

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 407 204**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 31/54 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2002 E 10007601 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013 EP 2305823**

(54) Título: **Materiales y procedimientos relacionados con la agregación de proteínas en la enfermedad neurodegenerativa**

(30) Prioridad:

15.01.2001 GB 0101049

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

12.06.2013

(73) Titular/es:

**WISTA LABORATORIES LTD. (100.0%)
51 Ayer Rajah Crescent No. 07-01/02
Singapore 139948, SG**

(72) Inventor/es:

**WISCHIK, CLAUDE MICHEL;
HORSLEY, DAVID;
RICKARD, JANET ELIZABETH y
HARRINGTON, CHARLES ROBERT**

(74) Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 407 204 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

Materiales y procedimientos relacionados con la agregación de proteínas en la enfermedad neurodegenerativa.

5 **Campo técnico**

[0001] El presente documento describe a modelos basados en células y a otros sistemas de análisis para modelar la agregación de proteínas asociada con la enfermedad neurodegenerativa. La presente invención se refiere a compuestos capaces de modular dicha agregación.

10 **Antecedentes de la técnica**

[0002] Los estados de demencia tales como la enfermedad de Alzheimer (AD) se caracterizan frecuentemente por una acumulación progresiva de depósitos intracelulares y/o extracelulares de estructuras proteicas tales como placas β -amiloïdes y marañas neurofibrilares en el cerebro de los pacientes afectados. El aspecto de estas lesiones se correlaciona en su mayor parte con una degeneración neurofibrilar patológica y una atrofia cerebral, así como con un deterioro cognitivo (Mukaetova-Ladinska, E. B. y col. (2000) Am. J. Pathol. Vol. 157, Nº 2, 623-636).

[0003] Tanto las placas neuríticas como las marañas neurofibrilares contienen filamentos helicoidales apareados (PHF), de los que un constituyente principal es la proteína tau asociada a microtúbulos (Wisnichik y col. (1988) PNAS EE.UU. 85, 4506). Las placas también contienen fibrillas β -amiloïdes extracelulares derivadas de un procesado anormal de la proteína precursora amiloidea (APP; Kang y col. (1987) Nature 325, 733). Un artículo de Wisnichik y col. (en 'Neurobiology of Alzheimer's Disease', 2^a Edición (2000) Eds. Dawbarn, D. y Allen, S. J., The Molecular and Cellular Neurobiology Series, Bios Scientific Publishers, Oxford), discute con detalle el papel putativo de la proteína tau en la patogenia de las demencias neurodegenerativas.

[0004] Los estudios de la enfermedad de Alzheimer indican que la pérdida de la forma normal de la tau (Mukaetova-Ladinska y col. (1993) Am. J. Pathol., 143, 565; Wisnichik y col. (1995a) Neurobiol. Ageing, 16: 409; Lai y col. (1995b) Neurobiol. Ageing, 16: 433), la acumulación de PHFs patológicos (Mukaetova-Ladinska y col. (1993), *loc. cit.*; Harrington y col. (1994a) Dementia, 5, 215; Harrington y col. (1994b) Am. J. Pathol., 145, 1472; Wisnichik y col., (1995a), *loc. cit.*) y la pérdida de sinapsis en la corteza mesofrontal (Terry y col. (1991) Ann. Neurol., 30, 572) se correlacionan con un deterioro cognitivo asociado. Adicionalmente, la pérdida de sinapsis (Terry y col., *loc. cit.*) y la pérdida de células piramidales (Bondareff y col. (1993) Arch. Gen. Psychiatry, 50: 350) se correlacionan ambas con medidas morfométricas de una patología neurofibrilar reactiva a tau, que es semejante, a un nivel molecular, a una redistribución prácticamente total del conjunto de proteínas tau desde una forma soluble a una polimerizada (PHFs) en la enfermedad de Alzheimer (Mukaetova-Ladinska y col. (1993), *loc. cit.*; Lai y col. (1995), *loc. cit.*).

[0005] La tau existe en isoformas de corte y empalme alternativo, que contienen tres o cuatro copias de una secuencia repetitiva correspondiente al dominio de unión a microtúbulos (Goedert, M., y col. (1989) EMBO J. 8, 393-399; Goedert, M., y col. (1989) Neuron 3, 519-526). La tau de los PHF se procesa proteolíticamente a un dominio de núcleo (Wisnichik, C. M., y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85, 4884-4888; Wisnichik y col. PNAS EE.UU. 1988, 85: 4506-4510); Novak, M., y col. (1993) EMBO J. 12, 365-370) que está formado por la versión de fase alterna del dominio repetitivo; sólo hay tres repeticiones implicadas en la integración estable tau-tau (Jakes, R., y col. (1991) EMBO J. 10, 2725-2729). Una vez formados, los agregados de tau de tipo PHF actúan como semillas para la captura adicional y proporcionan un plantilla para el procesado de la proteína tau completa (Wisnichik y col. 1996 Proc Natl Acad Sci EE.UU. 93, 11213-11218).

[0006] En el transcurso de su formación y acumulación, los filamentos helicoidales apareados (PHFs) se agrupan en primer lugar para formar agregados amorfos dentro del citoplasma, probablemente a partir de oligómeros tempranos de tau que quedan truncados antes o en el transcurso de la agrupación de los PHF (Mena, R., y col. (1995) Acta Neuropathol. 89, 50-56; Mena, R., y col. (1996) Acta Neuropathol. 91, 633-641). Estos filamentos continúan entonces para formar unas clásicas marañas neurofibrilares intracelulares. En este estado, los PHF están constituidos por un núcleo de tau truncada y una cubierta exterior y difusa que contiene la tau completa (Wisnichik., C. M., y col, (1996) *loc. cit.*). El proceso de agrupación es exponencial, consumiendo el conjunto celular de tau funcional normal e induciendo una nueva síntesis de tau para compensar el déficit (Lai, R. Y. K., y col., (1995), Neurobiology of Ageing, Vol. 16, Nº 3, 433-445). Finalmente, el deterioro funcional de la neurona progresa hasta el punto de la muerte celular, dejando atrás una maraña extracelular. La muerte celular se correlaciona en gran medida con el número de marañas extracelulares (Wisnichik y col. 2000, *loc. cit.*). Dado que las marañas son empujadas hacia el espacio extracelular, hay una pérdida progresiva de la cubierta exterior difusa de la neurona-PHF con la correspondiente pérdida de la inmunorreactividad tau N-terminal, pero conservando la inmunorreactividad de la tau asociada con el núcleo de los PHF (Figura 1; también Bondareff, W. y col., (1994) J. Neuropath. Exper. Neurol., vol. 53, Nº 2, 158-164).

[0007] El cambio de fase que se observa en el dominio repetitivo de la tau incorporada en los PHF sugiere que el dominio repetitivo experimenta un cambio conformacional inducido durante la incorporación en el filamento. Al inicio de la enfermedad de Alzheimer, se contempla que este cambio conformacional podría iniciarse por la unión de

la tau a un sustrato patológico, tal como proteínas de membrana dañadas o mutadas (véase la Figura 2 - también Wischik, C. M., y col. (1997) en "Microtubule-associated proteins: modifications in disease", eds. Avila, J., Brandt, R. y Kosik, K. S. (Harwood Academic Publishers, Amsterdam) págs. 185-241).

- 5 [0008] En el caso de la enfermedad de Alzheimer, las terapias farmacéuticas actuales se centran en el tratamiento sintomático de la pérdida de la transmisión colinérgica resultante de la neurodegeneración (Mayeux, R., y col. (1999) New Eng. J. Med. 341, 1670-1679). Sin embargo, aunque los tratamientos disponibles retrasan la progresión de la enfermedad en hasta 6 a 12 meses, no la previenen. El descubrimiento de fármacos que podrían impedir la agregación de la tau que da lugar a la neurodegeneración proporcionaría una estrategia más efectiva para la profilaxis o para la inhibición de la progresión de la enfermedad, que no requería un conocimiento inmediato de los diversos eventos que, cascada arriba, inician la agregación (véase la Figura 3).

Modelos y ensayos

- 15 [0009] El documento WO96/30766 describe un ensayo *in vitro* para la agregación de la tau en el que un fragmento de la tau correspondiente al dominio repetitivo del núcleo, que ha sido adsorbido sobre un sustrato en fase sólida, es capaz de capturar la tau soluble completa y unirse a la tau con una elevada afinidad (véase la Figura 4). Esta asociación confiere estabilidad frente a la digestión de las proteasas de las moléculas de tau en los dominios repetitivos de las moléculas de tau que se han agregado. Este proceso es autopropagante y puede ser bloqueado selectivamente mediante agentes farmacéuticos prototípicos ((Wischik y col. 1996 Proc Natl Acad Sci EE.UU. 93, 11213-11218)).

- 25 [0010] Aunque el ensayo *in vitro* descrito en el documento WO96/30766 facilita la identificación de inhibidores o moduladores de la asociación tau-tau, los presentes inventores también han reconocido que podrían ser útiles los modelos basados en células de la agregación de proteínas del tipo de la enfermedad de Alzheimer. Dichos modelos celulares podrían usarse tanto en el cribado primario de los candidatos moduladores de la agregación tau-tau, como en el cribado secundario de compuestos ya identificados en el ensayo *in vitro* del documento WO96/30766. Adicionalmente, la demostración de la agregación de la tau en células también podría ayudar en la identificación de los sustratos celulares normales que están implicados en el inicio de la agregación patológica de la tau, sustratos que por sí mismos podrían ser objetivos para una intervención farmacológica.

- 30 [0011] Sin embargo, numerosos artículos que describen la expresión de diversos construcciones de tau en modelos de cultivo tisulares no han conseguido demostrar la agregación (véase, por ejemplo, Baum, L. y col., (1995) Mol. Brain Res. 34:1-17). Por ejemplo, los fibroblastos de ratón 3T3 no poseen proteína tau, y por lo tanto presentan un entorno celular en el que la tau recombinante puede expresarse independientemente de la tau endógena del ratón. Previamente se ha informado de la transfección de diversas líneas celulares (Kanai y col., 1989; Goedert y Jakes, 1990; Knops y col., 1991; Lee y Rook, 1992; Gallo y col., 1992; Lo y col., 1993; Montejo de Garcini y col., 1994; Fasulo y col., 1996). Sin embargo, no se consiguió la expresión estable a largo plazo de tau truncada en dichas líneas celulares. Por ejemplo, las construcciones de tau para los restos 164 ó 173 hasta 338 ó 352 no expresaban la proteína (Lee y Rook, 1992).

- 35 [0012] Aunque Fasulo y col. (Alzheimer's Research 1996, 2, 195-200) informaron sobre la expresión transitoria de tau truncada en células COS, los datos de la expresión estable a largo plazo de esta tau no se mostraban. Estos trabajadores concluyeron, a partir del uso del sistema de transfección transitoria, que la expresión de la tau truncada no era suficiente por sí misma para inducir la agregación de tau de una forma adecuada para el análisis de fármacos.

- 40 [0013] Hasta la fecha sólo se ha conseguido la agregación de tau soluble *in vitro* en condiciones no fisiológicas y a elevadas concentraciones (revisado en Wischik (2000), *loc. cit.*).

- 45 [0014] El documento WO96/30766 describe dos metodologías para estudiar la agregación de tau en un entorno celular. En la primera metodología se expresaron de forma estable en células tau completas o fragmentos de tau. En la segunda metodología, la tau agregada se transfeció transitoriamente en células mediante el uso de lipofectina.

- 50 [0015] Aunque estas dos metodologías son útiles para el estudio de la agregación tau-tau, tienen algunas limitaciones. La transfección de tau agregada en células usando una lipofección tiene una eficacia variable, ya que es la producción *in vitro* de la propia tau agregada. Además, el fragmento del núcleo de tau, que es la semilla más eficaz para la agregación de tau, resulta ser tóxico cuando se expresa de forma estable en células, conduciendo a unos bajos niveles de expresión. Por lo tanto, la expresión constitutiva del fragmento de tau truncada del núcleo de los PHF en células eucariotas es difícil de conseguir. Los sistemas de expresión transitoria permiten la optimización de la expresión de tau, pero la toxicidad inherente de los fragmentos hace que incluso estos sistemas sean poco fiables. Los fragmentos más largos de tau son menos tóxicos, pero no se agregan de forma fiable cuando se expresan en células.

- 55 [0016] Por lo tanto, sería deseable desarrollar un sistema de modelo alternativo en el que la interacción entre, por ejemplo, moléculas de tau y similares, pudiera ser investigada en condiciones fisiológicas, en un entorno celular

estable y controlable, y que pudiera usarse para cribar potenciales agentes diagnósticos, pronósticos o terapéuticos de dolencias tales como la enfermedad de Alzheimer.

Divulgación de la invención

- 5 [0017] Los presentes inventores han ideado un sistema de análisis celular estable que puede usarse para modelar el procesado proteolítico guiado por plantilla de una proteína, cuya agregación está asociada con una enfermedad neurodegenerativa. En un sistema de análisis, exemplificado con la proteína tau, se combinó un nivel muy bajo de expresión constitutiva de un fragmento de la proteína tau con una expresión inducible de la tau completa. La inducción de la tau condujo a su conversión proteolítica en un fragmento deseado, confirmando que se estaba produciendo "el procesado por plantilla" de la tau. El sistema permite fácilmente la demostración de los efectos de los inhibidores de la agregación de la tau a través de su inhibición de la producción del fragmento de 12 kD procesado a partir de la tau completa inducida.
- 10 [0018] El que dicho sistema estable pueda conseguirse a pesar de las inherentes propiedades tóxicas del fragmento de 12 kD es particularmente sorprendente. Por ejemplo, según se demuestra en los Ejemplos, a continuación, aunque el truncamiento parcial en los extremos N o C de la tau completa da como resultado líneas celulares en las que puede mantenerse la expresión estable, estos construcciones más largos sólo muestran una débil propensión a agregarse, más que a unirse a la red microtubular. La expresión estable de combinaciones de fragmentos de tau genera agregados dentro del citoplasma de las células, pero este sistema no puede ser mantenido reproduciblemente. Los sistemas basados en la expresión inducible del fragmento de 12 kD dan lugar a una toxicidad como resultado de la imprevisible agregación intracelular del fragmento.
- 15 [0019] Por lo tanto, parecería existir una compensación en los sistemas celulares de expresión estable entre inducir la agregación, y por lo tanto la toxicidad, por un lado, que produce líneas celulares que o son variables o no son viables, y mantener líneas celulares viables en las que la tau tiene una baja propensión a agregarse. A pesar de todo esto, el sistema de expresión inducible de tau descrito en el presente documento es estable y además capaz de proporcionar una agregación controlada de la proteína para su uso en cribados y similares.
- 20 [0020] Adicionalmente, el uso del ensayo ha proporcionado pruebas de que el mecanismo de acción de ciertos inhibidores (por ejemplo, fenotiazinas) de la agregación de proteínas es principalmente de naturaleza estérica, más que esencialmente *redox*, según puede sospecharse sobre la base de la técnica anterior. Este descubrimiento tiene implicaciones inesperadas para la elección, valoración, formulación y uso de dichos compuestos en el contexto de las enfermedades discutidas en este documento. En particular, muestra que la valoración de los coeficientes de difusión puede proporcionar un cribado valorable para la identificación de inhibidores putativos, u optimizar la estructura o el estado de los conocidos, porque los parámetros valorados inherentemente midiendo el coeficiente de difusión pueden ser altamente aplicables a la potencia de los inhibidores.
- 25 [0021] El ensayo muestra adicionalmente que el uso de fenotiazinas en su forma reducida puede ser ventajoso para mejorar sus propiedades inhibidoras. Estas observaciones forman la base de la presente invención.
- 30 [0022] En el presente documento se describe un procedimiento para convertir, a través del procesado proteolítico, una proteína precursora en un fragmento producto de la proteína precursora, en una línea celular estable, procedimiento que comprende las etapas de: (a) proporcionar una línea celular estable transfectada con un ácido nucleico que codifica para (i) un fragmento de plantilla de la proteína precursora tal que el fragmento de plantilla se expresa constitutivamente en la célula a un nivel que no es tóxico para la célula; y (ii) la proteína precursora, proteína que es expresada de forma inducible en la célula en respuesta a un estímulo, mediante lo que la interacción del fragmento de plantilla con la proteína precursora provoca un cambio conformacional en la proteína precursora tal que provoca la agregación y el procesado proteolítico de la proteína precursora al fragmento producto.
- 35 [0023] El procedimiento puede incluir someter la célula a un estímulo tal que la proteína precursora se exprese en la célula. Sin embargo, en las realizaciones en las que se usa un promotor inducible que provoca unos niveles bajos pero detectables de expresión e incluso en ausencia del estímulo, entonces puede omitirse la etapa del estímulo.
- 40 [0024] Hablando de forma general, la proteína precursora será aquella que, *in vivo*, sea capaz de experimentar una interacción de polimerización conformacional inducida (de una forma autopropagante), que finalmente dé lugar a la formación de agregados formados por el fragmento producto, y asociados con el estado de enfermedad. El fragmento producto obtenido en el procedimiento proporcionado en este documento es una medida de la agregación patológica y el proceso de proteólisis que da lugar *in vivo* a la producción de uno o más productos tóxicos y al estado de enfermedad. El fragmento producto (o uno o más de los fragmentos) del presente procedimiento puede ser tóxico, o puede usarse simplemente como un indicador del proceso de agregación patológica.
- 45 [0025] Las proteínas y las interacciones en las que se basa el procedimiento se discuten con más detalle a continuación.
- 50 [0026] Los presentes inventores han demostrado que, inesperadamente, es posible expresar constitutivamente el

fragmento de plantilla en una (primera) concentración que no sea tóxica para la línea celular, es decir, la línea celular es viable. Tampoco muestra anomalías celulares del tipo mostrado en, por ejemplo, el documento WO96/30766 en la Fig. 29.

5 [0027] No obstante (por ejemplo, en un momento predeterminado mediante la adición de un estímulo), es posible sembrar el procesado de la proteína precursora a un fragmento producto (que puede ser el mismo, ampliamente equivalente o bastante diferente al fragmento de plantilla) que puede así acumularse a una (segunda, mayor) concentración que sea tóxica para la célula y que se corresponde con el estado de enfermedad. Esto a su vez proporciona procedimientos convenientes para modelar el estado de la enfermedad asociado con los efectos del fragmento producto, y evaluar el efecto de los moduladores sobre la generación del fragmento producto.

10 [0028] También se describen en el presente documento los correspondientes procedimientos para cualquiera de iniciación, sembrado o control del procesado proteolítico, y opcionalmente la agregación, de la proteína precursora hacia el fragmento producto.

15 [0029] En cada caso, el procedimiento puede implicar el seguimiento (directa o indirectamente) del nivel de procesado proteolítico de la proteína precursora.

20 [0030] En una realización del procedimiento, los fibroblastos (3T6) expresan la tau completa ("T40") bajo el control de un promotor inducible y bajos niveles constitutivos del fragmento de tau del núcleo de los PHF (fragmento de 12 kD). Cuando se induce la expresión de la T40 en este sistema, experimenta un truncamiento dependiente de la agregación dentro de la célula, N-terminalmente en el aa 295 y C-terminalmente en el aa 390, produciendo así mayores niveles del fragmento del dominio del núcleo de 12 kD de los PHF. La producción del fragmento de 12 kD puede bloquearse de una forma dependiente de la dosis mediante inhibidores de la agregación de la tau. De hecho, la cuantificación de la actividad inhibidora de los compuestos con respecto a la generación proteolítica del fragmento de 12 kD dentro de las células puede describirse completamente en términos de los mismos parámetros que describen la inhibición de la unión tau-tau *in vitro*. Esto es, la magnitud de la generación proteolítica del fragmento de 12 kD dentro de las células está determinada completamente por la magnitud de la unión tau-tau a través del dominio de repetición. La disponibilidad de las proteasas pertinentes dentro de la célula no es limitante.

30 *Proteínas precursoras y enfermedades (incluyendo tauopatías)*

35 [0031] Según se estableció anteriormente, el procedimiento puede basarse en torno al uso de cualquier proteína que esté asociada con una enfermedad en la que la proteína experimenta una interacción de polimerización conformacional inducida, es decir, aquella en la que un cambio conformacional de la proteína, o en un fragmento de la misma, provoca la unión al plantilla y la agregación de moléculas de proteínas adicionales (precursoras) de una forma autopropagante.

40 [0032] Una vez iniciada la nucleación, puede surgir una cascada de agregación que implica la polimerización conformacional inducida de moléculas de proteína adicionales, dando lugar a la formación de fragmentos de producto tóxicos en agregados que son sustancialmente resistentes a una proteólisis adicional. Se cree que los agregados de proteína así formados son una causa próxima de neurodegeneración, demencia clínica y otros síntomas patológicos de este grupo de enfermedades.

45 [0033] Los procedimientos preferido se basan en la proteína tau. Cuando se usa en este documento, el término "proteína tau" se refiere de forma general a cualquier proteína de la familia de las proteínas tau. Las proteínas tau se caracterizan por estar entre uno las familias más importantes de proteínas que se purifican simultáneamente con los microtúbulos durante ciclos repetidos de agrupación y desagrupación (Shelanski y col. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 70., 765-768), y se conocen como proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP). Los miembros de la familia tau comparten las características comunes de tener un segmento N-terminal característico, secuencias de aproximadamente 50 aminoácidos insertadas en el segmento N-terminal, que son reguladas desarrolladoramente en el cerebro, una característica región de repetición en tandem consistente en 3 ó 4 repeticiones en tandem de 31-32 aminoácidos, y una cola C-terminal.

55 [0034] La MAP2 es la proteína asociada a microtúbulos predominante en el compartimento somatodendrítico (Matus, A., en "Microtubules" [Hyams y Lloyd, eds.] págs. 155-166, John Wiley and Sons, NY). Las isoformas de la MAP2 son prácticamente idénticas a la proteína tau en la región de repetición en tandem, pero difieren sustancialmente tanto en la secuencia como en la magnitud del dominio N-terminal (Kindler y Garner (1994) Mol. Brain Res. 26, 218-224). No obstante, la agregación en la región de repetición en tandem no es selectiva para el dominio de repetición de tau. Por lo tanto, se apreciará que cualquier discusión en este documento en relación con la proteína tau o la agregación tau-tau debería considerarse como relacionada también con la agregación tau-MAP2, la agregación MAP2-MAP2 y así sucesivamente.

60 [0035] La Figura 5 muestra una Tabla que enumera otras diversas proteínas de agregación asociadas con enfermedades que pueden usarse en el presente procedimiento. En cada caso, se enumeran también la enfermedad o enfermedades en las que pueden jugar un papel el inicio de la agregación y/o la mutación de la(s) proteína(s). Se

enumeran el dominio o la mutación responsable de la actividad patológica, y al menos toda o parte de esta mínima porción de la proteína estarían preferiblemente englobadas por el fragmento de plantilla usado en el presente procedimiento.

5 [0036] Como puede observarse a partir de la tabla, los ejemplos de enfermedades que están caracterizadas por la agregación patológica de proteínas incluyen enfermedades de motoneuronas y enfermedades por cuerpos de Lewy.

10 [0037] Notablemente, no es sólo en la enfermedad de Alzheimer en la que puede jugar un papel la proteína tau (y la función o el procesado aberrante de la misma). La patogenia de las alteraciones neurodegenerativas tales como la enfermedad de Pick y la parálisis supranuclear progresiva (PSP) parece correlacionarse con una acumulación de agregados patológicos de tau truncada en la circunvolución dentada y en las células piramidales estrelladas de la neocorteza, respectivamente. Otras demencias incluyen demencia frontotemporal (FTD); parkinsonismo relacionado con el cromosoma 17 (FTDP-17); complejo de desinhibición-demencia-parkinsonismo-amiotrofia (DDPAC); degeneración pálido-ponto-nigral (PPND); síndrome de Guam-ALS; degeneración pálido-nigro-luisiana (PNLD); degeneración cortico-basal (CBD) y otras (véase Wischik y col. 2000, *loc. cit.*, para una discusión detallada - especialmente la Tabla 5.1). Todas estas enfermedades, que están caracterizadas principal o parcialmente por una agregación anormal de tau, se denominan en este documento "tauopatías".

20 [0038] Por lo tanto, a la luz de la anterior discusión, se apreciará (y excepto donde el contexto lo requiera de otro modo) que donde las realizaciones del procedimiento se describan con respecto a la proteína tau o proteínas de tipo tau (por ejemplo, MAP2), la descripción deberá entenderse como que se aplica igualmente a las otras proteínas discutidas anteriormente (por ejemplo, β -amiloidea, sinucleína, prión, etc.) u otras proteínas que pueden iniciar o experimentar una agregación patológica similar en virtud del cambio conformacional en un dominio crítico para la propagación de la agregación, o que imparten estabilidad proteolítica al agregado así formado (artículo de Wischik y col. en "Neurobiology of Alzheimer's Disease", 2^a Edición (2000) Eds. Dawbarn, D. y Allen, S. J., The Molecular and Cellular Neurobiology Series, Bios Scientific Publishers, Oxford). Todas estas proteínas pueden denominarse en este documento "proteínas de enfermedad por agregación".

30 [0039] Asimismo, cuando en este documento se hace mención a la "agregación tau-tau", o similar, esto también puede entenderse que se aplica a otra "agregación de proteínas de agregación", tales como la agregación d β - amiloidea, la agregación de priones y la agregación de sinucleína, etc. Igualmente para la "degradación proteolítica de tau" y así sucesivamente.

Fragmentos de plantilla

35 [0040] En las realizaciones preferidas del presente procedimiento, el fragmento de plantilla comprende, consiste esencialmente en, o está constituida por, un "fragmento de núcleo" de la proteína precursora, término que se refiere a aquella parte de la proteína que es capaz de unirse a la proteína precursora para iniciar o propagar la proteólisis y la agregación según se ha descrito anteriormente.

40 [0041] En el caso de proteínas patológicas que se agregan, también es probable que dichos fragmentos de núcleo sean aquellos que contribuyen a la estabilidad proteolítica del agregado.

45 [0042] Así, por ejemplo, un "fragmento de núcleo de tau" es un fragmento de tau que comprende una secuencia de la proteína tau truncada derivada de la región de repetición en tandem y que, en las condiciones apropiadas, es capaz de unirse a la región de repetición en tandem de una proteína tau adicional o de una proteína MAP2 con alta afinidad. En el caso de la tau, el fragmento preferido es por tanto ejemplificado mediante, pero no limitado a, los fragmentos de la tau presentes en los PHF (y, finalmente, en las marañas neurofibrilares) de los cerebros con enfermedad de Alzheimer.

50 [0043] Un fragmento de tau preferido puede ser, por tanto, desde aproximadamente (digamos) entre 295-297 que se extiende hasta aproximadamente 390-391 (véase 'dGAE' en la Figura 6), aunque también pueden usarse variantes de dichos fragmentos, según se discute a continuación.

55 [0044] En el caso de la APP (proteína precursora amiloidea), por ejemplo, puede preferirse la expresión de un fragmento de la APP que englobe el dominio AP de 1-40 o 1-42 aminoácidos como una proteína de fusión.

60 [0045] Otros fragmentos del núcleo pueden estar basados, por ejemplo, en los dominios discutidos con respecto a la Figura 5. Los fragmentos de plantilla pueden incluir dominios de dos, o más de dos, de estas proteínas (por ejemplo, como fusiones). La longitud total del fragmento de plantilla puede ser cualquiera que sea apropiada para el ensayo y el fragmento del núcleo de la proteína de enfermedad por agregación que se está usando, pero generalmente será mayor o igual a aproximadamente alrededor de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 aminoácidos de longitud. Sin embargo, en algunas realizaciones puede ser mayor de 100, 200 o incluso 500, si se desea.

Derivados

65 [0046] En todo los casos en los que en este documento se discute una proteína mencionada (por ejemplo,

proteína precursora, de plantilla o de fragmento de núcleo), o una secuencia de un ácido nucleico referida, puede usarse un derivado u otra variante de la correspondiente proteína de referencia (o ácido nucleico) según sea apropiado, siempre que conserve las características apropiadas de la secuencia de referencia. Dichos derivados también compartirán la identidad de secuencia con la secuencia de referencia.

5 [0047] Por ejemplo, la proteína usada puede incluir un N- o C-terminal extendido, extensión que puede ser heteróloga con la secuencia de la proteína. Igualmente, el derivado será uno mediante la inserción, delección o adición de aminoácidos en la secuencia de referencia. Por ejemplo, una proteína tau, o un fragmento de núcleo de tau, derivado comprenderá al menos una secuencia de aminoácidos parcial que se asemeja a la región de repetición en tandem de las proteínas tau, pero en la que uno o más de los aminoácidos de la tau natural o sus fragmentos han sido sustituidos o deletreados, o en la que se han insertado otros aminoácidos.

10 [0048] Dichos cambios pueden realizarse para incrementar o eliminar la actividad de unión (siendo el último caso útil para los experimentos de control). Los controles pueden contener delecciones de secuencias o dominios para ver qué efecto pueden tener sobre la agregación.

15 [0049] Los derivados preferidos pueden ser aquellos que incorporen mutaciones correspondientes a aquellos conocidos o sospechosos de estar asociados con el estado de enfermedad. Éstos pueden incluir cambios correspondientes a P301S dentro de la secuencia de tau (véase la Figura 7). Otras mutaciones incluyen G272V, G389R, P301L, N279K, S305N, V337M, G272V, K280Δ, R406W (véase también Wischik y col., 2000, *supra*).

20 [0050] Otros derivados preferidos pueden incluir repeticiones en tandem de los fragmentos de núcleo y discutidos anteriormente, o dominios de unión dentro de esos fragmentos.

25 [0051] Otros derivados adicionales pueden estar basados en productos químicos basados en múltiples proteínas patológicas relacionadas, en los que sus secuencias se mezclan o combinan. Por ejemplo, podrían ligarse fragmentos de la enzima de restricción de la tau junto con fragmentos de MAP2 o incluso de un gen no relacionado para generar derivados recombinantes. Una estrategia alternativa para modificar los fragmentos del núcleo emplearía una PCR según describen Ho y col., 1989, Gene 77, 51-59 o transposiciones de ADN (Crameri y col., 1998 Nature 391).

Uso de construcciones de ácidos nucleicos

30 [0052] Los ácidos nucleicos de, o para su uso en, el presente procedimiento, pueden proporcionarse aislados y/o purificados a partir de su entorno natural, en una forma sustancialmente pura u homogénea, o exentos o sustancialmente exentos de otros ácidos nucleicos de la especie de origen. Cuando se usa en este documento, el término "aislado" engloba todas estas posibilidades. Los ácidos nucleicos que codifican, por ejemplo, para el fragmento de plantilla, serán al menos parcialmente sintéticos porque comprenderán secuencias de ácidos nucleicos que no se encuentran conjuntamente en la naturaleza (no son contiguas), sino que han sido ligadas o artificialmente combinadas de otro modo.

35 [0053] El ácido nucleico utilizado en el procedimiento puede estar en forma de, o derivar de, ADNc, ARN, ADN genómico y ácidos nucleicos modificados o análogos de ácidos nucleicos. Cuando se especifica una secuencia de ADN, por ejemplo, con referencia a una figura, salvo que el contexto lo requiera de otro modo, se engloba el ARN equivalente, con el U sustituido por T cuando aparezca.

40 [0054] Según se ha descrito anteriormente, los ácidos nucleicos pueden codificar para derivados u otras variantes que comparten homología con las secuencias de referencia en cuestión. Preferiblemente, el ácido nucleico y/o la secuencia de aminoácidos en cuestión compartirán aproximadamente el 50%, o el 60%, o el 70%, o el 80% de identidad, muy preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de la secuencia en la que se basa la variante. La similitud u homología puede definirse y determinarse mediante el programa TBLASTN, de Altschul y col. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10, que es de uso estándar en la materia, o, y esto puede ser preferido, el programa estándar BestFit, que es parte del paquete Wisconsin, versión 8, septiembre de 1994, (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE.UU., Wisconsin 53711) usando los parámetros por defecto. Una fórmula común para calcular las condiciones de rigurosidad requeridas para conseguir la hibridación entre moléculas de ácidos nucleicos con una de secuencia específica es: $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6\log [\text{Na}^+] + 0,41 (\%) \text{ de G+C} - 0,63 (\%) \text{ de formamida} - 600/n^{\circ} \text{ de pb del bicanario}$.

45 [0055] El experto en la materia puede preparar fácilmente las secuencias de ácidos nucleicos que codifican para las proteínas o polipéptidos apropiados usando la información y referencias contenidas en este documento y las técnicas conocidas en la materia (por ejemplo, véase Sambrook, Fritsch y Maniatis, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, y Ausubel y col., Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, 1992). Estas técnicas incluyen (i) el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar muestras del ácido nucleico pertinente, por ejemplo, a partir de fuentes genómicas, (ii) una síntesis química, o (iii) la preparación de secuencias de ADNc.

[0056] Puede generarse un ADN que codifique, por ejemplo, fragmentos de núcleo de la tau y usarse de cualquier forma adecuada conocida por los expertos en la materia, incluyendo tomar el ADN codificante, identificar los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción adecuados en cualquier lado de la porción que se va expresar, y cortar y extraer dicha porción del ADN. Pueden realizarse modificaciones en las secuencias que codifican para la proteína (por ejemplo, tau), por ejemplo, usando mutagénesis dirigida.

Construcciones

[0057] Por tanto, el presente documento proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican las apropiadas proteínas precursoras y de fragmento de plantilla. Como se discute a continuación, éstas pueden estar presentes en construcciones iguales o diferentes constructos, y en el último caso, también se prevén composiciones que comprenden dos o más tipos de construcción.

[0058] Las secuencias de ácidos nucleicos que permiten a un vector replicarse en una o más células hospedadoras seleccionadas son conocidas para varias bacterias, levaduras y virus. Por ejemplo, varios orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para clonar vectores en células de mamífero. Los vectores de expresión que comprenden un ácido nucleico según se describe en este documento pueden estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, cósmido, partícula vírica, fago o cualquier otro vector o construcción adecuada que puedan ser captados por una célula y expresado apropiadamente.

[0059] Los vectores de expresión contendrán un promotor que esté unido operativamente a la secuencia de interés de ácido nucleico que codifica para la proteína, de forma que dirija la síntesis de ARNm. Los promotores reconocidos por diversas células hospedadoras potenciales son bien conocidos. "Unido operativamente" significa conectado como parte de la misma molécula de ácido nucleico, posicionado adecuadamente y orientado para que el promotor inicie la transcripción. El ADN unido operativamente a un promotor está "bajo el control transcripcional" del promotor. La transcripción desde vectores en células hospedadoras de mamíferos es controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir de genomas de virus tales como poliomavirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tales como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B y el virus del simio 40 (SV40), a partir de promotores heterólogos de mamífero, por ejemplo, el promotor de la actina o un promotor de inmunoglobulina, y a partir de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas celulares hospedadores. Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos o células nucleadas de otros organismos pluricelulares) contendrán también las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm.

[0060] El promotor usado para el fragmento de plantilla será "constitutivo". Este promotor puede ser lo suficientemente débil como para que el nivel del fragmento de plantilla expresado en la célula no sea detectable por sí mismo (directamente) usando técnicas convencionales, sino (indirectamente) por su efecto sobre la proteína precursora, dando lugar a la agregación y el procesado proteolítico de la misma (es decir, efectivamente indetectable cuando se inhibe dicha agregación). Dichos promotores pueden ser seleccionados por los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación sin una carga indebida tal como los enumerados anteriormente.

[0061] En el caso de la proteína precursora, el promotor es "inducible" -lo que significa que, y como bien entienden los expertos en la materia, la expresión se "activa" o se incrementa en respuesta a un estímulo aplicado. La naturaleza del estímulo varía entre los promotores. Algunos promotores inducibles provocan unos niveles bajos o indetectables de expresión (o ninguna expresión) en ausencia del estímulo apropiado. Otros promotores inducibles provocan una expresión constitutiva detectable en ausencia del estímulo. Cualquiera que sea el nivel de expresión en ausencia del estímulo, la expresión desde cualquier promotor inducible se incrementa en presencia del estímulo correcto. En los siguientes experimentos se ha usado un promotor inducible Lac.

[0062] Los vectores de expresión también pueden contener uno o más genes de selección. Los genes de selección típicos codifican para proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotrofias, o (c) aportan nutrientes críticos no disponibles en el medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica para la D-alanina racemasa para bacilos. Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son aquellos que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica para la proteína deseada, tal como la DHFR o la timidina cinasa. Una célula hospedadora apropiada, cuando se emplea DHFR natural, es la línea celular CHO deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada según se describe en Urlaub y col., Proc. Natl. Acad Sci EE.UU. 77: 4216 (1980). Un gen de selección adecuado para uso en levaduras es el gen trp1 presente en el plásmido de levadura Rp7 [Stinchcomb y col., Nature, 282: 39 (1979); Kingsman y col., Gene, 7: 141 (1979); Tschemper y col., Gene, 10: 157 (1980)]. El gen trp1 proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC: n° 44076 o PEP4-1 [Jones, Genetics, 85: 12 (1977)].

[0063] Por lo tanto, un vector típico puede incluir un origen de replicación, una o más secuencia(s) de proteína(s) unidas operativamente a un promotor constitutivo o inducible según sea apropiado, una secuencia de terminación de

la transcripción, un elemento potenciador, un gen marcador. La construcción de vectores adecuados que contienen varios de estos componentes emplea técnicas de ligación estándar que son conocidas por el experto en la materia.

Transformación

5 [0064] El presente documento también proporciona un procedimiento para producir una célula estable para uso en un procedimiento según se ha descrito anteriormente, procedimiento que comprende las etapas de: (a) introducir en una célula un ácido nucleico que codifica para (i) un fragmento de plantilla de la proteína precursora tal que el fragmento de plantilla se exprese constitutivamente en la célula a un nivel que no sea tóxico para la célula; y (ii) la proteína precursora tal que la proteína patológica sea expresada de forma inducible en la célula en respuesta a un estímulo.

10 [0065] La introducción, que puede denominarse de forma general sin limitación como "transformación", puede emplear cualquier técnica disponible. Para células eucariotas, algunas técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato cálcico, DEAE-Dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y 15 transducción usando retrovirus u otros virus, por ejemplo, vacunas o, para células de insecto, baculovirus. El tratamiento con calcio que emplea cloruro cálcico, según se describe en Sambrook y col., *supra*, o la electroporación, se usan generalmente para procariotas u otras células que contienen barreras sustanciales de pared celular. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para la transformación de ciertas células 20 vegetales, según describen Shaw y col., Gene, 23: 315 (1983) y el documento WO89/05859 publicado el 29 de junio de 1989.

25 [0066] Para células de mamífero sin dichas paredes celulares, puede emplearse el método de la precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, Virology 52: 456-457 (1978). Los aspectos generales de las transformaciones en sistemas hospedadores celulares de mamífero se han descrito en la Patente de EE.UU. nº 4.399.216. Las transformaciones en levaduras se llevan a cabo típicamente según el método de Van Solingen y col., J. Bact., 130: 946 (1977) y Hsiao y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.), 76: 3829 (1979). Sin embargo, también 30 pueden usarse otros métodos para introducir ADN en células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o policationes, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para las diversas técnicas para transformar células de mamífero, véanse Keown y col., Methods in Enzymology, 185: 527-537 (1990) y Mansour y col., Nature 336: 348-352 (1988).

Células hospedadoras

35 [0067] Las células hospedadoras adecuadas para su uso en los procedimientos y procesos pueden incluir bacterias, células eucariotas tales como células de mamífero y de levadura, y sistemas de baculovirus.

40 [0068] Las líneas celulares de mamífero disponibles en la materia para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de fibroblastos 3T6, células HeLa, células de riñón de cría de hámster, células COS, línea de riñón de mono CV1 trasformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 77: 4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); células tumorales mamarias de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); y muchas otras.

45 [0069] Algunos hospedadores procariotas adecuados incluyen, pero no se limitan a, eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *E. coli*. Hay disponibles públicamente de varias cepas de *E. coli*, tales como la cepa de *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); la cepa de *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) y K5 772 (ATCC 53.635). Algunos microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras también son hospedadores de clonación o de expresión adecuados 50 para vectores. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo hospedador procariota inferior usado habitualmente. La selección de la célula hospedadora apropiada se estima dentro de la experiencia en la materia.

55 [0070] También se proporciona en el presente documento una célula hospedadora que contiene un ácido nucleico heterólogo según se ha descrito anteriormente. El ácido nucleico puede estar integrado en el genoma (por ejemplo, cromosoma) de la célula hospedadora. La integración puede ser promovida por la inclusión de secuencias que promuevan la recombinación con el genoma, según técnicas estándar. Alternativamente, el ácido nucleico puede estar en un vector extracromosómico dentro de la célula, o por el contrario, identificablemente heterólogo o foráneo a la célula.

60 [0071] La célula puede ser producida mediante un método descrito anteriormente (introducción de la construcción de ácido nucleico) o ser el ancestro de dicha célula. También se prevén las correspondientes líneas celulares. Las líneas celulares preferidas pueden basarse en la línea celular de fibroblastos, por ejemplo, 3T6.

65 [0072] Las células hospedadoras transfectadas o transformadas con los vectores de expresión o de clonación descritos en este documento pueden cultivarse en medios nutriente convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, transformantes de selección, o amplificar los genes que codifican para las

secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como medio, temperatura, pH y similares, pueden ser seleccionadas por el experto en la materia sin una experimentación excesiva. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares pueden encontrarse en "Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach", M. Butler, ed. JRL Press, (1991) y Sambrook y col, *supra*.

5 [0073] La expresión génica puede confirmarse de forma directa , por ejemplo, mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción del ARNm [Thomas, Proc. Natl Acad Sci. EE.UU., 77: 5201-5205 (1980)], inmunotransferencia(análisis de ADN), o hibridación *in situ*, usando una sonda marcada apropiadamente, basada en la secuencia de la proteína patológica agregante. Alternativamente, pueden emplearse anticuerpos que puedan reconocer bicatenarios específicos, incluyendo bicatenarios de ADN, bicatenarios de ARN y bicatenarios híbridos ADN-ARN o bicatenarios de ADN-proteína.

10 [0074] La expresión génica puede medirse alternativamente mediante métodos inmunológicos tales como la tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejido, y ensayos de cultivos celulares, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de fluidos de muestra pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden prepararse contra una secuencia natural del polipéptido agregante patológico.

15 [0075] Por lo tanto, los métodos descritos en el presente documento pueden comprender causar o permitir la expresión a partir de los ácidos nucleicos descritos en este documento, por ejemplo, mediante el cultivo de células hospedadoras en unas condiciones para la expresión del gen (presencia de estímulo) de forma que se produzca el fragmento producto.

20 25 *Detección de la agregación y/o del procesado proteolítico y/o del fragmento tóxico*

30 [0076] En varias realizaciones, el progreso del procesado proteolítico o la agregación (o la modulación de los mismos -véase a continuación) puede detectarse directa o indirectamente mediante el seguimiento de la concentración o el nivel de una cualquiera o más de las siguientes especies: la proteína precursora; el fragmento producto; cualquier fragmento subproducto formado durante el proceso; un agregado de cualquiera de estos (por ejemplo, basándonos en los coeficientes de sedimentación).

35 [0077] Por lo tanto, como se ejemplifica con las proteínas y fragmentos de tau en particular (basados en el fragmento 297-351 y la T40), la agregación puede seguirse en base al incremento en los niveles de una especie procesada de 12 kDa, derivado primariamente de la proteína precursora.

40 [0078] Algunos procedimientos para la detección de proteínas se discuten en relación con la expresión génica anterior. Cuando se usan anticuerpos o fragmentos de los mismos en las realizaciones del procedimiento, éstos pueden producirse mediante técnicas convencionales. Los anticuerpos policlonales pueden crearse mediante, por ejemplo, por inyección del correspondiente antígeno de tau en un animal, preferiblemente un conejo, y recuperando el antisuero mediante purificación por inmunoafinidad, en la que el anticuerpo políclonal se hace pasar por una columna a la que está unido el antígeno y después se eluye de forma convencional. Preferiblemente, se utilizan anticuerpos monoclonales que sean selectivos para epítopos de tau que se, pueden preparar por el procedimiento de Kohler y Milstein. Los anticuerpos monoclonales adecuados como epítopos de tau pueden modificarse mediante procedimientos conocidos para proporcionar fragmentos Fab o fragmentos (Fab')2, quiméricos, humanizados o realizaciones de anticuerpos de cadena única.

45 [0079] Los anticuerpos pueden modificarse de varias formas. De hecho, el término "anticuerpo" debe interpretarse como que cubre cualquier sustancia de unión con un dominio de unión con la especificidad requerida. Por lo tanto, el procedimiento puede utilizar fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, incluyendo moléculas sintéticas y moléculas cuyas forma imita a la del anticuerpo, permitiendo que se une a un antígeno o epítopo.

50 [0080] Hablando de forma general, cuando se emplean anticuerpos para la detección, el anticuerpo puede portar una molécula indicadora. Alternativamente, la detección de la unión puede realizarse mediante el uso de un segundo anticuerpo capaz de unirse a un primer anticuerpo no marcado específico de tau. En este caso, el segundo anticuerpo está unido a una molécula indicadora.

55 [0081] Pueden usarse anticuerpos en cualquier sistema de inmunoensayo conocido en la materia, incluyendo, pero no limitándose a: radioinmunoensayos, ensayos en "sándwich", ensayos de enzimoinmunoanálisis de adsorción ELISA); inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, etc. Típicamente se usa un método por inmunotransferencia. Preferiblemente, el inmunoensayo se realiza en fase sólida, como sabría bien el experto en la materia. Por ejemplo, puede adsorberse un anticuerpo a, por ejemplo, una columna de ensayo, y entonces la muestra celular puede lavarse a través de la columna en unas condiciones adecuadas para permitir la unión al anticuerpo en fase sólida de cualquier agregado de la proteína de interés, por ejemplo, un agregado tau-tau. El exceso de reactivos se elimina lavando, y la unión de la proteína agregada a la columna puede detectarse mediante

cualquier medio adecuado, por ejemplo, según se ejemplificó anteriormente y a continuación.

[0082] Los anticuerpos monoclonales preferidos son los siguientes:

- los que reconocen el extremo N o Cdel epítopo de tau permiten medir la unión entre especies truncadas y completas de tau. Son especialmente útiles los anticuerpos que reconocen epítopos específicos humanos. Uno de dichos anticuerpos monoclonales (denominado 27/499) reconoce un epítopo específico humano localizado en la región entre la Gly-16 y la Gln-26 de tau, y permite así la medida de la unión entre las especies de tau completas, siempre que una derive de una fuente no humana (Lai (1995); "The role of abnormal phosphorylation of tau protein in the development of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease", PhD Thesis, Universidad de Cambridge).
- los que reconocen el fragmento de núcleo de tau truncado en la Glu-391. Un ejemplo es mAb 423 (Novak y col. (1993), *loc. cit.*). Este anticuerpo permite la detección de la unión de un fragmento de núcleo de tau truncada o que termina en la Glu-391 a un fragmento similar que termina en la Ala-390, que no es reconocido por mAb 423. Este truncamiento se produce de forma natural en el transcurso de la agrupación de los PHF en la enfermedad de Alzheimer (Mena y col. (1995), (1996), *loc. cit.*; Novak y col. (1993), *loc. cit.*; Mena y col. (1991), *loc. cit.*). Adicionalmente, cuando la tau se une a través del dominio de repetición *in vitro*, la digestión con una proteasa (por ejemplo, pronasa) genera un fragmento detectable mediante mAb 423 (véase Wischik y col. 1996, *loc. cit.*). En los aspectos preferidos del presente procedimiento, en lo que se refiere a la proteína tau, este anticuerpo puede usarse para distinguir la generación del fragmento producto escindido proteolíticamente (terminación Glu-391) a partir de la expresión constitutiva del fragmento de plantilla (Ala-390).
- los que reconocen un epítopo genérico de tau en el dominio de repetición. Una realización preferida utiliza un anticuerpo (por ejemplo, MAbs 7.51). Cuando va a detectarse una agregación tau-MAP2 o MAP2-MAP2, podría usarse un anticuerpo que detecte un epítopo genérico de MAP2. El anticuerpo 7.51 reconoce un epítopo genérico de tau ubicado en la antepenúltima repetición de tau (Novak y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 88, 5837-5841), que está oculto cuando la tau está unida en una configuración inmunoquímica de tipo PHF, pero que puede ser expuesto tras un tratamiento con ácido fórmico (Harrington y col. (1990), (1991), *loc. cit.*; Wischik y col. (1995a), *loc. cit.*). La tau normal soluble, o la tau unida a microtúbulos, puede detectarse usando mAb 7.51 sin tratamiento con ácido fórmico (Harrington y col. (1991), *loc. cit.*; Wischik y col. (1995a), *loc. cit.*). La unión de la tau completa en el ensayo de unión tau-tau está asociada con la oclusión parcial del epítopo mAb 7.51.

[0083] El anticuerpo 27/342 reconoce un epítopo genérico de tau no específico de especie localizado entre la Ser-208 y la Ser-238 que está parcialmente oculto en el transcurso de la interacción tau-tau (Lai, *loc. cit.*).

[0084] Los sitios de unión de algunos anticuerpos monoclonales se muestran en la Figura 6.

35 Cribado de moduladores e inhibidores

[0085] Según se ha descrito anteriormente, el presente documento se refiere preferiblemente al uso de un sistema según se proporciona en este documento, en un procedimiento para modelar e identificar agentes terapéuticos para el tratamiento de las enfermedades discutidas en este documento.

40 [0086] Un procedimiento típico para valorar la capacidad de un agente de modular la agregación y/o el procesado proteolítico de una proteína precursora en un producto en respuesta a una interacción con un fragmento de plantilla puede comprender:

- (a) proporcionar una célula o línea celular estable según se discutió anteriormente,
- (b) someter la célula al estímulo tal que la proteína precursora sea expresada en la célula y mediante lo que la interacción del fragmento de plantilla con la proteína precursora cause un cambio conformacional en la proteína tal que cause la agregación y el procesado proteolítico de la proteína precursora a un fragmento producto,
- (c) seguir la producción del fragmento producto en presencia del agente,
- (d) opcionalmente, comparar el valor obtenido en la etapa (c) con un valor de referencia.

50 [0087] El valor de referencia puede estar basado en la observación histórica, o puede basarse en los experimentos de control llevados a cabo paralelamente, por ejemplo, en los que un integrante del ensayo (fragmento de plantilla, proteína precursora, estímulo, agente) está modificado o ausente.

55 [0088] Los diversos procedimientos descritos anteriormente pueden comprender la etapa adicional de correlacionar el resultado de la etapa (d) con la actividad moduladora del (los) agente(s).

60 [0089] Por lo tanto, un procedimiento para identificar un modulador de la agregación de una proteína asociada con una enfermedad en el que la proteína experimenta una interacción conformacional inducida, puede comprender ejecutar un procedimiento para inducir la agregación, según se ha descrito anteriormente, en presencia de uno o más agentes sospechosos de ser capaces de modular (por ejemplo, inhibir o revertir) la agregación. El grado de agregación (y opcionalmente de procesado proteolítico) puede observarse en presencia o ausencia del agente, y correlacionarse los valores relativos con su actividad como modulador.

65 [0090] Por ejemplo, puede añadirse una sustancia de prueba a un sistema celular según se ha descrito anteriormente, e incubarse las células durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la unión y para

demostrar la inhibición de la unión. Entonces puede detectarse el complejo de tau unido, por ejemplo, usando un anticuerpo marcado adecuadamente, tal como MAb 7.51, en una inmunotransferencia del extracto celular total, o cualquier otro procedimiento de detección adecuado.

5 [0091] Cuando se emplea un procedimiento de cribado para este propósito, es decir, para la identificación de los compuestos moduladores/inhibidores, puede usarse un ensayo no competitivo o competitivo. Por ejemplo, en un ensayo competitivo de un tipo bien conocido en la materia, puede compararse el efecto de un inhibidor o modulador conocido en presencia o ausencia de sustancias de prueba o agentes adicionales, para determinar la capacidad de la sustancia de prueba de competir con el inhibidor/modulador conocido por unirse a la proteína de interés.

10 [0092] También se dan a conocer métodos de producción de moduladores (por ejemplo, inhibidores, que se han descrito anteriormente, pero que comprenden además la etapa de producir el modulador así definido).

Especificidad de inhibición

15 [0093] Pueden usarse los procedimientos de cribado para cribar compuestos que demuestren las propiedades de inhibición competitiva selectiva de la agregación de proteínas relacionadas con enfermedades (por ejemplo, tau-tau, tau-MAP2, u otra unión de proteínas), sin interferir en ninguna unión 'normal' en la que participe la proteína precursora (por ejemplo, tau o MAP2 a tubulina, o por analogía, otras proteínas precursoras con sus compañeros de unión, en la medida en que éstos sean conocidos).

20 [0094] Específicamente, en el caso de tau, un procedimiento para determinar cualquier posible interferencia de la unión de tau, MAP2 o un derivado de las mismas a tubulina por los potenciales inhibidores/moduladores, comprende poner en contacto una preparación de tubulina despolimerizada o microtúbulos de taxol estabilizados con el agente, seguido de la detección de la unión tau-tubulina o MAP2-tubulina. La unión tau-tubulina también podría demostrarse, por ejemplo, mediante una distribución citoesquelética normal, según se describe en, por ejemplo, el documento WO96/30766. Los procedimientos para la preparación de proteínas de tubulina o fragmentos de la misma, posiblemente en combinación con compañeros de unión, son conocidos en la materia y los describen, por ejemplo, Sloboda y col. (1976, en: Cell Mobility (R. Goldman, T. Pollard y J. Rosenbaum, eds.), Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, págs. 1171-1212).

30 [0095] A los expertos en la materia se les ocurrirán procedimientos análogos para otras proteínas con funciones 'patológicas' y 'normales' a la luz de la presente divulgación.

Viabilidad celular

35 [0096] Cuando se deseé, los procedimientos pueden incluir adicionalmente la etapa de ensayar la viabilidad de las células que expresan la proteína de plantilla y opcionalmente la proteína precursora, por ejemplo, mediante el uso de un kit de ensayo de lactato deshidrogenasa (Sigma).

40 [0097] En el caso de que se esté investigando una agregación tau-tau, tau-MAP2 o MAP2-MAP2 (véase anteriormente, en 'especificidad'), esta etapa también puede proporcionar una indicación de cualquier interferencia del agente de prueba en la unión de la tau o la MAP2 a tubulina, dado que la inhibición o la interferencia de la unión tau-tubulina o MAP2-tubulina se correlaciona hasta cierto punto con una disminución en la capacidad de las células para dividirse, y por tanto, con una disminución en la viabilidad celular.

45 [0098] Puede usarse la viabilidad celular para obtener un valor de la DL50 para el agente.

50 [0099] Los inhibidores preferidos tendrán un índice terapéutico (DL50/B50 - véase la discusión de la Figura 9) de al menos 2, 5, 10 ó 20.

Elección del agente de prueba

55 [0100] Los compuestos que se prueben pueden ser cualquiera del que se deseé evaluar su actividad relevante.

60 [0101] Los procedimientos pueden servir como un cribado primario, con objeto de identificar nuevos inhibidores/moduladores, o como cribado secundario con objeto de estudiar con más detalle inhibidores/moduladores conocidos.

[0102] Los agentes pueden ser compuestos químicos naturales o sintéticos. Los anticuerpos que reconocen un agregado de proteínas de tipo enfermedad de Alzheimer y/o que modulan la agregación de proteínas de tipo enfermedad de Alzheimer forman una clase de compuestos inhibidores o moduladores putativos con respecto al proceso de agregación. Más habitualmente, se probarán compuestos químicos relativamente pequeños, preferiblemente que sean capaces de atravesar la barrera hematoencefálica. Otras cualidades que pueden ser deseables para establecer junto con (antes, simultáneamente o después) del uso de la presente invención, incluyen:

no tóxico para la médula ósea, mínimamente perjudicial de la actividad cardiovascular; mínima toxicidad hepática y renal; buena absorción oral; no metabolizado a una forma inactiva, y similares. Como serán conscientes los expertos en la materia, estas pruebas pueden realizarse sobre una base comercial mediante procedimientos bien establecidos para compuestos que se desean probar de esta forma.

5 [0103] Para una sustancia de prueba típica y un modulador putativo, cuando sea posible, se determinará primero la solubilidad, por ejemplo, a partir del índice Merck. Cuando la sustancia sea soluble en disolución acuosa, puede prepararse una disolución madre concentrada, por ejemplo, a 5-20 μM en PBS. Inmediatamente antes de su uso, ésta puede diluirse con medio de cultivo tisular para dar una disolución madre de trabajo a, por ejemplo, 100 μM , e introducirse en células para dar una concentración final de entre 0-10 μM para la mayoría de los compuestos. Naturalmente, si se desea probar compuestos a una concentración mayor de 10 μM , la concentración de la disolución madre de trabajo se incrementará apropiadamente.

10 15 [0104] Cuando la sustancia no sea soluble en disolución acuosa, las disoluciones madre pueden prepararse en un disolvente apropiado (determinado a partir del índice Merck o experimentalmente), por ejemplo, etanol a 5-29 nM. Esta puede diluirse de nuevo con medio de cultivo tisular e inmediatamente antes de su uso para dar una disolución de trabajo, por ejemplo, a una concentración de 100 μM , y añadirse a las células para rendir una concentración final de, por ejemplo, 0-10 μM para la mayoría de los compuestos de prueba. Como anteriormente, si los compuestos se van a probar a una concentración mayor de 10 μM , la concentración de la disolución del trabajo se incrementará según sea apropiado.

20 25 30 [0105] La persona experta apreciará que la cantidad de sustancia o compuesto de prueba que se añade en un ensayo de cribado, y de hecho la forma en que es introducida, puede ser determinada por los expertos en la materia, si fuera necesario mediante el uso de una serie de experimentos. Cuando el compuesto administrado y la línea celular tengan unas condiciones óptimas en conflicto (por ejemplo, en términos de pH, o de fuerza iónica, etc.) deberían ensayarse diversas condiciones para encontrar un nivel de compromiso óptimo. Las concentraciones iniciales pueden elegirse para que estén a un nivel que pueda usarse realmente en un contexto terapéutico, es decir, que no sean letales para un paciente (véanse los comentarios sobre las dosis, a continuación). A la luz de la presente divulgación, dicha metodología no presentará ninguna carga indebida para el experto en la materia.

Cribado de fenotiacinas

35 [0106] También se describen aquí compuestos identificados mediante un procedimiento de cribado tal como se da a conocer aquí y composiciones que comprenden dichos inhibidores/moduladores de polimerización conformacional inducida de una proteína.

40 45 [0107] Según se describe en, por ejemplo, el documento WO96/30766, entre los agentes hallados capaces de inhibir la polimerización conformacional patológica inducida de proteínas tales como tau hay ciertas diaminofenotiacinas. Algunos ejemplos incluyen tales como tionina, azul de metileno (*methylene blue*, MB), cloruro de tolonio y azul de dimetilmeleno (*dimethyl-methylene blue*, DMMB), que son de particular interés como potenciales agentes terapéuticos para su uso en la prevención de la agregación tau-tau en enfermedades tales como la enfermedad de Alzheimer.

50 55 [0108] Curiosamente, tal como se describe en más detalle en los Ejemplos, los presentes inventores han utilizado los métodos descritos en este documento para demostrar que el mecanismo de acción de compuestos tales como MB en polimerización conformacional inducida, tal como la agregación de tau-tau es principalmente de naturaleza estérica. Además, se ha demostrado que el potente efecto inhibidor estérico, por ejemplo, de las diaminofenotiazinas en unión tau-tau, es dependiente del coeficiente de difusión del compuesto. Las diversas implicaciones de estas observaciones en términos del cribado y la formulación de compuestos se discuten en más detalle a continuación.

60 65 [0109] Este hallazgo es particularmente inesperado cuando se considera la descripción de la utilización de dichos compuestos en la técnica anterior. De este modo, por ejemplo, tales compuestos eran conocidos previamente por ser útiles en el tratamiento de la metahemoglobinemía, donde se ha demostrado que su acción está mediada por la reducción catalítica de la hemoglobina oxidadada por transferencia de electrones del suministro intrínseco de la célula de nucleótidos de piridina reducidos (véase, por ejemplo, Hauschild, F. (1936) Arch. Exp. Pathol Pharmacol 182:118; "Pharmacological Basis of Therapeutics", First Edition (1941), Goodman y Gilman; Hrgovic, Z. (1990) Anästhet Intensivther Notfallmed . 25: 172, y Cudd, L. et al (1996) Vet Human Toxicol. 38 (5): 329) y en la profilaxis de psicosis maníaco depresiva (Narsapur, SL (1983) Journal of Affective Disorders 5:155; Naylor, GJ (1986) Biol. Psychiatry 21:915). A pesar de esto, MB, cloruro de tionina y tolonio son en realidad agentes oxidantes intrínsecamente débiles y, en ausencia de un suministro de nucleótidos de piridina reducidos, oxidan proteínas tales como la hemoglobina (Morse, E. (1988) Annals of Clin. Lab. Sci. 18 (1): 13). Este efecto tóxico se puede utilizar para inactivar los virus y, en consecuencia, se ha explotado terapéuticamente MB en un proceso para la eliminación de virus de la hepatitis y el VIH de productos sanguíneos (Chapman, J. (1994), Transfusion Today 20:02; Wagner, SJ (1995) Transfusion 35 (5): 407). Se cree que el mecanismo de acción de este efecto implica la intercalación de MB en el ADN. El compuesto es estimulado a un estado redox superior por fotoactivación y, cuando se baja de nuevo a su estado fundamental, produce un oxígeno singlete que oxida el ADN y lo inactiva (Ben-Hur, E. et al. (1996) Transfusion

Medicine Reviews, Vol. X, N ° 1: 15; Margolis-Nunno, H. et al (1994), Transfusion 34 (9): 802). La explotación del efecto tóxico de diaminofenotiazinas fotoactivadas también se ha sugerido para el tratamiento del cáncer. Dentro de las células, los compuestos que se han fotoactivados a la forma oxidada pueden dañar las mitocondrias (Darzynkiewicz, Z. et al. Cancer Research 48 (1988): 1295) y/o los microtúbulos (Stockert, J. et al (1996) Cancer Chemother. Pharmacol 39: 167).

[0110] Por lo tanto, en la revisión de la técnica anterior, es evidente que se han propuesto dos posibles mecanismos para explicar la acción de los compuestos, tales como MB y tionina, en entidades tales como ADN o proteínas. La primera es la reducción catalítica de, por ejemplo, proteínas oxidadas por medio de la transferencia de electrones de nucleótidos de piridina reducidos en la célula. El segundo mecanismo propuesto es la oxidación, y la consiguiente inactivación de, por ejemplo, ADN por una forma fotoactivada oxidada de compuestos, tales como MB. A la luz de estos dos mecanismos, por tanto, podría asumirse de manera razonable que el efecto inhibidor sobre la asociación de tau-tau de compuestos, tales como MB, también era atribuible a una actividad redox. Es decir, se podría suponer que tales compuestos inhiben la polimerización conformacional inducida, tal como la asociación de tau-tau, al actuar como agentes oxidantes débiles o como agentes reductores catalíticos.

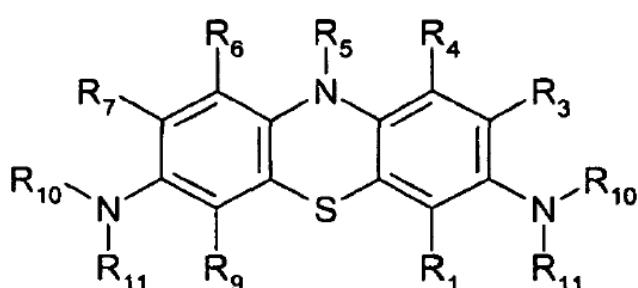
[0111] De este modo, el trabajo de los presentes inventores, en la demostración de que el mecanismo de acción es principalmente de naturaleza estérica, tiene consecuencias inesperadas para la elección, evaluación, formulación y uso de tales compuestos en el contexto de las enfermedades descritas en este documento.

[0112] En particular, ciertos compuestos han sido identificados como agentes terapéuticos viables que habrían sido descartados basándose en el resultado de los ensayos de la técnica anterior. Específicamente, Wischik et al. 1996 (loc cit) describieron en la página 1217 que la concentración de MB necesaria para la inhibición fue mayor que la que podría lograrse clínicamente. Sin embargo, los resultados en este documento muestran que la reducción de MB modifica su capacidad de apilamiento de tal manera que mejora su potencial inhibidor a un nivel en el que se vuelve clínicamente relevante para el tratamiento de, por ejemplo, una enfermedad asociada con la agregación de tau. Esto se discute en más detalle a continuación en relación con la medición de los coeficientes de difusión (que también se determinan, en parte, por la capacidad de "apilarse" del compuesto).

[0113] La figura 8 muestra la estructura de sólo algunos de los compuestos que han sido analizados en el ensayo de base celular. Las figuras 9-16 demuestran la potencia incrementada de ciertos compuestos en forma reducida, más algunos compuestos de control.

[0114] De este modo, en un aspecto de la presente invención se da a conocer la utilización de una diaminofenotiazina en la preparación de una composición de medicamento para utilizar en el tratamiento o la profilaxis de una tauopatía, en la que la preparación comprende la etapa de reducir previamente la diaminofenotiazina, de manera que está presente en por lo menos el 80, 90, 95, ó 99% de la (leuco) forma reducida, y en la que la diaminofenotiazina se reduce previamente mediante la adición de un agente reductor exógeno, y en la que la forma reducida está liofilizada, y en la que la (leuco)diaminofenotiazina reducida previamente tiene la fórmula:

(I)



en la que R1, R3, R4, R6, R7 y R9 se seleccionan independientemente entre hidrógeno, halógeno, hidroxilo, carboxilo, alquilo sustituido o no sustituido, haloalquilo o alcoxi;

R5 es hidrógeno; y cada uno de R10 y R11 se selecciona independientemente entre hidrógeno, hidroxilo, carboxilo, alquilo sustituido o no sustituido, haloalquilo o alcoxi; o es una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

[0115] Preferiblemente, el compuesto es una diaminofenotiazina que tiene 0, 2, 3 ó 4 grupos metilo alrededor del

núcleo de diaminofenotiazina. Preferiblemente, la diaminofenotiazina está metilada asimétricamente (por ejemplo, cloruro de tolonio, azura A, azura B y tionina).

5 [0116] Preferiblemente, el compuesto se selecciona entre azul de metileno, cloruro de tolonio, tionina, Azura A, Azura B o azul de 1,9-dimetilmetileno.

10 [0117] Las fenotiazinas para utilizar en la presente invención se pueden fabricar mediante los procesos referidos en textos estándar (por ejemplo, Merck Manual, Houben-Weyl, Beilstein, E. III/IV 27, 1214 ff, J. Heterocycl. Chem. 21, 613 (1984)).

15 [0118] En lugar de administrar estos compuestos directamente, se podrían administrar en una forma precursora, para la conversión en la forma activa mediante un agente activador producido en las células a tratar o dirigido a las mismas. Por ejemplo, se puede administrar azul de metileno en una forma precursora o puede servir por sí sola como precursor del compuesto Azura A.

15 *Estabilización de la forma reducida*

20 [0119] Algunos de estos compuestos de interés son conocidos por circular en el cuerpo predominantemente en forma reducida. Por ejemplo, para una discusión de la farmacocinética de MB, véase, por ejemplo, DiSanto, A. et al. (1972) Journal Pharm. Sci. 61 (7):1086 y DiSanto, A. et al. (1972) Journal Pharm. Sci 61(7):1090. Se Encuentra que sólo la forma reducida de compuestos, tales como MB, cruza la barrera hematoencefálica (Chapman, D.M. (1982) Tissue and Cell 14(3):475; Müller, T. (1992) Acta Anat. 144:39; Müller, T. (1994) J. Anat. 184:419; Becker, H. et al. (1952) Zeitschrift für Naturforschung 7:493; Müller, T. (1995) It. J. Anat. Embryol. 100(3):179; Müller, T. (1998) Histol. Histopathol. 13:1019).

25 [0120] Referencias tales como éstas ilustran que la forma reducida de compuestos, tales como MB, representa una formulación viable y farmacéuticamente aceptable para la administración a pacientes. El MB se ha utilizado previamente clínicamente en una preparación oral. Sin embargo, se necesitan pruebas toxicológicas adicionales antes de conseguir su aceptabilidad clínica. La semivida de MB y compuestos relacionados (por ejemplo, cloruro de tolonio) en sangre es aproximadamente 100 minutos. Es evidente que las formulaciones de liberación lenta de compuestos con dichas semividas, relativamente cortas, pueden mejorar sustancialmente la disponibilidad del compuesto y, por tanto, la eficacia terapéutica.

35 [0121] La figura 17 muestra que compuestos, tales como los descritos en el presente documento, difieren ampliamente en su grado de reducción en las condiciones del ensayo (aproximadamente: un exceso de DTT 500:1, a 120 minutos). Tal como muestra la figura, la tionina se reduce completamente bajo estas condiciones, el cloruro de tolonio se reduce a un nivel intermedio, y el MB y DMMB se reducen relativamente poco. Las cantidades de reductores utilizados habitualmente requeridas para conseguir, por ejemplo, el 90% de reducción de la forma oxidada en 10 minutos, antes de la administración/absorción pueden no ser viables (por ejemplo, una proporción 2000:1 de DTT con respecto a MB).

40 [0122] Tal como muestra la figura 18, el grado de reducción de MB bajo condiciones fisiológicas se puede acelerar ampliamente al permitir la reducción durante la noche y, a continuación, la liofilización de la forma reducida. El liofilizado se reduce en un 90% en 10 minutos, después de la solubilización en condiciones que mimetizan la acidez gástrica (HCl 5 mM). Las cápsulas que contienen una forma de la diaminofenotiazina reducida previamente con ácido ascórbico a una proporción de mg de 1,5-2 representan una formulación adecuada, si no óptima, para uso terapéutico.

45 [0123] Las mismas consideraciones aplican a otros compuestos, tales como tionina y cloruro de tolonio, que se reducen más fácilmente que el MB, pero el grado de reducción de los mismos, se puede acelerar de una manera tal como la descrita anteriormente.

50 [0124] De este modo, los agentes de fenotiazina de la presente invención se dan a conocer como compuestos reducidos previamente en preparaciones liofilizadas, opcionalmente en presencia de un agente estabilizador.

55 [0125] Un agente para estabilizar la forma preferida del compuesto activo (es decir, una forma del compuesto que tiene un coeficiente de difusión bajo, por ejemplo, la forma totalmente reducida del compuesto) puede ser un agente reductor o antioxidante. El agente puede servir para convertir una forma del compuesto inhibidor (por ejemplo, la forma oxidada) en la forma preferida del mismo (por ejemplo, la forma reducida) y para estabilizar esa forma preferida (por ejemplo, reducida). Alternativamente, el compuesto inhibidor se puede añadir a la composición en su forma preferida (por ejemplo, ya reducida), de manera que el agente sólo sirve para mantener el compuesto en esta forma.

60 [0126] Particularmente adecuado para utilizar en la conversión y/o estabilización de la forma reducida del agente activo (por ejemplo, la diaminofenotiazina) comprendido en las formulaciones de la presente invención es el antioxidante ascorbato. El ascorbato se ha utilizado previamente para minimizar el daño oxidativo de proteínas

(Parkkinen J. (1996), "Thrombosis and Haemostasis" 75(2): 292). Por tanto, una formulación tal como se proporciona en el presente documento podría ventajosamente comprender una diaminofenotiazina, especialmente MB, cloruro de tolonio, DMMB o tionina, en combinación con ascorbato, en proporciones, concentraciones y dosis adecuadas.

5 [0127] En otras realizaciones, la forma (leuco) reducida se puede favorecer mediante la adición o selección de grupos constituyentes apropiados.

10 [0128] De este modo, los aspectos de la invención incluyen además un método de preparación de un medicamento para utilizar en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad tal como se ha descrito anteriormente, cuyo método comprende la etapa de reducir el compuesto (de manera que se reduce por lo menos el 80, 90, 95 ó 99%) y estabilizarlo en una composición liofilizada en la forma reducida, antes de la administración de una dosis apropiada a un paciente con necesidad del mismo.

Dosis de agentes terapéuticos

15 [0129] La administración es preferiblemente en una "cantidad profilácticamente eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" (según sea el caso, aunque la profilaxis se puede considerar como terapia), siendo ésta suficiente para mostrar un beneficio para el paciente. La cantidad real administrada y la velocidad y evolución con el tiempo de la administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de la enfermedad en tratamiento. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones en la dosificación, etc. se encuentra dentro de la responsabilidad del profesional médico y otros doctores, y habitualmente tiene el cuenta el trastorno a tratar, la condición del paciente, el punto de liberación, el método de administración y otros factores conocidos por los médicos.

25 [0130] La penetración del SNC de MB después de la administración sistémica se ha descrito por Müller (1992; Acta Anat. 144:39). Se sabe que Azura A y B aparecen como productos de la degradación metabólica normal del MB (Disanto y Wagner (1972a) J. Pharm. Sci. 61: 598; Disanto y Wagner (1972b) J. Pharm. Sci. 61: 1086). La farmacocinética y la toxicidad del cloruro de tolonio en las ovejas se describe en Cudd et al (1996) Vet Human Toxic 38 (5) 329-332.

30 [0131] Para la tionina, que se ejemplifica específicamente aquí, una dosis diaria entre 1 y 1000 mg puede ser adecuada, preferiblemente dividida en 1 a 8 dosis unitarias, que, por ejemplo, pueden ser de la misma cantidad. Sin embargo, se entenderá que estos límites indicados anteriormente pueden alejarse de cuando se requiera, según sea apropiado con los compuestos de la invención diferentes de tionina, que tengan una actividad superior o inferior de la biodisponibilidad.

35 [0132] La figura 19 muestra la variación de los niveles en tejido de MB frente a la dosis IV.

40 [0133] La farmacocinética del azul de metileno se ha estudiado en humanos, perros y ratas por DiSanto y Wagner, J Pharm Sci 1972, 61:1086-1090 y 1972, 61:1090-1094. Datos adicionales sobre la excreción urinaria en humanos también está disponible en Moody et al., Biol Psych 1989, 26: 847-858. Con la combinación de datos sobre la excreción urinaria del MB en humanos, es posible derivar un modelo general para la distribución del MB siguiendo una dosis única de 100 mg en un sujeto de 70 kg, asumiendo una absorción instantánea (figura 19B). La excreción urinaria representa el 54-98% de la dosis ingerida. Esta variabilidad es muy probablemente debida a la absorción, aunque la variabilidad en el metabolismo no se puede excluir. A partir de los datos de excreción urinaria, es posible calcular que la depuración del organismo completo es de 56 mg/kg/hora. Por lo tanto, la dosis requerida para conseguir una concentración eficaz en el tejido diana de 4 μ M es de 1,73 mg/kg/day (0,58 mg/kg tds) si hubo una absorción completa. Sin embargo, a partir de Moody et al., está claro que la excreción urinaria total y, por tanto, la biodisponibilidad eficaz es por sí misma una función de la dosis. La dosis oral requerida para liberar 1,73 mg/kg/día es aproximadamente 2 veces la dosis calculada en base a la depuración del organismo completo. Por lo tanto, la dosis requerida real es del orden de 3,2 mg/kg/día. Ésta está próxima a la dosis oral mínima de rutina utilizada clínicamente en humanos, por ejemplo, en el tratamiento de la infección crónica del tracto urinario (390 mg/día). La dosis oral de mantenimiento en humano es por tanto de aproximadamente 225 mg/día, ó 75 mg tds. Los niveles máximos de tejido se alcanzan en aproximadamente 1 hora y la semivida del tejido es de aproximadamente 12 horas.

45 [0134] El azul de metileno existe en la forma oxidada azul cargada y la forma de azul de leucometileno reducida incolora no cargada. Se ha demostrado experimentalmente en células que la concentración de tejido diana en las células requerida para evitar la agregación de tau en un 50% (es decir la EC50) es de 4 μ M para azul de metileno reducido y que es la forma leuco que es preferiblemente activa. Se mostró por DiSanto y Wagner (1972) que aproximadamente el 78% del azul de metileno recuperado en orina está en la forma reducida, y a partir de estudios anatómicos después de la administración iv, la única forma que está unida a los tejidos es la forma reducida incolora, que se oxida en el color azul al exponerse al aire después de la disección post-mortem. La única forma de azul de metileno que cruza la barrera hematoencefálica después de la administración iv es la forma reducida (Muller, Acta Anat 1992, 144:39-44 y Becker y Quadbeck, 1952). Por lo tanto, el azul de metileno oralmente absorbido se reduce muy rápidamente en el cuerpo y permanece así hasta la excreción, posiblemente experimentando una

modificación química adicional que lo estabiliza en la forma reducida.

[0135] Es altamente probable que la variabilidad en la absorción oral esté determinada ampliamente por la eficacia de la reducción inicial en el tracto GI. Una manera de conseguir una absorción más fiable es por tanto reducir previamente el azul de metileno con ácido ascórbico. Se ha observado a partir de estudios *in vitro* que esta conversión es bastante lenta, de manera que se tardan 3 horas en conseguir una reducción del 90% del azul de metileno en agua en presencia de una proporción de 2 veces en mg de ácido ascórbico. Por lo tanto, la dosis del azul de metileno que más probablemente asegura una absorción fiable será de 3,5 mg/kg/día de azul de metileno reducido previamente durante por lo menos 3 horas en presencia de 7 mg/kg/día de ácido ascórbico.

[0136] También es posible que el MB pueda ser activo a concentraciones inferiores en el hombre y que el intervalo de dosis clínicamente viables fuera por tanto de 20 mg tds, 50 mg tds o 100 mg tds, combinado con una proporción de 2 veces en mg de ácido ascórbico, de manera que se consiga una reducción de más del 90% antes de la ingestión.

Formulación y administración de los agentes terapéuticos

[0137] Los compuestos adecuados, tales como aquellos con una fórmula tal como se muestra anteriormente o sus sales farmacéuticamente aceptables, se pueden incorporar en composiciones de este aspecto de la presente invención después de analizar adicionalmente la toxicidad. Las composiciones pueden incluir, además de los constituyentes anteriores, excipientes, portadores, tampones, estabilizadores farmacéuticamente aceptables u otros materiales conocidos por los expertos en la materia. Dichos materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del portador u otro material puede depender de la ruta de administración.

[0138] Cuando la composición se formula en una composición farmacéutica, la administración de la misma se puede realizar parenteralmente, tal como por vía oral, en forma de polvo, comprimidos, comprimidos recubiertos, grageas, cápsulas de gelatina dura y blanda, soluciones, emulsiones o suspensiones, por vía nasal (por ejemplo, en forma de pulverizadores nasales) o por vía rectal (por ejemplo, en forma de supositorios). Sin embargo, la administración se puede realizar parenteralmente, tal como por vía intramuscular, intravenosa, cutánea, subcutánea o intraperitoneal (por ejemplo, en forma de soluciones para inyección).

[0139] Cuando la composición farmacéutica está en forma de un comprimido, puede incluir un portador sólido, tal como gelatina o un adyuvante. Para la fabricación de comprimidos, comprimidos recubiertos, grageas y cápsulas de gelatina dura, los compuestos activos y sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden procesar con excipientes inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente inertes. Se puede utilizar lactosa, maíz, almidón o derivados del mismo, ácido esteárico o sus sales, etc, por ejemplo, como dichos excipientes para comprimidos, grageas y cápsulas de gelatina dura. Entre los excipientes adecuados para cápsulas de gelatina blanda se encuentran, por ejemplo, aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semisólidos y líquidos, etc.

[0140] Cuando la composición está en forma de una formulación farmacéutica líquida, incluirá generalmente un portador líquido, tal como agua, mezcla de hidrocarburos, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. También se pueden incluir una solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles, tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Otros excipientes adecuados para la fabricación de soluciones y jarabes son, por ejemplo, agua, polioles, sacarosa, azúcar invertido, glucosa, trehalosa, etc. Los excipientes adecuados para solución para inyección son, por ejemplo, agua, alcoholes, polioles, glicerol, aceites vegetales, etc.

[0141] Los excipientes adecuados para supositorios son, por ejemplo, aceites naturales o endurecidos, ceras, grasas, polioles semilíquidos o líquidos, etc.

[0142] Además, las preparaciones farmacéuticas pueden contener agentes conservantes, solubilizantes, sustancias que aumentan la viscosidad, agentes estabilizadores, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes edulcorantes, agentes colorantes, agentes saborizantes, sales para variar la presión osmótica, tampones o agentes de recubrimiento.

[0143] Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o la infusión intracatéter en el cerebro, el principio activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la materia son capaces de preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos, tales como Inyección de Cloruro de Sodio, Inyección de Ringer, Inyección de Ringer lactada, conservantes, estabilizadores, tampones y/o se pueden utilizar otros aditivos, según sea necesario.

[0144] Una composición según los usos de la presente invención se puede administrar sola, o en combinación con otros tratamientos, ya sea simultáneamente o secuencialmente, dependiendo de la patología o la enfermedad a tratar.

5 [0145] Según la presente invención, las formulaciones proporcionadas en el presente documento se pueden utilizar para la profilaxis o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de neuronas motoras, enfermedad de cuerpos de Lewy, enfermedad de Pick o Parálisis Supraneuclear Progresiva, o cualquier otra patología o enfermedad en que esté implicada la polimerización conformacional inducida de una proteína (véase la figura 5). En particular, tal como se describe en detalle a continuación, la formulación se puede utilizar para el bloqueo, la modulación e inhibición de la asociación de tau-tau patológica.

10 [0146] Ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente se pueden hallar en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 16^a edición, Osol, A. (ed.), 1980.

15 [0147] En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a la utilización de una composición del aspecto anterior, en el pronóstico o tratamiento de una patología en que está implicada la polimerización conformacional inducida de una proteína. La patología puede ser una enfermedad, tal como la enfermedad de Alzheimer.

15 *Utilización de la constante de difusión como cribado*

20 [0148] Tal como se afirma anteriormente, mediante la conversión de un compuesto en su forma reducida y/o su estabilización, se puede optimizar la potencia inhibidora del compuesto.

25 [0149] Sin embargo, tal como se describe con más detalle en los ejemplos siguientes, sorprendentemente, el potencial redox de un compuesto no determina directamente su actividad inhibidora con respecto a la polimerización conformacional inducida de proteínas, y, por tanto, ni el modelo de oxidación ni el modelo de reducción catalítica son relevantes para entender la actividad de compuestos como inhibidores de la agregación de tau-tau.

30 [0150] Los presentes inventores han encontrado que existe una fuerte correlación inversa entre el potencial inhibidor de un compuesto hacia la unión de tau-tau y la potencia al cuadrado o al cubo de su coeficiente de difusión.

35 [0151] El coeficiente de difusión se determina mediante la cantidad de apilamiento de moléculas descargadas en un cátodo. Experimentalmente, ésta se puede evaluar mediante la medición del flujo de corriente en una celda redox en el potencial de reducción. El coeficiente de difusión está correlacionado de forma inversa con el grado de agregación de las especies descargadas (es decir, reducidas) en la capa de Helmholtz que forma el cátodo. Estos agregados se forman mediante interacciones de apilamiento de enlaces pi a través de los sistemas anulares de fenol.

40 [0152] En un modelo, cuanto menor sea el coeficiente de difusión, mayor es la tendencia al apilamiento, y más potente es el compuesto en la inhibición de la polimerización conformacional inducida de proteínas, tales como la unión de tau-tau, tal como se refleja por una K_i baja.

45 [0153] El apilamiento de diaminofenotiazinas puede estar menos favorecida cuando la molécula están en forma oxidadada, ya que esta forma está cargada, y así se puede prever que se repelan entre sí, como las moléculas. Por tanto, este fenómeno puede explicar la mayor eficacia de la forma reducida de las diaminofenotiazinas en la inhibición de la agregación de tau (véase, por ejemplo, la figura 9).

50 [0154] De este modo, la valoración del coeficiente de difusión (que depende de la "capacidad de apilamiento que a su vez depende de la forma y la carga) puede ser una etapa útil en el desarrollo de moduladores eficaces. Uno de dichos parámetros relevantes estéricamente es el coeficiente de difusión que se puede disminuir mediante la disposición de diaminofenotiazinas en su forma reducida.

55 [0155] De este modo, los presentes inventores divulgan en el presente documento que la eficacia de un compuesto en el bloqueo, modulación o inhibición de la polimerización conformacional inducida de una proteína (referida en lo sucesivo como "potencia inhibidora") puede ser analizada en un método de ensayo que incluye la etapa de medir el coeficiente de difusión del compuesto.

60 [0156] La etapa de medir el coeficiente de difusión del agente de prueba se puede incorporar en cualquier etapa de un programa de cribado más amplio para identificar u optimizar posibles moduladores o moduladores ya establecidos. El método más amplio habitualmente incluirá adicionalmente etapas del ensayo tal como se describe en el presente documento, o en la técnica anterior (por ejemplo, WO 96/30766). De este modo, en el último caso por ejemplo, cuando se desean cribar agentes que bloquean, modular o inhibir la agregación de tau-tau, el método puede incluir las etapas de poner en contacto:

- 65 (a) una proteína tau o un derivado de la misma que contiene el fragmento central de tau, con:
 (b) una sustancia a analizar por su capacidad de bloquear, modular o inhibir la agregación de tau-tau; y
 (c) una proteína tau marcada o un derivado de la misma marcada que es capaz de unirse a la proteína tau de la etapa (a) o una proteína tau o un derivado de la misma que es distinta de la proteína tau de la proteína (a) y también es capaz de unirse a la proteína tau de la etapa (a).

[0157] El coeficiente de difusión se puede medir mediante cualquier medio adecuado, por ejemplo, según el método

de Murthy y Reddy (J Chem Soc., Faraday Trans J 1984, 80. 2745-2750). Esta publicación también incluía algunos valores determinados de coeficientes de difusión para colorantes de fenotiazina.

5 [0158] De este modo, el coeficiente de difusión se puede medir de manera adecuada mediante voltametría cíclica en un medio ácido acuoso, por la cual se analiza la magnitud del flujo de corriente en una celda redox en el potencial de reducción del compuesto.

10 [0159] El método puede incluir la etapa de realizar pruebas adicionales en el agente, por ejemplo, para asegurar su especificidad como un inhibidor o modulador de polimerización conformacional inducida de una proteína particular (por ejemplo, tau) o para determinar su aceptabilidad farmacéutica o idoneidad como agente para la administración a un animal.

15 [0160] La divulgación sorprendente dada a conocer en el presente documento de que la eficacia de un agente en el bloqueo, modulación o inhibición de la polimerización conformacional inducida de una proteína es dependiente, por lo menos en parte, del coeficiente de difusión del agente, se puede utilizar en la optimización de la eficacia del agente. Los presentes inventores han establecido que una potencia inhibidora del agente hacia la polimerización conformacional inducida de una proteína está inversamente relacionada con la potencia al cuadrado o al cubo de su coeficiente de difusión. En otras palabras, la potencia inhibidora de un agente se puede optimizar mediante la disposición del agente en una forma en que se minimiza su coeficiente de difusión.

20 [0161] Los aspectos de la invención se entenderán mejor en referencia a las siguientes figuras y datos experimentales, proporcionados únicamente a modo de ejemplo.

Figuras

25 [0162]

Figura 1. Muestra una ilustración esquemática de la estructura de un filamento helicoidal apareado (arriba) y la inmunoquímica de marañas neurofibrilares durante la progresión de la enfermedad de Alzheimer (abajo).

30 Figura 2. Muestra un esquema conceptual en el que los factores de nucleación críticos proporcionan una 'semilla' que inicia la captura de tau, que se convierte entonces en autocatalítica.

35 Figura 3. Muestra un modelo patógeno putativo de la enfermedad de Alzheimer. La agregación de tau es un proceso próximo previo al fracaso en el transporte axonal y la consiguiente muerte neuronal. La cascada de agregación de tau puede desencadenarse bien por un evento de sembrado/nucleación que surge de cambios cascada arriba, o bien a partir de mutaciones primarias en el gen de tau.

40 Figura 4. Muestra cómo la inducción de la tau completa puede conducir a su conversión en el fragmento de 12 kD, siempre que haya algo de tau de 12 kD preexistente en la célula.

45 Figura 5. Muestran una tabla que enumera proteínas que juegan un papel en enfermedades de agregación de proteínas. También se enumeran las propias enfermedades, el dominio de agregación y/o la mutación que se cree que está implicada, y el tamaño putativo (máximo) de la subunidad fibrilar. Se aportan una o más referencias bibliográficas para cada proteína.

Figura 6. Muestra una ilustración esquemática de los sitios de unión de varios anticuerpos monoclonales a diferentes formas de tau truncada en N y C.

50 Figura 7. Muestran la secuencia de nucleótidos y la predicha de aminoácidos de una isoforma de proteína tau humana. La secuencia se dedujo a partir del ADNc del clón htau40.

Figura 8. Muestra las estructuras de tionina, cloruro de tolonio, clorpromacina y tacrina.

55 Figura 9. Aporta datos de ensayos celulares para diaminofenotiacinas, y una antroquinona relacionada estructuralmente, junto con los valores de la KI aparente, determinados según se describe en este documento. En las Figuras y Ejemplos de este documento se ha calculado un parámetro adicional, B50, para expresar la actividad de una forma relacionada directamente con las condiciones del ensayo basado en células, y proporcionar por lo tanto una indicación de la concentración tisular que se requeriría para conseguir la correspondiente actividad *in vivo*.

60 El valor de B50 es la concentración del compuesto de prueba usado en el ensayo celular a la cual la producción relativa de la banda de 12 kD de la tau completa se redujo a un 50% de la observada en ausencia del compuesto. Hay una simple relación lineal entre el valor de la KI aparente y el valor de B50 como sigue:

$$\text{B50 celular} = 0,0217 \times \text{KI}$$

65 [0163] Con objeto de comparar la utilidad relativa de los compuestos como terapia, puede ser deseable

calcular un valor de DL50. Cuando las propiedades inhibidoras son similares, los compuestos preferidos para su uso clínico pueden ser aquellos que tengan el mayor valor de DL50. Puede calcularse un índice terapéutico (RxIndx) para cada uno de los compuestos probados en los ensayos celulares como sigue:

$$5 \quad RxIndx = DL50 / B50$$

[0164] La toxicidad de los compuestos puede medirse mediante las cifras celulares después de 24 h de exposición al compuesto usando un kit ensayo de lactato deshidrogenasa TOX-7 (Sigma Biosciences), según las instrucciones del fabricante, después de lisar las células remanentes. Alternativamente puede usarse un kit de Promega UK (CytoTox 96), de nuevo según las instrucciones del fabricante.

[0165] La Figura 10 muestra los resultados de usar tionina reducida en el procedimiento descrito en el presente documento basándose en un conjunto de datos de 7 experimentos. Los datos celulares observados para la producción de la banda de 12 kD pueden ajustarse adecuadamente (es decir, coeficiente de relación observado frente al predicho > 0,9) a una función estándar que describe la inhibición de la unión tau-tau *in vitro*. Para obtener este ajuste deben realizarse dos suposiciones, que son coherentes con los resultados de otros estudios basados en células e *in vitro*:

- 20 1) la concentración intracelular de tau es de aproximadamente 500 nM;
- 2) la afinidad de unión tau-tau es de 22 nM.

usando estas suposiciones, la función para la actividad celular predicha a través de un modelo de inhibición estándar es:

$$25 \quad Actividad = [tau] / ([tau] Kd * (1 + [tionina] / Ki))$$

puede resolverse mediante procedimientos numéricos convencionales para derivar un valor de la Ki aparente. Según se indica, el valor para la forma reducida de la tionina es 100 nM, que es esencialmente el mismo al observado para la unión tau-tau *in vitro* a una concentración de tau de 500 nM, cuando se sabe que el valor de la Kd para la unión tau-tau es de 22 nM. Por lo tanto, la actividad de la tionina, cuando la lectura es la producción del producto de truncamiento de 12 kD a partir de la tau completa, puede explicarse cuantitativamente sobre la base de la magnitud de la inhibición de la unión tau-tau que se produce a lo largo del dominio de repetición dentro de la célula. Esto confirma que la magnitud de la unión tau-tau determina la producción de una unidad tau del núcleo de los PHF proteolíticamente estable dentro de la célula.

[0166] Todos los análisis celulares posteriores de las actividades de otros compuestos se comunican en el mismo formato estandarizado, con las mismas suposiciones relativas a la concentración intracelular de tau (500 nM) y a la afinidad de unión tau-tau (22 nM) a lo largo del dominio de repetición.

[0167] La Figura 11 muestra los resultados para las condiciones en las que se han omitido los agentes reductores (es decir, tionina oxidada, véase la Figura 10).

[0168] De nuevo, la actividad celular se predice a través de un modelo de inhibición estándar:

$$45 \quad Actividad = [tau] / ([tau] Kd * (1 + [tionina oxid.] / Ki))$$

[0169] En este caso, la tionina tiene ahora un valor de Ki aparente de 1.200 nM. Esto confirma que las diaminofenotiacinas requieren estar en la forma reducida para su actividad. Se extrajo una conclusión similar a partir del análisis de los datos de unión *in vitro* (resultados no mostrados).

[0170] La Figura 12 muestra que usando unas condiciones reductoras o parcialmente reductoras, el azul de metileno parece ser mucho más activo en el ensayo basado en células que el predicho a partir de estudios *in vitro* en los que la duración del ensayo (1-2 horas) no había sido suficiente para conseguir la reducción.

[0171] La actividad celular se predice de nuevo a través de un modelo de inhibición estándar:

$$55 \quad Actividad = [tau] / ([tau] Kd * (1 + [MB] / Ki))$$

[0172] En el ensayo celular, el valor de la Ki aparente para el azul de metileno es de 123 nM, que está en el mismo intervalo que la tionina y el cloruro de tolonio. Según se indica en la Figura 9, la correspondiente concentración de tejido cerebral (es decir, valor de B50) requerida para inhibir la agregación de tau sería de 2-3 µM.

[0173] La Figura 13 muestra los correspondientes datos de actividad basados en células correspondientes al cloruro de tolonio reducido, indicando de nuevo que el valor predicho de Ki derivado de los estudios *in vitro* puede usarse para describir la producción del fragmento de 12 kD a partir de la tau completa en células.

[0174] La actividad celular se predice a través de un modelo de inhibición estándar:

$$\text{Actividad} = [\tau] / ([\tau] K_d * (1 + [TC] / K_I))$$

- 5 **[0175]** Esto proporciona una confirmación adicional de la validez del procedimiento de análisis matemático usado.
- 10 **[0176]** La Figura 14 muestra que la DH12 (antroquinona), que está estructuralmente relacionada con las diaminofenotiacinas, es inactiva en las condiciones del ensayo.
- 15 **[0177]** Las Figuras 15 y 16 muestran análisis similares a los aportados anteriormente en las Figuras 9-14, pero para la clorpromacina y la tacrina respectivamente. Usando las mismas suposiciones (concentración de tau de 415 nM, y Kd de la unión tau-tau de 22 nM), y la actividad celular predicha a través del modelo de inhibición estandar:
- 15 **Actividad = $[\tau] / ([\tau] K_d * (1 + [cpz] / K_I))$**
- 20 los valores de la KI aparente para clorpromacina y tacrina (2.117 nM y 802 nM, respectivamente) son mayores que los anticipados a partir de los estudios *in vitro*.
- 20 **[0178]** La Figura 17 muestra la magnitud de la reducción de varios compuestos en presencia de DTT.
- 25 **[0179]** La Figura 18 muestra el porcentaje de reducción del MB representado frente a la proporción de MB:Vitamina C.
- 30 **[0180]** La Figura 19(a) muestra que, suponiendo una concentración tisular objetivo de 4 μ M (es decir, 1,5 μ g/g), es posible determinar, a partir de los datos de DiSanto y Wagner (1972), que se conseguirían concentraciones tisulares de este orden a una dosis IV de 0,11 mg/kg.
- 30 **[0181]** La Figura 19(b) muestra un modelo para la distribución del MB tras una única dosis de 100 mg en un sujeto de 70 kg, suponiendo una absorción instantánea.
- 35 **[0182]** La Figura 20 resume los resultados de la expresión transitoria de fragmentos de tau en células 3T3 y COS-7 basándose en los datos a partir de experimentos microscópicos y bioquímicos.
- 40 **[0183]** La expresión de los fragmentos de tau recombinante en células eucariotas se realizó como sigue. Se examinaron ocho construcciones de tau, expresados transitoriamente en células 3T3 y en células COS-7 mediante inmunocitoquímica e inmunotransferencias. La magnitud de la expresión en cada tipo celular se expresó semicuantitativamente sobre la base de ambos conjuntos de resultados: -, no hay expresión detectable; \pm , inmunorreactividad muy débil; de + a +++, niveles crecientes de inmunorreactividad positiva. En todos los casos se usó mAb 7.51 con cada construcción para obtener los resultados. Además, se confirmó la especificidad para cada construcción usando un grupo de anticuerpos contra diferentes dominios de la proteína tau (mAbs 499, T14, Tau1, 342, 7.51, 423 y T46). Las secuencias de Kozak estaban ausentes en las primeras seis construcciones, pero estaban presentes en las construcciones de ADNc 7 y 8.
- 45 **[0184]** La Figura 21 ilustra la expresión inducible de la tau humana completa en fibroblastos 3T6 en dos líneas celulares. La T40.22 muestra un bajo nivel de filtración de fondo de la tau completa en el estado no inducido ("U"), y altos niveles de expresión tras la adición de IPTG (es decir, inducida, "I"). La T40.37 muestra lo mismo, pero niveles de expresión menores sin inducción.
- 50 **[0185]** La Figura 22 muestra un resultado de un sistema vector triple. Se introdujo un vector que permite un nivel de expresión constitutiva muy bajo del fragmento de 12 kD en las líneas celulares en las que ya se había conseguido la expresión inducible de la tau completa (de hecho, la línea celular T40.22 mostrada en la Figura 21, más arriba). Se introducen bajos niveles de IPTG para inducir la expresión de la tau completa. A 0 μ M de IPTG, hay un nivel de expresión muy bajo de la banda de 12 kD, y una baja expresión de "filtración de fondo" de la tau completa. Como se induce progresivamente más tau completa introduciendo mayores niveles de IPTG, más tau completa es convertida a la especie de 12 kD.
- 55 **[0186]** La Figura 23 muestra los efectos inhibidores de la tionina reducida. En cada conjunto de bandas, hay una producción inducible de la banda de 12 kD en presencia de concentraciones crecientes de niveles inductores de IPTG de la T40. Al aumentar la concentración de tionina, se suprime la producción de la banda de 12 kD a partir de T40.
- 60 **[0187]** La Figura 24 muestra cuantitativamente los resultados de la Figura 23. En ausencia de tionina, la inducción de la T40 a unas concentraciones crecientes de IPTG conduce a un correspondiente incremento en la producción del fragmento de 12 kD. En presencia de tionina 2 μ M, todavía hay inducción de la T40, pero no es convertida en el fragmento de 12 kD.

[0188] La Figura 25 muestra los valores comparativos de la KI *in vitro* para diversos compuestos, en nM. Los valores de KI se refieren a las condiciones de ensayo en particular usadas (500:1 de DTT:compuesto, 120 minutos - véase en la Figura 17).

[0189] Las Figuras 26 y 27 muestran el efecto inhibidor sobre la unión tau-tau de las fenotiacinas con 0, 2, 3 ó 0, 4, 6 grupos metilo, respectivamente.

[0190] La Figura 28 muestra la derivación de dos parámetros útiles para medir la inhibición de la asociación tau-tau por los compuestos de prueba. STB es la unión estandarizada relativa a la observada en ausencia de compuesto, tomada como la media observada a 1 y 10 μ g/ml. Según se describe en el documento WO96/30766, un valor de STB de 1,0 representa una unión equivalente a la observada en ausencia de compuesto, mientras que un valor de 0,2 indica que la unión se redujo a una media del 20% a las concentraciones del compuesto de prueba de 1 y 10 μ g/ml. La LB50 es el log 10 de la proporción molar compuesto:tau que produce un 50% de la unión tau-tau en comparación con la observada en ausencia de compuesto (B50).

[0191] La Figura 29 muestra la relación entre los parámetros STB y LB50. Puede demostrarse que STB es una función lineal de LB50.

[0192] STB es una función logarítmica de la proporción molar compuesto:tau a la que la unión tau-tau se reduce en un 50%.

[0193] LB50 es el log de la proporción molar del compuesto con respecto a tau a la que la unión tau-tau es el 50% de la observada en ausencia de compuesto

$$\text{LB50} = 0,05 + (2,65 \times \text{STB}) \quad r = 0,95$$

[0194] La determinación de B50 *in vitro* requiere que haya un cierto grado de inhibición de la unión tau-tau, y se obtiene un valor del 50% por extrapolación. La determinación de STB no requiere dicho procedimiento de extrapolación.

La Figura 30 muestra compuestos para los que se han determinado los valores de STB y B50. Suponiendo que la concentración total de tau en las células es de aproximadamente 500 nM (es decir, la concentración de tau usada en el ensayo), los valores de B50 proporcionan una aproximación en el ensayo *in vitro* de la concentración (es decir [500 x B50] nM) a la cual podría esperarse actividad en los sistemas celulares.

La Figura 31 muestra la relación formal entre el valor de LB50 *in vitro* y el valor del log KI para la serie de diaminofenotiacina.

La figura 32 muestra la relación entre el número de grupos metilo en una diaminofenotiazina (NMETH) y el potencial redox (E) y el coeficiente de difusión (DIF). Las figuras en cursiva indican los valores de los coeficientes de correlación (R) y p después de la exclusión de MB.

La figura 33 muestra la relación entre el porcentaje de compuesto que se reduce, determinado experimentalmente, y el potencial de reducción conocido del compuesto. El potencial de reducción predice el grado observado de reducción de las diaminofenotiazinas.

La figura 34a muestra que no existe una relación clara entre la potencia inhibidora y el grado de reducción de compuestos.

La figura 34b muestra que la potencia inhibidora no se determina simplemente mediante el potencial de reducción.

La figura 35 muestra que la potencia inhibidora puede estar relacionada directamente con el coeficiente de difusión (que es una medición de la tendencia de la forma reducida por apilarse y agregarse).

Las figuras 36 y 37 muestran las relaciones previstas entre los valores estimados de LB50 ("ESTLB50") y STB ("ESTSTB"), respectivamente, y el potencial de reducción y el coeficiente de difusión, en que al coeficiente de difusión se le da el mayor peso.

La figura 38 muestra la estructura cristalina del azul de metileno.

La figura 39 muestra la unión de tau-tau en presencia de DTT 1 mM, medida en el ensayo en fase sólida del documento WO 96/30766. Se utilizaron dos anticuerpos diferentes para detectar la unión de tau-tau, en concreto el mAb 342 (parte superior) y 499 (parte inferior). El eje vertical representa la unión de tau-tau, el eje horizontal muestra la concentración de tau de longitud completa en la fase acuosa y la llave muestra concentraciones variantes de tau

en fase sólida. Tal como se puede observar, la unión de tau-tau también tiene lugar en presencia de DTT.

La Figura 40 muestra varias especies de fragmentos y dobletes de tau que están presentes sin inducción ("U") y después de la inducción ("I") en una línea celular descrita en el presente documento. Estas incluyen especies con unas movilidades equivalentes a 12/14 kD, ~25/27 kD, ~30/32 kD, ~36/38 kD and ~42/44 kD (véase el Ejemplo 3).

La Figura 41(a) muestra cómo surge el fragmento de 12 kD a través del procesado proteolítico inducido por la plantilla de las moléculas de tau completas en las posiciones aproximadas mostradas por las cabezas de flecha.

10 La Figura 41(b) muestra cómo surge la especie de 25/27 kD a través del procesado proteolítico inducido por la plantilla de las moléculas de tau completas en las posiciones aproximadas mostradas por las cabezas de flecha.

La Figura 42 muestra una representación de las movilidades en gel aparentes de las especies de las Figuras 40-41 y sus longitudes en restos de aminoácidos.

15 La Figura 43 muestra que los fragmentos de las Figuras 40-42 están a intervalos de ~34 restos o de ~17 restos, lo que es el equivalente de una única repetición de tau, o a la mitad de ella. Todos los fragmentos pueden generarse a partir de un agregado heptamérico básico como un conjunto simple de escisiones proteolíticas que se producen en las posiciones indicadas por las puntas de flecha.

20 La Figura 44 muestra estos mismos fragmentos en orden descendiente de longitud y creciente de movilidad en gel.

La Figura 45 muestra que el DMMB es sorprendentemente potente en el modelo celular. Su actividad inhibidora podía observarse tanto en ausencia de inducción por IPTG como después de la inducción (véase el Ejemplo 4).

25 La Figura 46 muestra la actividad del DMMB en la expresión inicial de las especies de 12/14 kD, usando el mismo conjunto de suposiciones relativas a la concentración intracelular de tau y a la afinidad de unión tau-tau *in vitro* usadas en las figuras 10 - 16.

30 [0195] La actividad celular se predice a través de un modelo de inhibición estándar:

$$\text{actividad} = [\text{tau}] / ([\text{tau}] \text{ Kd} * (1 + [\text{DMMB}] / \text{Ki}))$$

[0196] El DMMB tiene una Ki aparente dentro de la célula de 4,4 nM, y el valor celular de B50 es ~100 nM.

Ejemplos

Materiales y procedimientos generales

40 *Producción de líneas celulares 3T6H*

[0197] Las células 3T6 fueron ECACC nº: 86120801, fibroblastos de embrión albino de ratón suizo.

45 [0198] Para el sistema inducible, los experimentos emplearon Lac Switch™ de Stratagene, usando el vector p3'SS para expresar la proteína represora Lac, y pOPRSVICAT para expresar la tau completa bajo el control del represor Lac. La expresión es inducida mediante la adición de IPTG.

50 [0199] Inicialmente se transfecaron células 3T6, mediante electroporación, con el plásmido p3'SS, y se seleccionaron las colonias por su resistencia a higromicina. Se escogieron 5 clones que estaban expresando niveles variables de la proteína represora Lac (determinados mediante inmunocitoquímica), y también se conservaron las células no clonadas para comparación.

Producción del vector pOPRSVT40

55 [0200] La inserción de la T40 para su clonación en el vector pOPRSVICAT se preparó mediante PCR con polimerasa Vent (NEB) usando cebadores (mostrados a continuación) que incluían un sitio Not I y un codón de inicio o de detención, según fuera apropiado. El producto de la PCR y el vector pOPRSVICAT se cortaron con Not I y se purificaron. El vector se desfosforiló para impedir una religación, y la inserción se ligó en el vector usando protocolos estándar.

60 [0201] La mezcla de ligación resultante se transfeció en células competentes de *E. coli*, y las células se colocaron en placas con amp. Las colonias se escogieron y se cuadricularon en una nueva placa con amp. Las colonias transferidas se llevaron a una membrana de nailon Hybond-N de 0,45 µm (Amersham), y los posibles positivos se seleccionaron mediante hibridación de colonias usando dGA marcado con ($\alpha^{32}\text{P}$)dCTP (Amersham) (usando un kit de oligomarcaje (Pharmacia Biotech) y purificado en una columna Nap-10 (Pharmacia Biotech)). La hibridación se lleva a cabo a 65°C durante la noche en tampón de Church, seguido por dos lavados de 20 min con

disolución de lavado de Church. Las colonias positivas, marcadas con la sonda radiactiva, se detectaron exponiendo las transferencias a una película de rayos X durante la noche a -70°C.

5 [0202] Las colonias positivas se seleccionaron y se hicieron crecer, y después se comprobaron mediante PCR y una digestión de restricción para confirmar la presencia de la inserción. El uso de un único sitio de restricción para la clonación significa que la T40 puede insertarse en el vector en cualquier orientación. La orientación de las inserciones se determinó de forma que se seleccionaran las colonias con el vector contenido a la T40 en la orientación correcta para su expresión.

10 Cebadores usados

[0203]

15 5'-3' T40-Not I

inicio

5' -gtc gac tct aga ggc ggc cgc ATG GCT GAG CCC CGG CAG GAG-3'

Not I

20 3'-5' T40- Not I

detención

5' -act ctt aag ggt cgc ggc cgc TCA CAA CAA ACC CTG CTT GGC CAG -3'

Not I

25 [0204] La secuencia complementaria de la secuencia T40 se muestra en mayúsculas, estando marcados los codones de inicio y de detención. El sitio Not I que se va a añadir se muestra subrayado. La secuencia remanente mostrada en minúsculas es un saliente de 13 pares de bases para permitir que la enzima Not I corte eficientemente. Esta era complementaria de la secuencia en el vector del plásmido hTau40 para permitir una unión eficiente de los cebadores.

Determinación de la orientación de la inserción

30 [0205] La orientación se determina usando una enzima de restricción que corta la inserción una vez y el vector como mucho unas pocas veces, y que proporciona un patrón de digestión de restricción diferente para cada orientación. La Hind III se ajusta a estos criterios para pOPRSVT40. Si la inserción está ausente, se producen dos bandas de restricción. Si la inserción está presente se producen tres bandas, y el tamaño de las bandas depende de la orientación de la inserción, según se muestra a continuación.

	Orientación directa (correcta)	5385 pb 1030 pb 381 pb
35	Orientación inversa	6101 pb 381 pb 314 pb

Producción de células que expresan la T40 bajo el control de un promotor inducible

40 [0206] El plásmido pOPRSVT40 se produjo y se purificó mediante centrifugación en gradiente de CsCl. Se transfeció (mediante electroporación) en células 3T6H (que expresaban la proteína represora Lac) producidas según se ha descrito anteriormente. Las células positivas se seleccionaron por su resistencia a G418 (a 500 µg/ml). Las colonias resistentes se escogieron y se hicieron crecer. El nivel de expresión de la T40 completa con y sin la adición de IPTG se determinó con anticuerpos anti-tau tanto por inmunocitoquímica como por inmunotransferencia Western.

45 Producción de pZeo295-391

50 [0207] El plásmido pZeo295-391 se diseñó para expresar la proteína correspondiente al fragmento truncado de tau (restos 295-391; véase a continuación). Se usó un sistema constitutivo (pcDNA3.1 de Invitrogen, Holanda) - el plásmido proporciona resistencia al antibiótico zeocina. El ADNc de esta región se amplificó mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando cebadores oligonucleotídicos específicos (sentido y antisentido; véase a continuación). El cebador sentido contenía un sitio EcoRI, y el antisentido un sitio BamHI. Los fragmentos se subclonaron en pcDNA3.1 (-)zeo (Invitrogen, Holanda) que había sido digerido con EcoRI y BamHI. El ADN insertado está secuencia en dirección 3' de una secuencia promotora de citomegalovirus y en dirección 5' de una señal de poliadenilación. El plásmido contiene la secuencia de ADN para la expresión de resistencia a ampicilina y zeocina para la selección en bacterias y células eucariotas, respectivamente. La autenticidad del ADN insertado fue confirmada mediante una secuenciación completa de ambas hebras.

55 [0208] Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del fragmento de tau truncada 295-391

gataatatcaaacacgtcccgaggcggcagtgtcaaatagttctacaaaccagttgacctgagca
aggtgacctccaagtgtggctcattaggcaa

catccatcataaaccaggaggtggccaggtggaaagtaaaatctgagaagcttgcattcaaggacaga
gtccagtcgaagattgggtccctggacaatat

cacccacgtccctggcggaggaaataaaaagattgaaacccacaagctgacccggcgagaacgcc
aaagccaagacagaccacggggcggag

DNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKFDRVQSKIGSLDNIT
HVPGGGNKKIETHKLTFRENAAKTDHGAE

295 cebador sentido

met asp²⁹⁵

5' - CGG AAT TCC ACC ATG GAT AAT ATC AAA CAC GTC CCG - 3'

EcoRI

391 cebador antisentido

detención glu ³⁹¹

5' - C GCG GGA TCC TCA CTC CGC CCC GTG GTC TGT CTT GGC - 3'

BamHI

5 [0209] Los codones de inicio y de detención están en cursiva, y los sitios de restricción EcoRI y BamHI que se van a añadir están subrayados.

10 Cultivo tisular de células para ensayo

[0210] El medio usado era DMEM (con Glutamax I, piruvato, 4,5 g/l de glucosa) de Life Technologies, Escocia. Éste fue complementado con FCS al 10% (Helena BioSciences), 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina, más un antibiótico adicional apropiado para la selección y el mantenimiento del plásmido pertinente. Las concentraciones de antibiótico eran 200 µg/ml de higromicina (selección y mantenimiento de p3'SS), 500 µg/ml de G418 (selección y mantenimiento de pOPRSVT40), 400 ó 200 µg/ml de zeocina (selección o mantenimiento de pZeo295-391).

20 [0211] Las células se hacen crecer a 37°C, en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. Las células se mantienen en placas de 10 cm, y se separan cuando se aproximan a confluencia. El medio se retira, las células se lavan con PBS y las células liberadas mediante tripsinización con 1 ml de disolución de tripsina/EDTA/plato de 10 cm. Las células se resuspenden en medio nuevo a una dilución de 1:10, u opcionalmente en un intervalo de diluciones desde 1:5 hasta 1:20 (desde aproximadamente 5.000 hasta 20.000 células/cm²).

25 [0212] Para la prueba de fármacos, las células se colocan en placas de 6 pocillos o de 24 pocillos a una densidad inicial que les permitirá crecer hasta una confluencia del 50-80% en 24 horas. Los fármacos se añaden al pocillo a diversas concentraciones, la expresión de la tau completa es inducida mediante la adición de IPTG a 0 - 50 µM. Las células se hacen crecer durante 24 horas adicionales y después se recogen para su análisis mediante SDS PAGE/transferencia Western.

30 Preparación de la proteína tau

[0213] Se prepararon tau recombinante (clon htau40) y tau soluble en ácido perclórico extraídas de cerebro humano y de rata, según se ha descrito previamente (Goedert, M. & Jakes, R. (1990) EMBO J. 9: 4225; Goedert, M. y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 5066).

5 *Electroforesis en gel e inmunotransferencia*

[0214] Las células crecidas según se ha esquematizado anteriormente se lavan una vez con PBS y después se lisan con 50 µl (placas de 24 pocillos) o 100 µl (placas de 6 pocillos) de tampón laemli. Las muestras se almacenan a -20°C, se hierven durante 4 min antes de revelarlas en geles de acrilamida al 15% usando el sistema de mini gel BioRad miniProtean III. La proteína se transfiere a una membrana de PVDF mediante transferencia Western usando el sistema tamponante CAPs. Las membranas se incuban en tampón de bloqueo (5% de polvo de leche desnatada (Marvel), 0,1% de Tween 20 en PBS) durante 1 h hasta toda la noche. La proteína tau se detecta incubando las membranas con mAb 7.51 diluido a 1:5 con tampón de bloqueo durante 1-3 h o durante la noche, lavando bien con PBS/Tween20 al 0,1%, incubando con HRP anti-ratón a una dilución de 1:5.000 en tampón de bloqueo durante 1 h, y lavando bien con PBS/Tween20 al 0,1%. El anticuerpo unido se detecta mediante una reacción de ECL detectada sobre hiperfilm de ECL (Amersham).

[0215] Las transferencias se escanean a un ordenador con un escáner de mesa Hewlett Packard Scanjet 6100C a 600 dpi y se guardan como archivos tiff. La densitometría de las bandas de T40 y dGAE se realiza con el programa Scananalysis en un Apple Power Mac G3.

Preparación de los fármacos

[0216] Tiamina, azul de metileno, DMMB y cloruro de tolonio se prepararon todos como una disolución madre 1 mM en ddH₂O. Antes de su uso, se prepara una disolución madre diluida 100 µM en HBSS que se añade directamente al medio sobre las células.

[0217] Para el fármaco oxidado, éste se prepara simplemente diluyendo la disolución madre 1 mM en HBSS y realizando una filtración esterilizante.

[0218] Para el fármaco reducido, la disolución 1 mM se trata con ácido ascórbico y DTT para rendir el fármaco 0,5 mM, ácido ascórbico 50 mM y DTT 50 mM, esto se deja reposar durante 15 min (cambia de azul a incoloro) antes de preparar la disolución madre diluida. Esto se diluye en HBSS para rendir el fármaco 100 µM, ácido ascórbico 10 mM, DTT 10 mM y se realiza una filtración esterilizante. Las células se tratan con el fármaco a diversas concentraciones, pero para el fármaco reducido se mantienen las concentraciones de ácido ascórbico y DTT a 400 µM de principio a fin usando las cantidades apropiadas de disolución madre reducida 100 µM, disolución madre oxidada 100 µM y disolución madre de ácido ascórbico/DTT 10 mM.

Electroforesis en gel-SDS e inmunotransferencia

[0219] Los procedimientos estándar de electroforesis e inmunotransferencia se usaron según se ha descrito previamente (Wischik, C. M. y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85: 4506; Novak, M., y col. (1993) EMBO J. 12: 365; Jakes, R. y col. (1991) EMBO J. 10: 2725). Las inmunotransferencias se revelaron con el kit ABC (Vector Laboratories). Los anticuerpos monocionales (mAbs) 7.51, 21.D10, 499 y 342 se usaron como fluido del sobrenadante del cultivo de hibridoma sin diluir. Se usó mAb AT8 (Innogenetics, Bélgica) a una dilución de 1/1.000. mAbs anti-tau 7.51 (que reconoce un epítopo en la última repetición; véase Novak, M. y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 88: 5837), 423 (que reconoce una tau trunca C-terminalmente en el residuo Glu-391; véase Wischik, C. M. y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85: 4506; Novak, M. y col. (1993) EMBO J. 12: 365), 499 (que reconoce un segmento de tau específico humano entre los restos Gly-14 y Gln-26; véase Wischik, C. M. y col. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93: 11213), y 342 (que reconoce un segmento entre los restos Ser-208 y Pro-251). El mAb 21.D10 se enfrentó al extracto cerebral A68-tau (Lee, V. M.-Y. y col. (1991) Science 251: 675).

Ensayo de unión de tau

[0220] Esto se llevó a cabo básicamente según se describe en Wischik, C. M., y col. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93: 11213. La tau en fase sólida (0-20 µg/ml) se recubrió en placas de microvaloración de 96 pocillos de cloruro de polivinilo con un tampón de carbonato 50 mM a 37°C durante 1 h. La placa se lavó dos veces con Tween 20 al 0,05%, y después se bloqueó con Marvel al 2% en PBST durante 1 h a 37°C. Después de lavar de nuevo, la placa se incubó durante 1 h a 37°C con tau en fase acuosa (0 - 300 µg/ml en PBST que contiene gelatina al 1%). En la presente solicitud también se añadió DTT 1 mM.

[0221] La placa se lavó dos veces y se incubó durante 1 h a 37°C con los mAb 499 ó 342, se diluyó con un volumen igual de Marvel al 2% en PBST. Después de lavar, se incubó anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante (1/1.000 en PBST) durante 1 h a 37°C. La placa se lavó y se incubó con disolución de sustrato que contenía tetrametilbencidina y H₂O₂ y se midió el índice de cambio en la absorbancia medida usando una lector de placas V_{max} (Molecular Diagnostics, California) según se ha descrito

previamente (Harrington, C. R. y col. (1990) J. Immunol. Meth. 134: 261). Cada experimento se realizó por triplicado e incluyó controles en los que estaban ausentes la tau en fase sólida y en fase acuosa, y también con una de las dos ausentes.

5 Análisis de datos

10 [0222] Esto se realizó según se describe en Wischik y col. (*supra*), y las curvas se ajustaron según la ecuación de Langmuir con los programas Kaleidagraph (Synergy, Filadelfia) o Systat (SPSS Inc., Chicago) usando una aproximación cuasi-newtoniana. Los coeficientes de correlación del ajuste de las curvas se proporcionan en las Figuras.

Ejemplo 1 - expresión constitutiva de la tau completa, truncada y mutada

15 [0223] Se postuló que la expresión de la tau en líneas celulares eucariotas generaba un modelo celular de agregación de tau en condiciones fisiológicas que no adolecía de las limitaciones de las metodologías basadas en la lipofectina. Esto implica la expresión de tau completa y fragmentos de tau truncada tanto para tau normal como para tau portadora de mutaciones patógenas.

Tau completa

20 [0224] Cuando se transfeció tau completa normal (T40) en células (3T3 y NIE-115), se expresó y se implicó en la agrupación de la red de microtúbulos dentro de las células.

Tau truncada

25 [0225] Inicialmente se transfeció el ADNc del fragmento de tau truncada del núcleo de los PHF, correspondiente al fragmento 297-391, en fibroblastos 3T3 no neuronales: fue seleccionada esta tau truncada dado que: (i) está presente en el núcleo de los PHF; (ii) se detecta en forma de depósitos en tejido cerebral de la AD durante las etapas tempranas de la enfermedad; (iii) es capaz de soportar la captura catalítica y la propagación de la captura de la tau *in vitro*. Subsiguentemente se realizó una serie de transfecciones en las que se varió la magnitud del truncamiento en los extremos N o C, basada parcialmente en las propiedades inmunoquímicas de la molécula de tau. Se crearon seis construcciones con truncamientos en los N-terminales (186-441; 297-441), en los C y N-terminales (186-391; 297-391) y en el C-terminal (1-391). El patrón de inmunorreactividad de las seis construcciones con un grupo limitado de anticuerpos fue capaz de discriminar todos los fragmentos de tau generados de este modo.

35 [0226] Las construcciones se expresaron en células eucariotas transitoriamente (usando pSG5 como vector) y establemente (usando pIF2 y pZeo como vectores). Los transfectantes estables se seleccionan sobre la base de resistencia a los antibióticos genética y zeocina para pIF2 y pZeo, respectivamente. El análisis de los epítopos se realizó sobre proteínas expresadas bacterialmente usando pRK172 como vector. La Figura 20 resume los resultados para diversos fragmentos en células 3T3 y COS-7. Los resultados adicionales mostraron que la expresión de las dos formas de la tau en la misma célula puede afectar al patrón de inmunorreactividad. Por ejemplo, la expresión estable de 1-391 y 295-391 da como resultado la aparición de manojos anormales dentro de la célula. Sin embargo, mantener dichas células en un estado estable y reproducible fue difícil.

45 *Tau mutada*

50 [0227] Se usó una mutagénesis de la tau completa para generar mutaciones clínicas conocidas. Estas fueron subclonadas en pIF2 y se generaron transfectantes estables en células 3T3 y NIE para varias de las mutaciones, incluyendo aquellas que afectaban a las propiedades de agrupación en microtúbulos de tau (G272V, V337M, P301S, R406W) y S305N, lo que afecta al empalme alternativo del gen de la tau *in vivo*. En general, las células que expresaban la tau completa portaban mutaciones que mostraban el marcaje de la red de microtúbulos, y eran indistinguibles de las células transfectadas con la tau natural. Las líneas celulares que expresaban ciertos fragmentos de tau truncada incluían mutaciones que mostraron ser inestables.

55 *Conclusión*

60 [0228] En resumen, la expresión constitutiva de tau truncada en células eucariotas demostró ser difícil de conseguir. Aunque los sistemas de transfección transitoria permitían la optimización de la expresión de tau mediante la manipulación de los consensos de Kozak que rodean al codón de iniciación de 297-tau, la expresión de, por ejemplo, 297-391, todavía era modesta, sugiriendo algunas propiedades tóxicas inherentes del fragmento. Las transfecciones estables reiteraban esta conclusión. Este último sistema demostró que el truncamiento en los N o C-terminales dio como resultado una propensión ligeramente mayor de la tau para agruparse en depósitos amorfos en lugar de en una red microtubular. La expresión estable de combinaciones de fragmentos de tau también genera agregados dentro del citoplasma de las células, pero este sistema no era fácilmente reproducible.

Ejemplo 2 - expresión inducible de tau truncada

[0229] En un intento adicional de crear un sistema estable y reproducible sin la toxicidad asociada a la expresión constitutiva, se intentó una expresión inducible del fragmento de la tau del núcleo de los PHF (es decir, 297-391 - que es de 12 kD).

[0230] Se intentaron varios sistemas inducibles para la expresión de proteínas en células eucariotas, aunque el sistema preferido fue el sistema "lac switch". En este sistema se incorporan dos vectores en las células, típicamente fibroblastos 3T3 o 3T6 que no expresan ninguna proteína tau endógena. El primero, el vector p3'SS, codifica para la expresión constitutiva del gen *lac I*, y los expresores se seleccionan sobre la base de resistencia a higromicina. El segundo, pOPRSVICAT, incorpora el ADN que codifica el fragmento de la proteína tau bajo el control de un fuerte promotor RSV que contiene las secuencias de operador del operón Lac. Las células que incorporan este vector se seleccionan sobre la base de resistencia a neomicina. Las células que han incorporado ambos vectores tienen la propiedad de que la expresión constitutiva de *lac I* impide la expresión de la proteína incorporada (es decir, la tau) controlada por el operón Lac. La adición del azúcar IPTG compite por la unión del *lac I* al operón Lac, y por lo tanto permite la expresión de la proteína tau.

[0231] Se llevó a cabo la expresión inducible del fragmento de 12 kD en dos líneas celulares. Éstas no mostraron unos niveles apreciables de expresión de proteína tau hasta después de 3 días de tratamiento con IPTG, etapa en la que aparecieron de repente altos niveles de 12 kD, formándose agregados intracelulares que rápidamente destruyeron la célula. El proceso de agregación fue, como se esperaba, una progresión no lineal desde un bajo nivel de expresión hasta una acumulación repentina de agregados tóxicos sin ninguna gradación clara, haciendo que la agregación y la toxicidad fueran imposibles de controlar. Esta progresión no lineal impidió un control apropiado del sistema.

Ejemplo 3 - Expresión de tau en líneas celulares estables

[0232] A la vista de los resultados anteriores, se usó un sistema adicional como sigue. La línea celular de cultivo tisular DH 19.4.1.4 y los clones de la misma se basaron en células 3T6 (ECACC nº 86120801 fibroblastos de embrión albino de ratón suizo) que expresaban cuatro repeticiones de la tau humana completa bajo el control de un promotor inducible, y una tau humana truncada (295-391) bajo el control de un promotor constitutivo.

[0233] Las células que expresan la T40 bajo el control de un promotor inducible, T40.22.10, fueron transfectadas (mediante lipofección) con el plásmido pZeo295-391. Las células positivas fueron seleccionadas por su resistencia a zeocina a 400 µg/ml. La expresión de la tau truncada sobre un trasfondo de expresión inducible de la tau completa fue confirmada mediante un análisis por inmunotransferencia Western con Mab 7.51.

[0234] La Figura 21 ilustra la expresión inducible de la tau humana completa sólo en fibroblastos 3T6 en dos líneas celulares. T40.22 muestra un bajo nivel de filtración de fondo de la tau completa en el estado no inducido ("U"), y altos niveles de expresión tras la adición de IPTG (es decir, inducido, "I"). T40.37 muestra lo mismo, pero menores niveles de expresión sin inducción. La Figura 22 muestra los resultados de un sistema vector triple. Se introdujo un vector que permite un nivel de expresión constitutiva muy bajo del fragmento de 12 kD en las líneas celulares en las que ya se había conseguido la expresión inducible de la tau completa (T40.22 mostrada en la Figura 21). La Figura 22 muestra lo que sucede cuando se introducen bajos niveles de IPTG para inducir la expresión de la tau completa. Con 0 µM de IPTG hay un nivel de expresión muy bajo de la banda 12 kD, y una baja expresión de "filtración de fondo" de la tau completa. Como se induce progresivamente más tau completa introduciendo unos niveles mayores de IPTG, más tau completa es convertida en la especie de 12 kD, y se producen más fragmentos intermedios de mayor peso molecular (descritos con más detalle en las figuras 43 y 44).

[0235] El examen de la línea celular inducible T40 original (T40.22.10), que no contenía el vector de la expresión constitutiva del fragmento de 12 kD, muestra que la especie de 12 kD no es producida como un subproducto del truncamiento de la inducción de la tau completa. El incremento en la expresión de la banda de 12 kD tras la inducción de la T40 sólo se observó en las células con un bajo nivel de expresión previa del fragmento de 12 kD (DH19.4.1.4.6). Esto es, el 12 kD preexistente proporciona un plantilla para la producción de más 12 kD tras la inducción de la tau completa. También puede aparecer un doblete adicional con una movilidad aparente en gel de 25/27 kD cuando las células están en un estado no inducido (por ejemplo, en la línea celular denominada DH 19.4.1.4A.B2). Después de la inducción con IPTG, puede parecer una serie adicional de dobletes, con unas movilidades en gel de ~30/32 kD, ~36/38 kD y ~42/44 kD.

[0236] Estas especies se muestran en la Figura 40 tanto sin inducción ("U") como después de la inducción ("I"). También se muestran los patrones de inmunorreactividad de estos fragmentos observados con mAb 342 y un anticuerpo policlonal C-terminal T46 que reconoce epítopos localizados entre los restos Ser422 y Leu441.

[0237] La derivación de los fragmentos observados en el estado no inducido (es decir, 12/14 kD y 25/27 kD) puede explicarse mediante referencia a la Figura 41.

[0238] La Figura 41(a) muestra cómo surge el fragmento de 12 kD a través del procesado proteolítico

inducido por la plantilla de las moléculas de tau completas en las posiciones aproximadas mostradas por las cabezas de flecha.

5 [0239] En el caso de las especies de 25/27 kD, estos fragmentos no pueden representar dímeros de las especies de 12/14 kD, ya que estos fragmentos son inmunorreactivos con la T46. Por lo tanto, debe surgir un producto proteolítico adicional de la proteína tau agregante completa a través de las escisiones que se producen en las posiciones aproximadas mostradas por las cabezas de flecha de la Figura 41(b).

10 [0240] Despues de la inducción (Figura 40, I), se observan las series de dobletes adicionales. La derivación de estos fragmentos adicionales puede comprenderse mejor con referencia a las Figuras 42-44.

15 [0241] La Figura 42 muestra una representación de las movilidades aparentes en gel de estos fragmentos y sus longitudes en restos de aminoácidos, indicando que las movilidades aparentes en gel pueden entenderse en términos de un conjunto característico de longitudes de fragmento.

20 [0242] Según se ilustra en la Figura 43, todos estos fragmentos son, a intervalos, restos de -34 o restos de -17, lo que es equivalente a una única repetición de tau, o a la mitad de ella. Todos los fragmentos generados pueden entenderse por tanto que todos los restos surgen de un simple conjunto de escisiones proteolíticas que se producen en las posiciones indicadas por las cabezas de flecha de la Figura 43 a partir de un agregado heptamérico básico, formado según se muestra en la Figura. En este diagrama, los fragmentos surgen como el conjunto combinatorio completo de las escisiones propuestas que se producen en las 3 posiciones aproximadas posibles mostradas por las cabezas de flecha en cualquier extremo del agregado. También están tabulados los correspondientes patrones de inmunorreactividad predichos observados con mAb 342 y T46 asociados con estos fragmentos.

25 [0243] La Figura 44 muestra estos mismos fragmentos en orden descendiente de longitud y creciente de movilidad en gel. Aunque el agregado heptamérico se muestra por conveniencia como surgido completamente a partir de las moléculas de tau completas, se apreciará que el fragmento de 12/14 kD podría estar interpuesto dentro del agregado propuesto, sustituyendo a algunos de los compañeros de unión, y que el patrón preciso de inclusión de estos fragmentos cortos en el agregado determinará qué fragmentos precisos del conjunto completo predominan en un caso dado. Por lo tanto, la producción de esta familia de fragmentos proteolíticos se entiende mejor como un posible repertorio que puede representarse de diversas formas dentro de la célula.

Ejemplo 4 - efectos inhibidores de los compuestos sobre la producción del fragmento proteolítico

35 [0244] Habiendo conseguido un sistema celular estable en el que poder controlar la producción del fragmento de 12 kD (y otros), se usó este modelo para probar los efectos inhibidores de la tiamina reducida. Esto se muestra en la Figura 23. En cada conjunto de bandas hay una producción inducible de la banda de 12 kD en presencia de concentraciones crecientes de IPTG que induce mayores niveles de T40. Al aumentar la concentración de tionina, se suprime la producción de la banda de 12 kD a partir de la T40. Esto se muestra cuantitativamente en la Figura 24. En ausencia de tionina, la inducción de T40 a concentraciones crecientes de IPTG conduce a un correspondiente incremento en la producción del fragmento de 12 kD. En presencia de tionina 2 µM, todavía hay inducción de la T40, pero no se convierte en el fragmento de 12 kD.

45 [0245] Como la propia tionina reducida es tóxica, es necesario un control para reducir los niveles de la T40 inducida por la correspondientes dosis de IPTG a mayores niveles de tionina. Esto puede conseguirse determinando la proporción de 12 kD:T40, lo que permite promediar los datos a lo largo de todos los niveles de IPTG y muestra una reducción dependiente de la dosis en el nivel de 12 kD relativa a la tau completa.

50 [0246] En las Figuras 9 a 16 se muestran las actividades de varios compuestos en el ensayo de T40/12 kD.

55 [0247] Los resultados se expresan en términos de la proporción de 12 kD:T40 tras la inducción de la tau completa (T40) mediante el tratamiento de las células con IPTG (0, 10, 25, 50 µM) en presencia de tionina o cloruro de tolonio introducidos a las concentraciones mostradas, en presencia de agentes reductores (DTT/ascorbato 200 µM), o clorpromacina o tacrina introducidas sin agentes reductores. Como puede observarse, la tionina y el cloruro de tolonio producen esencialmente una inhibición idéntica, mientras que la clorpromacina o la tacrina no son inhibidoras en el mismo intervalo de concentración. En experimentos de control se probó el efecto de los agentes reductores solos, que no mostraron una diferencia significativa observada en la proporción 12 kD:T40, en presencia sólo de agentes reductores.

60 [0248] También se examinaron las propiedades de la línea celular que produce los productos de degradación de mayor peso molecular con MB y DMMB (azul de dimetilmeleno).

65 [0249] Como puede observarse en la Figura 45, el DMMB demostró ser sorprendentemente potente en el modelo celular. Su actividad inhibidora pudo observarse tanto en ausencia de la inducción por IPTG como tras la inducción. El tratamiento con DMMB 1 µM suprimió efectivamente todos los productos de degradación dentro de la

célula. Una experiencia adicional con MB y DMMB ha demostrado que incluso la producción basal aparente para las especies de 12/14 kD está ampliamente determinada por la agregación. Esto es, la producción constitutiva del fragmento de 295-391 está por sí misma bien por debajo del nivel de detección mediante inmunotransferencia, o bien está estabilizada por una agregación espontánea, de forma que alcanza niveles dentro de la célula que pueden ser detectados por inmunotransferencia. Alternativamente, los niveles basales aparentes del fragmento de 12/14 kD observados sin inducción por IPTG y en ausencia del tratamiento con un inhibidor de la agregación de la tau pueden por sí mismos ser dominados por la producción dependiente de la agregación por plantilla a partir de niveles de filtración de la T40 producida en ausencia de inducción. Cualquiera que sea la combinación de factores que determine los niveles del fragmento de 12/14 kD en la condición inicial, su expresión aparente puede eliminarse esencialmente, junto con los productos de agregación de mayor peso molecular, mediante un potente inhibidor de la agregación tal como DMMB. Estos resultados confirman adicionalmente que la producción de los fragmentos proteolíticos de mayor peso molecular (es decir, 30/32, 36/38, 42/44 kD) también depende de las interacciones de unión críticas tau-tau que se producen a lo largo del dominio de repetición, según se muestra en las Figuras 41, 43 y 44.

[0250] La Figura 46 muestra la actividad del DMMB sobre la expresión basal de las especies de 12/14 kD, usando el mismo conjunto de suposiciones relativas a la concentración intracelular de tau y a la afinidad de unión tau-tau *in vitro* usado en las Figs. 10 - 16. En este caso se encuentra que el DMMB tiene una KI aparente dentro de la célula de 4,4 nM, y el valor celular de B50 es de ~ 100 nM. Esto indica que el DMMB es altamente potente de nro del ambiente celular.

Ejemplo 5 - comparación de los efectos inhibidores de los compuestos producidos y oxidados

[0251] Se usó el modelo matemático usado para los datos *in vitro* para analizar los efectos de las sustancias de prueba en el ensayo celular T40:12kD. Usando los valores conocidos para las Kd y KI a partir de los datos *in vitro*, se usó la expresión indicada para encontrar solución a la concentración intracelular de la tau completa (véase, por ejemplo, la Figura 10).

[0252] Se encontró que ésta era de aproximadamente 500 nM, que está en el intervalo esperado a partir de los estudios de la tau en cerebro y sistemas celulares. Se obtuvo un buen ajuste con los datos experimentales, lo que implicaba que para alguno de los compuestos, la inhibición de la producción de la tau truncada dentro de la célula podía ser predicha a partir de los valores aproximados de las Kd y KI determinados experimentalmente *in vitro*.

Ejemplo 6 - examen de las propiedades inhibidoras de las diaminofenotiacinas

[0253] En estudios *in vitro*, los inhibidores más activos de la unión tau-tau identificados eran las formas reducidas de las diaminofenotiacinas con 0, 2 ó 3 grupos metilo. La Figura 25 muestra las formas reducidas de dichos compuestos. Las correspondientes curvas de unión tau-tau se muestran en función de la proporción molar con respecto a tau en las Figuras 26 y 27. Según se muestra, los compuestos de las "series desmetiladas" (0, 2 ó 3 grupos metilo) producen una inhibición de aproximadamente 50% de la unión of tau-tau (mostrada en el eje vertical) a unas proporciones molares de 3:1 - 4:1 de compuesto:tau 'AMR' mostradas en una escala logarítmica en el eje horizontal). La principal proporción molar para la inhibición del 50% de la unión tau-tau para este grupo de compuestos es de 4:1.

[0254] Las diaminofenotiacinas con 4 ó 6 grupos metilo (el "grupo metilado") tienen una acción bifásica, con una mejora de la unión tau-tau a una concentración menor, y una inhibición de la unión tau-tau a concentraciones mayores (Figura 27). Estos compuestos requieren por tanto unas proporciones molares mucho mayores para efectuar la inhibición del 50% de la unión tau-tau.

[0255] También se llevó a cabo el examen de otras características del compuesto diaminofenotiacina. Se encontró que la sustitución del nitrógeno heterocíclico o de los átomos de azufre interfería gravemente con la potencia inhibidora de los compuestos. Asimismo, se encontró que la eliminación de los grupos diamino era perjudicial para la actividad inhibidora. Parecía por tanto que las estructuras diamino y heterocíclica de NB y S son importantes para la actividad de las moléculas en la inhibición de la unión tau-tau.

[0256] Para comparar, se usaron dos procedimientos para determinar la actividad inhibidora en el ensayo tau-tau: STB es la media de unión tau-tau observada a 1 y 10 pg/ml de compuesto a unas concentraciones estándar de tau de 488 nM; LB50 es el log10 de la proporción molar de compuesto:tau que produce un 50% de inhibición de la unión tau-tau (Figura 28). Según se muestra en la Figura 29, hay una fuerte correlación entre los valores STB y LB50 para un intervalo de compuestos, siendo la clorpromacina y la riboflavina dos casos atípicos (véanse también las Figuras 30 y 31).

Ejemplo 7 – Actividad inhibidora y potencial de difusión

[0257] La figura 32 indica que existe una correlación entre el número de grupos metilo (NMETH) en un compuesto

de prueba y el potencial de reducción (E) y el coeficiente de difusión (DIF). En todas las comparaciones, se utilizó la correlación de rangos Spearman. Tal como se observa en la figura 32, se puede observar una fuerte relación inversa entre el número de grupos metilo (NMETH) y el potencial de reducción sólo si se excluye el azul de metileno (tipo normal: los valores de correlación que incluyen azul de metileno; tipo cursiva: valores de correlación que excluyen el azul de metileno).

[0258] Esto indica que el azul de metileno tiene un potencial de reducción desproporcionadamente elevado en relación con el número de grupos metilo (NMETH) en esta serie. Existe también una fuerte correlación positiva entre el número de grupos metilo y el coeficiente de difusión (DIF, figura 32).

[0259] Al igual que no se observó una correlación entre el número de grupos metilo y el potencial de reducción (figura 33), se encontró sorprendentemente que no se observó una correlación entre el potencial de reducción y el potencial inhibidor (figura 34b), aunque el grado de reducción de las diaminofenotiazinas en las condiciones de ensayo está altamente correlacionado con el potencial de reducción (figura 33). De hecho, no existe una correlación entre el grado de reducción de estos compuestos y la potencia inhibidora (figura 34a). Por otro lado, existe una fuerte correlación inversa entre la potencia inhibidora del compuesto y su coeficiente de difusión y es posible predecir los valores estimados de LB50 y STB como funciones lineales del coeficiente de reducción y el coeficiente de difusión cuando se da más peso al coeficiente de difusión (figuras 35, 36 y 37). Se encuentra que los valores de LB50 y STB son uniformemente bajos para los valores de NMETH hasta e incluyendo 3, pero para valores de NMETH superiores (en particular, azul de metileno, NMETH=4), existe una potencia inhibidora desproporcionadamente baja en relación con el número de grupos metilo. Esto se puede relacionar con la situación simétrica de los grupos metilo que interfiere con la capacidad de apilamiento de las moléculas medida mediante el coeficiente de difusión. Esto se puede observar, por ejemplo, en la estructura cristalina del azul de metileno (véase la figura 38). La molécula de diaminofenotiazina es esencialmente plana y forma capas de apilamiento. La presencia de carga en la molécula, como en la forma oxidada, evita la formación de dichas capas de apilamiento y parece ser la tendencia de la forma reducida de este compuesto para formar dichas relaciones de apilamiento lo que determina la potencia inhibidora de la serie.

[0260] Los experimentos llevados a cabo por los presentes inventores examinaron la unión de tau de longitud completa en la fase acuosa al fragmento del dominio de repetición truncado de tau en fase sólida, tal como se describe con más detalle en el documento WO96/30766. La unión se detectó con mAb 342 o mAb 499. Tal como se muestra en la figura 39, existe una unión de tau-tau dependiente de la concentración de tau en presencia de un gran exceso del agente reductor estándar ditioltreitol (DTT, 1 mM). Sin embargo, la actividad inhibidora de las fenotiazinas también se demuestra en presencia de DTT (1 mM) en la configuración estándar del ensayo descrito anteriormente (es decir, los datos para STB y LB50). Los presentes inventores concluyen así que la actividad inhibidora no se puede atribuir al DTT *per se*, sino a la presencia de las fenotiazinas en su forma reducida debido a un exceso de DTT.

[0261] En resumen, los presentes inventores dan a conocer en el presente documento un potencial sistema significativamente mejorado para el tratamiento y la profilaxis de enfermedades, tales como la enfermedad de Alzheimer en que las proteínas experimentan la polimerización conformacional inducida, por ejemplo, tal como se ilustra en el caso de la enfermedad de Alzheimer por la unión patológica de tau-tau. Las divulgaciones importantes de esta solicitud, en concreto que el coeficiente de difusión de un compuesto puede ser importante en la determinación de su potencia inhibidora hacia esta polimerización conformacional de proteínas, son potencialmente de gran ventaja en el avance del entendimiento de enfermedades, tales como la enfermedad de Alzheimer, y en la capacidad de proporcionar terapia para las mismas. Finalmente, mediante la combinación de los descubrimientos en la preferencia de la forma reducida de MB, y la demostración de su actividad en el ensayo basado en células a concentraciones sustancialmente por debajo de las predichas únicamente en base a los datos *in vitro*, los inventores han demostrado que este compuesto y otros como éste, se pueden utilizar en una formulación reductora apropiada para la profilaxis o el tratamiento de AD y enfermedades relacionadas.

Referencias

[0262]

- Abramson, M., Jónsdóttir, S., Olafsson, I. & Grubb, A. (1992) Hereditary cystatin C amyloid angiopathy identification of the disease-causing mutation and specific diagnosis by polymerase chain reaction based analysis. Human Genetics 89, 377-380.
- Booth, D. R., Sunde, M., Bellotti, V., Robinson, C. V., Hutchinson, W. L., Fraser, P. E., Hawkins, P. N., Dobson, C. M., Radford, S. E., Blake, C. C. F. & Pepys, M. B. (1997) Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. Nature 385, 787-793.
- Carrell, R. W. & Gooptu, B. (1998) Conformational changes and disease - serpins, prions and Alzheimer's. Current Opinion in Structural Biology 8, 799-809.

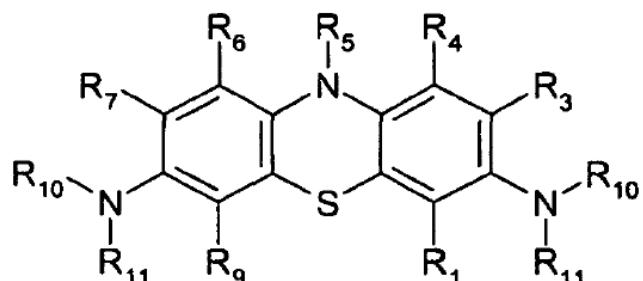
- Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stafani, M., Ramponi, G. & Dobson, C. (1999) Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences, EE.UU.* 96, 3590-3594.
- 5 Czech, C., Tremp, G. & Pradier, L. (2000) Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms. *Progress in Neurobiology* 60, 363-384.
- Davis, R. L., Shrimpton, A. E., Holohan, P. D., Bradshaw, C., Feiglin, D., Collins, G. H., Sonderegger, P., Kinter, J., Becker, L. M., Lacbawan, F., Krasnewich, D., Muenke, M., Lawrence, D. A., Yerby, M. S., Shaw, C. -M., Gooptu, B., Elliott, P. R., Finch, J. T., Carrell, R. W. & Lomas, D. A. (1999) Familial dementia caused by polymerization of mutant neuroserpin. *Nature* 401, 376-379.
- 10 DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K. O., Davies, S. W., Bates, G. P., Vonsattel, J. P. & Aronin, N. (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277, 1990-1993.
- 15 Dische, F. E., Wernstedt, C., Westermark, G. T., Westermark, P., Pepys, M. B., Rennie, J. A., Gilbey, S. G. & Watkins, P. J. (1988) Insulin as an amyloid-fibril protein at sites of repeated insulin injections in a diabetic patient. *Diabetologia* 31, 158-161.
- 20 Gasset, M., Bladwin, M. A., Lloyd, D. H., abriel, J. -M., Holtzman, D. M., Cohen, F. E., Fletterick, R. & Prusiner, S. B. (1992) Predicted a-helical region of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid. *Proceedings of the National Academy of Sciences, EE.UU.* 89, 10940-10944.
- 25 Glenner, G. G. & Wong, C. W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterisation of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 120, 885-890.
- 30 Goate, A., Chartier-Harlin, M. -C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., Mant, R., Newton, P., Rooke, K., Roques, P., Talbot, C., Pericak-Vance, M., Roses, A., Williamson, R., Rossor, M., Owen, M. & Hardy, J. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704-706.
- Gorevic, P. D., Casey, T. T., Stone, W. J., DiRaimondo, C. R., Prelli, F. C. & Frangione, B. (1985) b-2 Microglobulin is an amyloidogenic protein in man. *Journal of Clinical Investigation* 76, 2425-2429.
- 35 Gustavsson, A., Engstrom, U. & Westermark, P. (1991) Normal transthyretin and synthetic transthyretin fragments form amyloid-like fibrils in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 175, 1159-1164.
- Hutton, M., Lendon, C., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering- Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R.C., Stevens, M., de Graaf, E., Wauters, E., van Baren, J., Hillebrand, M., Joosse, M., Kwon, J. M., Nowotny, P., Che, L. K., Norton, J., Morris, J. C., Reed, L. A., Trojanowski, J. Q., Basun, H., Lannfelt, L., Neystat, M., Fahn, S., Dark, F., Tannenberg, T., Dodd, P. R., Hayward, N., Kwok, J. B. J., Schofield, P. R., Andreas, A., Snowden, J., Craufurd, D., Neary, D., Owen, F., Oostra, B.A., Hardy, J., Goate, A., van Swieten, J., Mann, D., Lynch, T. & Heutink, P. (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393, 702-705.
- 40 Johansson, B., Wernstedt, C. & Westermark, P. (1987) Atrial natriuretic peptide deposited as atrial amyloid fibrils. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 148, 1087-1092.
- 45 Lomas, D. A., Evans, D. L., Finch, J. T. & Carrell, R. W. (1992) The mechanism of Z a1-antitrypsin accumulation in the liver. *Nature* 357, 605-607.
- 50 Maury, C. P. & Baumann, M. (1990) Isolation and characterization of cardiac amyloid in familial amyloid polyneuropathy type IV (Finnish): relation of the amyloid protein to variant gelsolin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1096, 84-86.
- 55 Paulson, H. L. (1999) Human genetics '99: trinucleotide repeats. *American Journal of Human Genetics* 64, 339-345.
- Pepys, M. B., Hawkins, P. N., Booth, D. R., Vigushin, D. M., Tennent, G. A., Soutar, A. K., Totty, N., Nguyen, O., Blake, C. C. F., Terry, C. J., Feest, T. G., Zalin, A. M. & Hsuan, J. J. (1993) Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. *Nature* 362, 553-557.
- 60 Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenoos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papaetopoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I. & Nussbaum, R. L. (1997) Mutation in the a-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045-2047.

- Prusiner, S. B., Scott, M. R., DeArmond, S. J. & Cohen, F. E. (1998) Prion protein biology. *Cell* 93, 337-348.
- Shibata, N., Hirano, A., Kobayashi, M., Siddique, T., Deng, H. X., Hung, W. Y., Kato, T. & Asayama, K. (1996) Intense superoxide dismutase-1 immunoreactivity in intracytoplasmic hyaline inclusions of familial amyotrophic lateral sclerosis with posterior column involvement. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 55, 481-490.
- 5 Sletten, K., Westermark, P. & Natvig, J. B. (1976) Characterization of amyloid fibril proteins from medullary carcinoma of the thyroid. *Journal of Experimental Medicine* 143, 993-998.
- 10 Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M. & Goedert, M. (1998) α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences, EE.UU.* 95, 6469-6473.
- 15 Uemichi, T., Liuepnicks, J. j. & Benson, M. D. (1994) Hereditary renal amyloidosis with a novel variant fibrinogen. *Journal of Clinical Investigation* 93, 731-736.
- 20 Westermark, P., Engstrom, U., Johnson, K. H., Westermark, G. T. & Betsholtz, C. (1990) Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, EE.UU.* 87, 5036-5040.
- 25 Westermark, P., Johnson, K. H., O'Brien, T. D. & Betsholtz, C. (1992) Islet amyloid polypeptide - a novel controversy in diabetes research. *Diabetologia* 35, 297-303.
- 25 Westermark, P., Johnson, K. H. & Pitkänen, P. (1985) Systemic amyloidosis: A review with emphasis on pathogenesis. *Applied Physiology* 3, 55-68.
- 30 Wischik, C. M., Novak, M., Thøgersen, H. C., Edwards, P. C., Runswick, M. J., Jakes, R., Walker, J. E., Milstein, C., M., R. & Klug, A. (1988) Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences, EE.UU.* 85, 4506-4510.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de una diaminofenotiazina en la preparación de una composición de medicamento para utilizar en el tratamiento o la profilaxis de una tauopatía,
 5 en la que la preparación comprende la etapa de reducir previamente la diaminofenotiazina, de manera que está presente en por lo menos el 80, 90, 95, ó 99% en la (leuco)forma reducida,
 10 y en la que la diaminofenotiazina se reduce previamente mediante la adición de un agente reductor exógeno,
 y en la que la forma reducida está liofilizada,
 y en la que la (leuco)diaminofenotiazina reducida previamente tiene la fórmula:

(I)



15 en la que R1, R3, R4, R6, R7 y R9 se seleccionan independientemente entre hidrógeno, halógeno, hidroxilo, carboxilo, alquilo sustituido o no sustituido, haloalquilo o alcoxi;
 20 R5 es hidrógeno; y

25 cada uno de R10 y R11 se selecciona independientemente entre hidrógeno, hidroxilo, carboxilo, alquilo sustituido o no sustituido, haloalquilo o alcoxi;
 30 o es una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

35 2. Utilización según la reivindicación 1, en la que la forma reducida se estabiliza en el estado reducido mediante la adición de un agente estabilizador.

35 3. Utilización según la reivindicación 2, en la que la forma reducida se liofiliza con el agente estabilizador.

40 4. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición de medicamento comprende además uno o más de los siguientes: un excipiente, portador o tampón farmacéuticamente aceptable.

45 5. Utilización según la reivindicación 4, en la que la composición de medicamento es una formulación de liberación lenta.

50 6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que R1, R3, R4, R6, R7 y R9 se seleccionan independientemente entre -hidrógeno, -CH₃, -C₂H₅ o -C₃H₇;
 55 cada uno de R10 y R11 se selecciona independientemente entre hidrógeno, -CH₃, -C₂H₅ o -C₃H₇; y R5 es hidrógeno, -CH₃, -C₂H₅ o -C₃H₇.

55 7. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la diaminofenotiazina tiene 0, 2, 3 ó 4 grupos metilo alrededor del núcleo de diaminofenotiazina.

60 8. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la diaminofenotiazina está metilada asimétricamente.

65 9. Utilización según la reivindicación 8, en la que la diaminofenotiazina es cloruro de tolonio, azura A, azura B o tionina.

65 10. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la diaminofenotiazina se selecciona entre azul de metíleno, azul O de toluidina, o azul de 1,9-dimetilmeleno.

65 11. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el tratamiento o la profilaxis comprende administrar una cantidad profilácticamente eficaz o una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de medicamento a un paciente con necesidad de la misma.

65 12. Utilización según la reivindicación 9, en la que el tratamiento o la profilaxis comprende administrar a un paciente una diaminofenotiazina que es tionina y ésta se administra al paciente en una dosis diaria de entre 1 y 1000 mg

opcionalmente dividida en 1 a 8 dosis unitarias.

13. Utilización según la reivindicación 10, en la que el tratamiento o la profilaxis comprende administrar a un paciente una diaminofenotiazina que es azul de metileno y la dosis diaria es de aproximadamente 3,2-3,5 mg/kg.

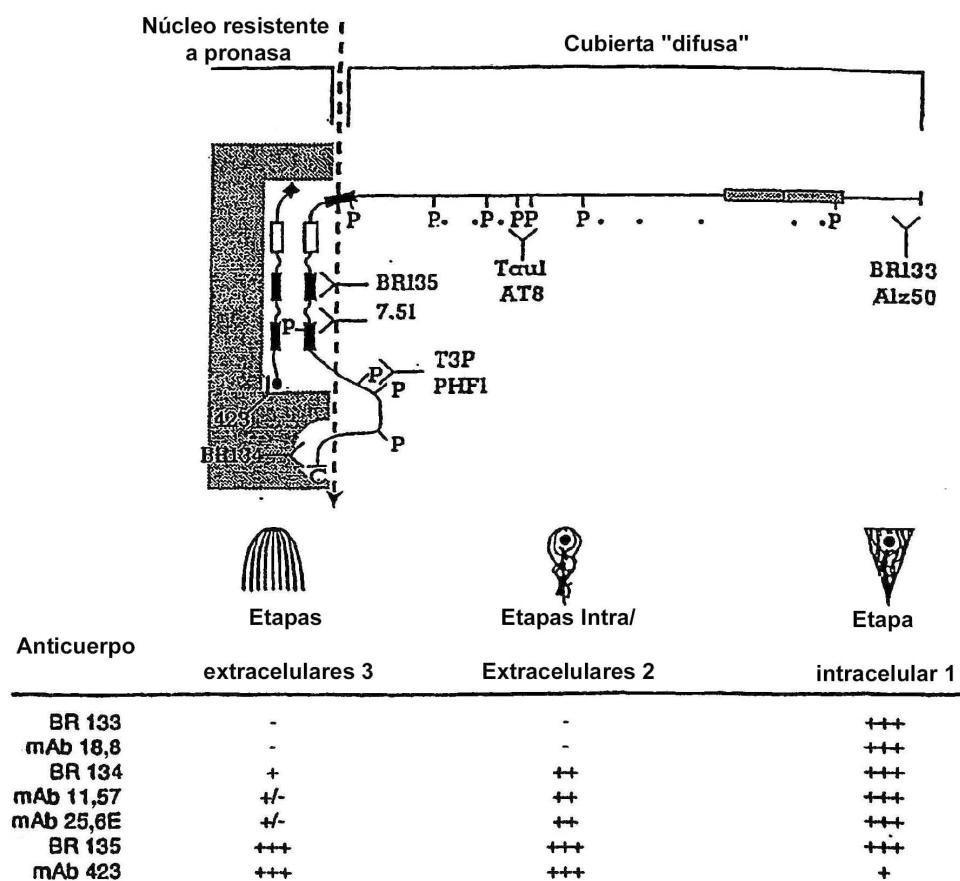


Figura 1

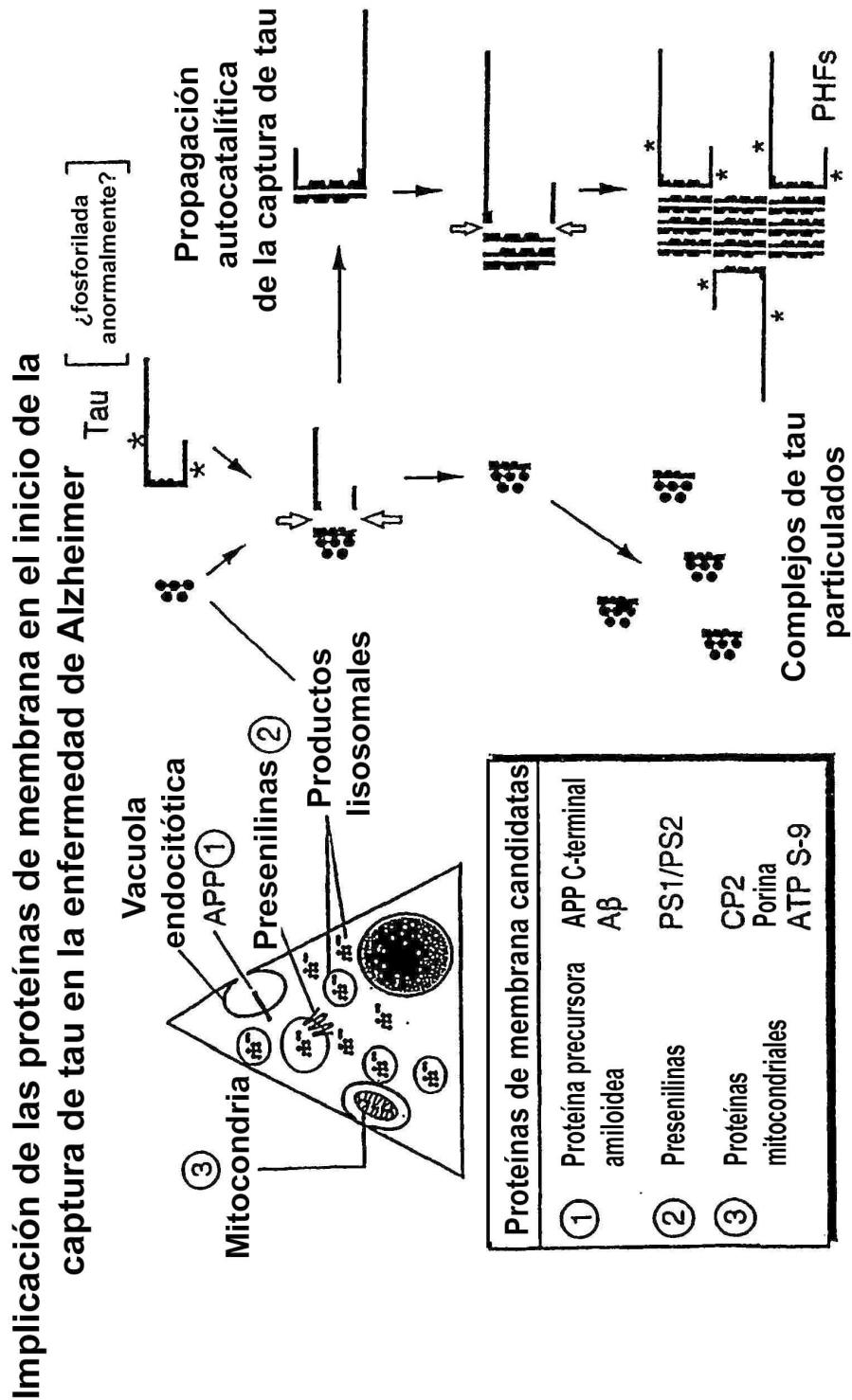


Figura 2

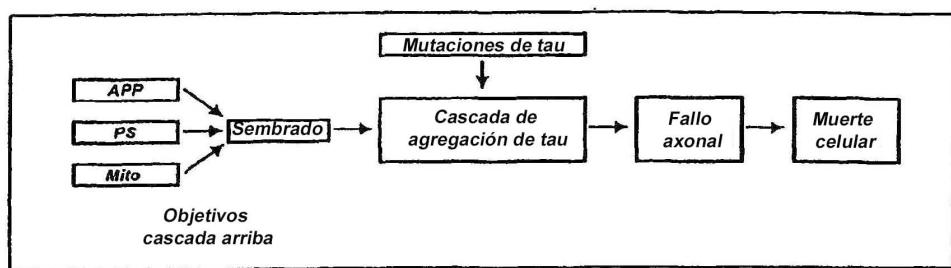


Figura 3

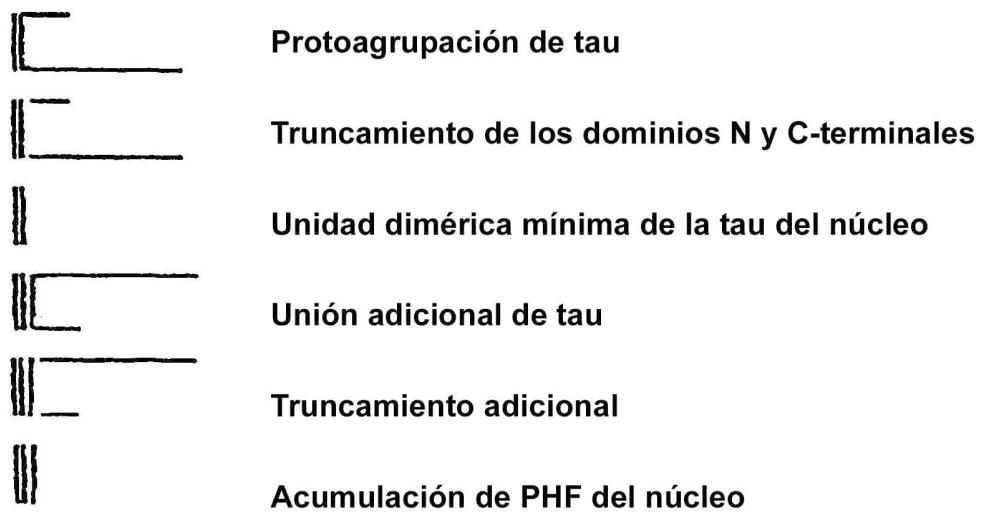


Figura 4

Enfermedades de agregación de proteínas				
Proteína	Enfermedad	Dominio y/o mutaciones agregantes	Tamaño de la subunidad de fibrilla (kDa)	Referencia
Enfermedades neurodegenerativas				
Proteína priónica	Enfermedades prionicas (CJD, nvCJD, insomnio familiar fatal, síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker, kuru)	Formas heredadas y esporádicas PrP-27-30; muchas mutaciones Dominios fibrilógenos: 113-120, 178-191, 202-218	27	Prusiner (1998) Gasset y col. (1992)
Proteína tau	Enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, FTDP-17, CJD, parkinsonismo postencefálico, enfermedad de Pick, parkinsonismo con complejo de demencia de Guam	Formas heredadas y esporádicas Tau truncada (dominio de unión a tubulina) 297-391 Mutaciones en la tau en FTDP-17 Muchas mutaciones en proteínas presenilinas	10-12	Wisnith y col. (1988) Hutton y col. (1989) Czechi y col. (2000)
Proteína β -amiloidea	Enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down	Formas heredadas y esporádicas β -amiloidea: 1-43(3): 11 mutaciones en APP en familias inusuales	4	Glenner & Wong. (1984) Goate y col. (1991)
Huntington	Enfermedad de Huntington	N-terminalas de la protein con repeticiones expandidas de glutamina	40	Difiglia y col. (1997)
Ataxias spinocerebelosas (SCA1, 2, 3, 7)	Ataxias espinocefálicas	Proteínas con repeticiones expandidas de glutamina		Paulson y col. (2000)
Atrofia dentatorubro-palidooyosana (DRPLA)	Atrofia muscular espinal y bulbar	Proteínas con repeticiones expandidas de glutamina		Paulson y col. (2000)
Receptor de andrógenos		Proteínas con repeticiones expandidas de glutamina		Paulson y col. (2000)
Neuroserpina	Encefalopatía familiar con cuerpos de inclusión neuronales (FENIB)	Neuroserpina: S48P, S52R	57	Davis y col. (1999)
A-sinucleína	Enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia sistémica múltiple	Formas heredadas y esporádicas A317, A319P En familias mutuas PD autosómicas dominantes	19	Spillantini y col. (1996) Polymeropoulos y col. (1997)
Cistatina C	Angiopatía celular hereditaria (islañica)	Cistatina C menos 10 residuos: L68Q	12-13	Abrahamsen y col. (1992)
Superóxido dismutasa 1	Angiopatía celular hereditaria (islañica)	Mutaciones SOD1		Shibata y col. (1996)
Enfermedades no neurodegenerativas				
Hemoglobina	Esclerosis lateral amiotrófica Anemia depanocítica	Cadena beta de la hemoglobina (S) Muchas mutaciones		Carrell & Gooptu (1998)
Serpinas	Hemólisis por cuerpos de inclusión Deficiencia en α -1 antitripsina (enfisema, cirrosis) Deficiencia en antitrombina (enfermedad tromboembólica) Deficiencia en inhibidor C-1 (angiogéderma)	Mutaciones Mutaciones Mutaciones		Lomas y col. (1992) Carrell & Gooptu (1998) Carrell & Gooptu (1998)
Cadena ligera de la immunoglobulina	Discasas de células plasmáticas (anfidirosis primaria sistémica AL)	Cadena ligera o fragmentos	0.5-26	Westerman y col. (1985)
Amiloido sérico A	Amiloidosis secundaria sistémica reactiva AA Enfermedad inflamatoria crónica	Fragmentos variables N-terminales de SAA	4.5-10	Westerman y col. (1985)

(continua.....)

Figura 5a

(.....continuación)

Transtiretina	Polineuropatía amiloidea familiar (sistémica; FAP I)	10-14	Gustavsson y col. (1991)
	Tetramero disociado en variantes monoméricas conformacionales Muchas mutaciones (algunas no asociadas con amiloide; muchos tipos diferentes de enfermedad)		
Amiloidosis cardíaca senil	Trastiretina normal	10-14	Gustavsson y col. (1991)
Gelsolina	D187Q conduce a 173-225/243 truncado (residuos críticos 182-192)	9,5	Maury & Baumann (1990)
B2-microglobulina	Microglobulina β -2	12-25	Gorevic y col. (1985)
	Amiloidosis por hemodiálisis Amilode prostático		
Apolipoproteína A1	Residuos 83-93 N-terminales; G26R, W50R, L60R	9	Booth y col. (1995)
Lisozima	Lisozima o fragmentos (con o sin I58T, D87H)	14	Pepys y col. (1993)
Amilina (polipeptido amiloideo de islote)	Fragmentos (núcleo crítico de 20-29), sin mutaciones	3,8	Westerman (1990)
Cadena α del fibrinógeno	Fragmentos de fibrinógeno	7-10	Uemichi y col. (1994)
Procalcitonina	Fragments de calcitonina	3,4	Sietten y col. (1976)
Factor natriurético atrial	ANP, sin mutantes	3,5	Johansson y col. (1987)
Insulina	Insulina		Dische y col. (1988)
Otras proteínas formadoras de amiloide (<i>In vitro</i>)	Otras proteínas		Chiti y col. (1999)

Figura 5b

Truncamiento N y C-terminal de tau

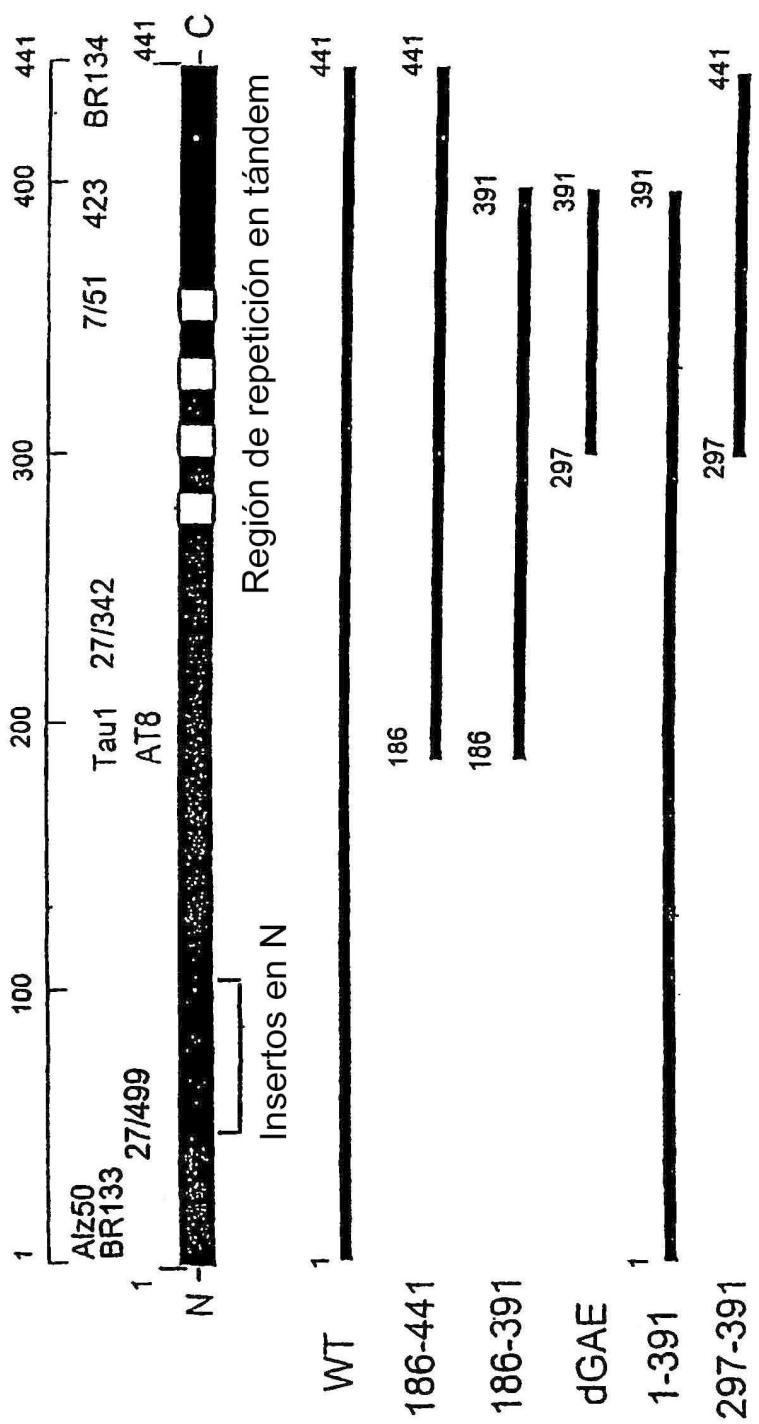


Figura 6

ATG GCT GAG CCC CGC CAG GAG TTC GAA GTG ATG GAA GAT CAC GCT GGG
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15

ACG TAC GGG TTG GGG GAC AGG AAA GAT CAG GGG GGC TAC ACC ATG CAC
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30

CAA GAC CAA GAG GGT GAC ACG GAC GCT GGC CTG AAA GAA TCT CCC CTG
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45

CAG ACC CCC ACT GAG GAC GGA TCT GAG GAA CCG GGC TCT GAA ACC TCT
Gln Thr Pro Gln Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
 50 55 60

GAT GCT AAG AGC ACT CCA ACA GCA GCG GAA GAT GTG ACA GCA CCC TTA GTG
Asp Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
 65 70 75 80

GAT GAG GGA GCT CCC GGC AAG CAG GCT GCC GCG CAG CCC CAC ACG GAG
Asp Glu Gly Ala Pro Glu Lys Glu Ala Ala Glu Pro His Thr Glu
 85 90 95

ATC CCA GAA GGA ACC ACA GCT GAA GAA GCA GGC ATT GGA GAC ACC CCC
Ile Pro Glu Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Glu Asp Thr Pro
 100 105 110

AGC CTG GAA GAC GAA GCT GGT CAC GTG ACC CAA GCT CGC ATG GTC
 Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
 115 120 125

AGT AAA AGC AAA GAC GGG ACT GGA AGC GAT GAC AAA AAA GCC AAG GGG
 Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
 130 135 140

GCT GAT GGT AAA ACG AAG ATC GCC ACA CCG CGG GGA GCA GCC CCT CCA
 Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
 145 150 155 160

GGC CAG AAG GGC CAG GCC AAC GCC ACC AGG ATT CCA GCA AAA ACC CCG
 Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
 165 170 175

CCC GCT CCA AAG ACA CCA CCC AGC TCT GGT GAA CCT CCA AAA TCA GGG
 Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
 180 185 190

GAT CGC AGC GGC TAC AGC AGC CCC GGC TCC CCA GGC ACT CCC GGC AGC
 Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 195 200 205

CGC TCC CGC ACC CCG TCC CTT CCA ACC CCA CCC ACC CGG GAG CCC AAG
 Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 210 215 220

Figura 7 a

AAG GTG GCA GTG GTC CGT ACT CCA CCC AAG TCG CTG TCT TCC GCC AAG
 Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Leu Ser Ser Ala Lys
 225 230 235 240

AGC CGC CTG CAG ACA GCC CCC GTG CCC ATG CCA GAC CTG AAG AAT GGC
 Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Gly
 245 250 255

AAG TCC AAG ATC GGC TCC ACT GAG AAC CTG AAG CAC CAG CCG GGA GGC
 Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 260 265 270

GGG AAG GTG CAG ATA ATT AAT AAG AAG CTG GAT CTT AGC AAC GTC CAG
Gly Lys Val Glu Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
 275 280 285

TCC AAG TGT GGC TCA AAG GAT AAT ATC AAA CAG GTC CCG GGA GGC GGC
Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asp Ile Lys Glu Val Pro Gly Gly Gly
 290 295 300

AGT GTG CAA ATA GTC TAC AAA CCA GTT GAC CTG AGC AAG GTG ACC TCC
Ser Val Glu Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
 305 310 315 320

AAG TGT GGC TCA TTA GGC AAC ATC CAT CAT AAA CCA GGA GGT GGC CAG
Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
 325 330 335

GTG GAA GTA AAA TCT GAG AAG CTT GAC TTC AAG GAC AGA GTC CAG TCG
Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Glu Ser
 340 345 350

AAG ATT GGG TCC CTG GAC AAT ATC ACC CAC GTC CCT GGC GGA GGA AAT
Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 355 360 365

AAA AAG ATT GAA ACC CAC AAG CTG ACC GTC CGC GAG AAC GCC AAA GCC
Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Val Arg Glu Asn Ala Lys Ala
 370 375 380

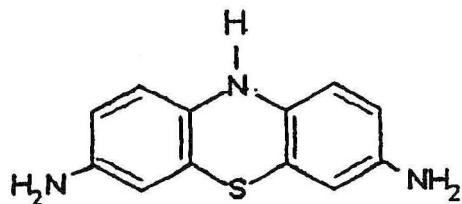
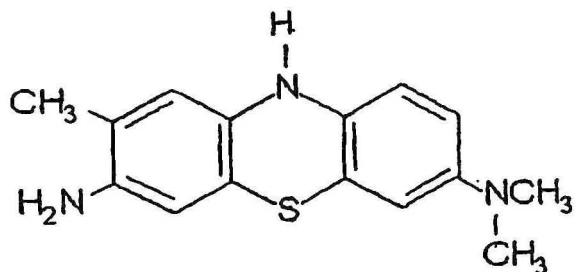
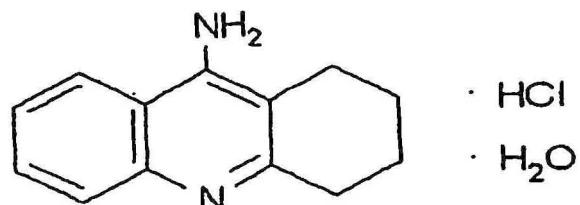
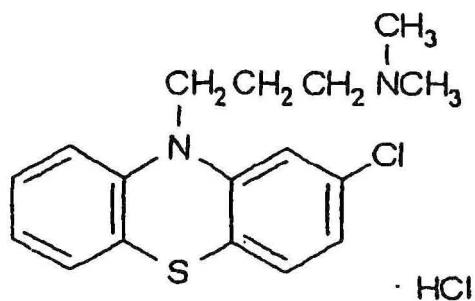
AAG ACA GAC CAC GGG GCG GAG ATC GTG TAC AAG TCG CCA GTG GTG TCT
Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
 385 390 395 400

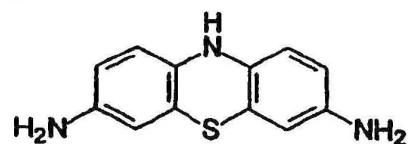
GGG GAC ACG TCT CCA CGG CAT CTC AGC AAT GTC TCC TCC ACC GGC AGC
Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
 405 410 415

ATT GAC ATG GTA GAC TCG CCC CAG CTC GCC ACG CTA GCT GAC GAG GGG
Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Glu Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Gly
 420 425 430

TCT GCC TCC CTG GCC AAG CAG GGT TTG TGA
Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu ***
 435 440

Figura 7b

Compuestos probados en ensayos basados en células**Tionina****Cloruro de tolonio****Tacrina****Clorpromacina****Figura 8**

KI (nM) B₅₀ (μM)**I**

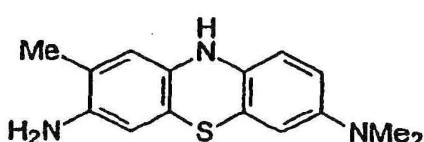
100

2,17



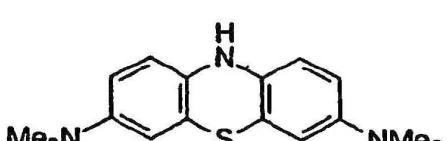
1200

26,07



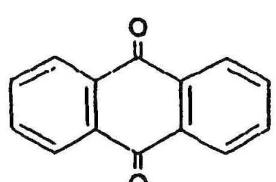
105

2,28



123

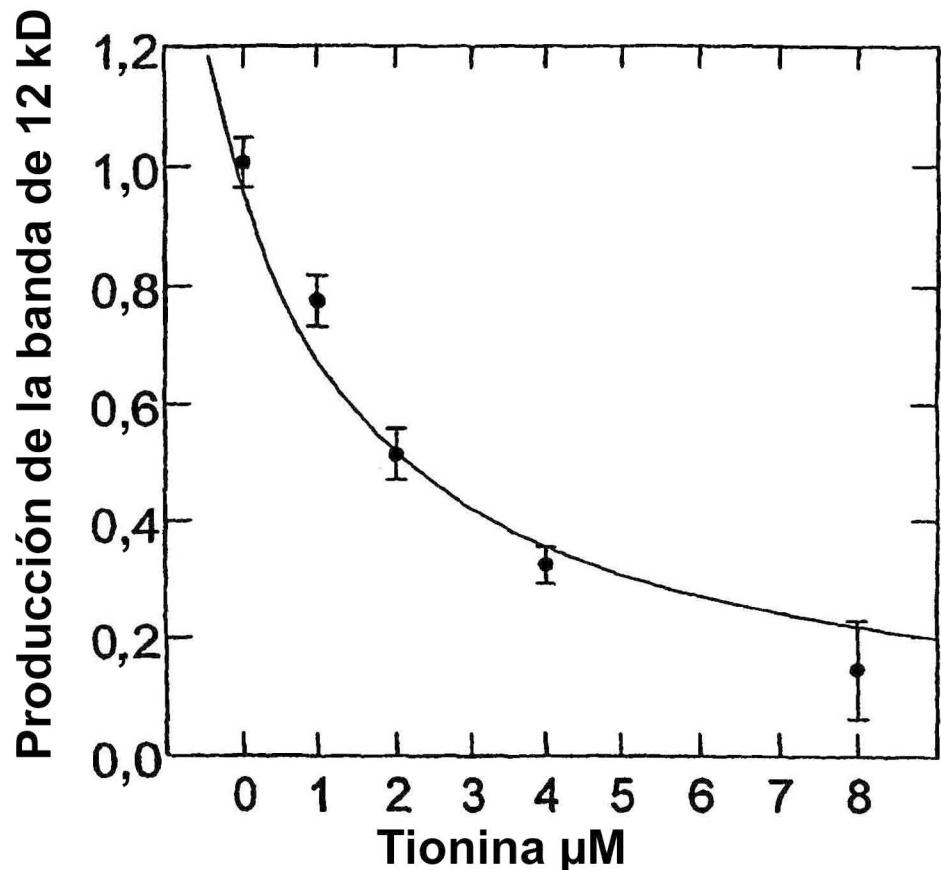
2,67



—

—

Figura 9



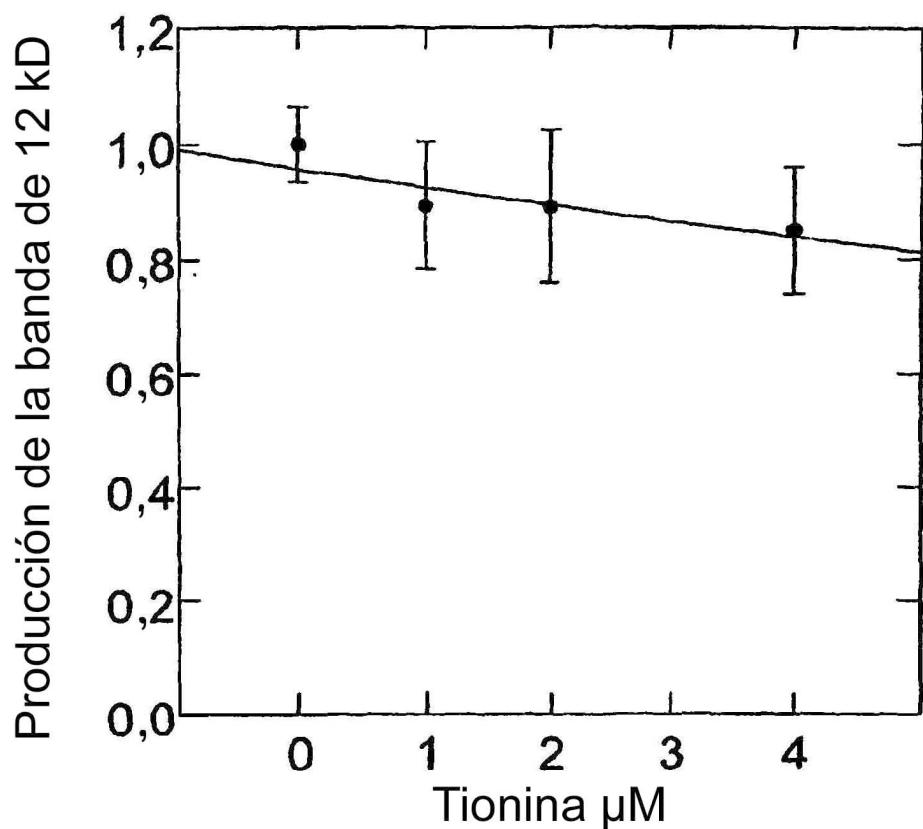
Actividad observada frente a predicha $r = 0,986$

Concentración de tau intracelular 500 nM

Afinidad de unión tau-tau 22 nM

KI de tionina 100 nM

Figura 10



Actividad observada frente a predicha

 $r = 0,784$

Concentración de tau intracelular

500 nM

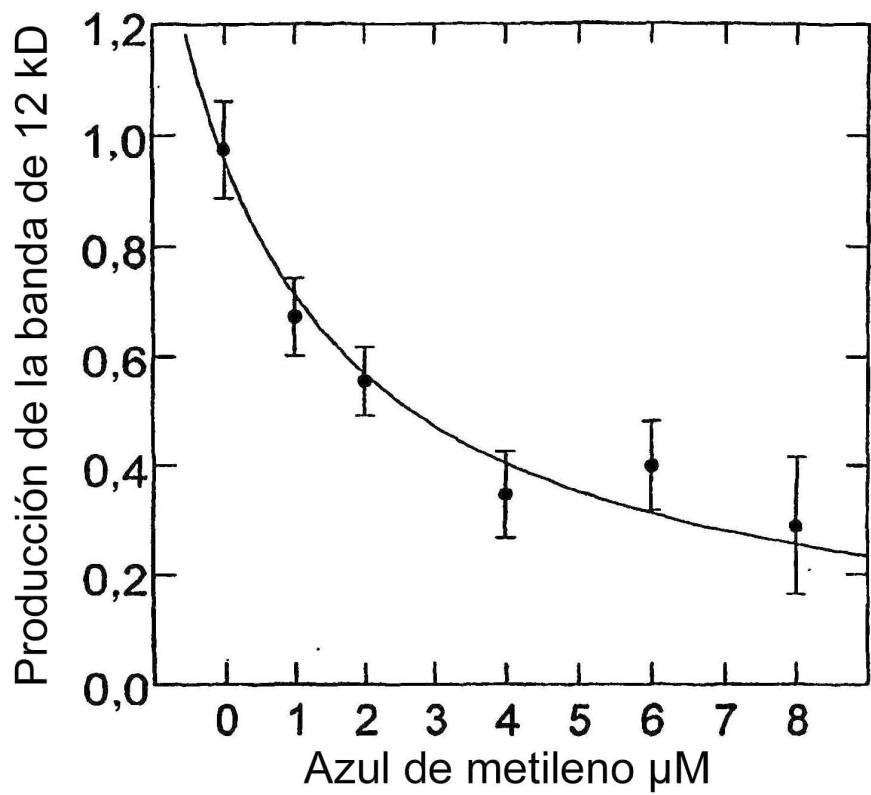
Afinidad de unión tau-tau

22 nM

KI de tionina oxidada

1200 nM

Figura 11



Actividad observada frente a predicha

 $r = 0,962$

Concentración de tau intracelular

500 nM

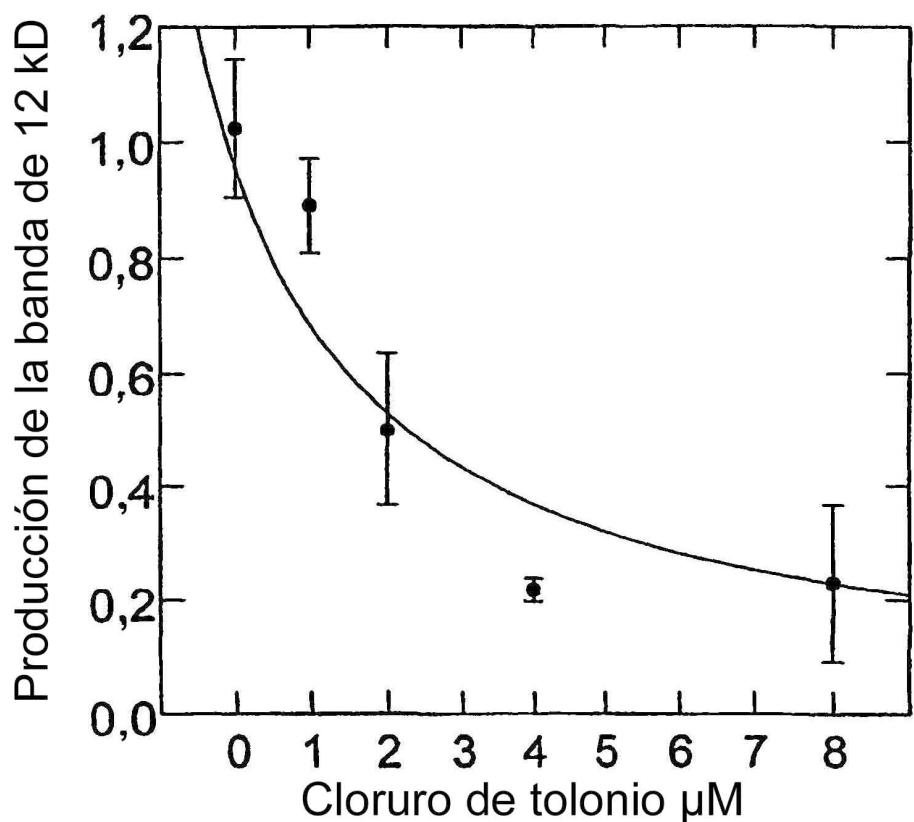
Afinidad de unión tau-tau

22 nM

KI del azul de metileno

123 nM

Figura 12



Actividad observada frente a predicha

 $r = 0,913$

Concentración de tau intracelular

500 nM

Afinidad de unión tau-tau

22 nM

KI del cloruro de tolonio

105 nM

Figura 13

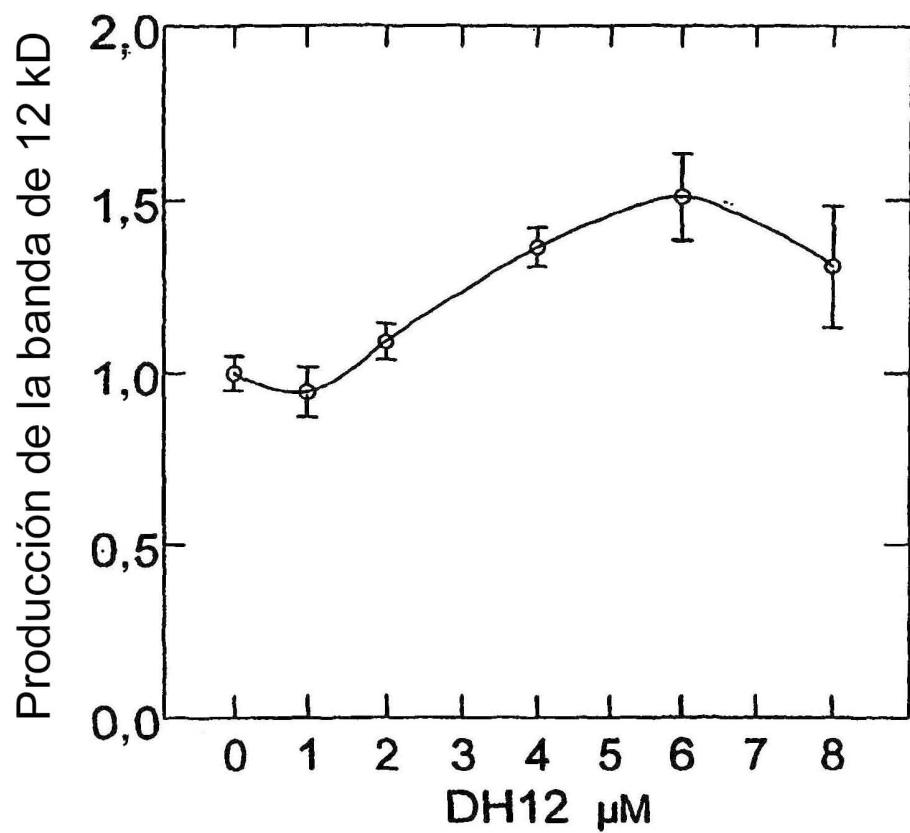
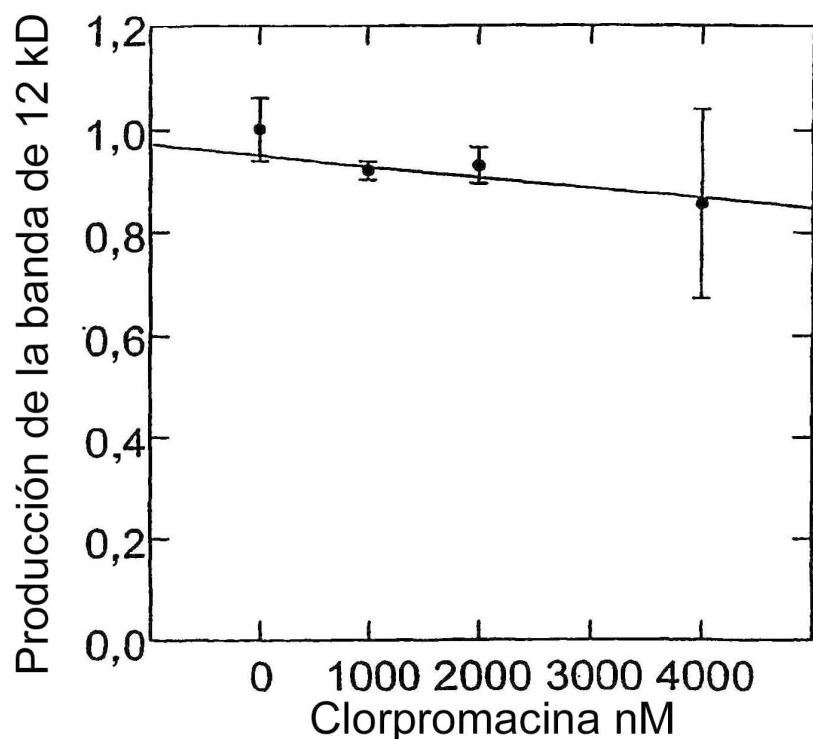


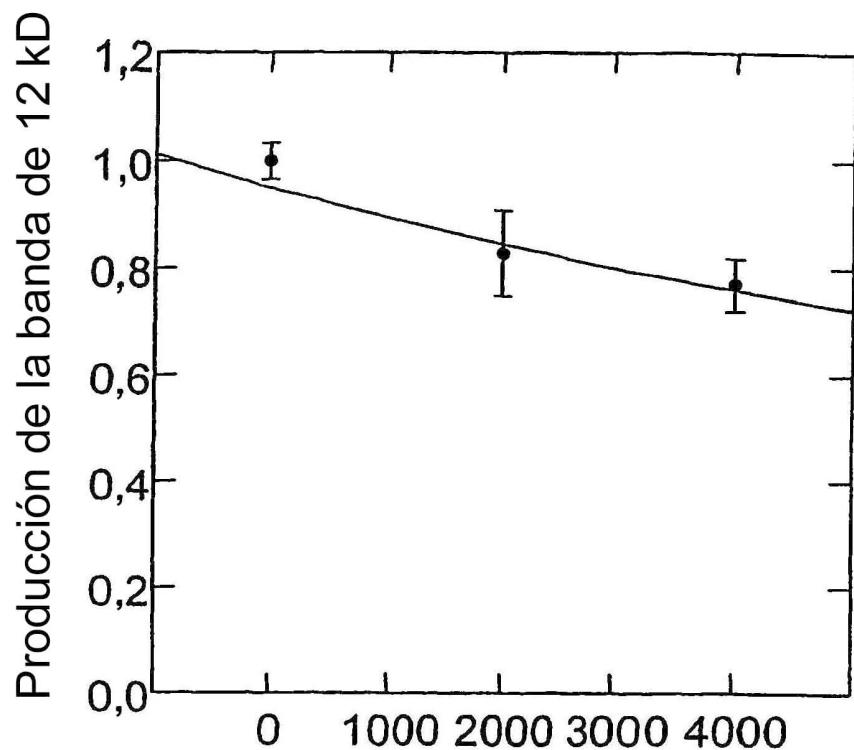
Figura 14



Actividad observada frente a predicha $r = 0,937$

Concentración de tau intracelular 415 nM
Afinidad de unión tau-tau 22 nM
KI del cloruro de tolonio 2117 nm

Figura 15



Actividad observada frente a predicha $r = 0,976$

Concentración de tau intracelular	415 nM
Afinidad de unión tau-tau	22 nM
KI del cloruro de tolonio	802 nm

Figura 16

Los compuestos difieren en la magnitud de la reducción a los 120 minutos

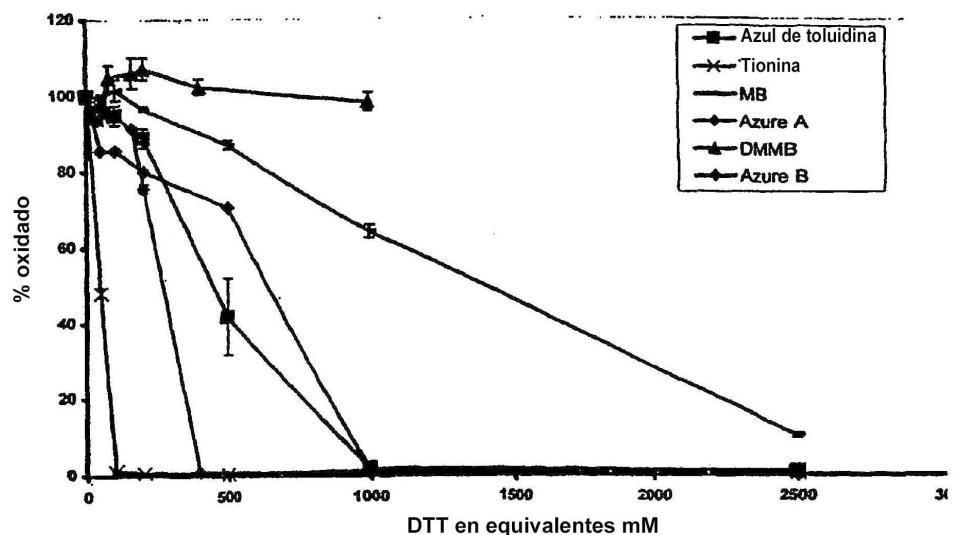


Figura 17

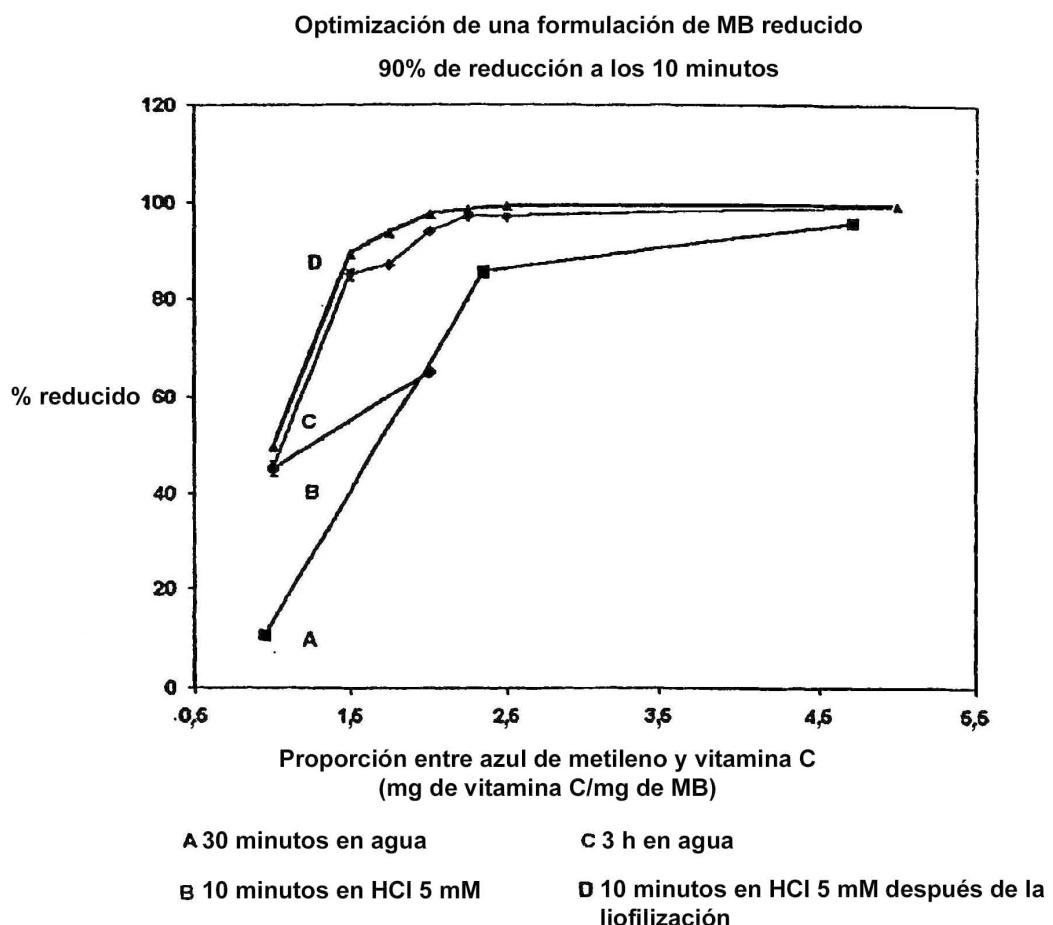


Figura 18

Niveles tisulares frente a dosis IV de MB
DiSanto y Wagner (1972)

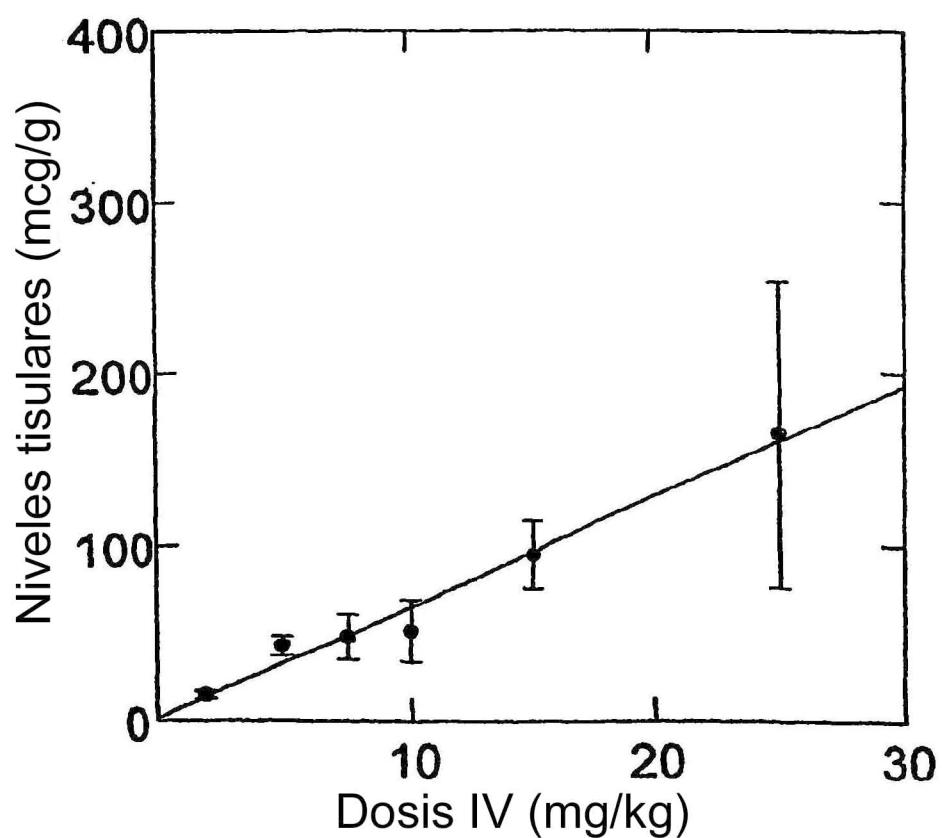


Figura 19a

Distribución en sangre y tejidos del MB (dosis de 1,43 mg/kg)

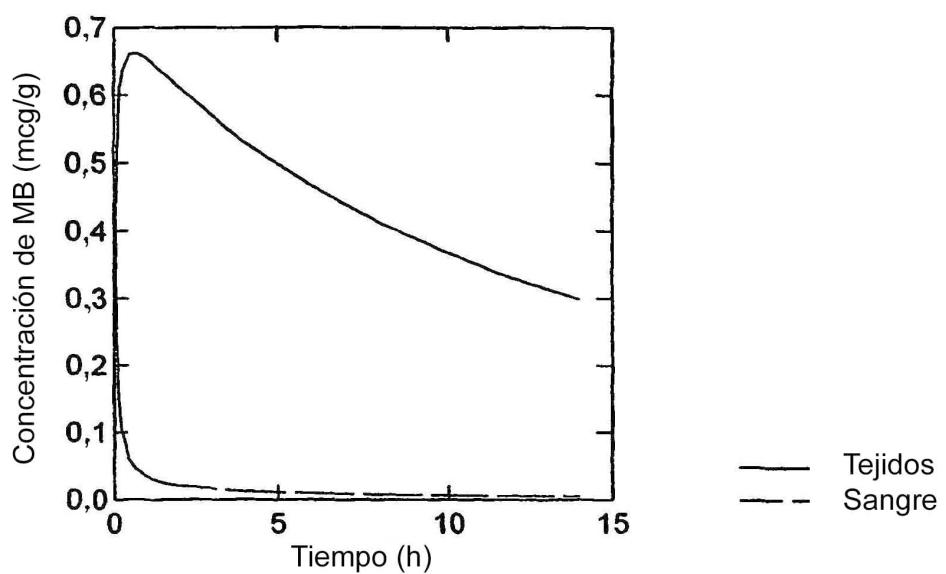


Figura 19b

Longitud de tau	Mr aparente (kDa)	Expresión en:	
		3T3	COS-7
1) 1-391	55	++	++++
2) m186-391	26	++	++++
3) m297-391	12	+/-	+
4) m186-441	32	++	+++
5) m297-441	18	+	+
6) 1-441	67	++	++++
7) [kozak]m295-391	12	+	+++
8) [kozak]m297-391	12	+/-	++

Figura 20

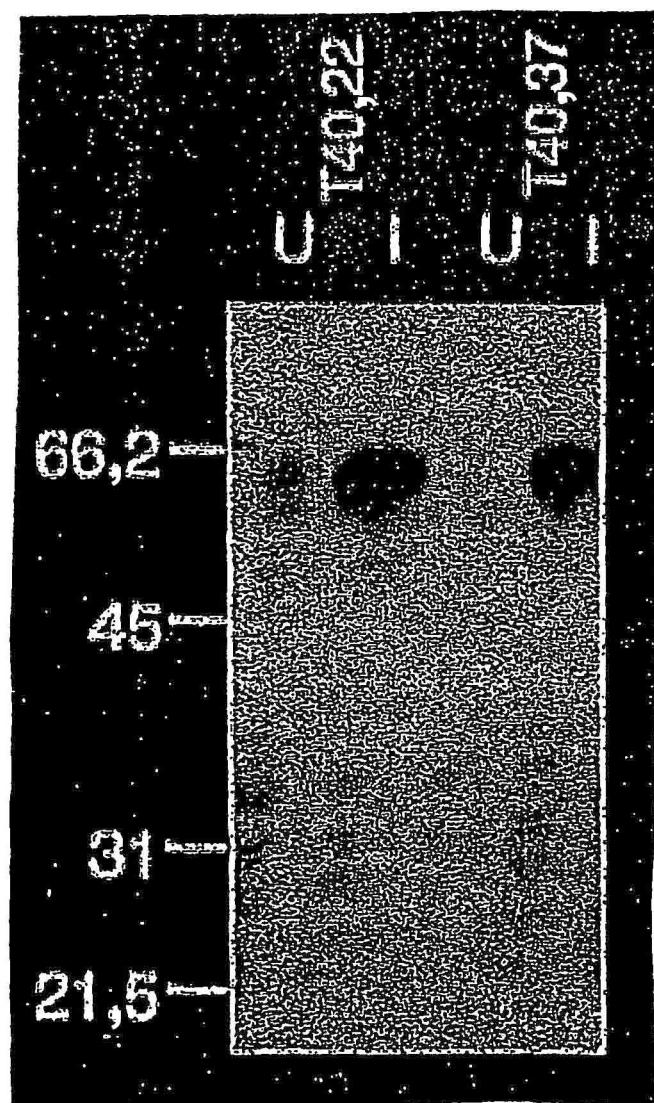


Figura 21

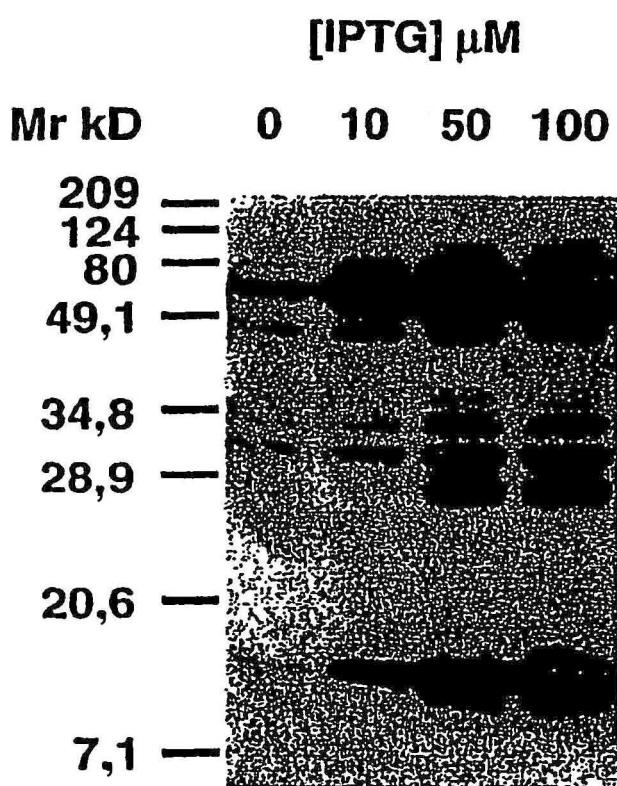


Figura 22

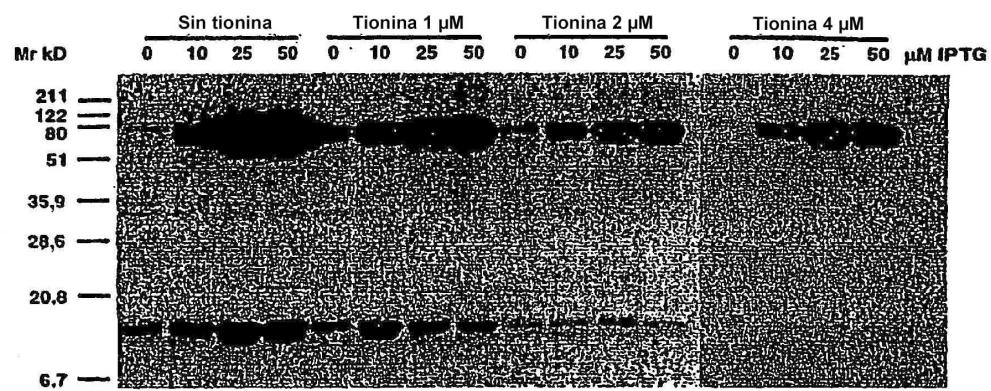
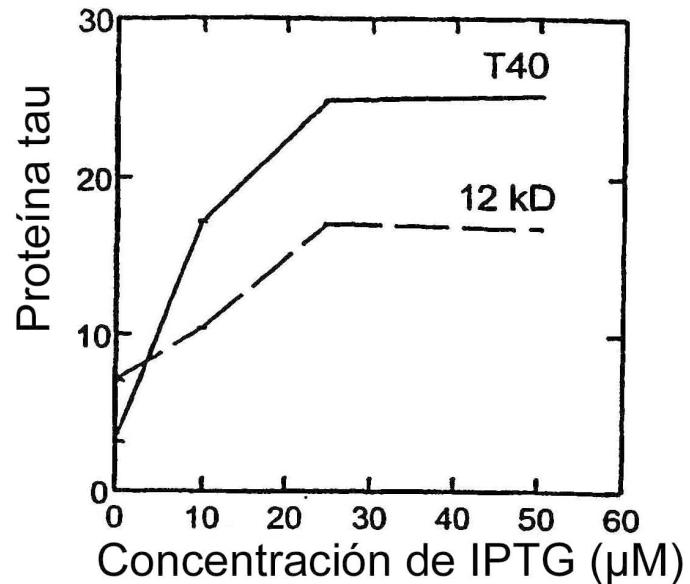


Figura 23

Sin tionina



Tionina = 2 μM

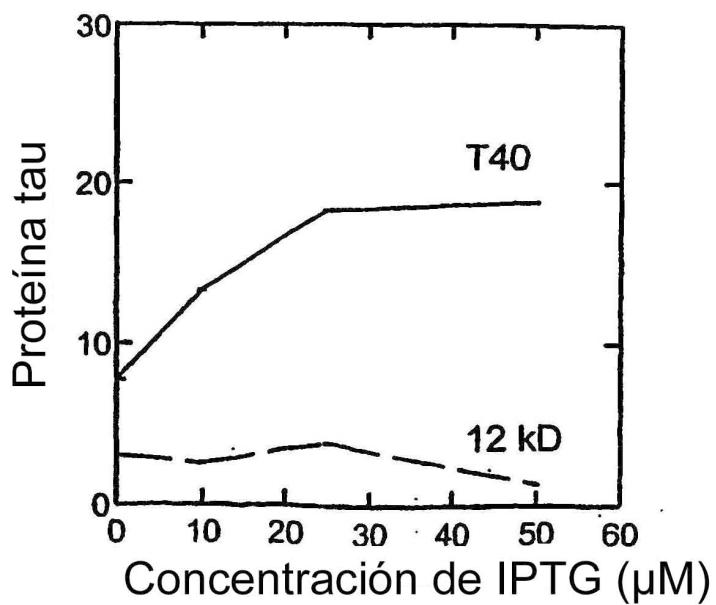


Figura 24

ORDEN DE CLASIFICACIÓN DE POTENCIA (KI)

FORMAS REDUCIDAS

Compuesto	Estructura	KI
Cloruro de tolonio		76,05
Tionina		108,34
Azure A		119,01
Azure B		123,91
1Azul de 1,9-dimetilmeleno		325,41
Azul de metileno		3731,26

Figura 25

Unión tau-tau frente a proporción molar (compuesto:tau)
0, 2, 3 grupos metilo

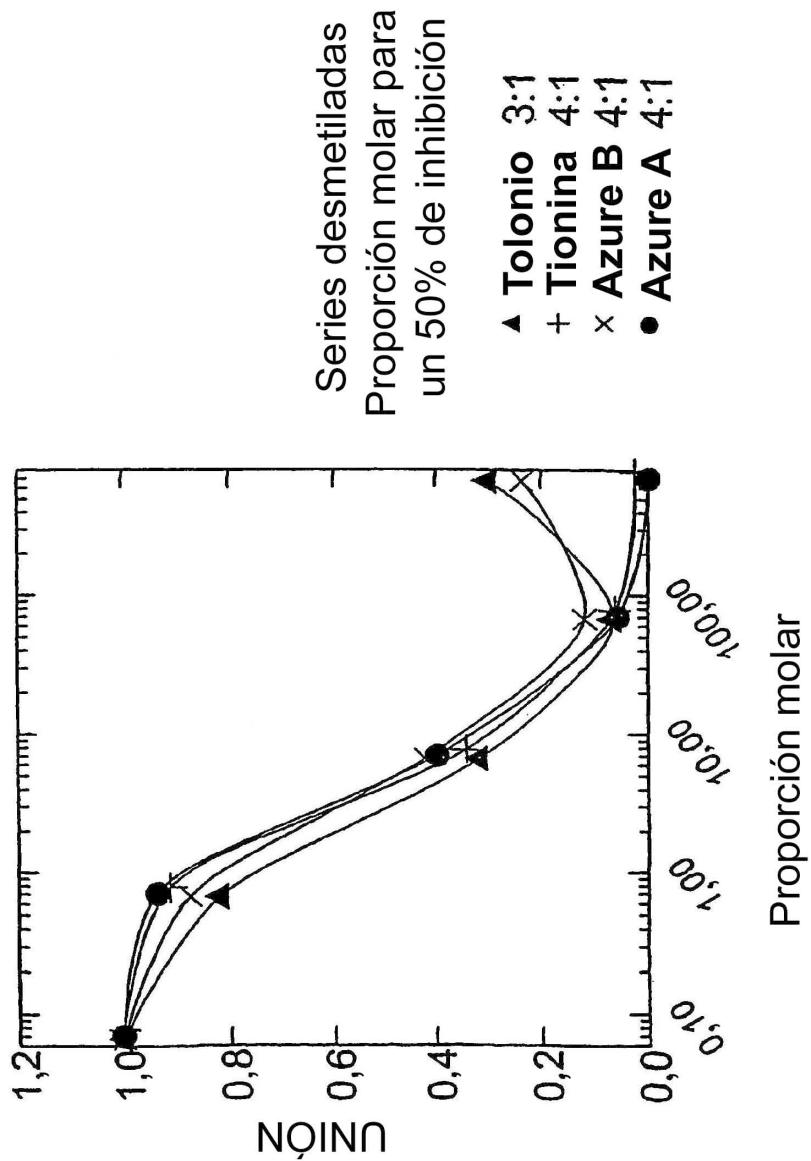


Figura 26

Unión tau-tau frente a proporción molar (compuuesto:tau)
0, 4, 6 grupos metilo

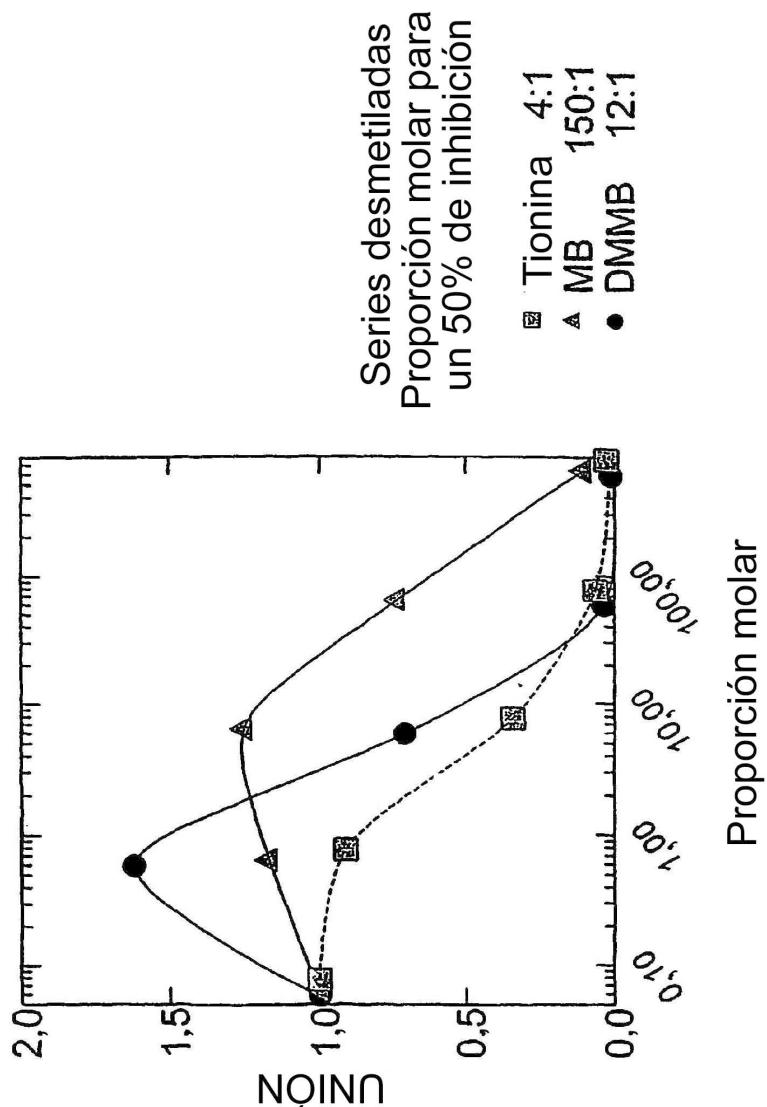


Figura 27

Determinación de la potencia inhibidora

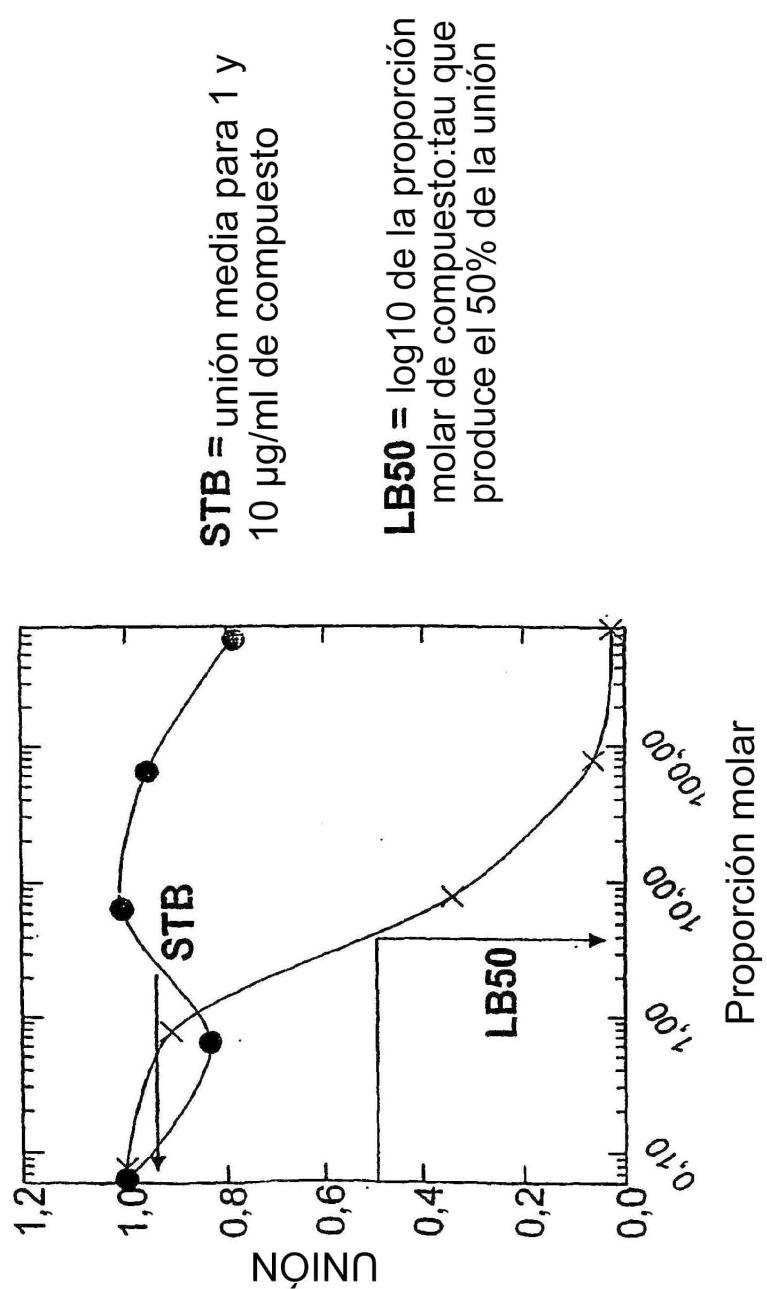


Figura 28

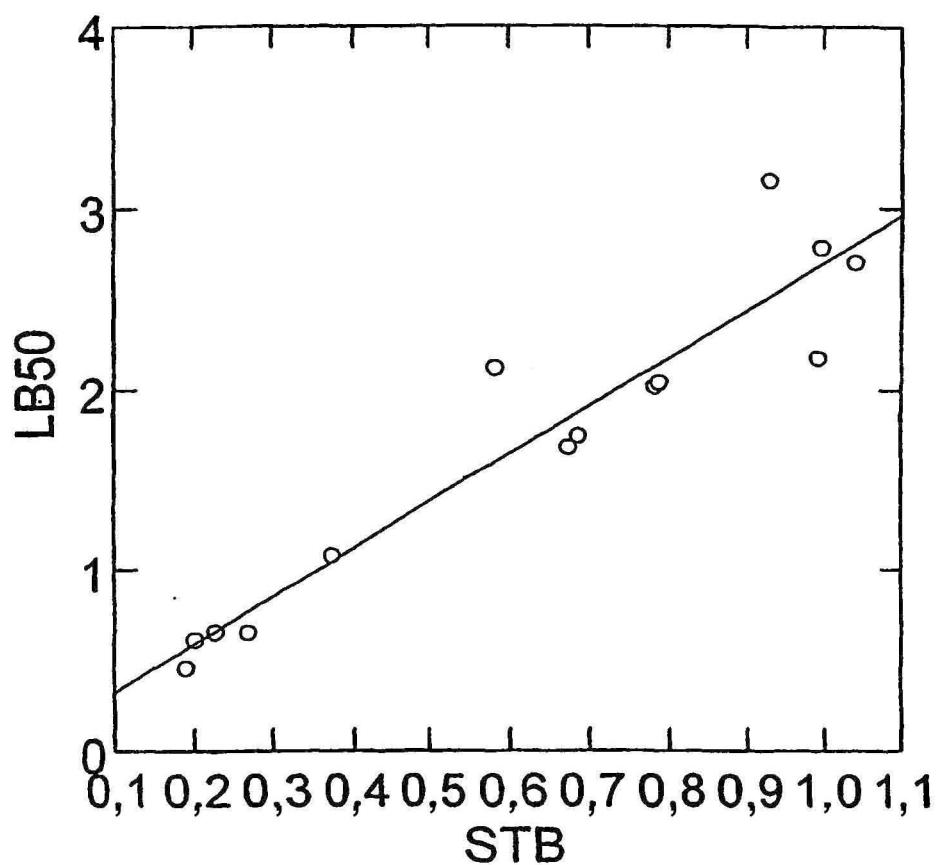


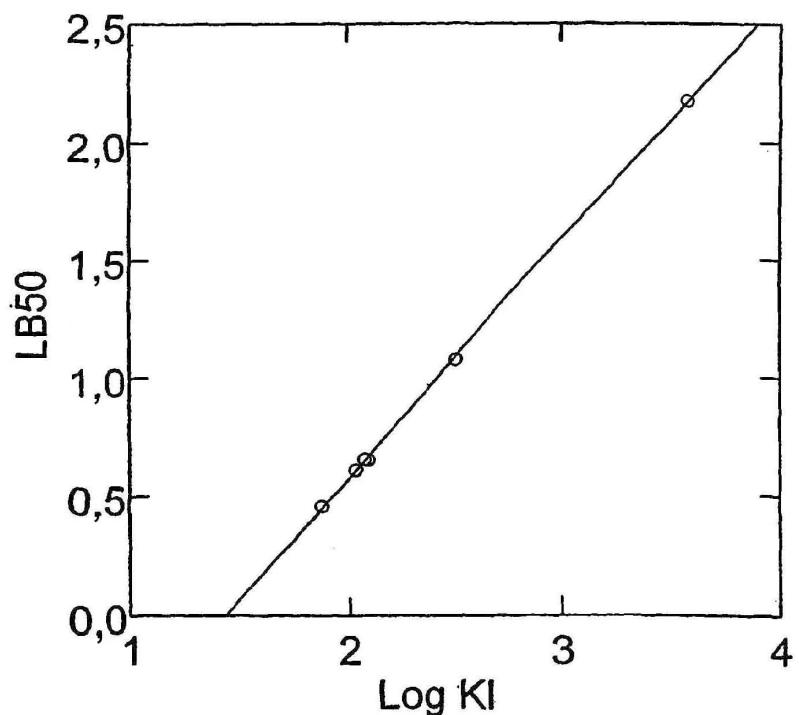
Figura 29

**Relación entre los valores de STB y B50
(proporción molar de compuesto:tau a la
cual la unión tau-tau se reduce en un 50%)**

Compuesto	STB	B50
Cloruro de tolonio	0,190	2,86
Tionina	0,201	4,06
Azure A	0,227	4,49
Azure B	0,269	4,46
Dimetil MB	0,372	12
Vitamina K	0,674	48
Rojo neutro	0,787	56
Pironina Y	0,783	104
Primulina	0,788	109
Acraflavina	0,583	132
Azul de metileno (MB)	0,992	150
Fenotiacina	1,040	508
Galocianina	0,997	608
Rojo de tiacina	0,929	1419

Figura 30

El valor de LB50 es una representación alternativa del valor de KI en el que éste puede ser determinado para las diaminofenotiacinas



$$LB50 = (1,019 * \text{Log}(KI)) - 1,471$$

Figura 31

**Número de grupos metilo
frente al potencial de
reducción y el coeficiente de
difusión**

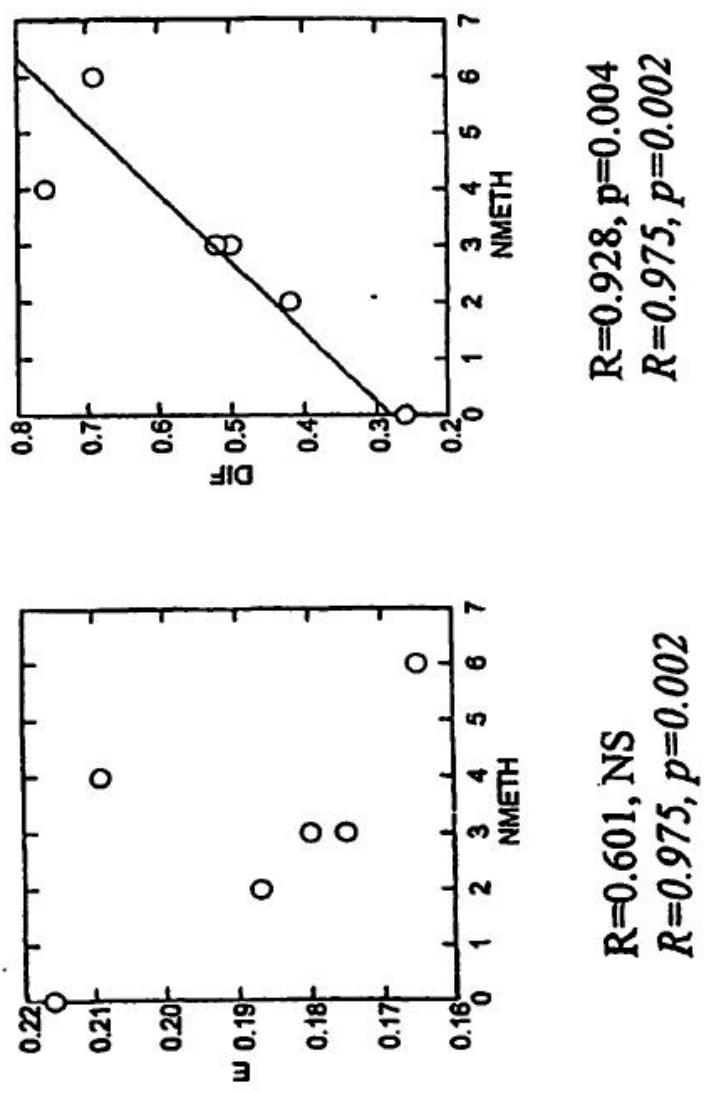
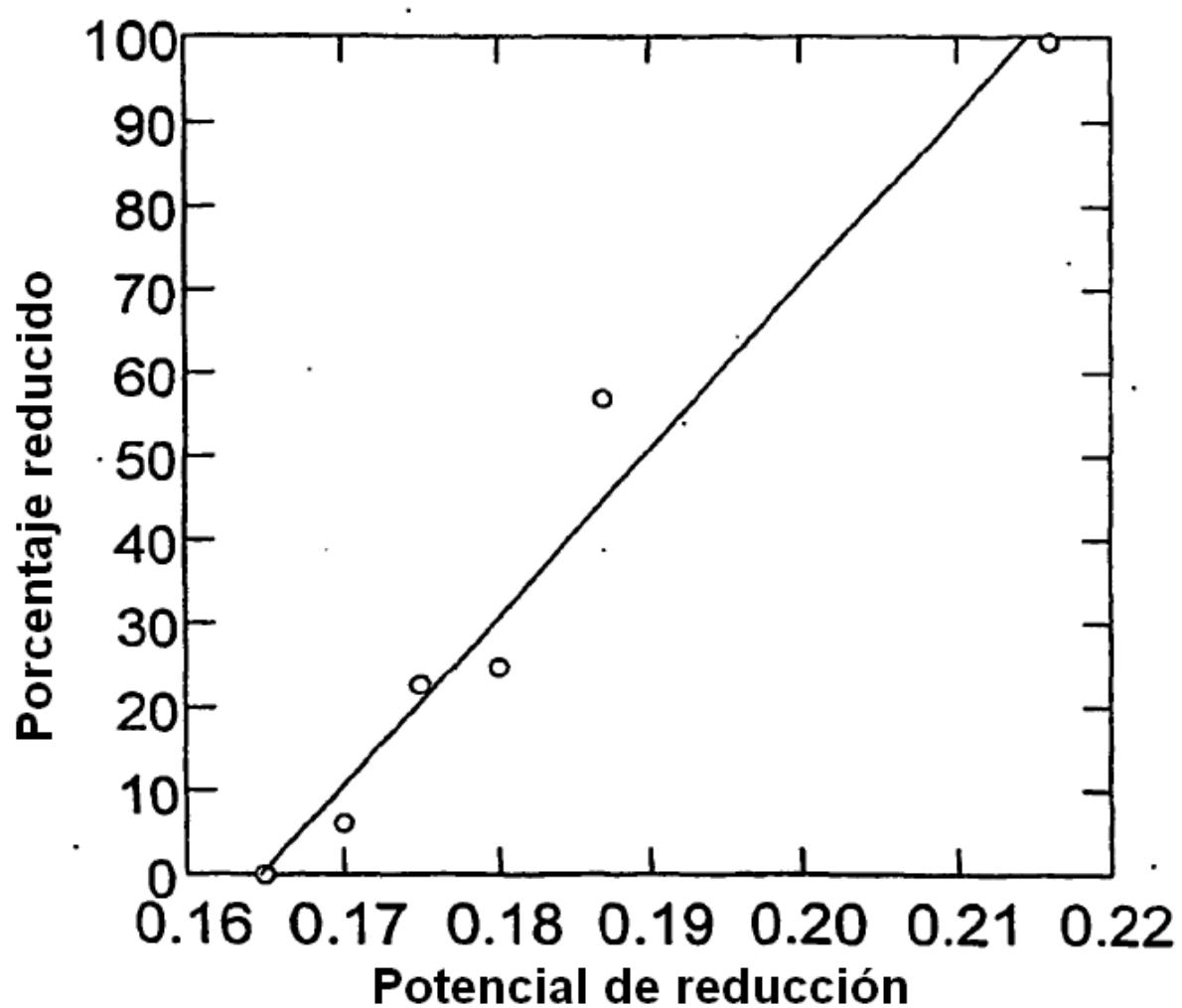


Figura 32



$$R = 0.947$$

Figura 33

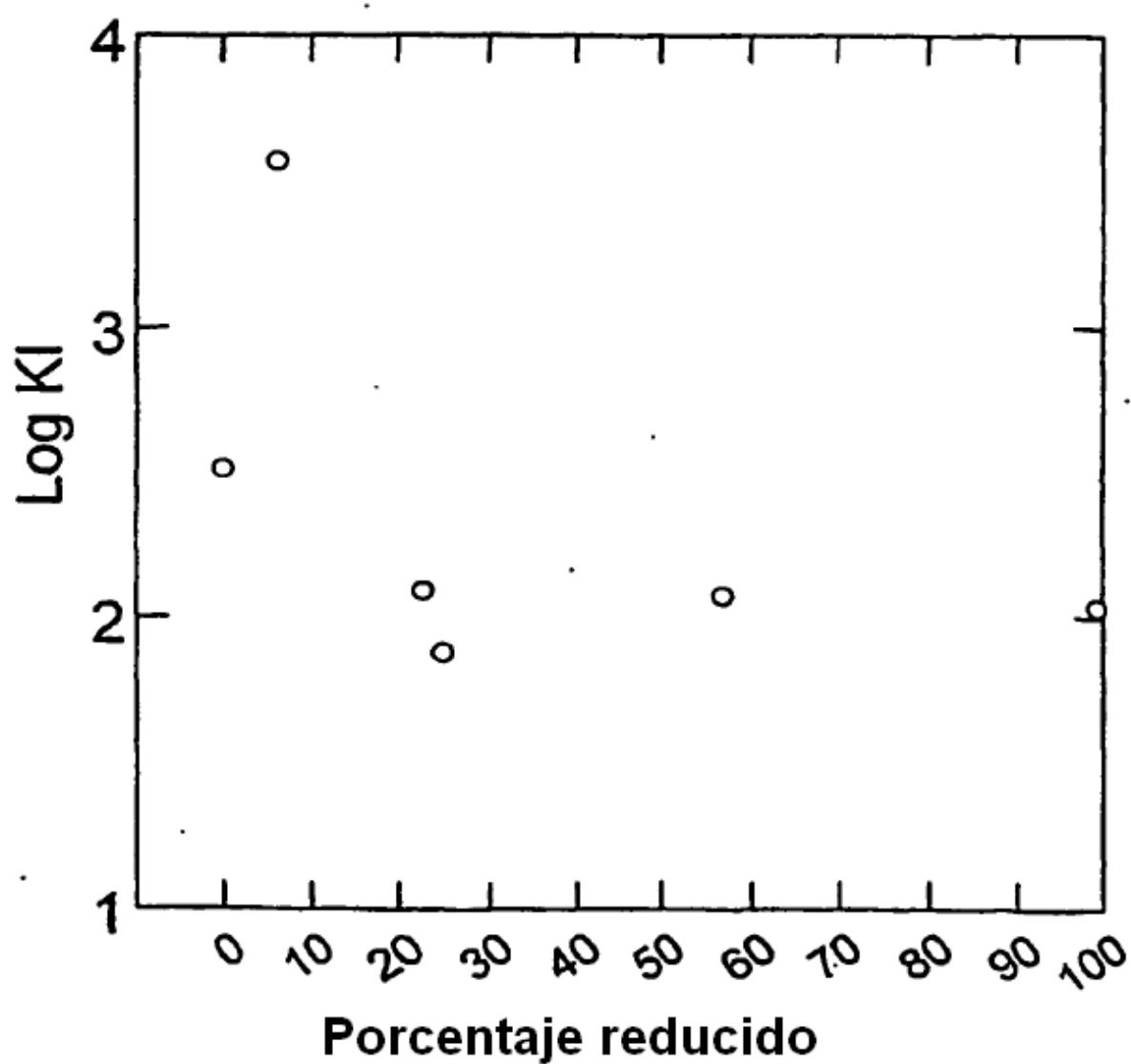
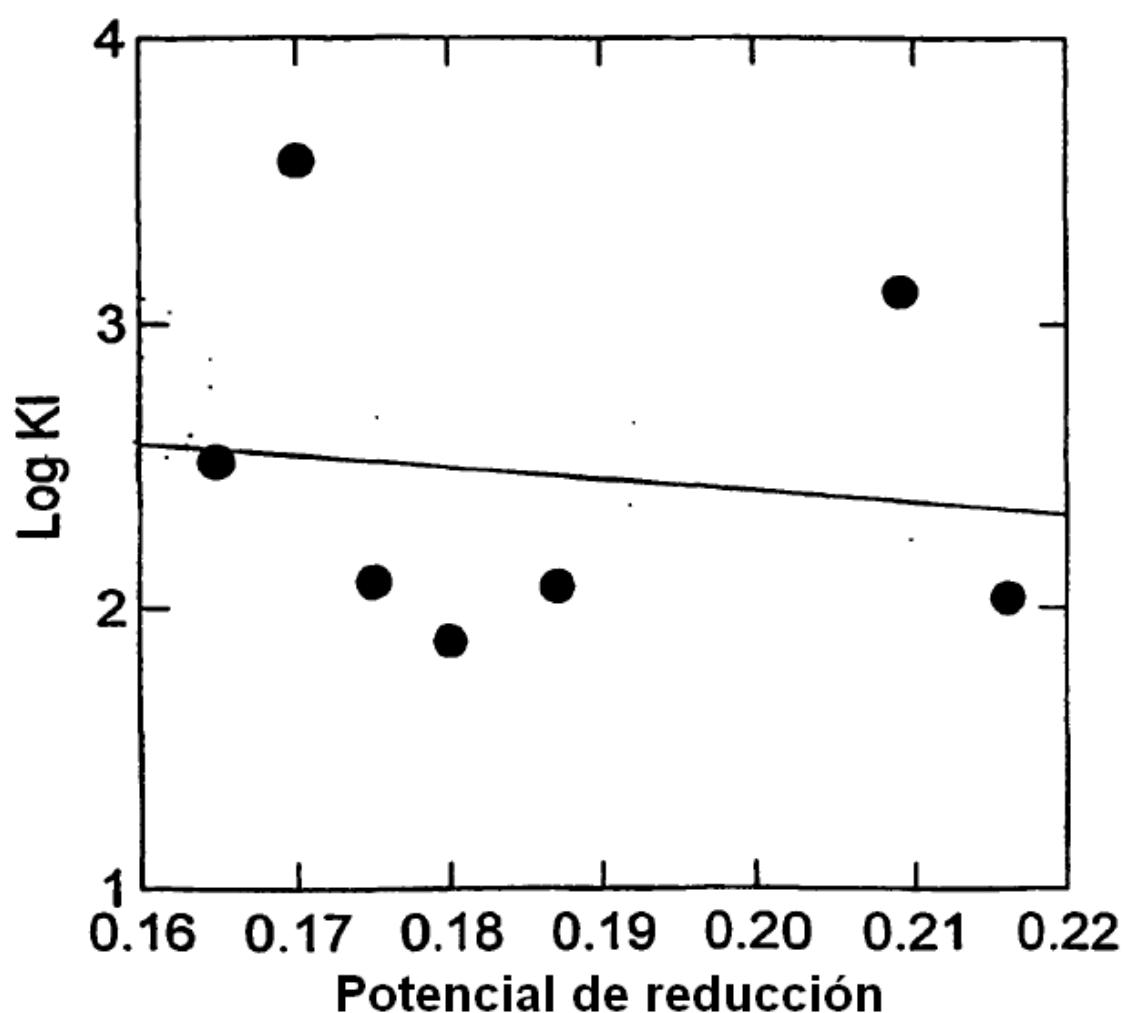
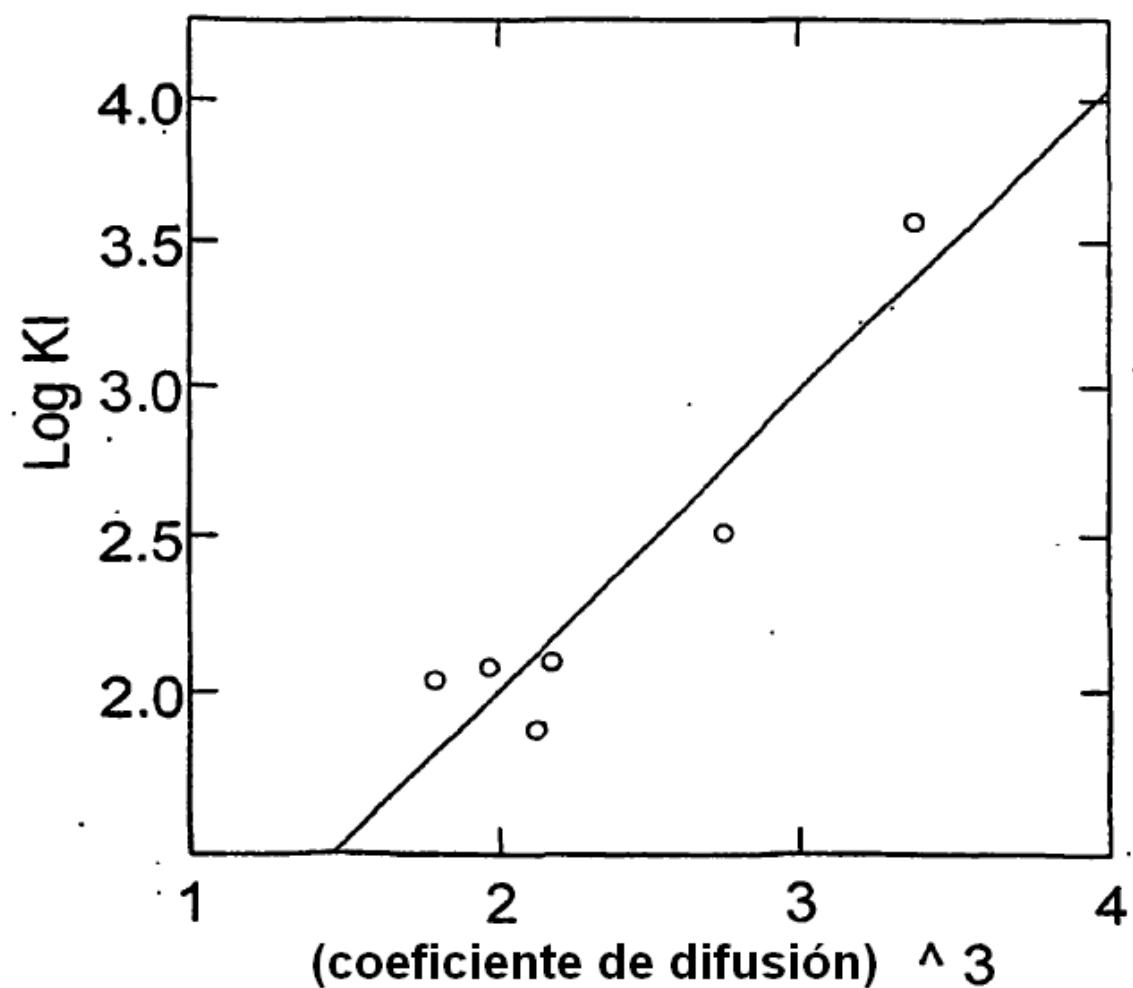


Figura 34a



La potencia inhibidora no se determina mediante el Potencial de reducción

Figura 34b



**La potencia parece estar asociada con la
eficacia de agregación de la forma reducida**

Figura 35

Aproximación de los valores de LB50 en función del potencial de reducción y el coeficiente de difusión

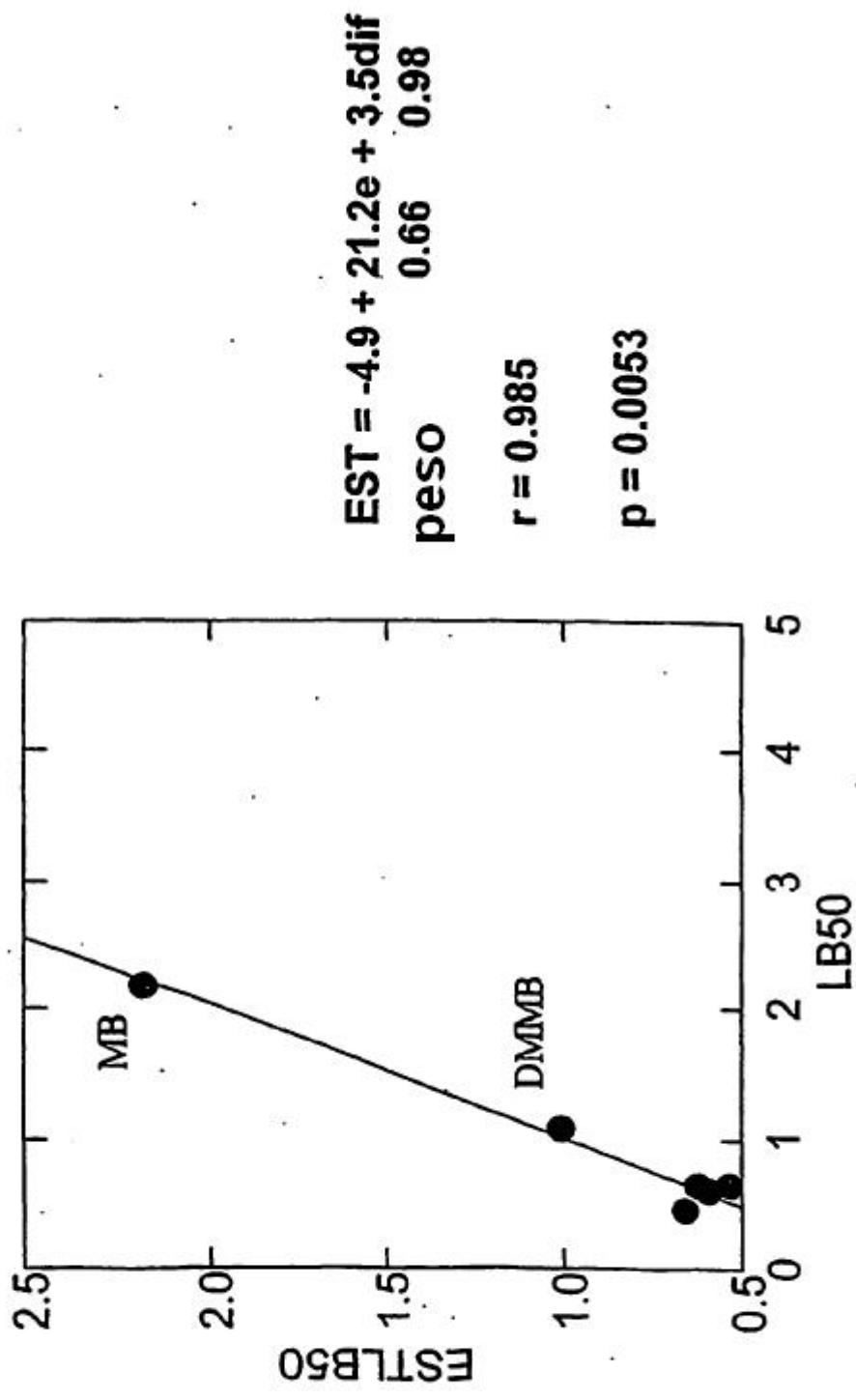


Figura 36

Aproximación de los valores de STB en función del potencial de reducción y el coeficiente de difusión

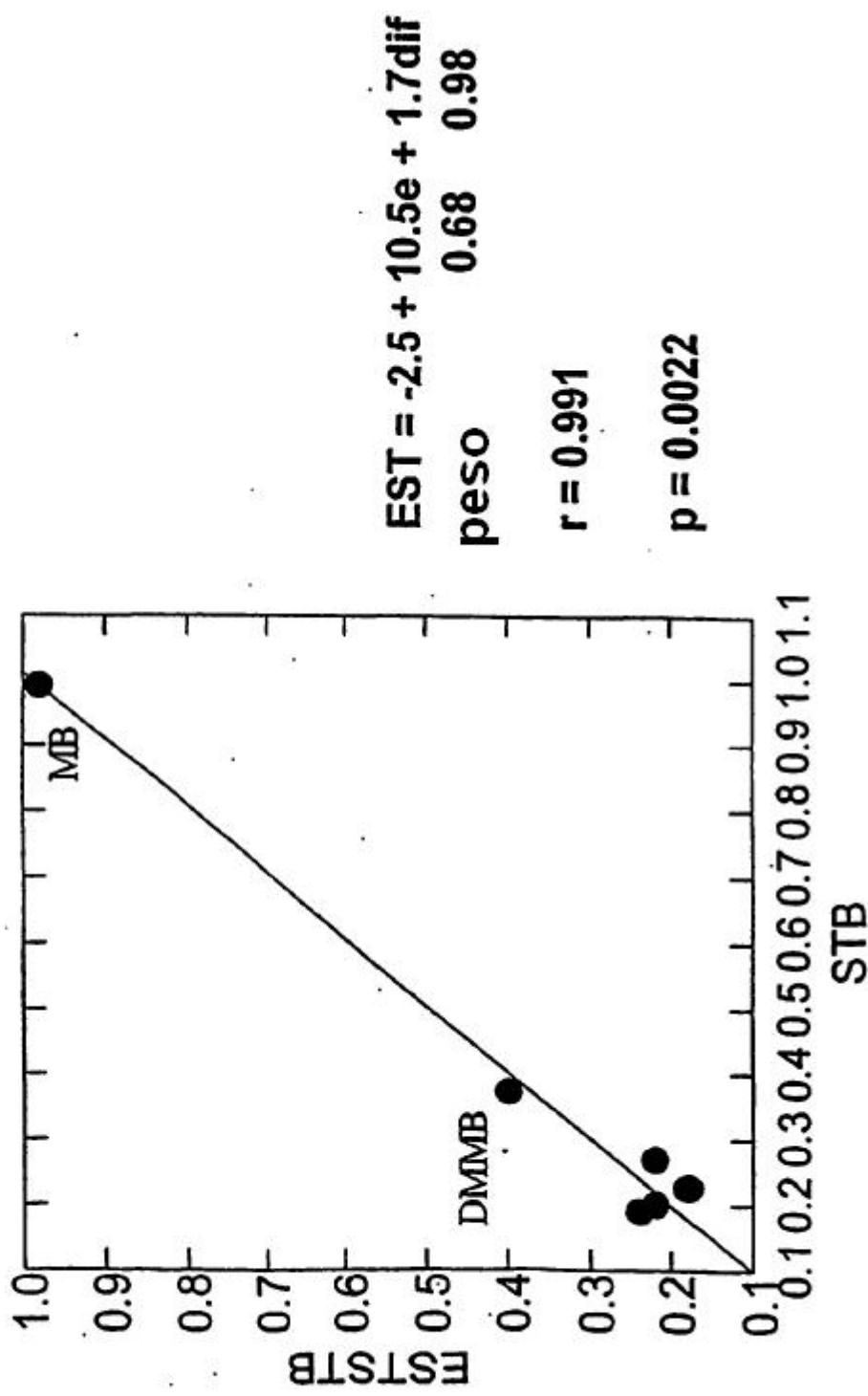


Figura 37

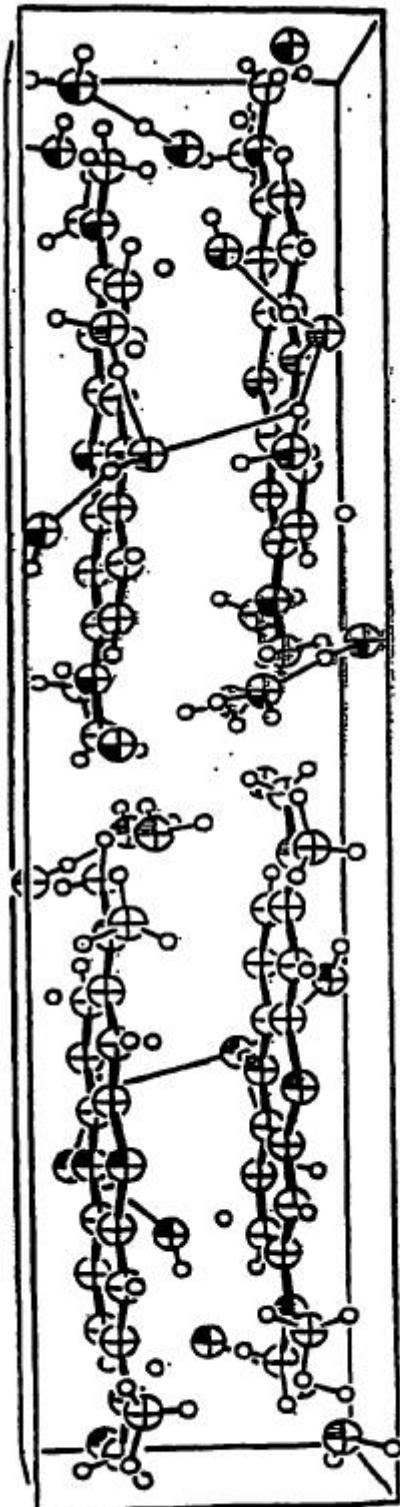
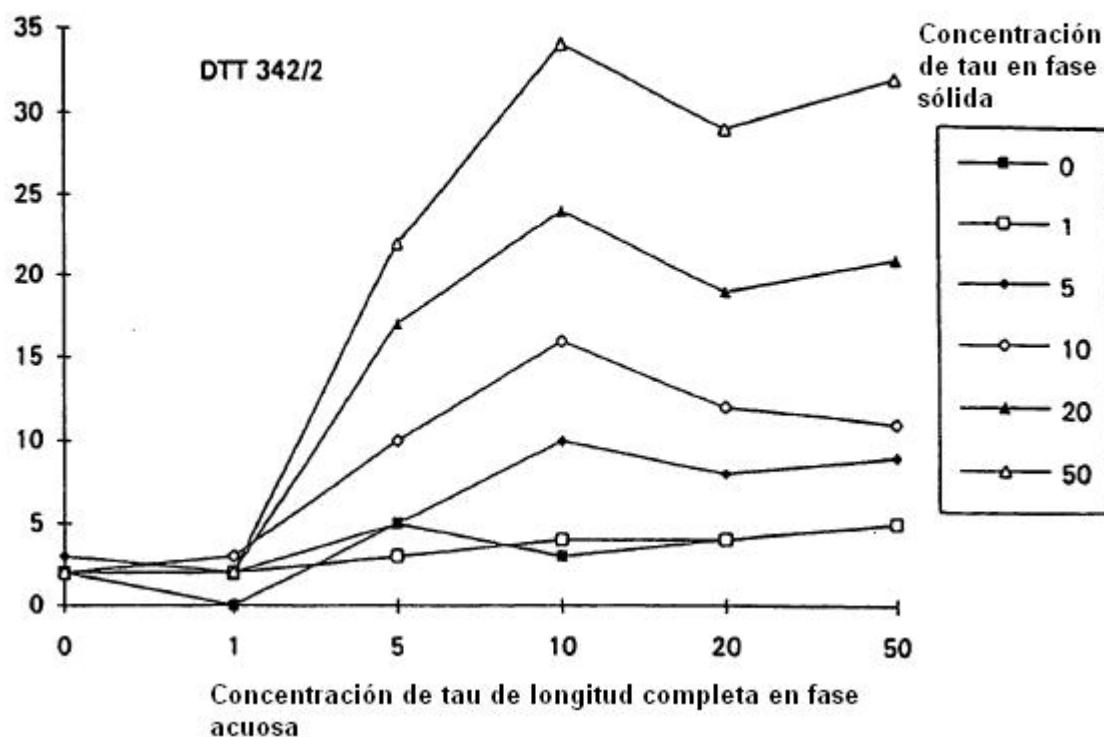


Figura 38

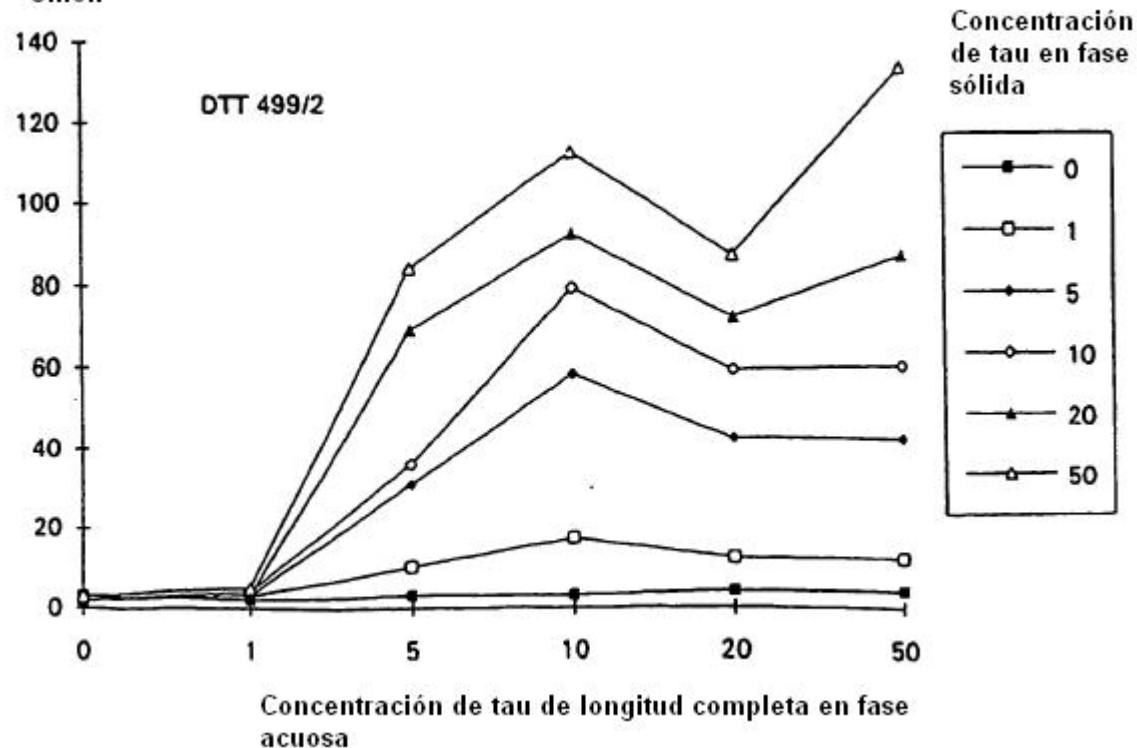
Figura 39

Unión



Concentración de tau de longitud completa en fase acuosa

Unión



Concentración de tau de longitud completa en fase acuosa

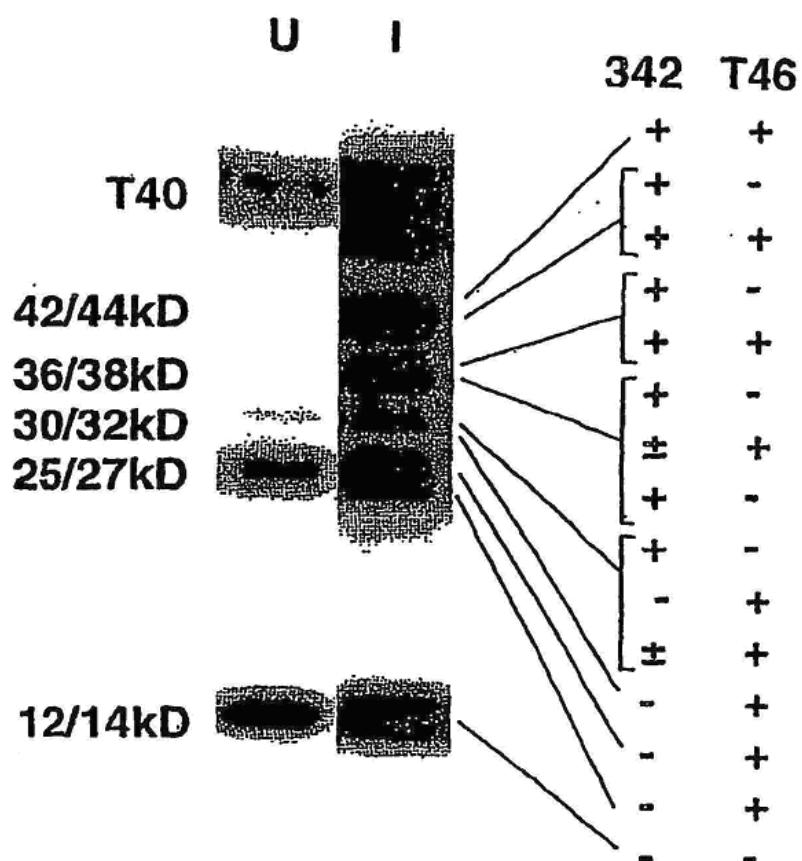


Figura 40

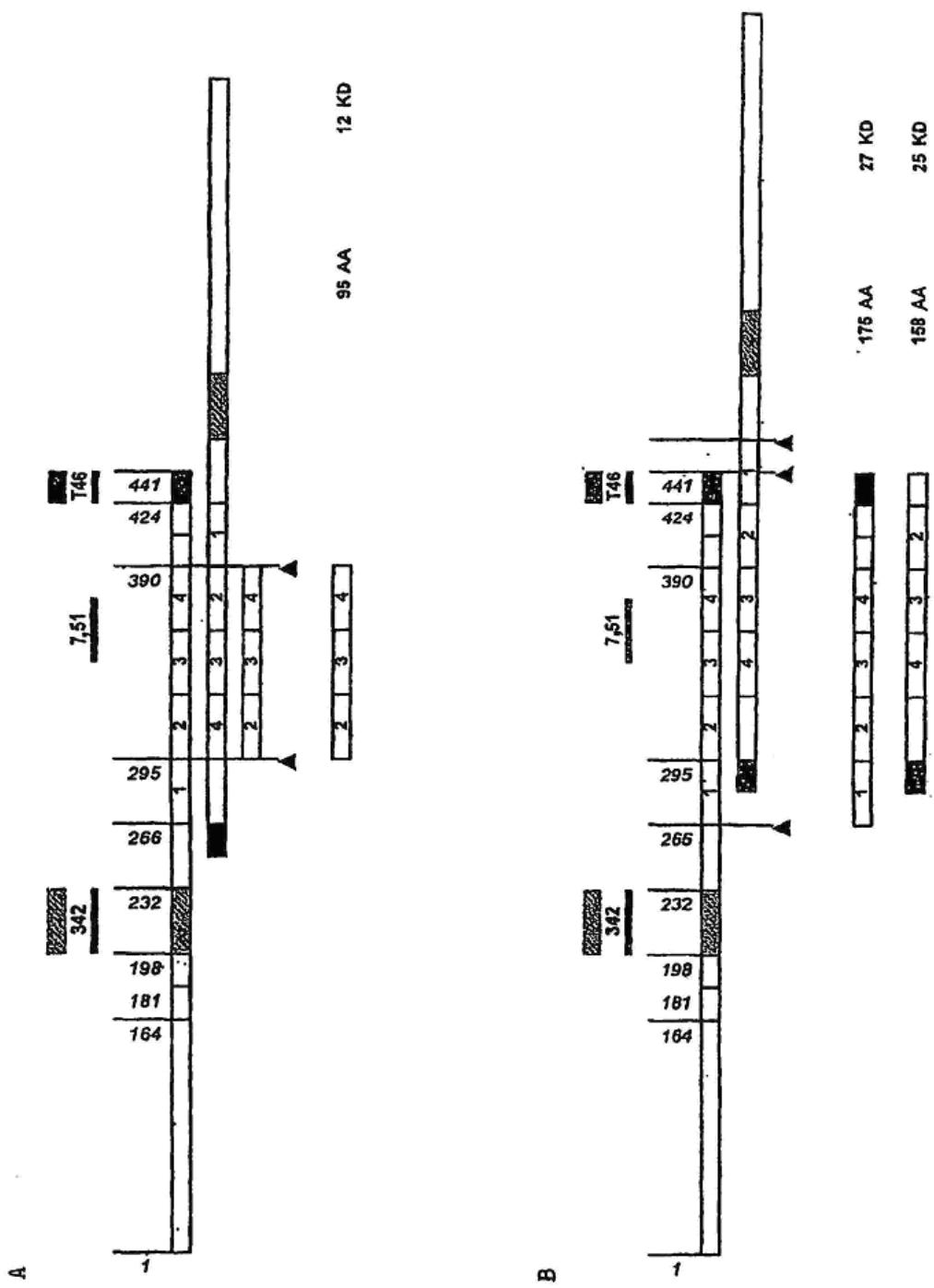


Figura 41

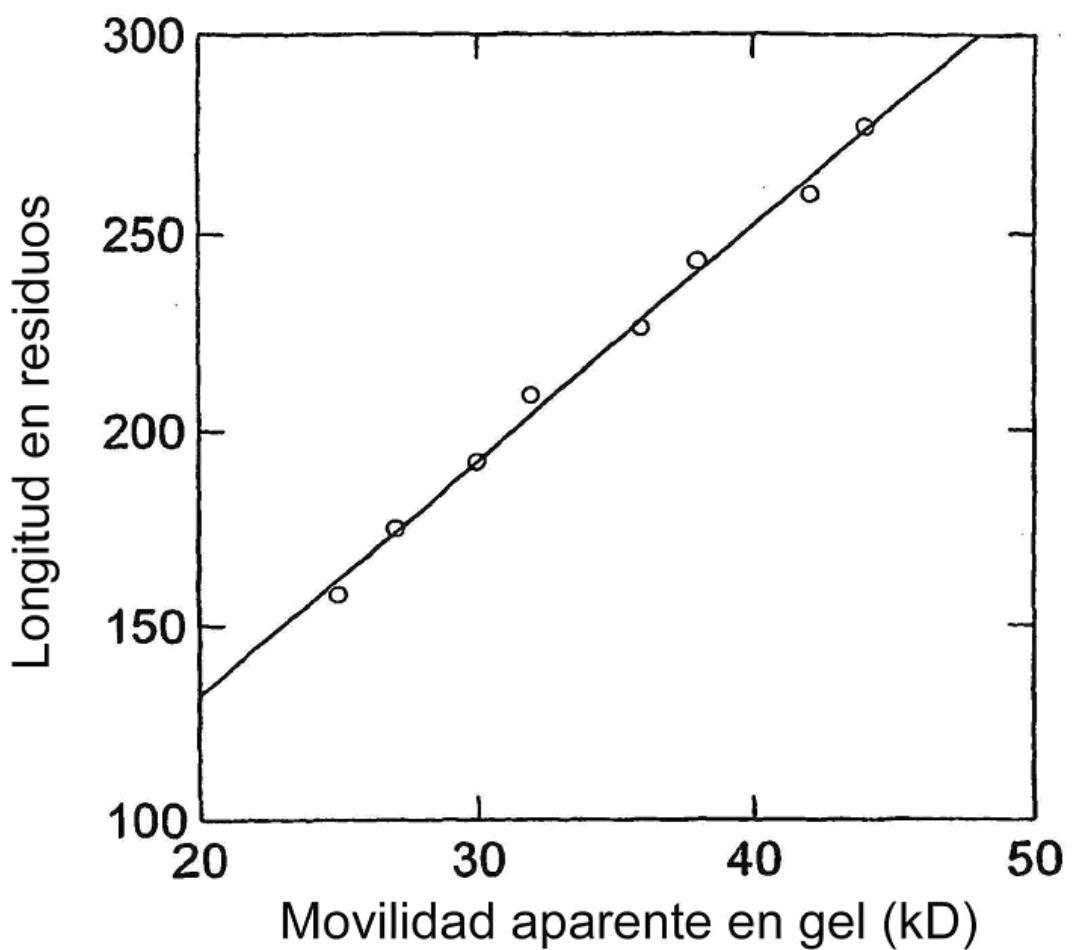


Figura 42

**DERIVACIÓN DE LOS FRAGMENTOS OBSERVADOS A PARTIR DEL PROCESADO
PROTEOLÍTICO DEL AGREGADO HEPTAMÉRICO**

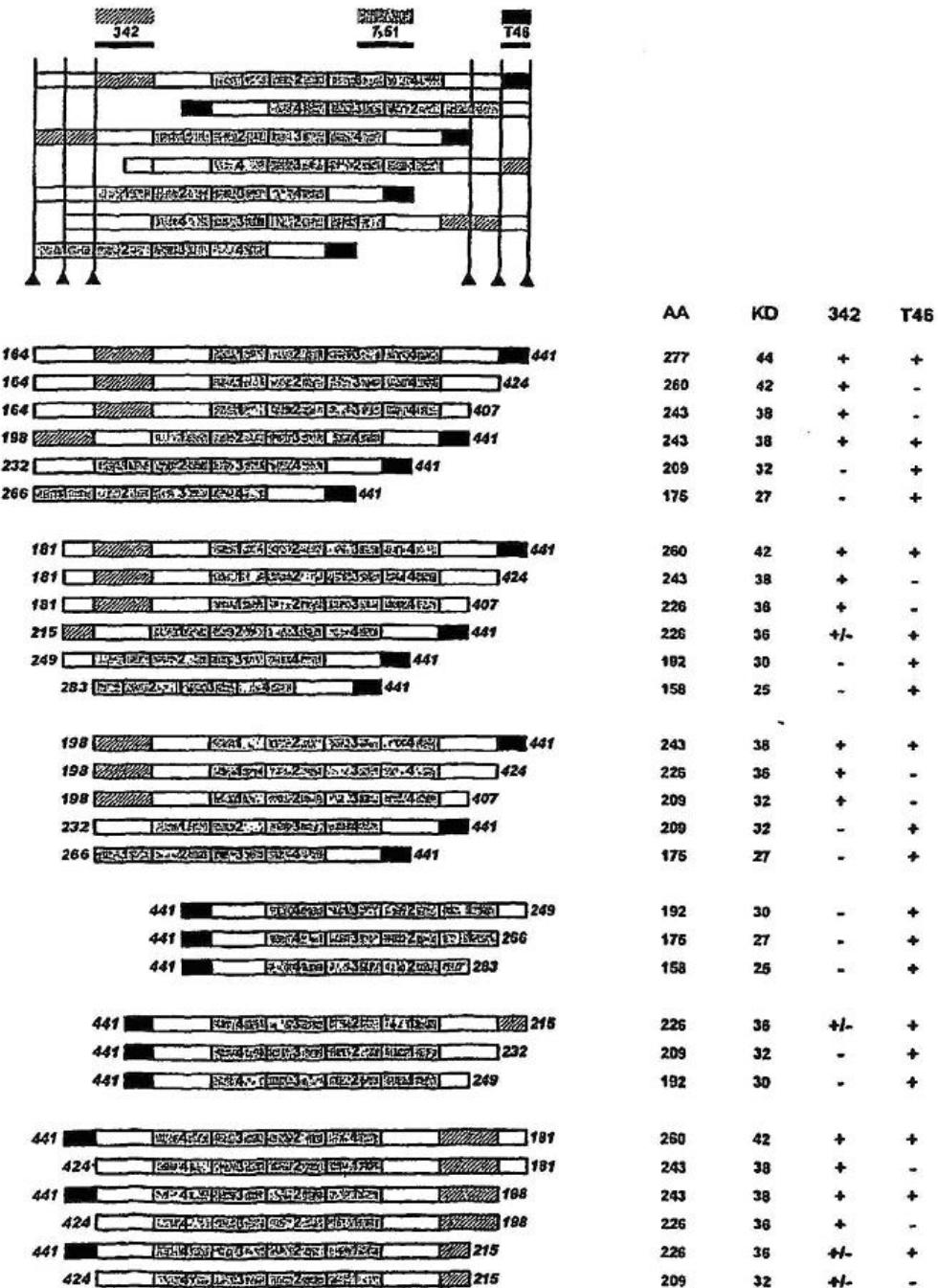


Figura 43

**FRAGMENTOS DERIVADOS DEL PROCESADO PROTEOLÍTICO
DEL AGREGADO HEPTAMÉRICO**

			AA	KD	342	T46
	342	7,51	T46			
164	[■■■■■]	1 2 3 4	441	277	44	+
164	[■■■■■]	1 2 3 4	424	260	42	+
181	[■■■■■]	1 2 3 4	441	260	42	+
164	[■■■■■]	1 2 3 4	407	243	38	-
181	[■■■■■]	1 2 3 4	424	243	38	-
198	[■■■■■]	1 2 3 4	441	243	38	+
181	[■■■■■]	1 2 3 4	407	226	36	-
215	[■■■■■]	1 2 3 4	441	226	36	+/-
198	[■■■■■]	1 2 3 4	424	226	36	-
198	[■■■■■]	1 2 3 4	407	209	32	-
232	[■■■■■]	1 2 3 4	441	209	32	+
424	[■■■■■]	4 3 2 1	215	209	32	+/-
249	[■■■■■]	1 2 3 4	441	192	30	-
266	[■■■■■]	1 2 3 4	441	176	27	-
283	[■■■■■]	2 3 4	441	168	25	-

Figura 44

Inhibición de la agregación de tau por el diMMB

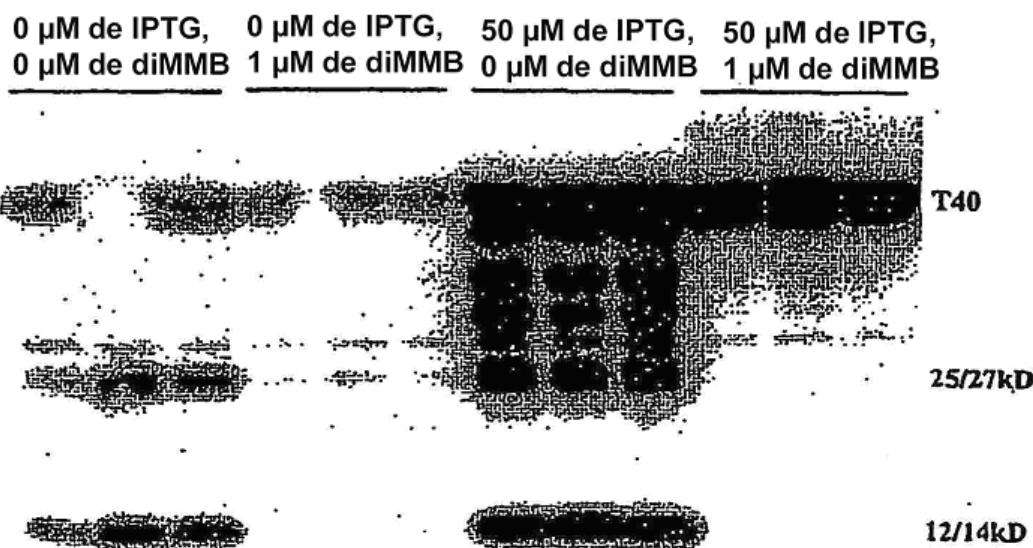
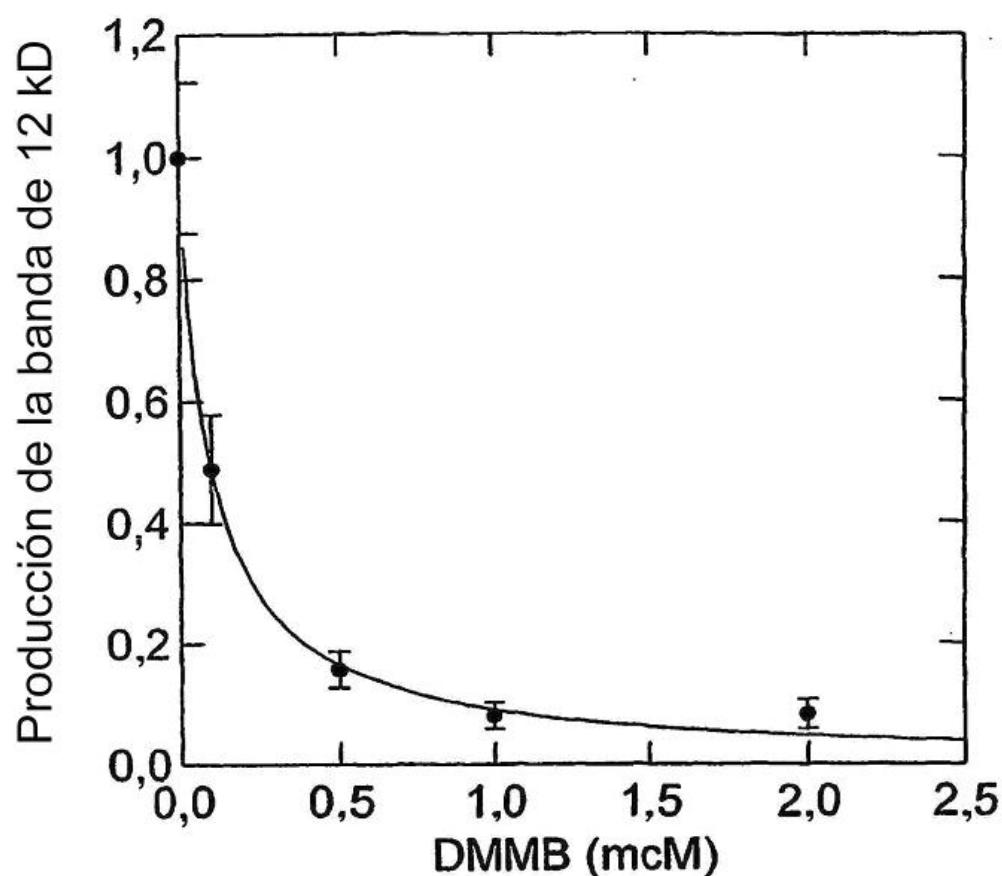


Figura 45



Actividad observada frente a predicha

$r = 1,00$

Concentración de tau intracelular

500 nM

Afinidad de unión tau-tau

22 nM

4.4 nM

100 nM

Figura 46