



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 287 292**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/255** (2006.01)  
**A61K 31/12** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02745640 .9**  
86 Fecha de presentación : **16.07.2002**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1408952**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.2004**

54 Título: **Derivados de naftoquinona como inhibidores de la agregación de tau para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y trastornos neurodegenerativos relacionados.**

30 Prioridad: **16.07.2001 GB 0117326**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.12.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.12.2007**

73 Titular/es: **Wista Laboratories Ltd.**  
**51 Ayer Rajah Crescent No. 07-01/02**  
**Singapore 139948, SG**

72 Inventor/es: **Wischik, Claude M.;**  
**Horsley, David;**  
**Rickard, Janet E. y**  
**Harrington, Charles R.**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 287 292 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Derivados de naftoquinona como inhibidores de la agregación de tau para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y trastornos neurodegenerativos relacionados.

5 **Campo de la técnica**

La presente invención está en general relacionada con la agregación de proteínas asociada con enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer (AD) y con compuestos capaces de modular la citada agregación.

10 **Antecedentes de la invención**

Las dolencias relacionadas con la demencia, tales como la AD; se caracterizan frecuentemente por una acumulación progresiva de depósitos intracelulares y/o extracelulares de estructuras proteínicas, tales como placas  $\beta$ -amiloides y ovillos neurofibrilares/NFTs), en los cerebros de los pacientes afectados. La aparición de estas lesiones está en gran manera relacionada con la degeneración neurofibrilar patológica y con la atrofia cerebral, al igual que con el deterioro cognitivo (Mukaetova-Ladinska, E.B. *et al.* (2000) *Am. J. Pathol.* Vol. 157, N° 2, 623-636).

20 En la AD, tanto las placas neuríticas como los NFTs contienen filamentos helicoidales emparejados (PHFs), un constituyente importante de los cuales es la proteína tau asociada a microtúbulos (Wischik *et al.* (1988a) *PNAS USA* 85, 4506-4510). Las placas contienen también fibrilos  $\beta$ -amiloides extracelulares, derivados del procesado anormal de proteína precursora amiloide (APP; Kang *et al.*, (1987) *Nature* 325, 733). Un artículo de Wischik *et al.* (en "Neurobiological of Alzheimer's Disease", 2nd Edition (2000) Eds. Dawbarn, D. and Allen, S.J., *The Molecular and Cellular Neurobiology Series*, Bios Scientific Publishers, Oxford) discute en detalle el papel putativo de la proteína tau en la patogénesis de demencias neurodegenerativas. La pérdida de la forma normal de tau, la acumulación de PHFs patológicos y la pérdida de sinapsis en la corteza mesofrontal está correlacionada con el deterioro cognitivo asociado. Además, la pérdida de sinapsis y la pérdida de células piramidales están ambas correlacionadas con las mediciones morfológicas de la patología neurofibrilar reactiva a tau, la cual se equipara, en paralelo, a nivel molecular, con la prácticamente redistribución total de la agrupación de proteína tau procedente desde una forma soluble hacia una forma polimerizada (a saber, PHFs), en la enfermedad de Alzheimer.

35 La proteína tau existe en isoformas empalmadas alternativamente, las cuales contienen tres o cuatro copias de una secuencia de repetición correspondiente al dominio de unión a microtúbulo (Goedert, M. *et al.*, (1989) *EMBO J.* 8, 393-399; Goedert, M., *et al.* (1989) *Neuron* 3, 519-526). Tau en PHFs es procesada proteolíticamente hasta un dominio núcleo (Wischik, C.M., *et al.* (1988b) *PNAS. USA* 85, 4884-4888; Wischik *et al.* (1988a) *Loc cit.*); Novak, M., *et al.* (1993) *EMBO J.* 12, 365-370) compuesto de una versión de fase desplazada del dominio de repetición; tan solo tres dominios de repetición están involucrados en la interacción estable tau-tau (Jakes, R., *et al.* (1991) *EMBO J.* 10, 2725-2729). Una vez formados, los agregados tau de tipo PHF actúan como semillas para las nuevas capturas y proporcionan una plantilla para el procesado proteolítico de proteína tau de longitud completa (Wischik *et al.* 1996 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11213-11218).

45 El desplazamiento de fase que es observado en el dominio de repetición de tau incorporado en los PHFs sugiere que el dominio de repetición sufre un cambio conformacional inducido durante la incorporación al filamento. Durante el inicio de la AD, se considera que este cambio conformacional podría iniciarse mediante la unión de tau a un sustrato patológico, tal como proteínas de membrana dañada o mutada (ver Wischik, C.M., *et al.* (1997) en "Microtubule-associated proteins: modifications in disease", eds Avila, J. Brandt, R. and Kosik, K.S. (Hardwood Academic Publishers, Amsterdam) pp. 185-241).

50 Durante el transcurso de su formación y acumulación, los PHFs se ensamblan primero para formar agregados amorfos dentro del citoplasma, probablemente procedentes de oligómeros tau tempranos los cuales devienen truncados con anterioridad a, o durante el transcurso del, ensamblado de PHF (Mena, R., *et al.*, (1995) *Acta Neuropathol.* 89, 50-56; Mena, R. *et al.* (1996) *Acta Neuropathol.* 91, 633-641). Estos filamentos se transforman después para formar NFTs intracelulares clásicos. En este estado los PHFs consisten en un núcleo tau truncado y un revestimiento exterior veloso que contiene tau de longitud completa (Wischik, C.M. *et al.*, (1996) *loc. Cit.*) El proceso de ensamblado es exponencial, consume la agrupación celular de tau funcional normal e induce nuevas síntesis de tau para cubrir el déficit (Lai, R.Y. K., *et al.*, (1995), *Neurobiology of Ageing*, Vol. 16, N° 3, 433-445). Finalmente, el deterioro funcional de la neurona avanza hasta el punto de la muerte celular, dejando atrás un NFT extracelular. La muerte celular está altamente correlacionada con el número de NFTs extracelulares (Wischik *et al.* 2000, *loc. cit.*) Dado que los ovillos son extrusionados en el espacio extracelular, se produce una progresiva pérdida del revestimiento exterior veloso de la neurona con la correspondiente pérdida de inmunoreactividad tau N-terminal, pero con conservación de la inmunoreactividad tau asociada con el núcleo PHF (Bondareff, W. *et al.*, (1994) *J. Neurophat. Exper. Neurol.*, Vol. 53, N° 2, 158-164).

65 Claramente, la identificación de compuestos que puedan modular la agregación de proteínas asociadas con enfermedad, tales como las tau, resulta de gran interés.

El documento WO 96/30766 (F. Hoffman-La Roche describe ensayos para la inhibición de la asociación tau-tau y determinados inhibidores, utilizando los ensayos. Las Figuras 23 y 24 del mismo ordenan determinados compuestos en función de sus propiedades inhibitoras. La vitamina K (=K2) tiene un valor de 0,674 y la menadiona (también conocida como Vitamina K3) se menciona por tener un valor de 1,042. Un valor de 1 en el ranking representa una unión equivalente a la observada en ausencia de compuesto.

Naturalmente, la vitamina K es bien conocida, per se, como agente terapéutico. Una revisión breve de la vitamina K es efectuada en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", de Goodman y Gilman, 9th edition, pp. 1582-1585, 1998. Una revisión más completa se efectúa en "Vitamins", de William Friedrich, pp. 285-338, 1988; Thorp *et al* (1995), *Drugs* 49, 376-387; Vermeer and Schurgens (2000), *Blood Stasis and Thrombosis*, 14, 339-353. La forma reducida de la vitamina K actúa como un cofactor para el enzima gamma-glutamylcarboxilasa. Este enzima es el responsable de la conversión de restos de ácido glutámico en gamma-carboxiglutamato en los factores de coagulación dependientes de vitamina K (factores II, VII, IX, X y en las proteínas de autocoagulación, proteína C y proteína S). Otras proteínas conteniendo ácido gamma carboxiglutámico (las denominadas proteínas Gla) han sido encontradas en el plasma (proteína Z), huesos (osteocalcina), riñón, y tejido testicular. Las funciones de las proteínas Gla no hematológicas son esbozadas en Vermeer and Schurgens (2000, loc. Cit.). No obstante, las citadas proteínas no son encontradas en el cerebro (Vermer (1990), *Biochem J*, 266, 625-636).

Entre los usos terapéuticos tradicionales de los análogos de vitamina K se incluyen la hipoprotrominemia en adultos y recién nacidos, la absorción inadecuada de sustancias solubles en lípidos y los síndromes de la absorción deficiente intestinal, tales como la fibrosis cística, la silosis, la enfermedad de Crohn y la enterocolitis.

Además de los usos terapéuticos descritos anteriormente, la vitamina K3 es también conocida por tener actividad anti-tumoral *in vitro* frente a un amplio rango de líneas celulares tumorales humanas y de roedor (Hu *et al*, 1996). El mecanismo de esta actividad no resulta todavía conocido. Se ha demostrado que la vitamina K3 presenta efectos complejos sobre varias cascadas del segundo mensajero quinasa (Markovits *et al.*, 1998; Wu and Sun 1999), y se ha propuesto específicamente que la vitamina K3 forma un enlace covalente con quinasas/fosfatasa que contienen la secuencia peptídica (I/V)HCXXXXXR(S/T)G, que induce la parada del ciclo celular y la muerte celular mediante la inhibición de la Cdc25 fosfatasa. No obstante, la secuencia consenso [HCXXXXXR(S/T)G] no es encontrada en el dominio de repetición de tau.

Un estudio (Nakajima *et al.*, 1993) examinó los efectos de derivados de vitamina K sobre neuronas CNS cultivadas y averiguó que las vitaminas K1 y K2 presentaban destacados efectos favorecedores de la supervivencia, en la banda comprendida entre 10 nM-1  $\mu$ M. Por el contrario, la vitamina K3 (menadiona) presentaba tan solo aproximadamente el 10% de esta actividad favorecedora de la supervivencia, y esto tan solo a 1  $\mu$ M. Cualquiera que sea el mecanismo de este efecto, el mismo no resultaba dependiente del ciclo de vitamina K, dado que el anticoagulante cumarina que interfiere con el paso de epoxi-reductasa, no presentaba efecto alguno sobre el ensayo favorecedor de la supervivencia. Utilizando células de neuroblastoma humano cultivadas, Ko *et al.* (1997) demostraron que la menadiona, a dosis elevadas (200  $\mu$ M) daba lugar tanto a una desfosforilación destacada de la proteína tau como a la oxidación de una amplia gama de proteínas. De modo interesante, por las razones discutidas en detalle en Wischik *et al* (2000), podría esperarse que la desfosforilación de la proteína tau reforzase la agregación de la proteína tau.

Más recientemente, Ko *et al.* (2000) discuten el papel de las mutaciones patógenas en alfa-sinucleína en la sensibilización de células neuronales frente a la tensión inducida por elevadas dosis de menadiona. En este documento, los autores alegan que la reducción de tiol provocada por compuestos que generan tensión oxidativa constituye un mecanismo general responsable de la toxicidad de alfa-sinucleína mutante en enfermedad de Parkinson hereditaria, con la implicación de que los planteamientos racionales frente a la terapia estarían basados en contrarrestar el daño oxidativo producido por sustancias tales como menadiona.

El documento DE 19504003 está relacionado con la diagnosis temprana, la prevención y el tratamiento de una pérdida acelerada de capacidades cognitivas, en particular las provocadas por la enfermedad de Alzheimer, mediante la utilización de una vitamina del grupo K. Constituyen ejemplos de compuestos la vitamina K1, K2 y K3. Se dice que los compuestos adquieren su eficacia a través de la influencia directa o indirecta de la homeostasis del calcio.

No obstante, aparte de los datos aislados proporcionados en el documento WO 96/30766 (F. Hoffman-La Roche), no se ha llevado a cabo ninguna investigación para demostrar y optimizar un papel para los compuestos de tipo naftoquinona en la inhibición de la agregación de proteína asociada con la enfermedad neurodegenerativa.

## Descripción de la invención

Los presentes inventores han investigado las estructuras de compuestos de tipo naftoquinona, los cuales pueden ser utilizados para inhibir la agregación de proteína asociada con la enfermedad neurodegenerativa. Utilizando nueva tecnología de ensayo, los mismos han demostrado que, contrariamente a los datos proporcionados en el documento WO 96/30766, la menadiona y compuestos relacionados pueden resultar inhibidores altamente eficaces. Las características detalladas estructura-función para los compuestos de tipo naftoquinona, tales como los compuestos derivados de vitamina K, han sido determinadas en relación con su utilización como inhibidores de agregación de proteína (por ejemplo, proteína tau). Tal como se apreciará por parte de los expertos en la materia, a la luz de la presente descripción,

estos resultados demuestran la utilidad de los citados compuestos, inter alia en el tratamiento de enfermedades (tales como AD) asociadas con la citada agregación proteínica.

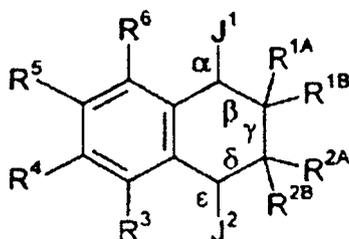
Más específicamente, los inventores han determinado que puede resultar ventajoso, para la potencia, que el grupo de la posición 3", generalmente el sustituyente  $R^{2A}$  en la fórmula estructural mostrada más adelante, se encuentre ausente o sea relativamente corto (por ejemplo, como en la menadiona), más que un grupo extendido (por ejemplo, como en la Vitamina K2 o la K3). Esto no tan solo resulta inesperado a la luz del documento WO 96/30766, sino también a la luz de relaciones de función-estructura generales más tempranas para estos compuestos. Por ejemplo, en Isler and Wiss (1959), *Vitamins and Hormones*, 17, 53-90, en la página 77, se muestra que la "actividad biológica" de la Vitamina K1 y K2 y de sus análogos se reduce a medida que se acorta la cadena lateral de la posición "3".

### Compuestos de la invención

Aspectos de la presente invención están basados en usos de compuestos de tipo Vitamina K que tienen grupos relativamente cortos o ningún grupo en la posición 3' (tal y como se define más adelante con mayor detalle) en relación con enfermedades neurodegenerativas de agregación proteínica.

Tal y como se ha descrito anteriormente, la clase de compuestos conocidos como "Vitamina K" corresponde en su forma de origen natural a un principio dietético esencial para la biosíntesis normal de diversos factores necesarios para la coagulación de la sangre. Esta actividad está asociada con al menos dos sustancias distintas de origen natural designadas como vitamina K1 (fitonadiona, o 2-metil-3-fitol-1,4-naftoquinona, la forma que aparece en los vegetales frondosos) y vitamina K2 menaquinona). La última representa a una serie de compuestos (las menaquinonas) en las cuales la cadena lateral fitilo de la fitonadiona está sustituida por una cadena lateral construida mediante 2 a 13 unidades fenilo y numerada consiguientemente. Las bacterias intestinales y el hígado son capaces de sintetizar menaquinonas (predominantemente menaquinona-4) a partir del análogo sintético soluble en lípido menadiona. La menadiona presenta dos derivados comunes solubles en agua, menadiol fosfato sódico y la menadiona bisulfato sódico, los cuales son convertidos en menadiona después de la administración. Se han investigado otros compuestos relacionados con la menadiona para determinar la actividad anti-tumoral, en particular compuestos relacionados con lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona). Variantes estructurales en la cadena lateral en la posición 3 son revisadas por Rao (1974). Algunos datos toxicológicos típicos y clínicos para lapachol son proporcionados por Seiber *et al.* (1976) y Morrison *et al.* (1970).

La invención pertenece particularmente a compuestos de la siguiente fórmula:



I

en la que:

$J^1$  y  $J^2$  son ambos = O, a saber, los enlaces covalentes marcados como  $\alpha$  y  $\epsilon$  son dobles enlaces; los marcados como  $\beta$  y  $\delta$  son enlaces sencillos, y el enlace covalente marcado como  $\gamma$  es un doble enlace en el que  $R^{1B}$  y  $R^{2B}$  están ambos ausentes;

o

el enlace covalente marcado como  $\gamma$  es un enlace sencillo.

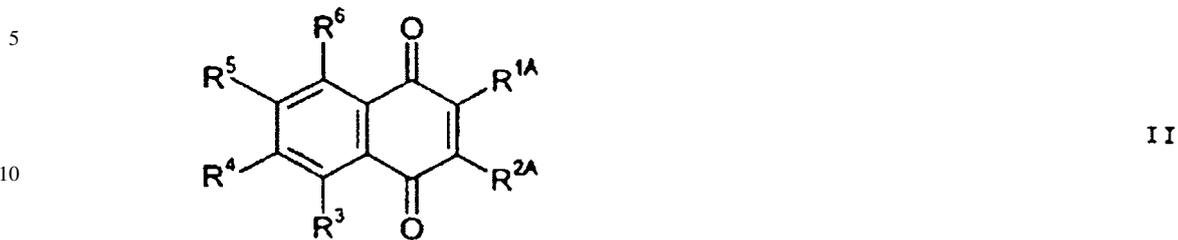
En otra realización:

$J^1$  es  $-OR^7$  y  $J^2$  es  $-OR^8$ ; a saber, los enlaces covalentes marcados como  $\alpha$  y  $\epsilon$  son enlaces sencillos; los marcados como  $\beta$  y  $\delta$  son enlaces dobles y el enlace covalente marcado como  $\gamma$  es un enlace sencillo en el que  $R^{1B}$  y  $R^{2B}$  están ambos ausentes;

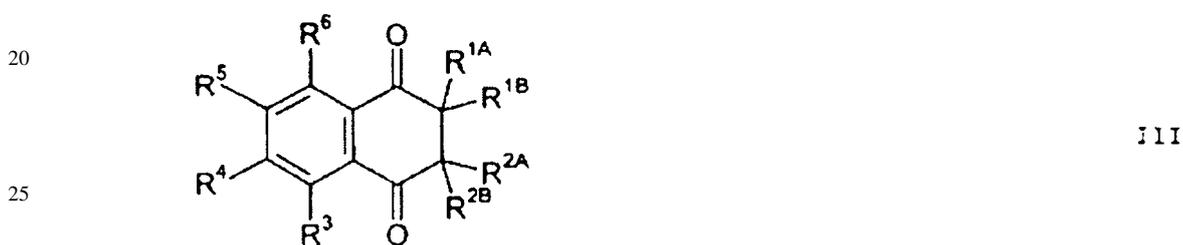
Tanto las formas oxidadas como las reducidas de los compuestos descritos en el presente documento pueden ser utilizadas en la presente invención.

## ES 2 287 292 T3

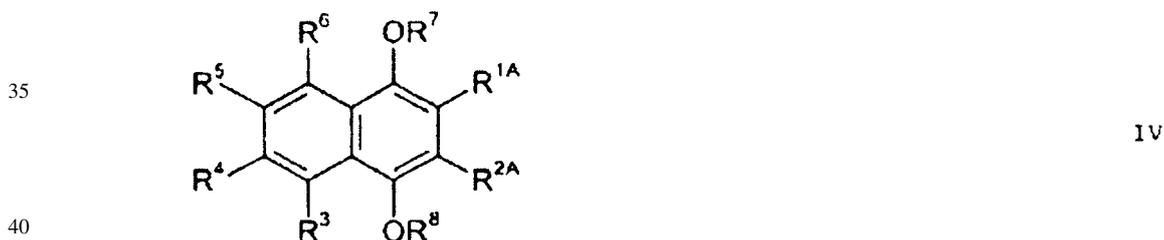
Así pues, en realizaciones particulares, los compuestos tienen la siguiente fórmula:



15 En una realización, los compuestos tienen la siguiente fórmula:



30 En una realización, los compuestos tienen la siguiente fórmula:



45 En la Figura 2 se muestran diversas realizaciones específicas preferidas con Vitamina K1 y Vitamina K2 y, a efectos comparativos, se incluyen determinados compuestos inactivos que no forman parte de la presente invención.

$R^{2A}$  y  $R^{2B}$ , si se encuentran presentes

50 Los compuestos de la invención son aquellos en los cuales  $R^{2A}$  es un grupo relativamente corto (comparar K1 y K2 con DH10 y K3, por ejemplo).

55 Así pues,  $R^{2A}$  puede ser seleccionado, independientemente, de -H, alquilo  $C_{1-7}$  (incluyendo, por ejemplo, alquilo  $C_{1-7}$  no sustituido, alquilo  $C_{1-7}$  sustituido, tal como haloalquilo  $C_{1-7}$ , hidroxialquilo  $C_{1-7}$ , aminoalquilo  $C_{1-7}$ , carboxialquilo  $C_{1-7}$ , etc), -OH, alcoxi  $C_{1-7}$ , aciloxi, -COOH, éster, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub>M, sulfonato, -alquilsulfonato  $C_{1-7}$  o un “grupo alquilo de cadena corta”, lo que debe interpretarse como un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene entre 1-15 átomos de carbono, muy preferiblemente entre 1 y 12, más preferiblemente entre 1 y 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 átomos de carbono, el cual puede ser saturado o parcialmente insaturado.

60 El término “grupo haloalquilo  $C_{1-7}$ ”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo  $C_{1-7}$  en el que al menos un átomo de hidrógeno (por ejemplo, 1, 2 3) ha sido sustituido por un átomo de halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br, I). Si se ha sustituido más de un átomo de hidrógeno por un átomo de halógeno, los átomos de halógeno pueden ser iguales o diferentes. Cada uno de los átomos de hidrógeno pueden ser sustituidos por un átomo de halógeno, en cuyo caso, el grupo puede ser identificado convenientemente como un grupo “perhaloalquilo  $C_{1-7}$ ”. Entre los ejemplos de grupos haloalquilo  $C_{1-7}$  se incluyen, sin que ello suponga ninguna limitación, -CF<sub>3</sub>, -CHF<sub>2</sub>,  
65 -CH<sub>2</sub>F, -CCl<sub>3</sub>, -CBr<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>F, -CH<sub>2</sub>CHF<sub>2</sub>, y -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>.

El término “grupo hidroxialquilo  $C_{1-7}$ ”, tal y como se utiliza en el presente documento, hace referencia a un grupo alquilo  $C_{1-7}$  en el que al menos un átomo de hidrógeno ha sido sustituido por un grupo hidroxilo. Entre los ejemplos de

## ES 2 287 292 T3

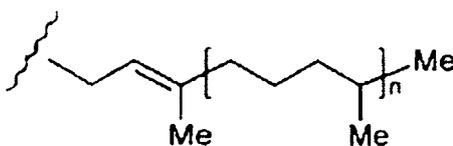
grupos hidroxialquilo  $C_{1-7}$  se incluyen, sin que ello suponga ninguna limitación,  $-CH_2OH$ ,  $-CH_2CH_2OH$  y  $-CH(OH)CH_2OH$ .

5 El término “grupo aminoalquilo  $C_{1-7}$ ”, tal y como se utiliza en el presente documento, hace referencia a un grupo alquilo  $C_{1-7}$  en el que al menos un átomo de hidrógeno ha sido sustituido por un grupo amino. Entre los ejemplos de grupos aminoalquilo  $C_{1-7}$  se incluyen, sin que ello suponga ninguna limitación,  $-CH_2NH_2$ ,  $-CH_2CH_2NH_2$  y  $-CH_2CH_2(CH_3)_2$ .

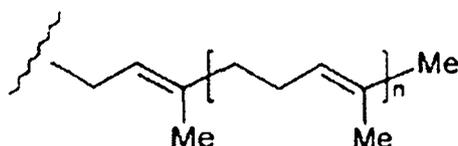
10 El término “grupo carboxialquilo  $C_{1-7}$ ”, tal y como se utiliza en el presente documento, hace referencia a un grupo alquilo  $C_{1-7}$  en el cual al menos un átomo de hidrógeno ha sido sustituido por un grupo carboxi. Entre los ejemplos de grupos carboxialquilo  $C_{1-7}$  se incluyen, sin que ello suponga ninguna limitación,  $-CH_2COOH$  y  $-CH_2CH_2COOH$ .

En una realización, el grupo alquilo de cadena corta es uno de los siguientes grupos, en los que  $n$  es 0, 1 ó 2:

15



20



25

30

$R^{2B}$ , si se encuentra presente, será seleccionado de entre los mismos grupos que  $R^{2A}$ , y puede ser igual o diferente a  $R^{2A}$ . No obstante, los compuestos preferidos son aquellos en los cuales  $R^{2B}$  se encuentra ausente.

35  $R^{1A}$ ,  $R^{1B}$

Cada uno de  $R^{1A}$ ,  $R^{1B}$  es, independientemente,  $-H$ , alquilo  $C_{1-7}$  (incluyendo, por ejemplo, alquilo  $C_{1-7}$  no sustituido, alquilo  $C_{1-7}$  sustituido, tal como haloalquilo  $C_{1-7}$ , hidroxialquilo  $C_{1-7}$ , aminoalquilo  $C_{1-7}$ , carboxialquilo  $C_{1-7}$ , etc),  $-OH$ , alcoxi  $C_{1-7}$ , aciloxi,  $-COOH$ , éster,  $-SO_3H$ ,  $-SO_3M$ , sulfonato, alquilsulfonato  $C_{1-7}$ , o un grupo alquilo de cadena corta, con la particularidad de que si el compuesto es un compuesto de fórmula II, entonces  $R^{1A}$  es:  $-OMe$ ,  $-OC(=O)Me$ ,  $-COOH$ ,  $-SO_3H$ ,  $-SO_3M$  o  $-SO_3Me$ .

40

M denota un catión o cationes de carga o carga acumulada para contrarrestar la carga en el grupo  $-SO_3^-$ . En una realización M denota un ión alcalino, tal como  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  o  $Cs^+$ , más preferiblemente  $Na^+$  o  $K^+$ .

45

Los compuestos preferidos son aquellos en los cuales  $R^{1B}$  está ausente, si bien compuestos en los cuales no se encuentra ausente (tales como por ejemplo DH3), muestran actividad.

50 Los compuestos preferidos son aquellos en los cuales  $R^{1A}$  es alquilo, tales como metilo (comparar DH2 y DH14, por ejemplo, también DH1, DH7 y DH15).

No obstante, en vez de metilo pueden resultar también preferidos otros grupos pequeños, tales como un grupo sulfato (comparar K3 y DH8). Preferiblemente, el grupo  $R^{1A}$  es un grupo donante de electrones, con la particularidad de que si el compuesto es un compuesto de fórmula II, entonces:  $R^{1A}$  es:  $-OMe$ ,  $-OC(=O)Me$ ,  $-COOH$ ,  $-COOMe$ ,  $-SO_3H$ ,  $-SO_3M$ , o  $-SO_3Me$ .

55

$R^{1A}$ ,  $R^{1B}$ ,  $R^{2A}$ ,  $R^{2B}$

60 En una realización, cada uno de  $R^{1A}$ ,  $R^{1B}$ ,  $R^{2A}$ ,  $R^{2B}$  es, independientemente,  $-H$ ;  $-Me$ ,  $-Et$ ,  $-nPr$ ,  $-iPr$ ,  $-nBu$ ,  $-sBu$ ,  $-iBu$ ,  $-tBu$ ;  $-OH$ ;  $-OMe$ ,  $-OEt$ ,  $-O(nPr)$ ,  $-O(iPr)$ ,  $-O(nBu)$ ,  $-O(sBu)$ ,  $-O(iBu)$ ,  $-O(tBu)$ ;  $-OC(=O)Me$ ,  $-OC(=O)Et$ ,  $-OC(=O)(nPr)$ ,  $-OC(=O)(iPr)$ ,  $-OC(=O)(nBu)$ ,  $-OC(=O)(sBu)$ ,  $-OC(=O)(iBu)$ , ó  $-OC(=O)(tBu)$ ;  $-C(=O)OMe$ ,  $-C(=O)OEt$ ,  $-C(=O)O(nPr)$ ,  $-C(=O)O(iPr)$ ,  $-C(=O)O(nBu)$ ,  $-C(=O)O(sBu)$ ,  $-C(=O)O(iBu)$ ,  $-C(=O)O(tBu)$ ;  $-SO_3H$ ,  $-SO_3M$ ,  $-SO_3Me$ ,  $-SO_3Et$ ,  $-SO_3(nPr)$ ,  $-SO_3(iPr)$ ,  $-SO_3(nBu)$ ,  $-SO_3(sBu)$ ,  $-SO_3(iBu)$ ,  $-SO_3(tBu)$ , con la particularidad de que si el compuesto es un compuesto de fórmula II, entonces:  $R^{1A}$  es:  $-OMe$ ,  $-OC(=O)Me$ ,  $-OC(=O)Me$ ,  $-COOH$ ,  $-COOMe$ ,  $-SO_3H$ ,  $-SO_3M$  o  $-SO_3Me$ .

65

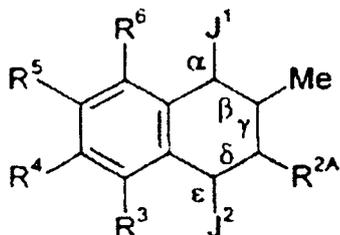
## ES 2 287 292 T3

En una realización, cada uno de  $R^{1A}$ ,  $R^{1B}$ ,  $R^{2A}$ ,  $R^{2B}$  es, independientemente, -H; -Me, -Et, -OMe, -OH, -OMe, -OEt, -OC(=O)Me, -OC(=O)Et, -COOH, -COOMe, -COOEt, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub>M, -SO<sub>3</sub>Me, -SO<sub>3</sub>Et, ó -CH<sub>2</sub>CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

En una realización, cada uno de  $R^{1A}$ ,  $R^{1B}$ ,  $R^{2A}$ ,  $R^{2B}$  es, independientemente, -H; -Me, -OMe, -OH, -OMe, -OC(=O)Me, -COOH, -COOMe, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub>M, -SO<sub>3</sub>Me, o -CH<sub>2</sub>CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

En una realización  $R^{1A}$  es -Me y  $R^{1B}$  y  $R^{2B}$  están ausentes:

10



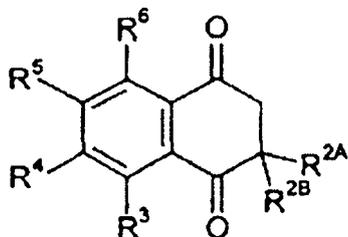
V

15

20

En una realización  $R^{1A}$  y  $R^{1B}$  son ambos -H, y  $R^{2A}$  y  $R^{2B}$  son lo que se ha definido anteriormente:

25



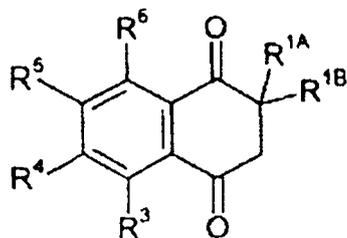
VI

30

35

En una realización,  $R^{2A}$  y  $R^{2B}$  son ambos -H y  $R^{1A}$  y  $R^{1B}$  son lo que se ha definido anteriormente.

40

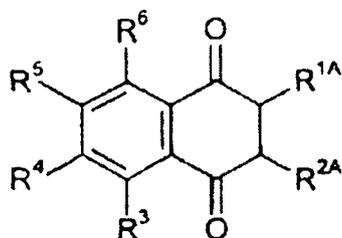


VII

45

En una realización  $R^{1B}$  y  $R^{2B}$  son ambos -H y  $R^{1A}$  y  $R^{2A}$  son lo que se ha definido anteriormente:

50



VIII

55

60

$R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  y  $R^6$

65 Cada uno de  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  y  $R^6$  es, independientemente, -H, -OH, alquilo C<sub>1-7</sub> (incluyendo, por ejemplo, alquilo C<sub>1-7</sub> no sustituido, alquilo C<sub>1-7</sub> sustituido, tal como haloalquilo C<sub>1-7</sub>, hidroxialquilo C<sub>1-7</sub>, aminoalquilo C<sub>1-7</sub>, carboxialquilo C<sub>1-7</sub>, etc), alcoxi C<sub>1-7</sub> o aciloxi.

## ES 2 287 292 T3

La presencia o ausencia de sustituyentes en R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> o R<sup>6</sup> no parece afectar en gran manera la actividad (comparar, por ejemplo, K3 y DH2).

En una realización, cada uno de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es, independientemente, -H, -OH, alquilo C<sub>1-7</sub>, alcoxi C<sub>1-7</sub>, o alquilaloxi C<sub>1-7</sub>.

En una realización, cada uno de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es, independientemente, -H, -OH, -Me, -Et, -nPr, -iPr, -nBu, -sBu, -iBu, -tBu; -OMe, -OEt, -O(nPr), -O(iPr), -O(nBu), -O(sBu), -O(iBu), -O(tBu); -OC(=O)Me, -OC(=O)Et, -OC(=O)(nPr), -OC(=O)(iPr), -OC(=O)(nBu), -OC(=O)(sBu) u -O(C=O)(tBu).

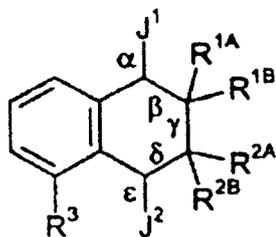
En una realización, cada uno de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es, independientemente, -H; -OH; -Me, -Et; -OMe, OEt, -OC(=O)Me, u -OC(=O)Et.

En una realización, cada uno de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es, independientemente, -H; -OH; -Me; -OMe, u -OC(=O)Me.

En una realización, cada uno de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es, independientemente, -H u -OH.

En una realización, cada uno de R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es -H y R<sup>3</sup> lo que se ha definido anteriormente:

20



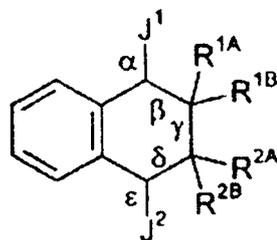
25

IX

30

En una realización, cada uno de R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es -H y R<sup>3</sup> es -H:

35



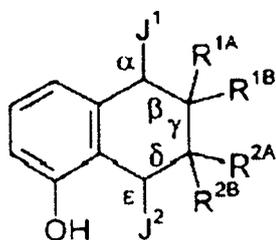
40

X

45

En una realización, cada uno de R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es -H y R<sup>3</sup> es -OH:

50



55

XI

60

*J*<sup>1</sup> y *J*<sup>2</sup>

Tal y como se ha demostrado en los ejemplos, los compuestos en los cuales *J*<sup>1</sup> y *J*<sup>2</sup> son ambos = O, o en los cuales son -OR<sup>7</sup> y -OR<sup>8</sup>, respectivamente, pueden ambos presentar elevadas actividades (comparar, por ejemplo, K3 y DH9; también DH5).

65

## ES 2 287 292 T3

Por lo tanto, en relación con la fórmula IV mencionada anteriormente, cada uno de R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es, independientemente, -H, -alquilo C<sub>1-7</sub> (incluyendo, por ejemplo, alquilo C<sub>1-7</sub> no sustituido, alquilo C<sub>1-7</sub> sustituido, tal como haloalquilo C<sub>1-7</sub>, hidroxialquilo C<sub>1-7</sub>, aminoalquilo C<sub>1-7</sub>, carboxialquilo C<sub>1-7</sub>, etc), acilo (incluyendo, por ejemplo, alquilacilo C<sub>1-7</sub>, por ejemplo, acetilo), -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub>M o sulfonato.

El término “acilo”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un grupo -C(=O)R, en el que R es un sustituyente acilo, por ejemplo, un grupo alquilo C<sub>1-7</sub> (identificado también como alquilacilo C<sub>1-7</sub> o alcanilo C<sub>1-7</sub>), un grupo heterociclilo C<sub>3-20</sub> (identificado también como heterocicilacilo C<sub>3-20</sub>), o un grupo arilo C<sub>5-20</sub> (identificado también como arilacilo C<sub>5-20</sub>, preferiblemente un grupo alquilo C<sub>1-7</sub>). Entre los ejemplos de grupos acilo se incluyen, sin que ello suponga ninguna limitación, -C(=O)CH<sub>3</sub> (acetilo), -C(=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (propionilo), -C(=O)C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (t-butirilo), y -C(=O)Ph (benzoilo, fenona).

En una realización, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> son iguales. En una realización, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> son distintos.

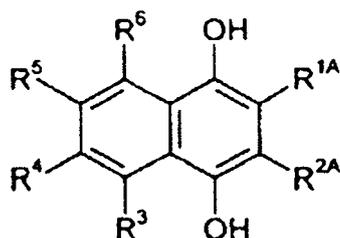
En una realización, cada uno de R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es, independientemente, -H, alquilo C<sub>1-7</sub>, alquilacilo C<sub>1-7</sub>, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub>M, o alquilsulfonato C<sub>1-7</sub>.

En una realización, cada uno de R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es, independientemente, -H; -Me, -Et, -nPr, -iPr, -nBu, -sBu, -iBu, -tBu, -C(=O)Me, -C(=O)Et, -C(=O)(nPr), -C(=O)(iPr), -C(=O)(nBu), -C(=O)(sBu), -C(=O)(iBu), o -C(=O)(tBu); -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub>M, -SO<sub>3</sub>Me, -SO<sub>3</sub>Et, -SO<sub>3</sub>(nPr), -SO<sub>3</sub>(iPr), -SO<sub>3</sub>(nBu), -SO<sub>3</sub>(sBu), -SO<sub>3</sub>(iBu), o -SO<sub>3</sub>(tBu).

En una realización, cada uno de R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es, independientemente, -H; -Me, -Et, -C(=O)Me, -C(=O)Et, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub>M, -SO<sub>3</sub>Me o -SO<sub>3</sub>Et.

En una realización, cada uno de R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es, independientemente, -H; -Me, -C(=O)Me, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub>M, ó -SO<sub>3</sub>Me.

En una realización, cada uno de R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es -H:



XII

Los compuestos preferidos de la invención son aquellos que muestran una elevada actividad en los ensayos descritos en el presente documento, particularmente el “ensayo I basado en células” descrito más adelante. Los compuestos preferidos tienen un B50 inferior a 10, más preferiblemente inferior a 5. De forma similar, los mismos tienen una baja toxicidad, con un Rxindx superior a 4, más preferiblemente superior a 10.

Tal y como se utilizará a partir de ahora, salvo que el contexto exija lo contrario, el término “compuesto vitamina K” pretende cubrir cualquiera de los compuestos tales como (por ejemplo, únicamente) menadiona, menadiol y sus diésteres y análogos de los mismos, según las fórmulas proporcionadas en el presente documento.

### 50 Usos de la presente invención

En un aspecto se describe el uso de un compuesto vitamina K para inhibir la agregación de una proteína, agregación ésta que va asociada a un estado de enfermedad.

En general, la agregación proteínica a la cual puede aplicarse la presente invención es la que surge de una interacción de polimerización conformacional inducida, a saber, una en la que un cambio conformacional de la proteína o en una de sus fragmentos proporciona una unión aplantillada y agregación de nuevas moléculas proteína (precursoras), de forma auto-propagadora. Una vez iniciada la nucleación, puede generarse una cascada de agregación, lo cual conlleva la polimerización conformacional inducida de nuevas moléculas proteína, conduciendo a la formación de fragmentos de producto tóxicos en agregados que son sustancialmente resistentes a nuevas proteólisis. Se considera que los agregados de proteína formados de este modo constituye la causa próxima de estados de enfermedad que se manifiestan como neurodegeneración, demencia clínica y otros síntomas patológicos.

#### Usos en relación con proteína Tau

Las realizaciones preferidas de la invención se basan en la inhibición de la agregación de la proteína tau. Cuando se utiliza en el presente documento, el término “proteína tau” hace generalmente referencia a cualquier proteína de la

familia de las proteínas tau. Las proteínas tau se caracterizan por ser una de entre un número más grande de familias de proteínas que co-purifican con microtúbulos durante ciclos repetidos de ensamblado y desensamblado (Shelanski *et al.*, (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70., 765-768), y son conocidas como proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs). Los componentes de la familia tau comparten las características comunes de tener un segmento N-terminal característico, secuencias de aproximadamente 50 aminoácidos insertadas en el segmento N-terminal, las cuales se regulan a nivel de desarrollo en el cerebro, una región de repetición tandem característica, que consiste en 3 o 4 repeticiones tandem de 31-32 aminoácidos y una cola C-terminal.

La MAP2 es la proteína asociada a microtúbulo predominante en el compartimiento somatodendrítico (Matus, A., en "Microtubules" [Hyams and Lloyd, eds.] pp. 155-166, John Wiley and Sons, NY). Las isomorfias MAP2 son casi idénticas a la proteína tau en la región de repetición tandem, pero difieren sustancialmente tanto en la secuencia como en la extensión del dominio N-terminal (Kindler and Garner (1994) Mol. Brain-224). Sin embargo, la agregación en la región de repetición tandem no resulta selectiva para el dominio de repetición tau. Por lo tanto, se apreciará el hecho de que cualquier discusión en el presente documento en relación con la proteína tau o la agregación tau-tau debe ser considerada también para la agregación tau-MAP2, la agregación MAP2-MAP2 y etc.

#### Otras proteínas

La Figura 4 muestra una Tabla que lista diversas otras proteínas agregantes asociadas a estados de enfermedad, la inhibición de las cuales forma parte de la presente invención. En cada uno de los casos, se lista también la enfermedad o enfermedades en las cuales puede desempeñar un papel clave el inicio de la agregación y/o la mutación de la(s) proteína(s).

Tal y como puede observarse a partir de la tabla, entre las enfermedades ejemplarizadas, las cuales se caracterizan por agregación proteínica patológica, se incluyen la enfermedad neuromotora y la enfermedad de cuerpos de Lewis. Además, la patogénesis de trastornos neurodegenerativos, tales como la enfermedad de Pick y la Parálisis Supranuclear Progresiva, parece estar relacionada con una acumulación de agregados tau patológicos en las células de circunvolución dentadas y en las células piramidales estrelladas del neocórtex, respectivamente, (Wischnik *et al.*, 2000, loc. Cit.). En la relación de otras "taupatías" a las cuales puede aplicarse la presente invención de incluyen la Taupatía Generalizada Familiar, la Degeneración Corticobasal, y la Enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker Familiar.

A la luz de la anterior discusión (y salvo que del contexto se deduzca lo contrario), se apreciará el hecho de que cuando las realizaciones de la invención se describen en relación con proteína tau o proteínas de tipo tau (por ejemplo, MAP2) la descripción debería ser considerada como de igual aplicación a las otras proteínas discutidas anteriormente (por ejemplo,  $\beta$ -amiloide, sinucleína, prión, etc) o a otras proteínas las cuales pueden iniciar o padecer una agregación patológica similar, en virtud de un cambio conformacional en un dominio crítico para la propagación de la agregación, o que impartan estabilidad proteolítica al agregado obtenido de esta forma (artículo de Wischnik *et al.* (en "Neurobiology of Alzheimer's Disease", 2nd Edition (2000) Eds. Dawbarn, D. and Allen, S.J., The Molecular and Cellular Neurobiology Series, Bios Scientific Publishers, Oxford). A la totalidad de las citadas proteínas se las puede identificar en el presente documento como "proteínas de enfermedad agregante". Las enfermedades pueden ser identificadas en el presente documento como "enfermedades de agregación proteínica".

De forma similar, cuando se hace mención en el presente documento a "agregación tau-tau", o similar, esto puede también significar que es aplicable a otra agregación de otras proteínas que tienen propiedades similares en este respecto, tales como la agregación  $\beta$ -amiloide, la agregación de prión y la agregación de sinucleína, etc. De modo similar, la "degradación proteolítica tau", etc.

#### Otros usos y procedimientos

Tal y como se ha descrito anteriormente, en un aspecto se discute el uso de un compuesto vitamina K para inhibir la agregación de una proteína, agregación que va asociada con un estado de enfermedad, tal y como se ha descrito anteriormente.

Una nueva realización se basa en un procedimiento para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad de agregación proteínica, tal y como se ha descrito anteriormente, comprendiendo el procedimiento la administración a un sujeto de un compuesto vitamina K o una composición terapéutica que comprende el mismo, con vistas a inhibir la agregación de la proteína asociada con el citado estado de enfermedad.

En una nueva realización se describe un compuesto vitamina K o una composición terapéutica que comprende el mismo, para su utilización en un procedimiento de tratamiento o profilaxis de una enfermedad de agregación proteínica, tal y como se ha descrito anteriormente, procedimiento éste que comprende la administración a un sujeto del compuesto vitamina K o una composición, con vistas a inhibir la agregación de la proteína asociada con el citado estado de enfermedad.

En una nueva realización se discute el uso de un compuesto Vitamina K en la preparación de un medicamento para ser utilizado en un procedimiento de tratamiento o profilaxis de una enfermedad de agregación proteínica, tal y como se ha descrito anteriormente, procedimiento que comprende la administración a un sujeto del medicamento con vistas a inhibir la agregación de la proteína asociada con el citado estado de enfermedad.

En una realización se describe un procedimiento para regular la agregación de una proteína en el cerebro de un mamífero, agregación ésta que está asociada con un estado de enfermedad tal y como se ha descrito anteriormente, comprendiendo el tratamiento el paso de administrar al citado mamífero que necesite del citado tratamiento una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la citada agregación, en donde el inhibidor es un compuesto vitamina K.

En otra realización de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la inhibición de la producción de agregados proteínicos (por ejemplo, en forma de PHFs, opcionalmente en NFTs) en el cerebro de un mamífero, siendo el tratamiento tal y como se ha descrito anteriormente.

Los compuestos vitamina K pueden ser administrados en solitario o en combinación con otros tratamientos, ya sea de forma simultánea o secuencial, en función de la dolencia o enfermedad que tenga que ser tratada. En particular, puede resultar deseable utilizar o formular los compuestos vitamina K con otros inhibidores de la reacción de agregación proteínica relevante, por ejemplo, en el caso de Tau, puede tratarse de compuestos como los descritos en el documento WO 96/30766 o en la solicitud anterior, no publicada, GB 0101049.5, cuyos contenidos se incorporan al presente documento como referencia.

En la relación de otros agentes terapéuticos para el tratamiento de, por ejemplo, AD, con los cuales puede combinarse la presente invención se incluyen inhibidores de colinesterasa, tales como donazepilo, agonistas de receptores muscarínicos e inhibidores beta-amiloides.

Un nuevo aspecto de la presente invención proporciona una composición de combinación terapéutica, que comprende un compuesto vitamina K más un compuesto adicional.

#### *Dosificación de productos terapéuticos*

La administración de compuestos, composiciones o medicamentos tal y como se ha escrito en el presente documento se lleva a cabo en una "cantidad profilácticamente eficaz" o en una "cantidad terapéuticamente eficaz" (según sea el caso, si bien la profilaxis puede ser considerada como terapia), resultando ello suficiente para mostrar un beneficio para el individuo. La cantidad real administrada y la frecuencia y duración de la administración dependerán de la naturaleza y de la gravedad de la enfermedad que esté siendo tratada.

La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre dosificación, etc, pertenece al campo de responsabilidad de los doctores de medicina general y de otros doctores en medicina y, habitualmente, tiene en cuenta el trastorno que tiene que ser tratado, el estado del paciente individual, el punto de administración, el procedimiento de administración y otros factores conocidos por los doctores.

Habitualmente, el mamífero será un humano, si bien la utilización en animales (por ejemplo, a los efectos de comprobación, o con finalidad veterinaria) queda también cubierta por esta invención.

Las dosis diarias permitidas recomendadas para la vitamina k varían desde entre aproximadamente 10 y 20  $\mu\text{g}/\text{día}$  (niños); entre 15 y 60  $\mu\text{g}/\text{día}$  (niños y jóvenes hasta 11 años), y entre 50 y 140  $\mu\text{g}/\text{día}$  (niños de más de 11 años y adultos) (RDAs para USA, 1980). Otros informes recomiendan entre 0,01 y 0,03 mg/kilogramo de peso corporal (ver Friedrich, 1988, loc cit, discusión de la página 319-320). Los compuestos vitamina K, tales como los utilizados en la presente invención, pueden ser administrados en cantidades superiores a o iguales a los 10 mg/por día o superior para un adulto de 70 Kg (según los datos del British National Formulary, publicado por la Royal Pharmaceutical Society de Gran Bretaña).

#### *Formulación y administración de productos terapéuticos*

Compuestos adecuados, tales como los de la fórmula mostrada anteriormente o sus sales farmacéuticamente aceptables, pueden ser incorporados en composiciones de este aspecto de la presente invención, después de comprobaciones adicionales en lo concerniente a su toxicidad.

Las composiciones pueden incluir, además de los constituyentes mencionados anteriormente, excipientes farmacéuticamente aceptables, agentes conservantes, solubilizantes, sustancias que incrementan la viscosidad, agentes estabilizantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes edulcorantes, agentes colorantes, agentes aromatizantes, sales para variar la presión osmótica, tampones, o agentes de recubrimiento. Los citados materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del soporte o de otro material dependerá de la ruta de administración. En la publicación "Remington's Pharmaceutical Sciences", 16th edition, Osol, A. 1980, pueden encontrarse ejemplos de técnicas y protocolos. Daabis & Khawas (1969 Pharmazie 24, 750) y Fattah and Daabis (1977, Pharmazie 32 H.4, 232, hacen referencia a compuestos que afectan a la estabilidad de la menadiona (vitamina K3).

Cuando la composición se formula en forma de composición farmacéutica, la administración de la misma puede ser efectuada parenteralmente, tal como por vía oral, en forma de polvos, comprimidos, comprimidos revestidos, grageas, cápsulas de gelatina dura y blanda, soluciones, emulsiones o suspensiones, por vía nasal (por ejemplo, en forma de rociadores nasales) o rectal (por ejemplo, en forma de supositorios). No obstante, la administración puede ser

## ES 2 287 292 T3

también efectuada parenteralmente, tal como intramuscularmente, intravenosamente, cutáneamente, subcutáneamente o intraperitonealmente (por ejemplo, en forma de soluciones para inyección).

Así pues, por ejemplo, cuando la composición farmacéutica es en forma de comprimidos, la misma puede incluir un soporte sólido, tal como gelatina o un adyuvante. Para la fabricación de los comprimidos, comprimidos revestidos, grageas y cápsulas de gelatina duras, los compuestos activos y sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables puede ser procesados con excipientes orgánicos, inorgánicos o inertes farmacéuticamente. Como excipientes para los comprimidos, grageas y cápsulas de gelatinas duras pueden utilizarse, por ejemplo, lactosa, maíz, almidón o derivados de los mismos, talco, ácido esteárico o sus sales. Resultan excipientes adecuados para las cápsulas de gelatina blanda, por ejemplo, los aceites vegetales, ceras, grasas, polioles líquidos y semi-sólidos, etc. Cuando la composición se presenta en forma de formulación farmacéutica líquida, la misma incluirá generalmente un soporte líquido, tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Pueden también incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacárido o glicoles, tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Otros excipientes adecuados para la fabricación de soluciones y jarabes son, por ejemplo, agua, polioles, sacarosa, azúcar invertido, glucosa, trihalosa, etc. Constituyen excipientes adecuados para inyección, por ejemplo, agua, alcoholes, polioles, glicerol, aceites vegetales, etc. Para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o infusión intracateter en el cerebro, el ingrediente activo estará en forma de solución acuosa parenteralmente aceptable, exenta de pirógenos, y con un pH, isotonicidad y estabilidad adecuadas. Los expertos en la materia serán capaces de preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos, tales como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de lactato de Ringer. Pueden también incluirse conservantes, estabilizantes, tampones, y/o otros aditivos, según necesidades.

Preparaciones orales y parenterales de vitamina K1 y de vitamina K3 se encuentran comercialmente disponibles (si bien no para los usos descritos en el presente documento).

La descripción de cualquier referencia cruzada efectuada en el presente documento, en la medida en la que ello pueda ser requerido por parte de un experto en la materia para suplementar la presente descripción, resulta específicamente incorporada en el presente documento.

La invención será descrita ahora adicionalmente con relación a las siguientes Figuras y Ejemplos no limitativos. Otras realizaciones de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia, a la luz de las mismas.

### Figuras

La Figura 1 muestra la unión tau-tubulina *in vitro*, en presencia de Vitamina K2.

La Figura 2a muestra las estructuras de las vitaminas K1-K3 y de 2,3-dimetil-1,4-naftoquinona (denominada DH10).

La Figura 2b muestra dos derivados 5-hidroxi-1,4-naftoquinona (denominados DH14 y DH2). Un nuevo compuesto (denominado DH16) es incluido para comparación.

La Figura 2c muestra el efecto de la presencia de un hidroxilo en la posición 2' en tres compuestos (denominados DH15, DH7 y DH1).

La Figura 2d muestra el efecto de la presencia de un grupo sulfato y bisulfito en la posición 2' (compuestos denominados DH8, DH3). Se muestra también un derivado alcoxi de la presente invención (DH17) y un nuevo compuesto (denominado DH19, que incluye un haluro), el cual es incluido para comparación.

La Figura 2e muestra dos compuestos 1,4-naftoquinoles, examinados (compuestos denominados DH4, DH5).

La Figura 2f muestra el efecto de sustituciones acetato y sulfato (compuestos denominados DH9, DH11, DH13).

La Figura 2g muestra el efecto de sustituciones alcoxi y metilo (compuesto denominado DH18) y un nuevo compuesto (denominado DH20, que incluye un haluro), el cual se incluye para comparación.

Las Figuras 3a y 3b muestran la inhibición de la agregación tau-tau utilizando el ensayo II de base celular.

La Figura 4 muestra una tabla que lista otras diversas proteínas agregantes asociadas con enfermedad, las cuales pueden ser utilizadas en la presente invención.

La Figura 5 es una representación esquemática del ensayo de agregación *in vitro* de WO 96/30766, en el que se mide la unión de dos unidades truncadas. La especie que termina en Ala-390 ("a") es primero revestida en la placa ELISA (en tampón carbonato sódico: 50 mM, pH 9,6). Seguidamente, una segunda especie tau truncada que termina en Glu-391 ("e") es incubada en diversas condiciones de tamponamiento. Tan solo la especie "e" es reconocida por mAb 423 y, por lo tanto, la inmunoreactividad a mAb 423 determina tan solo la tau que se ha unido durante la segunda incubación.

## ES 2 287 292 T3

La Figura 6a es una representación esquemática del proceso en el que se basa el ensayo I de base celular (“T40/12kD”). Muestra como la inducción de tau de longitud completa puede conducir a su conversión en un fragmento de 12 kD, siempre y cuando exista algo de 12kD tau en la célula. Las Figuras 6b-e son resultados de ejemplos obtenidos a partir del ensayo que utiliza DH15 (resultado negativo), vitamina K3, DH9 y DH17.

5

La Figura 7 es una representación esquemática del ensayo II de base celular (“SSK40/25kD”).

### Ejemplos

#### 10 Procedimientos

##### *Ensayo in vitro*

Este se describe en detalle en el documento WO 96/30766. Brevemente, un fragmento de tau correspondiente al dominio de repetición del núcleo, el cual ha sido adsorbido en un sustrato en fase sólida, es capaz de capturar tau soluble de longitud completa y de unirse a tau con elevada afinidad. Esta asociación confiere estabilidad frente a la digestión proteolítica de las moléculas tau agregadas. El proceso es auto-propagante y puede ser bloqueado de forma selectiva mediante agentes farmacéuticos prototipo (Wisshik, C.M. *et al.* (1996), loc. cit.).

20 El ensayo se muestra de forma esquemática en la Figura 5.

##### *Ensayo I basado en célula (“T40/12kD”)*

En esencia, células de fibroblasto (3T6) expresan tau de longitud completa (“T40”) bajo control de un favorecedor inducible y niveles constitutivos bajos del fragmento tau PHF-núcleo (fragmento 12 kD). Cuando se induce la expresión T40, la misma sufre truncación en función de la agregación dentro de la célula, N-terminalmente a aproximadamente  $\alpha\alpha 295$  y C-terminalmente a aproximadamente  $\alpha\alpha 390$ , produciendo con ello niveles elevados del fragmento de dominio núcleo-12 kD PHF. La producción del fragmento 12 kD puede ser bloqueada de un modo dependiente de la dosis, a través de inhibidores de agregación tau. Ciertamente, la cuantificación de la actividad inhibidora de los compuestos con relación a la generación proteolítica del fragmento 12 kD dentro de las células puede ser descrita completamente en términos de los mismos parámetros que describen la inhibición de la unión tau-tau *in vitro*. Es decir, la extensión de la generación proteolítica del fragmento 12 kD dentro de las células es determinada completamente por la extensión de la unión tau-tau a través del dominio de repetición. La disponibilidad de las proteasas relevantes dentro de la célula no es limitativa.

35

El proceso se muestra de forma esquemática en la Figura 6a, proporcionándose los resultados de los ejemplos en las Figuras 6b-6d. El proceso se describe en mayor detalle en la solicitud GB 0101049.5 no publicada.

##### *Parámetros utilizados en el ensayo I basado en célula*

40

Los datos celulares observados para la producción de la banda 12 kD pueden ser adaptados estrechamente (a saber, observados frente a coeficiente de correlación anticipados  $> 0,9$ ), a una función estándar que describe la inhibición de la unión tau-tau *in vitro*. Para obtener esta adaptación, necesitan efectuarse dos asunciones, las cuales están en consonancia con los resultados obtenidos a partir de estudios *in vitro*, basados en células:

45

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

50 Cuando se efectúan estas asunciones, la función:

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

55 puede ser solucionada a través de procedimientos numéricos estándar, para derivar un valor para  $K_I$  aparente. La comparación con valores observados para la unión tau-tau *in vitro*, a una concentración tau de 500 nM, en la que se sabe que el valor  $K_d$  para la unión tau-tau es 22 nM, confirma que el único determinante de la producción de la unidad núcleo tau proteolíticamente estable de PHF dentro de la célula es simplemente la extensión de la unión tau-tau.

60 Se ha establecido un nuevo parámetro, B50, en relación con compuestos ejemplificados en el presente documento. El valor B50 es la concentración determinada del compuesto de prueba utilizado en el ensayo celular en el que la producción relativa de la banda 12 kD procedente de tau de longitud completa se reducía hasta el 50% de la observada en ausencia de compuesto. Esto proporciona una indicación de la concentración tisular que sería necesaria para alcanzar la correspondiente actividad *in vivo*. En general, existe una relación aproximadamente lineal entre el valor  $K_I$  aparente y el valor B50, la cual puede ser utilizada para derivar el valor  $K_I$

65

$$B50 (\mu\text{M}) = 0,0217 \times K_I (\text{nM})$$

## ES 2 287 292 T3

### *Ensayo II basado en célula (“ssK40/25kD”)*

El procedimiento se describe con mayor detalle en la solicitud no publicada GB 0100119.7 que constituye estado de la técnica. Tal y como se demuestra en el presente documento, la expresión constitutiva de tau dirigida a membrana (sstau190-441, “ssK40”) se traduce en la producción de dos específicos productos de rotura: una especie menor de 30kD (“K30”), en la que el fragmento está truncado terminalmente en C, en el resto 390, y una especie mayor 25 kD (“K25”), en la que el fragmento está truncado N-terminalmente en el resto -295. Estos puntos de rotura, correspondientes a las fronteras conocidas del dominio PHF-núcleo, indican que su generación dentro de la célula depende de la agregación tau similar a PHF, a través de una alineación antiparalela de fase desplazada del dominio de repetición.

Esto se muestra de forma esquemática en la Figura 7. Cuando la expresión de tau de longitud completa (T40) es activada bajo control de un favorecedor inducible en células que expresan de forma constitutiva el fragmento ssK40 dirigido a membrana, la T40 es procesada de forma proteolítica para proporcionar un fragmento K40 (truncación N-terminal a aproximadamente  $\alpha\alpha$  185), un fragmento K30 (truncación C-terminal a aproximadamente  $\alpha\alpha$  390) y un fragmento K25 (truncación N-terminal a aproximadamente  $\alpha\alpha$  295).

#### Ejemplo 1

##### *Unión in vitro tau-tau y tau-tubulina*

Se averiguó que la vitamina K2 presentaba cierta actividad en ensayo de unión tau-tau *in vitro*. Para valores inferiores a 100  $\mu\text{M}$ , el valor KI aparente *in vitro* es 942 nM. No obstante, la vitamina K2 no inhibe la unión tau-tubulina *in vitro* a concentraciones de hasta 500  $\mu\text{M}$  (a saber, relación molar 2500:1 en relación con tau en las condiciones del ensayo) - ver la Figura 1.

Datos adicionales (no mostrados) demostraron que DH3 (Figura 2d) provocaba la inhibición a concentraciones superiores a o iguales a 50  $\mu\text{M}$  (con una concentración tau 100 nm). No obstante, la menadiona (Figura 2a) no mostró actividad alguna en el ensayo *in vitro*, debido posiblemente a su solubilidad reducida.

En esta base, se llevó a cabo una caracterización adicional estructura-actividad, utilizando los ensayos basados en células que pueden ser utilizados de forma más rápida con compuestos de diferentes solubilidades.

#### Ejemplo 2

##### *Inhibición tau-tau utilizando el ensayo I basado en célula*

La Figura 2a muestra las estructuras de las vitaminas K1-K3 y de 2,3-dimetil-1,4-naftoquinona (denominada DH10), la cual está estrechamente relacionada con K3 (2-metil-1,4-naftoquinona (menadiol)).

Se listan los valores correspondientes para KI aparente y B50, calculados a partir de los datos celulares utilizando el ensayo celular T40/12kD, para determinar la extensión de la inhibición de la unión tau-tau, tal y como se ha descrito anteriormente.

A través de la comparación de estructuras con actividad inhibitoria en células, resulta evidente que las cadenas más largas en la posición 3' están asociadas con actividad reducida.

La Figura 2b muestra dos derivados 5-hidroxi-1,4-naftoquinona. La comparación de DH14 y DH2 sugiere que el grupo metilo en la posición 3' puede resultar preferido para reforzar la actividad y que el grupo hidroxilo en la posición 5' no resulta perjudicial. Se demostró que DH2 resultaba el más tóxico de todos los compuestos objeto de comprobación, con un valor LD50 celular de 2,1  $\mu\text{M}$ . El compuesto DH16 no mostró actividad alguna.

La Figura 2c muestra el efecto de la presencia de un hidroxilo en la posición 2' en tres compuestos. Tal y como puede observarse a partir de DH15 y DH17, un hidroxilo en la posición 2' parece resultar perjudicial para la actividad. No obstante, con el derivado 3-fenilo (H1) puede observarse una actividad débil.

La Figura 2d muestra el efecto de la presencia de un grupo sulfato en la posición 2'. Tal y como puede observarse, un grupo sulfato puede ser ubicado en esta posición sin que tenga lugar una sustancial pérdida de actividad. No obstante, el bisulfato (una forma de K3 ampliamente utilizada como suplemento alimenticio animal) presenta una actividad reducida. El derivado metoxi (DH17) mostró una buena actividad, tal y como era de esperar mediante la comparación con vitamina K<sub>3</sub> en la Figura 2a. El compuesto presentado como DH19 no mostraba actividad alguna como inhibidor de agregación, y ciertamente parecía que el mismo podía ser un pro-agregante (resultados no mostrados). Esto sugiere que los compuestos que tienen las propiedades de enolización del DH19 pueden resultar no deseables.

La Figura 2a muestra los resultados obtenidos cuando dos 1,4-naftoquinoles eran comparados. El dicarbonitrilo resultaba completamente inactivo, el ácido naftoico presentaba actividad en experimentos preliminares. El ácido naftólico se encontraba generalmente presente en vegetales y es el precursor natural para la síntesis de naftoquinonas superiores en vegetales frondosos y en bacterias.

## ES 2 287 292 T3

La Figura 2f muestra el efecto de sustituciones acetato y sulfato en las posiciones 1 y 4. Tal como puede observarse a partir de esta serie, el 2-metil diacetato (DH9) es muy activo, mientras que el 2,3-dimetil diacetato (DH11) presenta una actividad reducida, al igual que ocurre con las correspondientes naftoquinonas. El 2-metil disulfato presenta una actividad intermedia.

La Figura 2g muestra un compuesto relacionado con DH10 en la Figura 2a, pero en el que un grupo metilo ha sido sustituido por un metoxi (DH18). De nuevo, esto presenta actividad (cf. DH17 y K3). El compuesto mostrado como DH20 no mostró actividad alguna como inhibidor de agregación y, ciertamente, parecía que podría ser un pre-agregante (resultados no mostrados)

### Ejemplo 3

#### *Inhibición tau-tau utilizando ensayo II de base celular*

Para confirmar los resultados obtenidos utilizando en ensayo I de base celular, se llevaron a cabo experimentos adicionales con el ensayo II de base celular.

Las Figuras 3a y 3b muestran que este procesado proteolítico puede ser bloqueado en este sistema utilizando Vitamina K3 (menadiona) a concentraciones de entre 1 y 2  $\mu\text{M}$ . La Figura 3a muestra que la conversión de T40 en T25 se reduce hasta aproximadamente 1/4 de la observada con vitamina K3, y la Figura 3b muestra que la conversión de K40 en K25 es reducida hasta aproximadamente 1/2 de la observada sin K3. A partir de esto puede deducirse que la conversión de T40 en K40 es también reducida hasta aproximadamente 1/2 de la observada sin K3.

### Ejemplo 4

#### *Toxicidad utilizando en ensayo I de base celular*

La toxicidad de los compuestos descritos anteriormente puede ser valorada en el ensayo celular T40/12kD utilizado para valorar la actividad. La toxicidad fue medida a través de números celulares después de transcurridas 24 horas de exposición para el compuesto que utiliza un kit para ensayo lactato-deshidrogenasa TOX-7 (Sigma Biosciences), según las instrucciones del fabricante después de la lisis de las células remanentes. Alternativamente, se utilizó un kit procedente de Promega UK (CytoTox 96), de nuevo según las instrucciones del fabricante.

De este análisis destacan dos importantes conclusiones:

1. No existe correlación entre la actividad de los compuestos como inhibidores de la agregación tau-tau y su toxicidad en el ensayo;
2. Considerando los compuestos objeto de comprobación por el momento, varios de ellos presentan valores KI similares de aproximadamente 120 nM, correspondientes a un nivel de actividad celular B50 de 2,6  $\mu\text{M}$ . No obstante, los mismos difieren en la toxicidad relativa, tal y como se expresa a través del valor LD50. Un compuesto preferido en este grupo para uso clínico puede ser el que presenta el valor LD50 más elevado. Un índice terapéutico (Rxindx) ha sido calculado para cada uno de los compuestos objeto de comprobación en los ensayos celulares, tal y como se indica:

$$\text{RxIndx} = \text{LD50} / \text{B50}$$

Determinados compuestos descritos anteriormente pueden ser ubicados en el orden:

Compuesto	KI (nM)	B50 ( $\mu\text{M}$ )	$r^*$	LD50 ( $\mu\text{M}$ )	Rxindx
K3	128	2,78	0,925	44,92	16,17
DH10	221	4,80	0,935	66,71	13,91
DH5	118	2,56	0,776	34,29	13,39
DH1	513	11,13	0,864	100,97	9,07
DH8	157	3,41	0,964	18,55	5,45
DH13	263	5,71	0,956	30,90	5,41
DH9	127	2,76	0,988	13,09	4,75
DH3	630	13,68	0,944	63,36	4,63
DH11	674	14,63	0,950	12,13	0,83

\* es una indicación de la bondad de adaptación de la función a los datos

## Referencias para la Figura 4

- 5 **Abrahamson, M., Jonsdottir, S., Olafson, I., & Grubb, A. (1992)** Hereditary cystatin C amyloid angiopathy identification of the disease-causing mutation and specific diagnosis by polymerase chain reaction based analysis. *Human Genetics* 89, 377-380.
- 10 **Booth, D.R., Sunde, M., Bellotti, V., Robinson, C.V., Hutchinson, W.L. Fraser, P.E. Hawkins, P.N., Dobson, C.M., Radford, S.E., Blake, C.C.F. & Pepys, M.B. (1997)** Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. *Nature* 385, 787-793.
- 15 **Carrell, R.W. & Gooptu, B. (1998)** Conformational changes and disease-serpins, prions and Alzheimer's. *Current Opinion in Structural Biology* 8, 799-809.
- 20 **Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi, G. & Dobson, C. (1999)** Designing conditions for *in vitro* formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96, 3590-3594.
- 25 **Czech, C., Tremp, G & Pradler, L. (2000)** Presenillins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms. *Progress in Neurobiology* 60, 363-384.
- 30 **Davis, R.L., Shrimpton, A.E. Holohan, P.D., Bradshaw, C., Feiglin, D., Collins, G.H., Sonderegger, P., Kinter, J., Becker, L.M., Lachawam, F., Kranewich, D., Muenke, M., Lawrence, D.A., Yerbi, M.S. Shaw, C.M., Gooptu, B., Elliott, P.R., Finch, J.T. Carrell, R.W. & Lomas, D.A. (1999)** Familial dementia caused by polymerization of mutant neuroserpin. *Nature* 401, 376-379.
- 35 **DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K.O., Davies, S.W., Bates, G.P., Vonsattel, J.P. & Aronin, N. (1997)** Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neuritis in brain. *Science* 277, 1990-1993.
- 40 **Dische, F.E., Wermstedt, C., Westermark, G.T., Westermark, P., Pepys, M.B., Rennie, J.A., Gilbey, S.G. & Watkins, P.J. (1988)** Insulin as an amyloid-fibril protein at sites of repeated insulin injections in a diabetic patient. *Diabetologia* 31, 158-161.
- 45 **Gasset, M., Bladwin, M.A., Lloyd, D., Abriel, J.-M., Holtzman, D.M., Cohen, F.E., Fletterick, R. & Prusiner, S.B. (1992)** Predicted  $\alpha$ -helical region of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 89, 10940-10944.
- 50 **Glenner, G.G. & Wong, C.W. (1984)** Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 120, 885-890.
- 55 **Goate, A., Chartier-Harlin, M.-C., Mullan, M., Browns, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., Mant, R., Newton, P., Rooke, K., Roques, P., Talbot, C., Pericak-Vance, M., Roses, A., Williamson, R., Rossor, M., Owen, M. & Hardy, J. (1991)** Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704-706.
- 60 **Gorevic, P.D., Casey, T.T., Stone, W.J., DiRaimondo, C.R., Prelli, F.C. & Frangione, B. (1985)** b-2 Microglobulin is an amyloidogenic protein in man. *Journal of Clinical Investigation* 76, 2425-2429.
- 65 **Gustavsson, A., Engström, U. & Westermark, P. (1991)** Normal transthyretin and synthetic transthyretin fragments from amyloid-like fibrils *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 175, 1159-1164.
- 70 **Hutton, M., Lendon, C., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J. Lincoln, S. Dickinson, D., Davies, P., Petersen, R.C., Stevens, M., de Graaf, E., Wauters, E., van Baren, J., Hillebrand, M., Joose, M., Kwon, J.M., Nowotny, P., Che, L.K., Norton, J., Morris, J.C., Reed, L.A., Trojanowski, J.Q., Basun, H., Lannfelt, L., Neystat, M., Fahn, S., Dark, F., Tannenberg, T., Dodd, P.R., Hayward, N., Kwok, J.B.J., Schofield, P.R., Andreadis, A., Snowden, J., Craufurd, D., Neary, D., Owen, F., Oostra, B.A., Hardy, J., Goate, A., van Swieten, J., Mann, D., Lynch, T. & Heutink, P. (1988)** Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17, *Nature* 393, 702-705.
- 75 **Johanson, B., Wernstedt, C., & Westermark, P. (1987)** Atrial natriuretic peptide deposited as atrial amyloid fibrils. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 148, 1087-1092.
- 80 **Lomas, D.A., Evans, D.L., Finch, J.T. & Carrell, R.W. (1992)** The mechanism of Z  $\alpha$ 1-antitrypsin accumulation in the liver. *Nature* 357, 605-607.
- 85 **Maury, C.P. & Baumann, M. (1990)** isolation and characterization of cardiac amyloid in familial amyloid polyneuropathy type IV (Finnish): relation of the amyloid protein to variant gelsolin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1096, 84-86.

## ES 2 287 292 T3

**Paulson, H.L.** (1999) Human genetics'99: trinucleotide repeats. *American Journal of Human Genetics* 64, 339-345.

5 **Pepys, M.B., Hawkins, P.N., Booth, D.R., Vigushin, D.M., Tennent, G.A., Soutar, A.K., Totty, N., Nguyen, O., Blake, C.C.F., Terry, C.J., Feest, T.G., Zallin, A.M. & Hsuan, J.J.** (1993) Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. *Nature* 362, 553-557.

10 **Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejla, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papaetropoulos, T., Jonhson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I. & Nussbaum, R.L.** (1997) Mutation in the a-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045-2047.

**Prusiner, S.B., Scott, M.R., DeAmond, S.J. & Cohen, F.E.** (1998) Prion protein biology. *Cell* 93, 337-348.

15 **Shibata, N., Hirano, A., Kobayashi, M., Siddique, T., Deng, H.X., Hung, W.Y., Kato, T. & Asayama, K.** (1996) Intense superoxide dismutase-1 immunoreactivity in intracytoplasmic hyaline inclusions of familial amyotrophic lateral sclerosis with posterior columns involvement. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 55, 481-490.

20 **Sletten, K., Westermark, P. & Natvig, J.B.** (1976) Characterization of amyloid fibril proteins from medullary carcinoma of the thyroid. *Journal of Experimental Medicine* 143, 993-998.

25 **Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M. & Goedert, M** (1998) a-Synuclein in filamentous inclusions of Lewis bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95, 6469-6473.

**Uemichi, T., Liuepnicks, J.J. & Benson, M.D.** (1994) Hereditary renal amyloidosis with a novel variant fibrinogen. *Journal of Clinical Investigation* 93, 731-736.

30 **Westermark, P. Engstrom, U., Johnson, K.H., Westermark, G.T. & Betsholts, C.** (1990) Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 87, 5036-5040.

35 **Westermark, P., Johnson, K.H., O'Brien, T.D. & Betsholts, C.** (1992) Islet amyloid polypeptide-a novel controversy in diabetes research. *Diabetologia* 35, 297-303.

**Westermark, P., Johnson, K.H. & Pitkanen, P.** (1985) Systemic amyloidosis: A review with emphasis on pathogenesis. *Applied Physiology* 3, 55-68.

40 **Wischnik, C.M., Novak, M., Thogersen, H.C. Edwards, P.C., Runswick, M.J., Jakes, R., Walker, J.E., Milstein, C., M.R. & Klug, A** (1988). Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 85, 4506-4510.

45

50

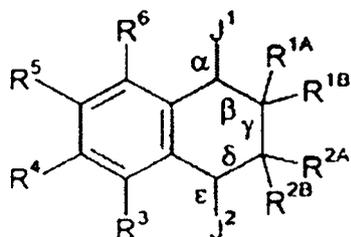
55

60

65

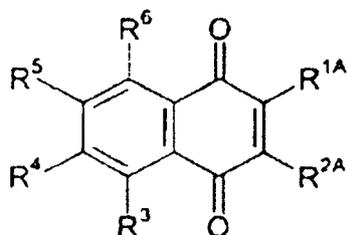
REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto en la preparación de un medicamento para la inhibición de la agregación de una proteína, agregación que está asociada con un estado de enfermedad manifestado como neurodegeneración y/o demencia clínica, en el que el compuesto es seleccionado a partir de compuestos de fórmula I:



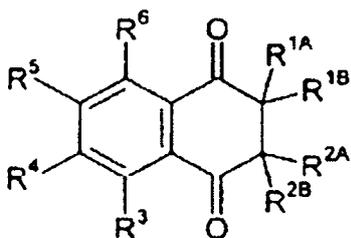
I

En la que J<sup>1</sup> y J<sup>2</sup> son ambos = O; los enlaces covalentes marcados como β y δ son enlaces sencillos y el enlace covalente marcado como γ es un enlace doble, estando R<sup>1B</sup> y R<sup>2B</sup> ambos ausentes:



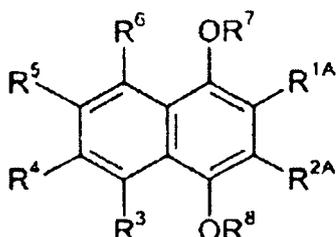
II

J<sup>1</sup> y J<sup>2</sup> son ambos = O; los enlaces covalentes marcados como β y δ son enlaces sencillos y el enlace covalente marcado como γ es un enlace sencillo:



III

J<sup>1</sup> es -OR<sup>7</sup> y J<sup>2</sup> es -OR<sup>8</sup>; los enlaces covalentes marcados como β y δ son enlaces dobles, y el enlace covalente marcado como γ es un enlace sencillo, estando R<sup>1B</sup> y R<sup>2B</sup> estando ambos ausentes:



IV

## ES 2 287 292 T3

En donde:

R<sup>1A</sup> es: -H, alquilo C<sub>1-7</sub> no sustituido, haloalquilo C<sub>1-7</sub>, hidroxialquilo C<sub>1-7</sub>, aminoalquilo C<sub>1-7</sub>, carboxialquilo C<sub>1-7</sub>, -OH, alcoxi C<sub>1-7</sub>, aciloxi, -COOH, éster, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub>M, sulfonato, alquilsulfonato C<sub>1-7</sub> o un grupo alquilo de cadena corta;

R<sup>2A</sup> es: -H, alquilo C<sub>1-7</sub> no sustituido, haloalquilo C<sub>1-7</sub>, hidroxialquilo C<sub>1-7</sub>, aminoalquilo C<sub>1-7</sub>, carboxialquilo C<sub>1-7</sub>, -OH, alcoxi C<sub>1-7</sub>, aciloxi, -COOH, éster, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub>M, sulfonato, alquilsulfonato C<sub>1-7</sub> o un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene entre 1 y 15 átomos de carbono, que puede estar saturado o parcialmente insaturado;

R<sup>1B</sup>, si está presente, es: -H, alquilo C<sub>1-7</sub> no sustituido, haloalquilo C<sub>1-7</sub>, hidroxialquilo C<sub>1-7</sub>, aminoalquilo C<sub>1-7</sub>, carboxialquilo C<sub>1-7</sub>, -OH, alcoxi C<sub>1-7</sub>, aciloxi, -COOH, éster, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub>M, sulfonato, alquilsulfonato C<sub>1-7</sub> o un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene entre 1 y 15 átomos de carbono, que puede estar saturado o parcialmente insaturado;

R<sup>2B</sup>, si está presente, es: -H, alquilo C<sub>1-7</sub> no sustituido, haloalquilo C<sub>1-7</sub>, hidroxialquilo C<sub>1-7</sub>, aminoalquilo C<sub>1-7</sub>, carboxialquilo C<sub>1-7</sub>, -OH, alcoxi C<sub>1-7</sub>, aciloxi, -COOH, éster, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub>M, sulfonato, alquilsulfonato C<sub>1-7</sub> o un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene entre 1 y 15 átomos de carbono, que puede estar saturado o parcialmente insaturado;

R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es, independientemente, -H, -OH, alquilo C<sub>1-7</sub>, alcoxi C<sub>1-7</sub> o aciloxi; y

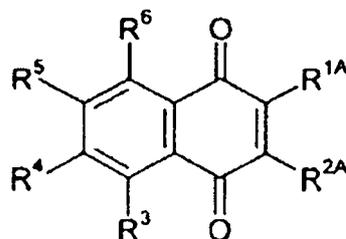
R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es, independientemente: -H, alquilo C<sub>1-7</sub>, acilo, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub>M, o sulfonato;

M denota un catión o cationes de carga o carga acumulada para contrarrestar la carga sobre el grupo -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>;

Y en donde, si el compuesto es un compuesto de fórmula II, entonces: R<sup>1A</sup> es: -OMe, -OC(=O)Me, -COOH, -COOMe, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub>M o -SO<sub>3</sub>Me;

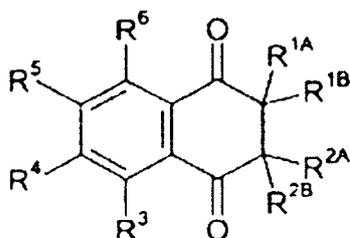
Y sus sales, solvatos, amidas, ésteres y éteres de los mismos, farmacéuticamente aceptables.

2. Uso como el reivindicado en la reivindicación 1 en el que J<sup>1</sup> y J<sup>2</sup> son ambos = O; los enlaces covalentes marcados como β y δ son enlaces sencillos; y el enlace covalente marcado como γ es un doble enlace con R<sup>1B</sup> y R<sup>2B</sup> estando ambos ausentes:



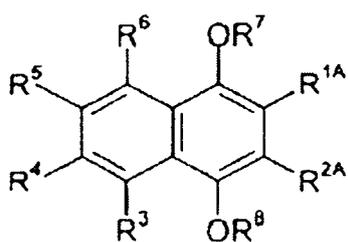
II

3. Uso como el reivindicado en la reivindicación 1, en el que J<sup>1</sup> y J<sup>2</sup> son ambos = O; los enlaces covalentes marcados como β y δ son enlaces sencillos; y el enlace covalente marcado como γ es un enlace sencillo:



III

4. Uso como el reivindicado en la reivindicación 1 en el que J<sup>1</sup> es -OR<sup>7</sup> y J<sup>2</sup> es -OR<sup>8</sup>; los enlaces covalentes marcados como β y δ son dobles enlaces; y el enlace covalente marcado como γ es un enlace sencillo, estando R<sup>1B</sup> y R<sup>2B</sup> ambos ausentes:



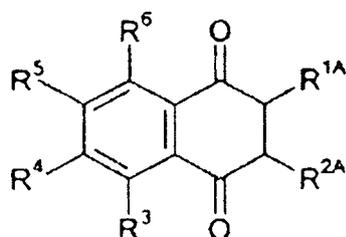
IV

5. Uso como el reivindicado en la reivindicación 4, en el que cada uno de R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es, independientemente, -H, -Me, -C(=O)Me, -C(=O)Et, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub>M, -SO<sub>3</sub>Me o SO<sub>3</sub>Et.

6. Uso como el reivindicado en la reivindicación 5, en el que cada uno de R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es, independientemente, -H, -Me, -C(=O)Me, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub>M ó -SO<sub>3</sub>Me.

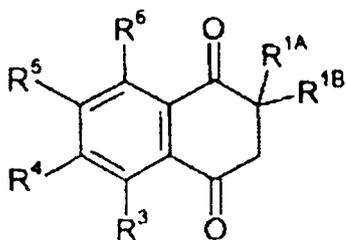
7. Uso como el reivindicado en la reivindicación 6, en el que cada uno de R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es -H.

8. Uso como el reivindicado en la reivindicación 3, en el que R<sup>1B</sup> y R<sup>2B</sup> son ambos -H:



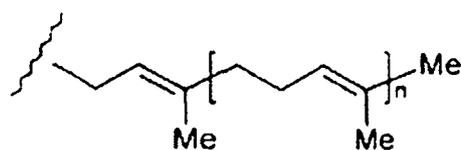
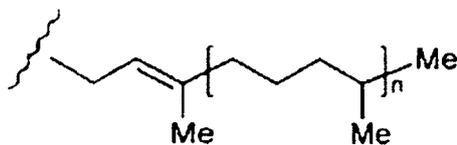
VIII

9. Uso como el reivindicado en la reivindicación 3, en el que R<sup>2A</sup> y R<sup>2B</sup> son ambos -H:



VII

10. Uso como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el grupo alquilo lineal o ramificado que tiene entre 1-15 átomos de carbono, que puede estar saturado o parcialmente insaturado en R<sup>2A</sup> es uno de los siguientes grupos, en los que n es 0, 1, ó 2:



## ES 2 287 292 T3

11. Uso como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que cada uno de R<sup>1A</sup>, R<sup>1B</sup>, R<sup>2A</sup> y R<sup>2B</sup>, si están presentes, es independientemente -H; -Me, -Et, -nPr, -iPr, -nBu, -sBu, -iBu, -tBu; -OH; -OMe, -OEt, -O(nPr), -O(iPr), -O(nBu), -O(sBu), -O(iBu), -O(tBu); -OC(=O)Me, -OC(=O)Et, -OC(=O)(nPr), -OC(=O)(iPr), -C(=O)(nBu), -OC(=O)(sBu), -OC(=O)(iBu), -OC(=O)(tBu), o -O(C=O)OMe, -C(=O)OEt, -C(=O)O(nPr), -C(=O)O(iPr), -C(=O)O(nBu), -C(=O)O(sBu), -C(=O)O(iBu), -C(=O)O(tBu); -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub>M, -SO<sub>3</sub>Me, -SO<sub>3</sub>Et, -SO<sub>3</sub>(nPr), -SO<sub>3</sub>(iPr), -SO<sub>3</sub>(nBu), -SO<sub>3</sub>(sBu), -SO<sub>3</sub>(iBu), -SO<sub>3</sub>(tBu) y en el que, si el compuesto es un compuesto de fórmula II, entonces: R<sup>1A</sup> es: -OMe, -OC(=O)Me, -COOMe, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub>M ó -SO<sub>3</sub>Me.

12. Uso como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que cada uno de R<sup>1A</sup>, R<sup>2A</sup> y R<sup>1B</sup>, R<sup>2B</sup>, si están presentes, es independientemente -H; -Me, -Et, -OH, -OMe, -OEt, -OC(=O)Me, -OC(=O)Et, -COOH, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub>M, -SO<sub>3</sub>Me, -SO<sub>3</sub>Et ó -CH<sub>2</sub>CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; y en el que, si el compuesto es un compuesto de fórmula II, entonces: R<sup>1A</sup> es: -OMe, -COOH, -OC(=O)Me, -COOMe, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub>M, o -SO<sub>3</sub>Me.

13. Uso como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que cada uno de R<sup>1A</sup>, R<sup>2A</sup> y R<sup>1B</sup> y R<sup>2B</sup>, si están presentes, es independientemente -H, -Me, -OH; -OMe, -OC(=O)Me, -COOH, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub>M, -SO<sub>3</sub>Me, -SO<sub>3</sub>Et ó -CH<sub>2</sub>CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; y en el que, si el compuesto es un compuesto de fórmula II, entonces: R<sup>1A</sup> es: -OMe, -COOH, -OC(=O)Me, -COOMe, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub>M, o -SO<sub>3</sub>Me.

14. Uso como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que cada uno de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es, independientemente: -H, -OH, -Me, -Et, -OMe, -OEt, -OC(=O)Me u -OC(=O)Et.

15. Uso como el reivindicado en la reivindicación 14, en el que cada uno de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es, independientemente: -H, -OH, -Me, -Et, -OMe, -OEt u -OC(=O)Me.

16. Uso como el reivindicado en la reivindicación 15, en el que cada uno de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es, independientemente: -H u -OH.

17. Uso como el reivindicado en la reivindicación 16, en el que cada uno de R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es -H.

18. Uso como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que R<sup>3</sup> es -H.

19. Uso como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que R<sup>3</sup> es -OH.

20. Uso como el reivindicado en la reivindicación 2, en el que R<sup>1A</sup> es -SO<sub>3</sub>H ó -SO<sub>3</sub>M, y cada uno de R<sup>2A</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es -H.

21. Uso como el reivindicado en la reivindicación 2, en el que R<sup>1A</sup> es -Ome y cada uno de R<sup>2A</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es -H.

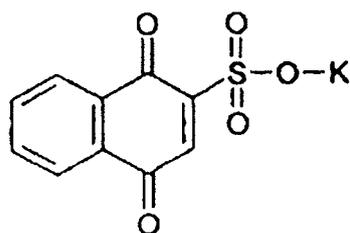
22. Uso como el reivindicado en la reivindicación 2, en el que R<sup>1A</sup> es -COOH; cada uno de R<sup>2A</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es -H; y R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> son -OH.

23. Uso como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en el que M, si se encuentra presente, es: Na<sup>+</sup> ó K<sup>+</sup>.

24. Uso como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en el que el compuesto tiene un valor B50, obtenido tal y como se determina en relación con los Ejemplos del presente documento, < 20.

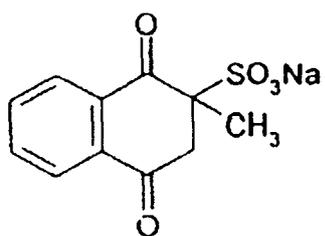
25. Uso como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en el que el compuesto tiene un valor Rxindx, obtenido tal y como se determina en relación con el Ejemplo 4 en el presente documento, superior a 4.

26. Uso como el reivindicado en la reivindicación 1, en el que el compuesto es seleccionado a partir de los siguientes compuestos y sales, solvatos, amidas, ésteres y éteres de los mismos, farmacéuticamente aceptables.



DH8

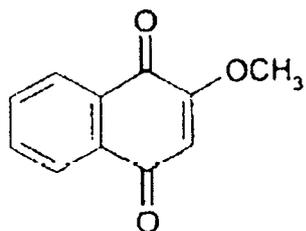
5



DH3

10

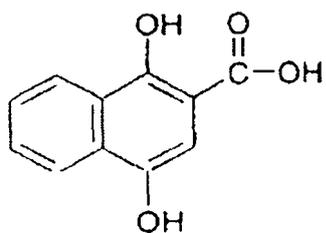
15



DH17

20

25

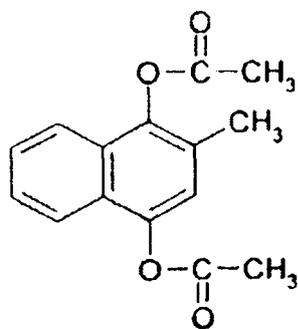


DH5

30

35

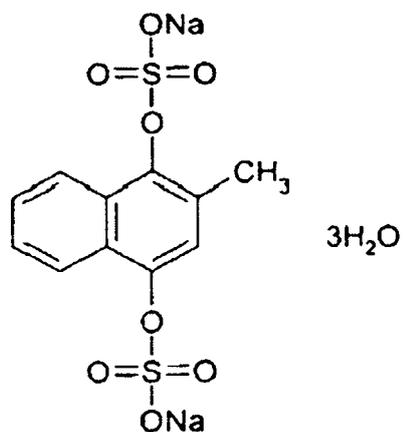
40



DH9

45

50

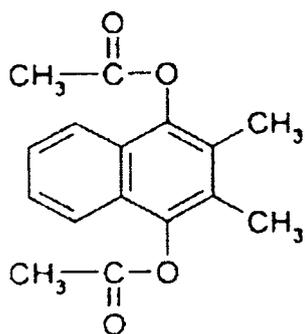


DH13

55

60

65



DH11

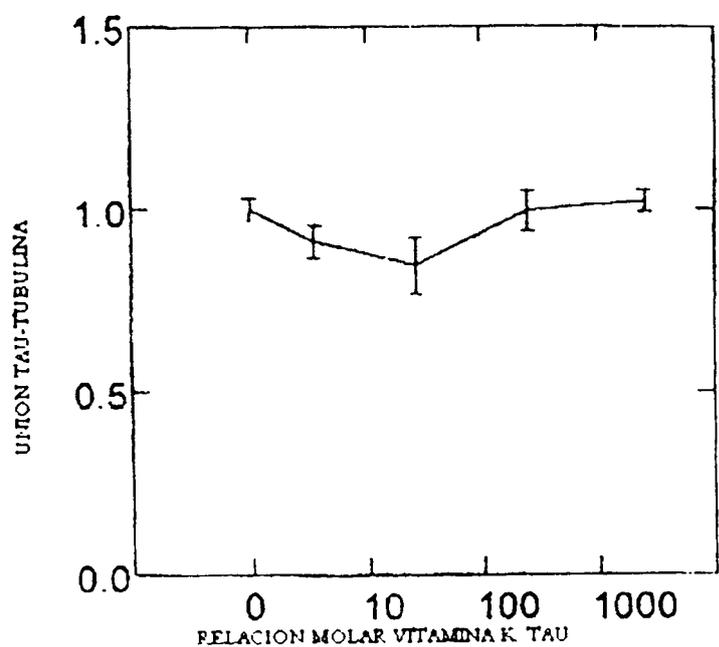
27. Uso como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en el que el medicamento es para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad neurodegenerativa y/o demencia clínica asociada con la agregación de proteína.

28. Uso como el reivindicado en la reivindicación 27, en el que el citado tratamiento o profilaxis es tratamiento o profilaxis en combinación con otro tratamiento para la citada enfermedad o demencia.

29. Uso como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, en el que la proteína es proteína tau.

30. Uso como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, en el que la enfermedad es: Tauopatía Familiar Generalizada, Degeneración Corticobasal, Enfermedad de Gerstmann-Starussier-Scheinker Familiar, Enfermedad Neuromotora, enfermedad de cuerpos de Lewis, enfermedad de Pick, Parálisis Supranuclear Progresiva o enfermedad de Alzheimer.

VITAMINA K. UNION TAU-TUBULINA

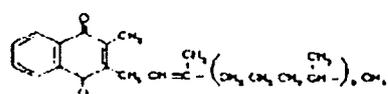


TUBULINA EN FASE SOLIDA      400 nM  
TUBULINA EN FASE ACUOSA      200 nM

FIGURA 1

KI (nM) B<sub>50</sub> (μM)

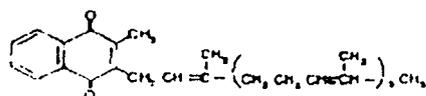
II



K<sub>1</sub>

1605

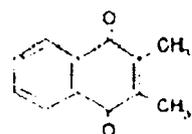
59.83



K<sub>1</sub>

1540

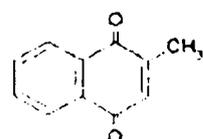
33.46



D1110

221

4.80



K<sub>1</sub>

128

2.78

FIGURA 2A

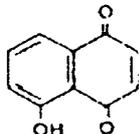
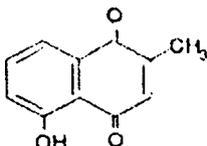
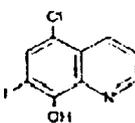
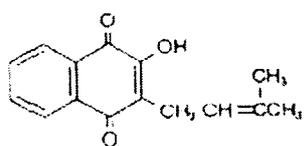
		KI (nM)	B <sub>50</sub> (μM)
III		--	—
		131	2.85
		—	—

FIGURA 2B

KI (nM) B<sub>50</sub> (μM)

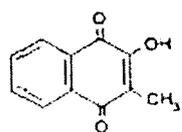
IV



DH1

513

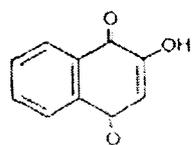
11.14



DH15

—

—



DH7

—

FIGURA 2C

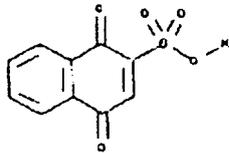
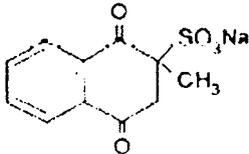
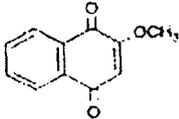
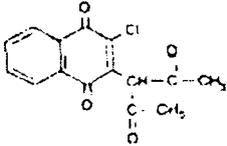
		KI (nM)	B <sub>50</sub> (μM)
V			
	DH8	157	3.41
			
	DH5	630	13.68
			
	DH17	293	6.4
			
	DH19	—	—

FIGURA 2D

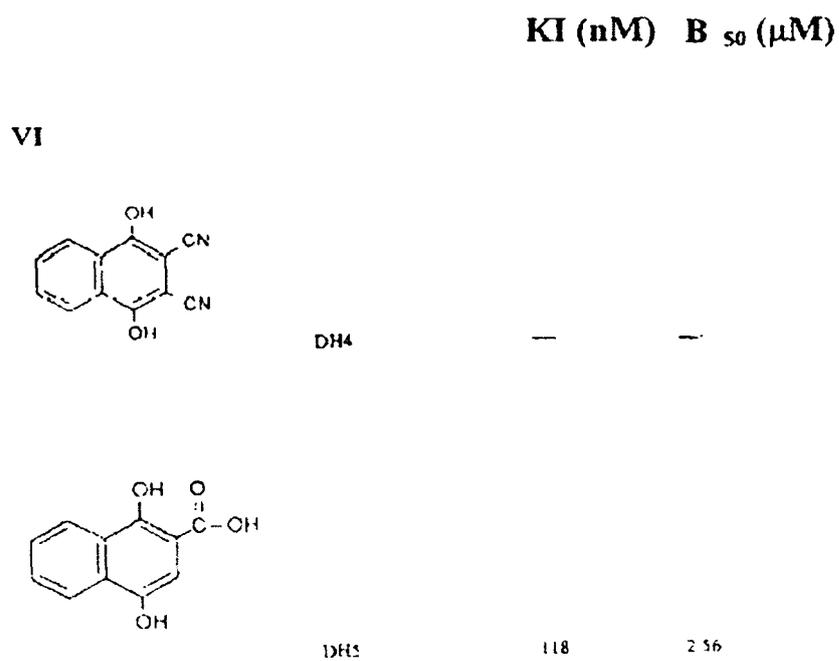


FIGURE 3E

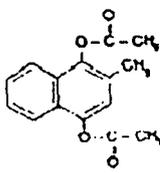
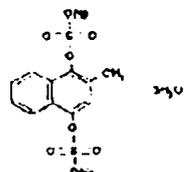
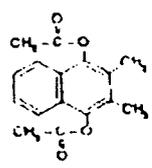
	KI (nM) B <sub>50</sub> (μM)	
<b>VII</b>		
	DH9	127 2 76
	DH13	263 5 71
	DH11	674 14 62

FIGURA 2F

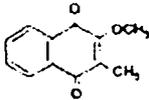
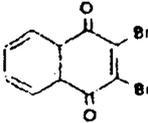
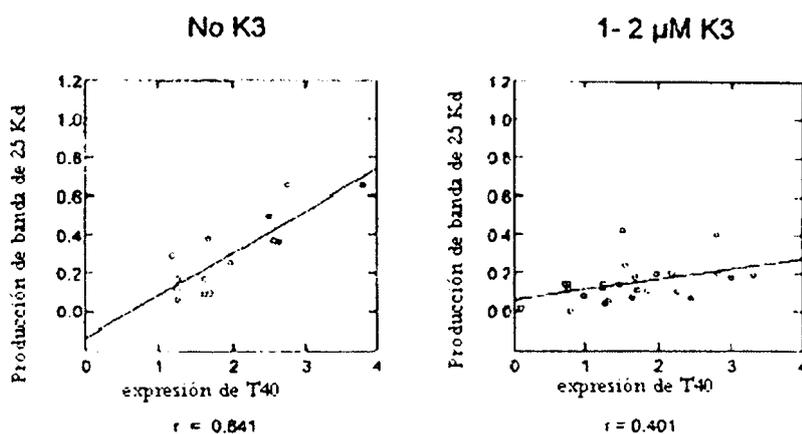
		KI (nM) B <sub>50</sub> (μM)	
VIII		DH18	15
		DH20	—

FIGURA 2G

INHIBICIÓN DE PRODUCCIÓN DE BANDA DE 25KD (K 25) A PARTIR DE TAU DE LONGITUD COMPLETA (T40) EN PRESENCIA DE VITAMINA K3



PRODUCCIÓN DE BANDA DE 25 KD

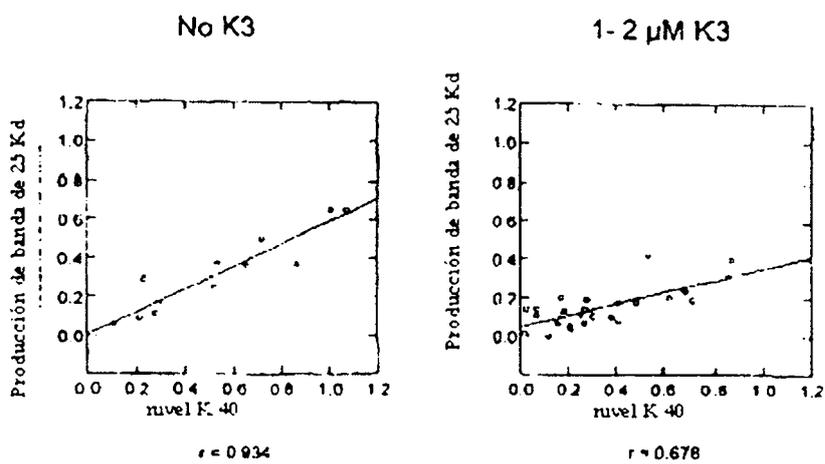
No K3  
1-2 μM K3

22% of T40  
5% of T40

$p = 0.0015$

FIGURA 3A

INHIBICIÓN DE PRODUCCIÓN DE BANDA DE 25 KD (K 25) A PARTIR DE FRAGMENTO TAU K 40 (S5190-441) EN PRESENCIA DE VITAMINA K3



PRODUCCIÓN DE BANDA DE 25 KI

No K3  
1-2 μM K3

59% of K40  
31% of K40

$p = 0.0012$

FIGURA 3B

Figura 4

Enfermedades de agregación de proteína	Enfermedad	Proteína	Subunidad fibrolo	Tamaño (kDa)	Referencia
Trastornos neurodegenerativos	Enfermedades prion	Proteína prion	27	Formas esporádicas y heredadas PRP-27-30, muchas mutaciones Dominios fibrologénicos: 113-120, 178-191, 202-218	Prusiner (1988) Gasset et al (1992)
Proteína tau	Enfermedad de Alzheimer, Síndrome de Down	Proteína tau	10-12	Tau truncada (dominio de unión a tubulina) 297-391 Mutaciones en tau en FTDP-17 Muchas mutaciones en proteínas presenilina	Wischik et al (1988) Hutton et al (1998) Czech et al (2000)
Proteína β-amiloide	Enfermedad de Alzheimer, Síndrome de Down	Proteína β-amiloide	4	Formas esporádicas y heredadas Proteína β-amiloide: 1-42(3); 11 mutaciones en APP en familias raras	Gienner & Wong (1984)
Huntingtina	Enfermedad de Huntington	Huntingtina	40	N-terminos de proteína con repeticiones de glutamina expandida. Proteínas con repeticiones de glutamina expandida Proteínas con repeticiones de glutamina expandida Proteínas con repeticiones de glutamina expandida	Goate et al (1991) DiFiglia et al. (1997)
Ataxias (1, 2, 3, 7)	Ataxias espinocerebelares (SCA 1, 2, 3, 7)	Ataxias (1, 2, 3, 7)			Paulson et al. (1999)
Atrofia	Atrofia dentado-rubro-palido-lusiana (DRPLA)	Atrofia dentado-rubro-palido-lusiana (DRPLA)			Paulson et al. (1999)
Receptor andrógeno	Encefalopatía familiar con cuerpos de inclusión neuronal (FENIB)	Receptor andrógeno			Paulson et al. (1999)
Neuroserpina	Enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewis, atrofia generalizada	Neuroserpina	57	Neuroserpina S49P, S52R	Davis et al. (1999)
A-sinucleína	Enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewis, atrofia generalizada	A-sinucleína	19	Formas esporádicas y heredadas A53T, A30P en familias PD con dominio autonómico raras	Spillantini et al. (1998) Polymeropoulos et al. (1997)
Cistatina C	Angiopatía cerebral hereditaria (icelandic)	Cistatina C	12-13	Cistatina C menos 10 restos	Abrahamson et al (1992) Shibata et al. (1996)
Superóxido dismutasa 1	Esclerosis lateral amiotrófica	Superóxido dismutasa 1		Mutaciones SOD1	
Trastornos no neurodegenerativos	Enfermedad de Huntington	Hemoglobina		Cadena beta de hemoglobina (S) Muchas mutaciones	Carrell & Gooptu (1998)
Hemoglobina	Anemia drepanocítica	Hemoglobina		Mutaciones	Lomas et al (1992)
Serpinas	Hemólisis con cuerpos de inclusión	Serpinas		Mutaciones	
	Deficiencia en α1-antitripsina (enfisema, cirrosis)			Mutaciones	
	Deficiencia en antitrombina (enfermedad tromboembólica)			Mutaciones	
	Deficiencia en inhibidor C1 (angioedema)			Mutaciones	Carrell & Gooptu

Enfermedades de agregación de proteína Proteína Enfermedad	Subunidad fibro Tamaño (kDa)	Referencia
Cadena ligera de inmunoglobulina Suero amiloide A	0.5-25	(1998) Carrell & Gooptu (1998) Westermarck et al. (1985) Westermarck et al (1985)
Discrasias de célula plasmática (amiloidosis AL generalizada primaria); Amiloidosis AA generalizada secundaria, reactiva Enfermedad inflamatoria crónica	4.5-7.5	
Transferrina	10-14	Gustavson et al (1991)
Polineuropatía amiloide familiar (generalizada, FAP I)		
Amiloidosis cardíaca senil	10-14	Gustavson et al. (1991)
Amiloidosis familiar de tipo finlandés (FAP IV)	9, 5	Maury & Baumann (1990)
Amiloidosis por hemodiálisis	12-25	Gorevic et al. 1985)
Amiloide protáctico	9	Booth et al. (1997)
Polineuropatía amiloide familiar (generalizada, FAP III)	14	Pepys et al (1983)
Amiloidosis visceral familiar		
Diabetes de tipo II (NIDDM)	3, 9	Westermarck et al (1990)
Amiloidosis renal hereditaria	7-10	Uemichi et al (1992)
Carcinoma medular de tiroides	3, 4	Sietten et al. (1978)
Amiloidosis cardíaca	3, 5	Johansson et al (1997)
Amiloidosis localizada para inyección (in vitro)		Dische et al. (1988) Chiti et al (1999)
Gelsolina		
Microglobulina β2		
Apolipoproteína A1		
Lisozima		
Amilina (polipéptido amiloide de islote pancreático)		
Fibrinógeno de cadena α		
Procalcitonina		
Factor natriurético auricular		
Insulina		
Otras proteínas formadoras de amiloide		
Tetramero disociado para variante de monómero conformacional		
Muchas mutaciones (algunas no asociadas con amiloide; diversos tipos diferentes de enfermedad)		
Transferrina normal		
D187Q conduce a 173-225/243 (restos críticos 182-192)		
Microglobulina β2		
Restos 83-93 N-terminales; G26R, W50R, L80R		
Lisozima o fragmentos (con o sin 156F, D67H)		
Fragmentos (núcleo crítico de 20-29); sin mutaciones		
Fragmentos de fibrinógeno		
Fragmentos de calcitonina		
ANF, no mutantes		
Insulina		
Otras proteínas		

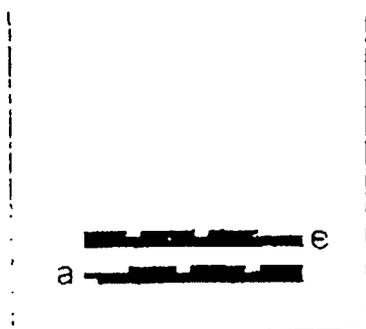


FIGURA 5

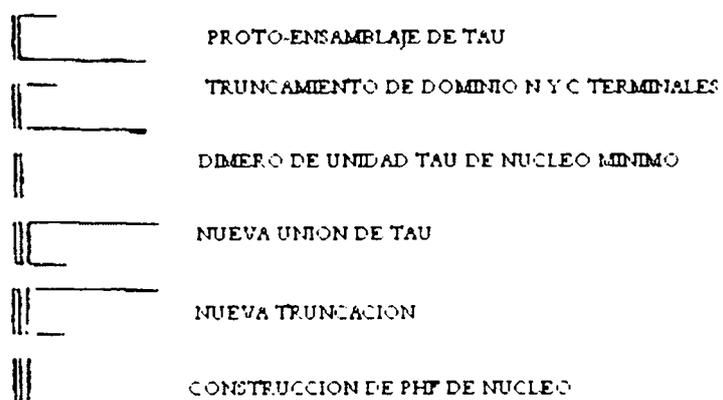


FIGURA 6A

MODELO DH 15 12 KD

$\uparrow T40 + 12 \text{ KD} \Rightarrow \uparrow 12 \text{ KD}$  ENSAYO CELULAR

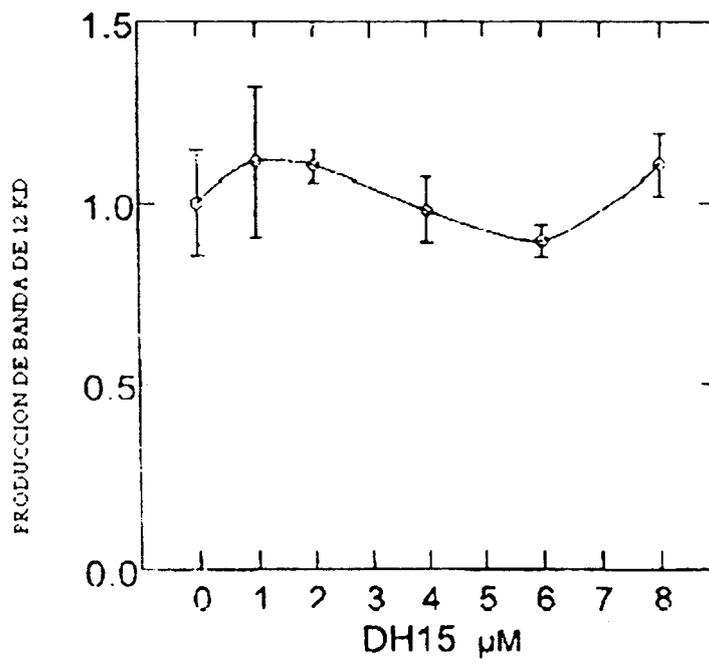


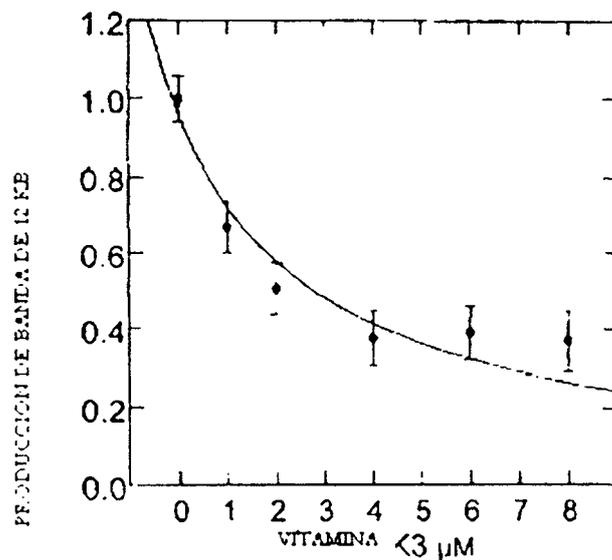
FIGURA 6B

MODELO VITAMINA K3 12 KD

$\uparrow T40 + 12 \text{ KD} \Rightarrow \uparrow 12 \text{ KD}$  ENSAYO CELULAR

ACTIVIDAD CELULAR ANTICIPADA A TRAVES DE MODELO DE INHIBICION ESTANDARD

$$\text{ACTIVIDAD} = \frac{[\text{tau}]}{([\text{tau}] + Kd * (1 + [\text{VK3}] / Ki))}$$



ACTIVIDAD OBSERVADA FRENTE A ANTICIPADA

$r = 0.925$

CONCENTRACION TAU INTRACELULAR	500 nM
AFINIDAD DE UNION TAU-TAU	22 nM
VITAMINA K3 KI	128 nM

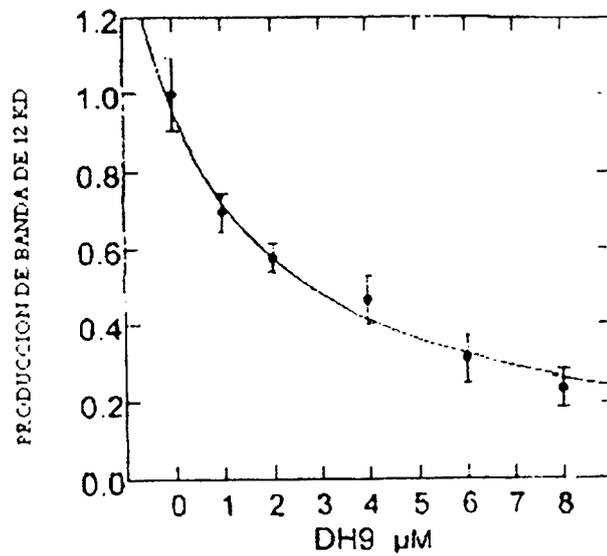
FIGURA 6C

MODELO DH9: 12 KD

$\uparrow\tau_{40} + 12 \text{ kD} \Rightarrow \uparrow 12 \text{ kD ENSAYO CELULAR}$

ACTIVIDAD CELULAR ANTICIPADA A TRAVES DE MODELO DE INHIBICION ESTANDARD

$$\text{ACTIVIDAD} = \frac{[\tau]}{([\tau] + K_d \cdot (1 + [\text{DH9}] / K_I))}$$



ACTIVIDAD OBSERVADA FRENTE A ANTICIPADA

$r = 0.988$

CONCENTRACION TAU INTRACELULAR

500 nM

AFINIDAD DE UNION TAU-TAU

22 nM

127 nM

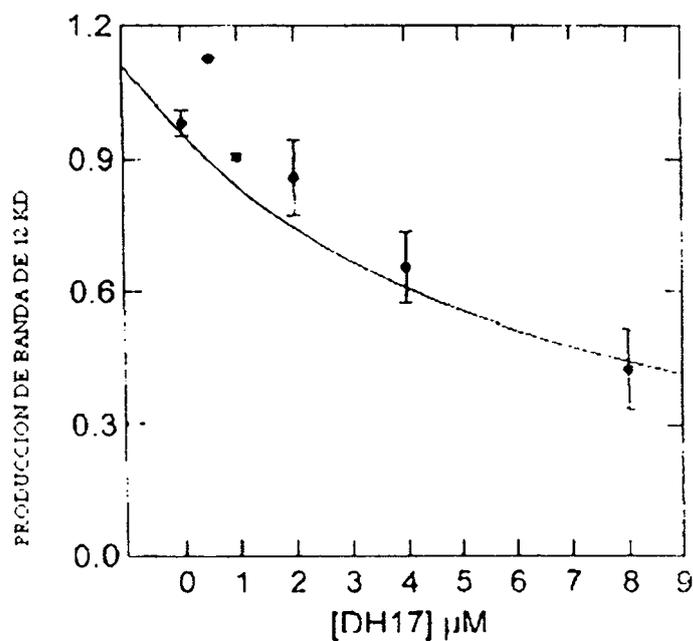
FIGURA 6D

MODELO DH17: 12 KD



ACTIVIDAD CELULAR ANTICIPADA A TRAVES DE MODELO DE INHIBICION

$$\text{ACTIVIDAD} = \frac{[\text{tau}]}{[\text{tau}] + Kd * (1 + [\text{DH17}]/Ki)}$$



ACTIVIDAD OBSERVADA FRENTE A ANTICIPADA

r-0.808

CONCENTRACION TAU INTRACELULAR

500nM

AFINIDAD DE UNION TAU-TAU

22nM

DH17 Ki

293nM

FIGURA 6E

EL SEMBRADO MEDIANTE SS TAU 190-441 INDUCE LA DEGRADACIÓN EN DOS ETAPAS DE T40 POR MEDIO DE AGREGACIÓN A TRAVÉS DE DOMINIO DE NUCLEO PHF (A) PRODUCCIÓN DE FRAGMENTO DE 25 KD

1. AGREGACIÓN CONSTITUTIVA DE SS TAU-190-441

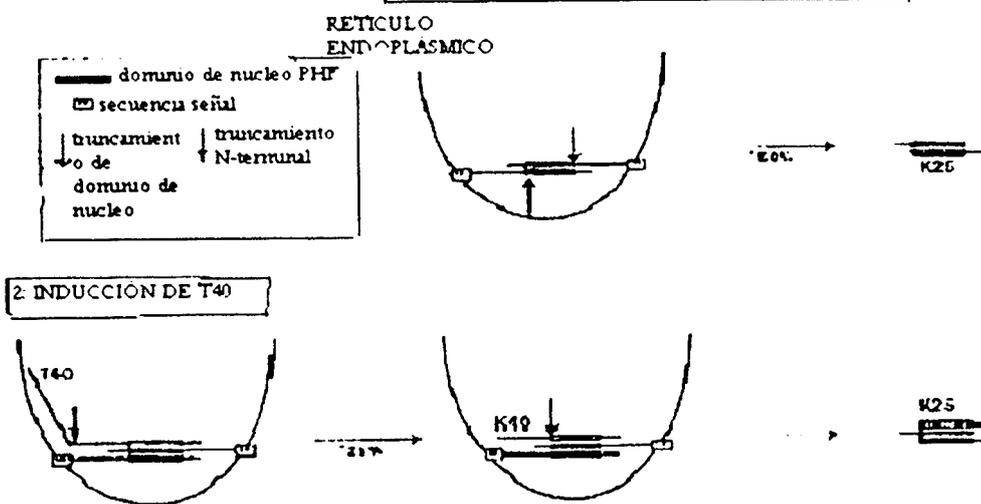
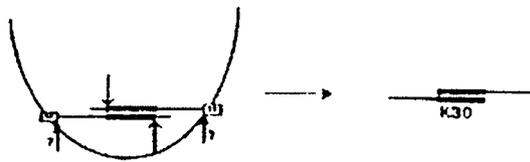
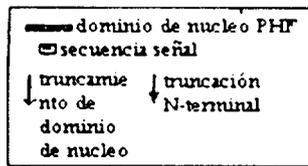


FIGURA 7A

EL SEMBRADO A TRAVÉS DE S5 TAU190-441 INDUCE LA DEGRADACIÓN EN DOS ETAPAS DE T40.  
 POR MEDIO DE AGREGACIÓN A TRAVÉS DE DOMINIO DE NUCLEO PHF.  
 (B) PRODUCCION DE FRAGMENTO DE 30 KD

1: AGREGACION CONSTITUTIVA DE S5TAU  
 190-441

retículo endoplasmico



2: Inducción de T40

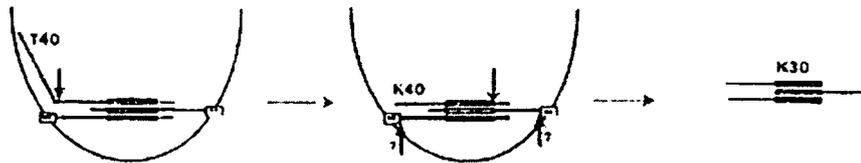


FIGURA 7B