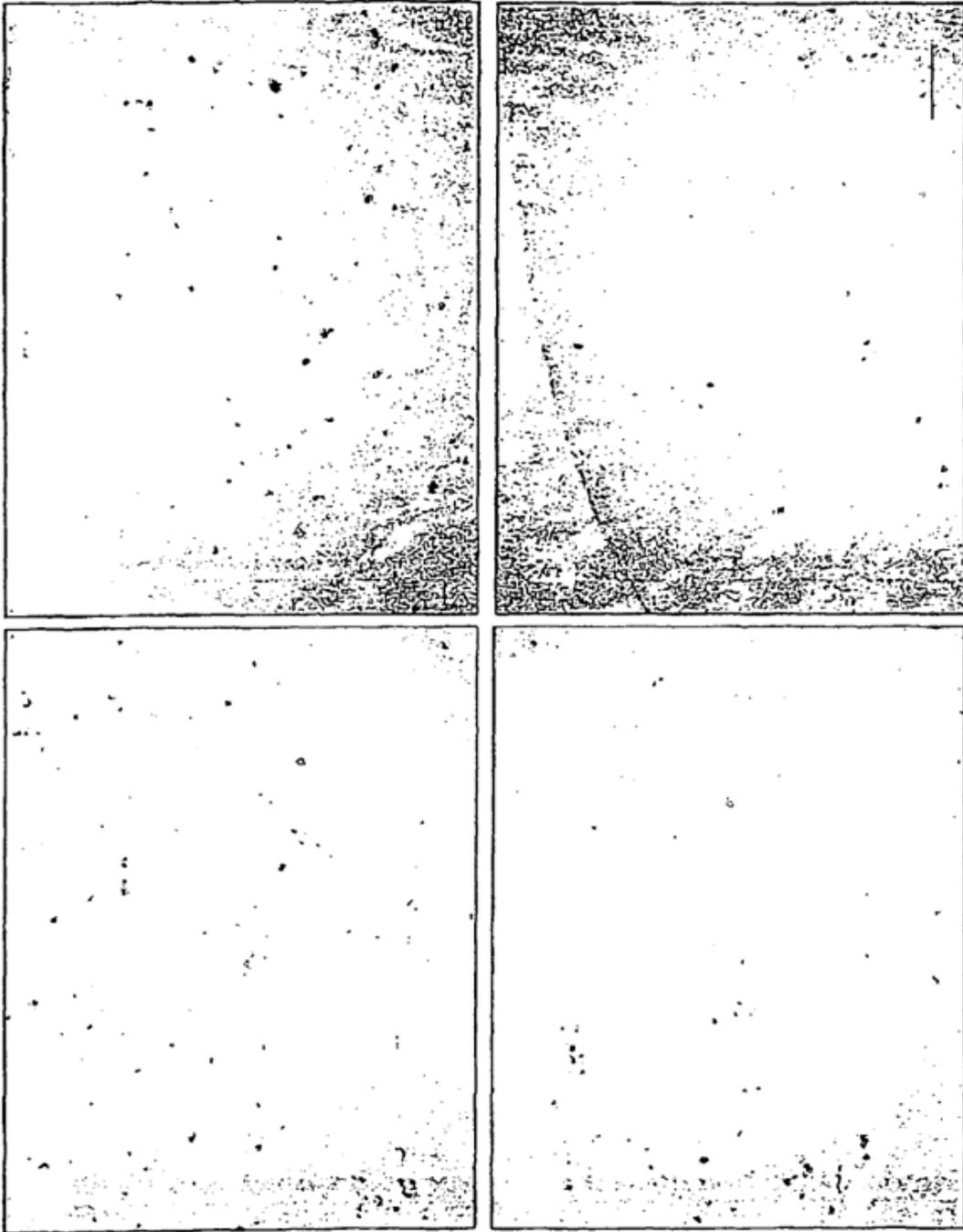


Figura 16A -16D

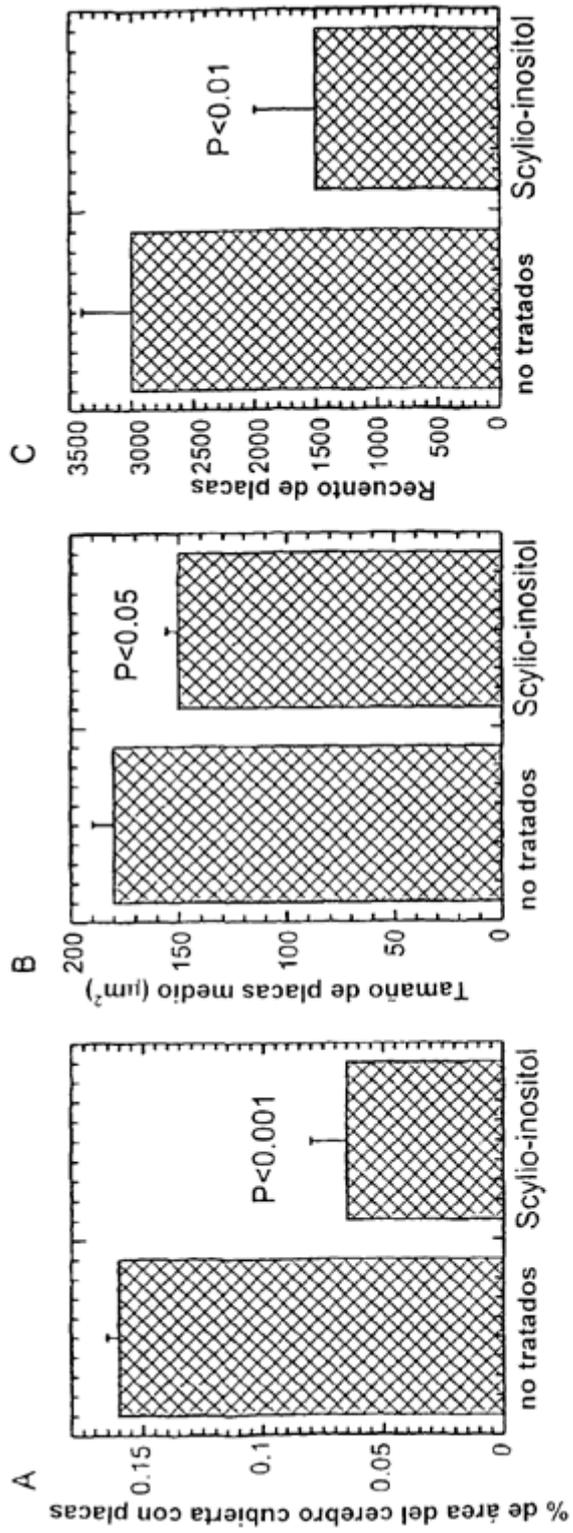


Figura 17A-17C