

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 095**

51 Int. Cl.:

A61K 31/52 (2006.01)
C07D 473/40 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2007 PCT/US2007/072671**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2008 WO08005937**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2007 E 07812557 (2)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2034839**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades neurodegenerativas a través de la inhibición de Hsp90**

30 Prioridad:

30.06.2006 US 806427 P

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

04.12.2017

73 Titular/es:

**SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH (50.0%)
 OFFICE OF INDUSTRIAL AFFAIRS, 1275 YORK AVENUE
 NEW YORK, NEW YORK 10021, US y
 THE ROCKEFELLER UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CHIOSIS, GABRIELA;
 GREENGARD, PAUL;
 DOU, FEI y
 LUO, WENJIE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 645 095 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

Tratamiento de enfermedades neurodegenerativas a través de la inhibición de Hsp90

Reivindicación de prioridad

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de EE. UU. N° 60/806.427, presentada el 30 de junio de 2006.

Declaración de financiación federal

Esta invención fue apoyada en parte por la subvención NIH AG09464. El gobierno de los Estados Unidos puede tener ciertos derechos en esta invención.

Antecedentes de la invención

10 Esta solicitud se refiere al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas a través de la inhibición de la proteína de choque térmico 90 (HSP90).

15 La familia HSP90 de proteínas tienen cuatro miembros reconocidos en células de mamífero: Hsp90 α y β , Grp94 y Trap-1. Hsp90 α y β existen en el citosol y el núcleo en asociación con un número de otras proteínas. Hsp90 en sus diversas formas es la chaperona celular más abundante, y se ha mostrado en sistemas experimentales que se requiere para el repliegamiento dependiente de ATP de proteínas desnaturalizadas o "desplegadas". Por lo tanto, se ha propuesto que funciona como parte de la defensa celular contra el estrés. Cuando las células se exponen a calor u otros estreses ambientales, la agregación de proteínas desplegadas se evita mediante rutas que catalizan su repliegamiento o degradación. Este proceso depende de la asociación de la proteína desplegada de un modo ordenado con múltiples chaperonas (Hsp 60, 90 y 70 y p23), formando un "repliegosoma" y finalmente la liberación dependiente de ATP de las chaperonas a partir de la proteína repliegada.

25 Hsp90 también puede representar un papel en el mantenimiento de la estabilidad y la función de proteínas mutadas. Parece requerirse para la expresión de p53 y v-src mutadas hasta un grado mucho mayor que para sus homólogos silvestres. Se ha sugerido que esto se produce como resultado de la supresión mediada por Hsp90 de los fenotipos de mutaciones que conducen al desplegamiento de proteínas.

30 Hsp90 también es necesaria para la maduración conformacional de varias proteínas clave implicadas en la respuesta de crecimiento de la célula a factores extracelulares. Estas incluyen los receptores de esteroides así como ciertas cinasas transmembranarias (es decir, serina cinasa Raf, v-src y Her2). El mecanismo por el que Hsp90 afecta a estas proteínas no se entiende totalmente, pero parece ser similar a su papel en el repliegamiento de proteínas. En el caso del receptor de progesterona, se ha mostrado que la unión y la liberación de Hsp90 del receptor se produce de un modo cíclico en conjunto con la liberación de otras chaperonas e inmunofilinas y se requiere para la unión de alta afinidad del esteroide al receptor. Así, Hsp90 podría funcionar como un regulador fisiológico de rutas de señalización, incluso en ausencia de estrés.

40 Se ha mostrado que Hsp90 se sobreexpresa en múltiples tipos de tumores y como una función de la transformación oncogénica. Se desconoce si representa un papel en el mantenimiento de la transformación, pero podría tener al menos tres funciones a este respecto. Las células cancerosas crecen en un ambiente de hipoxia, pH bajo y baja concentración de nutrientes. También se adaptan rápidamente a o se seleccionan para hacerse resistentes a radiación y agentes quimioterapéuticos citotóxicos. Así, el papel general de Hsp90 en el mantenimiento de la estabilidad de proteínas bajo estrés puede ser necesario para la viabilidad celular bajo estas condiciones. En segundo lugar, las células cancerosas alojan proteínas oncogénicas mutadas. Algunas de estas son mutaciones de ganancia de función que son necesarias para el fenotipo transformado. Hsp90 se puede requerir para mantener la conformación plegada funcionalmente activa de estas proteínas. En tercer lugar, la activación de rutas de señalización mediadas por receptores de esteroides, Raf y otras dianas de Hsp90 es necesaria para el crecimiento y la supervivencia de muchos tumores que así probablemente también requieren Hsp90 funcional.

50 Es probable que la neurodegeneración, de forma similar al cáncer, no sea el resultado de un solo episodio de desregulación, sino en cambio un proceso en varias etapas que implica episodios ambientales, epigenéticos y genéticos que conducen a la creación de un fenotipo transformado complejo manifestado por expresión anormal, modificación postraduccional y procesamiento de ciertas proteínas. El mantenimiento funcional de estas proteínas desreguladas en neuronas puede requerir, análogamente a la célula afectada por cáncer, que el mecanismo regulador de chaperonas moleculares evoluciones junto con el proceso de transformación.

55 En el contexto de las enfermedades neurodegenerativas, Hsp90 puede representar dos papeles. En primer lugar, las cinasas (tales como cdk5/p35, gsk3beta) activadas aberrantemente en enfermedades neurodegenerativas pueden

requerir Hsp90 para funcionar. Así, la inhibición de Hsp90 puede restaurar redes de señalización dañadas en el cerebro enfermo al aliviar la fosforilación aberrante, conduciendo a la reducción de la agregación de proteínas aberrantes y la eliminación o la reducción de agregados y de su toxicidad asociada. En segundo lugar, los mutantes patógenos (tales como de APP o presenilinas en AD o mtau en FTDP-17 o receptor de andrógeno mutante en la atrofia muscular bulbar) pueden requerir Hsp90 para corregir el plegamiento y el funcionamiento, así, la inhibición de Hsp90 puede conducir a la eliminación de estas proteínas y dar como resultado la reducción de agregados y la formación consiguiente de placas u ovillos.

La mayoría de las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan probablemente tanto por mutantes como por señalización aberrante, y asimismo Hsp90 puede representar un papel con respecto a mutantes patógenos. Las mutaciones tau provocan demencia frontotemporal dominante autosómica. Las patologías conectadas a mutaciones del receptor de andrógeno incluyen el síndrome de insensibilidad androgénica completo (CAIS) y la atrofia muscular espinal y bulbar (SBMA o enfermedad de Kennedy). (4) Las mutaciones en los genes de presenilina son la principal causa de AD familiar. El análisis de ratones con inactivación génica condicional ha mostrado que la inactivación de presenilinas da como resultado un deterioro de la memoria progresivo y neurodegeneración dependiente de la edad, sugiriendo que la reducción de la actividad de presenilina podría representar un mecanismo patógeno importante. Las presenilinas regulan positivamente la transcripción de genes que contienen elementos de respuesta a cAMP (CRE), algunos de los cuales se sabe que son importantes para la formación de la memoria y la supervivencia neuronal. (5) La enfermedad de Alzheimer (AD) se caracteriza tanto por NFTs (agregados tau) como por placas (depósitos de A β). En la enfermedad de Alzheimer, las mutaciones en la proteína precursora de amiloide o en las presenilinas provocan una enfermedad dominante autosómica. Estos son el sustrato y las proteasas responsables de la producción del péptido A β depositado. Las mutaciones priónicas provocan el síndrome de Gerstmann Straussler y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob hereditaria, las mutaciones de alfa-sinucleína provocan enfermedad de Parkinson dominante autosómica. En estos casos, la mutación patógena está en la proteína que se deposita en el tejido enfermo y toda la proteína se deposita. La enfermedad de Huntington resulta de una huntingtina mutante. (9) Así, en todos los casos, las mutaciones conducen a la enfermedad mediante un mecanismo que implica el proceso de deposición.

Estas características de Hsp90 la convierten en una diana viable para agentes terapéuticos. Los miembros de la familia de HASP90 poseen un bolsillo único en su región N-terminal que es específico para y se conserva entre todas las Hsp90s desde bacterias hasta mamíferos, pero que no está presente en otras chaperonas moleculares. El ligando endógeno para este bolsillo no se conoce, pero se une a ATP y ADP con baja afinidad y tiene una débil actividad de ATPasa. Se ha mostrado que los antibióticos de ansamicina geldanamicina (GM) y herbimicina (HA) se unen a este bolsillo conservado, y esta afinidad de unión se ha mostrado para todos los miembros de la familia de HSP90. La Publicación de Patente Internacional N° WO98/51702 divulga el uso de antibióticos de ansamicina acoplados a un resto de elección como diana para proporcionar el aporte dirigido de la ansamicina que conduce a la degradación de proteínas y a la muerte de las células elegidas como diana. La Publicación de Patente Internacional N° WO00/61578 se refiere a moléculas bifuncionales que tienen dos restos que interactúan con la proteína chaperónica Hsp90, incluyendo en particular homo- y heterodímeros de antibióticos de ansamicina. Estas moléculas bifuncionales actúan para promover la degradación y/o la inhibición de tirosina cinasas de la familia HER y son eficaces para el tratamiento de cánceres que sobreexpresan cinasas Her.

Agentes terapéuticos de molécula pequeña ejemplares que se unen al mismo bolsillo de unión de Hsp90 como ATP y los antibióticos de ansamicina se divulgan en la Publicación PCT N° WO02/36075, la Publicación PCT N° PCT/US06/03676 y las Publicaciones de Patente de EE. UU. 2005-0113339, 2005-0004026, 2005-0049263, 2005-0256183, 2005-0119292, 2005-0113340 y 2005-0107343.

En organismos viejos, la sobrecarga de chaperonas conduce a una disminución significativa en la robustez de redes celulares que cambian su función hacia un comportamiento más estocástico. El requerimiento de chaperonas y la capacidad de las chaperonas desequilibrados ayudan a la acumulación de proteínas plegadas incorrectamente y agregadas especialmente en el sistema nervioso, debido al potencial de proliferación muy limitado de las neuronas. Además, las redes de señalización dañadas pierden su rigor original, y se produce una fosforilación de proteínas irregular. Un enfoque atractivo para aliviar e invertir estos efectos dañinos es al modular la actividad de Hsp90. Los inhibidores de la actividad de Hsp90 liberan HSF1 de complejos de Hsp90 y corrigen la regulación defectuosa de la actividad de HSF1 después de un estrés térmico que conduce a un incremento en los niveles celulares de chaperonas, tales como Hsp70 y Hsp40. Se ha mostrado que la sobreexpresión de estas chaperonas representa un modo general de reinstaurar el plegamiento y aliviar los efectos tóxicos de proteínas plegadas incorrectamente. Además de sus efectos sobre la reinstauración del plegamiento correcto, los inhibidores de Hsp90 pueden regular proteínas implicadas en redes de señalización de neuronas enfermas.

Sin embargo, la utilidad de los inhibidores de Hsp90 como agentes clínicos en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas dependerá de si sus efectos se producen a concentraciones de fármaco que son tolerables para el paciente y de si los fármacos se pueden administrar de tal modo que se alcancen estas concentraciones en el cerebro. Desgraciadamente, los inhibidores de Hsp90 conocidos tales como geldanamicina y 17AAG, su derivado en un ensayo clínico en Fase I para el cáncer y el compuesto no relacionado radicalol tienen limitaciones significativas. Son poco solubles, difíciles de formular y no cruzan la barrera hematoencefálica. Así, a fin de conseguir el potencial

para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, se necesitan agentes terapéuticos que inhiban Hsp90 y que tengan suficiente solubilidad y la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica o se aporten de otro modo al cerebro.

5 El documento WO 2006/130469 A1 se dirige a métodos para promover la regeneración nerviosa que implican administrar al menos un compuesto, tal como una purina, un derivado de purina o un análogo de purina, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 HE H y cols., JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, Vol. 49, N° 1, páginas 381-390, describe la identificación de inhibidores de la estructura purínica de la proteína de choque térmico 90.

15 SOTI CSABA y cols., BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, BASINGSTOKE, HANTS; GB, Vol. 146, No. 6, páginas 769-780, analiza la idoneidad de proteínas de choque térmico como diana terapéuticas.

LUO WENJIE y cols., PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, Vol. 104, N° 22, páginas 9511-9516, analiza los papeles de proteínas de choque térmico en las tauopatías.

20 **Sumario de la invención**

Según la presente invención, el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas se consigue usando compuestos con estructura purínica de molécula pequeña como los definidos en la reivindicación 1 que inhiben Hsp90 y que poseen la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica. Así, según la presente invención, se proporciona un uso para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa de un compuesto con estructura purínica como el definido en la reivindicación 1 que inhibe Hsp90, y que cruza la barrera hematoencefálica o se aporta de otro modo al cerebro.

25 En una realización, el compuesto con estructura purínica que se define en la reivindicación 1 usando en la invención tiene un resto de purina conectado en la posición 8 o 9 a través de un conector a un grupo sustituyente monocíclico. Estos compuestos se describen en la Publicación PCT N° WO02/36075, la Publicación PCT N° PCT/US06/03676 y las Publicaciones de Patente de EE. UU. 2005-0113339, 2005-0004026, 2005-0049263, 2005-0256183, 2005-0119292, 2005-0113340 y 2005-0107343.

30 En una realización, el método de la invención hace uso de un compuesto con estructura purínica de molécula pequeña según se define en la reivindicación 1.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1A muestra la actividad de fosforilación de tau en cerebro de ratón después de la administración a corto plazo de PU24FCI.

La Fig. 1B muestra la concentración de PU24FCI en cerebro de ratón después de la administración a corto plazo.

40 La Fig. 2 muestra los efectos de la inhibición de Hsp90 a largo plazo con PU24FCI sobre la fosforilación de tau y la expresión de otras proteínas.

La Fig. 3 muestra los efectos de la inhibición de Hsp90 a largo plazo con PU-DZ8 sobre la fosforilación de tau.

La Fig. 4 muestra compuestos útiles en el método de la invención.

La Fig. 5 muestra un esquema sintético para elaborar compuestos útiles en la invención.

45 La Fig. 6 muestra un esquema sintético para elaborar compuestos útiles en la invención.

Las Figs. 7A y B muestran niveles de diversas proteínas en los cerebros de ratones tratados según la invención mediante la administración intraperitoneal de un compuesto con estructura purínica.

50 La Fig. 8 muestra la degradación de la proteína mutante, mtau (HT7), después de la administración de una dosis de PU-DZ8. También muestra el cambio en los niveles de chaperonas (incremento de hsp70) la expresión de cinasas (niveles de p35).

La Fig. 9 muestra la dependencia de proteína tau mutante sobre la chaperonización de hsp90.

Las Figs. 10A y B muestran la unión a hsp90 y la inducción de hsp70 por compuestos con estructura purínica en células de neuroblastoma.

La Figs. 11 muestra la afinidad de unión de PU-DZ8, PU24FCI y 17AAG a hsp90 en extractos cerebrales de JNPL3.

- 5 La Fig. 12 muestra que PU-DZ8 alcanza concentraciones farmacológicamente pertinentes en cerebro de ratón transgénico JNPL3 después de la administración de una dosis de 75 mg/kg de PU-DZ8 administrados i.p .

La Fig. 13A muestra los efectos de la administración a corto plazo de una dosis de PU-DZ8 sobre los niveles de tau mutante soluble en el cerebro de ratón JNPL3. Se presenta la región cerebral subcortical de ratones de 2,5 a 4 meses de edad. Los niveles de Tau humana se normalizaron a los de Hsp90.

- 10 La Fig. 13B muestra los efectos de la administración a corto plazo de una dosis de PU-DZ8 sobre los niveles de tau mutante insoluble en el cerebro de ratón JNPL3. Se presenta el análisis de las fracciones de tau insoluble (P3) extraídas de la región cerebral subcortical de ratones de 6 meses de edad tratados con PU-DZ8 (75 mg/kg) durante 4, 8, 12 y 24 h.

- 15 La Fig. 14 muestra el efecto de la administración de PU-DZ8 a largo plazo sobre tau hiperfosforilada en agregados de tau tóxicos.

La Fig. 15A muestra el efecto de PU-DZ8 sobre p35 en los ratones htau que expresan tau WT patógenamente hiperfosforilada de forma similar a pacientes con enfermedad de Alzheimer.

La Fig. 15B muestra el efecto de PU-DZ8 fosforilación de tau en los ratones htau que expresan tau WT patógenamente hiperfosforilada de forma similar a pacientes con enfermedad de Alzheimer.

20 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona un tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, que comprende la etapa de administrar a un individuo que necesite este tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto con estructura purínica según se define en la reivindicación 1 que inhibe Hsp90 y que cruza la barrera hematoencefálica o se aporta de otro modo al cerebro.

- 25 Según se usa en esta solicitud, el término "tratamiento" se refiere a retrasar el comienzo de los síntomas, reducir la gravedad o retrasar el avance sintomático de una enfermedad neurodegenerativa en el individuo. No se requiere una curación de la enfermedad para llenar el alcance del tratamiento. Además, se apreciará que los resultados específicos de estos objetivos del tratamiento variarán de individuo a individuo, y que algún individuo puede obtener beneficios mayores o menores que el promedio estadístico para una población representativa. Así, tratamiento se refiere a la administración de una composición a un individuo que lo necesite, con la expectativa de que obtendrán un beneficio terapéutico.

- 35 El término "enfermedad neurodegenerativa" se refiera a una enfermedad caracterizada por anomalías en las rutas de señalización, por ejemplo una fosforilación aberrante debida a una desregulación de la actividad de cinasa, proteínas mutantes (tau mutante, APP mutante) y desequilibrio de chaperonas que conduce a plegamiento incorrecto e incremento de la apoptosis. En una realización específica, la enfermedad neurodegenerativa es una tauopatía, es decir, una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por anomalías de la proteína tau que comparten el rasgo de una proteína tau hiperfosforilada, y formación de ovillos neurofibrilares intracelulares (NFT). Sin limitación, el término "enfermedad neurodegenerativa", según se usa en esta solicitud, se refiere a y abarca neurodegeneración inducida por alcohol (10); enfermedad de Alzheimer (11); esclerosis lateral amiotrófica (13; 14); isquemia cerebral (15; 20); adicción a cocaína (21); enfermedad por cuerpos de Lewy difusos (22); ataques electroconvulsivos (23); síndrome alcohólico fetal (10); displasia cortical focal (24); atrofia muscular espinal canina hereditaria (25); miositis por cuerpos de inclusión (26); atrofia sistémica múltiple (27; 28); Niemann-Pick tipo C; 45 enfermedad de Parkinson (22); y lesión de los nervios periféricos (71).

- El término "administrar" se refiere al acto de introducir en el individuo el compuesto terapéutico. En general, se puede usar cualquier vía de administración. Debido a que los compuestos usados en el método de la invención pueden ser capaces de cruzar la barrera hematoencefálica, se puede usar la administración sistémica. Así, en cierta realización de la invención, es apropiada la administración mediante inyección oral, intravenosa, intramuscular o parenteral. También se puede realizar la administración al cerebro mediante inhalación debido a que hay un compartimento en la parte superior de la nariz que conecta con el cerebro sin tener los capilares de la barrera 50

hematoencefálica. Asimismo, los compuestos que cruzan la barrera hematoencefálica se prefieren para este modo de administración, aunque esta características no se requiere estrictamente.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" abarca tanto la cantidad del compuesto administrado como el esquema de administración que sobre una base estadística obtiene el resultado de prevenir, reducir la gravedad o retrasar la progresión de una enfermedad neurodegenerativa en el individuo. Como se apreciará, las cantidades preferidas variarán de compuesto a compuesto a fin de equilibrar la toxicidad/la tolerancia con la eficacia terapéutica y el modo de administración. La determinación de la dosis tolerada máxima y del régimen de tratamiento en cuanto al número y la frecuencia de dosificación es una parte habitual de la evaluación clínica temprana de un compuesto.

El término "cruza la barrera hematoencefálica", según se usa en la presente, se refiere a la capacidad del compuesto para transitar al cerebro en cantidades detectables después de la administración sistémica. La capacidad de un compuesto para cruzar la barrera hematoencefálica se puede evaluar usando modelos animales tales como ratones. Según se ilustra en los ejemplos posteriores, se puede emplear una administración de una sola dosis, por ejemplo en de 50 a 200 mg/kg, con animales sacrificados a intervalos, y se puede determinar la concentración cerebral del compuesto. Se apreciará que el grado hasta el que un compuesto transita al cerebro también tendrá un impacto sobre la cantidad del compuesto terapéutico que sea necesaria. En general, sin embargo, los compuestos que cruzan la barrera hematoencefálica tendrán pesos moleculares de menos de 400 daltons, un grado de liposolubilidad, preferiblemente comparable a los compuestos divulgados en la presente, la ausencia de uniones de proteínas plasmáticas restrictivas y la ausencia de una afinidad significativa para cualquiera de los varios transportadores de aflujo activos para la barrera hematoencefálica tales como glicoproteína p. A este respecto, se apunta que 17-AAG no cruza eficazmente la barrera hematoencefálica y es un sustrato de glicoproteína P.

El compuesto terapéutico empleado en el método de la presente invención es adecuadamente un compuesto con estructura purínica de molécula pequeña según se define en la reivindicación 1 que inhibe Hsp90 y que posee la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica. El término "compuesto con estructura purínica" se refiere a un compuesto que tiene un resto purínico al que está unido un anillo arílico o heteroarílico adicional en la posición 8 o 9, en donde el compuesto como un todo posee la flexibilidad necesaria y grupos sustituyentes que van a ser recibidos dentro del bolsillo N-terminal de Hsp90. Estos requisitos generales se analizan en la Publicación PCT N° WO02/36075.

En general, fármacos moderadamente lipófilos tales como PUs cruza la barrera hematoencefálica mediante difusión pasiva. Todavía falta una buena comprensión estructural para la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, pero se cree que varios parámetros facilitan este comportamiento. La lipofilia era el primero de los descriptores en ser identificados como importantes para la penetración en el SNC. Para varias clases de sustancias activas en el SNC, Hansch y Leo (89) encuentran que la penetración en la barrera hematoencefálica es óptima cuando los valores de LogP están en el intervalo de 1,5-2,7, con el valor medio de 2,1. El valor medio para ClogP para los fármacos para el SNC comercializados es 2,5. PU-DZ8 tiene un valor de logP calculado de 1,73 (usando Molinspiration) y un valor experimentalmente determinado de 1,53 (usando RP-HPLC). Los fármacos para el SNC tienen pesos moleculares (PM) significativamente reducidos en comparación con otros agentes terapéuticos. Se han revisado las reglas para el peso molecular en fármacos para el SNC, donde las moléculas pequeñas pueden sufrir un transporte pasivo mediado por lípidos significativo a través de la barrera hematoencefálica, cuando la masa molecular se mantiene en o por debajo de un intervalo de 400 a 600 Da (90). PU-DZ8 tiene un PM de 512. Todas las ecuaciones de QSAR enfatizan la importancia de la unión de hidrógeno - la penetración en el SNC requiere 5 o menos aceptores de enlaces de hidrógeno (91). PU-DZ8 tiene 4. Se ha mostrado que la PSA es un descriptor muy bueno que caracteriza la absorción de fármaco, incluyendo la absorción intestinal, la biodisponibilidad, la permeabilidad de Caco-2 y la penetración en la barrera hematoencefálica. La PSA ha sido usada como un predictor para la penetración en la barrera hematoencefálica por muchos investigadores (92). En general, los fármacos dirigidos al SNC tienden a tener superficies polares inferiores que otras clases (93,94). La PSA para fármacos para el CNS es significativamente menor que para otros agentes terapéuticos con PSA para la penetración en el SNC estimado en 60-70 Å² hasta 90 Å² (95,96). El límite superior para la PSA para que una molécula penetre en el cerebro es alrededor de 90 Å². DZ8 tiene una PSA de 104 Å². Cambiar la naturaleza de la cadena ligada a la posición 9N de una amina secundaria a una terciaria reduce la PSA hasta 90 Å². Se ha mostrado que el número de enlaces giratorios es un descriptor muy bueno de la biodisponibilidad oral de fármacos (97-99). Se sugiere que los compuestos que cumplen solo los dos criterios de (1) 10 o menos enlaces giratorios y (2) una superficie específica polar hasta o menor de 140 Å² (o 12 o menos donantes y aceptores de enlaces de H) tendrán una alta probabilidad de buena biodisponibilidad oral en la rata (99). Muchos fármacos para el SNC son básicos y existen en equilibrio entre sus estados cargado y neutro bajo condiciones fisiológicas o son anfifílicos si también poseen un grupo ácido. La posesión de una carga positiva a pH 7-8 tiende a favorecer la penetración en el cerebro (100). Adicionalmente, los compuestos que poseen un nitrógeno terciario (un rasgo de muchos fármacos para el SNC) muestran un grado superior de penetración en el cerebro. Todas estas características son modeladas en los compuestos con estructura purínica que se describen en la presente.

Otra característica que es indicativa de la capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica es la unión a proteínas. La interacción fármaco-proteína es un proceso reversible y un fármaco para el SNC satisfactorio no debe ser un sustrato eficaz para glicoproteína P (in vivo) (102). No es suficiente para que un agente neuroterapéutico potencial

se mueva a través de la barrera hematoencefálica - también tiene que permanecer en el cerebro suficiente tiempo para que ejerza su acción deseada. Esto significa que también tiene que evitar ser un sustrato para una variedad de proteínas de transporte que trabajan para extraer compuestos desde el cerebro. El inhibidor de Hsp90 17AAG es un sustrato para P-gp, sin embargo, el agente terapéutico con estructura purínica PU-DZ8 no es un sustrato de P-gp y así no se extrae fácilmente desde el cerebro mediante este mecanismo.

Métodos sintéticos para elaborar compuestos útiles en el método de la invención se describen en la Publicación PCT N° WO02/36075, la solicitud PCT N° PCT/US06/03676 y las Publicaciones de Patente de EE. UU. 2005-0113339, 2005-0004026, 2005-0049263, 2005-0256183, 2005-0119292, 2005-0113340 y 2005-0107343. Las Figs 6 y 7 muestran esquemas sintéticos para elaborar compuestos con las estructuras que se muestran en la Fig. 4. En el caso de un conector carbonado, se generan en primer lugar ácidos fenilacéticos al reemplazar el puente de metilendioxi con los isómeros metabólicamente estables representados en la Fig. 6. La síntesis comienza al acoplar 2,4,5,6-tetraaminopirimidina con el fluoruro de ácido del ácido carboxílico correspondiente. El fluoruro de ácido se genera al tratar el ácido fenilacético con fluoruro cianúrico y piridina en CH_2Cl_2 . Después de un rápido lavado con agua, el fluoruro de ácido resultante se usa en la siguiente etapa sin purificación adicional. La amida resultante del acoplamiento de pirimidina-fluoruro de ácido se cicla al calentar en NaOMe alcohólico. La transformación del grupo amino en C2 en flúor (NH_2 en F) se efectúa mediante una diazotización de modificada-fluorodesdiazoniación del derivado amínico en HF/piridina en presencia de NaNO_2 . Los presentes inventores y otros han determinado previamente que el flúor en esta posición en general aumentaba la potencia de las purinas resultantes, probablemente al incrementar la capacidad donante de hidrógeno de NH_2 en C6. La halogenación selectiva adicional usando bien NIS o bien NBS conduce a los correspondientes derivados yodados o bromados. Estos se alquilan en primer lugar con 1,3-dibromopropano o 1,2-dibromobutano en presencia de Cs_2CO_3 . La formación de dímero no se detecta en esta reacción. El bromo resultante se alquila adicionalmente en presencia de $\text{R}_1\text{R}_2\text{NH}$ en exceso para dar el producto final.

Para derivados que contienen un conector de azufre, la síntesis se lleva a cabo usando un método previamente descrito por He y cols (1) y emplea el acoplamiento catalizado por cobre de 8-mercaptoadenina con el yoduro de arilo (Fig. 7). La reacción se produce en DMF anhidro a 110°C bajo nitrógeno. La 8-arilsulfaniladenina se yoda adicionalmente selectivamente en la posición 2 del resto arílico usando NIS como una fuente de yodo electrófilo y TFA como un catalizador. Esto se alquila adicionalmente en 9N en presencia de $\text{R}_1\text{R}_2\text{NH}$ en exceso para dar el producto final.

Aplicación de la invención a tauopatías

La enfermedad de Alzheimer (AD) es el trastorno neurodegenerativo más común caracterizado por el deterioro progresivo de la cognición y la memoria en asociación con la presencia de placas seniles, ovillos neurofibrilares y pérdida masiva de neuronas, principalmente en la corteza cerebral y el hipocampo. Las placas seniles son depósitos extracelulares compuestos por fibrillas de amiloide β ($\text{A}\beta$), rodeadas por neuritas distróficas, microglías reactivas y astrocitos. Las inclusiones filamentosas de Tau son crecientemente reconocidas como la marca distintiva de las tauopatías, una familia creciente de enfermedades neurodegenerativas que incluyen AD, síndrome de Down (DS), diversas variantes de enfermedades priónicas, parálisis supranuclear progresiva (PSP), esclerosis lateral amiotrófica/complejo de parkinsonismo-demencia de Guam (ALS/PDC), demencia frontotemporal esporádica con parkinsonismo (FTDP), enfermedad de Pick y síndromes de FTDP-17 familiares. Tau es un componente crítico del citoesqueleto neuronal. Algunos de los cambios morfológicos asociados con la apoptosis neuronal implican una modificación significativa de la red citoesquelética, probablemente para contribuir a la posterior degeneración de neuronas, indicando que la alteración de la red citoesquelética puede provocar neurodegeneración. En los axones, la proteína tau es una de las proteínas asociadas a los microtúbulos predominantes (30). Estabiliza los microtúbulos y promueve el crecimiento externo de neuritas. Este papel aparentemente beneficioso de tau contrasta con su comportamiento anómalo en varias enfermedades neurodegenerativas, lo más destacadamente AD, donde se presenta en una forma altamente fosforilada, se separa de los microtúbulos y se agrega. Las mutaciones patógenas de tau o la fosforilación anormal de tau (que se produce en AD y demencias frontotemporales) dan como resultado un desarrollo más rápido de NFTs y enfermedades neurológicas, un rasgo coherente con la visión de que estas enfermedades resultan de la agregación de tau (31).

Varias mutaciones en las isoformas humanas de tau sobre el cromosoma 17 da como resultado un conjunto de enfermedades neurodegenerativas, denominadas "demencia frontotemporal y parkinsonismo conectado al cromosoma 17 (FTDP-17)" y se caracterizan por la acumulación de ovillos neurofibrilares similares a los de AD, en regiones cerebrales afectadas. Estudios bioquímicos de estos mutantes de tau revelan que son menos estables que tau normal y tienden a formar agregados fibrilares (32), de acuerdo con la visión de que las tauopatías son enfermedades relacionadas con el plegamiento y la estabilidad de proteínas. Las proteínas tau en AD no están mutadas, y sin embargo comprenden NFTs. En AD, tau se hiperfosforila y se ha establecido como hipótesis que esto deteriora el papel estabilizador de los microtúbulos de tau.

Se cree que la tau hiperfosforilada se pliega incorrectamente, sufre disociación neta desde los microtúbulos, forma agregados filamentosos anormales (filamentos helicoidales apareados, PHFs) y se polimeriza en NFTs (33). El papel

central del plegamiento incorrecto de proteínas en este proceso está ilustrado por observaciones de que las diferentes mutaciones de tau conectadas a FDTP-17 difieren en sus niveles de fosforilación y en sus efectos sobre los microtúbulos (34). Se ha mostrado una relación inversa entre la tau agregada y los niveles de proteína de choque térmico (Hsp)70/90 en ratones transgénicos para tau y cerebros con enfermedad de Alzheimer. En diversos modelos celulares, el incremento de los niveles de Hsp70 y Hsp90 promovía la solubilidad de tau y la unión de tau a los microtúbulos, reducía tau insoluble y reducía la fosforilación de tau. A la inversa, la disminución de los niveles de Hsp70 y Hsp90 daban como resultado los efectos opuestos. Los presentes inventores también han demostrado una asociación directa de las chaperonas con proteínas tau. Los resultados de los presentes inventores sugirieron que la regulación al alza de chaperonas moleculares puede suprimir la formación de ovillos neurofibrilares al repartir tau en una vía de plegamiento productiva y evitar de ese modo la agregación de tau (12).

Se encontró que los inhibidores de Hsp90 incrementan beneficiosamente los niveles de la chaperona Hsp70 en otros sistemas neurodegenerativos. Se encontró que la inducción de chaperonas, especialmente Hsp70 y Hsp40, retrasa el inicio o disminuye los síntomas en enfermedades del plegamiento (3). Se encontró que la GM activa una respuesta de choque térmico e inhibe la agregación de huntingtina en un modelo de cultivo celular de la enfermedad de Huntington (16). Se presentó que la GM restaura la función para una respuesta de choque térmico defectuosa en células infectadas por encefalopatía espongiiforme ovina (17, 18). Auluck y cols (19) presentaron que el tratamiento de un modelo en mosca de la enfermedad de Parkinson con GM protegía completamente contra toxicidad por α -sinucleína. Estos efectos se observaron sin alterar la apariencia microscópica de inclusiones neuronales, sugiriendo que las chaperonas "destoxifican" los agregados de proteína de un modo más sutil que solo prevenir la formación de agregados de proteínas. Auluck también sugirió que solamente un cambio o una redistribución moderados de chaperonas podrían ser suficientes para la neuroprotección (19).

Estos efectos de los inhibidores de Hsp90 se producen por su modulación de los complejos de HSF1-hsp90. En células normales, la presencia de proteínas plegadas incorrectamente o agregadas desencadena una respuesta biológica compleja, denominada choque térmico (6). Esto implica la expresión de proteínas de choque térmico (HSPs, chaperonas moleculares) y de proteínas implicadas en la ruta de ubiquitina-proteasoma. La evolución de una maquinaria tan compleja atestiguó el hecho de que es necesario aislar las células y depurar rápidamente proteínas desplegadas tan pronto como aparezcan. En células no estresadas, HSF1 forma un complejo dinámico con Hsp90 (7). Cuando se incrementa el desplegamiento de proteínas, estas proteínas no naturales compiten con HSF1 por la unión a Hsp90 dando como resultado un incremento en HSF1 no unido e inducción de HSPs. Cuando la síntesis de chaperonas inducida por estrés se deteriora, son posibles enfermedades de plegamiento (8). Según se sugiere por su regulación de la actividad de HSF1, la interferencia con la actividad de Hsp90 por inhibidores de Hsp90 desencadena una respuesta de choque térmico. La actividad de cinasas activadas por enfermedades neuronales es regulada por Hsp90.

También se ha mostrado que los niveles de fosforilación de tau en sitios patológicos se reducía después del tratamiento con el inhibidor de Hsp90 geldanamicina (GM) en modelos celulares de AD. Cdk5, Gsk3 y MAPK son tres cinasas importantes que pueden fosforilar tau en sitios patológicos. Debido a que la fosforilación libera tau de los microtúbulos y debido a que tau en el PHF está muy fosforilada, las cinasas se han observado con recelo por un posible papel en la patogénesis. Existe una evidencia creciente de que CDK5 y GSK3 β pueden estar implicadas en la patogénesis de varios trastornos neurodegenerativos. En neuronas que ya no se dividen, la desregulación de Cdk5, especialmente Cdk5, se produce en muchos trastornos neurológicos, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (AD) y la enfermedad de Parkinson (PD). Fath y cols. ha mostrado que la sustitución de ciertos aminoácidos en sitios de fosforilación conocidos por un aminoácido cargado creaba tau 'pseudohiperfosforilada' que puede imitar aspectos estructural y funcionales de tau hiperfosforilada (35). La evidencia in vivo de una interacción con tau existe para Cdk5 y Gsk3. La sobreexpresión de p25 humano (un activador de Cdk5) en ratones inducía la hiperfosforilación de tau y alteraciones citoesqueléticas reminiscentes de la AD, pero no depósitos filamentosos (36). Noble y cols. cruzaron ratones transgénicos que sobreexpresaban el activador de Cdk5 p25 con ratones transgénicos se sobreexpresaban tau humana mutante (P301L). Tau se hiperfosforilaba en varios sitios en los dobles transgénicos, y se producía una acumulación muy significativa de tau agregada en el tronco encefálico y la corteza. Un incremento de los números de ovillos neurofibrilares (NFTs) teñidos con plata acompañaba a estos cambios así como una asociación de GSK activa con tau insoluble (37). La sobreexpresión de GSK-3 bajo el control de un transactivador sensible a tetraciclina también incluía hiperfosforilación de tau, deslocalización somatodendrítica de tau y apoptosis neuronal (38). Estudios recientes han mostrado que el péptido β -amiloide (A β) induce una desregulación de Cdk5 en células cerebrales cultivadas, y surge la cuestión sobre posibles papeles de esta proteína cinasa hiperfosforilante en la secuencia de episodios moleculares que conducen a muerte neuronal desencadenada por A β . En este contexto, existe una evidencia de que Cdk5 está implicada en la hiperfosforilación de tau promovida por A β en sus forma oligómera (42). Los inhibidores de Cdk5 protegen a las neuronas del hipocampo tanto de fosforilaciones anómalas de tau como de muerte neuronal. Las conexiones entre los estudios sobre el sistema Cdk5/p35 en la neurogénesis normal y su participación pretendida en la neurodegeneración, proporcionan un marco para comprender la importancia reguladora de este sistema de cinasa, y cambios en su regulación que pueden estar implicados en alteraciones tales como las que se producen en la enfermedad de Alzheimer (70). En general, estos estudios implican la hiperfosforilación de tau en la neurodegeneración relacionada con tau y aluden a Cdk5, Gsk3 y MAPK como actores principales en el proceso.

Según se demuestra en los ejemplos indicados posteriormente, compuestos con estructura purínica de molécula pequeña son capaces de inactivar las cinasas implicadas en la fosforilación de tau y, cuando se seleccionan los patrones de sustitución apropiados, son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica. Además, la adición del inhibidor de Hsp90 PU24FCI a un conjunto de células transformadas condujo a una inducción dependiente de la dosis de Hsp70 y Hsp40. Este fenómeno se producía en todas las líneas celulares probadas independientemente de su tejido de procedencia y se duplicaba en neuronas primarias corticales de rata. Dosis de PU24FCI y PU29FCI (otro compuesto de la clase de PU previo) que inducen una respuesta de estrés no eran tóxicas contra células normales, según se demostró en un conjunto de células epiteliales y fibroblastos normales.

10 Aplicación de la invención a otras enfermedades neurodegenerativas

La esclerosis lateral amiotrófica es un trastorno neurológico que afecta selectivamente a neuronas motrices del cerebro y la médula espinal. La esclerosis lateral amiotrófica (ALS) se caracteriza por una degeneración progresiva de neuronas motrices que da como resultado debilidad intensa y atrofia de músculos esqueléticos. La enfermedad es progresiva y habitualmente los pacientes sucumben a parálisis bulbar, caquexia o insuficiencia respiratoria a los 2-5 años del comienzo (44). Un rasgo distintivo de la ALS es la acumulación de neurofilamentos en los pericariones y los axones de las neuronas motrices espinales (para una revisión, véase Julien 2001, 45). NF-H y NF-M son sustratos de CDK5, y los cuerpos de inclusión de neuronas motrices que se presentan en casos de ALS contienen NF-H hiperfosforilado (para una revisión, véase Julien 1999, 47). Una evidencia emergente indica una implicación de la serina/treonina cinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5) en la patogénesis. La desregulación de Cdk5 por sus coactivadores truncados, p25 y p29, contribuye a la neurodegeneración al alterar el estado de fosforilación de proteínas citosólicas y citoesqueléticas y, posiblemente a través de la inducción de reguladores del ciclo celular.

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por bradicinesia en la mayoría de los pacientes y muchos pacientes pueden desarrollar un temblor de reposo (para una revisión, véase Fahn 2003, 48). Hallazgos patológicos clásicos incluyen pérdida de neuronas que contienen neuromelanina dentro de la sustancia negra y la presencia de cuerpos de Lewy (48). El cuerpo de Lewy es una inclusión neuronal citoplásmica eosinofílica (para una revisión, véase Fahn 2003, 48), y se produce inmunorreactividad a CDK5 en los cuerpos de Lewy en el mesencéfalo de pacientes con enfermedad de Parkinson (22). En ratas, la inducción de la apoptosis en neuronas de la sustancia negra daba como resultado niveles y actividad crecientes de CDK5 en los estadios tardíos de la apoptosis (49). Además, se observó inmunorreactividad para CDK5 y p35 en el pericarion y los núcleos de neuronas apoptóticas, mientras que la inmunorreactividad en neuronas sanas se confinaba a los axones (49).

Otras cinasas que también se desregulan en la PD, y para las que se han identificado mutaciones patógenas en pacientes de PD esporádica, son buenos candidatos como clientes de HSP90. Estos incluyen el gen de cinasa 2 con repetición rica en leucina (LRRK2) donde las mutaciones patógenas provocan enfermedad de Parkinson autosómica dominante y ciertos casos de esporádica. La sustitución G2019S en LRRK2 es el determinante genético más común de la enfermedad de Parkinson identificado hasta ahora, y se cartografía a una región específica del dominio de cinasa llamada el segmento de activación. Se muestra aquí que la autofosforilación de LRRK2 es una reacción intermolecular y elige como diana dos residuos dentro del segmento de activación. La destacada mutación G2019S patógena en LRRK2 da como resultado una alteración de la autofosforilación y un incremento de la autofosforilación y la fosforilación del sustrato, a través de un proceso que parece implicar la reorganización del segmento de activación. Otra cinasa mutante en el PTEN induce el gen de cinasa 1 putativa (PINK1). Estas mutaciones se descubrieron originalmente en tres árboles genealógicos con PD heredada recesivamente. Se identificaron inicialmente dos mutaciones de PINK1 homocigóticas: una mutación sin sentido truncada (W437X) y una mutación de sentido incorrecto G309D. Posteriormente, se han presentado múltiples tipos adicionales de mutaciones o truncamientos asociados a PD en PINK 1, convirtiendo a PINK1 en el segundo gen causal más común de la PD recesiva. De forma interesante, a pesar de la transmisión recesiva autosómica de la PD de comienzo temprano asociada a PINK1, un número de mutaciones heterocigóticas que afectan solamente a un alelo de PINK1 se han asociado con la PD de comienzo tardío. Se desconocen los mecanismos patógenos por los que las mutaciones PINK1 conducen a la neurodegeneración.

PINK1 codifica una proteína de 581 aminoácidos con una secuencia de elección como diana mitocondrial N-terminal predicha y un dominio de serina/treonina cinasa conservado. Se ha mostrado que la proteína PINK1 se localiza en la mitocondria y exhibe actividad de autofosforilación in vitro. El sustrato o los sustratos y la función bioquímica in vivo de PINK1 siguen siendo desconocidos. En células de mamífero cultivadas, la sobreexpresión de PINK1 silvestre protege a las células contra estímulos apoptóticos mientras que el agotamiento de PINK1 mediado por ARN interferente pequeño (ARNsi) incrementa la propensión a la muerte apoptótica. En *Drosophila*, la pérdida de PINK1 conduce a defectos mitocondriales y degeneración de neuronas musculares y dopaminérgicas. A pesar de la amplia evidencia que indica un papel esencial de PINK1 en la citoprotección, no se entiende el mecanismo por el que PINK1 protege contra la apoptosis.

Los presentes resultados mostraron que al menos Cdk5 y P35 son proteínas clientes de Hsp90. La inhibición de Hsp90 podría disminuir el nivel de proteínas Cdk5/P35 in vitro y el nivel de P35 in vivo. Puesto que la evidencia acumulada implica que Cdk5/P35 está relacionada con esas enfermedades neurodegenerativas, también se puede usar un inhibidor de Hsp90 en el tratamiento de esas enfermedades.

La invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplo de referencia 1 (útil para la comprensión de la invención)

Ratones jóvenes: Se obtuvieron ratones atímicos hembra nu/nu de cuatro a seis semanas de edad de the National Cancer Institute-Frederick Cancer Center y se mantuvieron enjaulados con ventilación. Los experimentos se llevaron a cabo bajo un protocolo aprobado por Institutional Animal Care and Use Committee y se siguieron las directrices para el uso apropiado y humanitario de animales en la investigación. Antes de la administración, se preparó una solución de PU24FCI a la concentración deseada en 50 μ l de vehículo (PBS:DMSO:EtOH en una relación 1:1:1). En experimentos diseñados para definir los efectos a corto plazo de PU24FCI sobre la fosforilación de tau, los ratones (2 por momento) se trataron con 200 mg/kg de PU24FCI o con vehículo solo. En el momento del sacrificio, los cerebros se recogieron e inmediatamente se congelaron instantáneamente. Para el análisis de proteínas, los cerebros se homogeneizaron en tampón de lisis de SDS (Tris 50 mM pH 7,4, 2% de SDS). Para los estudios de administración a largo plazo, los ratones (n = 5) se trataron cada dos días durante 30 días con las dosis indicadas de PU24FCI. Se comprobaron los cambios en el peso y el comportamiento para todos los animales. Los ratones fueron sacrificados mediante eutanasia con CO₂ a las 8 h después de la última inyección de PU24FCI. Los cerebros se recogieron y se procesaron como se menciona anteriormente. Las proteínas se analizaron adicionalmente mediante transferencia Western.

La fosforilación de tau en cerebros jóvenes y embrionarios se potencia (50) y es similar a un cerebro afectado por AD (51; 52). Además, los ratones atímicos lampiños de 4-6 semanas de edad pueden expresar tau fosforilada en epítomos de enfermedad pertinentes. En un primer experimento *in vivo*, se evaluó la modulación a corto plazo de Hsp90 en los cerebros de estos animales. Una dosis de PU24FCI (200 mg/kg) se administró intraperitonealmente a estos ratones y los animales fueron sacrificados a las 0, 6, 12, 24, 36 y 48 horas. Los cerebros enteros se homogeneizaron en tampón de lisis y la fosforilación de tau en S202/T205 se evaluó mediante transferencia Western. Se observó un aumento brusco en la fosforilación de tau en este epítomo 12 h después de la administración, con una disminución hasta niveles basales poco después (Fig. 1A). Los niveles de fármaco en el tejido cerebral se analizaron mediante LC-MS y mostraban la presencia en tejido cerebral a niveles terapéuticamente pertinentes con un pico alrededor de las 24 horas (Fig. 1B). En estos mismos ratones, PU24FCI se depuraba rápidamente del hígado, el suero y el útero.

En un segundo experimento, se analizaron los efectos de la inhibición de Hsp90 a largo plazo sobre la fosforilación de tau. Los ratones se trataron en días alternos durante 30 días con PU24FCI sin observar toxicidad o pérdida de peso notables en estos animales. Como se observa en la Fig. 2, una disminución significativa en la fosforilación de tau en S202/T205 era evidente en todos los ratones tratados. Esta diferencia en los efectos entre la modulación a corto y largo plazo de Hsp90 se ha documentado para otras proteínas chaperonadas por Hsp90. El tratamiento de células con inhibidores de Hsp90 provocaba la degradación de Raf-1 a lo largo de un transcurso de tiempo prolongado, mientras que inducía un aumento brusco transitorio de actividad de Raf-1 cuando se administraba durante un tiempo breve (53). Se ha demostrado una evidencia similar para la actividad de la cinasa dependiente de ARN PKR, que se vuelve activa con un tratamiento breve con GM (54). Estas observaciones sugieren que Hsp90 puede actuar para contener la señalización basal de estas cinasas. Ejemplos adicionales se encuentran en la regulación de receptores de hormonas esteroideas. La Hsp90 enmascara la dimerización e inhibe la unión a ADN de receptores de hormonas esteroideas hasta que las interacciones chaperónicas se interrumpen, típicamente como consecuencia de la unión a hormonas. Así, los receptores de hormonas esteroideas separados de chaperonas son competentes para la dimerización y la unión a ADN en ausencia de hormona (55). Aunque esta función de Hsp90 puede no seguir siendo cierta para todas sus proteínas clientes, en el caso de p35/cdk5, Hsp90 puede desempeñar un papel similar que contiene la actividad intrínseca del complejo, mientras que lo retiene en una conformación cebada, lista para la interacción con tau.

La reducción en la fosforilación de tau en el experimento de tratamiento a largo plazo se asoció con una disminución de 60 a 70% en la expresión de p35 (Fig. 2). Además, se observó en estos ratones un incremento en la expresión de la Hsp70 inducible (Fig. 2). La expresión de cdk5 en el cerebro entero no se veía afectada. La proteína cdk5 está ampliamente distribuida en tejidos de mamífero y en líneas celulares cultivadas y se compleja con una serie de otras proteínas, sirviendo cada asociación para un papel celular diverso. La cinasa asociada con cdk5/p35 se ha mostrado solamente en la corteza cerebral (56, 57). Cuando se examinaba la actividad de cdk5 inmunoprecipitada en cerebros con AD, se encontró que era elevada en la corteza prefrontal (58). La localización limitada de p35/cdk5 en la corteza puede explicar por qué la expresión de cdk5 total en el cerebro entero estaba inalterada durante la inhibición de Hsp90. Muy probablemente, el alto fondo provocado por cdk5 localizada en otros compartimentos hacía imposible comprobar un cambio pequeño en los estados estacionarios de cdk5 mediante transferencia Western. Estos resultados también pueden sugerir que el manejo de cdk5 por Hsp90 en el cerebro está probablemente limitado a regular la actividad del complejo p35/cdk5.

Ejemplo de referencia 2 (útil para la comprensión de la invención)

Ratones transgénicos: Se usaron en este estudio ratones transgénicos, línea JNPL3 (59), que sobreexpresan tau humana mutante (P301L, 4R0N). Los ratones eran heterocigóticos y en un fondo genético híbrido mixto estaban compuestos por C57BL/DBA2/SW, según se publica en la ref. 59. Estos ratones desarrollaban NFTs en el telencéfalo basal, el diencéfalo, el tronco encefálico y la médula espinal, con patología grave acompañada por degeneración en la médula espinal que conducía a distonía, parálisis y muerte en ratones >12 meses de edad. Ratones JNPL3 macho de nueve meses de edad (n = 2) se trataron intraperitonealmente con PU-DZ8 o vehículo durante 5 días. Los ratones fueron sacrificados 12 h después del último tratamiento mediante dislocación cervical bajo anestesia.

Para examinar adicionalmente el efecto de Hsp90 sobre la fosforilación de tau, se usó la línea JNPL3 de ratones que expresaban proteína tau mutante (P301L) (59). Los análisis genéticos tienen mutaciones conectadas en el gen de tau a FTDP-17 (60, 61). Se han identificado más de 20 mutaciones patógenas distintas, con P301L como la mutación más común en las tauopatías (33). Los ratones JNPL3 exhiben un incremento dependiente de la edad y la dosis de gen en la fosforilación de tau y el desarrollo de NFTs (59, 62). La proteína tau en JNPL3 es predominantemente humana y está fosforilada en múltiples sitios: T181 (AT270), S202/T205 (AT8), T212 (AT100), T231 (AT180), S262, S396/S404, S409 y S422 (59, 62). De acuerdo con los experimentos en los ratones atímicos lampiños jóvenes, un tratamiento de cinco días de ratones JNPL3 macho de nueve meses de edad con PU-DZ8, un derivado hidrosoluble de PU24FCI (2), reducía los niveles de p35 en cerebros enteros y conducía a una mejora significativa de fosforilación de tau en los sitios de cdk5 putativa, S202/T205 y T212. El grado de expresión de p35 se traducía bien en el alivio de la fosforilación. Una reducción de 50% en los niveles de p35 se traducía en un efecto aproximadamente similar sobre S202/T205 (Ab AT-8), mientras que reducía la fosforilación sobre T212/S214 (Ab AT-100) caso completamente. No se observó un efecto significativo sobre tau fosforilada en T231 (Ab AT-180), asociado con tau en PHF y ovillos (63, 64) con una reducción de 50% en la expresión de p35. Sin embargo, en ratones en los que los efectos eran más destacados y la expresión de p35 disminuía hasta aproximadamente 20% en comparación con el control, se observaba un efecto significativo sobre la fosforilación de tau en S202/T205 y T212/S214 y una reducción de 50% sobre T231. No se podía detectar una cantidad significativa de la fosforilación de tau en T181, un sitio que se encuentra que está hiperfosforilado en PHF, ovillos y neurofilamentos (65). De nuevo, la expresión en cerebro entero de cdk5 no se veía afectada (Fig. 3).

Se registraron niveles farmacológicamente pertinentes de PU-DZ8 en estos cerebros.

Ejemplo de referencia 3 (útil para la comprensión de la invención)

Ratones JNPL3 hembra de 6,5 meses de edad se trataron durante 30 días, 5 días/semana, con el inhibidor de Hsp90 PU-DZ8 (Fig. 5) o vehículo, o se sacrificaron para un tiempo cero, n=4/grupo. Los cerebros se dividieron en regiones subcorticales y corticales y se procesaron usando el protocolo de extracción de Greenberg y Davies. (77) Se analizaron fracciones solubles en lauroilsarcosinato sódico (S1) mediante WB para p35 y Hsp70, y para epítomos de tau encontrados anormalmente hiperfosforilados en cerebros con AD tales como: S202 y T205 reconocido por AT8, T181 por AT270, T231 por AT180. Estos son sitios de cdk5/p35 putativa. Las bandas de proteína se normalizaron para Hsp90 y se representaron como unidades relativas. Los resultados se muestran en la Fig. 8A y B. Puesto que la tauopatía, caracterizada por la fosforilación patógena de tau, se puede deber a la actividad de cinasa aberrante, el inhibidor de hsp90 es eficaz debido a que afecta la expresión de la proteína p35, un activador de cdk5 que se sabe que fosforila tau en sitios patógenos, y así alivia la fosforilación de tau en estos sitios.

Ejemplo de referencia 4 (útil para la comprensión de la invención)

Ratones JNPL3 hembra se 6 meses de edad se trataron IP con el inhibidor de Hsp90 PU-DZ8 (75 mg/kg) y se sacrificaron en diversos momentos según se indica en la Fig. 9. Los cerebros se dividieron en regiones subcorticales y corticales y se procesaron usando el protocolo de extracción de Greenberg y Davies (77). Se analizaron fracciones solubles en lauroilsarcosinato sódico (S1) extraídas de la región subcortical mediante WB para p35, cdk5, tau mutante (HT7), Hsp90 y Hsp70. Las bandas de proteína se normalizaron para actina y se representaron como un cambio relativo con respecto a los ratones no tratados. La Fig. 9 muestra la degradación de la proteína mutante, mtau (HT7), después de la administración de una dosis de DZ8. También muestra el cambio en los niveles de chaperonas (incremento de hsp70) y la expresión de cinasa (niveles de p35).

Ejemplo de referencia 5 (útil para la comprensión de la invención)

Células de COS-7 se transfectaron con ADNcs correspondientes a WT y mTau y las células se trataron adicionalmente con PU24FCI durante 24 h. Las células se sometieron a lisis y el contenido de proteínas se analizó mediante transferencia Western. Los resultados se muestran en la Fig. 10. Según se muestra, la Tau mutante (P301L) es muy sensible al inhibidor de Hsp90 PU24FCI, mientras que la tau WT no se ve afectada por dosis similares de fármaco.

Ejemplo de referencia 6 (útil para la comprensión de la invención)

La capacidad de la composición según las invenciones inhibidores de Hsp90 para unirse a Hsp90 se probó usando un ensayo de polarización fluorescente desarrollado por Chiosis y cols (documento WO2005012482.66.67.68). Células de neuroblastoma SK-N-SH se trataron con inhibidores de Hsp90 durante 24 h los niveles de Hsp70 se detectaron mediante un ensayo fenotípico basado en células desarrollado por Chiosis y cols (documento WO2005012482.69). Los resultados se resumen en las Figs. 11A y B. Según se muestra, los inhibidores inducen una respuesta de estrés en las células de neuroblastoma SK-N-SH y la inducción de Hsp70 por inhibidores de Hsp90 se correlaciona con su potencia en la unión al bolsillo regulador de ATP de la chaperona Hsp90.

Ejemplo de referencia 7 (útil para la comprensión de la invención)

Neuronas corticales primarias embrionarias de rata y células COS-7 transfectadas con ADNcs correspondientes bien a p35 sola (COS-7/p35) o bien tanto a p35 como a Tau (COS-7/p35/Tau) son sistemas experimentales pertinentes para estudiar la actividad aberrante de cinasa neuronal debido a que la fosforilación de Tau en sitios de cdk5 putativa tanto está potenciada en estas células y en cerebros embrionarios y jóvenes (50, 52) como es similar a aquella en cerebros afectados por AD (50). Células COS-7 transfectadas con ADNcs correspondientes bien a Tau WT humana (COS-7/Tau) o bien a Tau que aloja la mutación P301L característica de la demencia frontotemporal y el parkinsonismo asociados con el cromosoma 7 (COS-7/TauP301L) son modelos celulares que se pueden usar para diferenciar el efecto de la inhibición de Hsp90 sobre una proteína mutante en comparación con su homólogo normal.

Para examinar adicionalmente los papeles representados por Hsp90 en una tauopatía, se hizo uso tanto de PU24FCI como de 17-(alilamino)-17-desmetoxigeldanamicina (17AAG) y se investigaron sus efectos tanto sobre cdk5/p35 como sobre TauP301L en cultivos de células neuronales primarias y COS-7. Se derivaron cultivos neuronal primarios de las cortezas cerebrales de embriones de rata del día embrionario 17 y se mantuvieron según se describe previamente (105). Para determinar los efectos de PU24FCI sobre estados estacionarios de proteína y sobre la fosforilación de Tau, se añadió PU24FCI el día 6 de cultivo y las células se incubaron a 37°C según se indica. Células COS-7 desarrolladas en DMEM con FBS al 10% y penicilina/estreptomina (50 unidades y 50 µg/ml, respectivamente) se transfectaron transitoriamente al usar el reactivo FuGENE 6 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) para sobreexpresar p35 bien en Tau WT o bien en Tau que aloja una mutación P301L. A las 12 h después de la transfección, las células se incubaron durante 24 h con la concentración indicada de PU24FCI. Después de la incubación, las células se recogieron y se sometieron a lisis en SDS al 2%, y las muestras resultantes se analizaron mediante transferencia Western.

La fosforilación de Tau por cdk5 se inicia a través de la activación mediante la formación de complejo con una de las proteínas específicas de las neuronas p35 o p39. Sin embargo, solo la supresión de p35 por el tratamiento con oligonucleótidos antisentido pero no de la isoforma p39 muy relacionada reduce selectivamente la actividad de cdk5. Además los niveles de p35 pero no de proteína cdk5 son limitativos de la velocidad para la actividad de cdk5. En concordancia, se evaluó la influencia de la inhibición de Hsp90 sobre la expresión celular de p35. Una degradación dependiente de la dosis y el tiempo de p35 por PU24FCI fue detectada en neuronas primarias mediante inmunotransferencia y mediante técnicas de inmunofluorescencia, así como en células COS-7/p35 y COS-7/p35/Tau. Se observaron efectos a ~1-5 µM de PU24FCI y eran máximos a 10 µM de inhibidor de Hsp90, de acuerdo con la afinidad de este compuesto para Hsp90. p35 exógenamente introducida era más sensible a la inhibición de Hsp90 que la proteína endógena, sugiriendo que por analogía con oncoproteínas de Hsp90, la regulación y la estabilización de proteínas aberrantes en una tauopatía se pueden efectuar al coelegir Hsp90. La reducción de los niveles de p35 mediante la inhibición de Hsp90 afectaba a la actividad del complejo cdk5/p35, según se mide al usar un sustrato de cdk5, la histona-H1, y reducía la fosforilación de Tau en cdk5 putativa que se mostraba que se fosforilaba en cerebros con AD sin afectar a la expresión de Tau normal. Sin embargo, la mTau era sensible a concentraciones de PU24FCI que no interfería con la expresión de Tau WT. La sensibilidad superior a la inhibición de Hsp90 de mTau en comparación con Tau WT está de acuerdo con la labilidad observada de los clientes oncoproteínicos mutantes de Hsp90. Se observaron efectos análogos sobre p35 y mTau con 17AAG. El efecto de PU24FCI sobre proteínas neuronales estaba bien definido y era selectivo, ya que la expresión de varias cinasas y fosfatasas que regulan la actividad de Tau normal (PKA, CK-1, CK-2, PP-1-alfa, PP-1-gamma y PP2A) no se veía afectada por el inhibidor de Hsp90.

La inducción de Hsp70 por inhibidores de Hsp90 está documentada en varios modelos de enfermedades neurodegenerativas (12, 16, 19). La expresión de Hsp70 está indirectamente regulada por Hsp90 (7). Según esto, el tratamiento bien de neuronas primarias o bien de células COS-7 transfectadas con PU24FCI condujo a un incremento dependiente de la dosis en Hsp70. La inducción de Hsp70 se producía en dosis de PU24FCI que también modulaban tanto p35 como mTau, sugiriendo que la degradación de proteínas aberrantes y la inducción de una respuesta de choque térmico son ambas consecuencias directas de la inhibición de Hsp90 por PU24FCI.

Ejemplo de referencia 8 (útil para la comprensión de la invención)

Para examinar si Hsp90 representa un papel directo en el mantenimiento de la estabilidad de estas p35 y mTau, se probó si la inhibición de la función de Hsp90 por PU24FCI afectaba a su semivida. Se trataron cultivos neuronales primarios con inhibidor o vehículo en presencia de cicloheximida. La cuantificación de los niveles de proteína demostraba que la semivida de p35 endógena era 120 min en presencia de vehículo y disminuía hasta 60 min cuando se añadía PU24FCI al sistema. La p35 exógena era más lábil y tenía una semivida significativamente más corta que la proteína endógena ($t_{1/2}$ = 60 min en presencia de vehículo y 30 min en presencia de PU24FCI) tanto para células COS-7/p35/Tau como para neuronas primarias. Se observaban resultados similares para mTau: mientras que 50% de la proteína se degradaba a las 2-4 h en presencia del inhibidor de Hsp90, la semivida de mTau en células tratadas con vehículo superaba 10 h. El inhibidor no tenía efecto sobre el nivel de Tau WT. Por otra parte, mTau y p35 se degradaban durante el tratamiento con PU24FCI incluso cuando la inducción de Hsp70 era bloqueada por cicloheximida. Estos hallazgos sitúan con fuerza a la Hsp90 como un regulador directo e importante de la estabilidad tanto de p35 como de Tau mutante.

Ejemplo de referencia 9 (útil para la comprensión de la invención)

Para examinar si Hsp90 regula la estabilidad de estas proteínas a través de la formación de complejos proteínicos, se hizo uso de varias herramientas químicas e inmunológicas que se unen selectivamente bien a Hsp90 o bien a sus proteínas clientes putativas. Se observó la asociación de Hsp90 con p35 así como con mTau. No se observó una asociación significativa cuando las células estaban inmunopurificadas con una IgG de control. Cdc37, una cochaperona de Hsp90 encontrada asociada con varios ensamblajes chaperona-cinasa, estaba ausente en los complejos inmunopurificados con p35, de acuerdo con las observaciones previas de Lamphere y cols. (106). El pretratamiento de células con PU24FCI alteraba la interacción de Hsp90 con p35.

Los modelos celulares presentados anteriormente demuestran que una interacción entre Hsp90 y proteínas neuronales aberrantes es posible a nivel molecular. Sin embargo, la introducción exógena de proteínas mediante transfección puede desestabilizar el contenido de proteínas de la célula e imponer una regulación de la estabilidad de la proteína extraña mediante Hsp90. Por lo tanto, para evaluar la interacción de Hsp90 con TauP301L y p35 en un ambiente endógeno, se hizo uso de homogenados cerebrales obtenidos de modelos animales de tauopatía. La línea JNPL3 de ratones de expresan proteína Tau humana (hTau) mutante (P301L) exhiben un incremento dependiente de la edad, el género y la dosis de gen en la fosforilación de Tau y depósitos de Tau insolubles. Para aislar proteínas asociadas con Hsp90 en estos cerebros, se hizo uso de homogenados cerebrales obtenidos de ratones JNPL3 hembra (n = 4) de 10 meses de edad y se usó bien un derivado de PU biotinilado inmovilizado sobre cuentas de estreptavidina o bien un anticuerpo anti-Hsp90 específico. Hsp90 aislada mediante cuentas de PU se unía a mTau específicamente. La presencia del extremo C de proteína que interactúa con cognado 70 de proteína de choque térmico, una ubiquitina E3 ligasa que se encuentra que colabora con chaperonas moleculares para facilitar el plegamiento de proteínas, también se identificó en el complejo de Hsp90, de acuerdo con los hallazgos de Sahara y cols. (62). Un anticuerpo para Hsp90 identificaba específicamente la chaperona en complejo con p35 y su socio de cinasa cdk5. Colectivamente, estos datos sitúan a Hsp90 como un regulador de la estabilidad de p35 y mTau a través de la formación directa de complejos proteínicos.

Ejemplo 10

Unión a Hsp90 cerebral JNPL3. El tampón de ensayo (HFB) contenía 20 mM de HEPES (K) pH 7,3, 50 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, 20 mM de Na₂MoO₄, 0,01% de NP40. Antes de cada uso, se añadieron recientemente 0,1 mg/ml de gammaglobulina bovina (BGG) (Panvera Corporation, Madison, WI) y 2 mM de DTT (Fisher Biotech, Fair Lawn, NJ). GM-cy3B, un ligando de Hsp90 específico, se sintetizó como se presenta previamente (10) y se disolvió en DMSO para formar soluciones 10 μ M. Los cerebros se homogeneizaron en HFB con inhibidores de proteasa y fosfatasa añadidos. Se registraron curvas de saturación en las que GM-cy3B (3 nM) se trataba con cantidades crecientes de homogenados cerebrales. Se construyeron análisis de la gráfica de Hill y Scatchard del experimento para mostrar que a las bajas cantidades de homogenados cerebrales requeridas para alcanzar la saturación, se evitaba la interacción a partir de otro material celular. La cantidad de homogenado cerebral para el que más de 90% de GM-cy3B estaba unido a Hsp90 en el equilibrio (24 h) se eligió para el estudio de competición. Para los experimentos de competición, cada uno de los 96 pocillos contenía 3 nM de GM-cy3B, homogenado cerebral e inhibidor probado (reserva inicial en DMSO) en un volumen final de 100 μ l. La placa se dejó sobre un agitador a 4°C durante 24 h y se registraron los valores de polarización fluorescente en mP. Los valores de EC₅₀ se determinaron como las concentraciones de competidor a las que se desplazaba 50% de GM-cy3B. Las medidas de polarización fluorescente se realizaron en un instrumento Analyst GT (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Para GM-cy3B, se usaron un filtro de excitación a 545 nm y un filtro de emisión a de 610 a 675 nm con un espejo dicróico de 565 nm. Las medidas se tomaron en placas de microvaloración negras de 96 pocillos.

La Figs. 12 muestra la afinidad de unión de PU-DZ8, PU24FCI y 17AAG a hsp90 en extractos cerebrales JNPL3 determinada usando este procedimiento. Según se muestra, la EC₅₀ para PU-DZ8 es inferior que la de los otros compuestos. (46,71 nM, en oposición a 822,6 nM para PU24FCI y 98,40 nM para 17AAG).

Se repitió en mismo procedimiento usando los compuestos de la Fig. 5. Los valores de EC₅₀ determinados para estos compuestos se indican en la Tabla 1. Se determinó la inducción de Hsp70 en células de neuroblastoma por los diversos compuestos con estructura purínica. La potencia para la inducción de hsp70 corresponde a la afinidad de unión a hsp90.

5

Tabla 1

Compuesto	EC50 unión de Hsp90 cerebral JNPL3 (nM)
PU-HZ150	5,7
PU-HZ151	6,9
PU-DZ13	8,1
PU-DZ14	8,4
PU-BSI12	39,3
PU-BSI8	30,2
PU-BSI6	60,8
PU-BSI11	29,9
PU-BSI7	43,5
PU-BSI13	44,5
PU-BSI14	42,8
PU-BSI5	26,8
PU-DZ16	35,6
PU-DZ15	165,6
PU-DZ17	92,3
PU-DZ18	107,1

Ejemplo de referencia 11 (útil para la comprensión de la invención)

10 Evaluación de niveles cerebrales de PU-DZ8. Las concentraciones de compuesto se determinaron y se cuantificaron mediante un modo de MRM usando una cromatografía de líquidos de alta resolución-espectrometría de masas/masas (HPLC/MS/MS) en tándem. Un trozo de cerebro pesado se enjuagó con solución salina isotónica, se secó con una gamuza y a continuación se homogeneizó en fase móvil (acetonitrilo (ACN)/ácido fórmico al 0,1% = 1,2/2,8, v/v). Se añadió haloperidol como patrón interno. Se extrajo PU-DZ8 en cloruro de metileno, la capa orgánica se separó, se secó rápidamente bajo vacío y se reconstituyó en fase móvil. El análisis de los compuestos se realizó en el API 4000™ LC/MS/MS (Applied Biosystems) que estaba acoplado con un sistema Shimadzu LC y un automuestreador de placas de 96 pocillos. Se usó una columna Gemini C18 (tamaño de partícula 5 µ, 50 x 4,6 mm D.I.) para la separación por LC. El analito se eluyó bajo una condición isocrática durante 4 min a un caudal de 0,4 ml/min.

15 20 Una dosis de PU-DZ8 (75 mg/kg) se administró intraperitonealmente (i.p.) a ratones hembra de 2,5-4 meses de edad (n = 32) y los animales se sacrificaron en el intervalo de 0 a 36 h. Se prepararon fracciones de Tau tanto libres de agregados (S1) como insolubles (P3) a partir de las regiones subcortical y cortical de estos ratones. Los niveles de PU-DZ8 en el cerebro alcanzaban 0,35 µg/g (~700 nM) a las 4 h, y la dosis farmacológicamente pertinente se retuvo durante al menos 12 h después de la administración (0,2 µg/g, ~390 nM). Los resultados se muestran en la Fig. 13.

25 La Fig. 13 muestra que PU-DZ8 alcanza concentraciones farmacológicamente pertinentes en cerebro de ratón transgénico JNPL3 después de la administración de una dosis de 75 mg/kg de PU-DZ8 administrada i.p. Esto muestra que PU-DZ8 llegaba al cerebro mucho antes que PU24FCI (Fig. 1B).

Ejemplo de referencia 12 (útil para la comprensión de la invención)

En un conjunto de tauopatías denominado "demencia frontotemporal y parkinsonismo ligados al cromosoma 17 (FTDP-17)", la transformación está provocada por varias mutaciones en las isoformas de Tau humana sobre el cromosoma 17, que dan como resultado y se caracterizan por la acumulación de Tau agregada similar a la de la AD (10, 11). Se han identificado más de 20 mutaciones patógenas distintas, con P301L como la mutación más común en las tauopatías.

Para investigar si la liberación de mTau y p35 de a partir de la regulación de Hsp90 restaura la actividad neuronal normal y da como resultado la eliminación de agregados de Tau tóxicos, se hizo uso del modelo de tauopatía en ratones JNPL3. Los tejidos cerebrales de ratones JNPL3 contienen proteínas Tau con diferentes solubilidades y estas se pueden separar en fracciones extraíbles con tampón (S1), extraíbles con alto contenido de sal (S2) y extraíbles con lauroilsarcosinato sódico (P3). Las fracciones S1 contienen una proteína Tau humana de 50-60 kDa, mientras que se detectan proteínas Tau insolubles en lauroilsarcosinato sódico de 64 kDa y pesos moleculares superiores en las regiones cerebrales subcorticales de ratones JNPL3 tan pronto como 3 meses en hembras hemigóticas. Estas contienen Tau tóxica insoluble fosforilada en múltiples sitios tales como T181, S202/T205, T212 y T231 (37, 38).

Para investigar si la TauP301L humana presente en la línea JNPL3 de ratones es una diana sensible para la inhibición de Hsp90, los animales se trataron con el inhibidor de Hsp90 permeable a la barrera hematoencefálica PU-DZ8. Este agente es un derivado hidrosoluble de potencia superior de PU24FCI (Hsp 90 cerebral EC50JNPL3 = 70 nM). Una dosis de PU-DZ8 (75 mg/kg) se administró intraperitonealmente (i.p.) a ratones hembra de 2,5-4 meses de edad (n = 32) y los animales fueron sacrificados en el intervalo de 0 a 36 h. Se prepararon fracciones tanto de Tau libre de agregados (S1) como de Tau insoluble (P3) a partir de las regiones subcortical y cortical de estos ratones. Los niveles de Tau humana se evaluaron mediante inmunotransferencia con un anticuerpo anti-Tau específico humano (HT-7). A las 4 h después de la administración, el inhibidor de Hsp90 inducía una disminución significativa en la mTau de la fracción reunida de precursores solubles que está presente en las regiones cerebrales subcorticales (P = 0,0031 a las 4 h), con estos efectos mantenidos hasta 36 h (P = 0,0066 a las 8 h, 0,0030 a las 12 h, 0,111 a las 24 h y 0,042 a las 36 h) (Fig. 14A). A continuación se examinó en un grupo de ratones de 4 a 6 meses de edad (n = 15) si la estabilidad de mTau que estaba presente en agregados de tau (fracción P3) se regulaba adicionalmente mediante Hsp90. Según se demostraba en la Fig. 14B, se observó una reducción significativa de Tau insoluble (P < 0,0001) e hiperfosforilada (P = 0,001) Tau en ratones tratados (n = 8), como comparación con los ratones que no recibían inhibidor de Hsp90 (n = 7).

No se detectaron cambios significativos en la expresión de cdk5, indicando que el manejo de cdk5 por Hsp90 en el cerebro puede estar limitado a regular la actividad del complejo p35/ckd5. Las expresiones de Akt y Raf-1, proteínas nodulares en las rutas de la supervivencia y el crecimiento celular, respectivamente, estrechamente reguladas por Hsp90 en células malignas no eran alteradas por PU-DZ8.

Para experimentos diseñados para probar la cinética de la modulación de mTau y p35 por inhibidores de Hsp90, se les administraron a los animales intraperitonealmente (i.p.) 75 mg/kg de PU-DZ8 en PBS (DMSO al 6%). Los ratones fueron sacrificados mediante eutanasia con CO₂ en los momentos indicados después de la administración de PU-DZ8. Los hemiserebros se separaron en regiones corticolímbica (corteza, núcleo amigdalino e hipocampo) y subcortical (ganglios basales, diencéfalo, tronco encefálico y cerebelo), se congelaron rápidamente sobre hielo seco y se almacenaron a -80°C y se procesaron. En resumen, cada trozo de cerebro se pesó y se homogeneizó en tres volúmenes de solución salina tamponada con Tris (TBS) que contenía inhibidores de proteasas y fosfatasas (25 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 5 mM de pirofosfato sódico, 30 mM de β-glicerofosfato, 30 mM de fluoruro sódico, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)). Los homogenizados se centrifugaron a 27.000 g durante 15 min a 4°C. Los sobrenadantes se recogieron como fracción S1 y las pellas (P1) se rehomogeneizaron en tres volúmenes de tampón de sal/sacarosa (0,8 M de NaCl, 10% de sacarosa, 10 mM de Tris/HCl, pH 7,4, 1 mM de EGTA, 1 mM de PMSF) y se centrifugaron como anteriormente. Las pellas resultantes se descartaron y los sobrenadantes se incubaron con lauroilsarcosinato sódico (Sigma, St Louis, MO, USA; concentración final 1%) durante 1 h a 37°C. A continuación, las mezclas de lauroilsarcosinato sódico se centrifugaron a 150.000 g durante 30 min a 4°C. Los sobrenadantes (fracción S2) se recogieron y las pellas (P3) se resuspendieron en 50 μl de SDS al 2% en TBS y se almacenaron a -80°C para la transferencia Western. Las proteínas se analizaron mediante transferencia Western.

La Fig. 14A. muestra los efectos de la administración a corto plazo de una dosis de PU-DZ8 sobre los niveles de tau mutante soluble en el cerebro de ratones JNPL3. Se presenta la región cerebral subcortical de ratones de 2,5 a 4 meses de edad. Los niveles de Tau humana se normalizaron a los de Hsp90. La Fig. 14B muestra el efecto de la administración a corto plazo de una dosis de PU-DZ8 sobre los niveles de tau mutante insoluble en el cerebro de ratones JNPL3. Se presenta el análisis de las fracciones de insolubles de tau (P3) extraídas de la región cerebral subcortical de ratones de 6 meses de edad tratados con PU-DZ8 (75 mg/kg) durante 4, 8, 12 y 24 h.

Ejemplo de referencia 13 (útil para la comprensión de la invención)

Para investigar si la modulación de mTau se podía mantener a lo largo de un período de tratamiento con inhibidor de Hsp90 más prolongado, sin ser tóxico para los ratones. Ratones JNPL3 se sometieron durante 30 días a estos agentes. A ratones JNPL3 hembra de 6,5 meses de edad (n = 10) se les administró i.p. vehículo (n = 5) o uno de los inhibidores de Hsp90, PU24FCI (200 mg/kg) o PU-DZ8 (75 mg/kg) (n = 5), con un esquema diario de cinco veces a la semana y los animales fueron sacrificados a las 8 h después de la última dosis de inhibidor administrada. No se observó toxicidad según se evidenciaba por la falta de un cambio significativo en el peso del animal, el aspecto del pelaje, el apetito y la postura. Por otra parte, no se detectaba un daño visible a los órganos internos en el sacrificio con una inspección somera. Las fracciones tanto S1 como P3 extraídas de la región cerebral subcortical de estos ratones se analizaron con respecto a la expresión y la fosforilación de mTau. Se observaba una reducción significativa en la expresión y la fosforilación de Tau tanto en las fracciones reunidas de proteína precursora (fracción S1) (hTau, $P < 0,0001$) como en el agregado tóxico (fracción P3) (Tau fosforilada en T231, $P = 0,0034$) (Fig. 15), así como la reducción de p35 en la fracción S1 en ratones tratados con el inhibidor de Hsp90.

Colectivamente, la cinética rápida de degradación de Tau tanto en las fracciones reunidas solubles como en la forma agregada por los inhibidores de Hsp90 sugiere que Hsp90 regula el agregado de Tau tóxico y facilita su formación y acumulación. Estos datos también sugieren que se puede usar un inhibidor de Hsp90 en el tratamiento de tauopatías tanto para prevenir la formación de agregados tóxicos como para solubilizar la tau tóxica ya agregada.

La Figura 15 muestra el efecto de la administración de PU-DZ8 a largo plazo sobre tau hiperfosforilada en agregados de tau tóxicos.

Ejemplo de referencia 14 (útil para la comprensión de la invención)

En las tauopatías, la transformación se caracteriza por anomalías en la proteína Tau que conducen a una acumulación de Tau hiperfosforilada y agregada (5-7). En la enfermedad de Alzheimer (AD), se sugiere que la hiperfosforilación de Tau es un proceso patógeno provocado por la activación aberrante de varias cinasas, en particular proteína cinasa 5 dependiente de ciclina (cdk5) y glucógeno sintasa cinasa-3 beta (gsk3 β , que conduce a la fosforilación de Tau en sitios patógenos. Se cree que la Tau hiperfosforilada en la AD se pliega incorrectamente, sufre disociación neta a partir de los microtúbulos y forma agregados de Tau tóxicos (9, 10). La fosforilación de Tau por cdk5 se inicia a través de activación mediante la formación de complejos con una de las proteínas específicas de neuronas p35 o p39 (22, 23). Sin embargo, solamente la supresión de p35 mediante el tratamiento con oligonucleótidos antisentido, y no de la isoforma altamente relacionada p39, reduce selectivamente la actividad de cdk5 (24). Además, los niveles de p35 pero no de proteína cdk5 son limitativos de la velocidad para la actividad de cdk5 (25). De acuerdo con esto, se evaluó la influencia de la inhibición de Hsp90 sobre la expresión de p35.

Se detectó una degradación dependiente de la dosis y el tiempo de p35 por PU24FCI en neuronas primarias, así como en células COS-7/p35 y COS-7/p35/Tau. Neuronas corticales primarias embrionarias de rata y células COS-7 transfectadas con ADNcs correspondientes bien p35 sola (COS-7/p35) o bien tanto a p35 como a Tau (COS-7/p35/Tau) son sistemas celulares que permiten la evaluación de estos inhibidores sobre la actividad y la estabilidad de cdk5/p35 y también sobre la fosforilación de Tau en sitios de cdk5 putativos. Estos son sistemas experimentales pertinentes para estudiar la actividad de cinasa neuronal aberrante debido a que la fosforilación de Tau en estos sitios se potencia en cerebros embrionarios y juveniles (20) y es similar a cerebros afectados de AD (21). Además, las células COS-7 transfectadas con el activador de cdk5 p35 expresan Tau fosforilada en sitios patógenos (21). Los efectos se observaron en PU24FCI aproximadamente 1-5 μM y eran máximos con inhibidor de Hsp90 10 μM , de acuerdo con la afinidad de este compuesto para Hsp90. La p35 introducida exógenamente era más sensible a la inhibición de Hsp90 que la proteína endógena, sugiriendo que por analogía con oncoproteínas de Hsp90, la regulación y la estabilización de proteínas aberrante en una tauopatía pueden estar acompañados de coelección de Hsp90. La reducción de los niveles de p35 por inhibición de Hsp90 afectaba a la actividad del complejo cdk5/p35, según se medía usando un sustrato de cdk5, la histona-H1.

Para investigar su la disminución de la expresión de p35 daba como resultado una fosforilación reducida de Tau, se midió la fosforilación de Tau sobre tres sitios de cdk5 putativos, a saber S202/T205, T231 y T181 (26, 27). Se ha mostrado que estos sitios se fosforilan anormalmente en cerebros con AD (28). PU24FCI reducía la fosforilación en estos sitios de un modo dependiente de la dosis sin afectar a la expresión de proteína Tau normal. Según se observaba para los niveles y la actividad de p35, los efectos eran evidentes con 5 μM y máximos con 10 μM de inhibidor. Además, la cinética de degradación de p35 era similar a la observada para la reducción en la fosforilación de Tau.

Para investigar el efecto in vivo de la inhibición de Hsp90 sobre p35 en un ambiente de WT Tau, se hizo uso de ratones hTau (41). Los ratones hTau desarrollan patología de Tau con una distribución que es comparable a la que se produce en los estadios tempranos de AD. La mayoría de la patología de Tau en ratones hTau está situada en la región cerebral cortical. Estos ratones expresan seis isoformas de Tau humana no mutante, pero desarrollan patología de Tau similar a AD. Las fracciones termoestables (S1) preparadas a partir de homogenados corticales de estos ratones indican una acumulación relacionada con la edad de Tau fosforilada en sitios de cdk5 putativos. Se examinó si la inhibición de Hsp90 en estos cerebros puede conducir a una reducción en la expresión de p35 y un

alivio consiguiente de la fosforilación de Tau. A ratones hTau hembra (n = 10) de 4 y 8-10 meses de edad se les administró bien vehículo o bien una dosis de PU-DZ8 (75 mg/kg) i.p. y los animales fueron sacrificados a las 4 h u 8 h después de la administración. Se prepararon fracción de Tau libres de agregados (S1) a partir de la región cortical de estos ratones y los niveles de Tau humana se evaluaron mediante inmunotransferencia con un anticuerpo específico para la Tau de dominio de 3 repeticiones (RD3). Por analogía con experimentos sobre cultivos neuronales primarios y células transfectadas con WT Tau, el inhibidor de Hsp90 no tenía efecto sobre la expresión de WT Tau soluble. Sin embargo, tanto una reducción dependiente del tiempo significativa en los niveles de p35 (P = 0,0019) (Figura 16A) como un alivio de la fosforilación de Tau en Ser202, según se detectaba por el anticuerpo CP13 (P = 0,0078), eran evidentes a las 8 h después de la administración del inhibidor de Hsp90 (figura 16B). El anticuerpo monoclonal CP13 se usa comúnmente para detectar una patología de Tau en los estadios tanto tempranos como más avanzados de la acumulación de agregados de Tau (41). Colectivamente, estos datos sitúan a p35/cdk5 como un complejo de cinasas propenso a fosforilar aberrantemente Tau WT y mutante, y sugieren Hsp90 como un regulador de su actividad en ambos ambientes de Tau.

La Fig.16A muestra el efecto de PU-DZ8 sobre p35 en los ratones htau que expresan tau WT patógenamente hiperfosforilada de forma similar a pacientes con enfermedad de Alzheimer. La Fig. 16B muestra el efecto de la fosforilación de tau con PU-DZ8 en los ratones htau que expresan tau WT patógenamente hiperfosforilada de forma similar a pacientes con enfermedad de Alzheimer.

20 Referencias

- Las siguientes referencias se citan en la presente y se incorporan en la presente mediante referencia en su totalidad.
1. He H, Llauger L, Rosen N, Chiosis G. General Method for the Synthesis of 8-Arylsulfanyl Adenine Derivatives, *J. Org. Chem.* 2004, 69, 3230-3232.
 - 25 2. He H, Zatorska D, Kim J, Aguirre J, Llauger L, She Y, Wu N, Immormino RM, Gewirth DT, Chiosis G. Identification of Potent Water-Soluble Purine-Scaffold Inhibitors of the Heat Shock Protein 90. *J. Med. Chem.* 2006, 49(1):381-90.
 3. Soti C, Csermely P. Chaperones and aging: role in neurodegeneration and in other civilizational diseases. *Neurochem Int. Dic.* 2002;41(6):383-9.
 4. Poletti A, Negri-Cesi P, Martini L. *Endocrine. Dic.* 2005;28(3):243-62.
 - 30 5. Beglopoulos V, Shen J. *Trends Pharmacol Sci. En.* 2006;27(1):33-40.
 6. Sorger PK. Heat shock factor and the heat shock response. *Cell. Mayo* 1991 3:65(3):363-6.
 7. Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith DF, Voellmy R. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell. Ag.* 1998 21:94(4):471-80.
 8. Morimoto RI, Santoro MG. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nat Biotechnol. Sep.* 1998;16(9):833-8.,
 - 35 9. Gardian G, Vecsei L. Huntington's disease: pathomechanism and therapeutic perspectives. *J Neural Transm. Oct.* 2004;111(10-11):1485-94.
 10. Rajgopal Y, Vemuri MC. Ethanol induced changes in cyclin-dependent kinase-5 activity and its activators, P35, P67 (Munc-18) in rat brain. *Neurosci Lett.* 10 Ag. 2001;308(3):173-6.
 - 40 11. Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature.* 9 Dic. 1999;402(6762):615-22.
 12. Dou F, Netzer WJ, Tanemura K, Li F, Hartl FU, Takashima A, Gouras GK, Greengard P, Xu H. Chaperones increase association of tau protein with microtubules. *Proc Natl Acad Sci USA.* 21 En. 2003;100(2):721-6.
 - 45 13. Nakamura S, Kawamoto Y, Nakano S, Ikemoto A, Akiguchi I, Kimura J. Cyclin-dependent kinase 5 in Lewy body-like inclusions in anterior horn cells of a patient with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology. En.* 1997;488(1):267-70.

14. Bajaj NP, Al-Sarraj ST, Anderson V, Kibble M, Leigh N, Miller CC. Cyclin-dependent kinase-5 is associated with lipofuscin in motor neurones in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* 27 Mar. 1998;245(1):45-8.
15. Wang J, Liu S, Fu Y, Wang JH, Lu Y. Cdk5 activation induces hippocampal CA1 cell death by directly phosphorylating NMDA receptors. *Nat Neurosci.* Oct. 2003;6(10):1039-47.
- 5 16. Sittler A, Lurz R, Lueder G, Priller J, Lehrach H, Hayer-Hartl MK, Hartl FU, Wanker EE. Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntingtin aggregation in a cell culture model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 1 Jun. 2001;10(12):1307-15.
17. Winklhofer KF, Reintjes A, Hoener MC, Voellmy R, Tatzelt J. Geldanamycin restores a defective heat shock response in vivo. *J Biol Chem.* 30 Nov. 2001;276(48):45160-7.
- 10 18. Tatzelt J, Zuo J, Voellmy R, Scott M, Hartl U, Prusiner SB, Welch WJ. Scrapie prions selectively modify the stress response in neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28 Mar. 1995;92(7):2944-8.
19. Auluck PK, Bonini NM. Pharmacological prevention of Parkinson disease in *Drosophila*. *Nat Med.* Nov. 2002;8(11):1185-6.
- 15 20. Weishaupt JH, Kussmaul L, Grotsch P, Heckel A, Rohde G, Romig H, Bahr M, Gillardon F. Inhibition of CDK5 is protective in necrotic and apoptotic paradigms of neuronal cell death and prevents mitochondrial dysfunction. *Mol Cell Neurosci.* Oct. 2003;24(2):489-502.
21. Bibb JA, Chen J, Taylor JR, Svenningsson P, Nishi A, Snyder GL, Yan Z, Sagawa ZK, Ouimet CC, Nairn AC, Nestler EJ, Greengard P. Effects of chronic exposure to cocaine are regulated by the neuronal protein Cdk5. *Nature.* 15 Mar. 2001;410(6826):376-80.
- 20 22. Brion JP, Couck AM. Cortical and brainstem-type Lewy bodies are immunoreactive for the cyclin-dependent kinase 5. *Am J Pathol.* Nov. 1995; 147(5): 1465-76.
23. Chen J, Zhang Y, Kelz MB, Steffen C, Ang ES, Zeng L, Nestler EJ. Induction of cyclin-dependent kinase 5 in the hippocampus by chronic electroconvulsive seizures: role of [Delta]FosB. *J Neurosci.* 15 Dic. 2000;20(24):8965-71.
- 25 24. Sisodiya SM, Thom M, Lin WR, Bajaj NP, Cross JH, Harding BN. Abnormal expression of cdk5 in focal cortical dysplasia in humans. *Neurosci Lett.* 16 ag. 2002;328(3):217-20.
25. Green SL, Vulliamy PR, Pinter MJ, Cork LC. Alterations in cyclin-dependent protein kinase 5 (CDK5) protein levels, activity and immunocytochemistry in canine motor neuron disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* Nov 1998;57(11):1070-7.
- 30 26. Nakano S, Akiguchi I, Nakamura S, Sato H, Kawashima S, Kimura. Aberrant expression of cyclin-dependent kinase 5 in inclusion body myositis. *Neurology.* 10 Nov. 1999;53(8): 1671-6.
27. Nakamura S, Kawamoto Y, Nakano S, Akiguchi I, Kimura J. Cyclin-dependent kinase 5 and mitogen-activated protein kinase in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol.* Jul. 1998;57(7):690-8.
- 35 28. Honjyo Y, Kawamoto Y, Nakamura S, Nakano S, Akiguchi I. P39 immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in brains with multiple system atrophy. *Acta Neuropathol (Berl).* Mar. 2001;101(3):190-4.
30. E. Mandelkow and E.-M. Mandelkow, Kinesin motors and disease. *Trends Cell Biol.* 12(2002), pp.585-591.
31. Hong M, Trojanowski JQ, Lee VMY. Tau-based neurofibrillary lesions. In: Clark CM, Trojanowski JQ, eds. *Neurodegenerative dementia: clinical features and pathological mechanisms.* Nueva York: McGraw-Hill, 2000; 161-175.
- 40 32. von Bergen, M., Barghorn, S., Li, L., Marx, A., Biernat, J., Mandelkow, E. M. & Mandelkow, E. Mutations of tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local beta-structure. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 48165-48174

33. Lee, V. M., Goedert, M. & Trojanowski, J. Q. Neurodegenerative tauopathies (2001) *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1121-1159
34. Matsumura, N., Yamazaki, T. & Ihara, Y. Stable expression in Chinese hamster ovary cells of mutated tau genes causing frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17). (1999) *Am. J. Pathol.* 154(6):1649-56.
35. Fath, T., Eidenmuller, J., and Brandt, R. Tau-mediated cytotoxicity in a pseudohyperphosphorylation model of Alzheimer's disease (2002) *J Neurosci* 22, 9733-9741.
36. Ahljianian, M. K., Barrezueta, N. X., Williams, R. D., Jakowski, A., Kowsz, K. P., McCarthy, S., Coskran, T., Carlo, A., Seymour, P. A., Burkhardt, J. E., Nelson, R. B., and McNeish, J. D. Hyperphosphorylated tau and neurofilament and cytoskeletal disruptions in mice overexpressing human p25, an activator of cdk5. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2910-2915.
37. Noble, W., Olm, V., Takata, K., Casey, E., Mary, O., Meyerson, J., Gaynor, K., LaFrancois, J., Wang, L., Kondo, T., Davies, P., Burns, M., Veeranna, Nixon, R., Dickson, D., Matsuoka, Y., Ahljianian, M., Lau, L. F., and Duff, K. Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. (2003) *Neuron* 38, 555-565.
38. Lucas, J. J., Hernandez, F., Gomez-Ramos, P., Moran, M. A., Hen, R., and Avila, J. Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. (2001) *Embo J* 20, 27-39.
39. Tsai, L.H., Takahashi, T., Caviness, V. & Harlow, E. (1993) Activity and expression patterns of cyclin-dependent kinase 5 in the embryonic mouse nervous system. *Development* 119, 1029-1040.
40. Paudel, H.K., Lew, J., Ali, Z. & Wang, J. (1993) Brain proline-directed protein kinase phosphorylates tau on sites that are abnormally phosphorylated in tau associated with Alzheimer's paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 268, 23512-23518.
41. Lazaro, J.B., Kitzman, M., Poul, M.A., Vandromme, M., Lamb. N.Y. & Fernandez, A. (1997) Cdk5, is a positive regulator of myogenesis in mouse C2 cells. *J. Cell Sci.* 110, 1251-1260.
42. Alvarez, A., Toro, R., Cáceres, A. & Maccioni, R.B. (1999) Inhibition of tau phosphorylating protein kinase Cdk5 prevents beta-amyloid induced neuronal death. *FEBS Lett.* 459, 421-426.
43. Maccioni RB, Otth C, Concha II, Munoz JP. The protein kinase Cdk5. Structural aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer's pathology. *Eur J Biochem.* Mar 2001;268(6):1518-27
44. Walling AD. Amyotrophic lateral sclerosis: Lou Gehrig's disease. *Am Fam Physician.* 15 Mar. 1999;59(6):1489-96.
45. Julien JP, Beaulieu JM. Cytoskeletal abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis: beneficial or detrimental effects. *J Neurol Sci.* 1 Nov. 2000;180(1-2):7-14.
47. Julien JP, Couillard-Despres S, Meier J. Transgenic mice in the study of ALS: the role of neurofilaments. *Brain Pathol.* Oct. 1998;8(4):759-69.
48. Fahn S. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* Jun 2003;991:1-14.
49. Neystat M, Rzhetskaya M, Oo TF, Kholodilov N, Yarygina O, Wilson A, El-Khodori BF, Burke RE. Expression of cyclin-dependent kinase 5 and its activator p35 in models of induced apoptotic death in neurons of the substantia nigra in vivo. *J Neurochem.* Jun. 2001;77(6):1611-25.
50. Kanemaru K, Takio K, Miura R, Titani K, Ihara Y. Fetal-type phosphorylation of the tau in paired helical filaments. *J Neurochem.* Mayo 1992;58(5):1667-75.
51. Stoothoff WH, Johnson GV. Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim Biophys Acta.* 3 En 2005;1739(2-3):280-97.

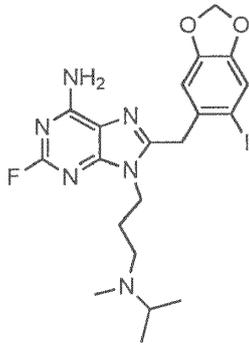
52. Michel G, Mercken M, Murayama M, Noguchi K, Ishiguro K, Imahori K, Takashima A. Characterization of tau phosphorylation in glycogen synthase kinase-3beta and cyclin dependent kinase-5 activator (p23) transfected cells. *Biochim Biophys Acta*. 10 abr 1998;1380(2):177-82.
53. Stancato LF, Silverstein AM, Owens-Grillo JK, Chow YH, Jove R, Pratt WB. The hsp90-binding antibiotic geldanamycin decreases Raf levels and epidermal growth factor signaling without disrupting formation of signaling complexes or reducing the specific enzymatic activity of Raf kinase. *J Biol Chem* 1997; 272:4013-20.
54. Donze O, Abbas-Terki T, Picard D. The Hsp90 chaperone complex is both a facilitator and a repressor of the dsRNA-dependent kinase PKR. *Embo J* 2001; 20:3771-80.
55. Cadepond F, Schweizer-Groyer G, Segard-Maurel I, Jibard N, Hollenberg SM, Giguere V, et al. Heat shock protein 90 as a critical factor in maintaining glucocorticosteroid receptor in a nonfunctional state. *J Biol Chem* 1991; 266:5834-41.
56. Oshima, T., Ward, J.M., Huh, C.G., Longenecker, G., Veeranna, C., Pant, H.C., Brady, R.O., Martin, L.J. & Kulkarni, A.B. (1996) Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 11173-11178.
57. Chae, T., Kwon, Y.T., Bronson, R., Dikkes, P., Li, E. & Tsai, L.H. (1997) Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5 display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. *Neuron* 18. 29-42.
58. Lee KY, Clark AW, Rosales JL, Chapman K, Fung T, Johnston RN. Elevated neuronal Cdc2-like kinase activity in the Alzheimer disease brain. *Neurosci Res*. Mayo 1999;34(1):21-9.
59. Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, Gwinn-Hardy K, Paul Murphy M, Baker M, Yu X, Duff K, Hardy J, Corral A, Lin WL, Yen SH, Dickson DW, Davies P, Hutton M. Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet*. Ag. 2000;25(4):402-5.
60. Hutton M, Lendon CL, 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 RC, Stevens M, de Graaff E, Wauters E, van Baren J, Hillebrand M, Joosse M, Kwon JM, Nowotny P, Che LK, Norton J, Morris JC, Reed LA, Trojanowski J, Basun H, Lannfelt L, Neystat M, Fahn S, Dark F, Tannenberg T, Dodd PR, Hayward N, Kwok JB, Schofield PR, Andreadis A, Snowden J, Craufurd D, Neary D, Owen F, Oostra BA, Hardy J, Goate A, van Swieten J, Mann D, Lynch T, Heutink P. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*. 18 jun. 1998;393(6886):702-5.
61. Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, Nemens E, Garruto RM, Anderson L, Andreadis A, Wiederholt WC, Raskind M, Schellenberg GD. Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol*. Jun. 1998;43(6):815-25.
62. Sahara N, Lewis J, DeTure M, McGowan E, Dickson DW, Hutton M, Yen SH. Assembly of tau in transgenic animals expressing P301L tau: alteration of phosphorylation and solubility. *J Neurochem*. Dic. 2002;83(6): 1498-1508.
63. Lewis J., Dickson D. W., Lin W.-L., Chisholm L., Corral A., Jones G., Yen S.-H., Sahara N., Skipper L., Yager D., Eckman C., Hardy J., Hutton M. and McGowan E. (2001) Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 293, 1487-1491.
64. Tatebayashi Y, Miyasaka T, Chui DH, Akagi T, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Tanemura K, Murayama M, Ishiguro K, Planel E, Sato S, Hashikawa T, Takashima A. Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 oct. 2002; 99(21):13896-901.
65. Gotz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM. Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science*. 24 ag. 2001;293 (5534): 1491-5.
66. Kim J, Felts S, He H, Llauger L, Huezio H, Rosen N, Chiosis G. Development of a fluorescence polarization assay for the molecular chaperone Hsp90. *J. Biomolecular Screening* 2004, 9(5):375-81.

67. Llauger L, Felts S, Huezó H, Rosen N, Chiosis G. Synthesis of novel fluorescent probes for the molecular chaperone Hsp90. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, 13, 3975-3978.
68. Moulick K, Clement CC, Aguirre J, Kim J, Kang Y, Felts S, Chiosis G. Synthesis of a red-shifted fluorescence polarization probe for Hsp90. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* Disponible en línea el 22 de junio de 2006.
- 5 69. Huezó H, Vilenchik M, Rosen N, Chiosis G. Microtiter cell-based assay for the detection of agents that alter cellular levels of Her2 and EGFR. *Chem Biol.* 2003, 10(7), 629-634.
70. Ferrer I, Gomez-Isla T, Puig B, Freixes M, Ribe E, Dalfo E, Avila J. Current advances on different kinases involved in tau phosphorylation, and implications in Alzheimer's disease and tauopathies. *Curr Alzheimer Res. En.* 2005;2(1):3-18.
- 10 71. Fu WY, Fu AK, Lok KC, Ip FC, Ip NY. Induction of Cdk5 activity in rat skeletal muscle after nerve injury. *Neuroreport.* 11 feb. 2002;13(2):243-7.
77. Greenberg, S. G., and Davies, P. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5827-5831.
89. Hansch C, Leo AJ. *Substituent constant for correlation analysis in chemistry and biology.* Nueva York: Wiley, 1979.
- 15 90. Hansch C, Bjorkroth J, Leo AJ. Hydrophobicity and central nervous system agents: on the principle of minimal hydrophobicity in drug design. *Pharm Sci* 76: 663, 1987.
91. Österberg T, Norinder U. Prediction of polar surface area and drug transport processes using simple parameters and PLS statistics. *J Chem Inf Comput Sci* 40: 1408-1411. 2000.
- 20 92. Feng RM. Assessment of blood-brain barrier penetration: in silico, in vitro and in vivo. *Curr Drug Metab* 3: 647-657, 2002.
93. Skaaeda T, Okamura N, Nagata S, Yagami T, Horinouchi M, Okumura K, Yamahita F, Hashida M. Molecular and pharmacokinetic properties of 222 commercially available oral drugs in humans. *Biol Pharm Bull* 24: 935-940, 2001.
94. Abraham MH, Chadha HS, Martins F, Mitchell RC, Bradbury MW, Gratton JA. Hydrogen bonding part 46: a review of the correlation and prediction of transport properties by an LFER method: physicochemical properties brain penetration and skin permeability. *Pestic Sci* 55: 78-88, 1999.
- 25 95. Kelder J, Grootenhuis PDJ, Bayada DM, Delbressine LPC, Ploemen J-P. Polar molecular surface as a dominating determinant for oral absorption and brain penetration of drugs. *Pharm Res* 16: 1514-1519, 1999.
96. van de Waterbeemd H, Camenish G, Folkers G, Chretien JR, Raevsky OA. Estimation of blood-brain barrier crossing of drugs using molecular size and shape, and H-bonding characteristics. *J Drug Target* 6: 151-165, 1998.
- 30 97. P. Ertl, B. Rohde, P. Selzer, Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J. Med. Chem.* 43, 3714-3717 (2000).
98. C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug. Delivery Rev.* 23, 4-25 (1997).
- 35 99. D.F. Veber, S.R. Johnson, H.-Y. Cheng, B.R. Smith, K.W. Ward, K.D. Kopple, Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.* 45, 2615-2623 (2002).
100. Clark DE. In silico prediction of blood-brain barrier permeation, *Drug Discovery Today* 8: 927-933, 2003.
101. Lin JH, Rodrigues AD. In vitro model for early studies of drug metabolism. In: *Pharmacokinetics optimization in drug research: biological, physicochemical and computational strategies* (Testa, Van de Waterbeemd H, Folker G, Guy R, eds.), pp 217-243. New York: Wiley-VCH, 2001.

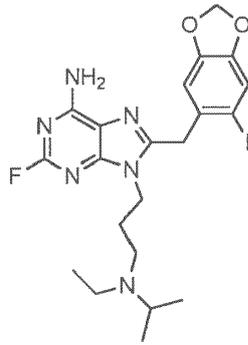
102. Raub JT. Early preclinical evaluation in support of hit identification and lead optimization for brain exposure. AAPS Workshop on Optimization of Drug-Like Properties During Lead Optimization. Parsippany, NJ, 19-22 Septiembre 2004.
- 5 103. Klettner A. The induction of heat shock proteins as a potential strategy to treat neurodegenerative disorders. Drug News Perspect. Jun. 2004;17(5):299-306.
104. Barral JM, Broadley SA, Schaffar G, Hartl FU. Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases. Semin Cell Dev Biol. Feb. 2004; 15(1):17-29.
105. Xu H., Gouras GK, Greenfield JP, Vincent B, Naslund J, Mazzarellu L, Fired G, Jovanovic JN, Seeger M, Relkin NR y cols, (1998) Nat. Ned. 4: 447-451.
- 10 106. Lamphere L, Fiore F, Xu X, Brizuela L, Keezer S, Sardet C, Draetta GF, Gyuris J (1997) Oncogene 14:1999-2004.

REIVINDICACIONES

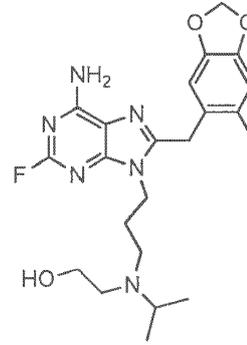
1. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en PU-BSI12, PU-BSI8, PU-BSI6, PU-BSI11, PU-BSI7, PU-BSI13, PU-BSI14, PU-BSI5, PU-HZ150, PU-HZ151, PU-DZ13, PU-DZ14 y PU-DZ16, que tiene las siguientes fórmulas



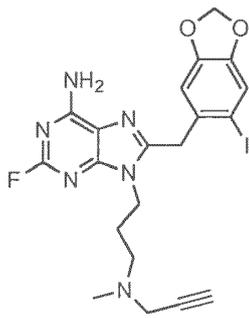
PU-BSI12



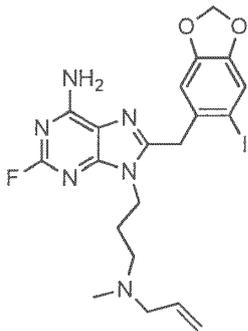
PU-BSI8



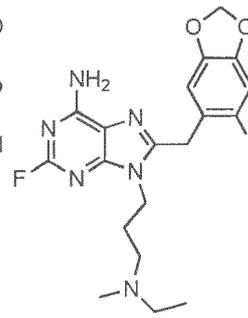
PU-BSI6



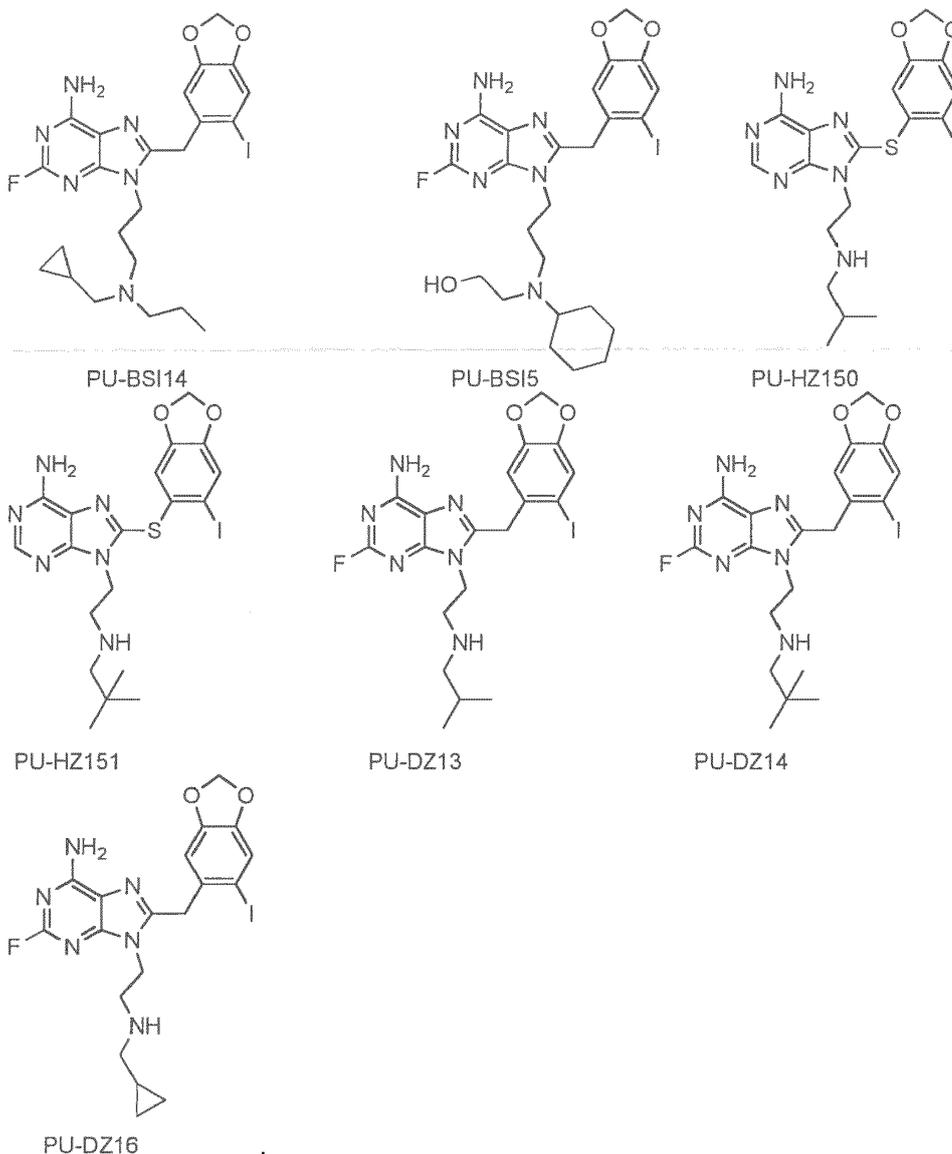
PU-BSI11



PU-BSI7



PU-BSI13



para el uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.

- 5 2. El compuesto para el uso según la reivindicación 1, en donde el compuesto es PU-HZ150.
3. El compuesto para el uso según la reivindicación 1, en donde el compuesto es PU-HZ151.
- 10 4. El compuesto para el uso según la reivindicación 1, en donde el compuesto es PU-BSI5.
5. El compuesto para el uso según la reivindicación 1, en donde el compuesto es PU-DZ13.
6. El compuesto para el uso según la reivindicación 1, en donde el compuesto es PU-DZ14.
- 15 7. El compuesto para el uso según la reivindicación 1, en donde el compuesto es PU-BSI-11.
8. El compuesto para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el compuesto cruza la barrera hematoencefálica.
- 20 9. El compuesto para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en neurodegeneración inducida por alcohol; enfermedad de Alzheimer; esclerosis lateral amiotrófica; isquemia cerebral; adicción a la cocaína; enfermedad por cuerpos de Lewy difusa; ataques electroconvulsivos; síndrome alcohólico fetal; displasia cortical focal; atrofia muscular espinal canina

hereditaria; miositis por cuerpos de inclusión; atrofia sistémica múltiple; Niemann-Pick tipo C; enfermedad de Parkinson; y lesión de los nervios periféricos.

5 10. El compuesto para el uso según la reivindicación 9, en el que la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer.

11. El compuesto para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la enfermedad neurodegenerativa es una tauopatía.

10 12. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.

15 13. El uso según la reivindicación 12, en el que la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en neurodegeneración inducida por alcohol; enfermedad de Alzheimer; esclerosis lateral amiotrófica; isquemia cerebral; adicción a la cocaína; enfermedad por cuerpos de Lewy difusa; ataques electroconvulsivos; síndrome alcohólico fetal; displasia cortical focal; atrofia muscular espinal canina hereditaria; miositis por cuerpos de inclusión; atrofia sistémica múltiple; Niemann-Pick tipo C; enfermedad de Parkinson; y lesión de los nervios periféricos.

20 14. El uso según la reivindicación 13, en el que la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer.

15. El uso según la reivindicación 12, en el que la enfermedad neurodegenerativa es una tauopatía.

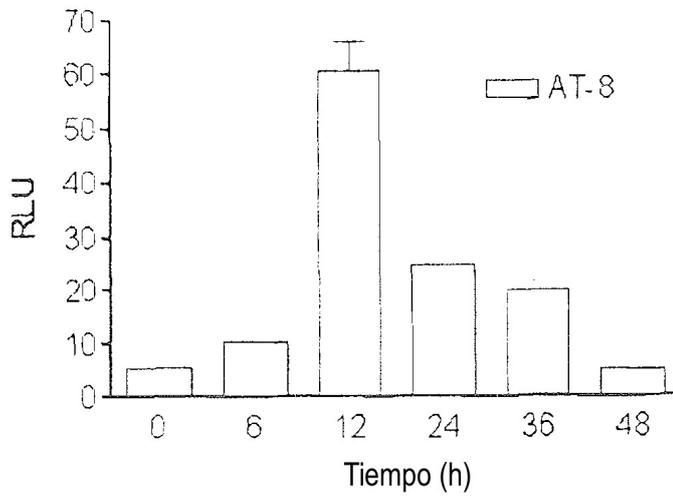


Fig. 1A

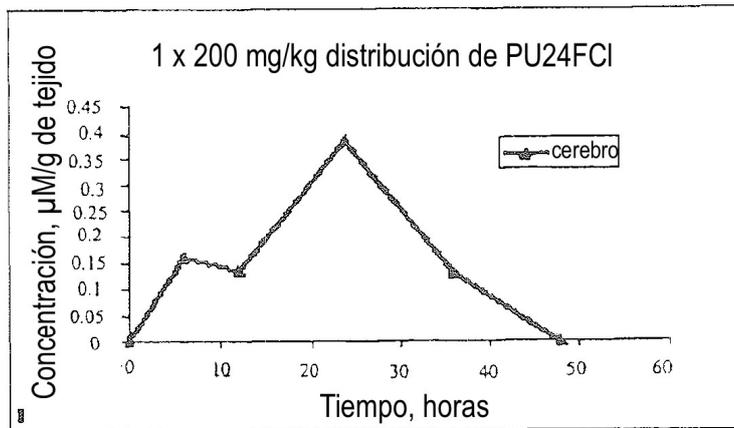


Fig. 1B

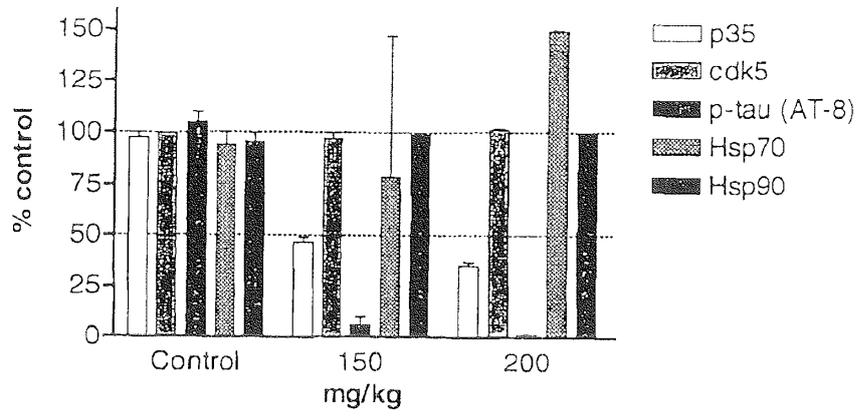


Fig. 2

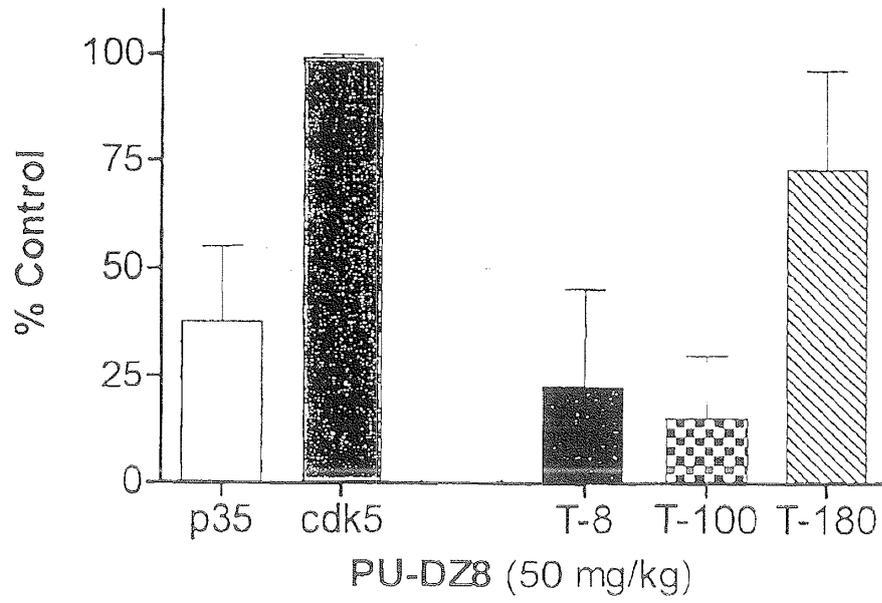


Fig. 3

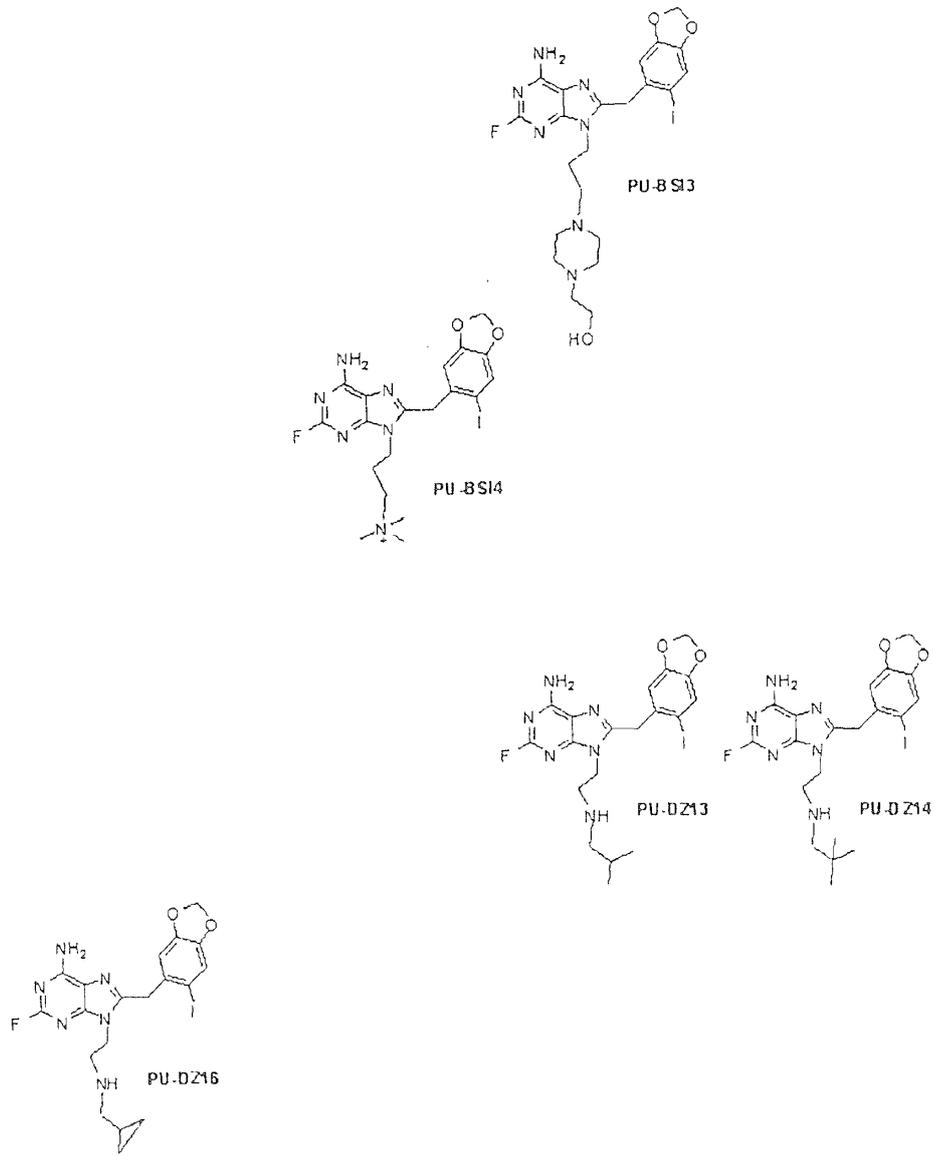


Fig. 4, Parte 2

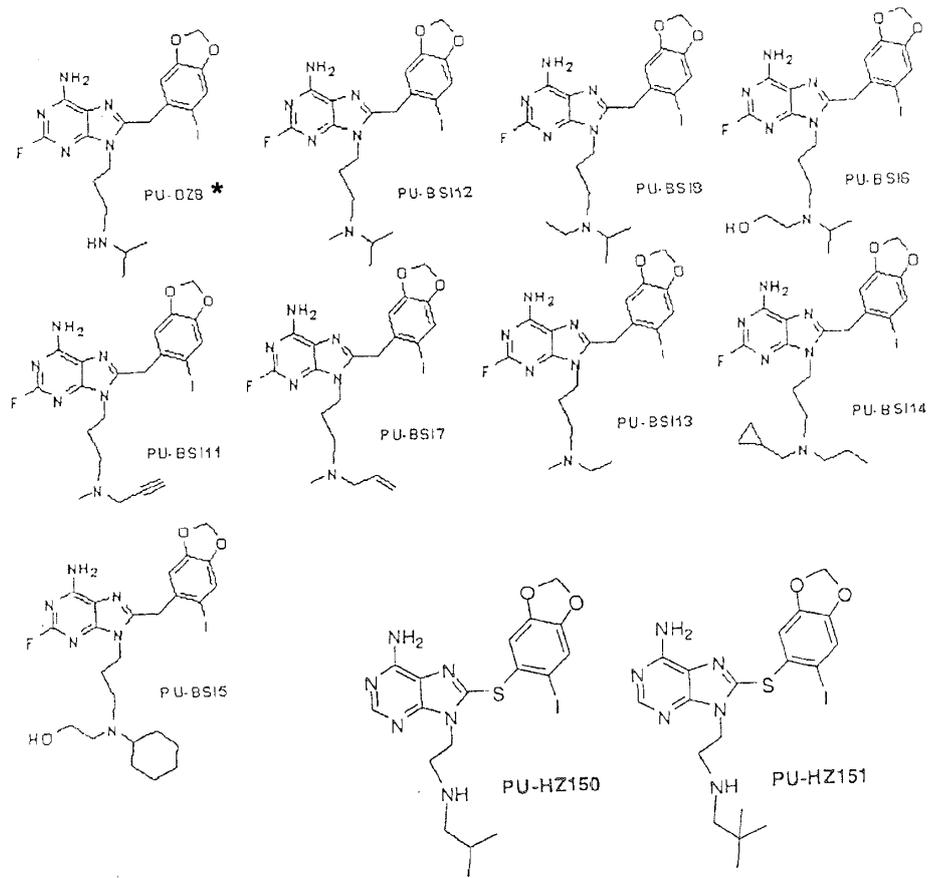
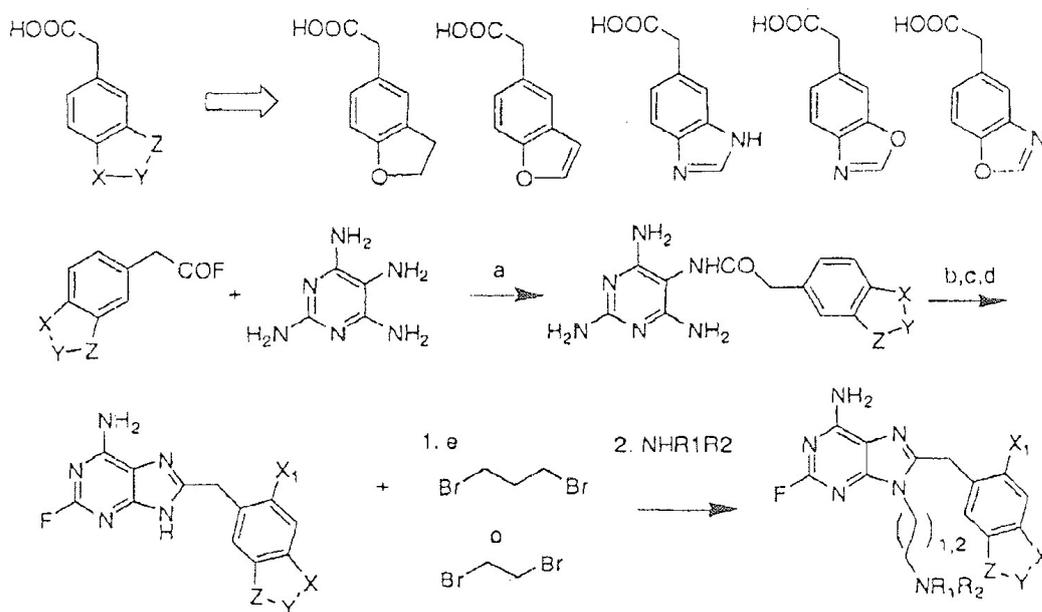


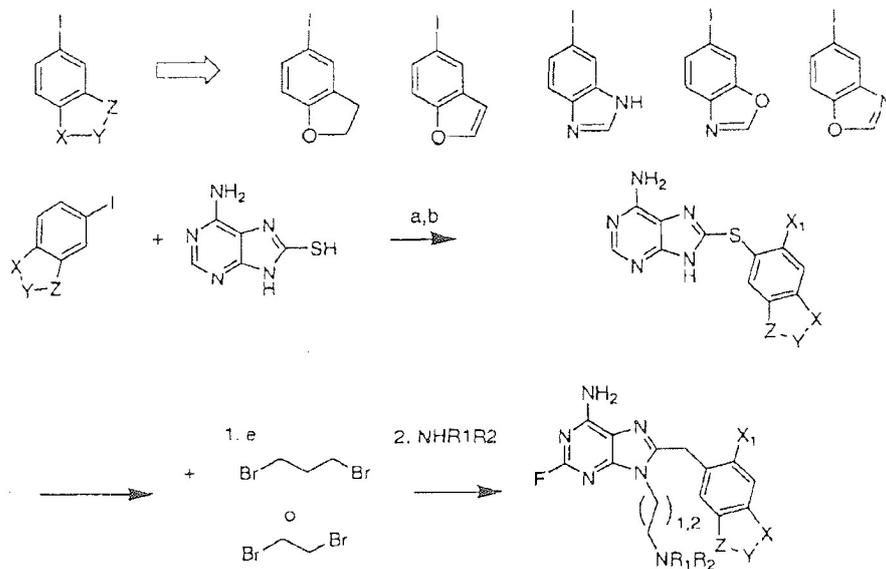
Fig. 4, parte 1

*Ejemplo de referencia (útil para la comprensión de la invención)



Reactivos y condiciones: (a) K₂CO₃, DMAP, DMF, 120°C; (b) NaOMe, MeOH, i-BuOH, 105°C; (c) HF-piridina, NaNO₂, ta; (d) NBS, DMF, ta o NIS, CF₃COOH, DMF, ta; (e) Cs₂CO₃, DMF, 50°C.

Fig. 5



Reactivos y condiciones: (a) NaOt-Bu, neocuproína, CuI, DMF, 110°C; (b) NIS, CF₃COOH, acetonitrilo, ta.

Fig. 6

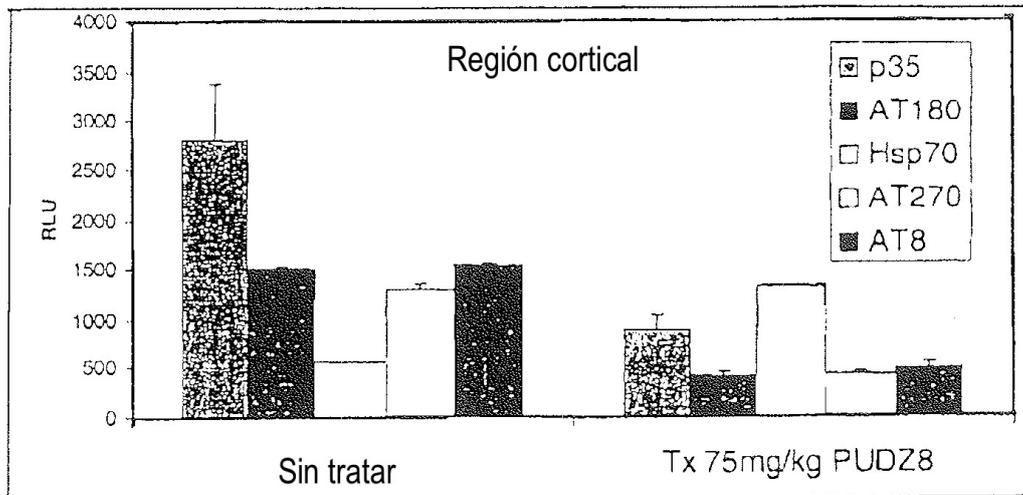


Fig. 7A

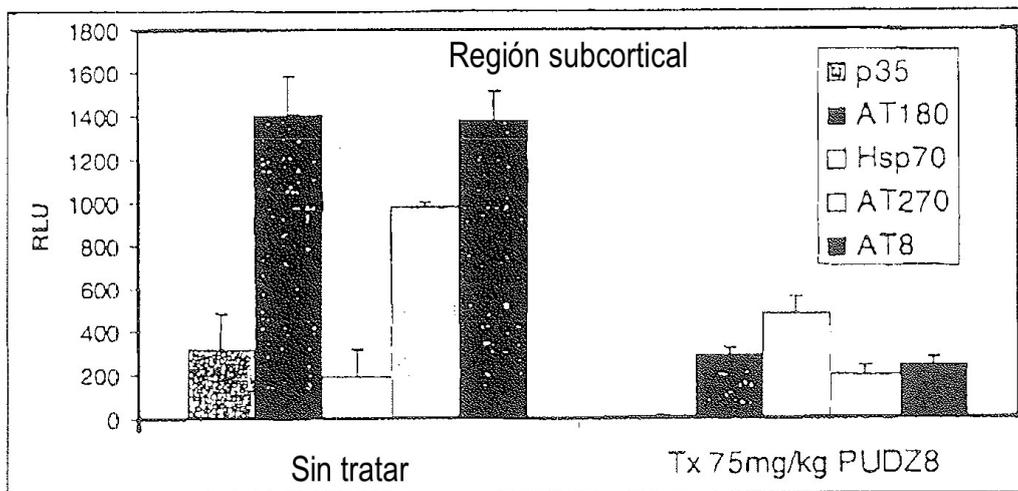


Fig. 7B

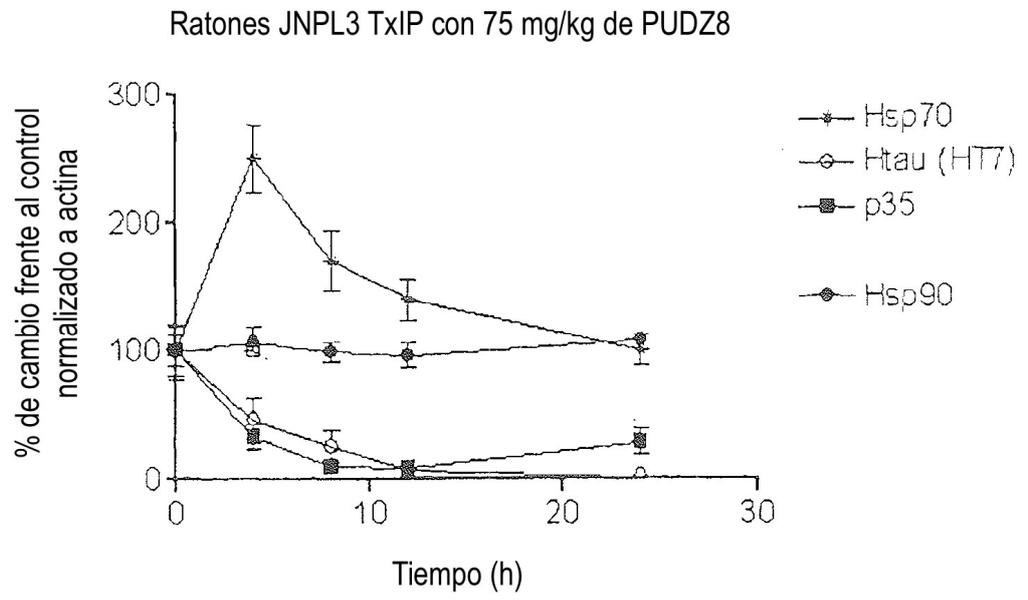


Fig. 8

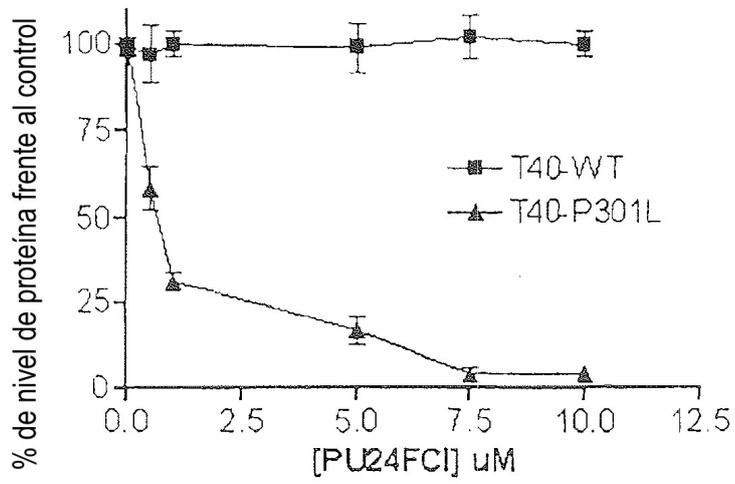


Fig. 9

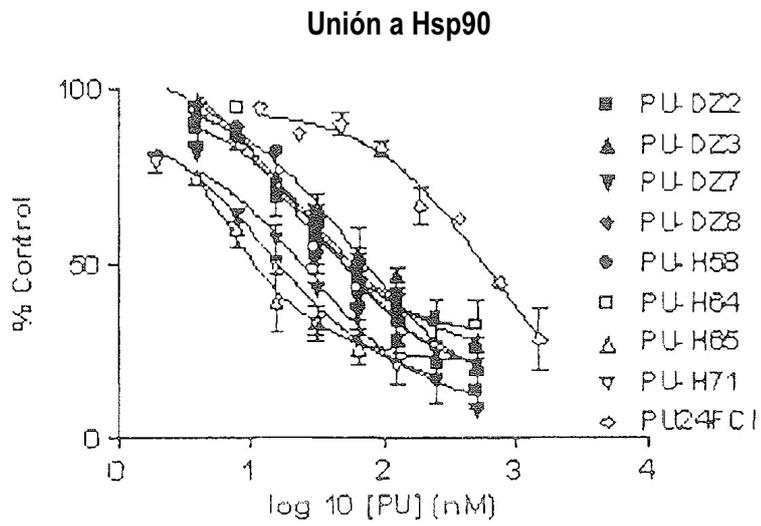


Fig. 10 A

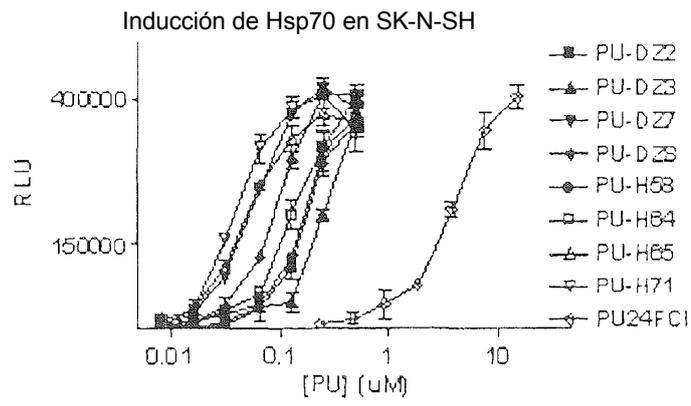


Fig. 10 B

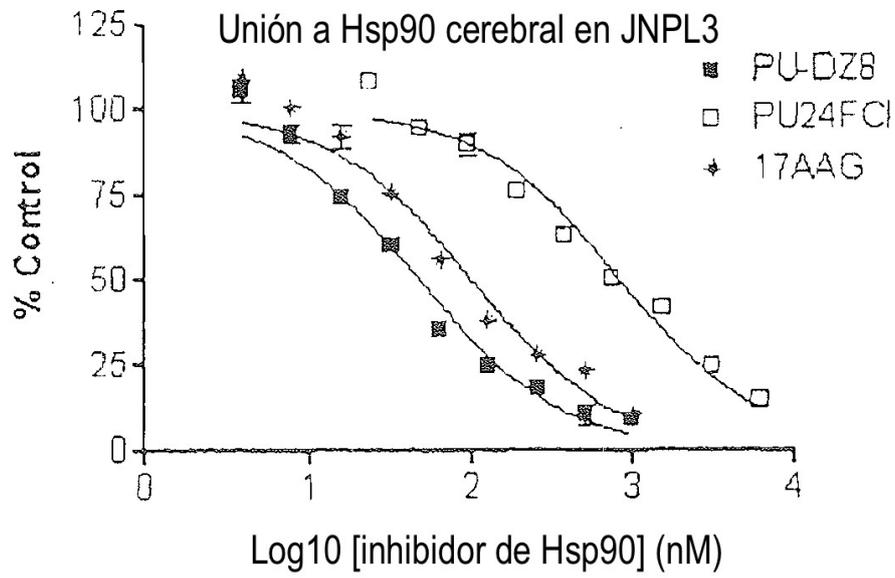


Fig. 11

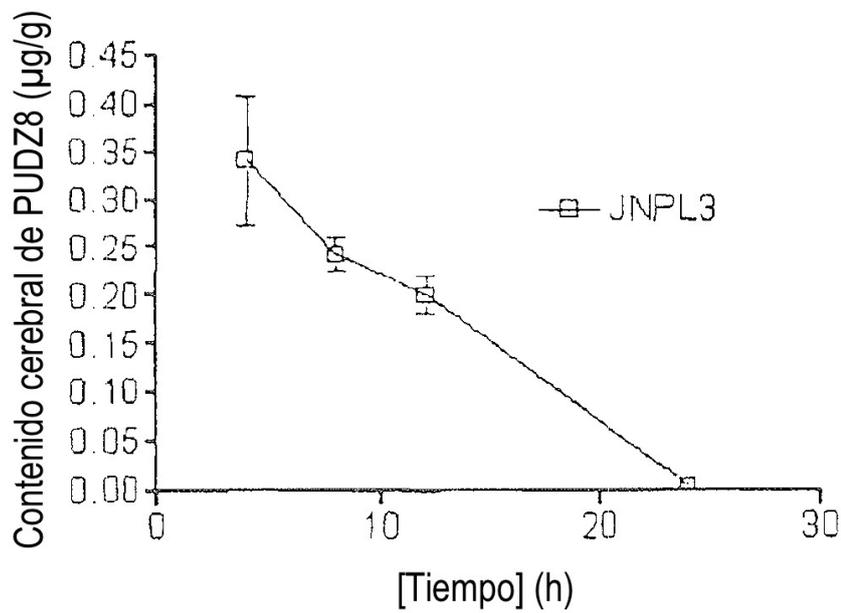


Fig. 12

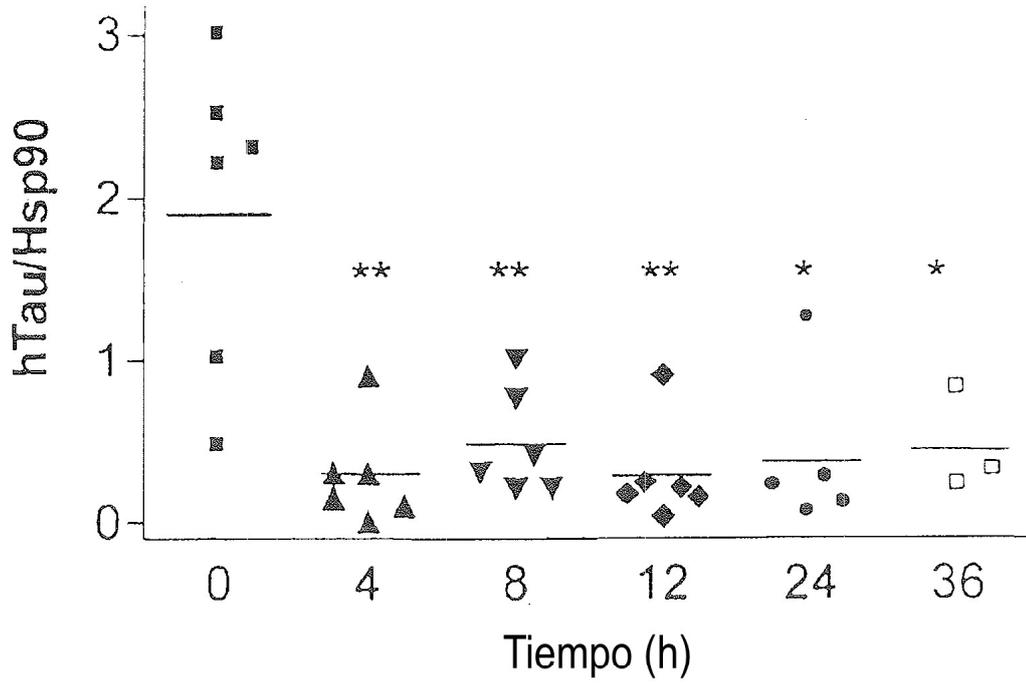


Fig. 13A

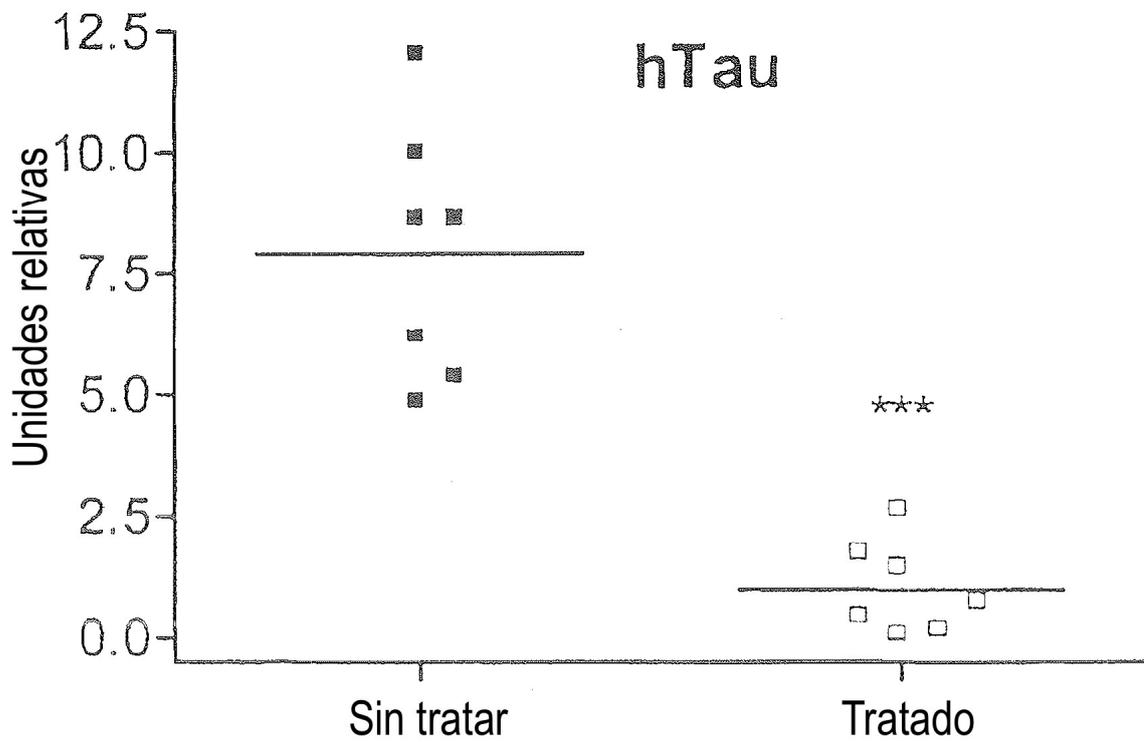


Fig. 13B

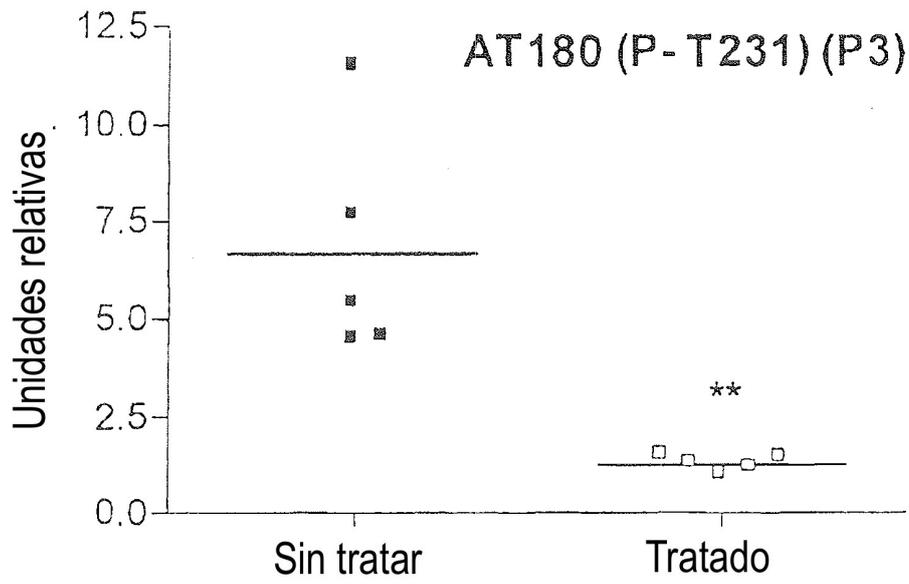


Fig. 14

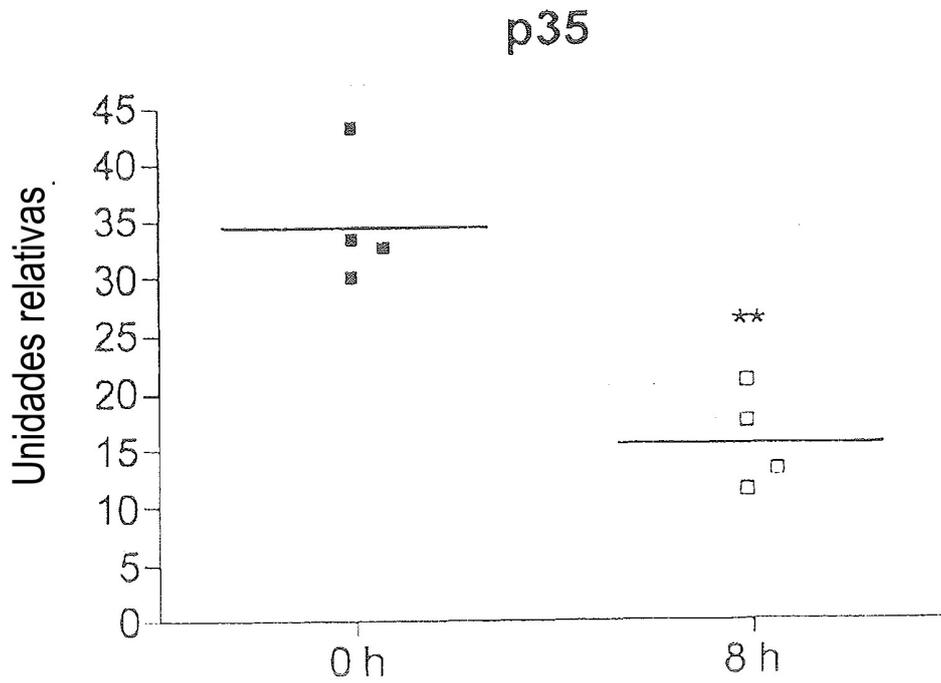


Fig. 15A

CP13 (P-S202)

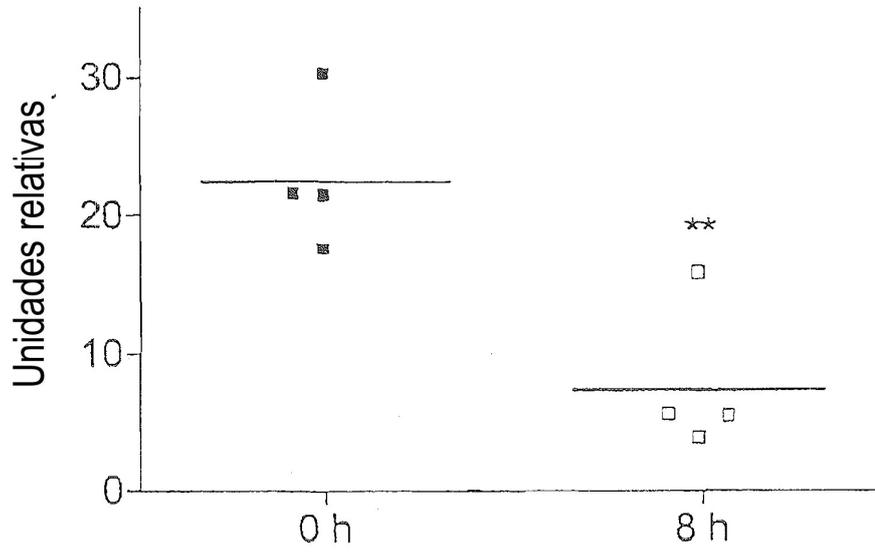


Fig. 15B