(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 386 773**

(51) Int. CI.:
G01N 33/68 (2006.01)
C07D 277/62 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
C07D 279/18 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **02720102 .9**
(96) Fecha de presentación: **20.03.2002**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1421389**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **26.05.2004**

(54) Título: **Marcadores neurofibrilares**

(30) Prioridad:
20.03.2001 GB 0106953

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.08.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.08.2012

(73) Titular/es:
WISTA LABORATORIES LTD.
51 AYER RAJAH CRESCENT NO. 07-01/02
SINGAPORE 139948, SG

(72) Inventor/es:
WISCHIK, Claude, Michel;
HARRINGTON, Charles, Robert;
RICKARD, Janet, Elizabeth y
HORSLEY, David

(74) Agente/Representante:
Zea Checa, Bernabé

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

Marcadores neurofibrilares

Campo técnico

[0001] La presente invención se refiere a ligandos para su uso en la estadificación neuropatológica y en el diagnóstico, pronóstico de enfermedades tales como Enfermedad de Alzheimer (EA).

Antecedentes de la invención

Estadificación neuropatológica y EA

[0002] La estadificación neuropatológica propuesta por Braak (Braak, H et al. (1991), Acta. Neuropathol. 82, 239-259) proporciona la mejor definición disponible de la evolución de la degeneración neurofribilar relativamente pura de tipo Alzheimer que es un diagnóstico de EA (Wischik et al. (2000), "Neurobiology of Alzheimer's Disease", Eds. Dawbarn et al., The Molecular and Cellular Neurobiology Series, Bios Scientific Publishers, Oxford). Esta estadificación se muestra esquemáticamente en la Fig. 2B en relación con las regiones cerebrales y se basa en una jerarquía regional regular de distribución de los ovillos neurofibrilares (ONF). Las regiones del cerebro que aparecen al comienzo en la jerarquía tienen más ovillos y están afectadas en casos menos graves que las últimas en la lista.

Relación entre EA, demencia clínica y estadificación neuropatológica

[0003] La existencia de una valoración pre-mortem eficaz de los estadios de Braak sería de utilidad en la valoración y el tratamiento de la EA, para la cual el diferencial incluye demencia con Cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson, diversas formas de degeneración fronto-temporal y cortico-basal, parálisis supranuclear progresiva y una diversidad de síndromes neurológicos poco frecuentes.

[0004] El modelo original propuesto por Braak fue de naturaleza esencialmente cualitativa, y no estaba relacionado con ninguna de las implicaciones sobre el umbral para el desarrollo de demencia y síntomas clínicos.

[0005] En cuanto a la aparición de demencia clínica mediante criterios según el DSM-IV, esta se corresponde estadísticamente con la transición entre los estadios 3 y 4 de Braak (Fig. 2C). Los criterios según el DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4ª Edición, American Psychiatric Association, American Psychiatric Press, Washington DC (1994)) para la definición de demencia son equivalentes a un punto de límite según el MMSE (Mini-Mental State Examination) de aproximadamente 18 y corresponden a una frecuencia de demencia de aproximadamente el 5% de la población mayor de 65 años (mayor de 65 años representa aproximadamente el 17% de la población total).

[0006] Gertz et al. ((1996) Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 246, 132-6)) estudiaron casos resultantes de una práctica general post-mortem, que se caracterizaron estrictamente a nivel clínico usando el CAMDEX (Roth et al, 1988, "The Cambridge Examination for Mental Disorders of the Elderly (CAMDEX)" Cambridge University Press). Estos se estadificaron post-mortem mediante los criterios de Braak y, después de excluir todos los casos sin ningún grado de patología vascular encontrados post-mortem, sigue habiendo incertidumbre aproximadamente en un tercio de casos en el punto de transición. Es decir, aproximadamente un tercio de casos con un diagnóstico clínico de EA están realmente en los primeros estadios de Braak (estadios 1-3), tienen patología vascular, o tienen patología concomitante con cuerpos de Lewy. Por tanto existe un alto grado de incertidumbre, incluso en el entorno de investigación más práctico. El sustrato neuropatológico predominante que en realidad está presente cuando se realiza un diagnóstico clínico rutinario de la EA es incluso más incierto.

[0007] Recientemente se ha descrito una molécula (FDDNP, 2-(1-{6-[(2-[^{18}F]fluoroetil) (metil)amino]-2-naftil} etilideno)malononitrilo) que muestra un tiempo de retención relativo (TRR) aumentado en las regiones del cerebro del lóbulo temporal medio (hipocampo, córtex entorrinal y amígdala) tras inyección y formación de imágenes PET (Tomografía de Emisión de Positrones) en casos con un diagnóstico clínico neurológico de enfermedad de Alzheimer (Shoghi-Jadid et al., Am. J. Geriatr. Psychiatr. 2002, 10: 24-35).

[0008] Aunque se analiza la unión a los ONF y a placas amiloideas, no se muestra unión a los ONF, aunque el compuesto se une con alta afinidad a fibrillas beta-amiloideas sintéticas *in vitro*.

[0009] Cuando coincidieron casos de gravedad de la enfermedad correspondiente, por puntuación según el MMSE, con una serie de casos neuropatológicos en los que se excluyó patología vascular, se encontró que los valores de TRR, indicados por Shoghi-Jadid et al., se correlacionaban con recuentos de placas beta-amiloideas pero no con mediciones de patología de ovillos neurofribilares, como se muestra a continuación.

[0010] Coeficientes de correlación por rangos de Spearman:

	PA LTM	PA Global	ONF LTM	ONF Global
TRR	0,665**	0,654**	0,244	0,189
p	<0,01	<0,01	>0,1	>0,1

[0011] Coeficientes de correlación de Pearson:

	PA LTM	PA Global	ONF LTM	ONF Global
TRR	0,602**	0,596**	0,266	0,275
p	<0,05	<0,05	>0,3	>0,3

[0012] En el que los parámetros se definen de la siguiente manera:

PA LTM	placas amiloideas del lóbulo temporal medio
PA Global	cantidad promedio de placa amiloidea en 12 regiones del cerebro
ONF LTM	ovillos neurofribilares en el lóbulo temporal medio
ONF global	cantidad promedio de ONF en 12 regiones del cerebro

[0013] Sin embargo, se sabe que la deposición de la beta-amiloidea se diferencia mal entre envejecimiento normal y enfermedad de Alzheimer (véase la Figura 2d en el presente documento) y la patología beta-amiloidea no proporciona una base sólida para la estadificación neuropatológica (Braak and Braak, 1991). Por lo tanto, el TRR de la molécula FDDNP no proporciona un método para la estadificación neuropatológica *in vivo* de la enfermedad de Alzheimer.

[0014] Sin embargo, es posible que un refinamiento adicional en métodos clínicos, con particular referencia a indicadores neuropsicológicos más específicos (por ejemplo tareas de atención divididas, coincidencia retrasada de muestras, etc.), pueda mejorar la precisión del diagnóstico clínico, un problema esencial es desarrollar métodos para medir directamente la neuropatología subyacente durante la vida, en particular la extensión de la degeneración neurofribilar del tipo Alzheimer.

Evolución de degeneración neurofribilar y tau

[0015] Como se ha descrito anteriormente, la patología de la EA basada en tau es una característica principal del fenotipo. Está muy correlacionada con la extensión de la destrucción neuronal (revisado en Wischik et al. (2000) lugar citado).

[0016] Sobre una base celular, se piensa que la formación de los ONF a partir de Tau evoluciona de la siguiente manera. Durante su formación y acumulación, en el citoplasma, filamentos helicoidales pareados (FHP) se ensamblan primero como filamentos, probablemente a partir de oligómeros de tau iniciales que comienzan a truncarse antes de, y durante, el ensamblaje de los FHP (Referencias 26, 27). Después van a formar los ONF intracelulares clásicos. En este estado, los FHP constan de un núcleo de tau truncada y una capa externa difusa que contiene la tau de longitud completa (Wischik et al. (2000) lugar citado). El proceso de ensamblaje es exponencial, consumiendo el grupo celular de tau funcional normal e induciendo nueva síntesis de tau para constituir el déficit (Ref. 29). Eventualmente el deterioro funcional de la neurona evoluciona hasta el punto de muerte celular, dejando atrás un ONF extracelular. La muerte celular está muy correlacionada con el número de ONF extracelulares (Bondareff, W. et al. (1993) Arc. Gen. Psychiatry 50: 350-6). Dado que la membrana neuronal externa resulta dañada y que los ONF se extruyen en el espacio extracelular, existe una pérdida progresiva de la capa externa difusa de la neurona con correspondiente pérdida de inmunorreactividad tau N-terminal, aunque se conserva inmunoreactividad tau asociada con el núcleo de los FHP (Figura 3; Ref. 30).

[0017] En el proceso de agregación, la proteína tau experimenta un cambio conformacional en el dominio repetido asociado con un cambio de fase medio repetido (Ref. 32, 33). Esto crea un fragmento proteolíticamente estable que es idéntico al encontrado en el núcleo de los filamentos helicoidales pareados (FHP) que constituye los ovillos neurofribilares característicos de la EA. Por analogía con otros sistemas de agregación de proteínas, el proceso más probablemente implica un cambio en la conformación de cadena beta a hélice-alfa (revisado en Wischik et al. (2000) lugar citado).

[0018] Por lo tanto, en términos generales, la agregación de tau puede considerarse en 3 estadios: oligómeros intracelulares; filamentos intracelulares (estadio 1 de la Figura 3); filamentos extracelulares (estadios 2 y 3 de la Figura 3).

[0019] Sin embargo, hasta ahora, no se ha establecido ninguna correlación definitiva entre estos estadios, que se producen a nivel celular y posiblemente a diferentes velocidades y probabilidades en diferentes regiones en el cerebro y la evolución de la patología de acuerdo con el sistema jerárquico de Braak y Braak definido que, como se

ha indicado anteriormente, es la mejor definición disponible de la evolución de la degeneración neurofribilar relativamente pura.

Métodos invasivos para valorar la EA

[0020] Las mediciones del CSF(líquido cefalorraquídeo, por las siglas en inglés de *Cerebral Spinal Fluid*) mediante punción lumbar permiten discriminar entre EA y controles y entre EA y otros trastornos neurológicos, pero la punción lumbar es más invasiva que las estrategias basadas en medicina nuclear y conlleva un mayor riesgo (Referencias 17 a 21). También se han desarrollado diagnósticos neurológicos por EEG (electroencefalografía) (Refs. 22-25), pero en ese sentido sigue existiendo una necesidad de instrumentación menos costosa que pueda usarse en el momento del contacto clínico.

Degeneración neurofibrilar mediante SPECT y PETP para detectar atrofia cerebral

[0021] Numerosos estudios han demostrado que la atrofia cerebral global y la atrofia específica del lóbulo temporal medio, particularmente del hipocampo, están estrechamente relacionadas con la degeneración neurofribilar subyacente del tipo Alzheimer y son valiosas en el diagnóstico precoz de la EA (Refs 1-8).

[0022] Sin embargo, aunque el diagnóstico de la EA monitorizando la atrofia cerebral global representa una metodología que puede realizarse para trabajar en un entorno de investigación, existen dificultades en la definición y medición de la atrofia en regiones cerebrales específicas y del mismo modo en la medición de la atrofia neocortical global. En cualquier caso, para un tratamiento eficaz, un diagnóstico basado en atrofia detectable puede llegar demasiado tarde.

[0023] En los últimos años, ha habido avances en cuanto a metodología de diagnóstico, continuando con la identificación de características de diagnóstico en exploraciones mediante SPECT (tomografía computerizada de emisión de fotones simple) (Refs 9-12; modelos característicos de defectos de perfusión detectados por HMPAO SPECT), exploraciones mediante PET (tomografía de emisión de positrones) (Refs 13-15; defectos metabólicos detectados por perfiles del metabolismo de glucosa) y exploraciones mediante MRI (imagen por resonancia magnética) (Ref 16; atrofia cerebral global, modelos específicos de atrofia lobular). De estos, generalmente los más accesibles son la MRI y la SPECT, ya que la PET está actualmente limitada a centros locales especializados que poseen ciclotrón y radioquímica capaces de preparar radioligandos inyectables de semi-vida corta (Aberdeen, Londres, Cambridge en RU). De manera destacable, el defecto de perfusión temporo-parietal característico del primer estadio detectado por HMPAO SPECT en pacientes con EA se corresponde muy estrechamente con el patrón de patología tau que puede detectarse bioquímicamente (Figura 1). Los cambios bioquímicos preceden claramente a la degeneración neurofribilar, como se observa por la aparición de los ONF (Figura 2; Mukaetova-Ladinska et al., 2000 Am. J. Pathol. Vol. 157, No. 2, 623-636).

[0024] Sin embargo, aunque las exploraciones MRI y SPECT sean útiles para detectar patrones específicos de defectos de perfusión característicos de EA, la discriminación entre diferentes estadios neuropatológicos o entre EA y otros tipos de demencia es difícil.

[0025] Por ejemplo, la SPECT es útil para detectar un patrón específico de defecto de perfusión temporo-parietal bilateral que es característico de la EA (Refs 9-11), que puede ser útil incluso en estadios precoces de la enfermedad. Sin embargo, cambios en la SPECT discriminan mal estadios neuropatológicas (Ref 12). Adicionalmente, la discriminación entre EA y demencia con cuerpos de Lewy es difícil. Ambas tienen un defecto de perfusión temporo-parietal bilateral, pero solo la última tiende a presentar un defecto de perfusión occipital. Los mismos patrones de defecto pueden demostrarse usando medición PET del metabolismo de glucosa (Refs 13-15), pero en esta modalidad, persiste el problema de diferenciar demencia con cuerpos de Lewy.

[0026] Por tanto, como puede deducirse a partir de los datos observados en la Ref 12, la probabilidad para detectar con éxito mediante SPECT casos en estadios Braak 1 y 2 es del 50% y del 60% en estadios 3 y 4. Sólo en los estadios 5 y 6 el 95% de los casos resultan ser positivos mediante SPECT. Al contrario, casos detectados como positivos mediante SPECT podrían ser en los estadios 1 y 2 (20%), 3 y 4 (20%) o 5 y 6 (60%). Por lo tanto, SPECT no detectará el 40 - 50% de la población diana en el pre-estadio 4 para un diagnóstico y una intervención terapéutica precoces. En un estudio adicional (datos no mostrados) se observó que la concordancia global entre diagnóstico SPECT y diagnóstico clínico fue del orden del 50%.

[0027] Por tanto, en el desarrollo de un tratamiento dirigido específicamente a la prevención de la degeneración neurofribilar del tipo Alzheimer, existe una necesidad crítica para desarrollar, en paralelo, medios no invasivos de selección de pacientes para el tratamiento y controlar su respuesta al tratamiento, de acuerdo con una definición definida y reproducible de la evolución de la enfermedad.

Descripción de la invención

Breve resumen de la invención

[0028] Los autores de la presente invención han usado propiedades inmunoquímicas (Refs 26, 27, 30) para distinguir ovillos intracelulares de ovillos extracelulares. Tanto la frecuencia de casos con ovillos en estas categorías (es decir, probabilidad) como su cantidad (es decir, recuentos por mm^2) se determinaron en una serie de casos prospectivos y se agruparon en regiones del cerebro que se sabía que representaban estadios en la evolución de la patología de acuerdo con el sistema de Braak y Braak.

[0029] Como se describe con más detalle a continuación, estos estudios con anticuerpos demuestran por primera vez que empleando especificidad extracelular frente a intracelular, en regiones cerebrales definidas, los depósitos de tau en los FHP proporcionan una base para la estadificación empírica de la degeneración neurofibrilar de la EA.

[0030] Por tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un ligando capaz de marcar a la proteína tau agregada en filamentos helicoidales pareados (FHP) para su uso en un método in vivo para determinar el estadio de degeneración neurofibrilar asociado con una tauopatía en un sujeto que se piensa que padece la enfermedad, cuyo método comprende las etapas de:

(i) introducir el ligando en el sujeto,
en el que el ligando es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y se conjuga, se quela o se asocia de otra manera, con un grupo químico detectable,
(ii) determinar la presencia y/o la cantidad de ligando unido a la proteína tau extracelular agregada en FHP en el lóbulo temporal medio del cerebro del sujeto,
(iii) correlacionar los resultados de la determinación realizada en el punto (ii) con la extensión de la degeneración neurofibrilar en el sujeto.

[0031] Como se ha descrito en la introducción, la evolución de la degeneración neurofribilar es definitiva de la estadificación neuropatológica propuesta por Braak, que a su vez es la mejor definición neuropatológica disponible de la evolución de la EA. Los métodos de la presente invención pueden por tanto usarse para proporcionar un resultado real de los estadios de Braak. En realizaciones preferidas estos métodos pueden usarse para realizar diagnósticos en pacientes en los primeros estadios de Braak (por ejemplo estadio de Braak 2) incluso antes de que los síntomas clínicos puedan ser fácilmente evidentes - tal diagnóstico puede usarse para un tratamiento y asesoramiento oportuno directo.

[0032] De manera interesante, los resultados mostrados en Gertz et al. (1996) lugar citado, basándose en detección inmunológica de los ONF, pero que no distingue ovillos extracelulares e intracelulares, mostraron pocas diferencias entre los números detectados en sujetos con demencia (generalmente estadio 4-6 de Braak) y sin demencia (generalmente estadio 1-3 de Braak) en estructuras del lóbulo temporal medio (véase la Figura 1 y la Tabla 2, página 134 en el mismo; las estructuras relevantes se marcaron con Pre alfa ent., CA1, Pri Ento.). Por tanto la correlación demostrada por la presente invención es particularmente sorprendente.

[0033] La memoria descriptiva describe adicionalmente ligandos para su uso en el marcaje de agregados tau, además también nuevas exploraciones para el descubrimiento de tales ligandos.

[0034] Algunos de los aspectos de la invención analizados anteriormente se tratarán ahora con más detalle.

Elección del sujeto

[0035] Los sujetos adecuados para el método pueden seleccionarse en base a factores convencionales. Por tanto la selección inicial de un paciente puede implicar una cualquiera o más de: evaluación rigurosa por un médico con experiencia; exclusión de diagnóstico no EA, en cuanto sea posible, por parte de un laboratorio y otras investigaciones complementarias; evaluación objetiva del nivel de función cognitiva usando equipos neuropatológicamente validados.

Ligandos

[0036] El ligando es capaz de marcar a la proteína tau agregada en FHP, cuya formación se ha analizado anteriormente. Específica o preferentemente puede unirse a tal proteína tau (preferentemente con respecto a sitios de unión competitivos presentes en la región relevante del cerebro). A continuación se analizan ligandos adecuados (incluyendo nuevos ligandos) y métodos para identificarlos.

[0037] Más específicamente, la estadificación de Braak de la descripción, puede evaluarse sobre la base descrita en el presente documento con implicaciones significativas para la elección y/o desarrollo de ligandos para su uso en el marcaje de diagnóstico. Los métodos inmunológicos presentan el inconveniente de que los anticuerpos no

atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica de una manera cuantitativa, y adicionalmente, el método puede ser clínicamente inadecuado dado que pueden desencadenarse reacciones adversas por la inyección de anticuerpos en el organismo para este fin. Es por consiguiente difícil discriminar entre estadios diferentes de agregación tau basándose en patrones de inmunoreactividad diferenciales en sujetos vivos.

[0038] Por lo tanto, los autores de la presente invención han investigado las características químicas críticas de los compuestos que se unen a ovillos neurofibrilares. En el presente documento se proporciona una estructura química mínima necesaria para la unión que tiene implicaciones, entre otras, en el desarrollo y uso de compuestos como ligandos de ovillos neurofibrilares y tales procesos, usos y compuestos forman aspectos adicionales de la invención.

[0039] Los ligandos preferidos, incluyendo nuevos ligandos, se describen con más detalle en lo sucesivo en el presente documento, pero en particular pueden incluir compuestos de tipo benzotiazol sulfonados (véase, por ejemplo, la Figura 4a) y diaminofenotiacinas (véase, por ejemplo, la Figura 8) así como otros compuestos miméticos que comparten una estructura química mínima apropiada con cada uno de estos. En el presente documento se describen composiciones que comprenden, o que consisten en, combinaciones de los ligandos descritos en el presente documento (preferentemente ligandos que pueden distinguirse, por ejemplo, en cuando a marcaje) y/o combinaciones de ligandos con agentes bloqueantes (véase más adelante).

Unión a tau extracelular

[0040] La determinación del punto (ii) anterior se realiza basándose en la proteína tau extracelular agregada. En términos generales, para los fines de la presente invención, esto puede determinarse a partir de ovillos extracelulares (véanse, por ejemplo, las Refs 26, 27, y el apartado de Ejemplos, Métodos y Materiales, Tabla).

[0041] Previamente, a partir de estudios histológicos, se ha observado que durante la agregación, la proteína tau adquiere sitios de unión para compuestos tales como rojo tiacina y tioflavina-S (Refs 26, 27). Puede observarse que el sitio de unión existe dentro del propio ovillo, y no en proteínas extrañas (Ref 34). Por tanto, según evaluación histológica, los ovillos intracelulares y extracelulares se marcan hasta cierto grado con tales ligandos.

[0042] En términos generales, la probabilidad o cantidad de sitios de unión extracelulares (a diferencia de sitios de unión totales o sitios intracelulares) puede determinarse usando ligandos que sean demasiado grandes para obtener un acceso intracelular fácil, o ligandos que puedan actuar intracelularmente, pero a una concentración definida (relativamente inferior) a la cual se favorezca la acción extracelular.

[0043] Podría esperarse al menos que ligandos grandes quelados, tales como aquellos que sean susceptibles a detección por SPECT, alcanzasen y se uniesen a dianas extracelulares apropiadas. Los compuestos marcados directamente para PET posiblemente podrían detectar dianas intracelulares o extracelulares, estando las últimas favorecidas a baja concentración. Por tanto el trabajo de los autores de la presente invención demuestra que estos dos métodos de detección tienen potencial en la estadificación de Braak, cuando se usan con un ligando de unión a ovillo apropiado. Sin embargo, a la luz de la presente descripción, se apreciará que para evaluar convenientemente la estadificación de Braak mediante números de ONF puede ser importante emplear ligandos que no solo sean capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y de marcar específicamente depósitos extracelulares o intracelulares de la proteína tau agregada, sino que preferentemente también puedan conservar esta propiedad cuando se conjugan con otros compuestos.

[0044] Sin embargo, para evitar dudas, los ligandos pueden visualizarse o detectarse mediante cualquier medio adecuado y el experto en la materia apreciará que, para estos ejemplos, pueda sustituirse cualquier medio de detección adecuado, conocido en la técnica.

Potenciación de unión tau preferencial

[0045] En una realización de la invención, las etapas (i) y/o (ii) del método se realizan junto con (preferentemente precedidas por) la etapa adicional de introducir en el sujeto un segundo ligando que marque sitios de unión competitivos (es decir tau no agregada) presentes en la región relevante del cerebro, preferentemente con respecto al primer ligando.

[0046] Por tanto los métodos y otras realizaciones del presente documento pueden incluir una etapa:

(i*bis*) introducir en el sujeto un ligando de bloqueo que marque sitios de unión a tau no agregada en el cerebro del sujeto preferentemente con respecto al ligando capaz de marcar a la tau agregada en ONF.

[0047] Un sitio de unión competitivo puede ser uno que presente, por ejemplo, placas amiloideas, de tal manera que pueden estar presentes en el sujeto. Introduciendo tales segundos ligandos en el sujeto, puede potenciarse la concentración relativa o eficaz del primer ligando disponible para unirse a la tau agregada. Los segundos ligandos adecuados (o compuestos de bloqueo como pueden describirse en el presente documento) se describen más

adelante, pero en particular pueden incluir benzotiazoles tales como se observa en la Figura 5, compuestos 1B y 2. Otro ligando de bloqueo adecuado puede ser FDDNP de Shoghi-Jadid et al., Am. J. Geriatr. Psychiatr. 2002, 10:24-35, analizado anteriormente.

Regiones cerebrales

[0048] En las Figuras 25, 27 y 29 se demuestra la importancia del lóbulo temporal medio, es decir, regiones E2/Trans (capa 2 de la corteza entorrinal/corteza entorrinal transicional) y E4/HC (capa 4 de la corteza entorrinal e hipocampo) y también estructuras neocorticales (regiones F/T/P - frontal, temporal, parietal) del cerebro.

[0049] En una realización, el método comprende únicamente analizar los datos basándose en los ONF extracelulares en el lóbulo temporal medio.

[0050] En una realización adicional, se evalúan los datos de esta región así como los de la estructura neocortical. En el último caso puede preferirse evaluar los depósitos de los ONF intracelulares.

[0051] Por tanto los métodos y otras realizaciones del presente documento pueden incluir la etapa adicional de:

(iib) determinar adicionalmente la presencia y/o la cantidad de ligando unido a la proteína tau intracelular agregada en FHP en una estructura neocortical del cerebro del sujeto.

[0052] Esto puede realizarse después de:

(iii) correlacionar el resultado de la determinación realizada en (ii) y opcionalmente (iib) con la extensión de la degeneración neurofribilar en el sujeto y por tanto el estado de EA del sujeto.

[0053] El ligando usado para el marcado intracelular puede ser en principio el mismo que el usado para el marcador extracelular, pero preferentemente será diferente y/o se marcará distintivamente (de tal manera que pueda diferenciarse mediante cualquier proceso de formación de imágenes que se use).

[0054] Pueden preferirse etapas adicionales particularmente para evaluar o confirmar la degeneración neurofibrilar en sujetos en los estadios 2-6 de Braak.

Determinación de la degeneración neurofibrilar

[0055] La presencia de unión en un área determinada puede determinarse. Después, esta determinación puede relacionarse con un intervalo normal de valores para casos sin ninguna patología (es decir, casos supuestamente en el estadio 1 de Braak) o con intervalos de valores de referencia que se han determinado para estadios de Braak sucesivos para determinar el estadio neuropatológico correspondiente a la determinación proporcionada. La correlación puede realizarse mediante una tabla o un gráfico de consulta, por ejemplo, en base a datos correspondientes a las Figuras y Tabla 1 en el Ejemplo 1 del presente documento para la densidad. Como alternativa, una determinación proporcionada puede relacionarse con referencia a un valor umbral proporcionado frente a una probabilidad de un caso que está en un estadio más avanzado que el estadio 1 (basándose, por ejemplo, en datos correspondientes a las Figuras del presente documento para probabilidad) y por lo tanto proporcionar una probabilidad para atribuir correctamente un diagnóstico de enfermedad de Alzheimer.

Usos del método

[0056] La determinación puede ser como parte de un método de diagnóstico o pronóstico. Esta puede usarse para seleccionar un paciente para el tratamiento, o para evaluar la eficacia de un tratamiento o una terapia, por ejemplo, un inhibidor de asociación tau-tau administrado al sujeto.

[0057] Por tanto las realizaciones de la invención incluyen:

Un ligando que sea capaz de marcar a la proteína tau extracelular agregada en FHP para su uso en un método de diagnóstico o pronóstico de EA en un sujeto que se piensa que padece la enfermedad, cuyo método comprende las etapas de:

(i) introducir en el sujeto un ligando que sea capaz de marcar a la proteína tau agregada en FHP, donde el ligando es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y se conjuga, se quela, o se asocia de otra manera, con un grupo químico detectable,
(ii) determinar la presencia y/o la cantidad de ligando unido a la proteína tau extracelular agregada en FHP en el lóbulo temporal medio del cerebro del sujeto,
(iii) correlacionar el resultado de la determinación realizada en (ii) con la extensión de la degeneración neurofibrilar en el sujeto, y por tanto el estado de EA del sujeto.

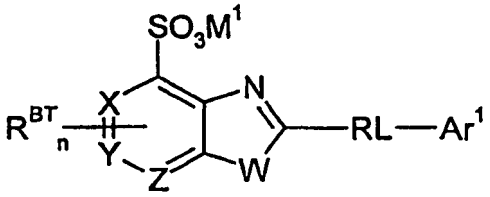
[0058] El uso de un ligando que sea capaz de marcar a la proteína tau extracelular agregada en FHP en un método para preparar un reactivo de diagnóstico o pronóstico adecuado para su uso en un método de determinación del estadio de degeneración neurofibrilar asociado con EA en un sujeto que se piensa que padece la enfermedad, cuyo método comprende las etapas de:

(i) introducir en el sujeto dicho reactivo que sea capaz de marcar a la proteína tau agregada en FHP, donde el ligando sea capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y se conjuga, se quela, o se asocia de otra manera, con un grupo químico detectable,
(ii) determinar la presencia y/o la cantidad de reactivo unido a la proteína tau extracelular agregada en FHP en el lóbulo temporal medio del cerebro del sujeto,
(iii) correlacionar el resultado de la determinación realizada en (ii) con la extensión de la degeneración neurofibrilar en el sujeto.

[0059] En el presente documento también se describe un kit para realizar los usos y métodos descritos anteriormente, comprendiendo el kit uno o más ligandos o derivados, tal y como se proporcionan en el presente documento, que sean capaces de unirse a las moléculas agregadas. Esto puede incluir medios para aumentar la posibilidad de detectar tales compuestos, por ejemplo, un grupo quelante para el tecnecio, más opcionalmente medios para conjugar este con el ligando, más opcionalmente con tecnecio. Cuando el kit comprende un derivado de un compuesto, tal y como se describe en el presente documento, este puede detectarse, por ejemplo, fluoroscópicamente, como se analiza en otra parte de esta descripción. El kit también puede incluir medios para detectar o visualizar el ligando, por ejemplo, cuando el ligando tiene un grupo de biotina incorporado, el kit incluye preferentemente un anticuerpo antibiotina. De manera similar, el kit puede incluir medios para detectar la fluorescencia inherente de un compuesto, medios para detectar grupos fotoactivables, anticuerpos marcados adicionales, etc.

[0060] A continuación, se analizarán con más detalle diversos ligandos preferidos para su uso en la presente invención. En cada caso, los expertos en la materia apreciarán que, en lugar de administrar los ligandos directamente, estos pueden administrarse en una forma precursora, para la conversión de la forma activa mediante un agente de activación presente en, o administrado al, mismo sujeto.

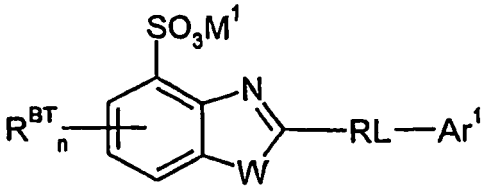
[0061] Son ligandos adecuados para su uso en este aspecto de la presente invención, compuestos de la fórmula:



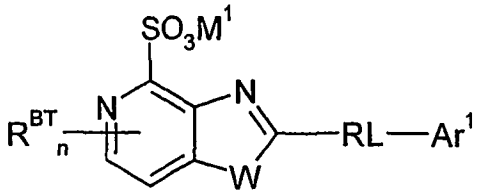
en la que:

W es S, O o NH;
exactamente uno de X, Y y Z es CH o N;
el resto de X, Y y Z son CH;
M^1 es un catión de metal álcali;
RL es un grupo enlazador rígido;
Ar^1 es un grupo arilo C_{5-20};
n es un número entero de 0 a 3; y
cada R^{BT} es un sustituyente de núcleo.

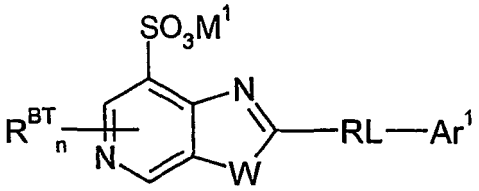
[0062] En una realización, cada uno de X, Y y Z es CH, y los compuestos que tienen la siguiente fórmula:



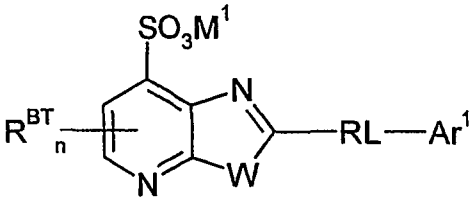
[0063] En una realización, X es N; cada uno de Y y Z es CH; y los compuestos tienen la siguiente fórmula:



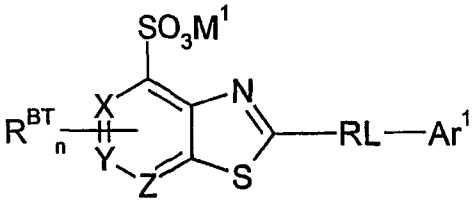
[0064] En una realización, Y es N; cada uno de X y Z es CH; y los compuestos tienen la siguiente fórmula:



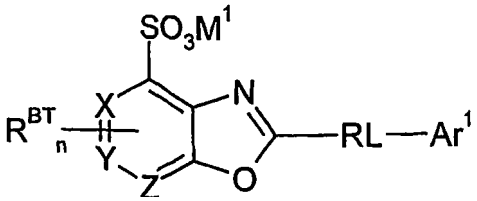
[0065] En una realización, Z es N; cada uno de X e Y es CH; y los compuestos tienen la siguiente fórmula:



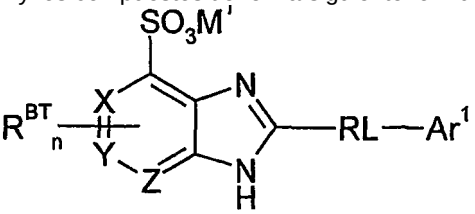
[0066] En una realización, W es S, y los compuestos tienen la siguiente fórmula:



[0067] En una realización, W es O y los compuestos tienen la siguiente fórmula:



[0068] En una realización, W es NH y los compuestos tienen la siguiente fórmula:



[0069] En una realización, cada uno de X, Y y Z es CH; y W es S.
En una realización, cada uno de X, Y y Z es CH; y W es O.
En una realización, cada uno de X, Y y Z es CH; y W es NH.

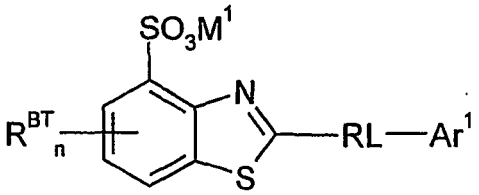
[0070] En una realización, X es N; cada uno de Y y Z es CH; y W es S.
En una realización, X es N; cada uno de Y y Z es CH; y W es O.
En una realización, X es N; cada uno de Y y Z es CH; y W es NH.

[0071] En una realización, Y es N; cada uno de X y Z es CH; y W es S.
En una realización, Y es N; cada uno de X y Z es CH; y W es O.
En una realización, Y es N; cada uno de X y Z es CH; y W es NH.

[0072] En una realización, Z es N; cada uno de X e Y es CH; y W es S.
En una realización, Z es N; cada uno de X e Y es CH; y W es O.
En una realización, Z es N; cada uno de X e Y es CH; y W es NH.

[0073] El grupo bicíclico, que comprende W, X, Y y Z, puede indicarse como el "grupo principal". Cuando cada uno de X, Y y Z es CH, y W es S, el compuesto puede denominarse como un compuesto de benzotiazol y puede considerarse que tiene, como grupo principal, un grupo benzotiazol. Entonces, los "sustituyentes principales" pueden denominarse como "sustituyentes de benzotiazol".

[0074] Un ligando preferido para su uso en este aspecto de la presente invención es un compuesto ligando de la fórmula (I):



en la que:

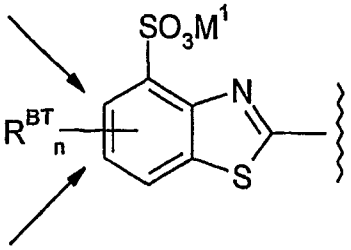
M^1 es un catión de metal álcali;
RL es un grupo enlazador rígido;
Ar^1 es un grupo arilo C_{5-20};
n es un número entero de 0 a 3; y
cada R^{BT} es independientemente un sustituyente de benzotiazol.

[0075] Tanto el grupo enlazador rígido, RL, como el grupo arilo, Ar^1, son sustancialmente planos. Además, el grupo enlazador plano, RL, y el grupo arilo, Ar^1, junto con el grupo principal (por ejemplo, grupo benzotiazol), forman un compuesto que es sustancialmente plano. Por "sustancialmente plano" se quiera hacer referencia a que el resto/compuesto tiene un alto grado de planicidad, por ejemplo, menos de 5, 4, 3, 2 o 1 º de giro entre los componentes, según se cuantificó usando supuestos y modelos químicos convencionales. Preferentemente, el giro no será superior al del compuesto de la Figura 16.

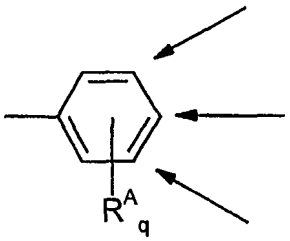
[0076] En una realización, el compuesto tiene una longitud de compuesto que es de aproximadamente 14,7 UA a aproximadamente 15,3 UA.

[0077] Los inventores de la presente invención han determinado que compuestos que tienen las características que se han descrito anteriormente pueden ser particularmente adecuados para los procedimientos "estadificación de Braak" de la invención. Dichos compuestos pueden ser conocidos en la técnica o pueden ser nuevos, como se describe con mayor detalle a continuación.

[0078] La "longitud de compuesto" es la distancia entre los dos átomos en el anillo aromático más distantes (denominados "átomos de referencia"). Por ejemplo, para compuestos de benzotiazol, en el "extremo" de benzotiazol de la molécula, el átomo de referencia será uno de los dos átomos:



[0079] En el "extremo" de arilo de la molécula, cuando Ar^1 es un grupo arilo que tiene un núcleo de fenilo (véase más adelante), el átomo de referencia será uno de los tres átomos:



[0080] Las distancias usadas en el presente documento puede computarse usando el servicio "Chemical Database Service", Daresbury, y la base de datos Cambridge Structure Database, usando el software "Chemical structure search and retrieval software". Estos datos y software son de dominio público.

[0081] En una realización, M es Li, Na, K o Cs.
En una realización, M es Na o K.

[0082] En una realización, n es 0. En una realización, n es 1.
En una realización, n es 2. En una realización, n es 3.

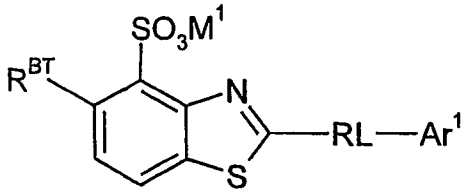
[0083] En una realización, cada R^{BT} se selecciona independientemente entre: alquilo C_{1-4}, hidroxi, alcoxi C_{1-4}, nitro, ciano, halo y amino.

[0084] En una realización, cada R^{BT} se selecciona independientemente entre: -Me, - Et, -nPr, -iPr, -OH, -OMe, -OEt, -O(nPr), -O(iPr), $-NO_2$, -CN, -F, - Cl, -Br, -I, $-NH_2$, $-NH_2$, -NHMe, -NHEt, -NH(iPr), -NH(nPr), $-NMe_2$, - NEt_2, $N(iPr)_2$ y $-N(nPr)_2$.

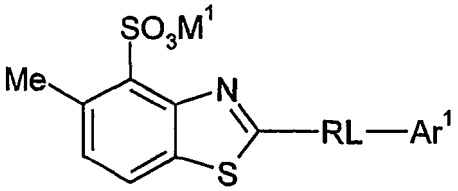
[0085] En una realización, cada R^{BT} se selecciona independientemente entre: alquilo C_{1-4}. En una realización, cada R^{BT} se selecciona entre: -Me, -Et, - nPr y -iPr. En una realización, cada R^{BT} es -Me.

[0086] En una realización, n es 1 y R^{BT} es -Me, -Et, -nPr o -iPr. En una realización, n es 1 y R^{BT} es -Me.

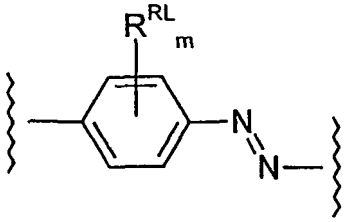
[0087] En una realización, el compuesto tiene la siguiente fórmula:



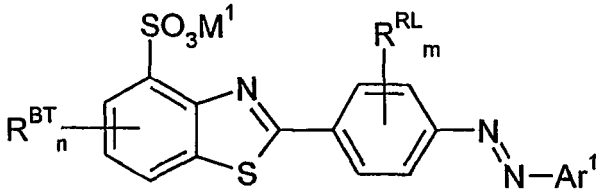
[0088] En una realización, el compuesto tiene la siguiente fórmula:



[0089] En una realización, RL es un grupo de la fórmula:



en la que m es un número entero de 0 a 4, y cada R^{RL} es independientemente un sustituyente arilo de enlazador rígido y los compuestos tienen la fórmula:



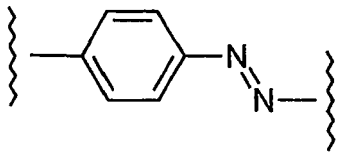
[0090] En una realización, m es 0. En una realización, m es 1.
En una realización, m es 2. En una realización, m es 3.
En una realización, m es 4.

[0091] En una realización, cada R^{RL} se selecciona independientemente entre: alquilo C_{1-4}, hidroxi, alcoxi C_{1-4}, nitro, ciano, halo y amino.

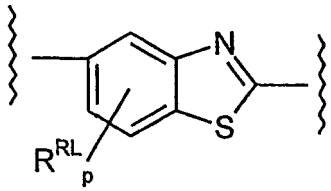
[0092] En una realización, cada R^{RL} se selecciona independientemente entre: -Me, - Et, -nPr, -iPr, -OH, -OMe, -OEt, -O(nPr), -O(iPr), $-NO_2$, -CN, -F, - Cl, -Br, -I, $-NH_2$, $-NH_2$, -NHMe, -NHEt, -NH(iPr), -NH(nPr), $-NMe_2$, - NEt_2, $N(iPr)_2$ y $-N(nPr)_2$.

[0093] En una realización, cada R^{RL} se selecciona independientemente entre: alquilo C_{1-4}.

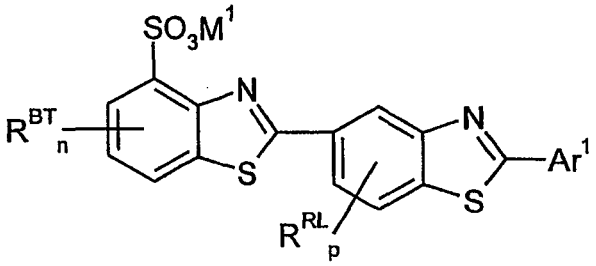
[0094] En una realización, RL es un grupo de la fórmula:



[0095] En una realización, RL es un grupo de la fórmula:



en la que p es un número entero de 0 a 3 y cada R^{RL} es independientemente un sustituyente arilo de enlazador rígido y los compuestos tienen la fórmula:



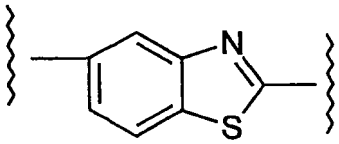
[0096] En una realización, p es 0. En una realización, p es 1.
En una realización, p es 2. En una realización, p es 3.

[0097] En una realización, cada R^{RL} se selecciona independientemente entre: alquilo C_{1-4}, hidroxi, alcoxi C_{1-4}, nitro, ciano, halo y amino.

[0098] En una realización, cada R^{RL} se selecciona independientemente entre: -Me, - Et, -nPr, -iPr, -OH, -OMe, -OEt, -O(nPr), -O(iPr), $-NO_2$, -CN, -F, - Cl, -Br, -I, $-NH_2$, $-NH_2$, -NHMe, -NHEt, -NH(iPr), -NH(nPr), $-NMe_2$, - NEt_2, $N(iPr)_2$ y $-N(nPr)_2$.

[0099] En una realización, cada R^{RL} se selecciona independientemente entre: alquilo C_{1-4}.

[0100] En una realización, RL es un grupo de la fórmula:



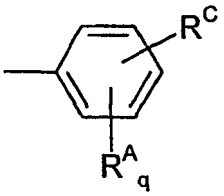
[0101] El grupo arilo, Ar^1, es un grupo arilo C_{5-20}. La expresión "arilo C_{5-20}", como se usa en el presente documento, pertenece a un resto monovalente obtenido mediante la retirada de un átomo de hidrógeno de un átomo de anillo aromático de un compuesto aromático C_{5-20}, teniendo dicho compuesto un anillo, o dos o más anillos (por ejemplo, condensado), y teniendo de 5 a 20 átomos en el anillo, y en el que al menos uno de de dichos anillos es un anillo aromático. Preferentemente, cada anillo tiene de 5 a 7 átomos en el anillo. "C_{5-20}" representa átomos en el anillo, tanto átomos de carbono átomos de carbono como heteroátomos.

[0102] Los ejemplos de grupos arilo C_{5-20} que no tienen heteroátomos en el anillo (es decir, grupos carboarilo C_{5-20}) incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de benceno (es decir, fenilo) (C_6), naftaleno (C_{10}), antraceno (C_{14}), fenantreno (C_{14}), naftaceno (C_{18}) y pireno (C_{16}).

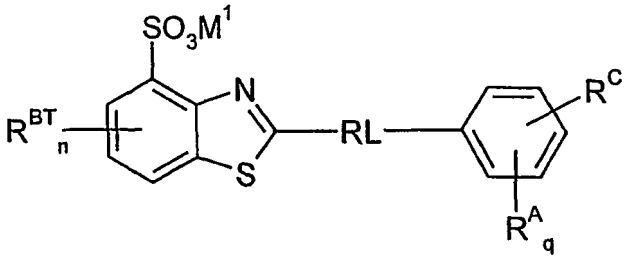
[0103] Los ejemplos de grupos heteroarilo C_{5-20}, pero sin limitación, grupo heteroarilo C_5 obtenidos a partir de furano (oxol), tiofeno (tiol), pirrol (azol), imidazol (1,3-diazol), pirazol (1,2-diazol), triazol, oxazol, isoxazol, tiazol, isotiazol, oxadiazol y oxatriazol; y grupos heteroarilo C_6 obtenidos a partir de isoxazina, piridina (azina), piridazina (1,2-diazina), pirimidina (1,3-diazina; por ejemplo, citosina, timina, uracilo), pirazina (1,4-diazina), triazina, tetrazol y oxadiazol (furazano).

[0104] Los ejemplos de grupos heterocíclicos C_{5-20} (incluyendo grupos heteroarilo C_{5-20}) que comprenden anillos condensados, incluyen, pero sin limitación, grupos heterocíclicos C_9 obtenidos a partir de benzofurano, isobenzofurano, indol, isoindol, purina (por ejemplo, adenina, guanina), benzoimidazol; grupos heterocíclicos C_{10} obtenidos a partir de quinolina, isoquinolina, benzodiazina, piridopiridina, quinoxalina; grupos heterocíclicos C_{13} obtenidos a partir de carbazol; grupos heterocíclicos C_{14} obtenidos a partir de acridina, xanteno, fenoxatiina, fenazina, fenoxazina, fenotiazina.

[0105] En una realización, Ar^1 es un grupo arilo que tiene un núcleo de fenilo y tiene la fórmula:



en la que q es un número entero de 0 a 5; y cada R^A es independientemente un sustituyente arilo; R^C, está presente y es un sustituyentes de conjugación reactivo, o R^C es, o contiene, un marcador detectable; y el compuesto tiene la fórmula:



[0106] En una realización, R^C, si está presente, es un sustituyente de conjugación reactivo, y es un grupo que es adecuado para conjugación con otra molécula o especie química.

[0107] En una realización, R^C, si está presente, es un sustituyente de conjugación reactivo, y es, o contiene, un grupo funcional reactivo adecuado para conjugación con otra molécula mediante reacción química con la misma, para formar un engarce covalente entre ellas. Los ejemplos de grupos funcionales reactivos adecuados incluyen ésteres activos (por ejemplo, ésteres de succinimidilo).

[0108] En una realización, R^C, si está presente, es un sustituyente de conjugación reactivo, y es, o contiene, un

resto adecuado para conjugación con otra molécula mediante una interacción fuerte no covalente. Los ejemplos de dichos grupos incluyen biotina (para unión con moléculas que portan avidina o estreptavidina).

[0109] En una realización, R^C, si está presente, es un sustituyente de conjugación reactivo, y es, o contiene, un resto adecuado para conjugación a otra molécula mediante formación de complejo o quelato, por ejemplo, un grupo quelante. Los ejemplos de dichos grupos incluyen grupos que se complejan con o quelan, por ejemplo, iones metálicos, por ejemplo, iones de tecnecio. Los ejemplos de dichos grupos incluyen ácido dietilenotriaminapentaacético.

[0110] En una realización, R^C, si está presente, es o contiene un marcador detectable. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen, por ejemplo, colorantes, marcadores fluorescentes, grupos antígenos, isótopos estables y no estables y átomos de carbono emisores de positrones. En una realización, R^c, si está presente, es, o contiene, un marcador detectable que comprende un isótopo estable. En una realización, R^c, si está presente, es, o contiene, un marcador detectable que comprende un isótopo inestable. En una realización, R^c, si está presente, es, o contiene, ^{18}F. En una realización, R^c, si está presente, es, o contiene, un marcador detectable que comprende un átomo de carbono emisor de positrones.

[0111] Además, se describen a continuación sustituyentes R^c.

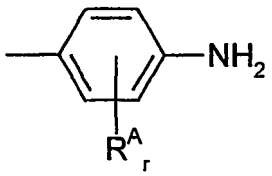
[0112] En una realización, R^c está presente y es como se ha definido anteriormente.

[0113] En una realización, q es 0. En una realización, q es 1.
En una realización, q es 2. En una realización, q es 3.
En una realización, q es 4. En una realización, q es 5.

[0114] En una realización, cada R^a se selecciona independientemente entre: -OH, $-NH_2$, $-NHR^1$, $-NR^1R^2$, $-SO_3M^2$, alquilo C_{1-4}, en los que R^1 y R^2 son cada uno alquilo C_{1-4} y M^2 es un catión de metal álcali, como se ha definido anteriormente.

[0115] En una realización, al menos un R^a es -OH o $-NH_2$.

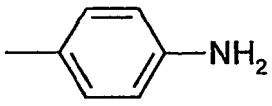
[0116] En una realización, Ar^1 es un grupo arilo que tiene un núcleo de fenilo sustituido con amino y tiene la fórmula:



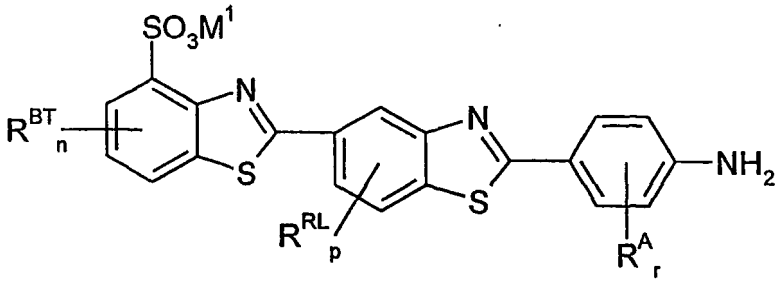
en la que r es un número entero de 0 a 4 y cada R^a es independientemente un sustituyente arilo, como se ha definido anteriormente.

[0117] En una realización, r es 0. En una realización, r es 1.
En una realización, r es 2. En una realización, r es 3.
En una realización, r es 4.

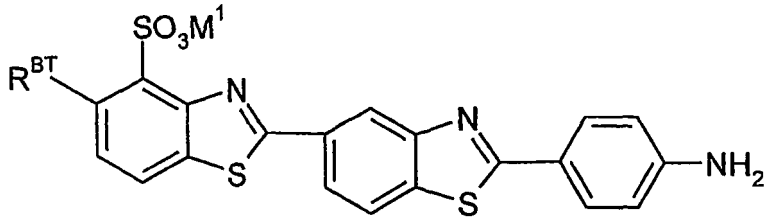
[0118] En una realización, r es 1 y Ar^1 es un grupo de la fórmula:



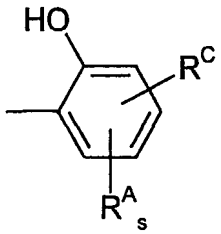
[0119] En una realización, el compuesto tiene la fórmula:



[0120] En una realización, el compuesto tiene la fórmula:



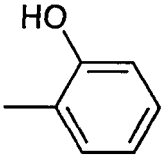
[0121] En una realización, Ar^1 es un grupo arilo que tiene un núcleo de fenilo sustituido con hidroxi, y tiene la fórmula:



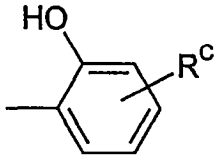
en la que s es un número entero de 0 a 4, y cada R^a es independientemente un sustituyente arilo, como se ha definido anteriormente y R^c, está presente y es un sustituyente de conjugación reactivo o R^c es, o contiene, un marcador detectable, como se ha definido anteriormente.

[0122] En una realización, s es 0. En una realización, s es 1.
En una realización, s es 2. En una realización, s es 3.
En una realización, s es 4.

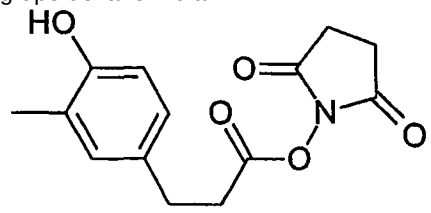
[0123] En una realización, Ar^1 es un grupo de la fórmula:



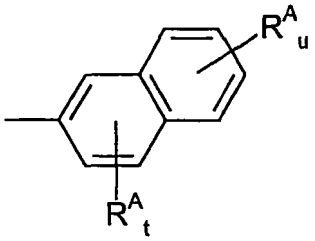
[0124] En una realización, Ar^1 es un grupo de la fórmula:



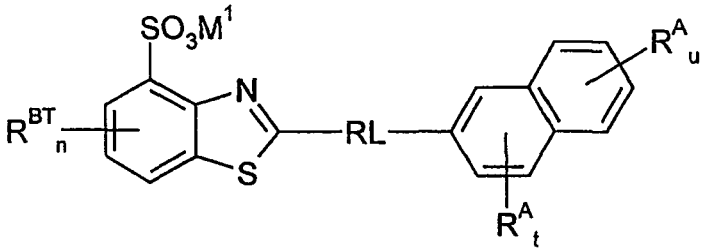
[0125] En una realización, Ar^1 es un grupo de la fórmula:



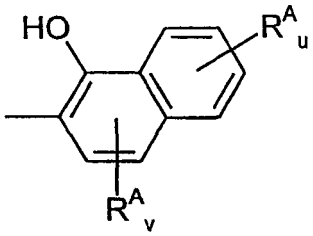
[0126] En una realización, Ar^1 es un grupo arilo que tiene un núcleo de naftilo y tiene la fórmula:



en la que t es un número entero de 0 a 3, u es un número entero de 0 a 4, y cada R^A es independientemente un sustituyente arilo, como se ha definido anteriormente, y el compuesto tiene la fórmula:

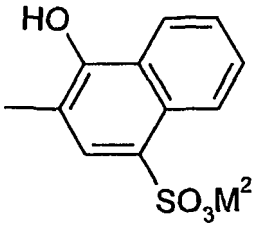


[0127] En una realización, Ar^1 es un grupo arilo que tiene un núcleo naftilo sustituido con hidroxi y tiene la fórmula:

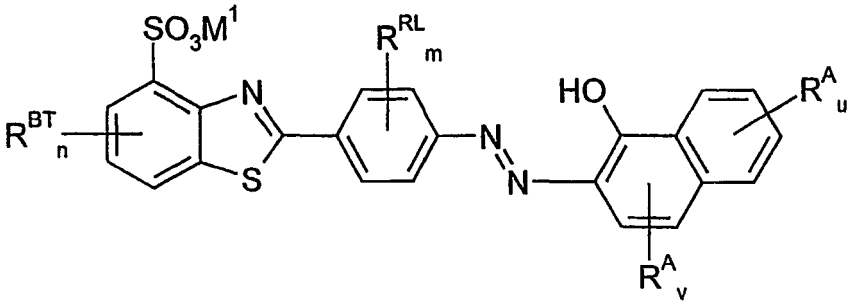


en la que v es un número entero de 0 a 2, u es un número entero de 0 a 4, y cada R^A es independientemente un sustituyente arilo.

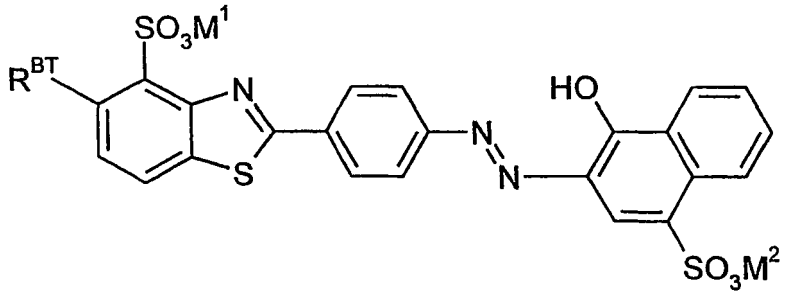
[0128] En una realización, Ar^1 tiene la formula:



[0129] En una realización, el compuesto tiene la fórmula:



[0130] En una realización, el compuesto tiene la fórmula:



[0131] En una realización, el ligando es un compuesto como se describe a continuación bajo el encabezado "Ligandos de tipo benzotiazol sulfonado preferidos".

[0132] Pueden prepararse compuestos del tipo descrito anteriormente, por ejemplo de fórmula (I), para uso en los procedimientos de diagnóstico de la presente invención, por medios convencionales - véase, por ejemplo, Referencia 31.

[0133] Todos los compuestos que se describen en el presente documento (o derivados de los mismos) que tienen la fórmula, tamaño, planicidad y actividad adecuados pueden denominarse generalmente, pero no limitantemente, en el presente documento como "compuestos de tipo benzotiazol sulfonado" o 2ligandos SB"). Generalmente, dichos compuestos serán ligandos de moléculas de tau agregadas, por ejemplo, las que se encuentran en ligamentos helicoidales pareados o en ovillos neurofibrilares.

[0134] Los ligandos que se describen en el presente documento pueden detectarse adecuadamente incorporando un carbono de emisión de positrones, en uno de los grupos metilo del compuesto como se describe en el presente documento, y detectar el compuesto mediante el uso de tomografía de emisión de positrones (PET) como se conoce en la técnica. Como alternativa, o además, un quelato que contiene tecnecio puede incorporarse en el compuesto (por ejemplo, como en el grupo R^c de los compuestos descritos en el presente documento), de manera que puede conseguirse la detección selectiva de ovillos neurofibrilares. Un grupo quelante preferido es R^C = ácido dietilenotriaminapentaacético.

[0135] Los ligandos pueden conjugarse, quelarse o asociarse de otra forma, con otros grupos químicos, colorantes, marcadores fluorescentes, grupos antigénicos, restos terapéuticos o cualquier otra entidad que pueda ayudar en un pronóstico, diagnóstico o aplicación terapéutica. Por ejemplo, cuando el ligando se une al colorante o grupo fluorescente, el conjugado puede usarse como un marcador de tau agregado o moléculas de tipo tau. Por tanto, puede usarse para marcar ovillos intracelulares o extracelulares característicos de EA.

Fenotiazinas

[0136] Los inventores de la presente invención han identificado previamente otra clase de compuestos, cuyos miembros alteran la estructura de FHP e invierten la estabilidad proteolítica del núcleo de FHP (WO 96/30766).

[0137] Los compuestos de diaminofenotiazina que se describen en el documento WO 96/30766 se muestran mediante las estructuras de la Figura 8a. La Fórmula (IV) en la Figura 8a representa una forma de resonancia diferente de (II) incluida con fines de claridad. Todos los compuestos (II)-(IV) son formas oxidadas, mientras que (I) es una forma reducida. Dichos compuestos (que pueden denominarse en lo sucesivo en el presente documento "diaminofenotiazinas" o "fenotiazinas") incluyen, por ejemplo, cloruro de tolonio y azul de metileno. Se muestran ejemplos en la Figura 8b. Todos estos se muestran en la forma oxidada, estando todos, excepto tionina, en forma de sales estabilizadas (la tionina se muestra como una forma oxidada neutra).

[0138] Los compuestos que pueden usarse en los procedimientos que se describen en el presente documento pueden ser cualesquiera que tengan una fórmula que se muestra en la Figura 8a, en la que:

cada uno de R_1, R_3, R_4, R_6, R_7 y R_9 es independientemente hidrógeno, halógeno, hidroxi, carboxi, alquilo sustituido o sin sustituir, haloalquilo o alcoxi;
R_5 es hidrógeno, hidroxi, carboxi, alquilo sustituido o sin sustituir, haloalquilo o alcoxi; y
R_{10} y R_{11} son independientemente hidrógeno, hidroxi, carboxi, alquilo sustituido o sin sustituir, haloalquilo o alcoxi;
y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

[0139] En una realización:

cada uno de R_1, R_3, R_4, R_6, R_7 y R_9 es independientemente hidrógeno, halógeno, hidroxi, carboxi, alquilo C_{1-6} sustituido o sin sustituir, haloalquilo C_{1-4} o alcoxi C_{1-6};
R_5 es independientemente hidrógeno, hidroxi, carboxi, alquilo C_{1-6} sustituido o sin sustituir, haloalquenilo C_{1-4} o alcoxi C_{1-6};
R_{10} y R_{11} se seleccionan independientemente entre hidrógeno, hidroxi, carboxi, alquilo C_{1-6} sustituido o sin sustituir, haloalquilo C_{1-4} o alcoxi C_{1-6}.

[0140] El término "alquilo", como se usa a este respecto, se refiere a grupos de cadena lineal o ramificada, que tienen preferentemente de uno a ocho, más preferentemente de uno a seis, átomos de carbono. Por ejemplo, "alquilo" puede referirse a metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, isopentilo, terc-pentilo, hexilo, isohexilo y similares. Los sustituyentes adecuados para los grupos alquilo sustituidos que se usan en la invención incluyen los grupos mercapto, tioéter, nitro, amino, ariloxi, halógeno, hidroxilo y carbonilo, así como arilo, cicloalquilo y grupos heterocíclicos distintos de arilo.

[0141] Los términos "alcoxi" se refieren a grupos como se han definido anteriormente en el presente documento como alquilo, como puede ser el caso, que también portan un átomo de oxígeno interpuesto entre ellos y el residuo de sustrato al que están unidos.

[0142] El término "haloalquilo" representa una cadena de alquilo lineal o ramificada que tiene de uno o a cuatro átomos de carbono con 1, 2 ó 3 átomos de halógeno unidos a ella. Los grupos haloalquilo típicos incluyen clorometilo, 2-brometilo, 1-cloroisopropilo, 3-fluoropropilo, 2,3-dibrombutilo, 3-cloroisobutilo, yodo-t-butilo, trifluorometilo y similares.

[0143] El "halógeno" representa flúor, cloro, bromo o yodo.

[0144] Algunas de estas fenotiazinas poseen uno o más átomos de carbono sustituidos asimétricamente y por tanto existen en formas racémicas y ópticamente activas. La invención pretende incluir las formas racémicas de los compuestos así como cualquiera de las formas ópticamente activas de los mismos.

[0145] Pueden formarse sales de adición de ácidos entre compuestos básicos de la Figura 8a o 8b y ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácidos hidrohálicos, tales como ácido clorhídrico y ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, etc., o ácido orgánico, por ejemplo ácido acético, ácido cítrico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, etc.

[0146] En una realización preferida particular, la presente invención emplea una fenotiazina, en la que:

R_1, R_3, R_4, R_6, R_7 y R_9 son independientemente -H, $-CH_3$, $-C_2H_5$, o $-C_3H_7$;
R_{10} y R_{11} son independientemente -H, $-CH_3$, $-C2H_5$ o $-C_3H_7$;
R_5 es -H, $-CH_3$, $-C_2H_5$ o $-C_3H_7$;
o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

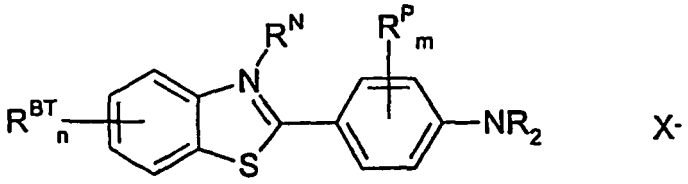
[0147] Ahora, los inventores de la presente invención enseñan en el presente documento que dichos compuestos de fenotiazina de esta clase pueden unirse a los FHP en un sitio específico que parece, en base a sus características de unión, que es distinto al que pueden unirse los compuestos de tipo benzotiazol sulfonado, descritos anteriormente. Se piensa que la unión de los compuestos fenotiazina en este sitio efectúa la inhibición de la agregación de tau.

[0148] Pueden usarse compuestos de fenotiazina en los procedimientos y realizaciones descritas anteriormente, incorporando marcadores según sea adecuado. Cuando se marcan adecuadamente con un grupo funcional de emisión de positrones (detectable por PET - véase Figuras 11, 11b, 12, 13), dichos compuestos servirían como ligandos para todos los agregados de tau, y serían capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (Ref, 36) y entrar en las células.

[0149] En una realización más, a la luz de la divulgación del presente documento, se apreciará que el efecto de, y particularmente el progreso de, la terapia basada en inhibidores de unión tau-tau puede supervisarse mediante el uso de ligandos SB.

Ligandos bloqueadores

[0150] Preferentemente, estos son benzotiazoles de la fórmula:



en la que:

n es un número entero de 0 a 4;
cada R^{BT} es independientemente un sustituyente es un sustituyentes benzotiazol de ligando de bloqueo;
m es un número entero de 0 a 4;
cada R^{P} es independientemente un sustituyente fenileno;
cada R es independientemente -H o un sustituyente amino; y.
también:

R^n y X- están ambos ausentes y el átomo de nitrógeno asociado (terciario) es neutro; o:
R^n es un sustituyente benzotiazolino y el átomo de nitrógeno asociado (cuaternario) porta una carga positiva, y X^- es un contraión.

[0151] Los benzotiazoles preferidos incluyen tioflavina T. Como se muestra en los Ejemplos posteriores, dichos compuestos de desplazan de NFT mediante ligandos SB. Sin embargo, dichos compuestos sí que se enlazan preferentemente a amiloide.

[0152] En una realización, n es 0. En una realización, n es 1.
En una realización, n es 2. En una realización, n es 3.
En una realización, n es 4. En una realización, n es 0, 1 ó 2.

[0153] Los ejemplos de sustituyentes de benzotiazol de ligando de bloqueo, R^{BT}, incluyen, pero sin limitación, grupos alquilo C_{1-4}, $-SO_3H$ y $-SO_3M^3$, en el que M^3 es un catión. En una realización, M^3 es un catión de metal álcali. En una realización, M^3 es Li, Na, K o Cs. En una realización, M^3 es Na o K. Los ejemplos de grupos alquilo C_{1-4} incluyen, pero sin limitación, -Me, -Et, -nPr y -iPr.

[0154] En una realización, cada R^{BT} es independientemente un grupo alquilo C_{1-4}.
En una realización, cada R^{BT} se selecciona entre: -Me, -Et, -nPr y - iPr. En una realización, cada R^{BT} es -Me. En una realización, n es 1 y R^{BT} es -Me, -Et, -nPr o -iPr. En una realización, n es 1 y R^{BT} es -Me.

[0155] En una realización, uno de los grupos R^{BT} es $-SO_3H$ o $-SO_3M^3$. En una realización, uno de los grupos R^{BT} es $-SO_3H$ o $-SO_3M^3$ y otros de los grupos R^{BT} es un grupo alquilo C_{1-4}. En una realización, n es 2 y un R^{BT} es un grupo alquilo C_{1-4} y un R^{BT} es $-SO_3H$ o $-SO_3M^3$. En una realización, n es 2 y un R^{BT} es -Me y un R^{BT} es $-SO_3H$ o $-SO_3M^3$.

[0156] En una realización, R^N y X^- están ambos ausentes y el átomo de nitrógeno asociado (terciario) átomo es neutro.

[0157] En una realización, R^N es un sustituyente benzotiazolino, el átomo de nitrógeno asociado (cuaternario) porta una carga positiva y X^- es un contraión. Los ejemplos de sustituyentes de benzotiazolino, R^N, incluyen, pero sin limitación, grupos alquilo C_{1-4}. En una realización, R^N es -Me, -Et, -nPr o -iPr. En una realización, R^N es -Me. Los ejemplos de contraiones incluyen, pero sin limitación, Cl^-, Br^- y I^-. En una realización, R^N es -Me y X^- es Cl^-.

[0158] En una realización, m es 0, En una realización, m es 1.
En una realización, m es 2. En una realización, m es 3.
En una realización, m es 4.

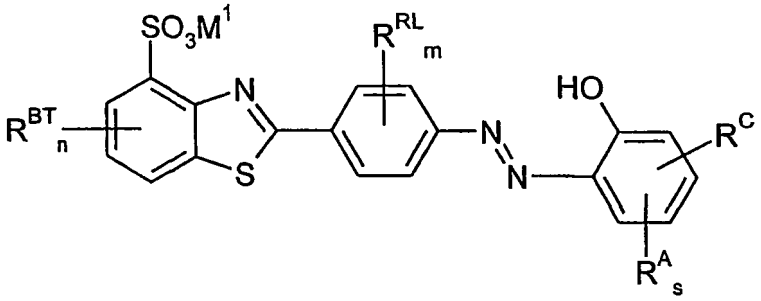
[0159] Los ejemplos de sustituyentes fenileno, R^P, incluyen, pero sin limitación, grupos alquilo C_{1-4}.

[0160] En una realización, cada R es -H, y el grupo amino es $-NH_2$. En una realización, un R es -H y un R es un sustituyentes amino. En una realización, cada R es un sustituyente amino. Los ejemplos de sustituyentes amino incluyen, pero sin limitación, grupos alquilo C_{1-4}. En una realización, el grupo amino es $-NH_2$, -NHMe, -NHEt, $-NH(iPr)$, $-NH(nPr)$, $-NMe_2$, $-NEt_2$, $N(iPr)_2$ o $-N(nPr)_2$.

[0161] Se muestran realizaciones preferidas de ligandos de bloqueo en la figura Figure 5 como compuestos 1b y 2.

Ligandos de tipo benzotiazol preferidos

[0162] En un aspecto de la presente invención, los ligando usados para marcar la tau agregada, preferentemente, tau agregada extracelularmente, presente en NFT, son compuestos que tienen la formula (II):



en la que:

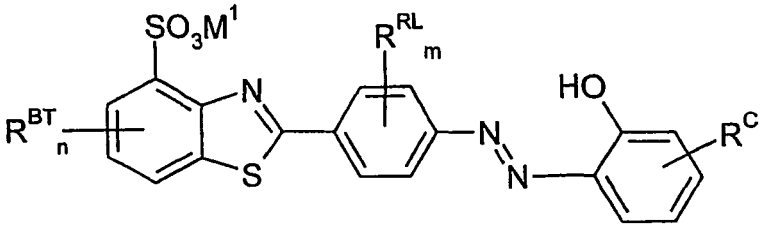
M^1 es un catión de álcali metálico;
n es un número entero de 0 a 3;
cada R^{BT} es independientemente un sustituyente benzotiazol;
m es un número entero de 0 a 4;
cada R^{RL} es independientemente un sustituyente arilo de enlazador rígido;
s es un número entero de 0 a 4;
cada R^A es independientemente un sustituyente arilo; y
R^c, si está presente, es un sustituyente de conjugación reactivo, o
R^c es, o contiene, un marcador detectable.

[0163] En diversas realizaciones, M^1, n, cada R^{BT}, cada R^{RL}, s, cada R^A, y R^c son como se describen en el presente documento (por ejemplo, bajo el encabezado anterior "Ligandos de tipo benzotiazol sulfonados").

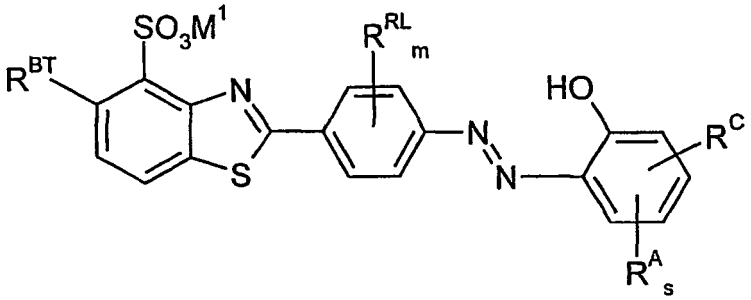
[0164] El grupo enlazador rígido, RL, y el grupo arilo, Ar^1, junto con el grupo benzotiazol, forman un compuesto que es sustancialmente plano, es decir, tiene un alto grado de planicidad.

[0165] Como se muestra en el presente documento, dichos compuestos pueden ser particularmente eficaces cuando se desea incorporar un grupo R^c voluminoso para facilitar la detección.

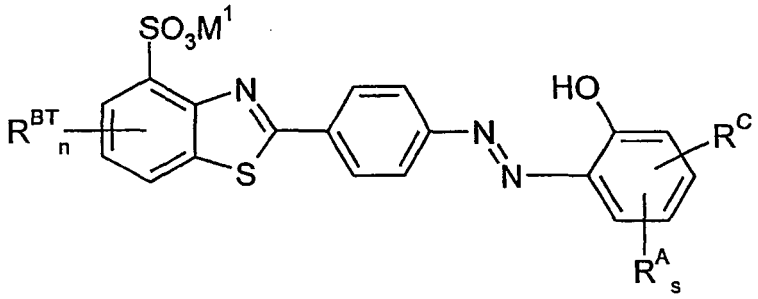
[0166] En una realización, el compuesto tiene la fórmula:



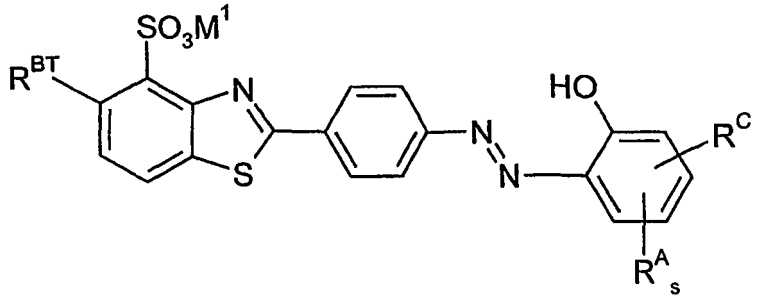
[0167] En una realización, el compuesto tiene la fórmula:



[0168] En una realización, el compuesto tiene la fórmula:



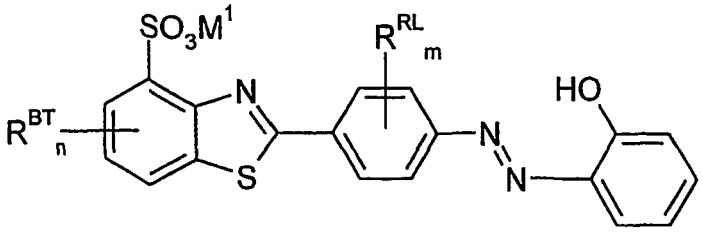
[0169] En una realización, el compuesto tiene la fórmula:



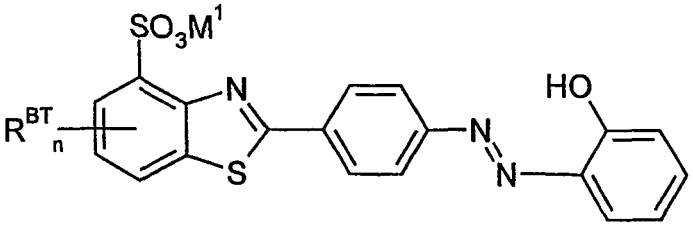
[0170] En diversas realizaciones, s puede ser como se ha descrito anteriormente.

[0171] En una realización, cada R^A se selecciona independientemente entre los sustituyentes dados anteriormente en relación a la fórmula (I).

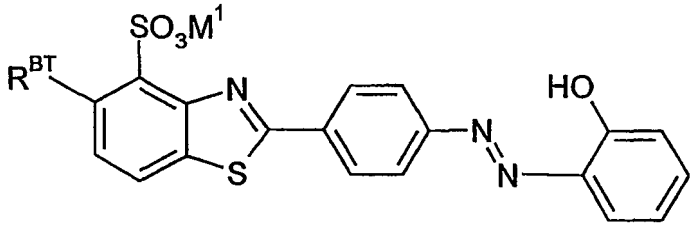
[0172] En una realización, el compuesto tiene la fórmula:



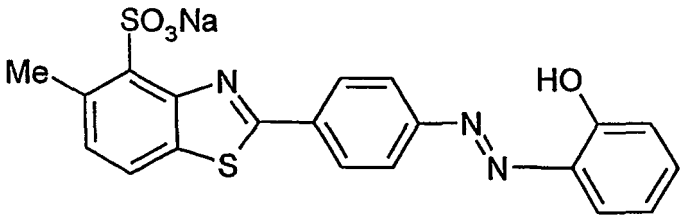
[0173] En una realización, el compuesto tiene la fórmula:



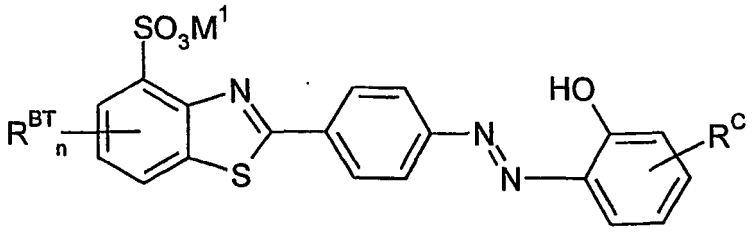
[0174] En una realización, el compuesto tiene la fórmula:



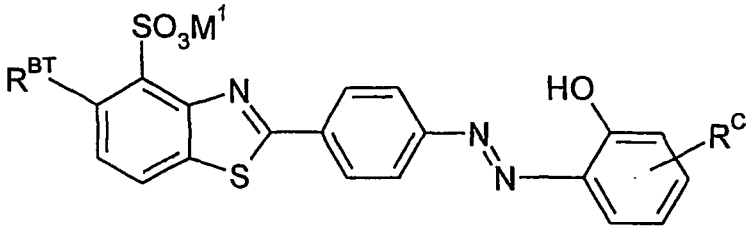
[0175] En una realización, el compuesto tiene la fórmula:



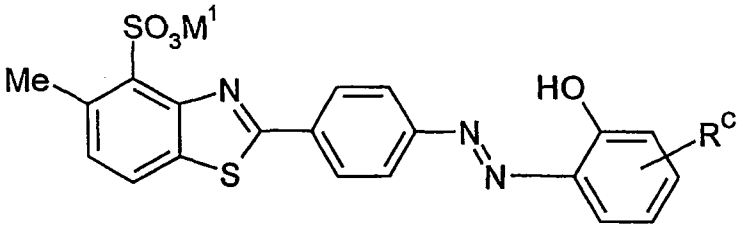
[0176] En una realización, el compuesto tiene la fórmula:



[0177] En una realización, el compuesto tiene la fórmula:

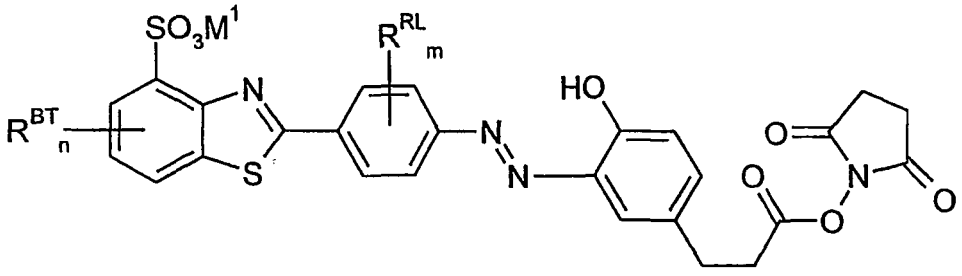


[0178] En una realización, el compuesto tiene la fórmula:

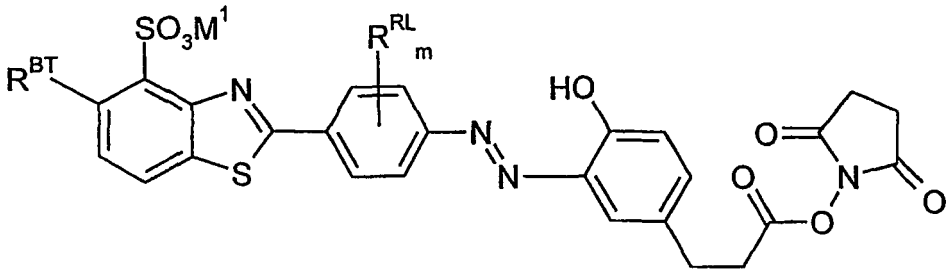


[0179] Diversos sustituyentes R^C se describen en cualquier otra parte del presente documento.

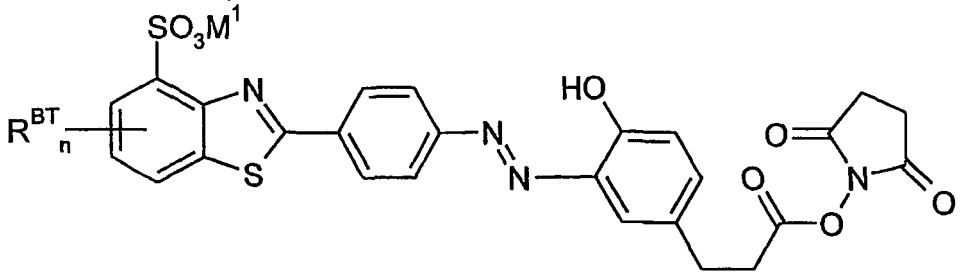
[0180] En una realización, el compuesto tiene la fórmula:



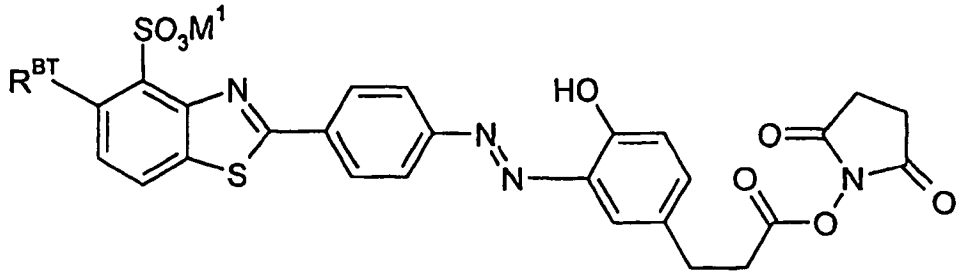
[0181] En una realización, el compuesto tiene la fórmula:



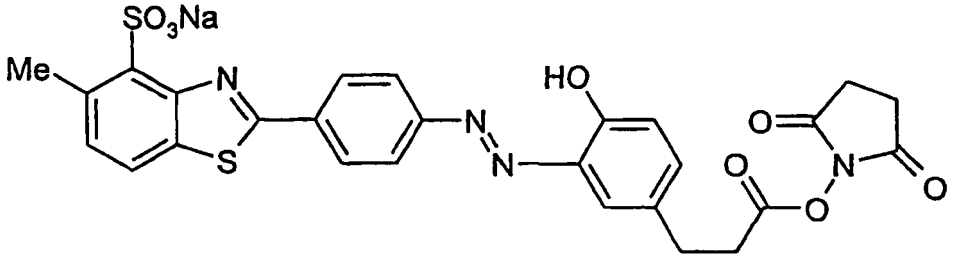
[0182] En una realización, el compuesto tiene la fórmula:



[0183] En una realización, el compuesto tiene la fórmula:



[0184] En una realización, el compuesto tiene la fórmula:



[0185] Algunos de estos compuestos preferidos, y derivados de los mismos, se muestran en las figuras 4a-c.

[0186] Dichos compuestos se denominarán más adelante como ligandos SB preferidos.

Miméticos de ligandos SB preferidos

[0187] En general, en el diseño de un mimético existen varias etapas comúnmente adoptadas a partir de un compuesto que tiene una propiedad diana determinada (en este caso un ligando SB de agregación tau-tau preferido) de las cuales, lo más importante, es que se determinen las partes particulares del compuesto que sean críticas y/o importantes en la determinación de la propiedad diana. La provisión por los autores de la presente invención de la estructura crítica mínima necesaria para una unión de alta afinidad a moléculas de tau agregadas ha obviado esta etapa.

[0188] La estructura crítica mínima del compuesto 4a puede modelarse de acuerdo con sus propiedades físicas, por ejemplo, estereoquímica, unión, tamaño y/o carga, usando datos de una serie de fuentes, por ejemplo, datos de

técnicas espectroscópicas, de difracción de rayos X y de RMN. En este proceso de modelado puede usarse análisis computacional, de manera similar, mapeo (que modela la carga y/o el volumen del ligando, en lugar de uniones entre átomos) y otras técnicas.

[0189] En una variante de esta estrategia, se modela la estructura tridimensional del ligando SB preferido y su compañero de unión. Esto puede ser especialmente útil cuando el ligando y/o el compañero de unión cambian de conformación al unirse, lo que permite que el modelo tenga en cuenta esto en el diseño del mimético. Después, se selecciona una molécula molde sobre la cual puedan injertarse grupos químicos que imiten la estructura crítica mínima. La molécula molde y los grupos químicos injertados en ella pueden seleccionarse convenientemente de manera que el mimético sea fácil de sintetizar, sea posiblemente farmacológicamente aceptable y no se degrade *in vivo*, conservando a la vez la actividad la actividad biológica necesaria. El mimético o los miméticos encontrados en esta estrategia pueden después explorarse para observar si tienen la propiedad diana, o hasta qué grado la muestran. Después puede realizarse una optimización o modificación adicionales para llegar a uno o más miméticos finales para ensayo u optimización adicionales, por ejemplo, ensayo *in vivo* o clínico. La optimización puede incluir seleccionar un compuesto mimético, como se ha descrito anteriormente, y ponerle en contacto con una preparación de moléculas tau agregadas (por ejemplo, tau preagregada en solución, o unida a una fase sólida, o aislada de los FHP - véase el documento WO96/30766 y los ensayos descritos a continuación) y determinar el grado al cual la sustancia (o sustancias) de ensayo se une a las moléculas tau agregadas y/o desplazan el compuesto 4a de las moléculas.

Métodos para marcar la proteína tau agregada

[0190] La presente memoria descriptiva enseña un método para marcar a la proteína tau, o a moléculas similares a la proteína tau, agregada que comprende poner en contacto las moléculas de tau agregadas con un compuesto ligando SB preferido, o derivado del mismo, como se proporciona en el presente documento (por ejemplo, de fórmula (II)) y detectar la presencia de dicho compuesto o derivado. Los métodos de uso pueden realizarse, por ejemplo, por analogía con el uso de los ligandos proporcionados en las Referencias 26-34.

[0191] Cuando el presente documento se usa la expresión “proteína tau” se refiere generalmente a cualquier proteína de la familia de las proteínas tau. Las proteínas tau se caracterizan por ser una de entre un gran número de familias de proteínas que se copurifican con microtúbulos durante ciclos repetidos de ensamblaje y desensamblaje (Shelanski *et al*. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70., 765-768) y se conocen como proteínas asociadas a microtúbulos (PAM). Los miembros de la familia tau comparten las características comunes de tener un segmento del extremo N característico, secuencias de aproximadamente 50 aminoácidos insertadas en el segmento del extremo N, que están reguladas evolutivamente en el cerebro, una región de repetición en tándem característica constituida por 3 ó 4 repeticiones en tándem de 31-32 aminoácidos y una cola del extremo C.

[0192] Las moléculas “similares a tau” incluyen, por ejemplo, PAM2, que es la proteína asociada a microtúbulos predominante en el compartimento somatodendrítico (Matus, A., in “Microtubules” [Hyams and Lloyd, eds.] págs 155-166, John Wiley y Sons, NY). Las isoformas de la PAM2 son casi idénticas a la proteína tau en la región de repetición en tándem, pero se diferencian sustancialmente tanto en la secuencia como en la extensión del domino del extremo N (Kindler y Garner (1994) Mol. Brain Res. 26, 218-224). Sin embargo, la agregación en la región de repetición en tándem no es selectiva para el dominio de repetición de tau. Por tanto se apreciará que cualquier análisis en el presente documento en relación con la proteína tau o la agregación de tau-tau deberá considerarse que también se refiere a la agregación de tau-PAM2, agregación PAM2-PAM2 , etc.

[0193] El ligando SB preferido puede conjugarse, quelarse o asociarse de otra manera, con un grupo o entidad adicional que tenga un propósito o efecto de diagnóstico, pronóstico o terapéutico, por ejemplo, con un grupo fluorescente que permita así visualizar los ovillos neurofibrilares a los cuales se une el ligando.

Composiciones de diagnóstico y usos

[0194] Generalmente, un ligando SB preferido para su uso en la presente invención (por ejemplo de fórmula (II)) puede proporcionarse en una forma aislada y/o purificada, es decir, sustancialmente pura. Esta puede incluirse en una composición en la que represente al menos aproximadamente el 90% de ingrediente activo, más preferentemente al menos aproximadamente el 95%, más preferentemente al menos aproximadamente el 98%. Tal composición puede, sin embargo, incluir materiales transportadores inertes u otros excipientes farmacéutica y fisiológicamente aceptables. La composición puede incluir, además de un ligando SB preferido como se describe en el presente documento, una u otras moléculas más de uso para el diagnóstico, pronóstico o uso terapéutico.

[0195] Una sustancia ligando SB preferida, como se describe en el presente documento, o una composición que

comprende tal ligando, puede proporcionarse para su uso en un método para el diagnóstico, pronóstico o tratamiento de un organismo humano o animal mediante terapia, especialmente en relación con una afección tal como la EA como se describe más adelante.

[0196] La presente memora descriptiva proporciona un método de diagnóstico o pronóstico, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad eficaz, desde el punto de vista del diagnóstico o pronóstico, de uno o más ligandos SB preferidos como se describe en el presente documento. Esto incluye tales compuestos para su uso en un método para el diagnóstico o pronóstico. Este aspecto incluye usos tanto *in vivo* como *in vitro.* Los métodos *in vitro* pueden realizarse (i) obteniendo una muestra de tejido apropiada de un sujeto; (ii) poniendo en contacto la muestra con el ligando SB preferido; (iii) detectando la cantidad y/o la localización del ligando SB preferido unido a la muestra (iv) correlacionando el resultado de (v) con el estadio o la gravedad de la enfermedad en el sujeto.

[0197] Por tanto la presente memoria descriptiva proporciona el uso de un ligando SB preferido o derivado como se proporciona en el presente documento, en la preparación de una composición para el diagnóstico, pronóstico o terapia de una enfermedad como se ha descrito anteriormente.

[0198] La enfermedad o afección puede ser, por ejemplo, EA, o una afección similar a EA, o cualquier otra afección en la que estén implicadas moléculas de proteínas agregadas.

[0199] Notablemente, no es sólo en la Enfermedad de Alzheimer en la que la proteína tau (y la función o el procesamiento anómalo de la misma) puede desempeñar una función. La patogénesis de trastornos neurodegenerativos tales como enfermedad de Pick y Parálisis Supranuclear Progresiva (PSP) parece que guarda relación con una acumulación de agregados tau truncados patológicos en el giro dentado y en células piramidales estrelladas de la neocorteza, respectivamente. Otras demencias incluyen demencia frontotemporal (DFT); parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17); complejo de desinhibición-demencia-parkinsonismo-amiotrofia (CDDPA); degeneración pálido-ponto-nigral (DPPN); síndrome de Guam-ALS; degeneración pálido-nigro-luisiana (DPNL); degeneración córtico-basal (DCB) y otras (véase Wischik *et al.* 2000, lugar citado, para un análisis detallado – especialmente Tabla 5.1). Todas estas enfermedades, que se caracterizan principal o parcialmente por la agregación de tau anómala, se denominan en el presente documento “tauopatías”.

[0200] Las composiciones para el diagnóstico pueden comprender, además de uno de los derivados de los ligandos SB citados anteriormente, un excipiente, un vehículo, un tampón, un estabilizador u otros materiales aceptables desde el punto de vista del diagnóstico, bien conocidos por los expertos en la materia. Dichos materiales deben ser no-tóxicos y no deben interferir con la actividad de unión del sustrato a la proteína tau agregada, o con la eficacia de cualquier grupo bioactivo unido a, o asociado de otra manera con, la sustancia. La naturaleza exacta del vehículo, o de otro material, puede depender de la vía de administración, por ejemplo, vía oral, intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular e intraperitoneal.

[0201] Las composiciones para el diagnóstico para la administración oral pueden estar en forma de comprimido, cápsula, polvo o líquido. Un comprimido puede incluir un vehículo sólido, tal como gelatina, o un adyuvante. Las composiciones líquidas para el diagnóstico generalmente incluyen un vehículo líquido tal como agua, vaselina, aceites procedentes de animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. También puede incluirse una solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles, tal como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

[0202] Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o inyección en sitio afectado, el ligando estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que sea apirógena y tenga un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la materia podrán preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como Inyección de Cloruro de Sodio, Inyección de Ringer, Inyección de Ringer Lactada. Según se necesite, pueden incluirse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos.

[0203] Como se ha descrito anteriormente, una composición puede administrarse en solitario o en combinación con otros tratamientos, de manera simultánea o secuencial, dependiendo de la afección que vaya a tratarse.

Identificación de ligandos

[0204] Un método adicional para identificar ligandos para la proteína tau agregada requiere un ensayo de exploración que puede usarse en un formato que permita una exploración a alto rendimiento de bibliotecas químicas para identificar compuestos con la actividad necesaria. Hasta ahora, no se disponía fácilmente de ninguno de estos métodos. Los métodos preferidos no requerirán compuestos previamente marcados, ya que los procesos de marcado pueden limitar gravemente la capacidad de búsqueda química.

[0205] La presente memoria descriptiva proporciona un método que puede usarse como un ensayo de exploración a alto rendimiento, que no está limitado por la necesidad de tener sustancias de ensayo previamente marcadas. En realizaciones preferidas el método emplea las siguientes etapas:

1. la generación de alta capacidad de proteínas tau en una forma que, durante la preparación, hayan experimentado agregación parcial;
2. el uso de proteínas tau preparadas de esta manera para someter a ensayo supuestos ligandos, en el ensayo de unión tau-tau, proporcionado en el documento WO96/30766, para identificar sustancias que tengan actividad mínima o completamente ausente como inhibidores de la agregación de tau o unión tau-tau potenciada a altas concentraciones;
3. ensayar supuestos ligandos en presencia de un fuerte inhibidor ejemplar de la agregación de tau, tal como ADMM, a una concentración inhibidora;
4. los supuestos ligandos pueden identificarse por la propiedad de que carecen de capacidad para bloquear la unión tau-tau a través del dominio de repetición, pero bloquean la capacidad inhibidora de un fuerte inhibidor de agregación de tau.

[0206] Por tanto, la memoria descriptiva enseña un método *in vitro* para identificar un ligando capaz de marcar a la proteína tau agregada en FHP, comprendiendo el método las etapas de:

(i) proporcionar un primer agente que se sospecha que es capaz de marcar una proteína tau agregada en FHP,
(ii) poner en contacto (a) una proteína tau o un derivado de la misma que contenga el fragmento núcleo de tau unido a una fase sólida para exponer un sitio de captura de tau de alta afinidad (por ejemplo una proteína tau truncada correspondiente al fragmento núcleo y que termine en Ala390 – dGA), con (b) una proteína tau o derivado de la misma en fase líquida capaz de unirse a la proteína tau o derivado en fase sólida (por ejemplo dGAE que termina en Glu-391), y (c) dicho primer agente seleccionado y (d) un segundo agente que se sabe que es un inhibidor de la unión tau-tau,
(iii) seleccionar un primer agente que libere, completa o parcialmente, la inhibición de unión de la proteína tau o derivado en fase líquida de (b) a la proteína tau o derivado en fase sólida de (a) por el inhibidor (d).

[0207] Como ligandos pueden proporcionarse agentes que cumplan (iii).

[0208] Preferentemente el método se realiza junto con (antes, durante, después) las siguientes etapas:

(i*bis*) poner en contacto (a) una proteína tau o un derivado de la misma que contenga el fragmento núcleo de tau unido a una fase sólida para exponer un sitio de captura de tau de alta afinidad, (b) una proteína tau o derivado de la misma en fase líquida capaz de unirse a la proteína tau o derivado en fase sólida con (c) dicho primer agente y,
(i*bis*.1) detectar la inhibición de unión de tau-tau como se muestra por inhibición de unión de la proteína tau o derivado en fase líquida de (b) a la proteína tau o derivado en fase sólida de (a), (i*bis*.2) seleccionar un primer agente que tenga actividad mínima o ninguna como inhibidores de unión tau-tau y/u opcionalmente potenciar la unión tau-tau.

[0209] Como ligandos pueden proporcionarse agentes que cumplan (iii) e (i*bis*.2).

[0210] El inhibidor es preferentemente una diamino fenatiozina como se ha descrito anteriormente (más preferentemente DMMB). Los compuestos seleccionados para explorar pueden ser cualquier compuesto, incluyendo ligandos SB.

[0211] En formas preferidas la proteína tau o derivado en fase líquida se prepara en una forma que haya experimentado agregación parcial antes de exponerse a la fase sólida. Aparte de esto, el ensayo pueda realizarse ampliamente como se describe en el documento WO96/30766 y resumirse con más detalle en los Ejemplos indicados más adelante. Para las etapas de unión se usan condiciones preferentemente alcalinas o fisiológicas (por ejemplo PBS) y los resultados se detectan inmunológicamente.

[0212] Estos y otros aspectos de la presente invención serán más evidentes a partir de la lectura de los siguientes Ejemplos no limitativos, en los que las realizaciones de la invención se describirán solo a modo de ejemplo. Se hace referencia a las figuras acompañantes en las que:

Breve descripción de las figuras

[0213]

La Figura 1 muestra la distribución regional de tau-FHP, medida usando anticuerpos mAb423 (A) o mAb7.51 después de tratamiento con ácido fórmico de la fracción FHP (B), para 18 casos de EA. Tomado de Mukaetova-Ladinska *et al*., (1993), Am. J. Pathol. 143, 565-578.

La Figura 2 (a) muestra la agregación de moléculas tau y la aparición de los ovillos neurofibrilares durante los estados patológicos de la EA. Tomado de (Mukaetova-Ladinska, E. B. *et al*. (2000) Am. J. Pathol. Vol. 157, No. 2, 623-636); (b) muestra la estadificación neuropatológica propuesta por Braak; (c) muestra que la aparición de demencia clínica, según los criterios del DSM-IV, parece corresponder estadísticamente con la transición entre los estadios III y IV;

(d) muestra los niveles de la proteína beta amiloidea insoluble en SDS aislada de casos de control y casos con enfermedad de Alzheimer, como se describe en Harrington *et al*., (Am J Pathol 1994; 145: 1472-1484). Aunque el nivel medio es mayor en EA que en controles, el 70% de casos de EA se solapan con niveles de beta amiloidea encontrados en sujetos control.

La Figura 3 muestra una representación esquemática de un ovillo neurofibrilar (parte superior) y los cambios de inmunorreactividad que se observan durante el desarrollo de la enfermedad (parte inferior). Tomado de Bondareff *et al*. (1994) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53, 2, 158-164.

La Figura 4 muestra las estructuras químicas de: la estructura crítica mínima que permite unión de alta afinidad a moléculas tau agregadas (compuesto 4a); una versión biotinilada del compuesto 4a (compuesto 4b); y un derivado sustituido con R del compuesto 4a (compuesto 4c), en el que R es cualquier sustituyente adecuado.

La Figura 5 muestra las estructuras químicas de determinados ligandos analizados en el presente documento.

La Figura 6 muestra los picos de fluorescencia de primulina en solución (izquierda) y cuando se unen con una preparación pura de FHP (derecha).

La Figura 7 muestra los picos de fluorescencia de primulina unida a los FHP, en ausencia (izquierda) y presencia (derecha) de anhídrido citracónico. Como se observa, el anhídrido citracónico tiene el efecto de alterar la estructura ordenada de los FHP y de liberar la tau libre y la primulina no unida libre. El anhídrido citracónico también tiene el efecto de invertir la carga sobre restos de lisina y esto también puede desempeñar una función en la liberación de primulina.

Las Figuras 8a y 8b ilustran inhibidores de unión tau-tau ejemplares, como se describe en el documento WO 96/30766.

La Figura 9 muestra la fluorescencia de la primulina unida a los FHP en presencia de azul alcián. La figura demuestra que, en presencia de azul alcián, un modificador de la estructura de los FHP (Ref 33), no hay perturbaciones del pico de fluorescencia de primulina unida característico a 460 nm.

La Figura 10 muestra el efecto de diversos compuestos ("PM", proporción molar de compuesto: tau) sobre la unión tau-tau usando proteínas tau preparadas de acuerdo con el método proporcionado en el documento WO96/30766 y denominado en este documento "Preparación 1".

La Figura 11a muestra esquemáticamente la síntesis de azul de metileno marcado con [^{11}C]. La reacción transcurre mediante N-metilación de las aminas con [^{11}C]yodometano. Puede usarse HPLC para purificar el producto deseado a partir de cualquiera de los productos secundarios. La Figura 11b muestra una síntesis adicional basada en tionina, NaH y CH_3I.

La Figura 12 muestra esquemáticamente la síntesis Azur B marcado con [^{11}C]. La reacción transcurre mediante N metilación de las aminas con [^{11}C]yodometano. Puede usarse HPLC para purificar el producto deseado a partir de cualquiera de los productos secundarios.

La Figura 13 muestra esquemáticamente la síntesis de un derivado del compuesto 4a de la Figura 4 marcado con [^{18}F]. La reacción transcurre mediante sustitución aromática nucleófila por la cual un grupo nitro de un compuesto precursor se intercambia con un grupo flúor [^{18}F]. Puede usarse HPLC para purificar el producto deseado a partir de cualquiera de los productos secundarios.

La Figura 14 muestra las estructuras de determinados ligandos analizados en el presente documento. Los tamaños de estas moléculas se han determinado en base a distancias C-C de estructuras cristalinas conocidas y se han denominado A y B para cada molécula. Las longitudes C-C son las siguientes:

a)	Mínima	14,78 UA
	Máxima	15,11 UA
	Media	14,95 UA
b)	Mínima	15,05 UA
	Máxima	15,26 UA
	Media	15,17 UA
c)	Mínima	15,73 UA
	Máxima	16,14 UA
	Media	15,93 UA

Las Figuras 15 y 16 ilustran la estructura cristalina de la parte 'B' de la estructura de primulina (Soon-Beng Teo *et al*., 1995, Acta Crystallogr., Sect. C, 591.

Las Figuras 17 y 18 ilustran la estructura cristalina de un compuesto denominado N2A (Gilardi, R. D., 1972, Acta

Chrystallogr., Sect. B, 107).

Las Figuras 19 y 20 muestran la estructura cristalina de un diazoaminobenceno (Gladkova & Kondrashev, 1972, Kristallografiya (41) 17 33.

Las Figuras 21 y 22 ilustran como cristaliza en el espacio la molécula de las Figuras 15 y 16.

La Figura 23 muestra una comparación de las magnitudes media, máxima y mínima de las moléculas de la Figura 14. Las dimensiones se proporcionan en unidades ángstrom (UA).

La Figura 24 muestra una comparación similar para los núcleos benzotiazol básicos (es decir moléculas 1b y 2 de la Figura 5) y las diaminofenotiacinas. Estas distancias son distancias de carbono a carbono.

La Figura 25 muestra la probabilidad de ovillos extracelulares en función de la estadificación de Braak. Los estadios 2 – 4 pueden diferenciarse claramente del estadio 1 basándose en la probabilidad de ovillos extracelulares en E2/Trans y E4/HC.

La Figura 26 muestra la probabilidad de ovillos intracelulares en función de la estadificación de Braak. Los ovillos intracelulares proporcionan una mala base para discriminar primeros estadios en estas regiones, pero una buena base para discriminar los estadios 4 y 5 usando regiones neocorticales.

La Figura 27 corresponde a la Figura 25, pero en la que se seleccionaron casos con puntuaciones mayores de 21 según el MMSE en los 12 meses antes de la muerte. Se obtuvieron resultados similares.

La Figura 28 corresponde a la Figura 26, pero se seleccionaron usando casos con puntuaciones mayores de 21 según el MMSE en los 12 meses antes de la muerte. Se obtuvieron resultados similares.

La Figura 29 muestra densidades de ovillos extracelulares (recuentos por mm^2) en función de la estadificación de Braak. Se obtienen resultados similares a los mostrados en la Figura 25.

La Figura 30 muestra densidades de ovillos intracelulares (recuentos por mm^2) en función de la estadificación de Braak.

La Figura 31a muestra un ovillo apenas visible visualizado con tioflavina-T al 0,001% (punta de flecha). En suspensiones ifl tales como esta, los ovillos pueden observarse por fluorescencia azul que no se diferencia de la asociada con la unión de contaminantes en la preparación. El panel superior muestra que la fluorescencia azul de los ovillos producida por la tioflavina-T al 0,001% está desplazada por la fluorescencia amarilla de los ovillos producida por la primulina al 0,001%. La Figura 31b muestra una microscopía electrónica de los FHP marcados después de digestión con Pronasa. (a) Producto químico marcado con un análogo de benzotiazol biotinilado. Los FHP se depositaron sobre una cuadrícula recubierta con carbono después de digestión con Pronasa y se incubaron brevemente con el compuesto 4b y después se incubaron con una preparación de anticuerpos antibiotina que se habían conjugado con oro coloidal. La decoración de los FHP aislados establece que el compuesto se une a la estructura de FHP proteolíticamente estable. (b) inmunomarcado con mAb 423 de los FHP aislados después de digestión con Pronasa, seguido de incubación con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con oro como se describe en Novak *et al*. 1993 (Novak M, Kabat J, Wischik CM (1993) “Molecular characterisation of the minimal protease-resistant tau unit of the Alzheimers’ disease paired helical filament”, EMBO J 12: 365-370). Como se observa en este documento, el mAb 423 marca mal los FHP derivados de ovillos intracelulares (que conservan inmunorreactividad tau N terminal en la capa externa difusa), aunque los FHP se digieren fuertemente con Pronasa. Del mismo modo Mena *et al*. (1996) (Mena R, Edwards PC, Harrington CR, Mukaetova-Ladinska EB, Wischik CM, “Staging the pathological assembly of truncated tau protein into paired helical filaments in Alzheimer’s disease”, Acta Neuropathol 91: 633-641) demuestran que en los ovillos intracelulares la inmunorreactividad de los mAb 423 está muy obstruida, pero puede exponerse por tratamiento previo con ácido fórmico de las secciones.

La Figura 32 muestra la “Preparación 2” de la proteína tau purificada como se describe en el Ejemplo 7 más adelante.

La Figura 33 muestra una representación gráfica de los resultados de un procesamiento preparativo para dGA. La “Purificación en veces” se expresa como la proporción de inmunorreactividad específica para cada fracción (es decir inmunorreactividad/concentración proteína) frente a inmunorreactividad específica en el flujo a través de DE.

La Figura 34 muestra cromatografía de filtración en gel de dGAE purificada. Tamaño de elución aparente en condiciones no desnaturalizantes: 1- -320 kD; 2- -80 kD; 3 - -30 kD; 4 - -10 kD. Aproximadamente el 64% de inmunorreactividad DE mAb 7,51 eluye en fracciones correspondientes a especies de tamaño > 15 kD.

La Figura 35 muestra cromatografía de filtración en gel de T40 purificado. Tamaño de elución aparente en condiciones no desnaturalizantes: 1 - -450 kD; 2 - -160 kD; 3 - -55 kD. Aproximadamente el 50% de inmunorreactividad DE mAb 499 eluye en fracciones correspondientes a especies de tamaño > 60 kD.

La Figura 36 muestra la actividad de la tionina contra la unión tau-tau en las Preparaciones 1 y 2.

La Figura 37 muestra la actividad del cloruro de tolonio contra la unión tau-tau en las Preparaciones 1 y 2.

La Figura 38 muestra la actividad de DMMB contra la unión tau-tau en las Preparaciones 1 y 2.

Las Figuras 39a-c muestran que la proteína tau de longitud completa (hT40) preparada de acuerdo con el protocolo de Preparación 2 demuestra actividad de unión tau-tau mínima cuando se usa en la fase acuosa con dGA en la fase sólida (b). Sin embargo, cuando la hT40 se usa en la fase sólida (c), la unión de dGAE fue similar a la obtenida para la unión de dGAE a dGA en la fase sólida (a).

La Figura 40 muestra que la primulina y el rojo de tiacina no tienen actividad inhibidora contra la unión tau-tau en la Preparación 2 y de hecho potencian tal unión a altas concentraciones.

La Figura 41 muestra el bloqueo de efectos inhibidores de DMMB 5 μM sobre la unión tau-tau en presencia de concentraciones en aumento de Primulina (a) y rojo de tiacina (b) expresado como “exceso molar” con respecto a DMMB. Similares resultados se muestran para DMMB 15 μM en presencia de concentraciones en aumento de Primulina (c) y Rojo de Tiacina (d).

La Figura 42 muestra atenuación e inversión de inhibición de la unión Tau-Tau mediante DMMB en presencia de exceso molar en aumento de Primulina. Para cada gráfico, se muestra la unión tau-tau en presencia de concentraciones constantes de DMMB coincubada con Primulina a 0x, 1x, 5x, 10x, 100x las concentraciones de DMMB mostradas. La inhibición de la unión Tau-Tau producida por DMMB se atenúa progresivamente y se invierte en presencia de un exceso molar en aumento de Primulina.

La Figura 43 muestra una curva de unión tau-tau en presencia de DMMB 25 μM y exceso molar de Primulina en aumento como se muestra. La unión tau-tau puede configurarse de la siguiente manera:

$$\text{Unión} = (B_{max} \times [Prim]) / (Kd + [Prim])$$

En la que $B_{Max} = 1,67$
Kd = 13,37
r = 0,977 (observado frente a previsto)

La Figura 44 muestra una curva de unión tau-tau en presencia de DMMB 5 μM y exceso molar de Primulina en aumento como se muestra. La unión tau-tau puede configurarse de la siguiente manera:

$$\text{Unión} = (B_{max} \times [Prim]) / (Kd + [Prim])$$

En la que $B_{Max} = 1,38$
Kd = 13,86
r = 0,927 (observado frente a previsto)

La Figura 45 muestra una curva de unión tau-tau en presencia de DMMB 5 μM y exceso molar de Rojo de Tiacina en aumento como se muestra. La unión tau-tau puede configurarse de la siguiente manera:

$$\text{Unión} = (B_{max} \times [TR]) / (Kd + [TR])$$

En la que $B_{Max} = 1,64$
Kd = 17,45
r = 0,915 (observado frente a previsto)

Ejemplos

Métodos y materiales

Compuestos de unión a FHP

[0214] A menos que se indique otra cosa, los compuestos usados en el presente documento se adquirieron en ICI Pharmaceuticals. La Tioflavina T y el amarillo de tiacina se adquirieron en Fluka AG.

Cuantificación de fluorescencia

[0215] Se cortaron secciones en serie de 16 μM del hipocampo de un caso de muerte con EA clínica y neuropatológicamente confirmada. Estas secciones se tiñeron con tioflavina S a concentraciones de 0,01%, 0,001% o 0,0001% en agua durante 5-10 minutos, después se lavaron en agua y se montaron en medio acuoso de Apathe. En una segunda serie de experimentos, las secciones se cortaron del hipocampo y del núcleo basal de Meynert. Estas secciones se tiñeron con primulina a concentraciones de 0,01%, 0,001% o 0,0001% en agua durante 5-10 minutos, después se lavaron en agua y se montaron en medio acuoso de Apathe.

[0216] Para cuantificar la emisión de fluorescencia se usó un microscopio de fluorescencia Leitz equipado con un tubo fotomultiplicador (Modelo MPV-2). Se usaron tres bloques de filtro Leitz de la siguiente manera:

1. Bloque de filtro H2, código 513 417
Paso de banda de intervalo de Excitación 390-490 nm
Espejo RKP 510 (es decir transmite por debajo de 510 nm)
Filtro de supresión LP 515 (es decir refleja por encima de 515 nm)

3. Bloque de filtro G, código 513 416
Paso de banda de intervalo de Excitación 350-460 nm
Espejo RKP 510 (es decir transmite por debajo de 510 nm)
Filtro de supresión LP 515 (es decir refleja por encima de 515 nm)

4. Bloque de filtro A, código 513 410
Paso de Banda UV de intervalo de Excitación 340-380 nm
Espejo RKP 400 (es decir transmite por debajo de 400 nm)
Filtro de supresión LP 430 (es decir refleja por encima de 430 nm)

Preparación de if I y II

[0217] El material IfI se preparó como describen Wischik *et al* (1985) J Cell Biol 100: 1905-1912.

[0218] El material IfII se preparó como describen Wischik *et al* (1995) Neurobiol Aging 16: 409-431. Para los experimentos que implican ifll digerido sin pronasa se siguió un protocolo idéntico IfII, omitiendo la etapa de digestión con pronasa.

Espectrofluorometria de ifII

[0219] Estas mediciones se realizaron en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer (modelo MPF-3). Para todas las mediciones se usó rutinariamente una concentración de ligando del 0,00001%. Se observó que la primulina tenía un pico de excitación a 370 nm y un pico de emisión a 515 nm. Todas las mediciones se realizaron por lo tanto a una longitud de onda de excitación convencional de 370 nm y a una anchura de abertura constante de 3 mm.

Ensayo de unión competitivo

[0220] El material IfI se homogeneizó en PBS en un homogeneizador de vidrio de 0,2 ml. A la suspensión, se añadieron los compuestos de ensayo a concentraciones finales que variaban del 0,1% al 0,00001%. Estas se dejaron incubar durante 5 minutos y se añadió primulina a una concentración equivalente o inferior. Las suspensiones se transfirieron a un portaobjetos de vidrio y se examinaron mediante microscopia fluorescente a través de una serie de bloques de filtro de fluorescencia, que cubrían las longitudes de onda de excitación y emisión entre 380 nm y 570 nm. El criterio de valoración buscado en estas observaciones era el desplazamiento de la fluorescencia de primulina típico de los fragmentos de ovillos.

Microscopia Electrónica del ligando

[0221] Los FHP derivados de una fracción ifl se depositaron sobre una cuadrícula recubierta con carbono después de digestión con pronasa y se incubaron brevemente con una preparación de primulina biotinilada y después se incubó con un anticuerpo anti biotina que se había conjugado con oro coloidal mediante el método de Slot y Gueze (1981).

Succinilación y cromatografía de IfII

[0222] Se absorbieron fracciones de Ifll lavadas en urea 8 M/borato 50 mM (1 ml, pH 9) y se sometieron a ultrasonido, se añadió 1 ml de anhídrido succínico en acetona a una concentración final de succinato 250 mM en 4 ml y el pH se mantuvo a 8,5 con hidróxido de sodio. La solución se aclaró por centrifugación y se aplicó a una columna Sephacryl S200 equilibrada con bicarbonato. El eluado de la columna se controló a 230 ó 280 nm.

[0223] Dado que las fracciones succiniladas no pudieron visualizarse por tinción Coomassie o tinción de geles de plata, las bandas se detectaron por autorradiografía después de marcaje químico específico de fracciones Ifll con reactivo Bolton-Hunter (Amersham).

[0224] Para el marcaje por fotoafinidad de péptidos derivados de FHP, las fracciones ifI o ifII se incubaron previamente con un derivado fotolabil marcado con I^{125}.

[0225] La fracción fotomarcada procesada a una Kav de 0,21 se concentró por ultrafiltración a través de una membrana Amicon YM2 (10 ml), se digirió con quimiotripsina (0,01 mg/ml) en bicarbonato de amonio 50 mM. Los fragmentos quimotrípticos para análisis de secuencia los aisló el Dr H. C Thogersen por HPLC de fase inversa usando una columna C18, con un gradiente de acetil nitrilo de 0-100%, con ácido trifluoroacético al 0,1%. Los péptidos quimotrípticos se secuenciaron.

Estudios morfológicos de los FHP en presencia de fenotiacinas

[0226] Para estos experimentos, se prepararon fracciones ifII como se ha descrito anteriormente para microscopia electrónica. Este material se incubó directamente con preparaciones de fenotiacinas a concentraciones finales que variaban entre el 0,1% y el 0,0001% y después se aplicaron a cuadrículas recubiertas con carbono y se examinaron directamente después de tinción con LiPTA (1%). Como alternativa, las suspensiones ifII se depositaron sobre cuadrículas recubiertas con carbono, parcialmente secas y lavadas con soluciones de fenotiacina. Dichas preparaciones se tiñeron directamente con LiPTA o se procesaron después para microscopia inmunoelectrónica usando 6.423 como anticuerpo primario. Las micrografías electrónicas se registraron a aumentos nominales entre 25.000 y 45.000.

Cálculo de proteína tau agregada en el espacio extracelular expresado en µg/g de tejido cerebral como una función de estadificación de Braak

[0227] Se usaron niveles de tau-FHP en pmol/g (P) y recuentos de ovillos por mm^2 (T), previamente descritos, en una cohorte clínica y neuropatológicamente estadificada (R. Y. K. Lai, *et al*., Neurobiol Aging 16, 433 (1995)) para deducir un cálculo del nivel de tau-FHP por célula piramidal (CP) afectada en pg/cell usando el mismo ELISA en cerebro humano. El recuento de ovillos por mm^2 proporciona un cálculo del número de células piramidales afectadas en un volumen de 1 mm x 1 mm x 0,1 mm (0,0001 cm^3), permitiendo que cualquier perfil de ovillo contado en una sección nominal de 7 μm pudiese extenderse en -45 μm ortogonal a la sección en cualquier dirección (S. M. Blinkov, I. I. Glezer, The human brain in figures and tables, a quantitative handbook; Plenum Press, NY, 1968, Table 204). El nivel de tau-FHP en el núcleo en pg/cm^3 es 10 x P ya que el fragmento de tau FHP-núcleo es de 10 kD (CM. Wischik, *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4506 (1988)). A partir de esto, CP = (P x 10) / (T / 0,0001). En los estadios de Braak 4-6 (H. Braak, E. Braak, Acta Neuropathol. 82, 239 (1991)), los valores regionales para CP en materia gris fueron: córtex frontal, 0,13 ± 0,05 pg/cell; hipocampo, 0,60 ± 0,39 pg/cell; córtex temporal, 1,074 ± 0,44; córtex entorrinal 1,56 ± 0,63 pg/cell. Estas diferencias reflejan diferencias anatómicas, velocidades regionales diferentes del desarrollo de la enfermedad (C. Bancher, H. Braak, P. Fischer, K. Jellinger, Neurosci. Lett. 162, 179 (1993), también Gertz *et al*., Acta Neuropathol. 95, 154 (1988)), y el grado al cual los recuentos de ovillos se infravaloran los FHP que se acumulan en neuritis distrófica a estadios de patología más avanzados (Lai *et al*, 1995, lugar citado). Las medias globales proporcionan una aproximación para los niveles de FHP por célula que podrían ser relevantes para EA. Estos son 0,37 ± 0,08 pg/cell para casos en estadios 1-3 de Braak y 1,08 ± 0,28 pg/cell para casos en estadios 4-6 de Braak.

[0228] Con el propósito de calcular la proteína tau extracelular agregada en FHP, mostrado más adelante en la Tabla y en las Figuras 26, 27, 29 y 31, los ovillos se contaron extracelulares si podía demostrarse inmunorreactividad con mAb 423 después de tratamiento de secciones montadas en vidrio con ácido fórmico al 98% durante 5 minutos antes de incubación con mAb 423 durante 1 hora. Para evitar dudas, esta metodología difiere de la indicada por Mena *et al*. (1996) en la que secciones de vibrotomo de flotación libre se incubaron brevemente con ácido fórmico y después durante una noche con mAb 423. Como se observa en esta publicación, este último protocolo de sección de flotación libre durante una noche consigue una inmunorreactividad de mAb 423 máxima en ovillos intracelulares y mostró que todos los ovillos intracelulares contenían inmunorreactividad de mAb 423, aunque en un estado sustancialmente ocluido por la capa externa difusa del FHP (véase la Figura 3). El propósito del presente protocolo fue garantizar el marcado máximo de los ovillos en los estadios 3 y 2 ilustrados en la Figura 3. Algún grado menor de marcaje de ovillos intracelulares podría no excluirse por completo y también se realizaron intentos de recuento en los que se intentó una discriminación subjetiva. Sin embargo, lo último estima no concordar con la densidad o probabilidad del marcaje de ovillos por mAb AT8 (Figuras 28, 30, 32) que es exclusivamente intracelular y muestra perfiles completamente diferentes con respecto al estadio neuropatológico con respecto a los revelados usando mAb 423. Para los fines de los presentes cálculos, por lo tanto, se tomaron recuentos de ovillos inmunorreactivos a mAb 423 como sustancial o completamente representativos de patología de ovillos extracelulares en los estadios 2 y 3 como se muestra en la Figura 3, pero sustancialmente no en el estadio 1 de la Figura 3. Para evitar dudas, los estadios indicados en la Figura 3 no son estadios de Braak, sino estadios de degeneración de una neurona sencilla que contiene un ovillo.

[0229] Los datos específicos mostrados en la Tabla 1 se basaron en lo siguiente:

Número	ESB	ME1T4	CP	PT4	REG3B	SE1T4
1	1,0000	0,3982	1,5600	0,6212	1,0000	0,3982
2	2,0000	6,7259	1,5600	10,4924	1,0000	2,7047
3	3,0000	14,9646	1,5600	23,3448	1,0000	2,9836
4	4,0000	33,6297	1,5600	52,4624	1,0000	10,9883
5	5,0000	44,3102	1,5600	69,1240	1,0000	13,0298
6	1,0000	0,0	0,6000	0,0	2,0000	0,0
7	2,0000	1,3865	0,6000	0,8319	2,0000	0,4531
8	3,0000	3,7169	0,6000	2,2302	2,0000	0,8060
9	4,0000	8,9384	0,6000	5,3630	2,0000	3,0048
10	5,0000	23,9479	0,6000	14,3687	2,0000	4,0567
11	1,0000	0,0	0,6000	0,0	3,0000	0,0
12	2,0000	0,0	0,6000	0,0	3,0000	0,0
13	3,0000	0,0	0,6000	0,0	3,0000	0,0
14	4,0000	0,1293	0,6000	0,0776	3,0000	0,1293
15	5,0000	2,2007	0,6000	1,3204	3,0000	1,0634

en la que:

ESB son estadios de Braak
ME1T4 es el recuento de ovillos extracelulares

CP es un cálculo de la concentración de tau - FHP por célula (calculado como se ha indicado anteriormente)
PT4 es el contenido de FHP adscrito a ovillos extracelulares (CP x MEIT4)
REG3B es el agrupamiento de regiones cerebrales en 3 grupos según las Figuras 26 y 27
SE1T4 en el error típico del recuento de ovillos extracelulares.

Ejemplo 1 – tau agregada en estadificación de Braak

[0230] Basándose en propiedades inmunológicas (Ref 26, 27, 30), es posible diferenciar ovillos intracelulares de ovillos extracelulares. Ambas frecuencias de casos con ovillos en estas categorías (es decir probabilidad) y su cantidad (es decir recuentos por mm^2) se determinaron en una serie de casos prospectivos y se agruparon en las regiones que se sabía que representaban estadios en el desarrollo de la patología de acuerdo con el sistema de Braak y Braak.

[0231] Como se observa en la Figura 25, los estadios 2 - 4 pueden diferenciarse claramente del estadio 1 basándose en la probabilidad de ovillos extracelulares en E2/Trans y E4/HC. También se observa en las figuras las regiones F/T/P (regiones neocorticales – frontal, temporal, parietal).

[0232] Al contrario, los ovillos intracelulares proporcionan una mala base para diferenciar estadios iniciales en estas regiones, pero una buena base para diferenciar los estadios 4 y 5 usando regiones neocorticales. De manera similar, cuando se seleccionaron casos con puntuaciones mayores de 21, según el MMSE, 12 meses antes de la muerte, se obtuvieron resultados similares. De nuevo, se obtuvieron resultados similares cuando se determinaron densidades de ovillos.

[0233] Estos resultados pueden convertirse en aproximaciones para la cantidad de proteína tau agregada en el espacio extracelular expresada en μg/g de tejido cerebral, como se ha descrito anteriormente en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la Tabla 1. Estos son subestimaciones, dando que los recuentos de ovillos subestiman la cantidad de proteína tau agregada.

Tabla 1: CONTENIDO DE TAU-FHP CALCULADO EN OEC POR REGIÓN Y ESTADIO

REGIÓN	ESB	FHP/TAU (μg/g)
E2/TRANS	1	0,62
	2	10,49
	3	23,34
	4	52,46
	5	69,12
HC/E4	1	0
	2	0,83
	3	2,23
	4	5,36
	5	14,36
F/T/P	1	0
	2	0
	3	0
	4	0,08
	5	1,32

[0234] La tabla 1 muestra la cantidad de proteína tau agregada en el espacio extracelular expresada en μg/g de tejido cerebral en función de la estadificación de Braak. Los datos se calcularon como se describe en Materiales y Métodos.

[0235] En resumen, estos resultados demuestran que los depósitos extracelulares de tau-FHP en las estructuras del lóbulo temporal medio proporcionan una base para la estadificación empírica de la degeneración neurofibrilar de la EA. Dicha estadificación sólo podría conseguirse por métodos de formación de radio imágenes siempre que pudiesen crearse ligandos adecuados.

Ejemplo 2 – valoración de compuestos que se unen dentro del dominio de repetición agregado de la proteína tau núcleo en los FHP

[0236] Un compuesto prototipo obtenido como un componente de la preparación en bruto, disponible en el mercado, de tioflavina S, se separó en 20 constituyentes distintos por cromatografía de capa fina analítica y cromatografía preparativa. Los ensayos demostraron que no todos los constituyentes eran capaces de actuar como

ligandos eficaces de ovillos. Específicamente, se encontró que la primulina pura marcaba ovillos, pero el benzotiazol tioflavina T era mucho menos eficaz, sin embargo marcaba preferentemente amiloide.

[0237] Se supuso que una posible diferencia era el grupo sulfonado en la posición 1. Sin embargo, se observó que el marcaje del ovillo no se debía solo a la estructura de benzotiazol sulfonada, indicando que se necesitaba una estructura aromática más grande.

[0238] Se encontró que el rojo tiacina purificado competía con la primulina a concentraciones equivalentes, mientras que el amarillo tiacina no. Por lo tanto, una estructura benzotiazol aromática agrandada no determina, en sí misma, la alta afinidad de unión en los ovillos.

[0239] Para determinar un requisito crítico mínimo para la unión competitiva, el benzotiazol sulfonado se agrandó añadiendo un solo grupo fenilo a través de un enlace diamino. Este compuesto, aunque no era fluorescente, se encontró que competía con la fluorescencia del rojo tiacina y de la primulina a concentraciones equivalentes. Este compuesto agrandado por lo tanto define la estructura crítica mínima necesaria para una alta afinidad de unión con el ovillo.

[0240] Para demostrar que el sitio de unión en el ovillo era de hecho el propio FHP, el compuesto agrandado se agrandó adicionalmente con la adición de un grupo de biotina. Como se encontró que este competía con la primulina y el rojo tiacina, el compuesto agrandado adicionalmente conservó alta afinidad de unión con el ovillo. Adicionalmente, se encontró que anticuerpos anti-biotina conjugados con inmuno-oro marcaban los FHP aislados previamente incubados con el compuesto agrandado adicionalmente, mientras que no se demostró ningún marcaje sin preincubación o con preincubación sólo con biotina (Fig. 31b). Finalmente, cuando se preparó un conjugado del compuesto fotoactivado, fue posible identificar y secuenciar la proteína marcada. Se encontró que esta era el mismo fragmento tau núcleo que el aislado del núcleo del FHP, que comprendía la región de repetición de la proteína tau.

[0241] En resumen, estos resultados demuestran inequívocamente que el sitio de unión para los compuestos agrandados y adicionalmente agrandados está dentro del dominio de repetición de la proteína tau agregada del núcleo de FHP. Adicionalmente, demuestran que el compuesto agrandado puede usarse como un quelato para la adición de grupos funcionales sin alterar la actividad del ligando dentro del núcleo de FHP. Por lo tanto, el compuesto agrandado podría usarse como quelato para la adición de tecnecio u otro resto de formación de imágenes para generar un ligando adecuado para detectar, por ejemplo, ovillos extracelulares en EA.

Ejemplo 3 – determinación de dimensiones óptimas de moléculas de ligando

[0242] Como se indica, la Figura 14 muestra tres estructuras junto con sus dimensiones. Por ejemplo, se muestra la distancia C11-C1 y C10-C1.

[0243] La Figuras 15 y 16 ilustran las estructuras cristalinas de la parte 'B' de la estructura de primulina (Soon-Beng Teo *et al*., 1995, Acta Crystallogr., Sect. C, 591). Como puede observarse en la Figura 16, que es una vista lateral, la molécula es esencialmente plana, aunque tiene una ligera vuelta. La parte 'A' de la primulina puede calcularse a partir de la misma molécula. De esto, pueden derivarse mediciones de A+B, que proporcionan una indicación de la longitud real de una de las especies activas de la presente invención.

[0244] Para calcular el tamaño del compuesto (b) mostrado en la Figura 14, se usó la medición A a partir de los datos de la Figura 15 y la medición B se determinó a partir de una molécula indicada N2A y mostrada en las Figuras 17 y 18 (Gilardi, R. D., 1972, Acta Chrystallogr., Sect. B, 107). Como puede observarse a partir de la vista lateral en la Figura 18, esta parte de la molécula es completamente plana. Al rojo de tiacina se aplican las mismas mediciones, que es idéntico en sus dimensiones al compuesto (b).

[0245] El tamaño del compuesto (c) (mostrado en la Figura 14) se determinó de la siguiente manera. La parte 'A' proviene de la molécula de la Figura 15 que se usó para la primulina, mientras que la parte 'B' proviene de la molécula mostrada en las Figuras 19 y 20 (Gladkova *et al*., 1972, Kristallografiya 41). De nuevo, la parte B de la molécula es completamente plana y la única diferencia con respecto a la molécula mostrada en la Figura 17 es la distancia entre los grupos aromáticos.

[0246] Las Figuras 21 y 22 ilustran cómo cristaliza en el espacio la molécula de la Figura 15. Como puede observarse, la molécula forma un modelo en " forma de V" alternativo, y no apilado. Si se comparan, la estructura cristalina del azul de metileno indica que las moléculas forman apilamientos con láminas alternativas de moléculas de agua entre los apilamientos unidos por enlaces pi.

La Tabla 2 clasifica las dimensiones mínima, máxima y media para los compuestos (a) (b) y (c) y la unidad de benzotiazol en solitario (es decir las estructuras 1b y 2 como se muestra en la Figura 5). Las dimensiones correspondientes al azul de metileno se proporcionan como "AMCC" (carbono-carbono) y "AMNN" (nitrógeno-nitrógeno):

	1	2	3	4	5	6
	(a)	(b)	(c)	BENZOTIAZOL	AMCC	AMNN
Mínima	14,7830	15,0500	15,7270	8,7700	7,0849	9,9600
Máxima	15,1120	15,2610	16,1380	8,9550	7,4443	9,9600
Media	14,9475	15,1680	15,9273	8,8625	7,3031	9,9600

[0247] La Figura 23 muestra una comparativa de los grados medio, máximo y mínimo de moléculas que son ligandos activos y del azul de tiacina (que es inactivo como ligando). Las dimensiones se proporcionan en unidades ángstrom (UA). En la Figura 24, se realiza una comparativa similar para el núcleo básico de benzotiazol (es decir moléculas 1b y 2 de la Figura 5) y las diaminofenotiacinas. Estas distancias son distancias carbono-carbono.

[0248] Los resultados anteriores ilustran que las moléculas proporcionadas en el presente documento son substancialmente planas. Sin embargo, hay una diferencia fundamental en la actividad entre ligandos de acuerdo con la presente invención y otras moléculas analizadas anteriormente. Como se muestra en las Figuras, los ligandos adecuados de acuerdo con la invención comprenden moléculas largas, planas con dimensiones entre 14,783 y 15,261 UA. Por otro lado, una molécula más larga, tal como el amarillo de tiacina, que sobrepasa estas dimensiones (media 15,927 UA) no sirve como un ligando eficaz, incluso si es plana. Sin embargo, determinadas moléculas planas, más cortas, se unen preferentemente a amiloide.

Ejemplo 4 - PET usando moléculas ligando e inhibidores

[0249] Las Figuras 11 a 13 indican métodos de síntesis típicos que podrían usarse para convertir las diaminofenotiazinas u otros compuestos en especies emisoras de positrones.

[0250] La Figura 11b muestra un método particular mediante el cual la tionina se trata con NaH seguido de yoduro de metilo marcado para dar azul de metileno. Para la síntesis de azul de metileno puede adoptarse un procedimiento similar comenzando a partir de Azur A y Azur B. También pueden usarse otras bases fuertes.

[0251] Otros métodos que pueden usarse incluyen HCl y MeOH marcado, ácido trimetil fosfórico marcado; dimetilsulfóxido marcado y formaldehído marcado. Los expertos en la materia conocen la química de la síntesis y metodología general. Estos ejemplos se proporcionan sin ninguna restricción implícita como una metodología final.

Ejemplo 5 - ligandos de bloqueo

[0252] Compuestos tales como tioflavina-T y -S tiñen fuertemente depósitos amiloides. Sin embargo la Figura 31 demuestra que la primulina puede desplazar tales compuestos de los ovillos. Por lo tanto estos compuestos pueden usarse como reactivos de bloqueo para saturar sitios de unión que no sean de interés sin inhibir la unión de ligandos para la proteína tau agregada.

Ejemplo 6 - comparación de moléculas ligando e inhibidores

[0253] Parece que hay una diferencia fundamental en cuanto a la actividad de las moléculas que son ligandos eficaces, en comparación con aquellas que son inhibidores eficaces de la unión tau-tau. La molécula de benzotiazol no altera los FHP, ni de hecho ninguno de los ligandos, mientras que la serie de diaminofenotiazina se constituye como un modificador de FHP e inhibidor de la agregación de la proteína tau.

[0254] Usando primulina, se realizaron investigaciones adicionales en cuanto a la relación entre ligandos de tau dependientes de agregación e inhibidores de agregación de la proteína tau. La primulina en solución tiene un pico de fluorescencia a 520 nm. Este cambia a 470 nm cuando la primulina se une con una preparación pura de FHP (Figura 6). Se encontró que el tratamiento de los FHP con anhídrido citracónico, que se ha observado que altera la estructura de FHP y libera la tau libre (así como que invierte la carga en los restos de lisina), anulaba el pico de fluorescencia a 470 nm (Figura 7). Por lo tanto, la unión por tales compuestos es dependiente del estado polimerizado de la tau encontrada en los FHP, pero no está presente en la tau libre.

[0255] Se han identificado compuestos que alteran la estructura de los FHP e invierten la actividad proteolítica del núcleo de FHP (véase el documento WO 96/30766). En la Figura 8 adjunta se muestran ejemplos de tales compuestos. Los autores de la presente invención han identificado ahora que estos compuestos se unen a tau en un sitio de unión específico dentro del dominio de unión tau-tau de alta afinidad. Sin embargo, se encontró que tales compuestos no podían alterar la unión de la primulina a la proteína tau en moléculas de tau agregadas, como demuestra la conservación del pico de fluorescencia de primulina a 470 nm en presencia de azul alcián (Figura 9).

[0256] Por tanto, parece que, aunque el azul alcián puede inhibir las interacciones tau-tau, el sitio de inhibición, o quizá el orden de interacción de unión en el que actúa, son tales que dejan el sitio de unión para los ligandos SB existentes. Por tanto los compuestos que actúan como ligandos de la proteína tau agregada no parecen unirse en el mismo sitio (o sitios) que los compuestos que son inhibidores de la agregación de tau, aunque sin embargo pueden influir en las propiedades inhibidoras de estos inhibidores (véase el Ejemplo 7 más adelante).

[0257] Este punto se examinó adicionalmente estudiando la fuerza de los ligandos de la tau agregada típicos como inhibidores de la agregación de tau. Se ha observado previamente que, basándose en la inhibición de unión tau-tau en un ensayo en fase sólida (WO 96/30766) pueden identificarse inhibidores de la agregación de tau (por ejemplo diaminofenotiazinas). Cuando en el mismo ensayo se sometieron a ensayo, la primulina y el rojo de tiacina se observó que eran inhibidores débiles de la unión tau-tau (Figura 10). Por tanto, aunque estos compuestos son fuertes ligandos para tau dentro del núcleo de FHP, a lo sumo son inhibidores débiles en el sitio requerido para la inhibición de la unión tau-tau.

[0258] La demostración de que compuestos de la clase similar a diaminofenotiazina se unen a tau en el estado agregado se prueba por demostración directa de la interrupción de la estructura de FHP en presencia de concentraciones suficientemente altas, particularmente de compuestos tales como azul de metileno. Por tanto, los compuestos de la clase similar a diaminofenotiazina que son inhibidores de la unión tau-tau pueden servir como ligandos de tau agregada a concentraciones más bajas.

[0259] En resumen, los autores de la presente invención han encontrado que es posible definir dos clases de sitios de unión dentro del agregado tau FHP-núcleo. Ambos son potencialmente útiles para el desarrollo de ligandos de formación de imágenes radiológicas:

(i) Sitios similares a benzotiazol sulfonados: debido a su tamaño y carga, los compuestos de este tipo, asociados con quelatos adecuados, tales como tecnecio, pueden servir como ligandos para ovillos extracelulares.

(ii) sitios similares a diaminofenotiazinas: cuando tales compuestos se marcan adecuadamente con un grupo funcional emisor de positrones, servirían como ligandos para todos los agregados de tau y serían capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (Ref 36) y entrar en las células. Por tanto estos compuestos, y sus derivados, tienen un posible uso en el marcaje de ovillos intracelulares, por ejemplo, los presentes en los cerebros de pacientes con EA, o de ovillos intracelulares, cuando se usan a menores concentraciones.

Ejemplo 7 - ensayos ejemplo para identificar ligandos de diagnóstico adicionales en base a reducción de inhibición

(i) Preparación de proteína Tau en la que se ha producido agregación parcial

[0260] La preparación (“Preparación 2”) se muestra esquemáticamente en la Figura 32 y se diferencia de los métodos anteriormente descritos (por ejemplo en el documento WO96/30766- "Preparación 1" - mostrados en (ii) más adelante).

[0261] Los plásmidos de ADNc recombinante son los descritos en el documento WO96/30766.

[0262] Brevemente, el ADNc de tau se generó usando protocolos convencionales (Sambrook, Fritsch & Maniatis "Molecular cloning. A Laboratory Manual" (1989) Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.) a partir de ARNm aislado del tejido cerebral de un paciente con Alzheimer cuyo tejido se obtuvo 3 h después de morir. La genoteca de ADNc se exploró con sondas sintéticas de 17 oligómeros derivadas de la secuencia de parte de una proteína núcleo de FHP (Goedert et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 4051-4055). Los clones de ADNc de longitud completa se subclonaron en el sitio EcoRI de M13mp19 y se usó mutagénesis dirigida a sitio para introducir un sitio NdeI en el contexto del codón iniciador. Después de la escisión con NdeI y EcoRI, los fragmentos de ADNc resultantes se subclonaron aguas abajo del promotor de ARN polimerasa de T7 en el plásmido de expresión de corte NdeI/EcoRI pRK172 (McLeod et al. (1987) EMBO J., 6, 729-736). El pRK172 es un derivado del pBR322 que se propaga a un número de copias muy elevado en E. coli debido a la retirada de la región de control de número de copias pBR322. El plásmido lleva un gen de resistencia a ampicilina para la selección de clones recombinantes.

[0263] Las construcciones de ADNc, que codifican formas truncadas de tau, se prepararon a partir de ARNm como se describe en Novak et al. (1993) EMBO J., 12, 365-370. El ARNm se usó como molde para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores oligonucleotídicos específicos. El cebador con sentido contenía un sitio NdeI y el anti-sentido un sitio EcoRI. Los fragmentos de la PCR se subclonaron en el pRK172, como se ha descrito anteriormente. Los cebadores usados para la construcción de dGAE se proporcionan en la Figura 22. La autenticidad de todos los fragmentos de ADN usados para la expresión se confirmó por secuenciación de longitud completa de ambas cadenas.

[0264] Detalles para la construcción del ADNc de htau40 ("T40") se describen en (Goedert et al. (1989), Neuron 3: 519-526). Esta secuencia es la forma más larga de tau encontrada en el SNC y codifica la proteína tau que contiene tanto los 2 insertos N-terminales de 29 aminoácidos cada uno como una repetición extra de 31 aminoácidos en el dominio de unión a tubulina.

[0265] Los plásmidos recombinantes se usaron para transformar la cepa BL21 de E. coli (DE3), usada para la expresión procariota, que lleva una copia cromosómica del gen de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 bajo control del promotor *lac* UV5 (Studier y Moffat (1986), J. Mol. Biol. 189, 113-130). Se indujeron cultivos de crecimiento exponencial con IPTG (isopropil tiogalactósido) durante 3 h.

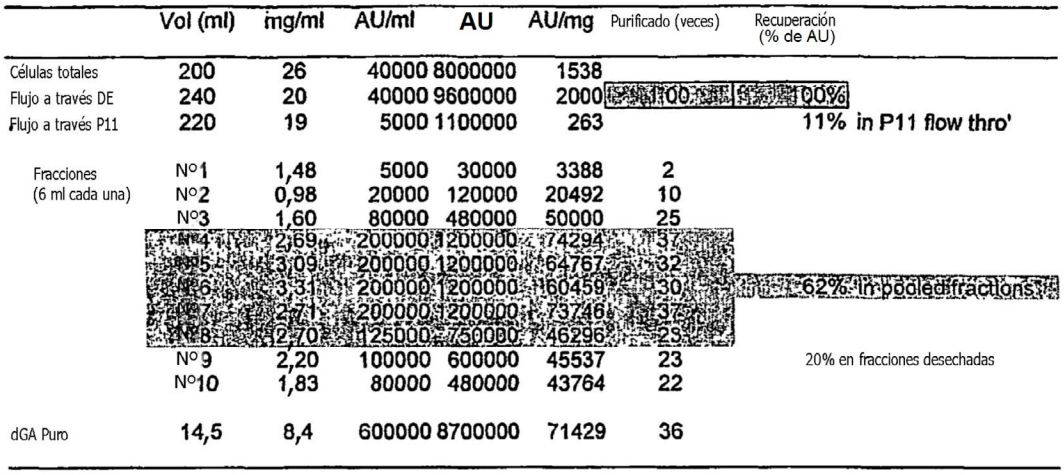
[0266] Se realizó purificación a gran escala (1 litro de cultivo bacteriano) de fragmentos de tau como describen Goedert y Jakes (1990, EMBO J., 9, 4225-4230) con pocas modificaciones. Las células se alteraron por congelación rápida del sedimento celular en nitrógeno líquido. Después, los sedimentos se suspendieron en tampón que contenía PIPES 50 mM, ditiotreitiol (DTT) 1 mM (pH 6,8). Las proteínas termoestables en el sobrenadante se dializaron contra PIPES/DTT, después se aplicaron a una columna que contenía fosfocelulosa equilibrada en el mismo tampón. La proteína tau se eluyó con un gradiente de NaCl (0-0,5 M) en el tampón anterior. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE y por tinción con Coomassie e inmunotransferencia. Las fracciones que contenían tau se agruparon, se dializaron contra MES 25mM, DTT 1 mM (pH 6,25) y se conservaron a -20 ºC a aproximadamente 5 mg/ml. Las concentraciones de proteína se midieron por el método de Lowry (Harrington CR(1990), "Lowry protein assay containing sodium dodecyl sulphate in microtitre plates for protein determinations on fractions from brain tissue", Analytical Biochemistry 186: 285-287).

[0267] La Preparación 2 se diferencia de la Preparación 1 anterior en los siguientes aspectos: (1) La concentración de las células en la etapa de tratamiento con ultrasonidos está 5 veces aumentada. (2) Se incluye una adsorción discontinua proteínas no-tau a DE52. (3) Las proteínas no se someten a tratamiento térmico. (4) La etapa final implica concentración usando polietilenglicol.

[0268] Se cultiva *Escherichia coli* en medio TY (Oxoid) 2x complementado con ampicilina (50 microgramos por ml) hasta fase logarítmica última. Las células de 5 litros de cultivo se recogen por centrifugación y los sedimentos celulares se congelan rápidamente con nitrógeno líquido. Los sedimentos se extraen con PIPES 50 mM (pH 6,8) que contiene EDTA 1 mM, ditiotreitol 1 mM y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 1 mM y las bacterias se lisaron por tratamiento con ultrasonido (2 x 3 min) a 4 ºC. La mezcla se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se hizo girar con un gramo de DE52 Whatman durante 3 h a 4 ºC. La mezcla se separó sobre una columna y el material de flujo de paso que no se unía a DE52 se incubó durante 3 h a 4 ºC, con rotación, con 0,4 g de Whatman P11 (recién regenerado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante). La columna se lavó con tampón de columna (PIPES 50 mM, pH 6,8 que contenía EGTA 1 mM, EDTA 5 mM, $MgCl_2$ 0,2 mM, β-mercaptoetanol 5 mM y PMSF 1 mM). La proteína tau se eluyó gradualmente con un gradiente de 0,1 a 1 M de KCl en un tampón de columna. Las fracciones que contenían tau (determinadas por inmunoensayo) se agruparon y se dializaron contra PIPES 80 mM (pH 6,8) que contenía EGTA 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM y β-mercaptoetanol 5 mM, usando entubación de diálisis con un límite de peso molecular de 1000. El dializado se concentró aplicando polietilenglicol 8000 hacia el exterior de la bolsa durante 2-3 horas. La concentración final de tau varió de 3 a 10 mg por ml.

[0269] En un procesamiento preparativo típico a gran escala, la inmunoreactividad específica de tau se purificó aproximadamente de 30 a 40 veces a partir del material que no se unía a DE52. En el producto final se recuperó aproximadamente un 60% de tau, con un 10% que no se unía a P11 y el resto en fracciones se ignoró de la columna.

La Tabla 3 muestra los detalles de un procesamiento preparativo para dGA. Las “veces de purificación” se expresan como la proporción de inmunoreactividad específica para cada fracción (es decir inmunoreactividad/concentración de proteína) frente a inmunoreactividad específica en el flujo de paso por DE.



[0270] La Figura 33 es una representación gráfica de los datos de la Tabla 3.

La Tabla 4 resume los rendimientos de los procesamientos preparativos típicos para las especies de la proteína tau: dGA, dGAE y hT40.

Preparación Tau	Concentración de proteína (mg/ml) en base a		Immunorreactividad (mAb 7/51; UA/ml)	Rendimiento de proteína (por 10 litros)
	absorbancia a 280 nm	Ensayo de proteínas (ref BSA)		
dGAE (711)	3,3	3,8	300.000	100 mg
dGA (1511)	8,1	8,4	600.000	122 mg
T40 (1311)	3,5	3,1	125.000	120 mg

en base a coeficientes de extinción		absorbancia a 280 nm
BSA (referencia)	10 mg/ml	6,6
Proteína Tau	10 mg/ml	14,7

[0271] Las proteínas se separaron procesando hacia abajo una columna de filtración en gel de sefarosa CL-6B de 50 x 1 cm equilibrada con tampón PBS y se procesaron a temperatura ambiente. Se preparó una curva patrón de peso molecular para la columna procesando hacia abajo de la columna marcadores de peso molecular sobre el rango de 12.400 a 200.000. Para cada proteína patrón, se preparó una curva patrón representando gráficamente el $\log_{10}$ de Mr en Kd frente a Ve/Vo, en la que Ve es el volumen de elución para el patrón y Vo es el volumen inicial para la columna determinado con dextrán azul.

[0272] En un tampón de 0,5 ml, que contenía glicerol al 5%, se cargó T40 o dGAE y se recogieron en fracciones de 1 ml. La presencia de proteínas en las fracciones se determinó espectrofotométricamente por la absorbancia a 280 nm. La presencia de dGAE o de T40 se detectó por ELISA con los anticuerpos monoclonales 7/51 o 499 respectivamente. El ensayo ELISA se realizó en placas de PVC de 96 pocillos de la siguiente manera:

Se incubaron muestras de 50 µl de cada fracción durante 1 h a 37 ºC, la placa se lavó en tween-20 al 0,05% y después se bloquearon los sitios de unión con PBS 200 µl + leche en polvo no grasa al 2% durante 1 h a 37 ºC. La placa se lavó con tween-20 al 0,05%, se incubó con anticuerpo primario 50 µl diluido 1:10 en PBS más leche en polvo no grasa al 2% durante 1 h a 37 ºC. La placa se lavó en tween-20 al 0,05%, se incubó con anticuerpo secundario 50 µl (conjugado de anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón:HRP) diluido en PBS + leche en polvo no grasa al 2% durante 1 h a 37 ºC. La placa se lavó en tween-20 al 0,05%, después se aclaró en agua desionizada, se añadieron 50 µl de sustrato recién preparado (TMB [tetrametilbenzidina] en tampón de acetato de sodio, pH 5,0 con H_2O_2, recién preparado) y durante 2 minutos se leyó la tasa de cambio en DO 650.

[0273] En las Figuras 34 (dGAE) y 35 (hT40) se observa el perfil de elución de dGAE purificada y de T40 purificada. Aunque típicamente ambos fragmentos se procesan a aproximadamente 12 kD y 55 kD respectivamente, aproximadamente el 64% de inmunoreactividad de mAb 7,51 (dGAE) eluye en fracciones correspondientes a especies de tamaño > 15 kD y aproximadamente el 50% de inmunoreactividad de mAb 499 (hT40) eluye en

fracciones correspondientes a especies de tamaño > 60 kD. Por tanto las proteínas tau están presentes, al menos en parte, en forma pre-agregada.

(ii) efecto de inhibidores de agregación tau medido usando diferentes preparaciones de proteína Tau

[0274] Cuando las proteínas dGA y dGAE se prepararon como se ha indicado anteriormente ("Preparación 2"), las propiedades del ensayo de unión tau-tau se modificaron con respecto a las propiedades obtenidas usando el método preparativo descrito en el documento WO96/30766 ("Preparación 1").

[0275] El ensayo se realizó usando placas de PVC de 96 pocillos (Falcon Nº Cat. 353912) y las siguientes etapas:

1. Se incuban 50 µl de dGA (-10 µg/ml) en tampón carbonato, durante 1 h a 37 ºC. (tampón carbonato: bicarbonato carbonato 50 mM, pH 9,6 (Na_2CO_3 1,59 g/l, $NaHCO_3$ 2,93 g/l))

2. Se lava la placa en Tween-20 al 0.05%.

3. Se incuban 200 µl de PBS+Marvel al 2%, durante 1 h a 37 ºC.

4. Se aclara la placa 2X en agua desionizada, después se lava en Tween-20 al 0,05%.

5. Se incuban 50 µl de dGAE (-10 µg/ml) más fármaco en PBS+gelatina de piel de pez al 1%+ Tween-20 al 0,05%, durante 1 h a 37 ºC.

6. Se lava la placa en Tween-20 al 0,05%.

7. Se incuban 50 µl de anticuerpo 423 (dilución 1:10 en PBS+Marvel al 2%), durante 1 h a 37 ºC.

8. Se aclara la placa 2X en agua desionizada, después se lava en Tween-20 al 0,05%.

9. Se incuban 50 µl de anti-ratón conjugado con HRP (dilución 1:1000 en PBS+Tween-20 al 0,05%), durante 1 h a 37 ºC.

10. Se lava la placa en Tween-20 al 0,05%, después se aclara 1X con agua desionizada.

11. En un lector de placa a una DO de 650 leer inmediatamente la tasa inicial durante 2 min 50 µl de solución sustrato.

[0276] (Solución sustrato: acetato de sodio 50 mM, pH 5,0 + TMB (1 ml/100 ml de una solución de 10 mg/ml en DMSO) + H_2O_2 (10 µl/100 ml)).

[0277] Se encontró que, para ejercer efectos inhibidores, los compuestos tionina y cloruro de tolonio requerían mayores concentraciones en la Preparación 2 que en la Preparación 1. Esto se muestra en las Figuras 36 y 37. Adicionalmente, se encontró que el compuesto azul de dimetil metileno (ADMM) tenía una fuerza inhibidora más alta en la Preparación 2 que en la Preparación 1. Esto se muestra en la Figura 38.

[0278] En la proteína Tau preparada por el método de la Preparación 1, pero a la que se había permitido agregar *in vitro* a lo largo del tiempo, pudieron observarse diferencias similares, la interpretación de este efecto es de la siguiente manera. Se necesitaron mayores concentraciones de compuestos tales como tionina y cloruro de tolonio dado que debían conseguirse dos efectos para conseguir inhibición máxima de unión tau-tau:

1. alteración de agregados pre-existentes en la fase acuosa;

2. inhibición de unión de especies en fase acuosa a la fase sólida.

[0279] La mayor fuerza del ADMM en el ensayo de Preparación 2 puede explicarse por la mayor afinidad de unión en el sitio de acción necesaria para ambos efectos inhibidores.

[0280] La proteína tau de longitud completa (hT40), preparada de acuerdo con el protocolo de Preparación 2, demostró actividad de unión tau-tau mínima cuando se usó en la fase acuosa con dGA en la fase sólida. Sin embargo, cuando se usó hT40 en la fase sólida, la unión de dGAE fue similar a la obtenida para la unión de dGAE a dGA en la fase sólida (véase la Figura 39a-c). La interpretación es que en la hT40 los agregados formados en la unión tau-tau en fase acuosa ya se habían producido en, o a través de, dominios necesarios para la interacción de unión con dGA en la fase sólida. Cuando la hT40 se siembra primero en placa en la fase sólida, la unión a PVC despliega los agregados/proteína de tal manera que pone a disposición los sitios de unión tau-tau críticos.

(iii) efecto de inhibidores de agregación medido usando diferentes preparaciones de proteína Tau

[0281] En el formato de ensayo de Preparación 2, los fuertes ligandos del tipo representado por Primulina y Rojo de tiacina no tienen actividad inhibidora sobre la unión tau-tau. Esto se muestra en la Figura 40 (cf. Figura 10). De hecho en este ensayo, estos compuestos potencian la unión tau-tau a concentraciones mayores de 100 μM (es decir proporción molar 100 veces con respecto a la proteína tau).

[0282] El ADMM reduce típicamente la unión tau-tau (con tau presente típicamente a 1 μM) al 23% a concentraciones de ADMM de 5 μM y al 17% a concentraciones de ADMM de 15 μM con respecto a lo observado en ausencia de ADMM.

[0283] Inesperadamente, este efecto inhibidor puede invertirse completamente co-incubando en presencia de concentraciones en aumento de ligandos de alta afinidad representados por Primulina y Rojo de tiacina. Esto se observa en la Figura 41.

[0284] Por lo tanto, los ligandos de tau agregada pueden caracterizarse funcionalmente como compuestos que en sí mismos inhiben la unión tau-tau, pero bloquean los efectos inhibidores de fuertes inhibidores de la unión tau-tau.

[0285] Como puede observarse en la Figura 42, la inhibición de la unión Tau-Tau producida por el ADMM se atenúa progresivamente y se invierte en presencia de exceso molar en aumento de Primulina. Para el Rojo de tiacina puede observarse un efecto similar. Esto indica que estos compuestos reducen el efecto inhibidor máximo del ADMM y por lo tanto actúan como inhibidores no competitivos del ADMM. Una posible explicación podría ser que los ligandos estabilizan los agregados de tau usados en el ensayo, por ejemplo, en regiones fuera del dominio de unión crítico necesarias para la actividad del ADMM y por lo tanto impiden el efecto inhibidor del ADMM sobre la unión Tau-Tau.

[0286] Las Figuras 43 - 45 muestran que para cualquier concentración proporcionada de ADMM, existe una potenciación cuantitativa de unión Tau-Tau en presencia de primulina (43, 44) o Rojo de Tiacina (45) que puede modelarse mediante una ecuación de Michaelis-Menten convencional. Esto implica que el efecto potenciador de la agregación de Tau de estos ligandos es proporcional a la fracción de los sitios de unión a ligando ocupados, supuestamente dentro de los agregados de Tau introducidos en la fase acuosa del ensayo. La Bmax media para ambos ligandos es -1,6. Es decir, el efecto máximo del ligando es producir 1,6 veces la señal de unión Tau-Tau observada en ausencia de cualquier fármaco. La Kd media para este efecto es ~ 15x. Es decir, para cualquier concentración proporcionada de ADMM > 4 μM, puede observarse un 50% de potenciación máxima de unión Tau-Tau cuando el exceso molar de ligando es de 15 veces con respecto a la concentración de ADMM.

Ejemplo 8 - ensayos ejemplo para identificar ligandos de diagnóstico adicionales en base a ligandos proporcionados en el presente documento

[0287] Habiendo definido dos clases de ligandos, como se ha descrito anteriormente, adecuados para marcar los FHP en la EA, pueden desarrollarse ligandos adicionales usando los compuestos/derivados en ensayos de exploración. Además, los métodos de modelación pueden basarse en ligandos ya presentados.

(i) Identificación de nuevos ligandos en el sitio de benzotiazol sulfonado.

[0288] Usando una preparación adecuadamente marcada de un benzotiazol sulfonado conocido, incubado con una preparación de moléculas tau agregadas (por ejemplo tau preagregada en solución o unida a una fase sólida o FHP altamente enriquecidos aislados de cerebro con EA - véase el documento WO96/30766) pueden introducirse compuestos que se supone que son ligandos adecuados y su capacidad para competir con el ligando conocido, de tal manera que se impida la unión dentro de los FHP, puede someterse a ensayo.

(ii) Identificación de nuevos ligandos en el sitio de fenotiazina.

[0289] El ensayo de unión tau-tau descrito en el documento WO 96/30766 puede usarse como una exploración preliminar para identificar posibles inhibidores en el sitio de unión tau-tau. Del mismo modo, podría usarse una preparación de diaminofenotiazinas conocidas, marcada adecuadamente, incubada con una tau agregada, como se ha descrito anteriormente, para explorar otros compuestos que se sospecha que son competidores en este sitio de unión a FHP y por tanto posiblemente ligandos de FHP adecuados.

[0290] La implementación física de ensayos competitivos se conoce bien en la técnica. Esta puede incluir la medición de fluorescencia, radiactividad o cualquier otro sistema indicador adecuado que derive de compuestos similares a benzotiazol sulfonados o compuestos similares a diaminofenotiazina no unidos a los FHP, es decir, aquellos que quedan en solución.

Referencias

[0291]

1 DeToleda-Morrell, L. et al. (1997), Neurobiology of Aging 18, 5, 463-8;
2 De Leon et al. (1997), Neurobiol. Of Aging, 18, 1, 1-11;
3 Mori, E et al. (1997), Am. J. Psychiatry 154:1, p18;
4 Juottonen, K. (1998); J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 65, 322-327;
5 Bobinski, M. et al. (1999), Lancet 353, p.38;
6 Fox, N.C. (1999) Neurol. 52, 1687-9;
7 Jack, C.R. et al. (1997) Neurol. 49: 786-794;
8 Fox, N. et al. (1996), Brain 119, 2001-7;
9 Johnson, K.A. et al. (1998), Neurol. 50, 1563-1571;
10 Perez-Tur, J. et al. (1999), Neurol. 53, 411-3;
11 Lehtovirta, M. et al. (1998) J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 64, 742-6;
12 Nagy, Zs et al. (1999), Dement. Geriatr. Cogn. Disord. 10, 109-114;
13 Ishii, K. et al. (1998), Neurol. 51, 125-130;
14 Imamura, T et al. (1997), Neurosci. Lett. 235, 49-52;
15 Minoshima, S. et al. (1997), Ann. Aurol. 42, 85-94;
16 Ibanez, V. et al. (1998), Neurol. 50, 1585-1593;
17 Wischik, C.W. et al. (2000) "Neurobiology of Alzheimer's Disease", Eds. Dawbarn et al., The Molecular and Cellular Neurobiology Series, Bios Scientific Publishers, Oxford).
18 Carretero, M.T. et al. (1995), Dementia 6, 281-5;
19 Villareal, D.T. et al. (1998), Alzheimer's Dis. Rev. 3, 142-152;
20 Marin, D.B. et al. (1998), Artherosclerosis 140, 173-180;
21 Kuller, L.H. et al. (1998), Stroke 29, 388-398;
22 Vargha-Khadem, F. et al. (1997), Science 277, pág 376;
23 Willingham, D.B. (1997), Neuron 18, 5-8;
24 Lakmache, Y. et al. (1995), PNAS USA 95, 9042-6;
25 Hodges, J.R. et al. (1999), PNAS USA 96, 9444-8;
26 Mena, R. et al. (1995), Acta Neuropathol. 89, 50-6;
27 Mena, R. et al. (1996), Acta Neuropathol. 91, 633-641;
28 (suprimida)
29 Lai, R. et al. (1995) Neurobiol. Aging 16, 3, 433-445;
30 Bondareff, W. et al. (1994) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53, 2, 158-164;
31 Resch, J.F. et al. (1991) Bioorg. Med. Chem. Lett.1, 10, 519-522;
32 Novak, M. et al. (1993), EMBO J. 12, 1, 365-370;
33 Wischik, C.W. et al. (1996), PNAS USA 93, 11213-8;
34 Wischik C.W. et al. (1989), Curr. Opin. Cell Biol. 1, 115-122;
35 documento WO 96/30766;
36 Muller, T. (1992), Acta Anat. 144, 39-44.

REIVINDICACIONES

1. Un ligando capaz de marcar a la proteína tau agregada en filamentos helicoidales pareados (FHP) para su uso en un método *in vivo* para determinar el estadio de degeneración neurofibrilar asociado a una tauopatía en un sujeto que se piensa que padece la enfermedad,
cuyo método comprende las etapas de:

(i) introducir el ligando en el sujeto,
donde el ligando es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y se conjuga, se quela, o se asocia de otra manera, con un grupo químico detectable,
(ii) determinar la presencia y/o la cantidad de ligando unido a la proteína tau extracelular agregada en FHP en el lóbulo temporal medio del cerebro del sujeto,
(iii) correlacionar el resultado de la determinación realizada en (ii) con la extensión de la degeneración neurofibrilar en el sujeto.

2. Un ligando como se reivindica en la reivindicación 1 para su uso en el método *in vivo* de la reivindicación 1 donde la determinación en la etapa (ii) se utiliza para establecer la densidad de unión del ligando.

3. Un ligando como se reivindica en la reivindicación 1 ó 2 para su uso en el método *in vivo* de cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la correlación en la etapa (iii) se realiza mediante referencia a datos históricos.

4. Un ligando como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en el método *in vivo* de cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la tauopatía es la enfermedad de Alzheimer (EA).

5. Un ligando como se reivindica en la reivindicación 4 para su uso en el método *in vivo* de la reivindicación 4 donde la extensión de la degeneración neurofibrilar está relacionada con el estadio neuropatológico de la progresión de la EA de acuerdo con el sistema jerárquico definido mostrado en la Figura 2c.

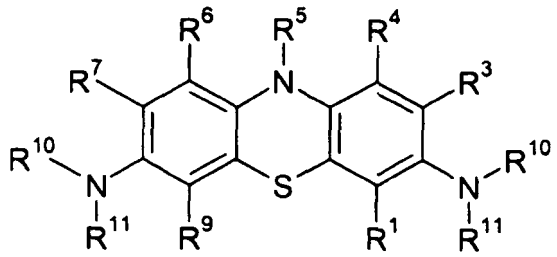
6. Un ligando como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en el método *in vivo* de cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el ligando está marcado para SPECT y no puede captarse intracelularmente.

7. Un ligando como se reivindica en la reivindicación 6 para su uso en el método *in vivo* de la reivindicación 6 donde el ligando comprende un grupo de tecnecio quelante.

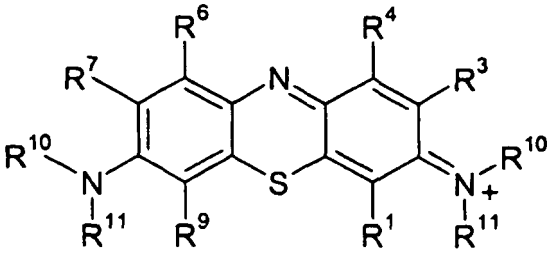
8. Un ligando como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en el método *in vivo* de cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el ligando se marca para tomografía por emisión de positrones (PET).

9. Un ligado como se reivindica en la reivindicación 8 para su uso en el método *in vivo* de la reivindicación 8 donde el ligando comprende un carbono emisor de positrones, opcionalmente incorporado en un grupo metilo presente en el ligando.

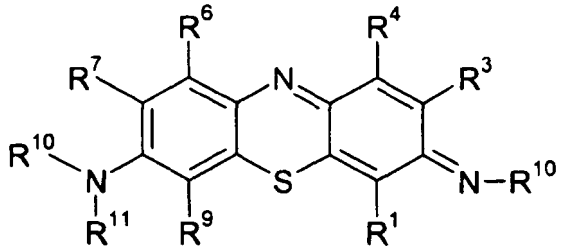
10. Un ligando de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en un procedimiento *in vivo* de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el ligando es un compuesto de una de las siguientes fórmulas:



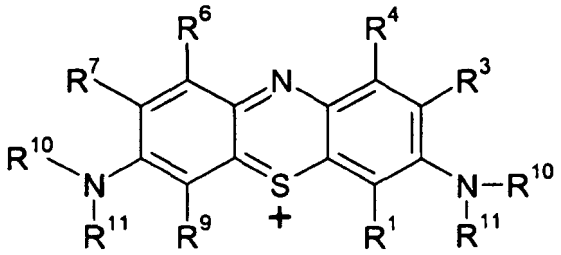
(I)



(II)



(III)



(IV)

donde:

cada uno de R_1, R_3, R_4, R_6, R_7 y R_9 es independientemente hidrógeno, halógeno, hidroxi, carboxi, alquilo sustituido o sin sustituir, haloalquilo o alcoxi;
R_5 es independientemente hidrógeno, hidroxi, carboxi, alquilo sustituido o sin sustituir, haloalquilo o alcoxi;
R_{10} y R_{11} se seleccionan independientemente entre hidrógeno, hidroxi, carboxi, alquilo sustituido o sin sustituir, haloalquilo o alcoxi;
o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

11. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 10 para uso en un procedimiento *in vivo* de cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde:

cada uno de R_1, R_3, R_4, R_6, R_7 y R_9 es independientemente hidrógeno, halógeno, hidroxi, carboxi, alquilo C_{1-6} sustituido o sin sustituir, haloalquilo C_{1-4} o alcoxi C_{1-6};
R_5 es independientemente hidrógeno, hidroxi, carboxi, alquilo C_{1-6} sustituido o sin sustituir, haloalquilo C_{1-4} o alcoxi C_{1-6};
R_{10} y R_{11} se seleccionan independientemente entre hidrógeno, hidroxi, carboxi, alquilo C_{1-6} sustituido o sin sustituir, haloalquilo C_{1-4} o alcoxi C_{1-6}.

12. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 11 para su uso un procedimiento *in vivo* de cualquiera de las

reivindicaciones anteriores donde dicho alquilo C_{1-6} se selecciona entre: metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, isopentilo, terc-pentilo, hexilo e isohexilo.

13. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 11 o reivindicación 12 para uso en un procedimiento *in vivo* de cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde los sustituyentes de dicho alquilo C_{1-6} sustituido se seleccionan entre: mercapto, tioéter, nitro, amino, ariloxi, halógeno, hidroxilo, carbonilo, arilo C_{5-20}, cicloalquilo C_{1-6} y heterociclilo C_{3-2} distinto de arilo.

14. Un ligando de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 para uso en un procedimiento *in vivo* de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde dicho haloalquilo C_{1-4} se selecciona entre: clorometilo, 2-brometilo, 1-cloroisopropilo, 3-fluoropropilo, 2,3-dibromobutilo, 3-cloroisobutilo, yodo-t-butilo y trifluorometilo.

15. Un ligando de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14 para uso en un procedimiento *in vivo* de cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el ligando es una sal de adición de ácido formada entre un compuesto descrito en dichas reivindicaciones y un ácido.

16. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 15 para uso en un procedimiento *in vivo* de cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el ácido es un ácido inorgánico o un ácido orgánico.

17. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 16 para uso en un procedimiento *in vivo* de cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el ligando es una sal cloruro.

18. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 16 para uso en un procedimiento *in vivo* de cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde dicho ácido orgánico se selecciona entre: ácido acético, ácido cítrico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido metanosulfónico y ácido p-toluenosulfónico.

19. Un ligando de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18 para uso en un procedimiento *in vivo* de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde:

R_1, R_3, R_4, R_6, R_7 y R_9 son independientemente -H, $-CH_3$, $-C_2H_5$ o $-C_3H_7$;
R_{10} y R_{11} son independientemente -H, $-CH_3$, $-C_2H_5$ o $-C_3H_7$;
R_5 es independientemente -H, $-CH_3$, $-C_2H_5$ o $-C_3H_7$.

20. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 19 para su uso en un procedimiento *in vivo* de cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el ligando se selecciona entre el grupo que consiste en: cloruro de tolonio, tionina, Azur A, Azur B, Azul de 1,9-Demetil-Metileno, Azul de Metileno.

21. Un ligando de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 20 para uso en un procedimiento *in vivo* de cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el ligando comprende un carbono emisor de positrones.

22. Un ligando como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en un método *in vivo* de cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde (ii) comprende además la etapa de determinar adicionalmente la presencia y/o la cantidad de un ligando unido a tau agregada intracelular en una estructura neocortical del cerebro del sujeto.

23. Un ligando como se reivindica en la reivindicación 22 para su uso en un método *in vivo* de la reivindicación 22 donde el ligando usado para unirse a tau intracelular agregada en FHP en el lóbulo temporal medio y el ligando usado para unirse a tau intracelular agregada en FHP en la estructura neocortical del cerebro están marcados de manera distinta.

24. Un ligando, como se reivindica en la reivindicación 22 ó 23, para su uso en el método *in vivo* de las reivindicaciones 22 ó 23 en el que el ligando usado para unirse a tau intracelular agregada es el ligando descrito en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 21.

25. Un ligando como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en un método *in vivo* de cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el ligando se une a tau agregada en FHP preferentemente con respecto a sitios de unión competitivos presentes en la región relevante del cerebro.

26. Un ligando como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en un método *in vivo* de cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde las etapas (i) y/o (ii) del ligando se realizan conjuntamente con la etapa adicional de introducir en el sujeto otro ligando de bloqueo que marca los sitios de unión competitivos presentes en la región relevante del cerebro preferentemente con respecto al ligando usado para unirse a tau agregada en FHP.

27. Un ligando como se reivindica en la reivindicación 26 para su uso en el método *in vivo* de la reivindicación 26

donde el ligando de bloqueo es [^{18}F] FDDNP.

28. Un ligando como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 para su uso en el método *in vivo* de las reivindicaciones 1 a 25 donde dicho uso es para el diagnóstico o el pronóstico de una tauopatía en un sujeto que se piensa que padece dicha enfermedad.

29. Un ligando como se reivindica en la reivindicación 28 para su uso en el método *in vivo* de la reivindicación 28 donde la tauopatía es la enfermedad de Alzheimer.

30. Un ligando como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 para su uso en el método *in vivo* de las reivindicaciones 1 a 25 donde dicho uso es para determinar la eficacia de un tratamiento de un sujeto con un inhibidor de agregación tau-tau para inhibir la degeneración neurofibrilar en ese sujeto.

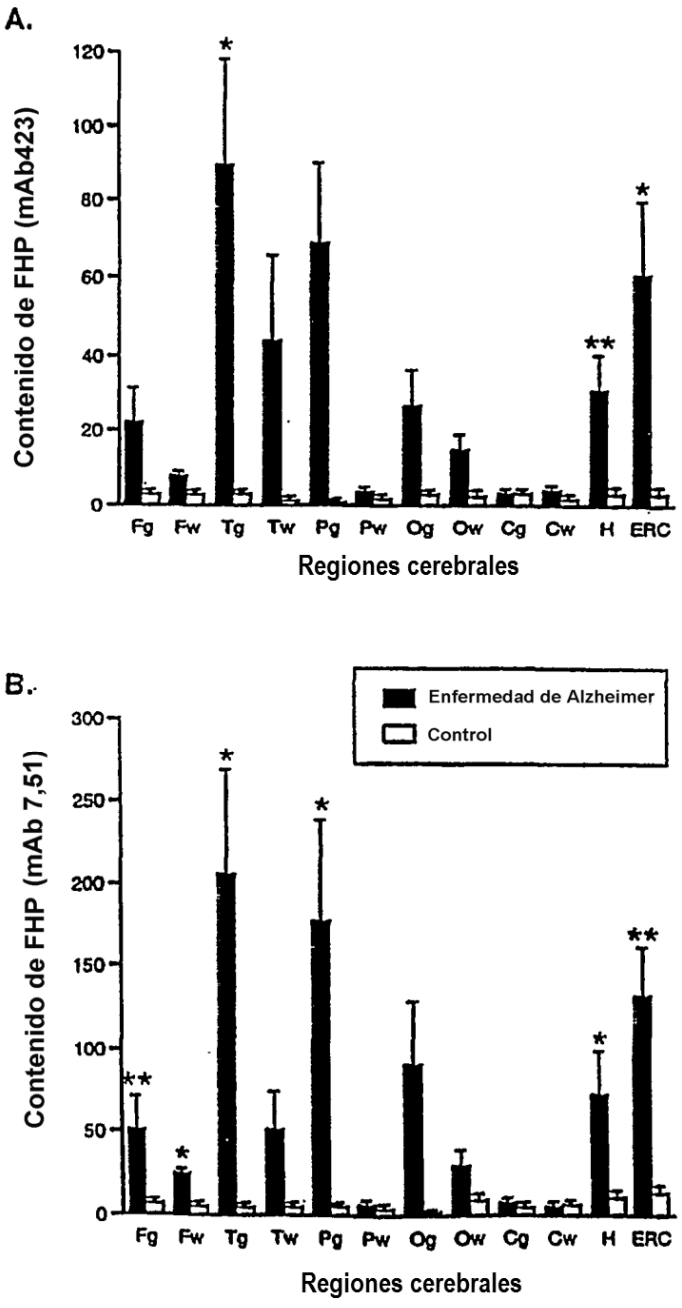

A.
Contenido de FHP (mAb423)
120
100
80
60
40
20
0
Fg Fw Tg Tw Pg Pw Og Ow Cg Cw H ERC
Regiones cerebrales
B.
Enfermedad de Alzheimer
Control
Contenido de FHP (mAb 7,51)
300
250
200
150
100
50
0
Fg Fw Tg Tw Pg Pw Og Ow Cg Cw H ERC
Regiones cerebrales

Figura 1

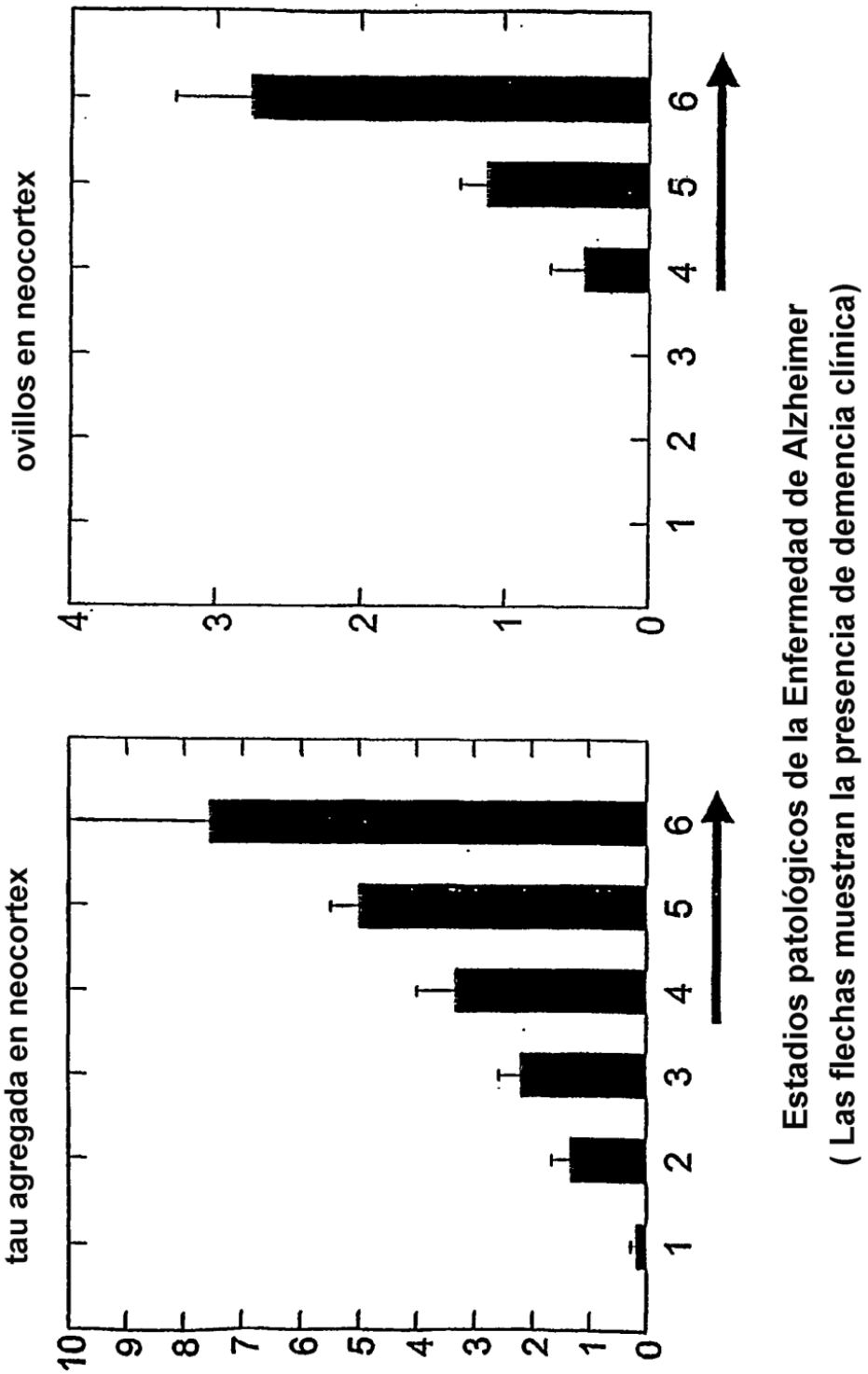

ovillos en neocortex
tau agregada en neocortex
Estadios patológicos de la Enfermedad de Alzheimer
(Las flechas muestran la presencia de demencia clínica)

Figura 2a

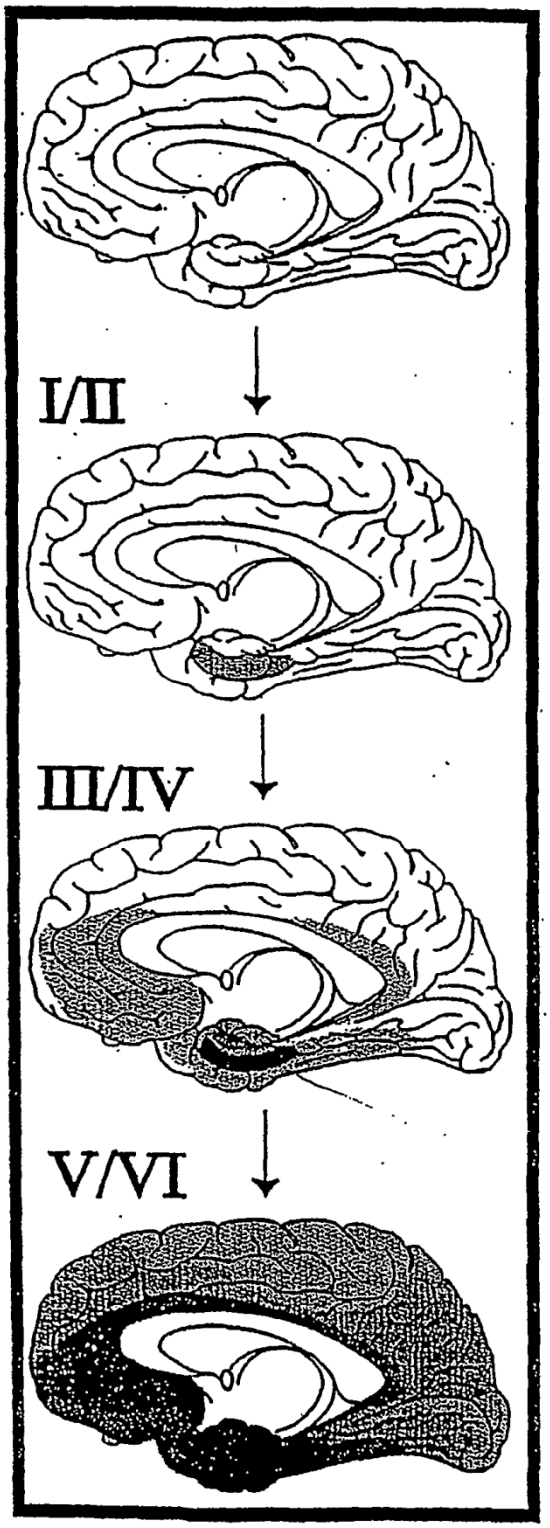


Figura 2b

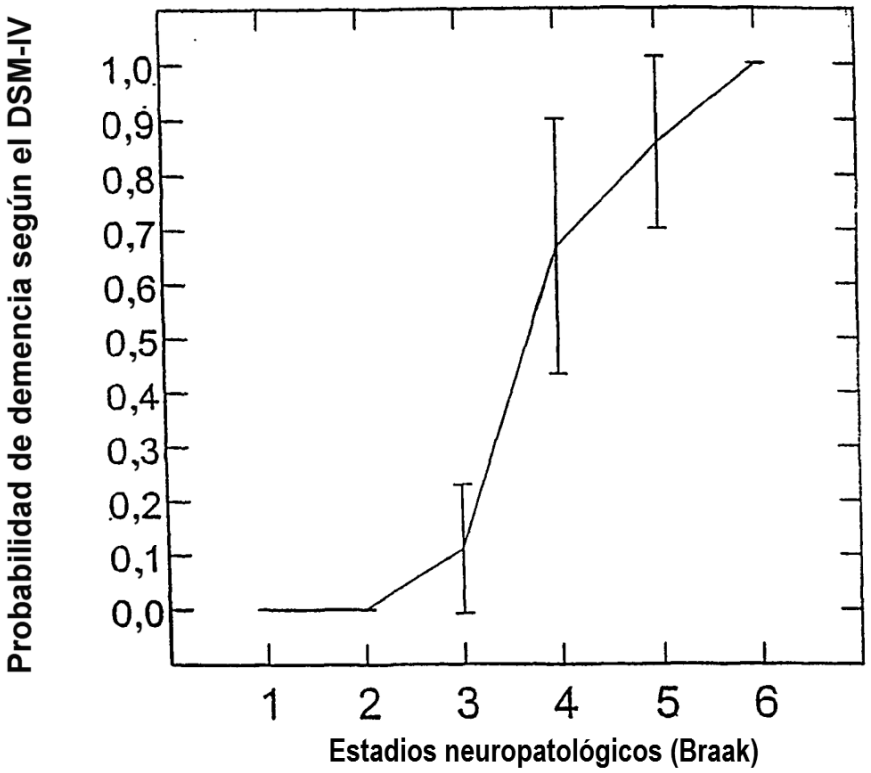

Probabilidad de demencia según el DSM-IV
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
1
2
3
4
5
6
Estadios neuropatológicos (Braak)

Figura 2c

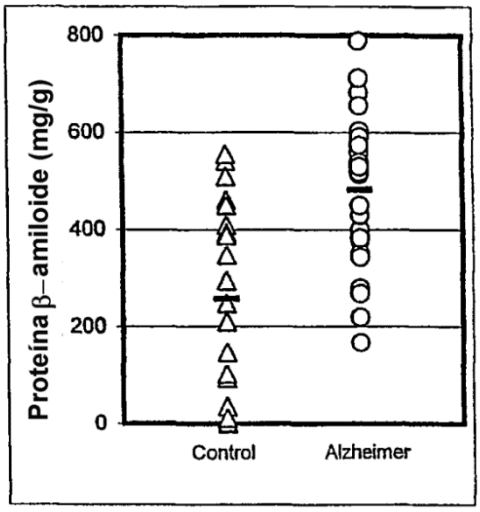
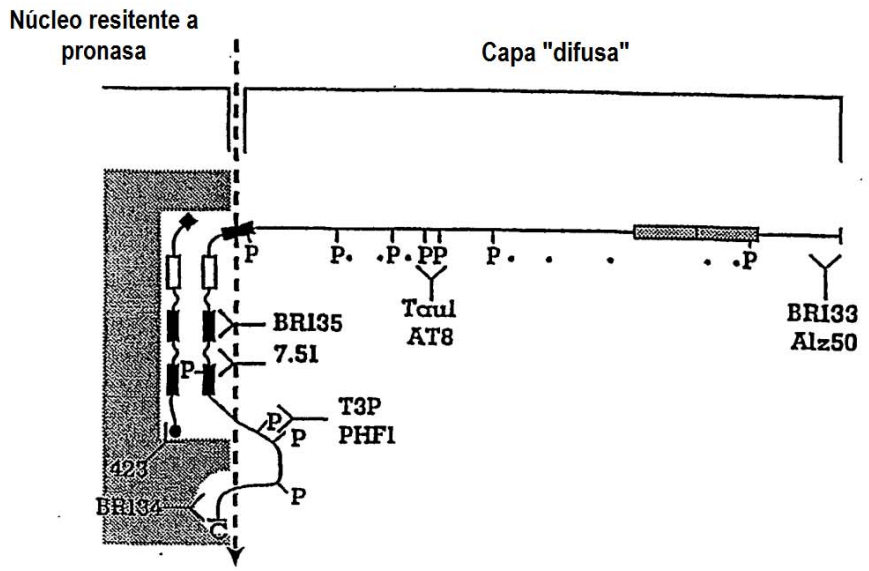


Figura 2d



Anticuerpo	Extracelular Estadio 3	Intra-/extra-celular Estadio 2	Intracelular Estadio 1
BR 133	-	-	+++
mAb 18.8	-	-	+++
BR 134	+	++	+++
mAb 11.57	+/-	++	+++
mAb 25.6E	+/-	++	+++
BR 135	+++	+++	+++
mAb 423	+++	+++	+

Figura 3

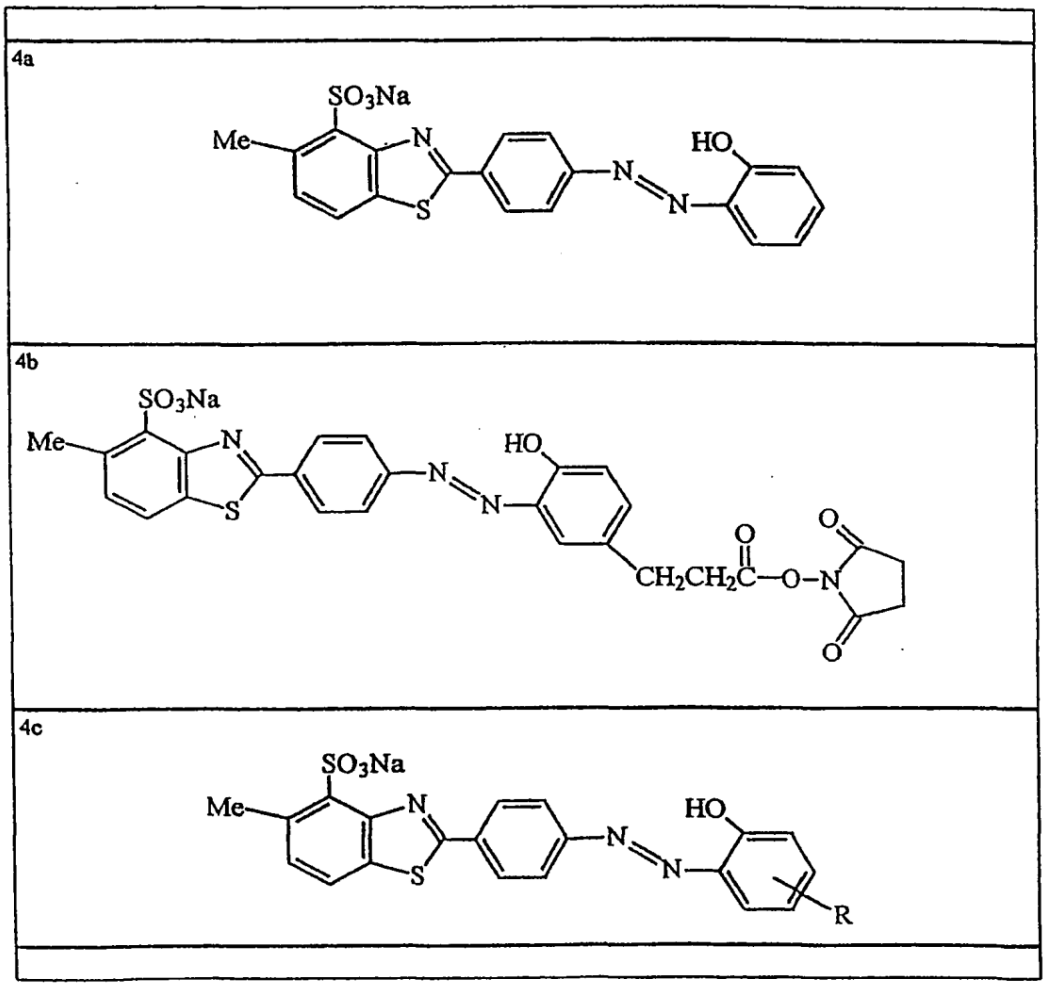

4a
SO3Na
Me
N
S
N
N
HO
4b
SO3Na
Me
N
S
N
N
HO
CH2CH2C
O
O
O
O
N
4c
SO3Na
Me
N
S
N
N
HO
R

Figura 4

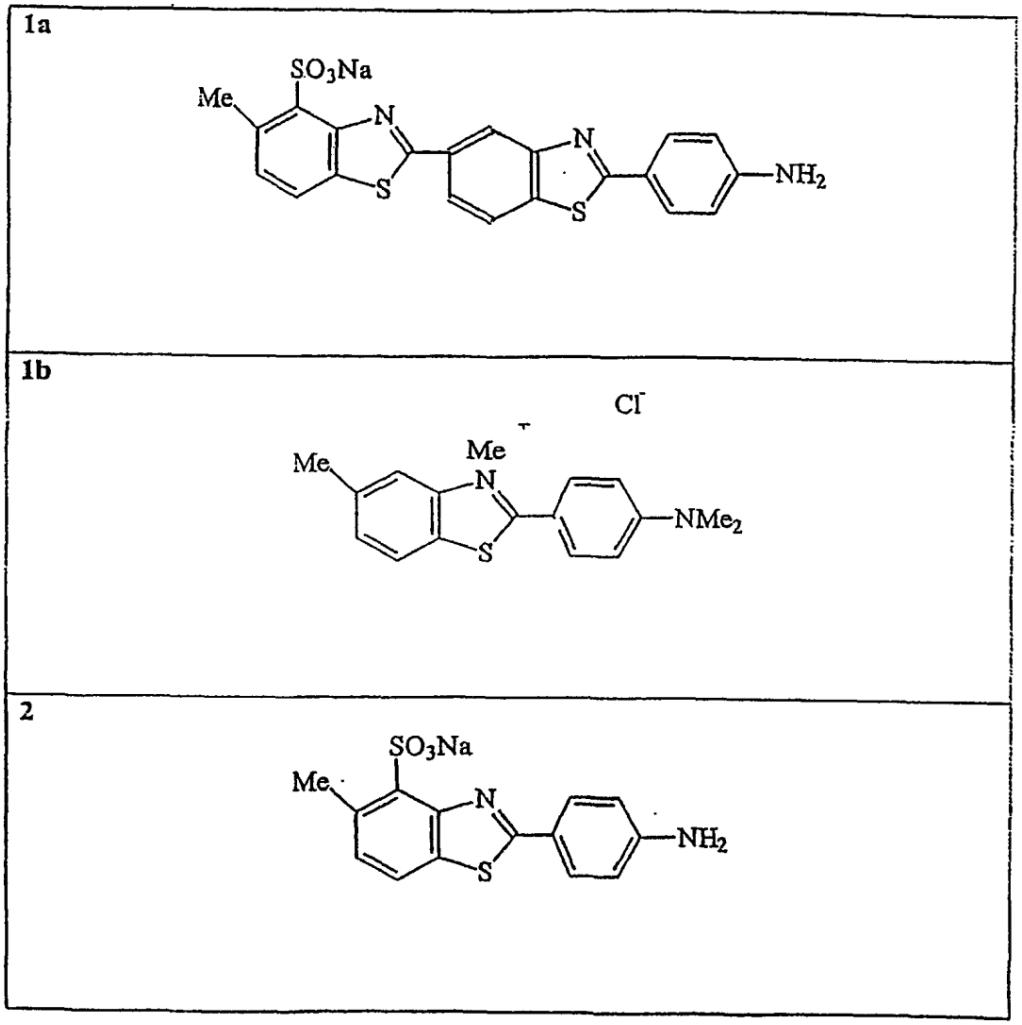


Figura 5

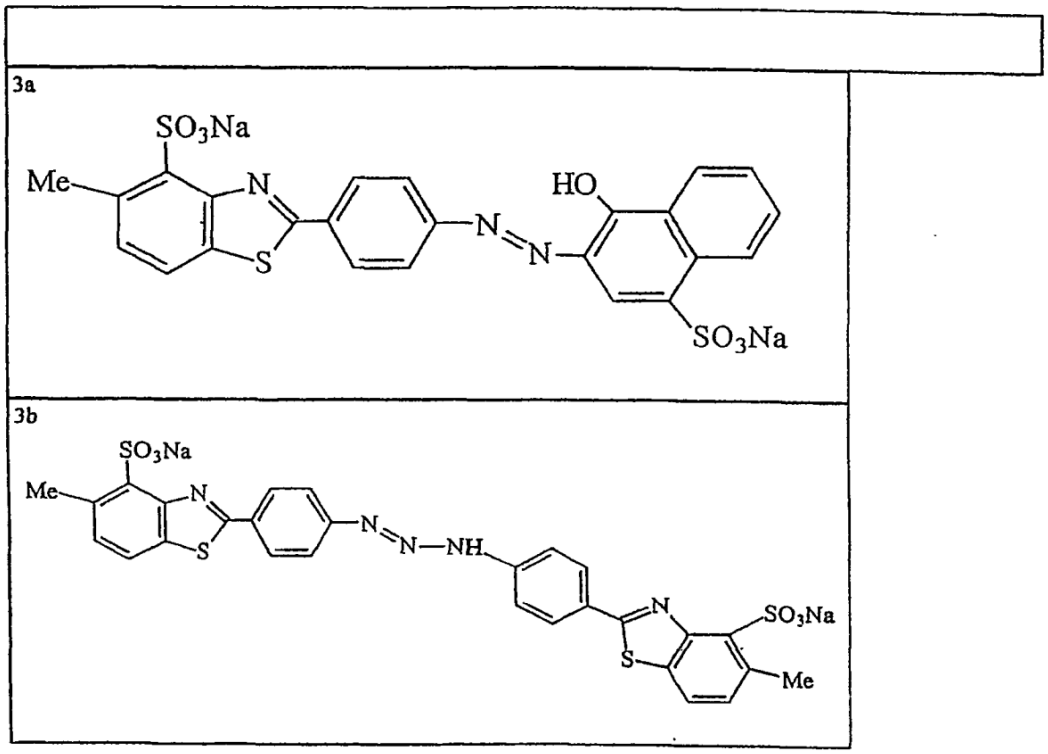
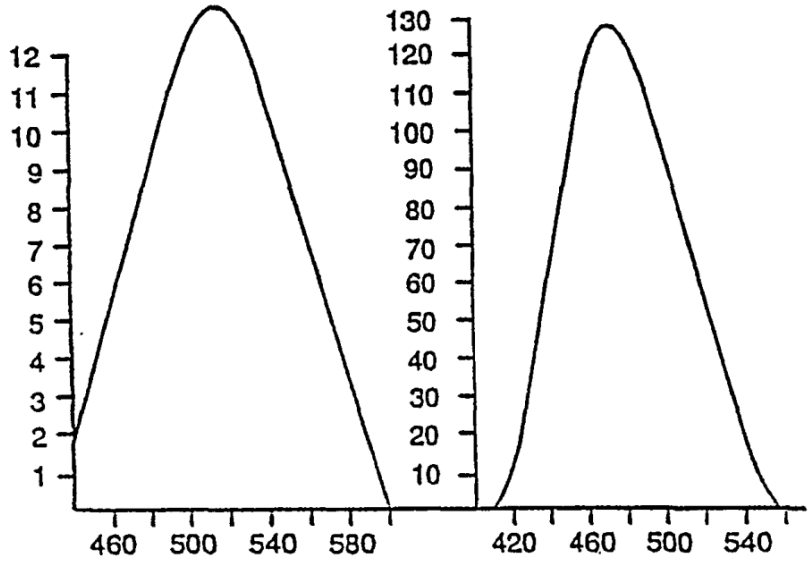


Figura 5 continuación

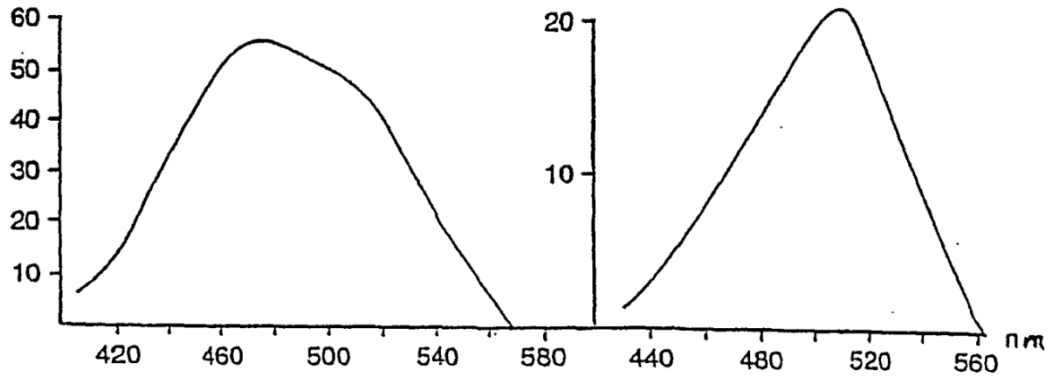


c14537 (0,00001%)

if II +c14537 (0,00001%)

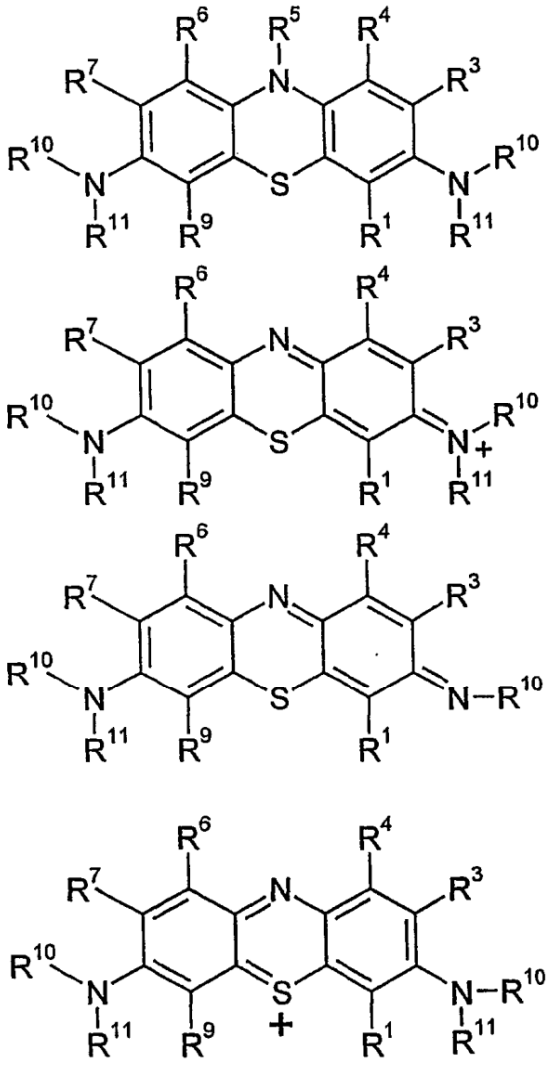
(c14537=primulina)

Figura 6



(c14537=primulina)

Figura 7



(I)

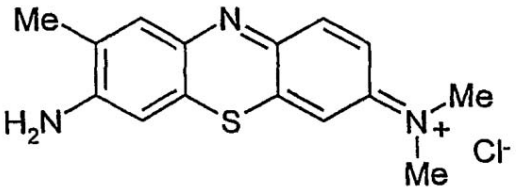
(II)

(III)

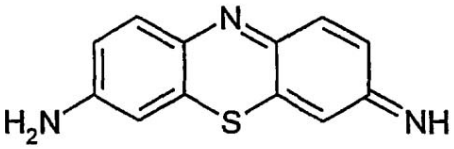
(IV)

Figura 8a

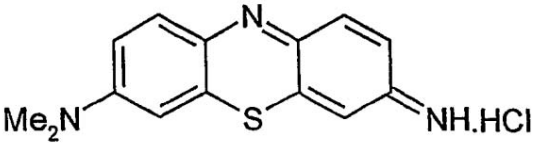
Diamino fenotiazinas con diversos grupo metilo



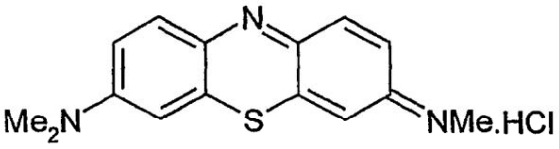
Cloruro de Tolonio



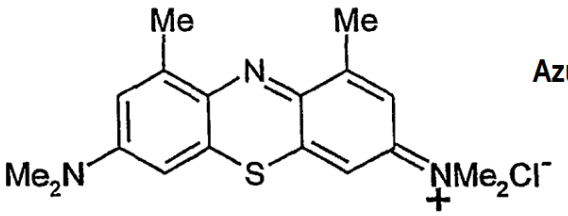
Tionina



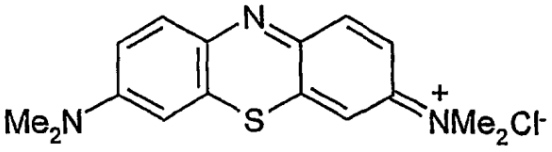
Azur A



Azur B

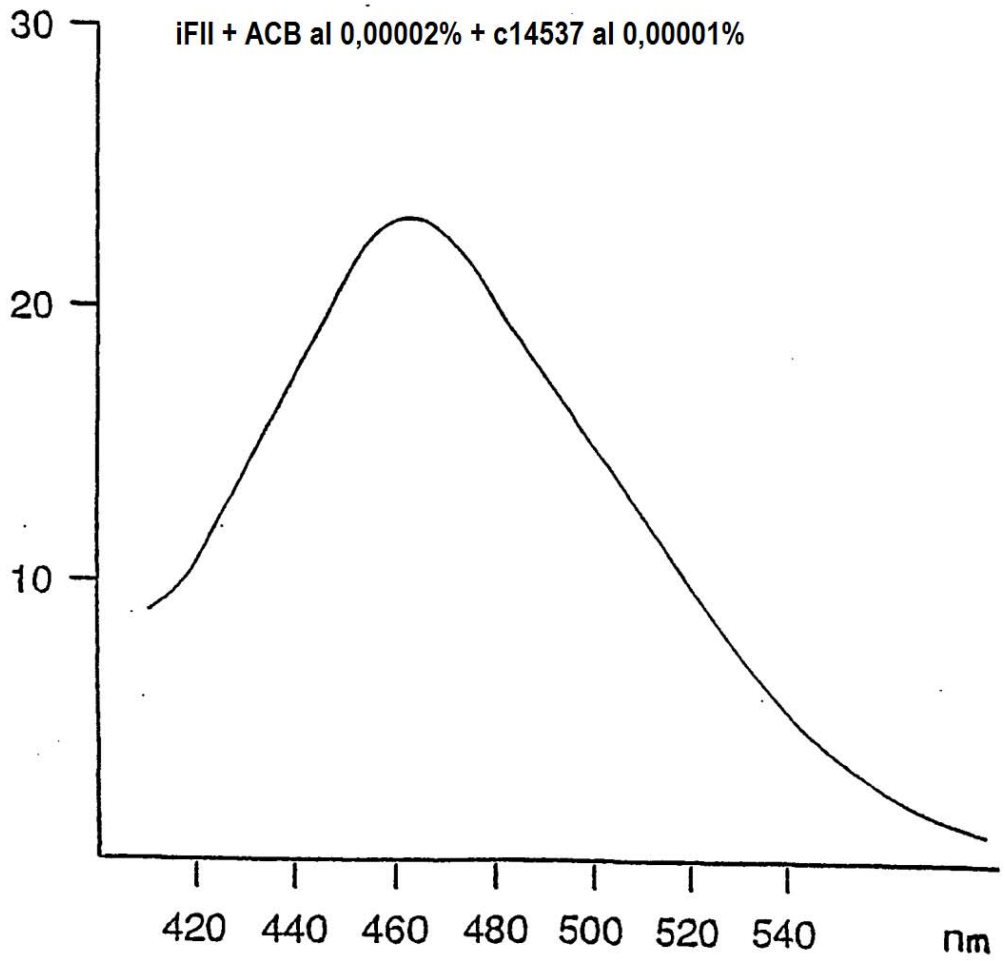


Azul 1,9-dimetil-metileno



Azul de metileno

Figura 8b



(ACB= Azul alcián, c14537= primulina)

Figura 9

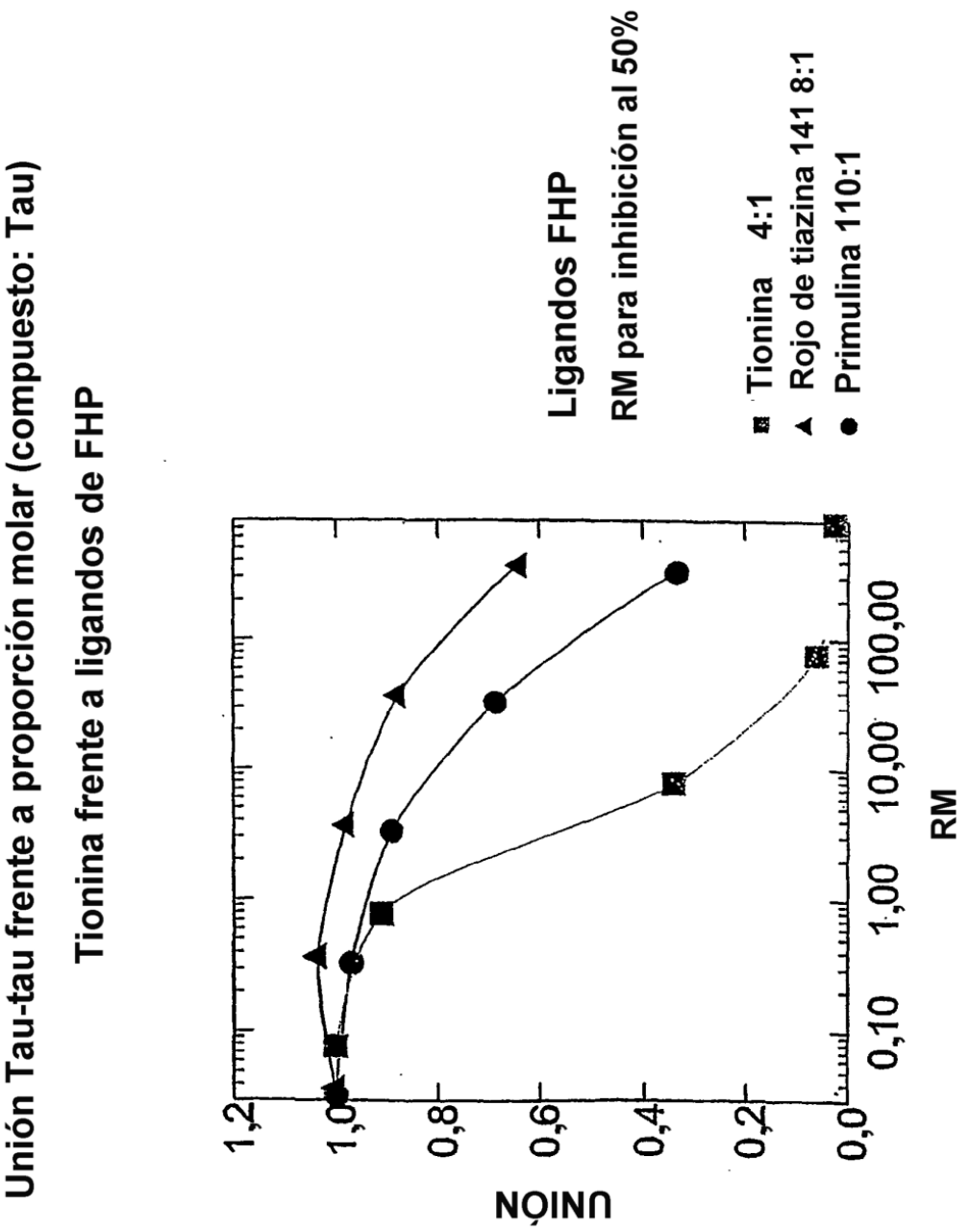

Unión Tau-tau frente a proporción molar (compuesto: Tau)
Tionina frente a ligandos de FHP
Ligandos FHP
RM para inhibición al 50%
Tionina 4:1
Rojo de tiazina 141 8:1
Primulina 110:1
UNIÓN
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0,10
1,00
10,00
100,00
RM

Figura 10

Síntesis de azul de metileno marcado con [^{11}C]

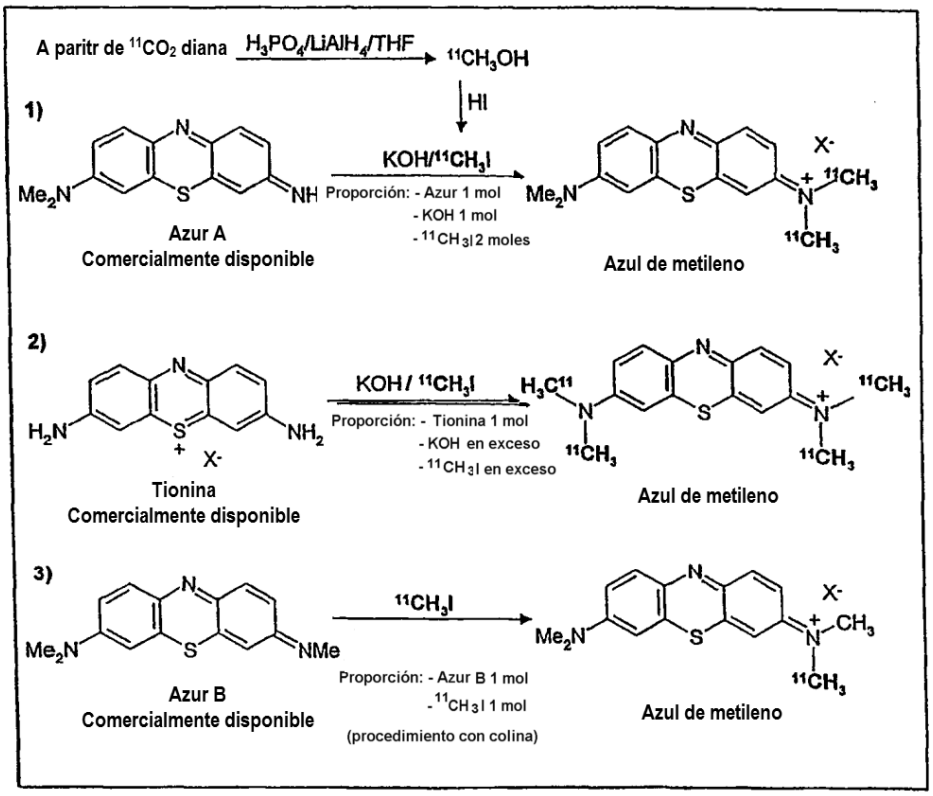


Figura 11a

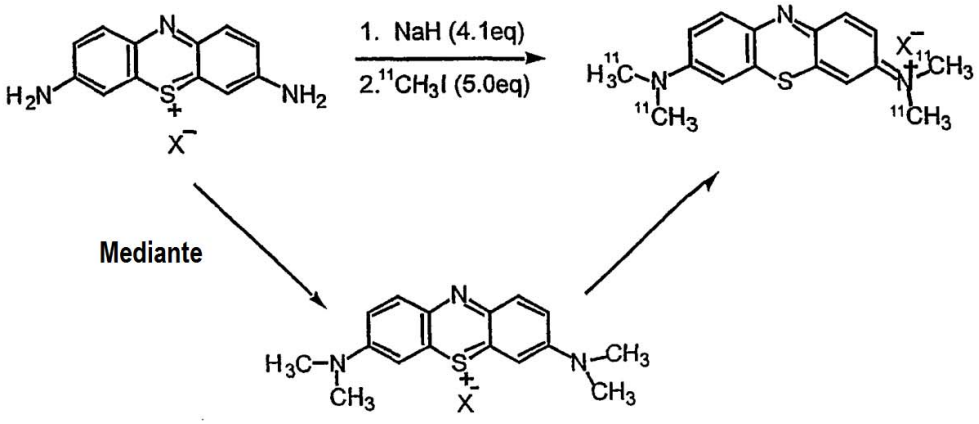


Figura 11b

Síntesis de Azur B marcado con [^{11}C]

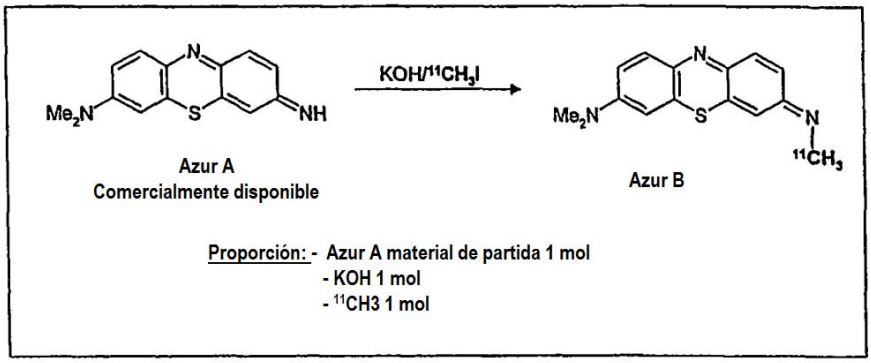


Figura 12

Síntesis de un derivado marcado con [^{18}F]

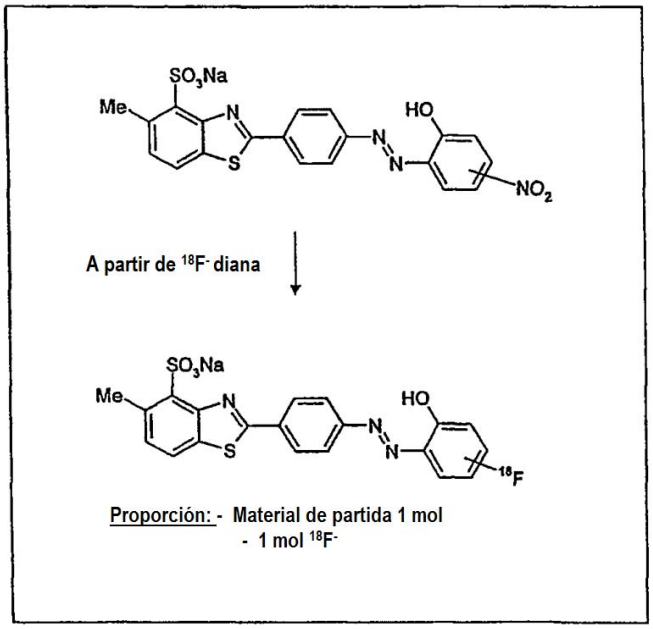
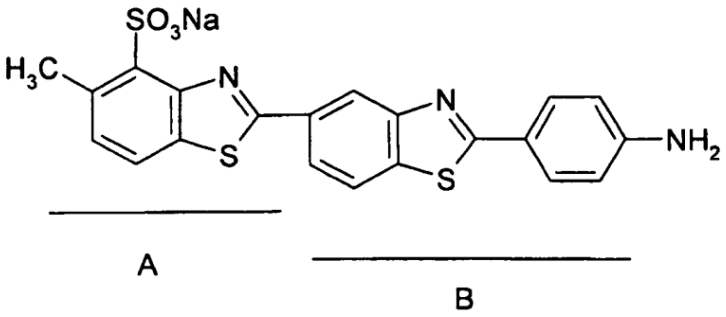
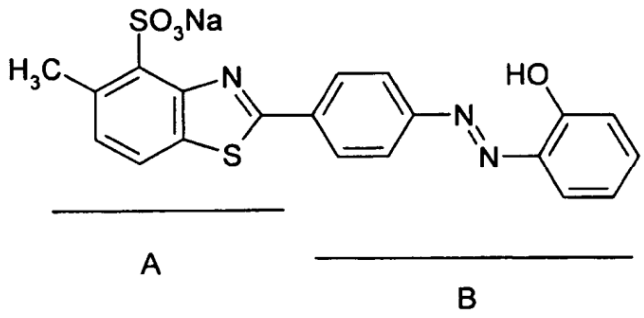


Figura 13

a)



b)



c)

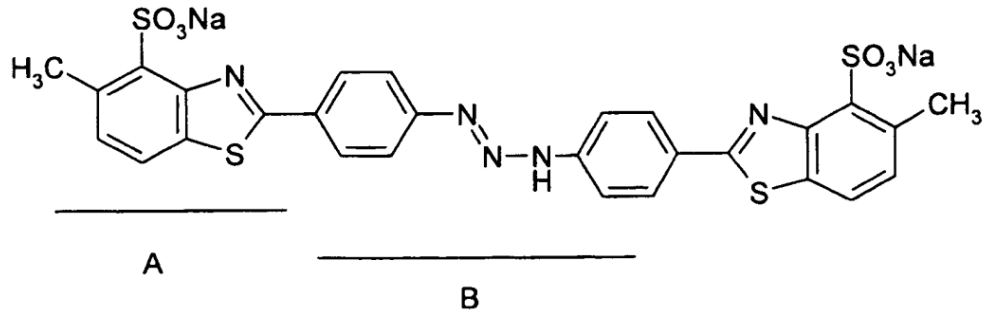


Figura 14

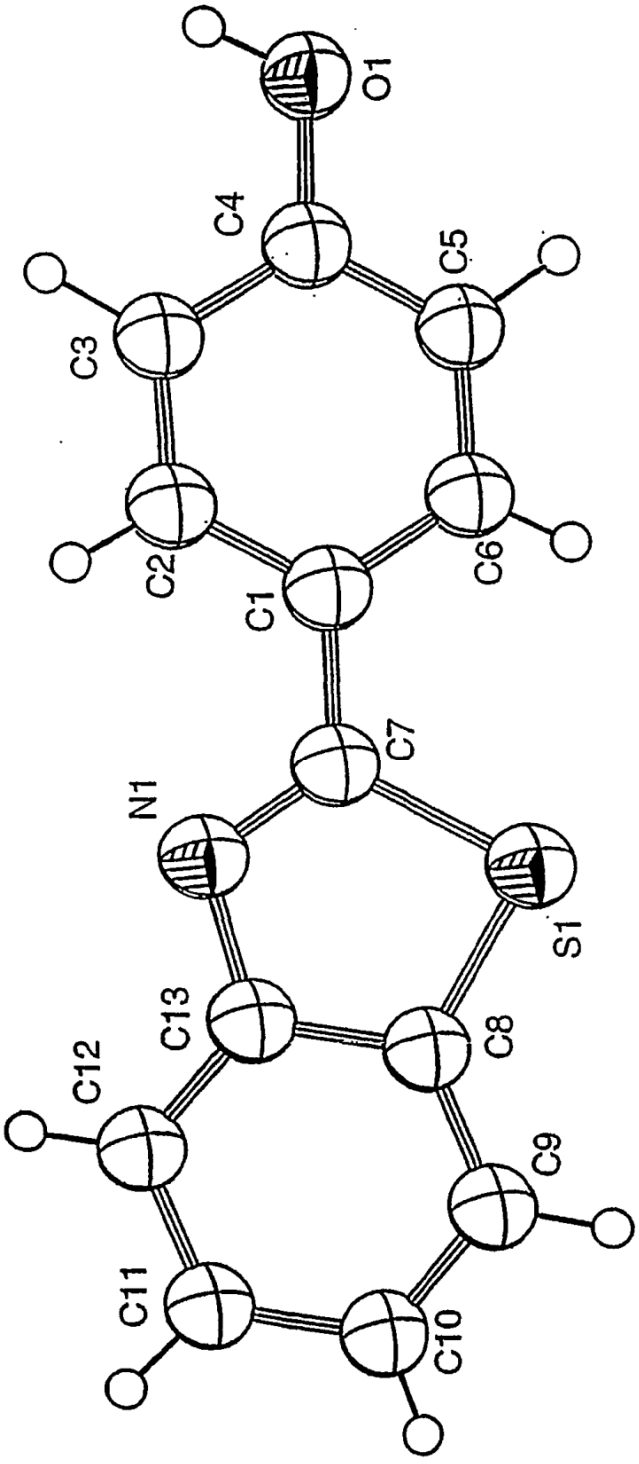


Figura 15

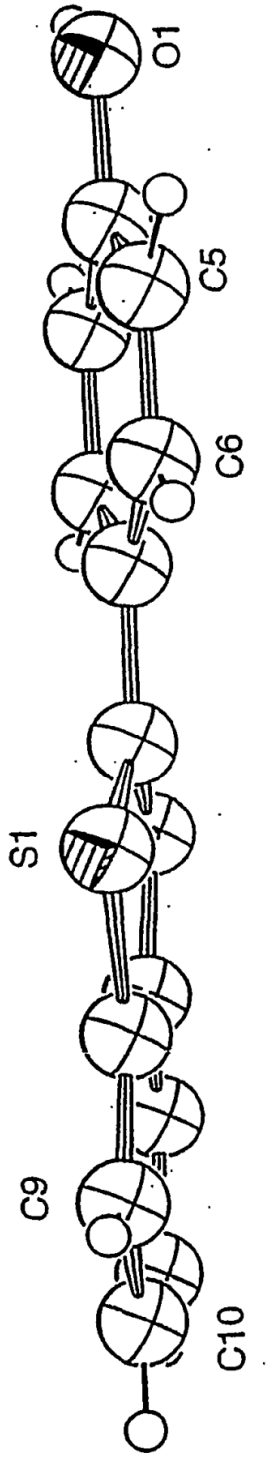


Figura 16

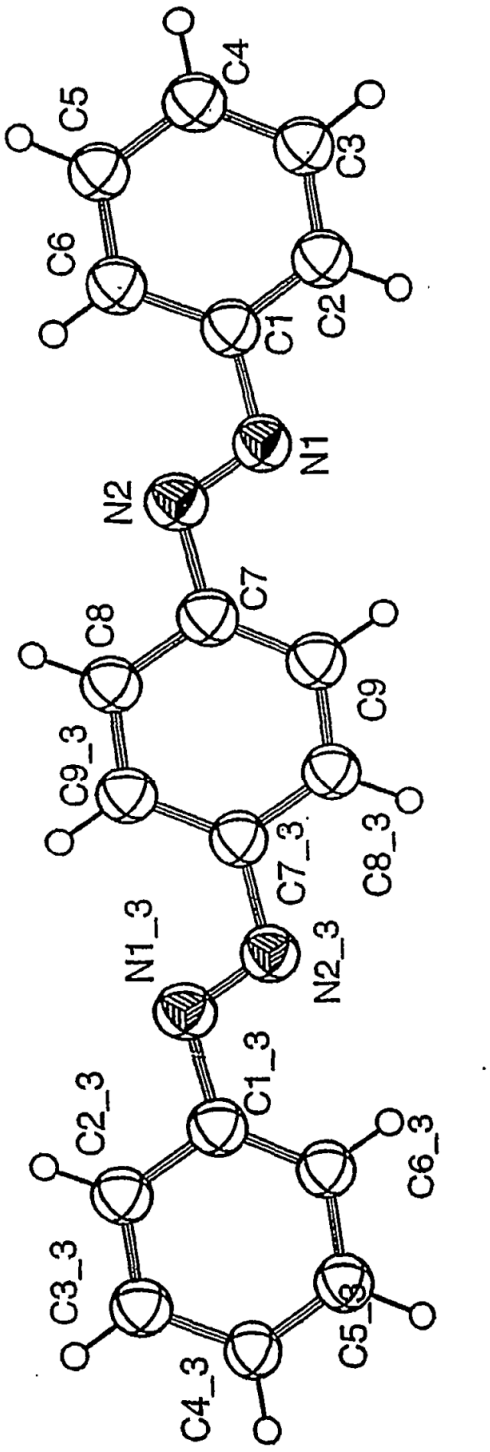

C4
C5
C3
C6
C2
C1
N1
N2
C7
C8
C9
C9_3
C7_3
C8_3
N1_3
N2_3
C1_3
C2_3
C6_3
C3_3
C5_3
C4_3

Figura 17

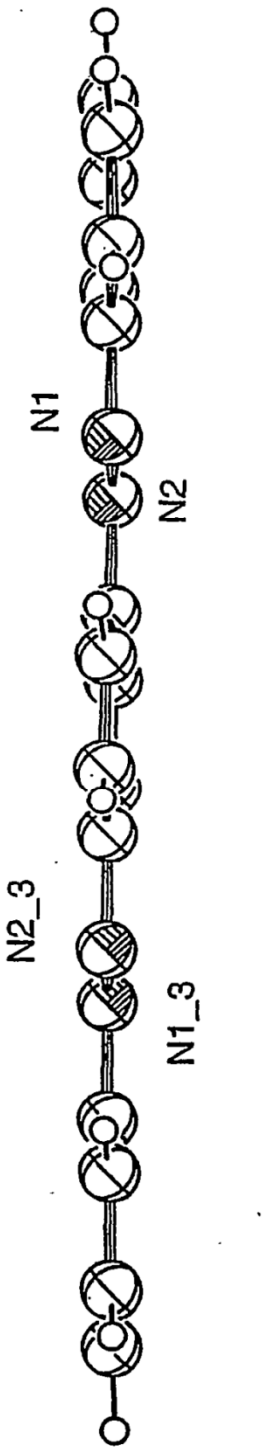


Figura 18

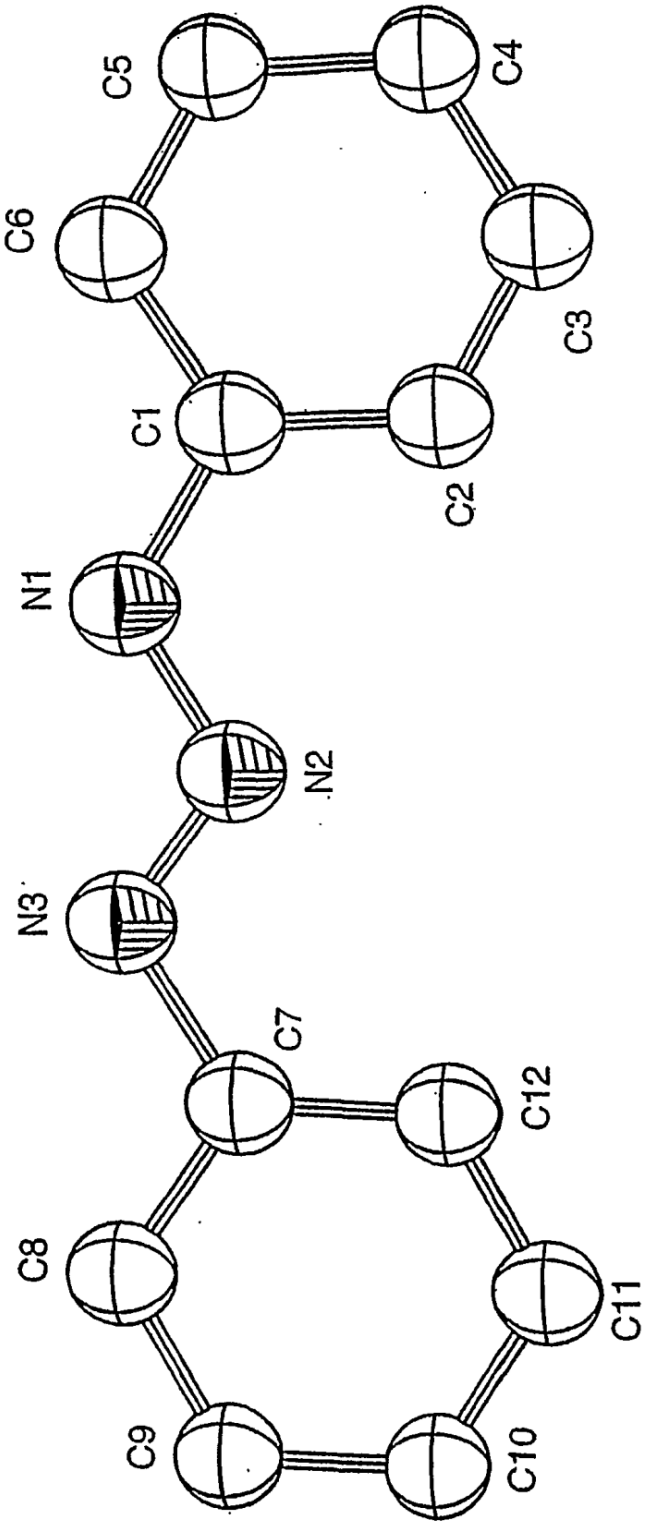


Figura 19

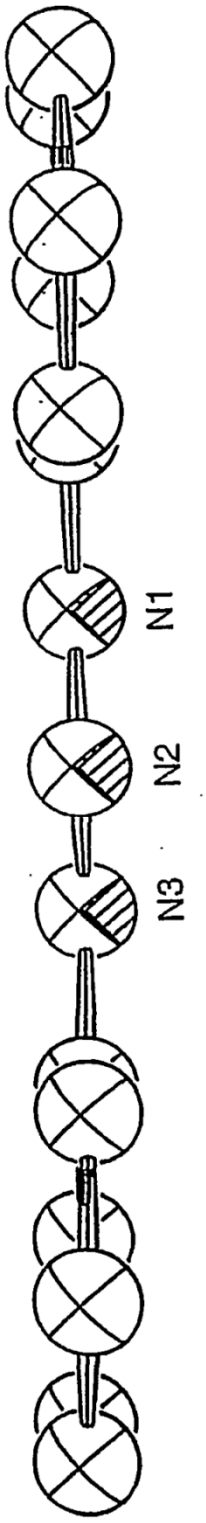


Figura 20

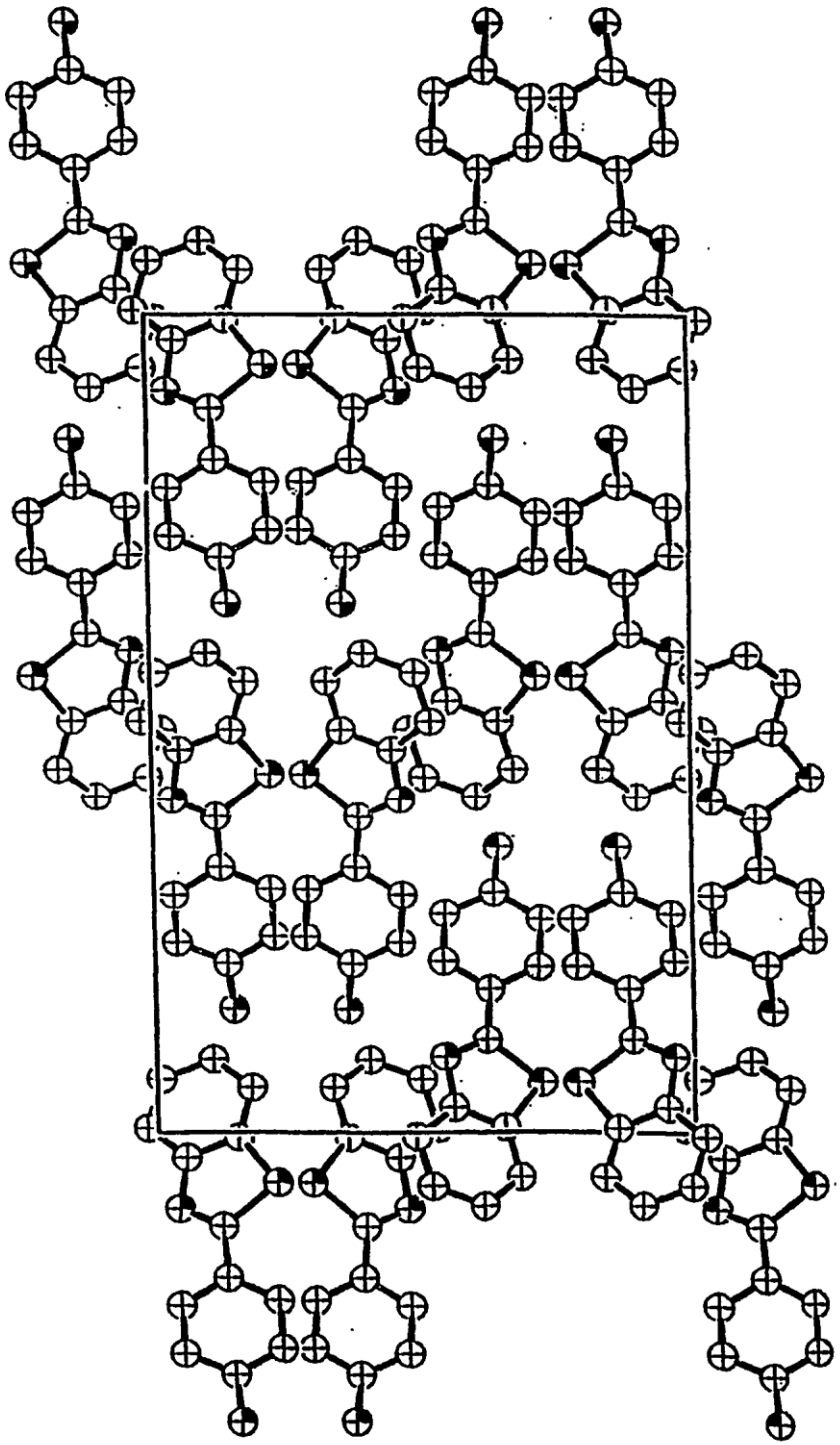


Figura 21

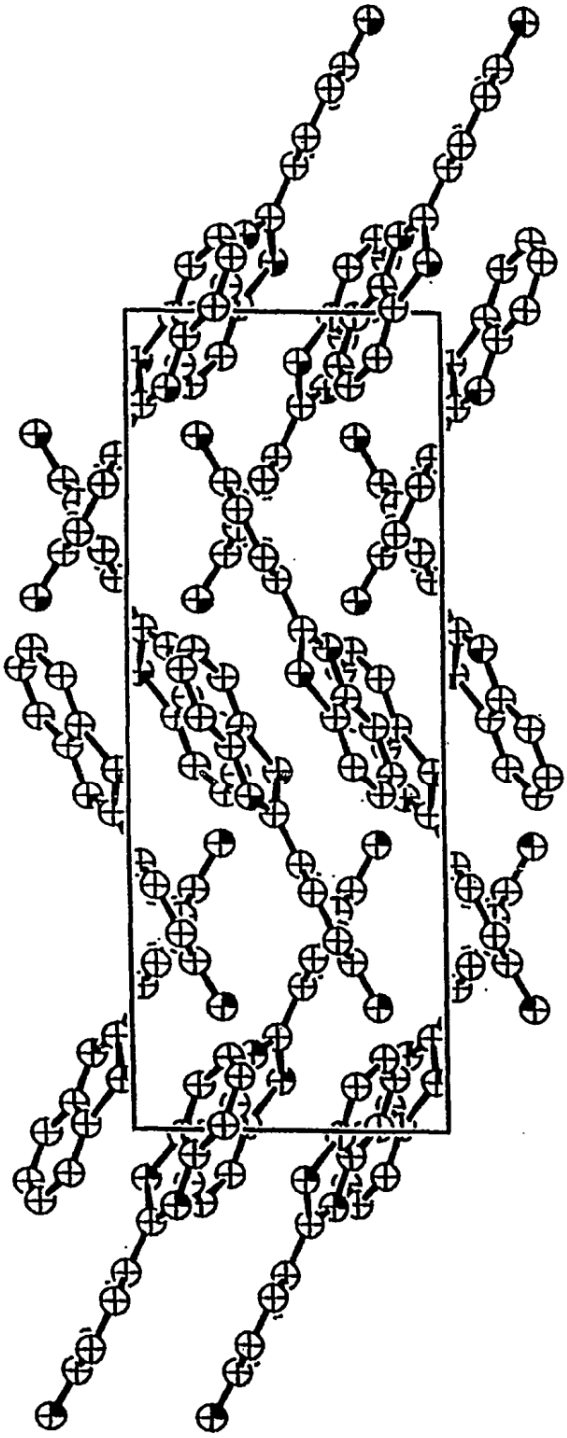


Figura 22

Comparación de dimensiones de moléculas activas e inactivas sometidas a ensayo (máxima, media, mínima)

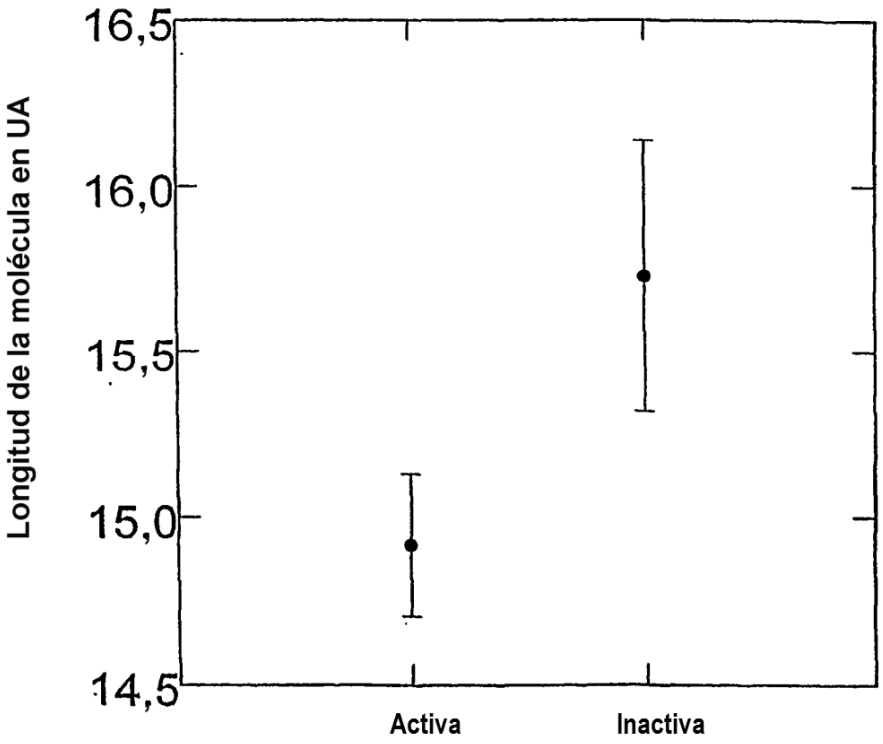


Figura 23

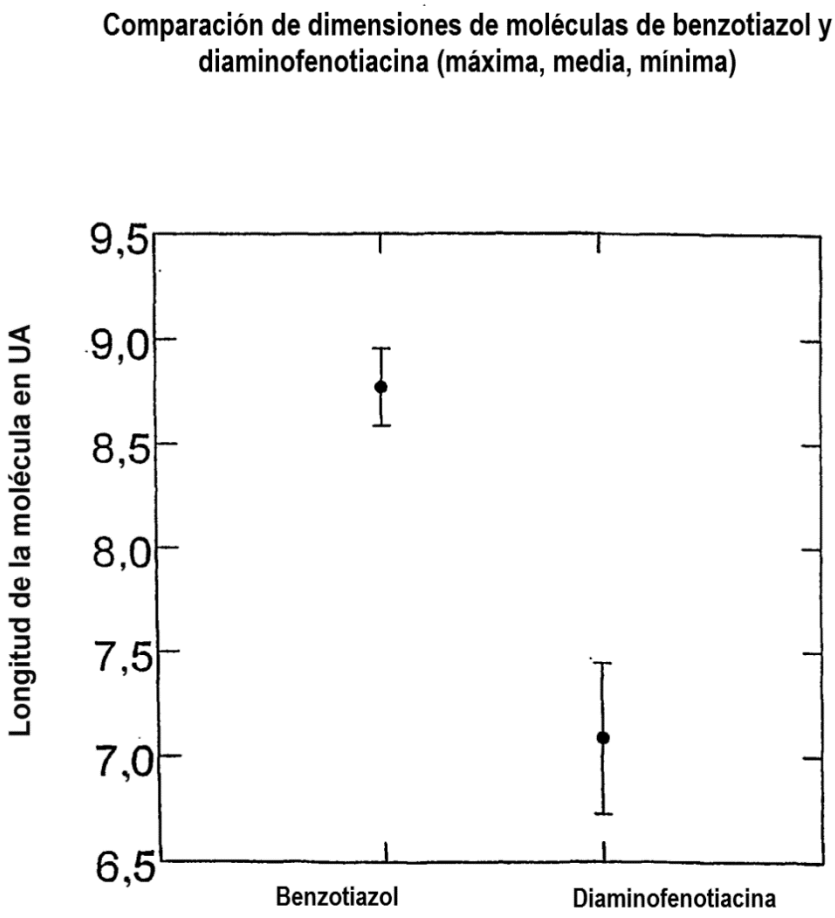

Comparación de dimensiones de moléculas de benzotiazol y diaminofenotiacina (máxima, media, mínima)
Longitud de la molécula en UA
9,5
9,0
8,5
8,0
7,5
7,0
6,5
Benzotiazol
Diaminofenotiacina

Figura 24

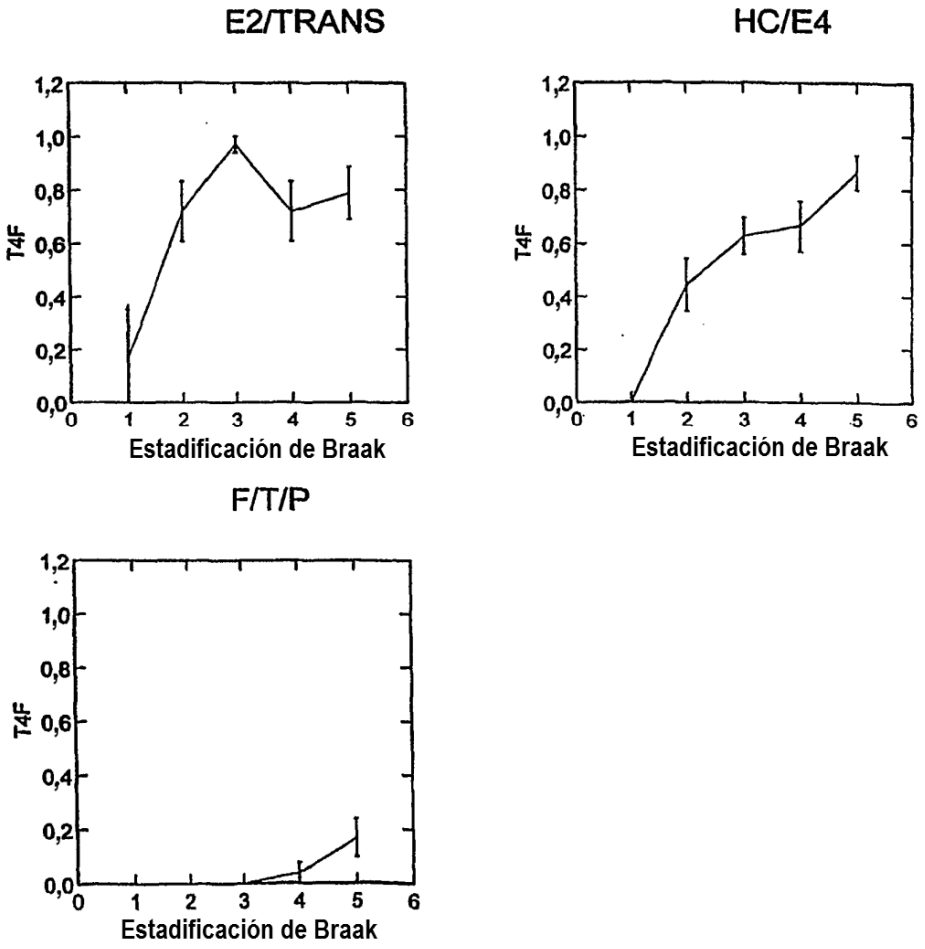

Probabilidad de ovillos-423 por región y estadio
E2/TRANS
HC/E4
F/T/P
T4F
Estadificación de Braak
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
1,0
1,2
0
1
2
3
4
5
6

Figura 25

Probabilidad de ovillos- AT8 por región y estadio

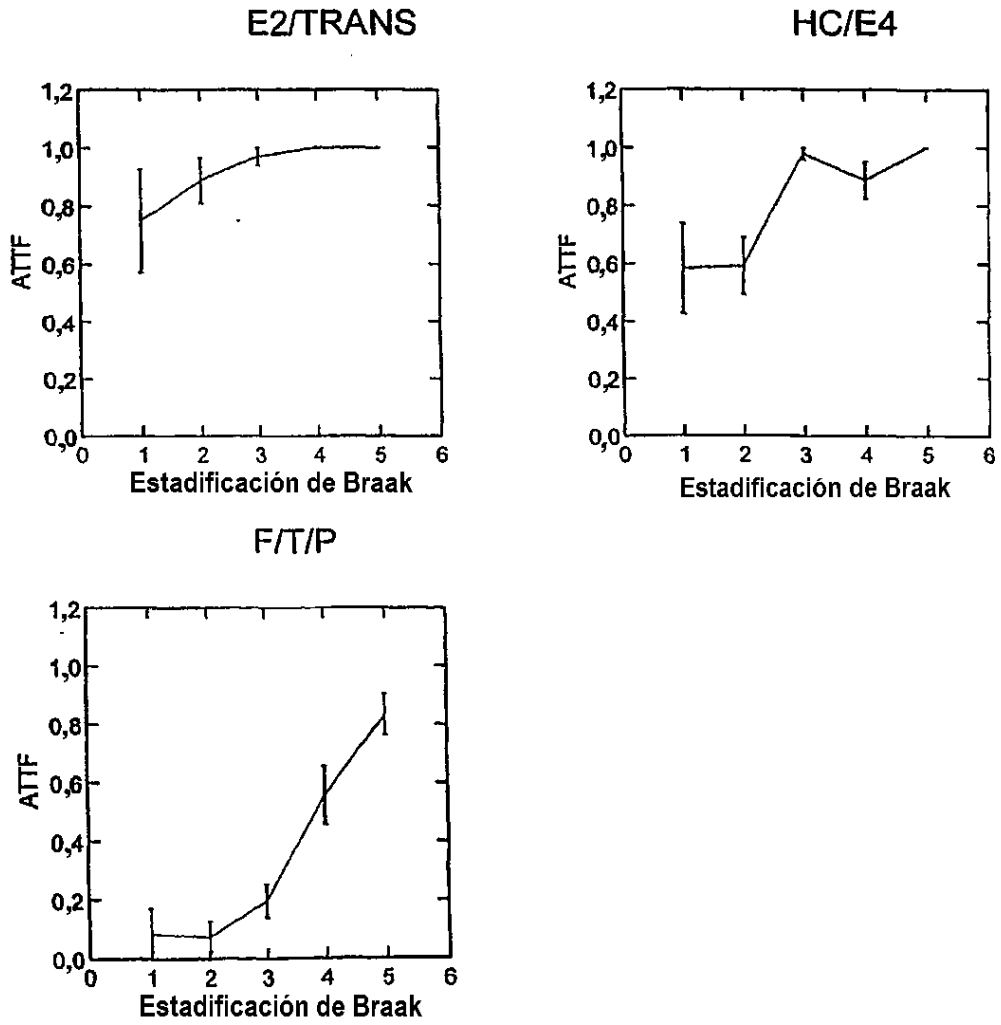


Figura 26

Probabilidad de ovillos- 423 por región y estadio con puntuación >21 según el MMSE

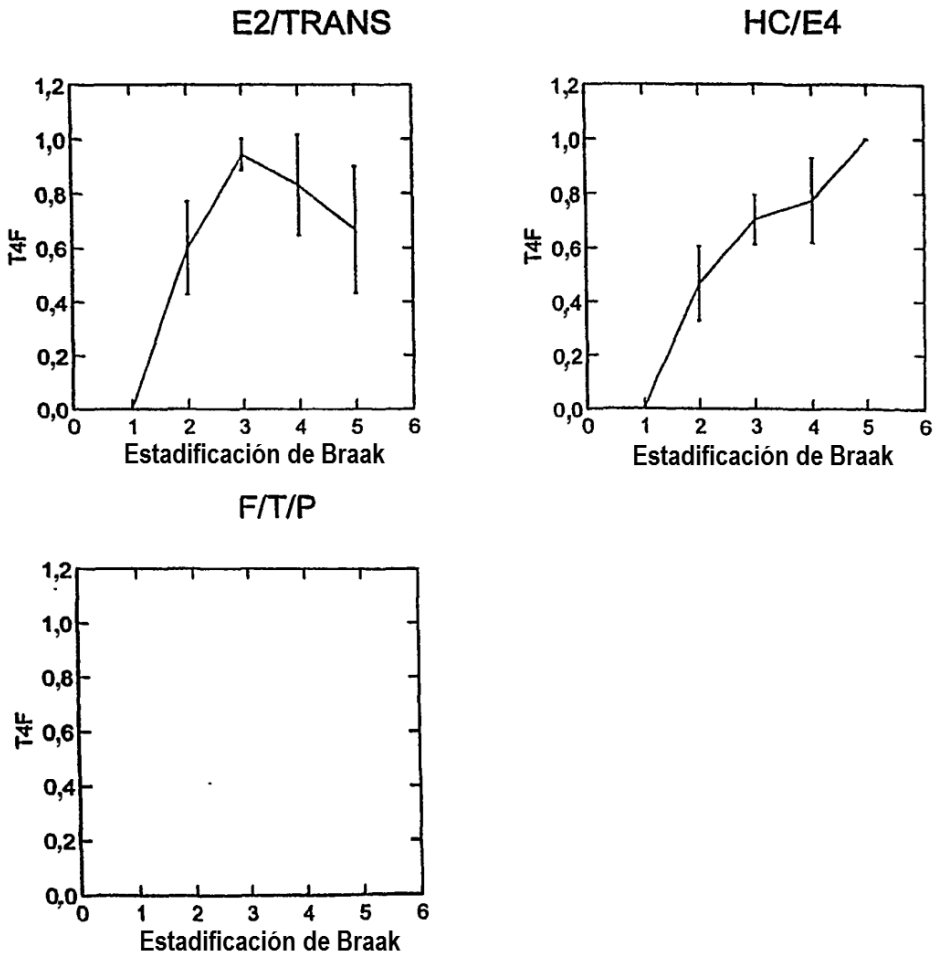


Figura 27

Probabilidad de ovillos- AT8 por región y estadio con puntuación >21 según el MMSE

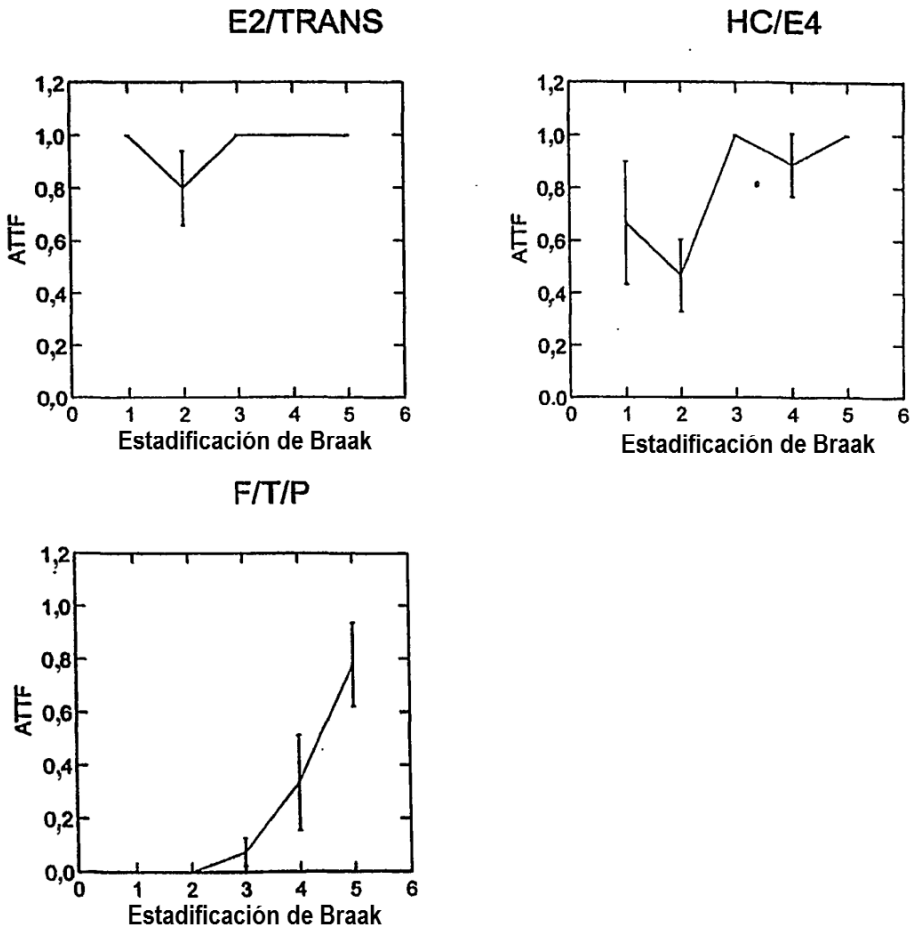


Figura 28

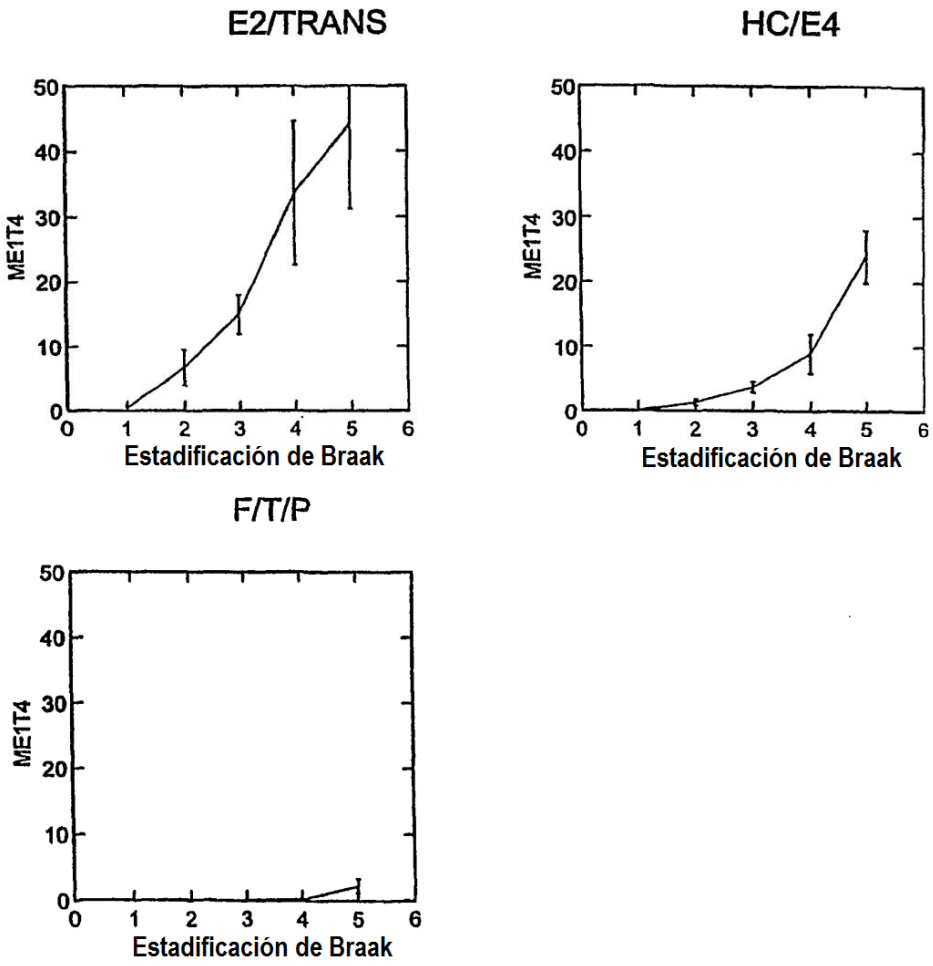

Densidad de ovillos-423 por región y extremo
E2/TRANS
HC/E4
F/T/P
ME1T4
Estadificación de Braak
0
10
20
30
40
50
0
1
2
3
4
5
6

Figura 29

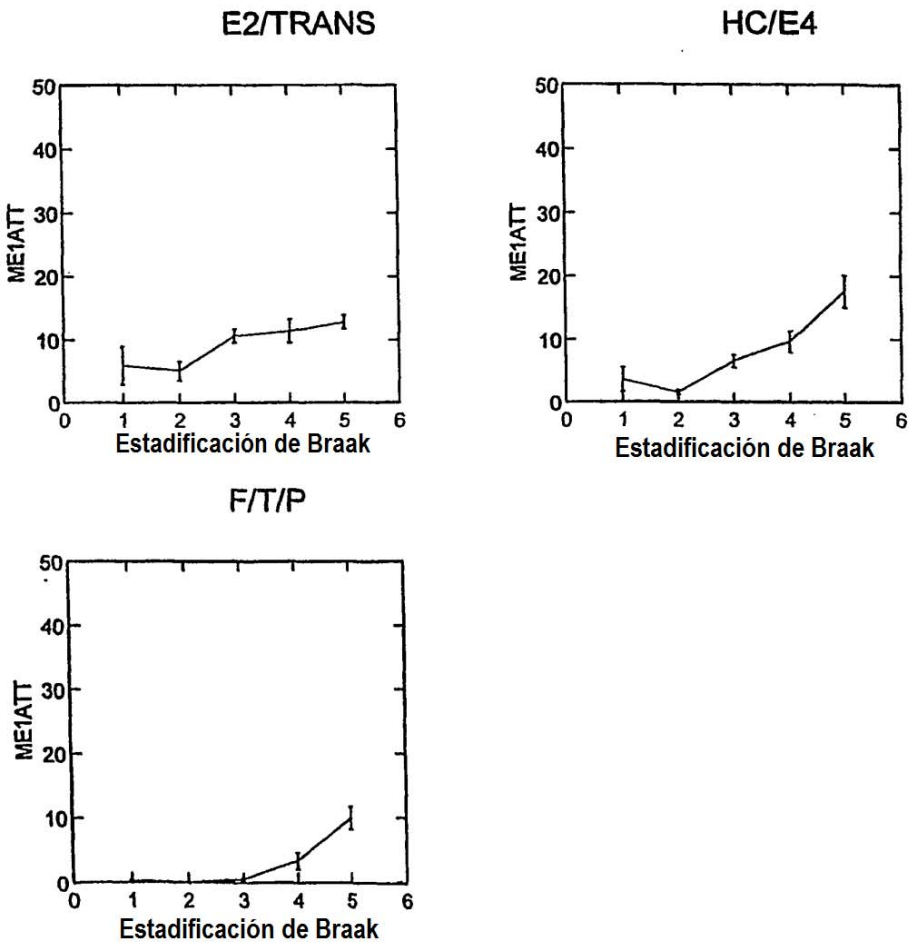

Densidad de ovillos-AT8 por región y estadio
E2/TRANS
HC/E4
F/T/P
ME1ATT
Estadificación de Braak
0
10
20
30
40
50
0
1
2
3
4
5
6

Figura 30

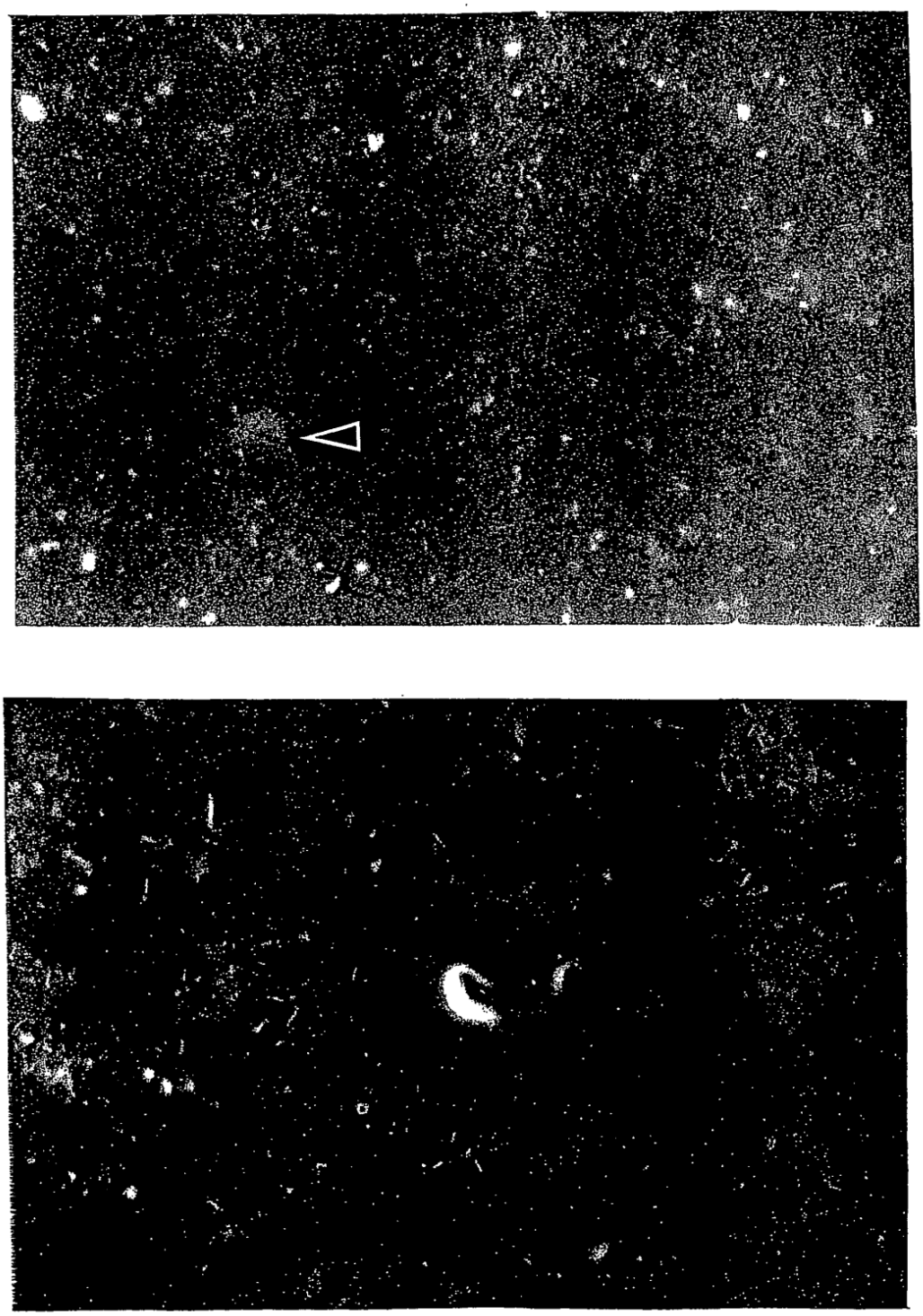


Figura 31a



Figura 31b

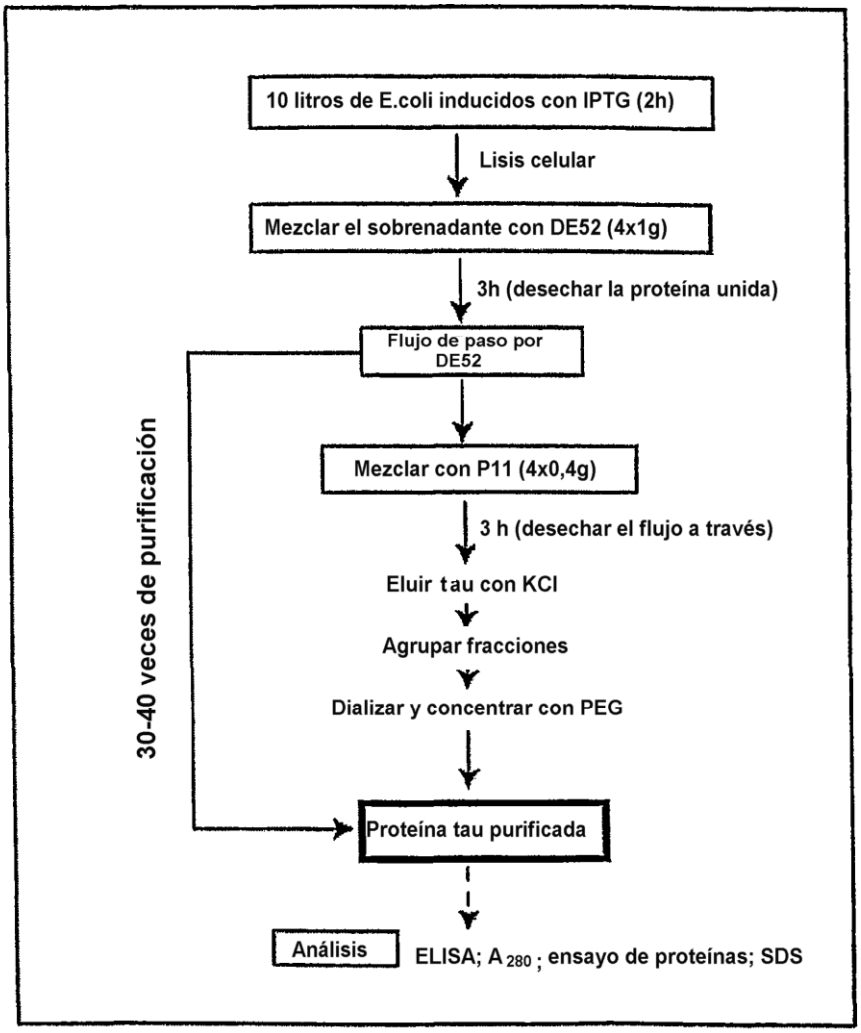

10 litros de E.coli inducidos con IPTG (2h)
Lisis celular
Mezclar el sobrenadante con DE52 (4x1g)
3h (desechar la proteína unida)
Flujo de paso por DE52
Mezclar con P11 (4x0,4g)
3 h (desechar el flujo a través)
Eluir tau con KCl
Agrupar fracciones
Dializar y concentrar con PEG
Proteína tau purificada
30-40 veces de purificación
Análisis
ELISA; A 280 ; ensayo de proteínas; SDS

Figura 32

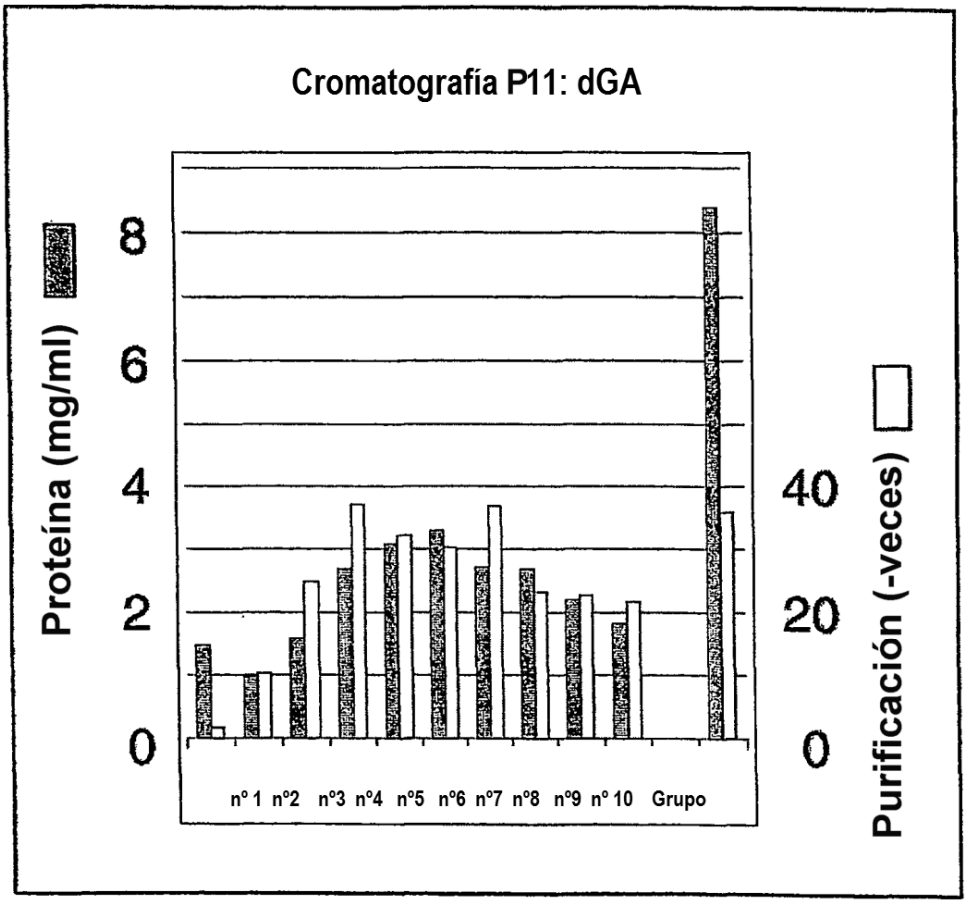

Cromatografía P11: dGA
Proteína (mg/ml)
8
6
4
2
0
40
20
0
Purificación (-veces)
nº 1 nº2 nº3 nº4 nº5 nº6 nº7 nº8 nº9 nº 10 Grupo

Figura 33

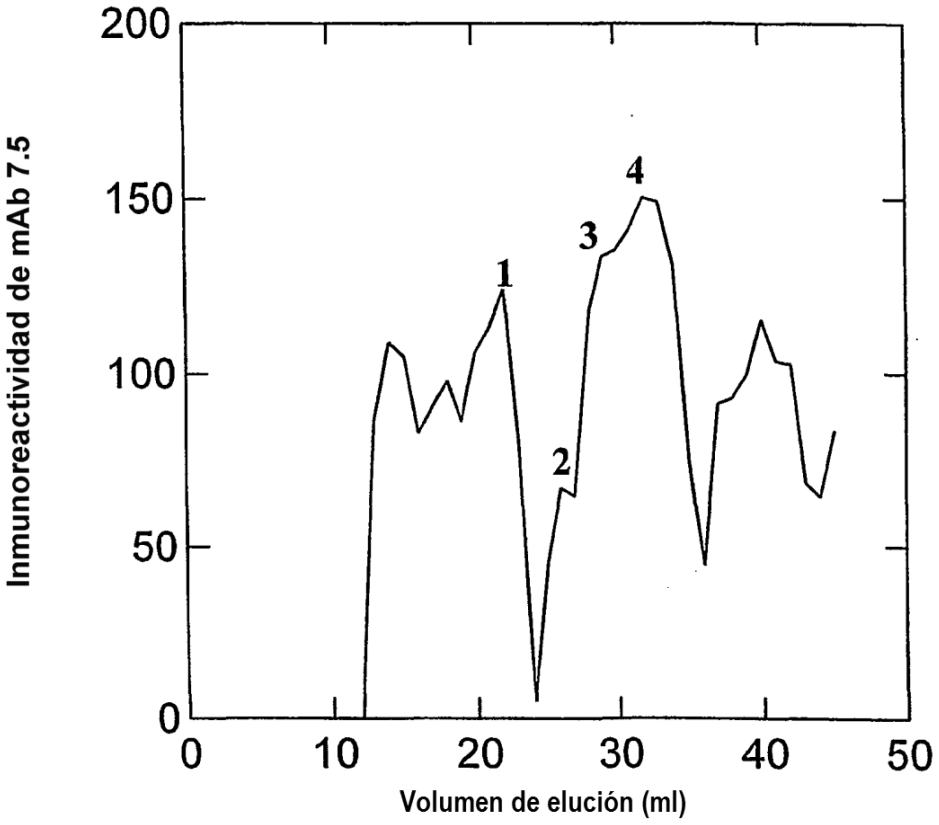

Inmunoreactividad de mAb 7.5
200
150
100
50
0
0
10
20
30
40
50
Volumen de elución (ml)
1
2
3
4

Figura 34

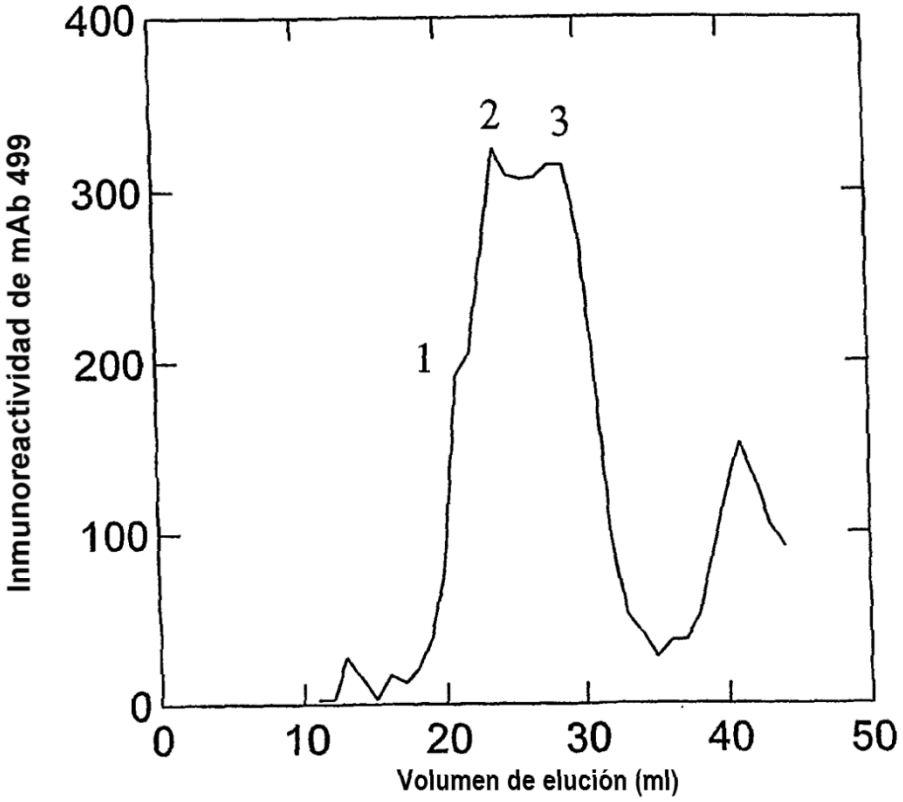
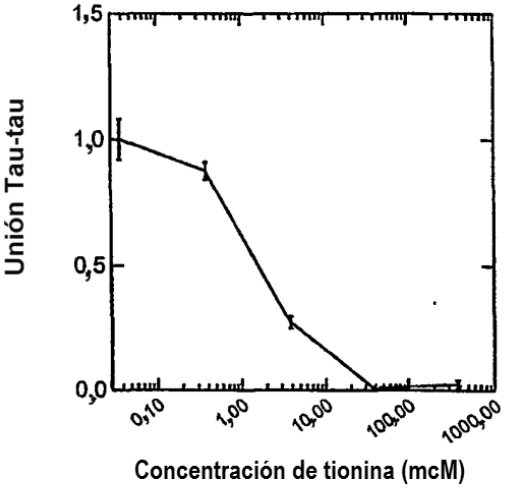

Inmunoreactividad de mAb 499
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
50
Volumen de elución (ml)
1
2
3

Figura 35

Preparación 1

dGA 5mcg/ml, dGAE 5 mcg/ml



Preparación 2

dGA 4mcg/ml, dGAE 5 mcg/ml

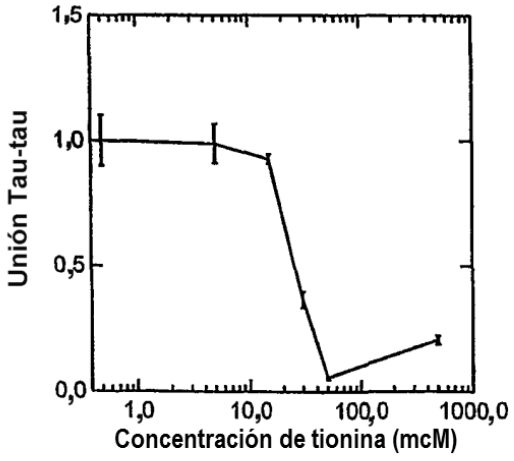
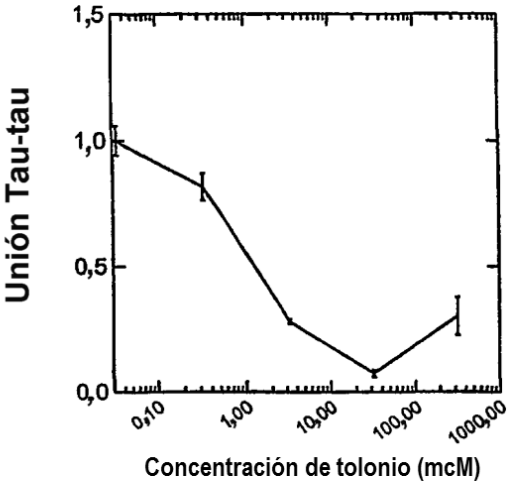


Figura 36

Preparación 1

dGA 5 mcg/ml, dGAE 5 mcg/ml



Preparación 2

dGA 10 mcg/ml, dGAE 10 mcg/ml

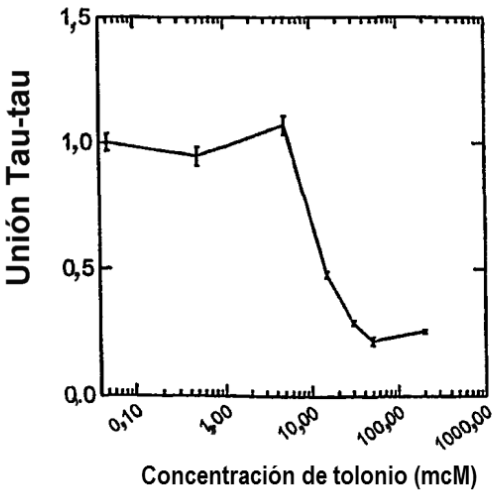
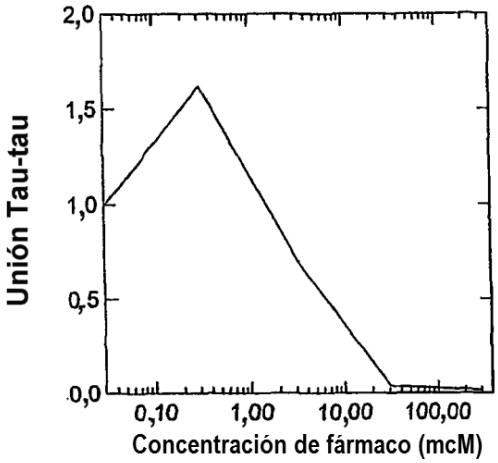


Figura 37

Preparación 1



Preparación 2

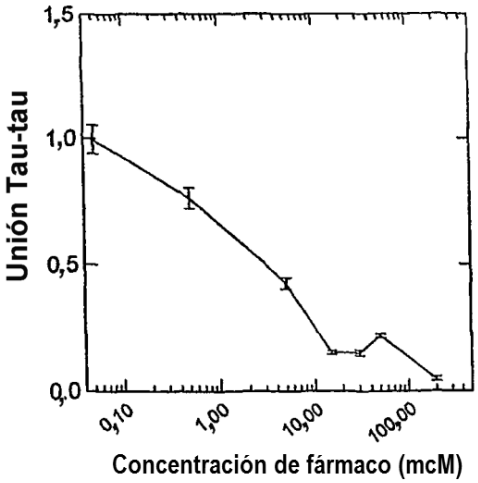
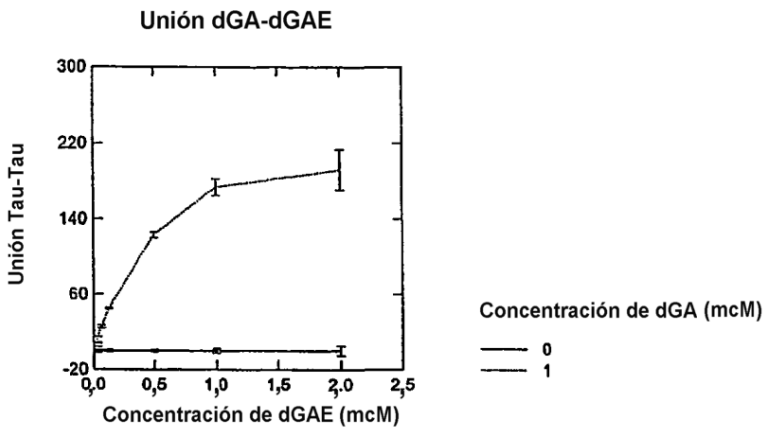
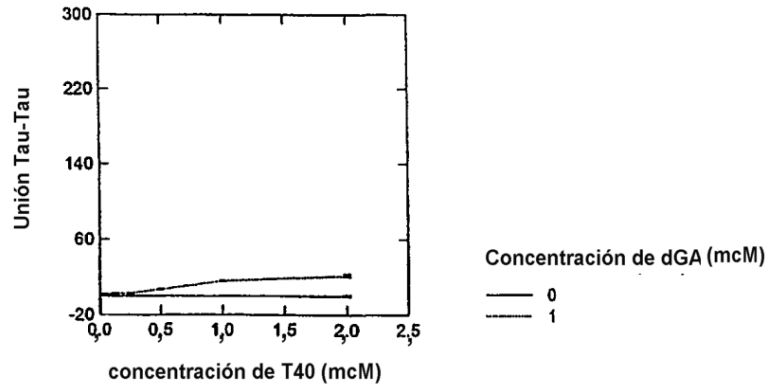


Figura 38

A



B



Figuras 39a y 39b

C

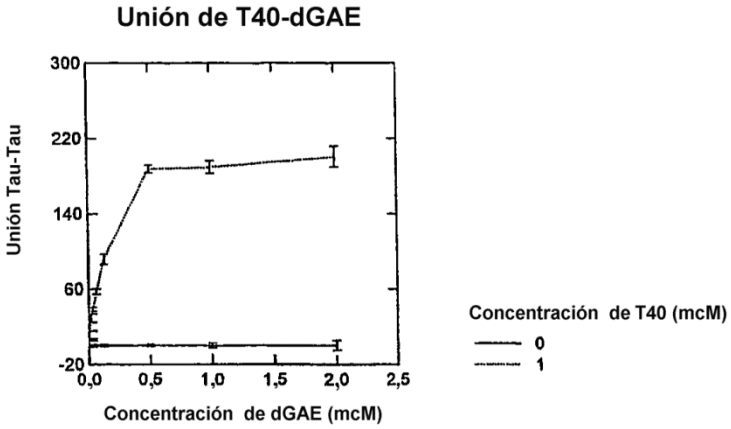
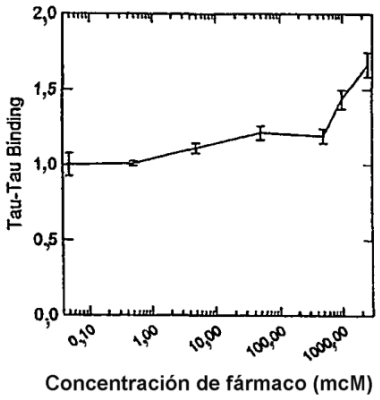

Unión de T40-dGAE
Unión Tau-Tau
300
220
140
60
-20
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
Concentración de dGAE (mcM)
Concentración de T40 (mcM)
0
1

Figura 39c

primulina



rojo de tiacina

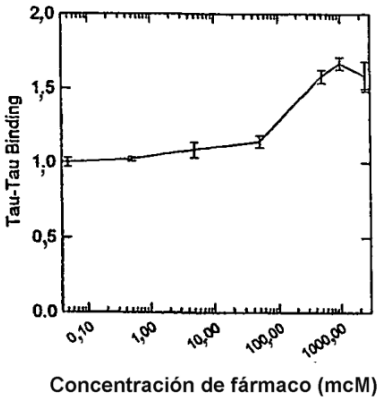
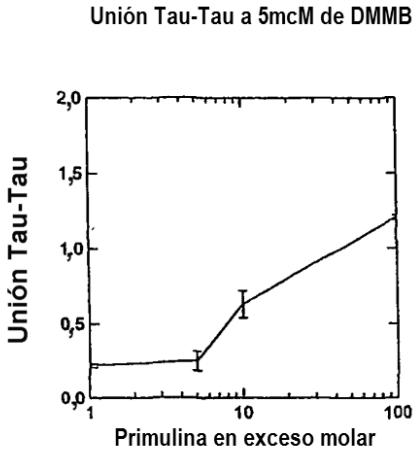
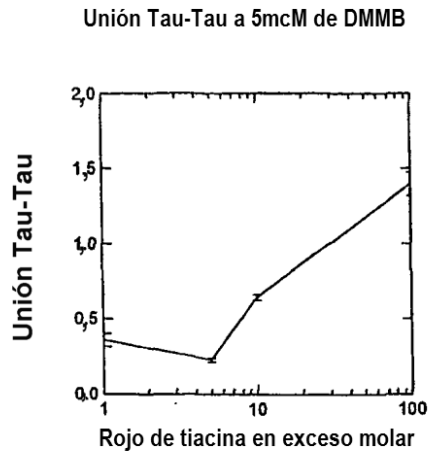


Figura 40

(a)

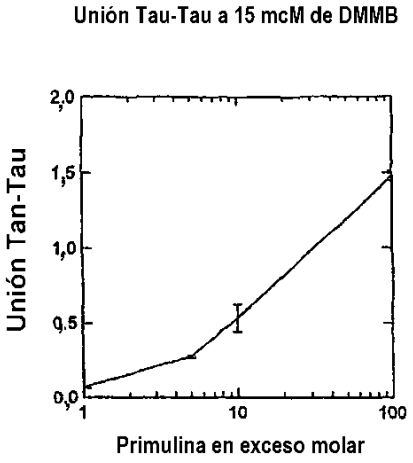


(b)

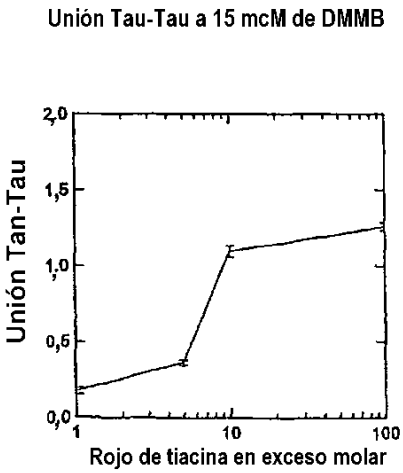


Figuras 41a y 41b

(c)



(d)



Figuras 41c y 41d

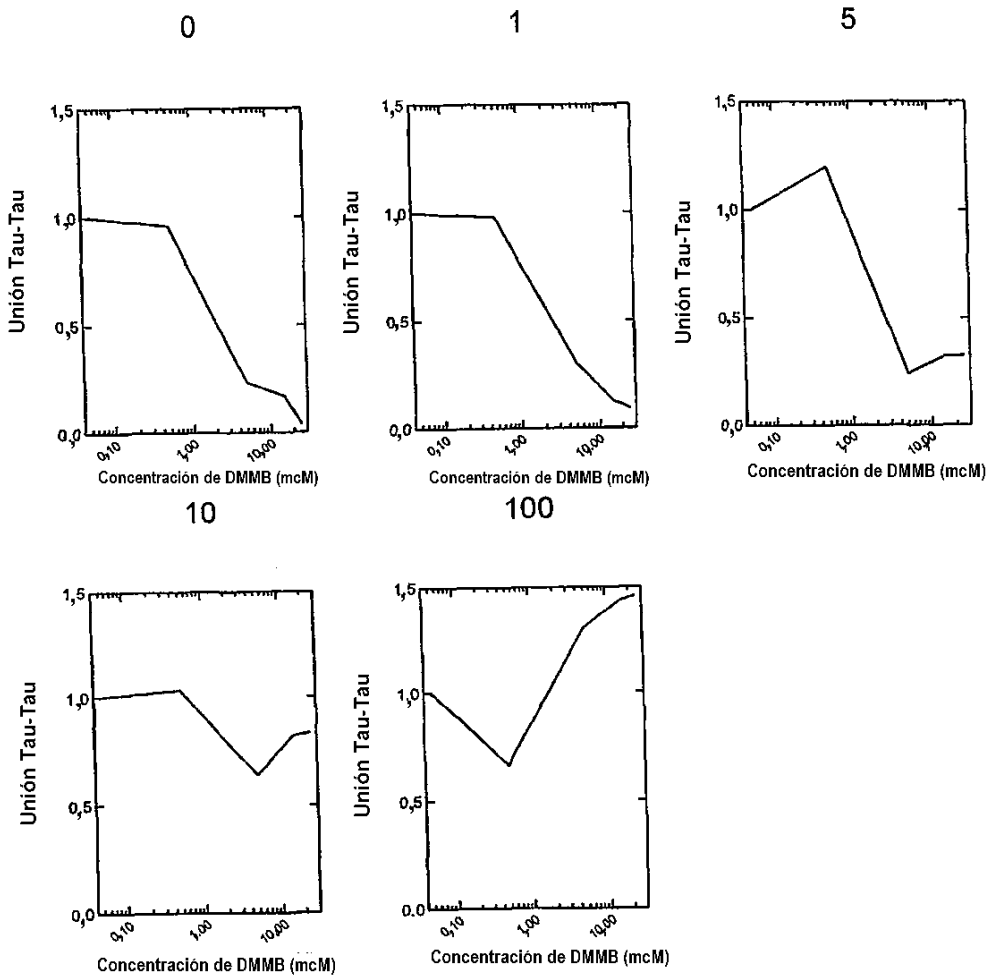

0
1
5
10
100
Unión Tau-Tau
Concentración de DMMB (mcM)
1,5
1,0
0,5
0,0
0,10
1,00
10,00

Figura 42

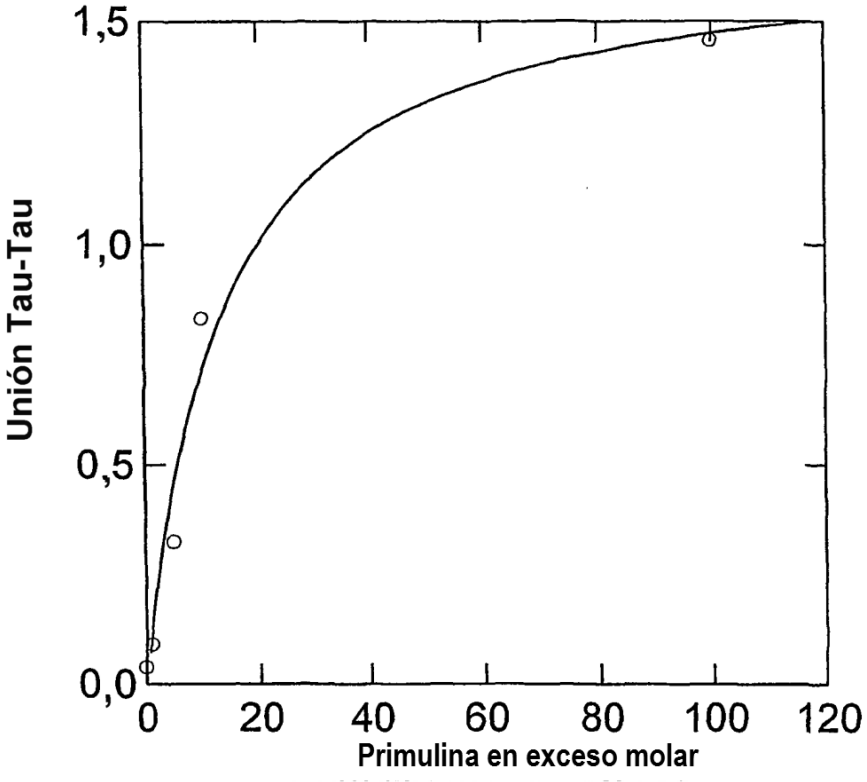

1,5
1,0
0,5
0,0
Unión Tau-Tau
0
20
40
60
80
100
120
Primulina en exceso molar

Figura 43

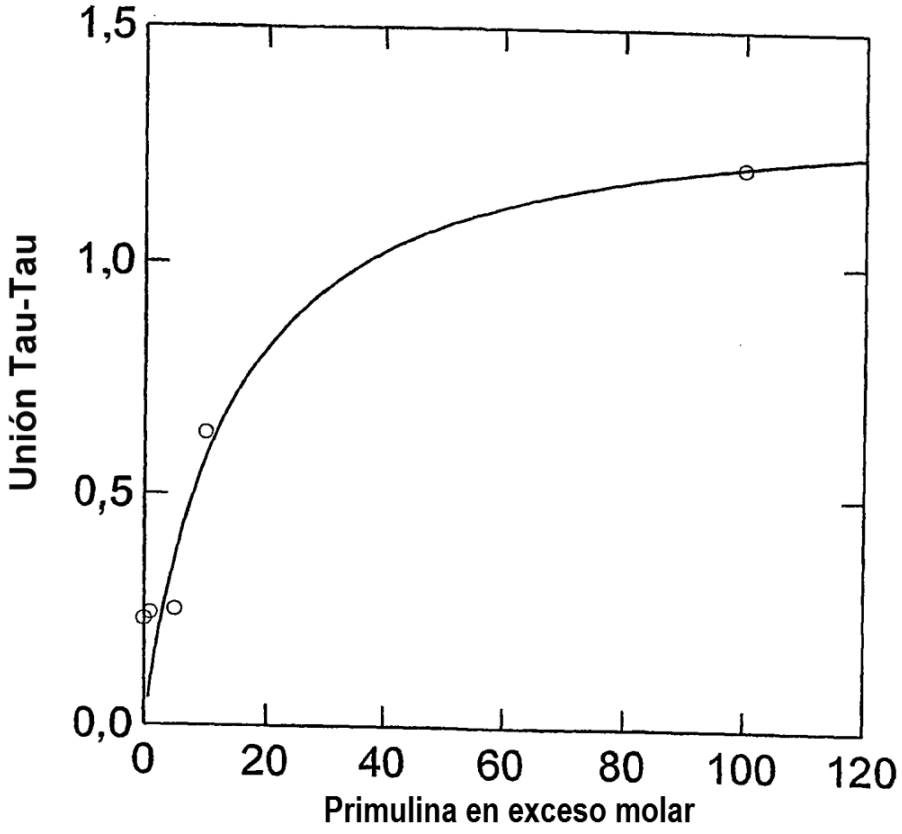

1,5
1,0
0,5
0,0
Unión Tau-Tau
0
20
40
60
80
100
120
Primulina en exceso molar

Figura 44

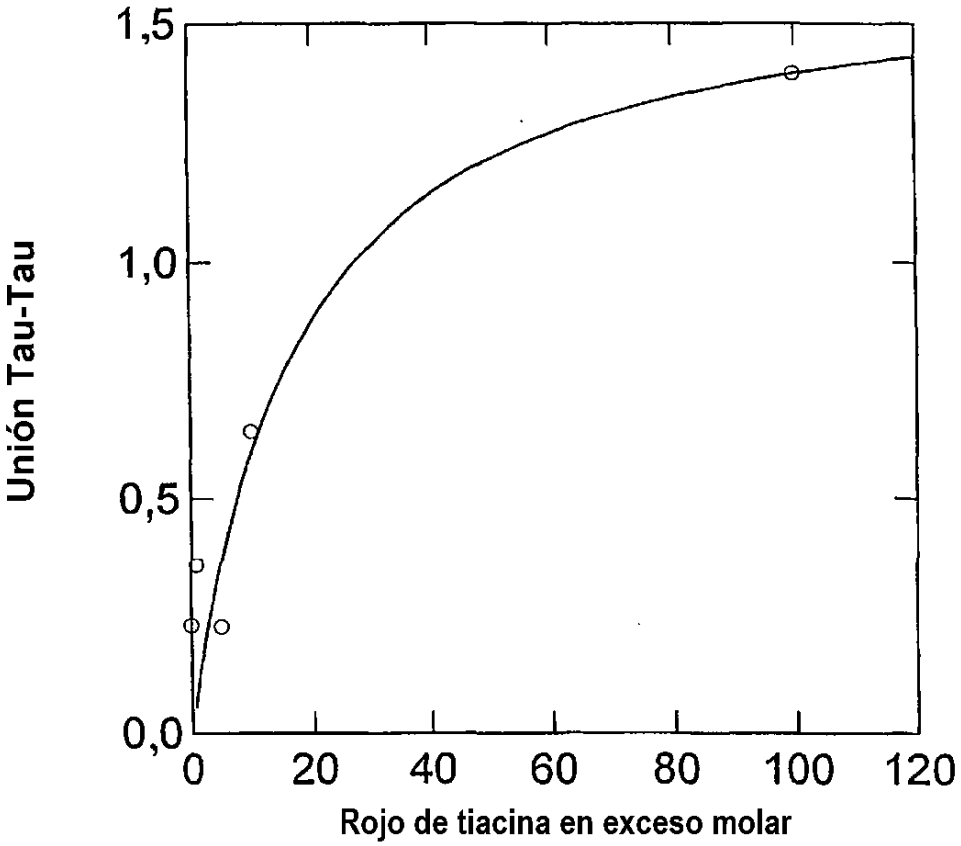

1,5
1,0
0,5
0,0
Unión Tau-Tau
0
20
40
60
80
100
120
Rojo de tiacina en exceso molar

Figura 45