

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 804 541**

51 Int. Cl.:

A61K 31/185 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2016 PCT/EP2016/079353**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.06.2017 WO17093363**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2016 E 16809318 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 3383381**

54 Título: **Compuesto para su uso en la prevención y el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas**

30 Prioridad:

30.11.2015 EP 15196984

22.02.2016 EP 16156775

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

08.02.2021

73 Titular/es:

UNIVERSITÄT WIEN (100.0%)

Universitätsring 1

1010 Wien, AT

72 Inventor/es:

KONRAT, ROBERT y

SEALEY, MARCO

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 804 541 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

Compuesto para su uso en la prevención y el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas

5 La presente invención se refiere a un compuesto que comprende un esqueleto de calixareno para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, en particular de una sinucleinopatía, en donde el compuesto es capaz de a) prevenir la formación de agregados de α -sinucleína (α -syn), y b) unirse a Lipocalina 2 (Lcn2/NGAL). La presente descripción se refiere adicionalmente a una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de dicho compuesto y uno o más agentes auxiliares farmacéuticamente aceptables.

10

Antecedentes de la invención

15 Se ha propuesto que la acumulación progresiva de la proteína sináptica α -sinucleína (α -syn) desempeña un papel crítico en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson (EP), la demencia con cuerpos de Lewy (DLB) y la atrofia multisistémica (MSA), denominadas conjuntamente sinucleinopatías. Se estima que aproximadamente 10 millones de personas en todo el mundo están afectadas por sinucleinopatías; actualmente no existe terapia modificadora de la enfermedad disponible. Aunque los mecanismos precisos que da como resultado la acumulación patológica de α -syn no se entienden completamente, se supone que están involucradas las alteraciones en la tasa de síntesis, agregación y eliminación de α -syn. Por ejemplo, en ciertas formas familiares de parkinsonismo se ha descrito un aumento en la síntesis de α -syn debido a la multiplicación del gen α -syn, así como una mayor propensión a la agregación debido a mutaciones (E46K, A53T, H50Q, G51D).

20

25 Además, se ha propuesto que la acumulación de α -syn conduce a la neurodegeneración a través de la formación de oligómeros tóxicos y la propagación de tipo prión de célula a célula. Aunque la identificación de las especies de α -syn tóxicas precisas es controvertida, la mayoría de los estudios coinciden en que podrían ser responsables los oligómeros en lugar de los agregados más grandes. Además, los estudios biofísicos proporcionan evidencia de que la unión de α -syn y la posterior penetración de la membrana neuronal es importante en este proceso.

25

30 Se ha propuesto que las interacciones entre α -syn y los lípidos en la membrana celular neuronal son una etapa importante en el proceso de oligomerización y citotoxicidad. Por lo tanto, las estrategias dirigidas a aumentar la degradación y el aclaramiento, prevenir la agregación o disminuir la síntesis de α -syn podrían representar estrategias terapéuticas razonables.

30

35 Estudios anteriores se han dirigido a los agregados de α -syn mediante anticuerpos, enzimas proteolíticas y con moléculas pequeñas que disminuyen la agregación o fibrilación de α -syn. Recientemente se demostró que la formación de dímeros de propagación de α -syn en la membrana es una etapa temprana en el desarrollo de oligómeros de α -syn tóxicos y las interacciones entre los residuos 96-102 en una de las α -syn y 80-90 en el otra α -syn en un dímero desempeñan un papel importante en este proceso.

35

40 Se han propuesto numerosas estrategias terapéuticas para atacar la α -syn, que van desde agentes anti-amiloides que interrumpen las fibrillas intracelulares grandes, hasta aquellos que apuntan a la propagación de agregados oligoméricos mal plegados o aquellos que se dirigen a la fase de crecimiento de fibrillas, modelada por la adición de α -syn monomérica a protofibrillas "semillas".

40

45 Lamberto G.R. et al. (2009), Structural and mechanistic basis behind the inhibitory interaction of PcTS on α -synuclein amyloid fibril formation, PNAS 106 (50): 21057-21062, describen que la identificación de inhibidores de la agregación y la investigación de su mecanismo de acción son fundamentales en la búsqueda para mitigar las consecuencias patológicas de la formación de amiloide. La caracterización de la base estructural y mecanicista del efecto anti-amiloidogénico del tetrasulfonato de ftalocianina (PcTS) sobre la sinucleína α les permitió demostrar que las interacciones aromáticas específicas podrían ser cruciales para la inhibición de la formación de amiloide mediada por ligandos. Estos hallazgos enfatizan el uso de inhibidores de la agregación como sondas moleculares para evaluar los mecanismos estructurales y tóxicos relacionados con la formación de amiloide y el potencial de las moléculas pequeñas como agentes terapéuticos para las patologías relacionadas con el amiloide.

50

55 El documento US2010/062540 describe un método para detectar formas de proteínas circulantes formadoras de agregados en una muestra biológica de origen humano que puede contener dichas formas de proteínas circulantes formadoras de agregados, caracterizado porque utiliza un agente no proteico que produce la agregación de las formas circulantes de las proteínas no infecciosas implicadas en procesos de agregación patológica del sistema nervioso central y/o un agente no proteico para capturar los agregados naturales de las formas de proteínas circulantes formadoras de agregados o los agregados inducidos por dichos agentes.

60

El documento WO2013/134371 se refiere a compuestos que bloquean específicamente la formación temprana de agregación de proteínas tóxicas, p. ej. la formación de oligómeros A β , en un organismo humano o animal. Se dice que estos compuestos se dirigen específicamente a las agregaciones de proteínas tóxicas muy tempranas y tienen

una alta afinidad por las proteínas que se sabe que están implicadas en la agregación de proteínas en el trastorno neurodegenerativo, como el amiloide β .

La reacción glial es una característica común de las enfermedades neurodegenerativas, incluida la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la degeneración lobular frontotemporal (FTLD), la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer. Los astrocitos y la microglía se vuelven reactivos durante los procesos neurodegenerativos, y los astrocitos activados pueden exhibir una expresión diferencial de receptores, transportadores y transmisores astrocíticos; cambios metabólicos; y alteración de la síntesis y liberación de proteínas, quimiocinas y citocinas. La activación controlada de los astrocitos se considera beneficiosa para las neuronas, pero los astrocitos hiperactivos pueden ser dañinos. La astrocitosis en la neurodegeneración se ha estudiado intensamente, pero queda por determinar exactamente cómo los astrocitos reactivos contribuyen a la neurotoxicidad. Por lo tanto, existe una demanda continua de desarrollar nuevos compuestos que sean capaces de activar de forma controlada los astrocitos e inhibir la conversión de los astrocitos quiescentes en reactivos.

Bi y col. (2013), Reactive astrocytes secrete Lcn2 to promote neuron death, PNAS, 110 (10): 4069-4074, describen la lipocalina 2 (Lcn2) como un factor inducible que es secretado por los astrocitos reactivos y que es selectivamente tóxico para las neuronas. Se demostró que Lcn2 se induce en astrocitos reactivos en ratas transgénicas con expresión neuronal de la proteína 43 de unión a ADN TAR humana mutante (TDP-43) o la proteína de unión a ARN fusionada en sarcoma (FUS). Se describe adicionalmente que la Lcn2 sintética es citotóxica para las neuronas primarias de una manera dependiente de la dosis, pero es inocua para los astrocitos, la microglía y los oligodendrocitos. El agotamiento parcial de Lcn2 por inmunoprecipitación redujo la neurotoxicidad mediada por medio condicionado. Estos datos indican que los astrocitos reactivos secretan Lcn2, que es un potente mediador neurotóxico. Además, una publicación reciente informó que la expresión de LCN2/NGAL aumenta en la sustancia negra (SN) de pacientes con enfermedad de Parkinson (EP), Kim, B. W. y col. (2016) Journal of Neuroscience, 36 (20), 5608-5622.

El documento US 5.489.612 describe derivados del calixareno, su síntesis y su uso como bloqueadores de los canales de cloruro. Más precisamente, el documento US 5.489.612 propone el uso de varios compuestos en el tratamiento de trastornos respiratorios, trastornos del músculo esquelético y trastornos cardiovasculares.

El documento WO 00/07585 describe el uso de calixarenos en el tratamiento de enfermedades fibróticas.

Compendio de la invención

Se han identificado compuestos con múltiples efectos positivos sobre el cerebro de relevancia para las enfermedades neurodegenerativas, incluida la inhibición de una vía que convierte los astrocitos quiescentes en astrocitos reactivos (neurotóxicos).

Más precisamente, el autor de la presente invención ha identificado nuevos compuestos que se dirigen a α -syn. A concentraciones más altas liberan α -syn de la membrana y, por lo tanto, afectan a sus propensiones de agregación. Sin embargo, a diferencia de los compuestos de la técnica anterior, también se unen al dominio N-terminal de la forma monomérica soluble de α -syn y, por lo tanto, afectan la unión de α -syn a algunos de sus compañeros de interacción de proteínas endógenas (es decir, Calmodulina, una importante proteína de unión a calcio). La actividad de los compuestos en modelos animales transgénicos para la enfermedad de Parkinson ya podría haber sido mostrada. Redujeron el número de agregados de α -syn y aumentaron el número de neuronas (efecto neurotrófico) en el córtex de los ratones transgénicos.

Sin embargo, otro logro importante de los nuevos compuestos es una actividad adicional completamente nueva y sin precedentes. Lo más sorprendente es que el autor de la presente invención descubrió que estos compuestos aumentaban selectivamente el número de astrocitos en el córtex de los ratones transgénicos, pero no en los ratones de control sanos (los compuestos por sí solos no inducen la producción de astrocitos). Este hallazgo inesperado es la base de una estrategia completamente nueva para combatir enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Parkinson.

Esta actividad está relacionada con la función de estos nuevos compuestos para unirse a la Lipocalina 2 (Lcn2/NGAL), que parece ser el factor clave para influir en la formación y el comportamiento de los astrocitos. Una electroforesis en gel 2D seguida de un análisis por espectrometría de masas de proteínas que fueron secretadas al medio de cultivo a partir de secciones de cerebro de rata identificaron la lipocalina 2 (Lcn2) como una molécula inducible secretada por astrocitos reactivos que media la neurotoxicidad. La Lcn2 se validó adicionalmente como un factor astrocítico en ratas transgénicas que expresan TDP-43 mutante o proteína de unión a ARN fusionada en sarcoma (FUS). Colectivamente, los datos presentados en la presente memoria demuestran que Lcn2 es un potente factor neurotóxico secretado por astrocitos reactivos.

Por lo tanto, además de las propiedades beneficiosas comunes a otras terapias del Parkinson (que reducen de los

agregados de alfa-sinucleína), las moléculas pequeñas presentadas aquí tienen una serie de propiedades inesperadas y clínicamente significativas, que incluyen (i) aumento del número de neuronas en el córtex (efectos neurotróficos); y (ii) aumento selectivo del número de astrocitos en el córtex de ratones transgénicos, a través de la unión competitiva a la proteína Lcn2 (un potente factor neurotóxico secretado por astrocitos reactivos).

5

Descripción de las figuras

Figura 1: sondeo de RMN de la interacción entre α -sinucleína y Sulfocalixareno. (arriba) Razones de intensidad en función de la posición del residuo. El aumento de los valores tras la unión del ligando indican la liberación de las vesículas de membrana. (abajo) La ubicación del sitio de unión al Sulfocalixareno mediante cambios en el desplazamiento químico de RMN cambia después de la unión del ligando. Se observan cambios significativos para los residuos en el dominio N-terminal de la α -sinucleína (y por lo tanto en la ubicación del sitio de unión al extremo N-terminal).

10

Figura 2: La administración de Sulfocalixareno a modelos animales transgénicos para la Enfermedad de Parkinson (EP) conduce a un aumento del número de neuronas en el córtex.

15

Figura 3: Cuantificación de los experimentos de inmunotinción neuronal. El área total, el tamaño promedio y el % de área son diferentes estrategias computacionales para cuantificar el número de neuronas (que conducen, sin embargo, a los mismos resultados).

Figura 4: Inmunotinción de astrocitos en animales sanos (control) y transgénicos (EP). Lo más importante, la administración de Sulfocalixareno conduce a un aumento del número de astrocitos (presumiblemente neurotróficos quiescentes), mientras que los animales de control sanos no se ven afectados. Los números proporcionados para los modelos animales transgénicos son números promedio (y desviación típica) de astrocitos obtenidos para diferentes animales y regiones del córtex.

20

Figura 5: El Sulfocalixareno conduce a una reducción de los agregados patológicos de α -sinucleína y, por lo tanto, muestra una actividad similar en comparación con las estrategias terapéuticas en curso.

25

Figura 6: Cuantificación de agregados de α -sinucleína. La adición de Sulfocalixareno conduce a una reducción significativa de los agregados de α -sinucleína (abajo, de izquierda a derecha).

Figura 7: Verificación biofísica experimental de la interacción entre el Sulfocalixareno y Lcn2/NGAL. (arriba) Solapamiento de espectros HSQC 1H-15N para Lcn2 sin (color rojo) y con Sulfocalixareno (color azul). Los cambios en las frecuencias de picos cruzados (posiciones) indican residuos que se ven afectados por la unión. (abajo) Trazas de calorimetría de titulación isotérmica de unión de Sulfocalixareno a Lcn2. El Sulfocalixareno se une a Lcn2 con una KD de aproximadamente 700 nM.

30

Figura 8: **A.** Lcn2/NGAL purificada. Una sola proteína de ~22 kDa, identificada como Lcn2/NGAL. **B.** Representación esquemática del procedimiento de diferenciación en 2 etapas, iniciado mediante la adición de ácido retinoico (RA) 10 μ M durante 3 días, a continuación, se eliminó el medio y se cambió añadiendo 12-O-tetradeca-noil-forbol-13-acetato 80 nM (PMA) a los medios para SH-SY5Y durante otros 3 días. **C.** Cambios morfológicos en las células SH-SY5Y en condiciones de diferenciación. Imágenes representativas de microscopio de contraste de fase, Células SH-SY5Y no diferenciadas (día 0) y diferenciadas (RA-PMA) (día 6) (barra de escala de 10 μ m). **D.** Efecto neurotóxico de Lcn2/NGAL sobre células SH-SY5Y no diferenciadas. Las células SH-SY5Y se trataron con concentraciones crecientes de Lcn2/NGAL y se midió la citotoxicidad a las 24h, 48h, 72h y 96h. **E.** Las células SH-SY5Y se trataron con una concentración creciente de Lcn2/NGAL en presencia de H₂O₂ (10 μ M) durante 24h, 48h, 72h y 96h. La viabilidad celular se determinó por el método del Azul Alamar. Los resultados se presentan como un porcentaje de las células de control, que se ajustaron a 100%.

35

40

Figura 9: **A.** Efecto neurotóxico de Lcn2/NGAL en células SH-SY5Y diferenciadas (RA) y éster de forbol 12-O-tetradeca-noil-forbol-13-acetato (PMA). Las células diferenciadas se expusieron a concentraciones crecientes de Lcn2/NGAL y se midió la citotoxicidad a las 24h, 48h, 72h y 96h. **B.** Las células SH-SY5Y diferenciadas se trataron con concentraciones crecientes de Lcn2/NGAL en presencia de H₂O₂ (10 μ M). La citotoxicidad se midió a las 24h, 48h, 72h y 96h. La viabilidad celular se determinó por el método del Azul Alamar. Los resultados se presentan como un porcentaje de las células de control, que se ajustaron a 100%. **C.** Imágenes representativas de microscopio de contraste de fase, de células SH-SY5Y diferenciadas con RA/PMA tratadas con H₂O₂ (10 μ M) de durante 72h. **D.** Imágenes representativas de microscopio de contraste de fase de células SH-SY5Y diferenciadas con RA/PMA tratadas con H₂O₂ (10 μ M) durante 72h y 200 μ g/ml de Lcn2/NGAL durante 72h (barra de escala de 20 μ m).

50

Figura 10: Localización celular del receptor cognado Lcn2/NGAL (SLC22A17). Imágenes representativas que muestran células SH-SY5Y no diferenciadas (día 0) panel **(A)** y diferenciadas (RA/PMA) (día 6) panel **(B)**. Células SH-SY5Y Lcn2/NGALr - SLC22A17 (color rojo), Hoechst 33342 (color azul) con doble tinción. Lcn2/NGALr - SLC22A17 se expresó en exceso predominantemente en células diferenciadas (barra de escala de 20 μ m). **C.** Cuantificación de Lcn2/NGALr - SLC22A17 en células SH-SY5Y no diferenciadas (día 0) y diferenciadas (RA-PMA) (día 6). Las células se delinearon usando la herramienta de la región de interés (ROI) y se contaron para cada canal por separado para una fluorescencia combinada total (unidades arbitrarias). Los resultados se presentan como diagramas de caja. Las líneas en el cuadro muestran el cuartil inferior, la mediana y el cuartil superior. Los bigotes se establecen en 1,5 veces el rango intercuartílico. Las diferencias entre las células no diferenciadas y diferenciadas son estadísticamente significativas al nivel * p <

60

0,05 utilizando la prueba U de Mann-Whitney o la prueba de Wilcoxon.

Figura 11: Protección con Sulfocalixareno contra la citotoxicidad de Lcn2/NGAL. **A.** Las células SH-SY5Y diferenciadas con RA/PMA se trataron durante 24 y 48 horas con dos concentraciones letales de Lcn2/NGAL (100 µg/ml y 200 µg/ml). Las células se expusieron al aumento de la concentración de Sulfocalixareno y se evaluaron para los análisis de microscopía de contraste de fase y MTT. **B.** Las células SH-SY5Y diferenciadas con RA/PMA se trataron durante 24 y 48 horas con dos concentraciones letales de MPP+ (0,5 mM y 10 mM). Las células se expusieron al aumento de la concentración de Sulfocalixareno y se evaluaron para el análisis de microscopía de contraste de fase y MTT.

Figura 12: Protección con Sulfocalixareno contra la citotoxicidad por MPP+ y H₂O₂. Imágenes representativas de microscopio de contraste de fase de células SH-SY5Y diferenciadas con RA/PMA, barra de escala de 100 µm.

Figura 13: Roído de Pasta. La Prueba de Roído de Pasta es un experimento conductual libre de estrés para evaluar los déficits motores en roedores. Durante la prueba, se registran los ruidos de los animales al comer un pedazo de pasta seca. Se evalúan parámetros como la velocidad de mordedura y el número de episodios de mordeduras/masticación.

El gráfico de la izquierda muestra la comparación por pares de mordeduras por episodio durante el día 28. El gráfico de la derecha muestra la comparación de la velocidad de mordida. En ambos casos, los animales transgénicos (tg) de la línea 61, tratados con Sulfocalixareno mostraron significativamente más mordeduras por episodio/más velocidad de mordida que los animales tratados con vehículo. Los datos se muestran como media ± ETM. Estadísticas Anova de 1 Vía. Las diferencias de grupo estadísticamente significativas se indican con asteriscos (para el Anova de Una Vía) y etiqueta "hashtag" (para prueba t); * p <0,05; ** p <0,01; #p <0,05.

Figura 14: Recorrido en Barra. Esta prueba se utiliza para medir la coordinación motora, particularmente de las extremidades posteriores. Los animales son entrenados y probados para atravesar una barra estrecha elevada que está suspendida entre una plataforma de inicio y su jaula. Se registra el tiempo para completar la tarea y el número de deslizamientos de pie. La prueba se graba en video y los parámetros son evaluados por un observador capacitado.

Los gráficos muestran la comparación de animales tg tratados con T.I. y Vehículo (Línea 61) y animales ntg de control por prueba para el parámetro de tiempo activo, deslizamientos y deslizamientos por velocidad. Los datos se muestran como media ± ETM. Estadísticas Anova de 1 Vía. Las diferencias de grupo estadísticamente significativas se indican con asteriscos; ** p <0,01; *** p <0,001.

Descripción detallada de la invención

Según un primer aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto que comprende una cadena principal de calixareno capaz de

- a) prevenir la formación de agregados de α-sinucleína (α-syn), y
- b) unirse a Lipocalina 2 (Lcn2/NGAL),

para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.

De acuerdo con un aspecto adicional, el compuesto tiene opcionalmente un efecto protector contra el estrés oxidativo y/o la neurotoxicidad inducida por disfunción mitocondrial, actores clave en la neuroinflamación.

En otro aspecto más, el compuesto es opcionalmente capaz de mejorar los déficits motores en roedores transgénicos (tg) para α-syn de una manera dependiente de la dosis. Los roedores transgénicos (tg) para α-syn incluyen cualquier modelo de ratón o rata en el que la secuencia y/o expresión del gen α-syn humano se haya alterado para simular una sinucleinopatía. Los ejemplos específicos de tales modelos de roedores en uso actual incluyen A53T, Line 61 (TNWT61), D-Line y E46K.

Por lo tanto, un método para prevenir/tratar una enfermedad neurodegenerativa de acuerdo con la invención abarca la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto capaz de prevenir la formación de agregados de α-sinucleína (α-syn) y de unirse a Lipocalina 2 (Lcn2/NGAL) a un paciente que lo necesite. El tratamiento de la enfermedad puede incluir tratamiento sintomático y tratamiento neuroprotector (modificador de la enfermedad). En particular, el tratamiento sintomático puede incluir alivio o reversión de los síntomas motores, conductuales, cognitivos, del estado de ánimo, del sueño, sensoriales y reducción de la neuroinflamación.

El presente compuesto es capaz, entre otros, de prevenir la formación de agregados de α-sinucleína (α-syn). El término "agregación" como se emplea en la presente memoria también incluye "fibrilación". El compuesto en particular previene la formación de los agregados oligoméricos tóxicos más pequeños, así como las protofibrillas aguas abajo más grandes sin interferir necesariamente con las funciones fisiológicas de la α-syn. Al interrumpir la

formación de dímeros incluidos en la membrana en este punto temprano de intervención, existe un mayor potencial para revertir los efectos adversos de la α -syn sobre la función sináptica en una fase anterior a que se hayan iniciado procesos neurodegenerativos irreversibles. La elección como diana específicamente de la estructura de α -syn que se estabiliza en las membranas celulares permite un diseño de fármaco dirigido molecularmente más específico. Los estudios de microscopía electrónica demostraron que los compuestos de la presente invención redujeron la formación de oligómeros globulares en una matriz de membrana lipídica y disminuyeron la formación de dímeros por inmunotransferencia. Por lo tanto, el compuesto es útil en la prevención de la formación de agregados de α -syn en neuronas que se logra reduciendo la unión y el ensamblaje en la membrana de α -syn en dímeros de propagación de α -syn y oligómeros más pequeños.

Los compuestos de la presente invención bloquean específicamente la formación temprana de agregación de proteínas tóxicas, p. ej. la formación de oligómeros de α -syn, en el organismo humano o animal. Estos compuestos se dirigen específicamente a agregaciones de α -syn muy inversas, por ejemplo, bloqueando totalmente la formación de oligómeros o evitando que los oligómeros ya formados (por ejemplo, trímeros y tetrámeros) crezcan más y formen estructuras de tipo anular (p. ej., pentámeros, hexámeros). En una realización de la invención, los compuestos de la presente invención interactúan con los dominios N-terminales de los dímeros de α -syn u oligómeros de α -syn más pequeños. En otra realización, los compuestos se unen al dominio N-terminal de la forma monomérica soluble de α -syn. Preferiblemente, el compuesto se une a α -syn con afinidad de al menos μ m, incluso más preferiblemente con afinidad de al menos nm (según lo medido utilizando métodos biofísicos tales como calorimetría de titulación isotérmica (ITC), ThermoFluor y espectroscopía de RMN).

Se demostró que los compuestos de la invención se dirigen más selectivamente al estado plegado de α -syn en la membrana. Según lo confirmado por los estudios de RMN, las interacciones del compuesto fueron con los conformadores unidos a la membrana en lugar de con la α -syn libre. Esto sugirió que los compuestos se dirigen a formas patológicas de α -syn en lugar de las configuraciones fisiológicas de α -syn que generalmente están en las fracciones citosólicas asociadas libremente con las vesículas. Además, aunque los compuestos mejoraron los déficits conductuales y sinápticos en los ratones transgénicos (tg) para α -syn, el compuesto no tuvo efectos secundarios en los ratones no tg. Del mismo modo, los estudios neuropatológicos y ultraestructurales confirmaron que las vesículas y terminales sinápticas no se vieron afectadas en los ratones no tg. Asimismo, los compuestos mejoraron el comportamiento conductual - motor evaluado por la prueba de recorrido de barra y de roído de pasta descrita por Rabl, R., et al. (2016)] en los ratones transgénicos (tg) para α -syn. Además, el compuesto no tuvo efectos secundarios en los ratones tg y no tg.

Además, los compuestos de la presente invención son preferiblemente estables en plasma y solución y pueden atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica.

La segunda función del compuesto de la presente invención es la unión a la lipocalina 2 (Lcn2/NGAL). Preferiblemente, el compuesto se une a Lcn2/NGAL con afinidad al menos μ m, incluso más preferiblemente con afinidad al menos nm (tal como se mide usando métodos biofísicos tales como calorimetría de titulación isotérmica (ITC), ThermoFluor y espectroscopía de RMN). Lcn2, también conocida como oncogén 24p3 o lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), es una proteína codificada por el gen LCN2 en seres humanos. Se expresa en neutrófilos y a niveles bajos en el riñón, la próstata y los epitelios de las vías respiratorias y alimentarias.

El autor de la presente invención ha investigado la posible unión de los compuestos de la presente invención a la proteína Lcn2 empleando calorimetría de titulación isotérmica (ITC) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN). La ITC y la RMN demostraron inequívocamente la unión del ligando y revelaron información cuantitativa sobre la afinidad de unión (KD \approx 700 nM) y la ubicación del sitio de unión (véase la Figura 7). Curiosamente y lo más importante, el sitio de unión observado indica que la unión del compuesto es competitiva para la unión de Lcn2 a uno de sus receptores celulares cognados.

Los compuestos de la presente invención se administran a un paciente (preferiblemente un paciente humano) en una dosis terapéuticamente eficaz. Tal dosis eficaz se refiere a la cantidad del compuesto suficiente para dar como resultado la curación, prevención o mejora de afecciones relacionadas con trastornos neurodegenerativos. La dosis eficaz variará dependiendo de la salud y la condición física del individuo que se vaya a tratar, el grupo taxonómico del individuo que se vaya a tratar, la formulación de la composición, la evaluación de las situaciones médicas y otros factores relevantes.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, una dosis única de los compuestos de la invención es de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 5,0 g, preferiblemente de aproximadamente 0,05 mg a 2 g, más preferiblemente de aproximadamente 0,5 mg a 1 g, incluso más preferiblemente de aproximadamente 1 mg a 500 mg. Los compuestos de la presente invención se pueden administrar a un paciente en una cantidad de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 5 g, preferiblemente de aproximadamente 0,05 mg a 2 g, más preferiblemente de aproximadamente 0,5 mg a 1 g, incluso más preferiblemente de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal.

Las vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transmucosa o intestinal; administración parenteral, incluidas inyecciones intramusculares, subcutáneas, intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales o intranasales. La administración del compuesto de la presente invención utilizado en la composición farmacéutica o para poner en práctica el método de la presente invención se puede llevar a cabo en una variedad de formas convencionales, tales como ingestión oral, inhalación, aplicación tópica o cutánea, subcutánea, intraperitoneal, parenteral, o inyección intravenosa. Se prefiere la administración intravenosa y peroral al paciente.

La enfermedad neurodegenerativa prevenida o tratada según la invención es preferiblemente una sinucleinopatía. Las sinucleinopatías (también llamadas sinucleinopatías α) son enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por la acumulación anormal de agregados de proteína alfa-sinucleína en neuronas, fibras nerviosas o células gliales.

La sinucleinopatía se puede seleccionar del grupo que consiste en la enfermedad de Parkinson, la demencia con cuerpos de Lewy y la atrofia multisistémica. Otras enfermedades neurodegenerativas que se van a tratar/prevenir mediante los compuestos de la presente invención son la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Huntington.

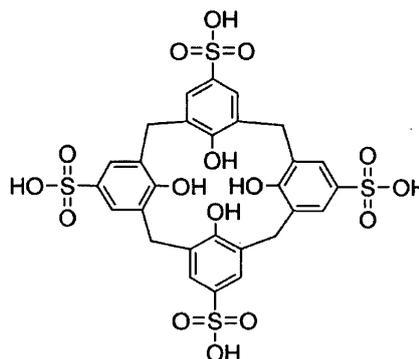
Un efecto adicional que podrían lograr los compuestos de la presente invención es promover la proliferación de neuronas; la activación controlada de astrocitos y/o la inhibición de la conversión de astrocitos quiescentes en reactivos. Como se señaló anteriormente, la activación controlada de los astrocitos se considera beneficiosa para las neuronas, pero los astrocitos hiperactivos pueden ser dañinos. Este efecto de los compuestos de la presente invención presumiblemente está relacionado con su función de unión a Lcn2/NGAL. El sitio de unión de los compuestos de la presente invención a Lcn2/NGAL es competitivo para la unión de Lcn2/NGAL a uno de sus receptores celulares cognados. Los compuestos de la invención demuestran un efecto inhibitorio de la actividad neurotóxica de Lcn2/NGAL.

Para estudiar más a fondo el efecto del compuesto en cultivos celulares neuronales, se desarrolló un ensayo de citotoxicidad utilizando la línea celular SH-SY5Y de Neuroblastoma humana como modelo in vitro para neuronas dopaminérgicas. En primer lugar, se demostró que las células SH-SY5Y diferenciadas terminalmente con RA-PMA son sensibles a la citotoxicidad por Lcn2/NGAL de una manera dependiente de la dosis. Además, en presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) desencadenadas por H_2O_2 la citotoxicidad por Lcn2/NGAL es más fuerte. En segundo lugar, se podría demostrar que las células SH-SY5Y diferenciadas terminalmente expresan ~ 5 veces más el receptor cognado Lcn2/NGAL (SLC22A17) en la membrana plasmática. Estos resultados explican por qué las células SH-SY5Y diferenciadas son más sensibles a Lcn2/NGAL.

Adicionalmente, se demostró que el Sulfocalixareno tiene propiedades de neuroprotección contra la proteína citotóxica Lcn2/NGAL en células de neuroblastoma SH-SY5Y diferenciadas humanas. Además, se demostró que el Sulfocalixareno protege contra MPP+ (un sustrato para el transportador de dopamina que se absorbe selectivamente en las neuronas dopaminérgicas donde inhibe el complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial) y el estrés por H_2O_2 en células SH-SY5Y diferenciadas humanas. El estrés oxidativo y el daño mitocondrial se han implicado en la patogénesis de varias enfermedades neurodegenerativas. Los resultados de los autores de la presente invención muestran que el Sulfocalixareno (500 μ M y 100 μ M) atenúa la reducción de la viabilidad celular inducida por MPP+ (1-metil-4-fenilpiridinio) y H_2O_2 . Además, las imágenes de contraste de fase representativas mostraron el efecto de protección de los cambios morfológicos inducidos por MPP+ y H_2O_2 .

En una realización preferida, los compuestos de la presente invención comprenden una cadena principal de calixareno. Un calixareno generalmente se define como un macrociclo u oligómero cíclico basado en un producto de hidroxialquilación de un fenol y un aldehído. Los calixarenos se caracterizan por una forma tridimensional de canasta, copa o cubeta. En calix[4]arenos el volumen interno es de alrededor de 10 angstroms cúbicos. Los calixarenos se caracterizan por un borde superior ancho y un borde inferior estrecho y un anillo central. Con fenol como material de partida, los 4 grupos hidroxilo son intraanulares en el borde inferior. En un resorcin[4]areno 8 grupos hidroxilo se colocan extraanulares sobre el anillo superior. Los calixarenos existen en diferentes conformaciones químicas porque es posible la rotación alrededor del puente de metileno.

Un ejemplo preferido de un calixareno es el Sulfocalixareno, por ejemplo, en forma de una sal de sodio. Como ejemplo, se utiliza 4-sulfocalix[4]areno representado en la siguiente fórmula 1



Fórmula 1

5 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de un compuesto como se define anteriormente. La composición farmacéutica contiene preferiblemente uno o más agentes auxiliares farmacéuticamente aceptables y está en una forma farmacéutica que permite que el compuesto farmacéutico activo se administre con alta biodisponibilidad y que ayuda a los compuestos a cruzar la barrera hematoencefálica. Los agentes auxiliares adecuados pueden estar, por ejemplo, basados en ciclodextrinas. Las formulaciones adecuadas podrían, por ejemplo, incorporar nanopartículas poliméricas sintéticas formadas por un polímero seleccionado del grupo que consiste en acrilatos, metacrilatos, cianoacrilatos, acrilamidas, polilactatos, poliglicolatos, polianhidratos, polioctoésteres, gelatina, albúmina, poliestirenos, polivinilos, poliactoleína, poliglutaraldehído y derivados, copolímeros y mezclas de los mismos.

10 Por lo tanto, en una realización preferida, la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de un compuesto de la invención como ingrediente farmacéutico activo, o que contiene como único ingrediente farmacéutico activo ese compuesto, y uno o más agentes auxiliares farmacéuticamente aceptables.

15 La invención también se refiere a terapias combinadas para enfermedades neurodegenerativas, que comprenden administrar un compuesto de acuerdo con la invención combinado con uno o más de otros compuestos farmacéuticamente activos. En particular, en un aspecto, la invención se dirige a un kit que comprende una cantidad eficaz de:

- 20 (i) un primer compuesto de acuerdo con la invención;
- 25 (ii) un segundo compuesto utilizado para prevenir o tratar enfermedades neurodegenerativas; y uno o más agentes auxiliares farmacéuticamente aceptables, para la administración separada, secuencial o simultánea a un paciente que necesite terapia. Opcionalmente, el segundo compuesto se puede seleccionar del grupo que consiste en levodopa, agonistas de dopamina, inhibidores de monoaminoxidasa, antagonistas anticolinérgicos de glutamato, inhibidores de catecol-C-metiltransferasa (COMT) e inhibidores de descarboxilasa DOPA.

30 La invención se refiere adicionalmente a un método para el tratamiento del cuerpo humano y/o animal. En una realización, la invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa que comprende administrar a un ser humano que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto capaz de

- 35 a) prevenir la formación de agregados de α -sinucleína (a-syn), y
b) unirse a lipocalina 2 (Lcn2/NGAL).

40 La invención se refiere adicionalmente a un compuesto que comprende una cadena principal de calixareno para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa. Preferiblemente, el compuesto para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa es la sal de sodio de Sulfocalixareno. Más preferiblemente, el tratamiento implica la administración del compuesto a un paciente en una cantidad de aproximadamente 0,01 mg a 5,0 g/kg de peso corporal, preferiblemente, la administración del compuesto se realiza por vía intravenosa u oral.

45 En una realización adicional, la invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa que comprende administrar a un ser humano que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto que comprende una cadena principal de calixareno. Preferiblemente, la invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa que comprende administrar a un ser humano que lo necesite una cantidad eficaz de sal de sodio de Sulfocalixareno. Más preferiblemente, el tratamiento implica la administración del compuesto a un paciente en una cantidad de aproximadamente 0,01 mg a 5,0 g/kg de peso corporal, incluso más preferiblemente, la administración del compuesto se realiza por vía intravenosa u oral.

La presente invención se ilustrará ahora adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

5 Estudios de RMN de interacciones de Sulfocalixareno con α -sinucleína unida a micelas

Los liposomas utilizados en los experimentos contenían solo 1-hexadecanoil-2-(9Z-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfo-(1'-*rac*-glicerol) (sal de sodio) denominado por lo tanto POPG. Se solicitó POPG a Avantis Polar Lipids como una reserva de 5 mg/ml disuelto en cloroformo. La solución de reserva se dividió en alícuotas en viales de vidrio, la mayoría del cloroformo se evaporó bajo flujo de nitrógeno y la muestra se secó al vacío durante un mínimo de 45 minutos. El POPG se disolvió en el tampón deseado a 1 mg/ml, se mantuvo a RT durante 1 hora y se sometió a 3 ciclos de congelación-descongelación para completar la solvatación. La suspensión se sometió a sonicación en un sonicador de baño durante 5 minutos y se hizo circular a través de una extrusora (mini extrusora Avanti®) equipada con una membrana de 0,4 μ m durante 20 veces.

Para permitir mediciones de alta concentración, la solución resultante se centrifugó a 200.000 x g durante 10 minutos, se desechó el 75% del sobrenadante y el sedimento se resuspendió en el 25% restante produciendo una solución de 4 mg/ml de POPG. Esta solución se congeló en alícuotas antes de utilizarse en mediciones adicionales. Para verificar la integridad de los liposomas tanto con respecto a la congelación como al procedimiento de concentración, se realizaron mediciones de dispersión dinámica de la luz (DLS) comparando liposomas de nueva aportación no concentrados con reservas concentradas congeladas. Estas mediciones, así como las mediciones de RMN en α -syn con liposomas de nueva aportación y de reserva, no mostraron una diferencia medible causada el tratamiento de los autores de la presente invención.

Para todas las mediciones de RMN, la proteína se sometió a diálisis en fosfato 20 mM, pH = 7,4, NaCl 100 mM. Las concentraciones de proteínas se estimaron a partir de la absorción a 280 nm. La pureza y estabilidad de la muestra se verificaron mediante SDS-PAGE. Los espectros de RMN se registraron en espectrómetros Varian Direct Drive 600 MHz y Varian Inova 800MHz con D₂O al 10% como solvente de bloqueo. Los espectros se procesaron utilizando NMRPipe (F. Delaglio, S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, A. Bax, NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* 6, 277-293 (1995)). La α -sinucleína se utilizó a 0,12 mM mientras que los liposomas POPG se añadieron a 0,8 mg/ml cuando estaban presentes. Las mediciones obtenidas con α -Sinucleína libre (apo) utilizaron la misma concentración de aproximadamente 0,12 mM. La interacción entre el Sulfocalixareno y la α -sinucleína monomérica (soluble) se observó mediante el mapeo de los cambios de desplazamiento químico observados en las posiciones específicas de los residuos. Como se puede observar en la Figura 1 (parte inferior), los cambios en el desplazamiento químico más pronunciados se agrupan en la parte N-terminal de la α -sinucleína. Todos los espectros de correlación ¹H-¹⁵N se registraron con una secuencia de pulso SOFAST (P. Schanda, E. Kupce, B. Brutscher, SOFAST-HMQC experiments for recording two-dimensional heteronuclear correlation spectra of proteins within a few seconds. *J Biomol NMR* 33, 199-211 (2005)) para muestras 120 μ M y HSQCS de sensibilidad mejorada detectada por Rance-Kay (J. Cavanagh, A. G. Palmer, P. E. Wright, M. Rance, Sensitivity improvement in proton-detected 2-dimensional heteronuclear relay spectroscopy. *J Magn. Reson.* 91, 429-436 (1991); L. E. Kay, P. Keifer, T. Saarinen, Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J Am Chem Soc* 114, 10663-10665 (1992)) para muestras 40 μ M. La asignación de resonancia en condiciones fisiológicas cercanas estaba fácilmente disponible en una publicación anterior (J. N. Rao, Y. E. Kim, L. S. Park, T. S. Ulmer, Effect of pseudorepeat rearrangement on alpha-synuclein misfolding, vesicle binding, and micelle binding. *J Mol Biol* 390, 516-529 (2009)) (BMRB ID 16300). La unión de Sulfocalixareno a Lcn2 se sondeó utilizando espectroscopía de RMN de última generación (las condiciones experimentales fueron similares a los experimentos de RMN de α -sinucleína).

Calorimetría de titulación isotérmica (ITC) - La unión de Sulfocalixareno libre y unido a Lcn2 se determinó utilizando un microcalorímetro Microcal ITC200. Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C en Tris 20 mM, pH 7,4, NaCl 50 mM. La celda de referencia contenía agua Milli Q. La concentración de Lcn2 en la celda de reacción fue 50 μ M. La concentración de Sulfocalixareno en la jeringa fue 500 μ M. La titulación consistió en 19 inyecciones sucesivas de 4 μ L, con una velocidad de agitación de 800 rpm, separadas por intervalos de 300 s. El análisis de datos se realizó con el soporte lógico Origin suponiendo un único sitio de unión.

La Figura 1 muestra una caracterización de RMN de los efectos del Sulfocalixareno sobre la estructura de α -syn y la unión de lípidos. La unión de α -syn a liposomas de alto peso molecular conduce a una reducción significativa de la señal. Sin embargo, la flexibilidad intramolecular residual en el estado unido al liposoma conduce a cambios de intensidad específicos del residuo. La unión a la membrana de α -syn se realiza a través de dos modos de unión (que implican el dominio N-terminal o el dominio N-terminal y NAC central). El dominio C-terminal (más allá del residuo 125) de α -syn retiene la flexibilidad conformacional en ambos modos de unión y, por lo tanto, muestra la intensidad de señal más alta en los espectros de RMN. (arriba) Patrón de atenuación de la señal (razón de intensidad frente a la posición del residuo) para (120 mM) con liposomas POPG (0,8 mg/ml) (color negro). La adición de Sulfocalixareno (color rojo) libera en parte α -syn de los liposomas (y se observa a través de un aumento en la intensidad de la señal,

en particular en el extremo N-terminal). (abajo) Mapeo del sitio de unión de Sulfocalixareno en α -syn. La unión de Sulfocalixareno conduce a cambios de desplazamiento químico específicos de residuos (observados en los espectros de RMN). Los cambios más pronunciados se observaron para residuos en el dominio N-terminal (1-40).

- 5 La Figura 7 ilustra una caracterización biofísica de la unión de Sulfocalixareno a Lcn2 soluble. (parte superior). Superposición de espectros HSQC ^1H - ^{15}N para Lcn2 sin (color rojo) y con Sulfocalixareno (color azul). Los cambios en las frecuencias de picos cruzados (posiciones) indican residuos que se ven afectados por la unión. (abajo) Trazas de calorimetría de titulación isotérmica de unión de Sulfocalixareno a Lcn2. El Sulfocalixareno se une a Lcn2 con una K_D aproximadamente 700 nM. Por lo tanto, Lcn2 y Sulfocalixareno se unen entre sí con una fuerte afinidad.
- 10 Adicionalmente, es de esperar que esta unión también pueda tener lugar in vivo, y que es muy probable que esta unión en el ratón sea responsable de los efectos beneficiosos sobre los astrocitos neurotóxicos observados en ratones tratados con Sulfocalixareno.

Referencias

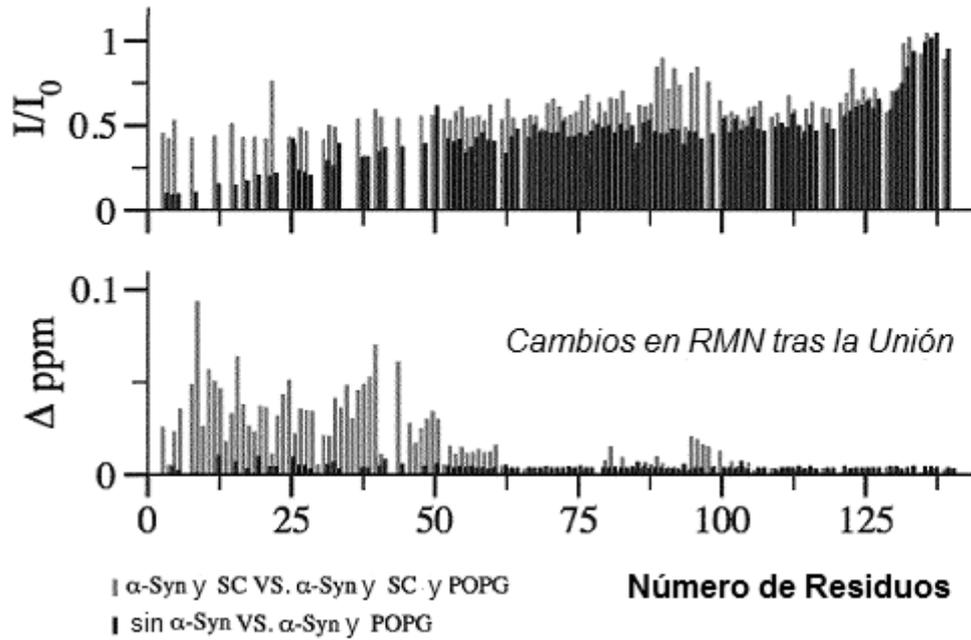
- 15 Bi, F., Huang, C., Tong, J., Qiu, G., Huang, B., Wu, Q., et al. (2013). Reactive astrocytes secrete Lcn2 to promote neuron death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(10), 4069-4074. doi:10.1073/pnas.1218497110
- 20 Kim, B. W., et al. (2016). Pathogenic Upregulation of Glial Lipocalin-2 in the Parkinsonian Dopaminergic System. *Journal of Neuroscience*, 36(20), 5608-5622. doi:10.1523/JNEUROSCI.4261-15.2016
- Lamberto, G. R., Binolfi, A., Orsellet, M. L., Bertoncini, C. W., Zweckstetter, M., Griesinger, C., y Fernandez, C. O. (2009). Structural and mechanistic basis behind the inhibitory interaction of PcTS on α -synuclein amyloid fibril formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(50), 21057-21062.
- 25 Rabl, R., Horvath, A., Breitschaedel, C., Flunkert, S., Roemer, H., y Hutter-Paier, B. (2016). *Journal of Neuroscience Methods*. *Journal of Neuroscience Methods*, 274, 125-130. doi:10.1016/j.jneumeth.2016.10.006

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto que comprende un esqueleto de calixareno para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, en donde el compuesto es capaz de
- 10 a) prevenir de la formación de agregados de α -sinucleína (a-syn), y
b) unirse a lipocalina 2 (Lcn2/NGAL).
- 15 2. El compuesto para su uso de la reivindicación 1 que adicionalmente
- 20 c) tiene un efecto protector contra el estrés oxidativo; y/o
d) tiene un efecto protector contra la neurotoxicidad inducida por disfunción mitocondrial, y/o
e) es capaz de mejorar los déficits motores en ratones transgénicos (tg) para α -syn de una manera dependiente de la dosis.
- 25 3. El compuesto para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enfermedad es una sinucleinopatía, preferiblemente la sinucleinopatía se selecciona del grupo que consiste en la enfermedad de Parkinson, la demencia con cuerpos de Lewy y la atrofia multisistémica.
- 30 4. El compuesto para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, que además es capaz de promover la proliferación de neuronas.
- 35 5. El compuesto para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, que además es capaz de activar de forma controlada los astrocitos y/o inhibir la conversión de los astrocitos quiescentes en reactivos.
- 40 6. El compuesto para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, donde el sitio de unión del compuesto a Lcn2/NGAL es competitivo para la unión de Lcn2/NGAL a uno de sus receptores celulares cognados.
- 45 7. El compuesto para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa de acuerdo con la reivindicación 6, donde el compuesto demuestra un efecto inhibitor de la actividad neurotóxica de Lcn2/NGAL.
- 50 8. El compuesto para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa de acuerdo con la reivindicación 6, que es competitivo para la unión del receptor celular cognado Lcn2/NGAL (SLC22A17) que está regulado por incremento en células SH-SY5Y de neuroblastoma terminal diferenciado.
- 55 9. El compuesto para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, donde la prevención de la formación de agregados de α -syn en las neuronas se logra al reducir la unión a la membrana y el ensamblaje en dímeros y oligómeros más pequeños de α -syn en propagación.
- 60 10. El compuesto para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado porque** confiere efectos protectores contra la disfunción mitocondrial inducida por MPP+ y el estrés oxidativo (H₂O₂) en células de neuroblastoma terminal diferenciado SH-SY5Y.
11. El compuesto para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa de acuerdo con la reivindicación 7 o 9, que interactúa con el dominio N-terminal del monómero de α -syn, dímeros de α -syn u oligómeros de α -syn más pequeños.
12. El compuesto para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa de acuerdo con la reivindicación 1, que es la sal de sodio de Sulfocalixareno.
13. El compuesto para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en donde el tratamiento implica la administración del compuesto a un paciente en una cantidad de aproximadamente 0,01 mg a 5,0 g/kg de peso corporal, preferiblemente, la administración del compuesto se realiza por vía intravenosa u oral.

α -Sinucleína y POPG y Sulfocalixareno

Sulfocalixareno libera Sinucleína de la membrana



Ligando

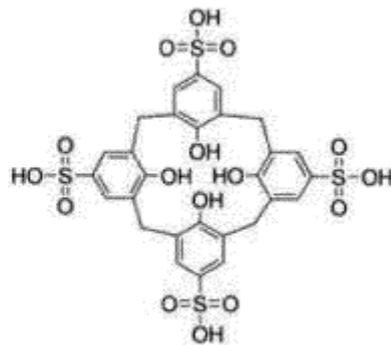


Fig. 1

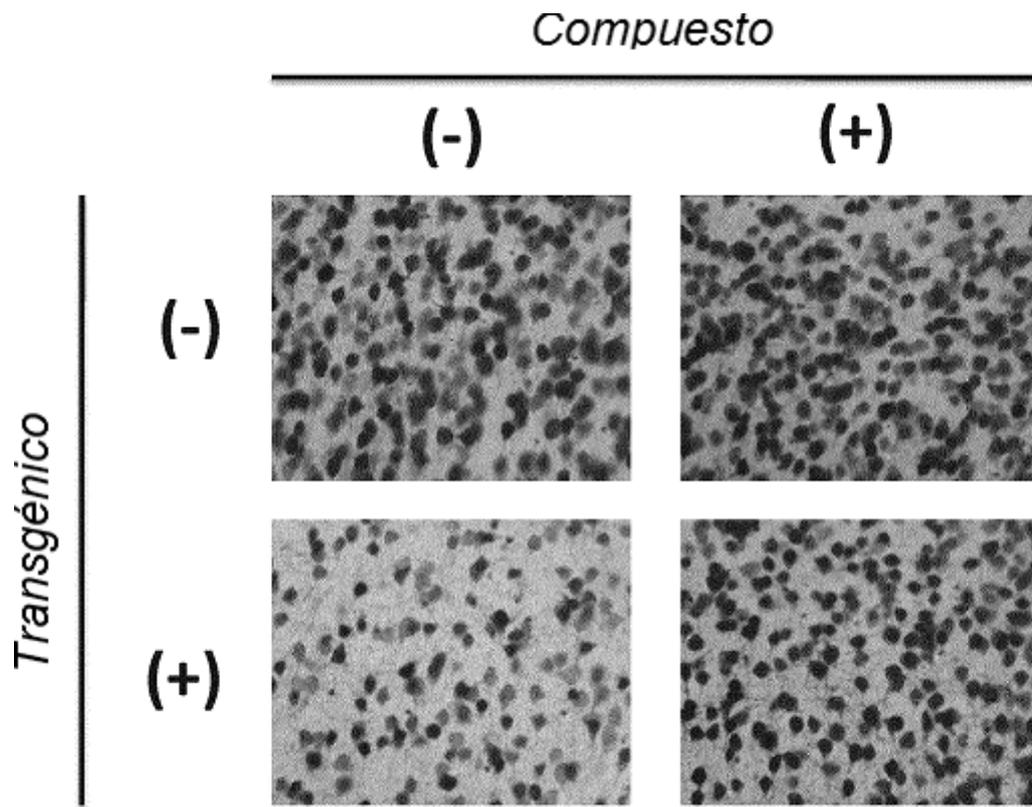


Fig. 2

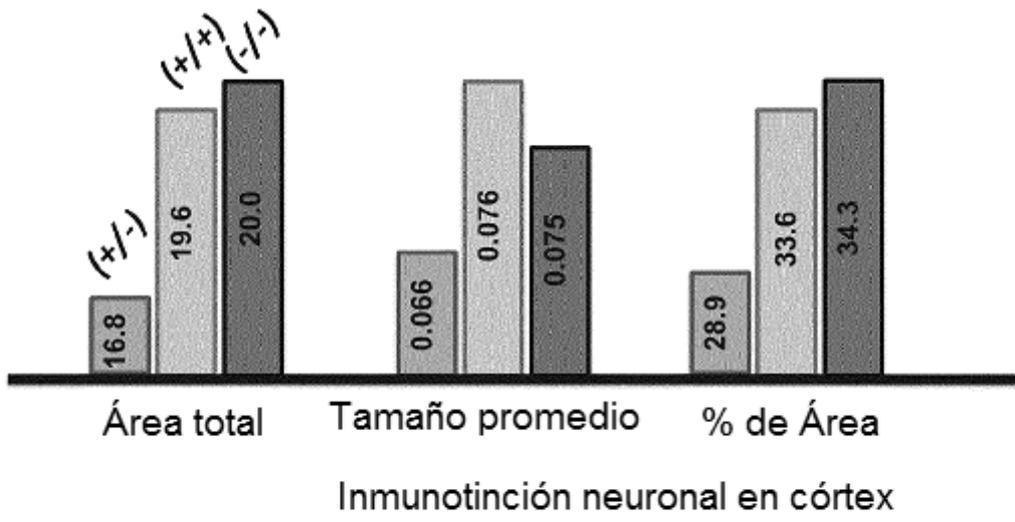


Fig. 3

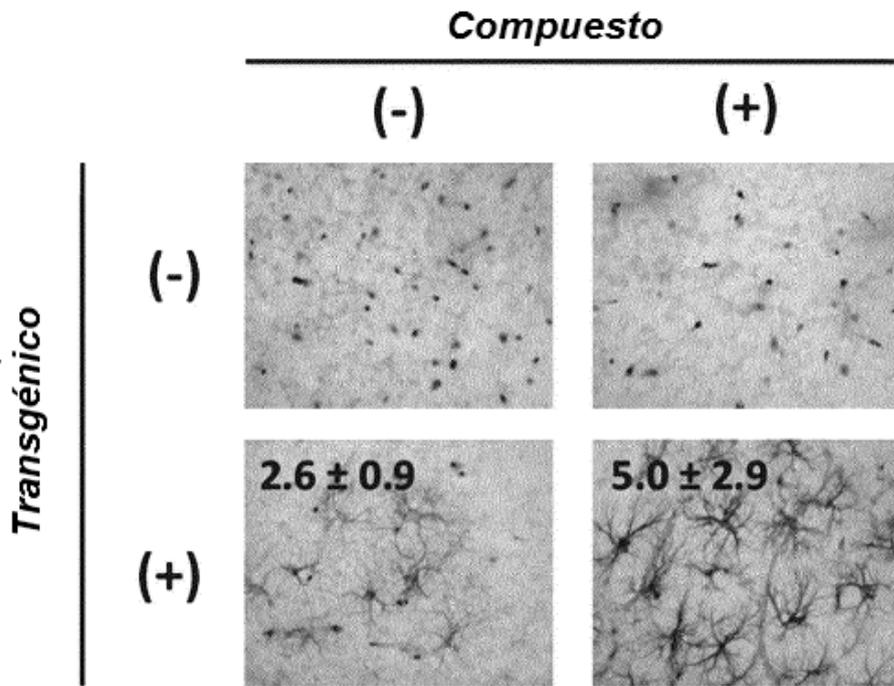


Fig. 4

Fig. 5A

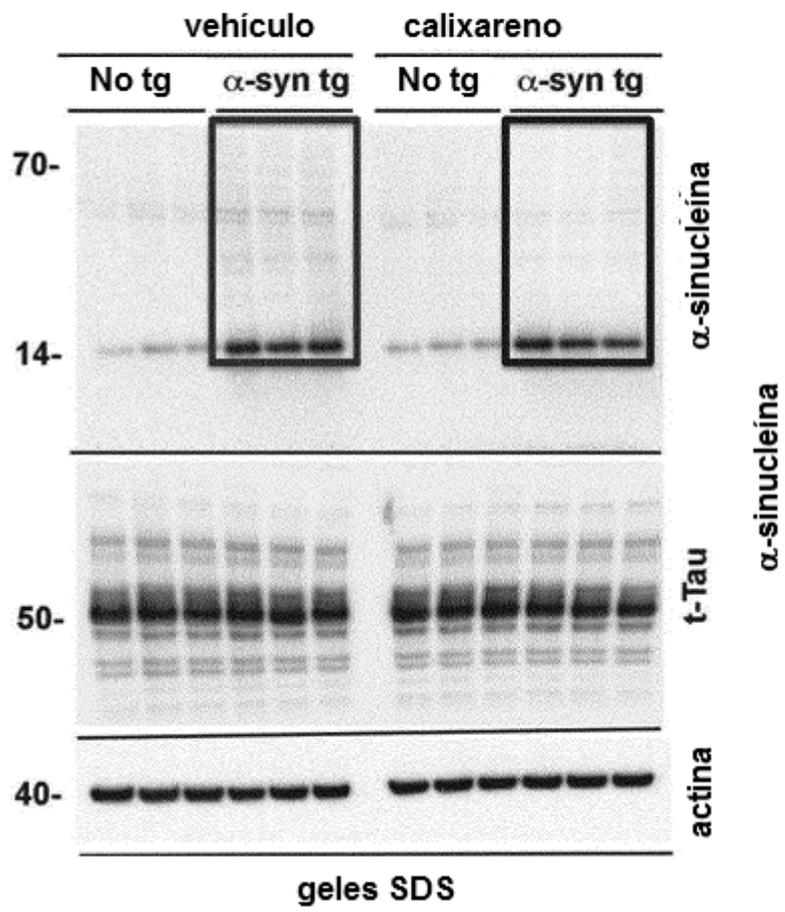
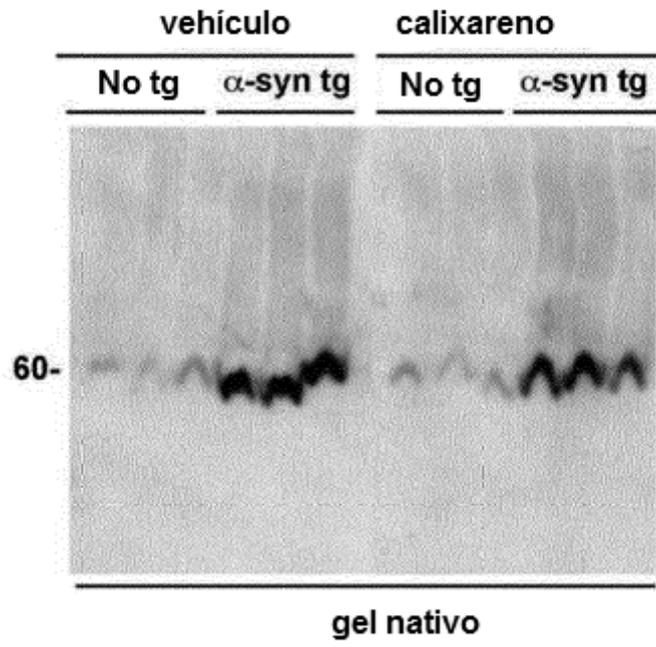


Fig. 5B



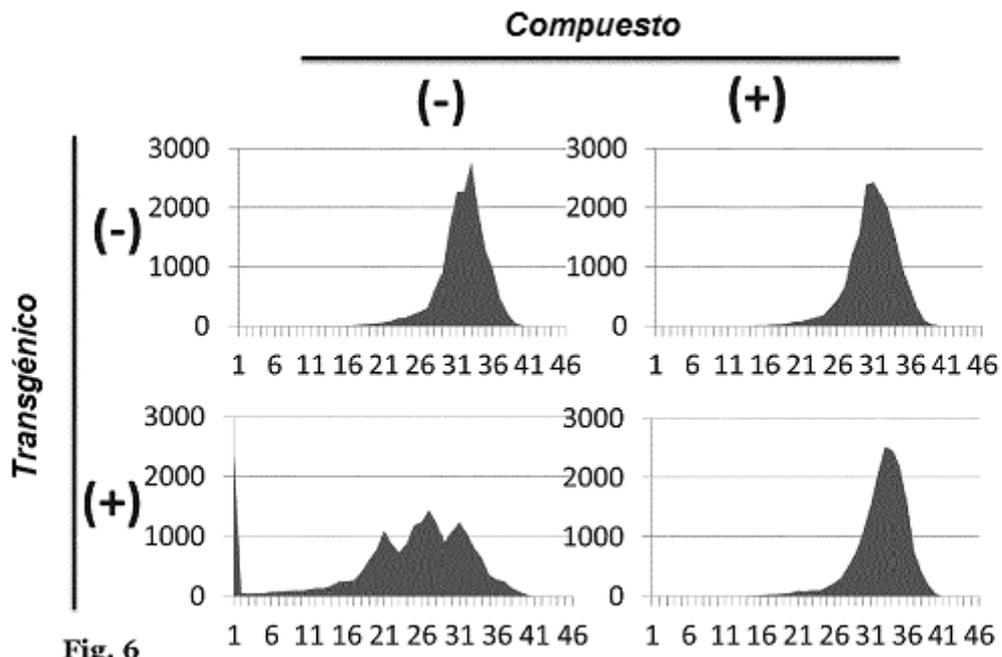


Fig. 6

Fig. 7A

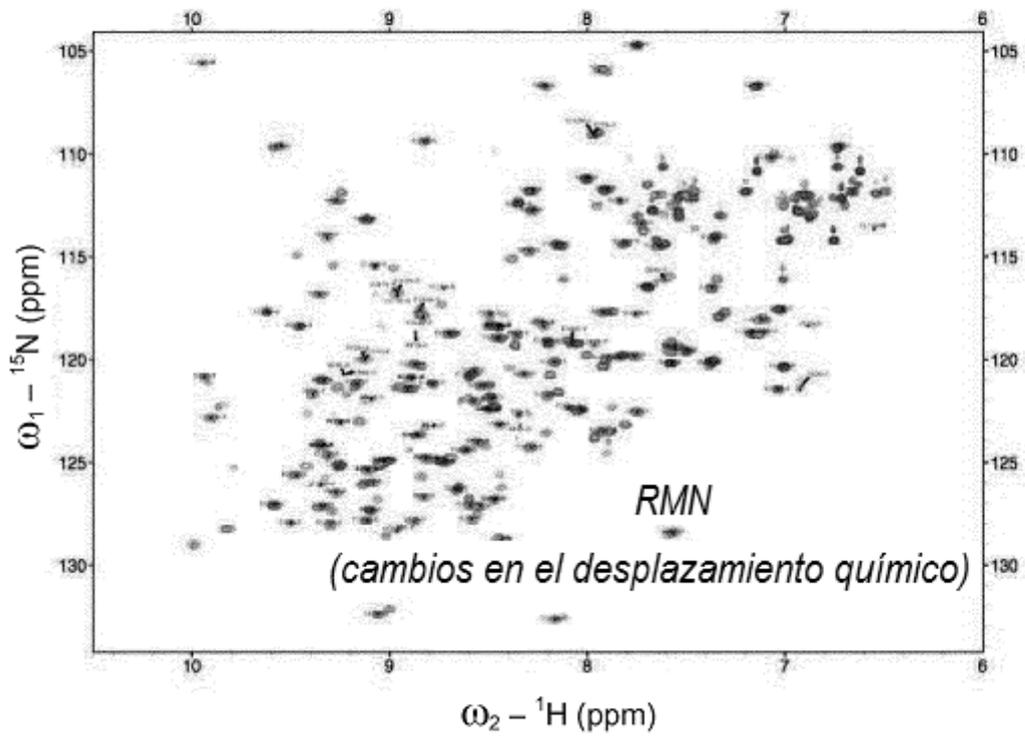


Fig. 7B

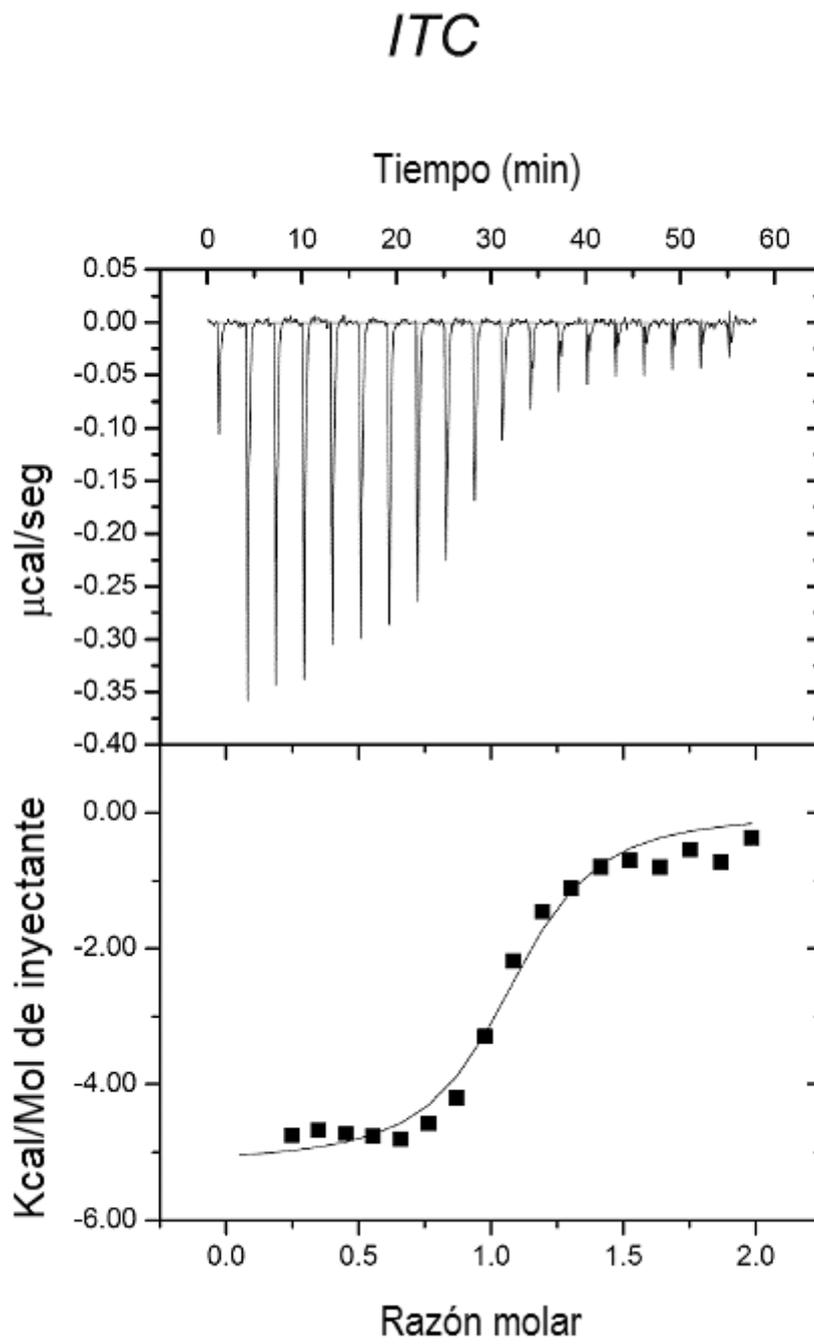


Fig. 7C

ITC

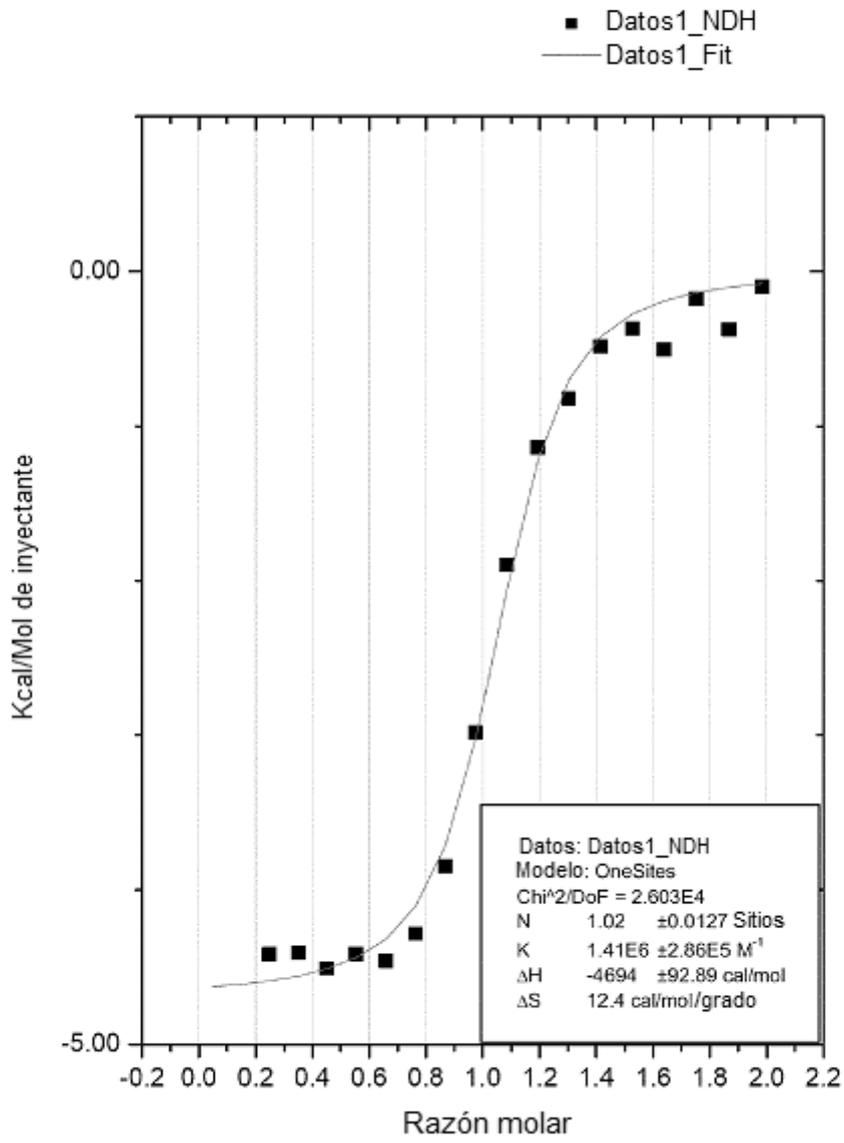


Fig. 7D

Termoflúor

(desplazamiento en el punto de fusión)

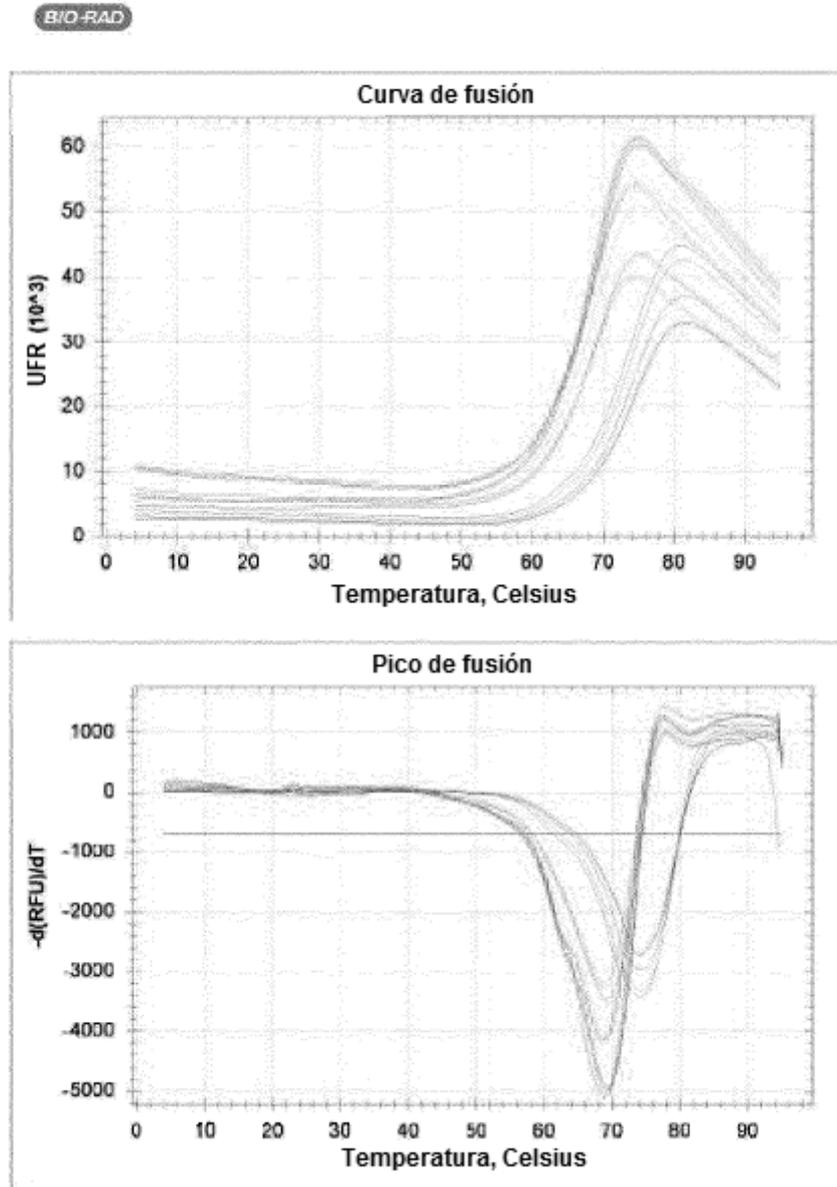


Fig. 7E

Datos de la curva de fusión

Pocillo	Flúor	Contenido	Muestra	Temp.fusión
B01	FAM	Descon-13		69.00
B02	FAM	Descon-14		68.50
B03	FAM	Descon-15		69.00
B04	FAM	Descon-16		68.50
C01	FAM	Descon-25		74.00
C02	FAM	Descon-26		94.50
C02	FAM	Descon-26		74.00
C03	FAM	Descon-27		74.50
C04	FAM	Descon-28		74.00
D01	FAM	Descon-37		69.50
D02	FAM	Descon-38		69.50
D03	FAM	Descon-39		69.50
D04	FAM	Descon-40		69.00

Fig. 8A

A

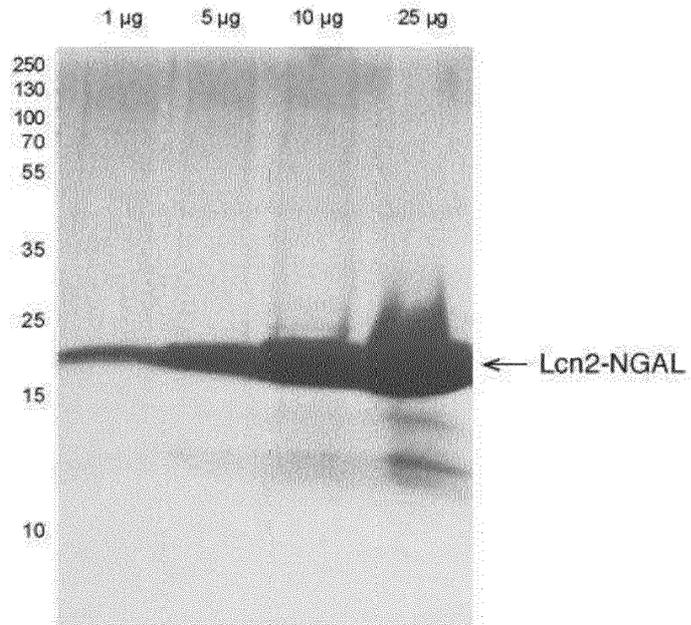


Fig. 8B

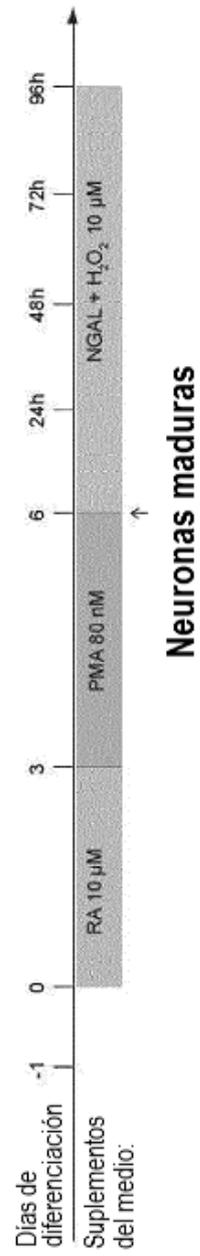


Fig. 8C

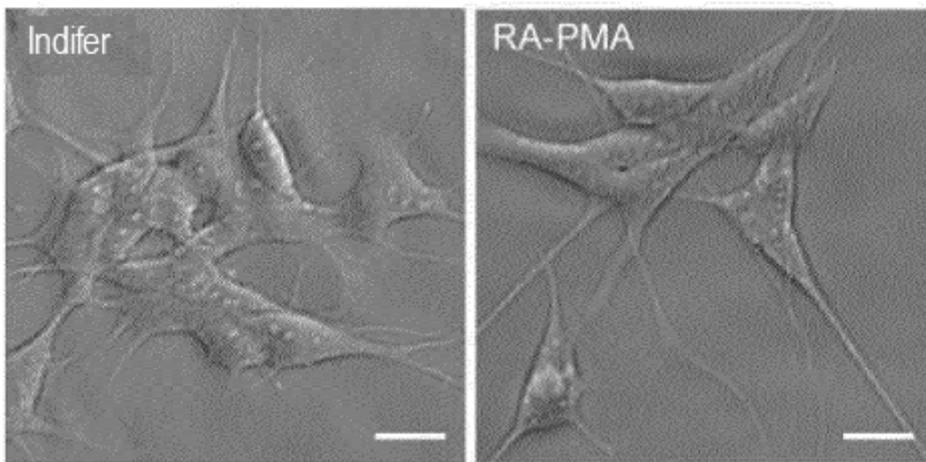


Fig. 8D

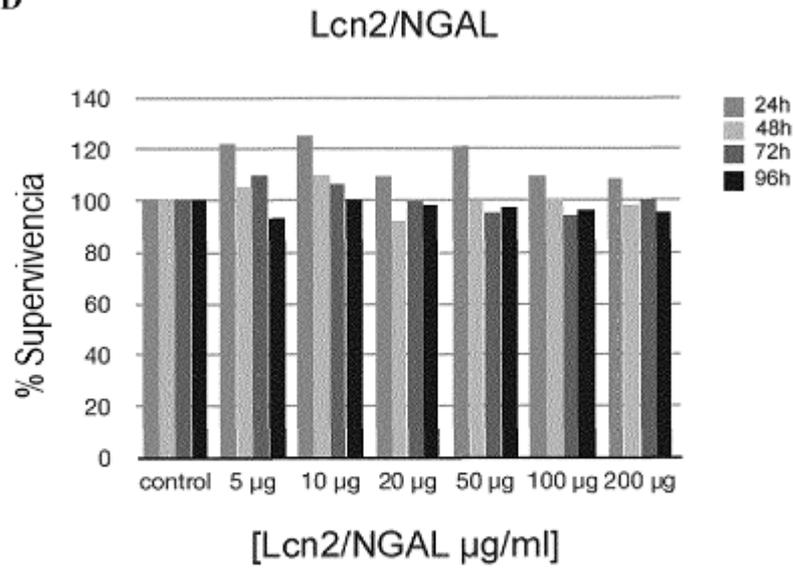


Fig. 8E

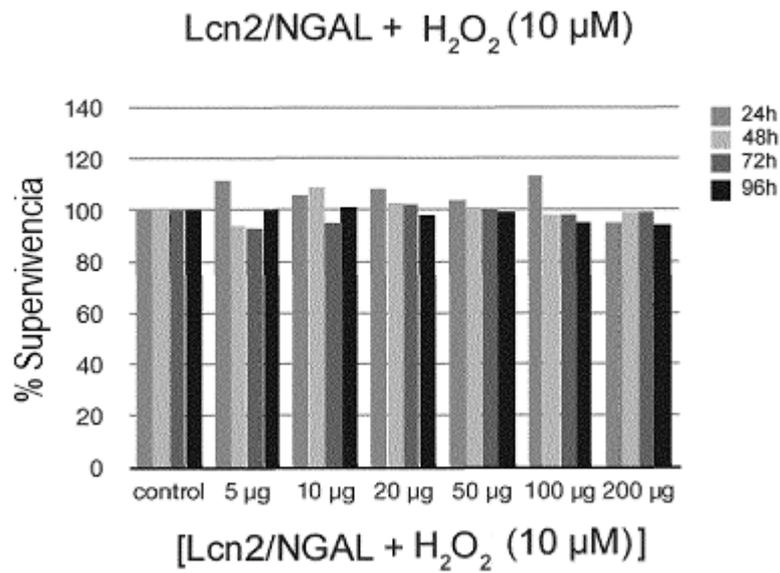


Fig. 9A

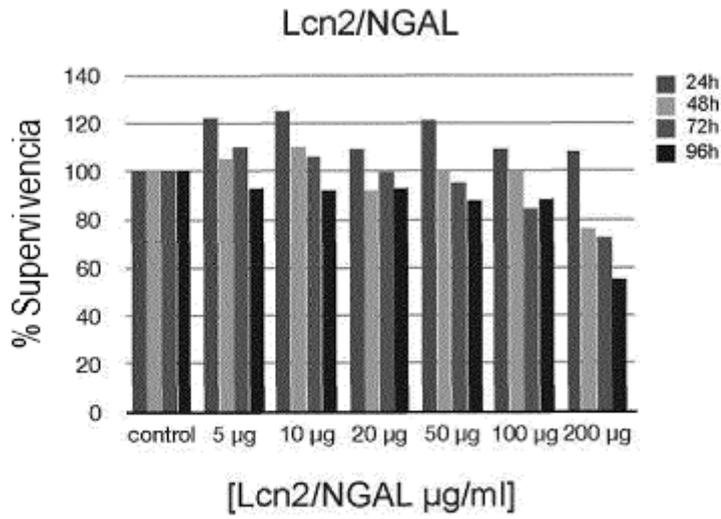


Fig. 9B

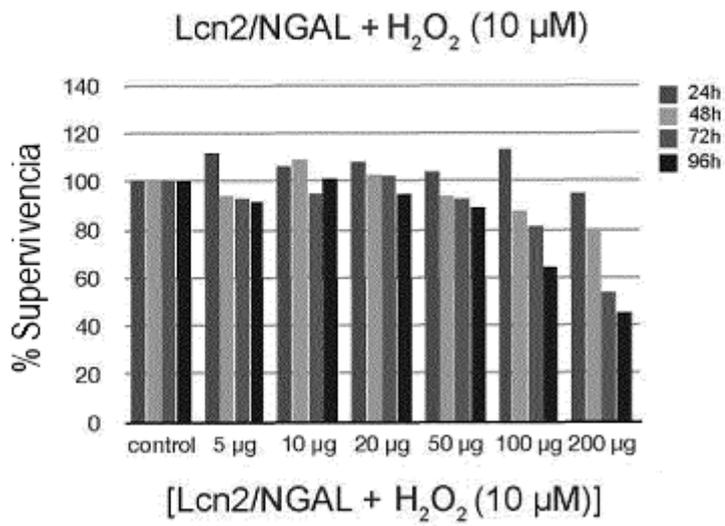


Fig. 9C

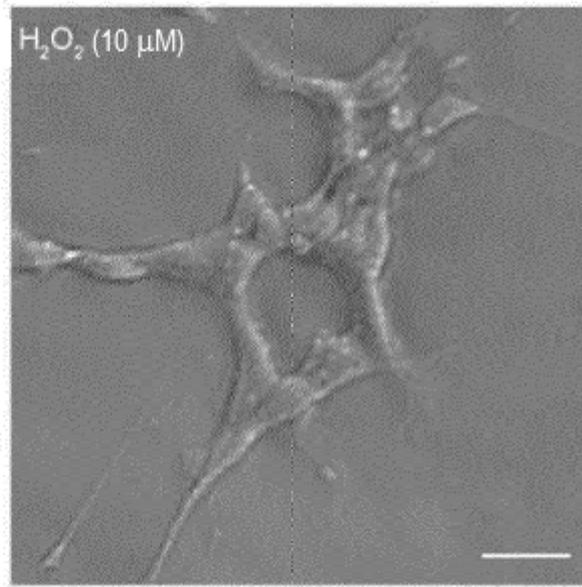
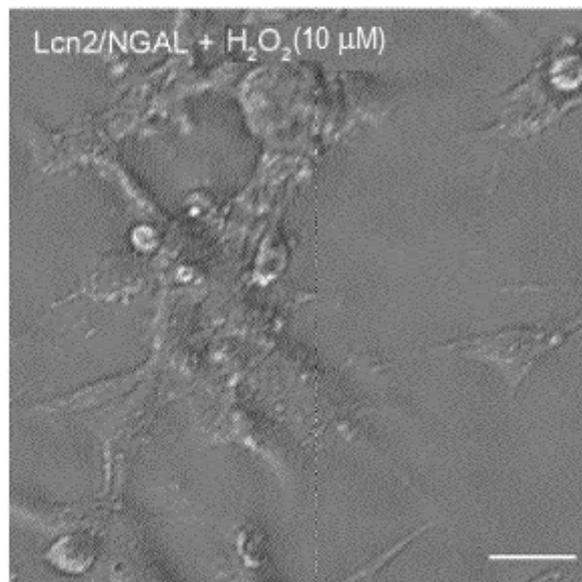


Fig. 9D



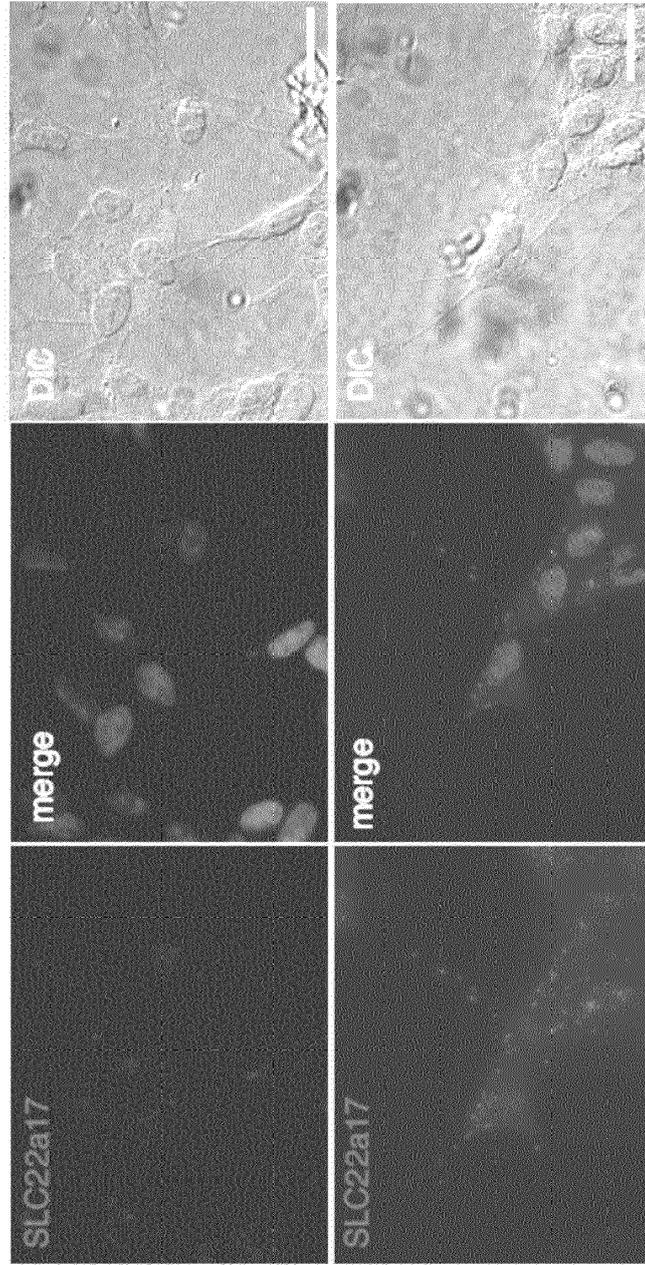


Fig. 10A

Fig. 10B

Fig. 10C

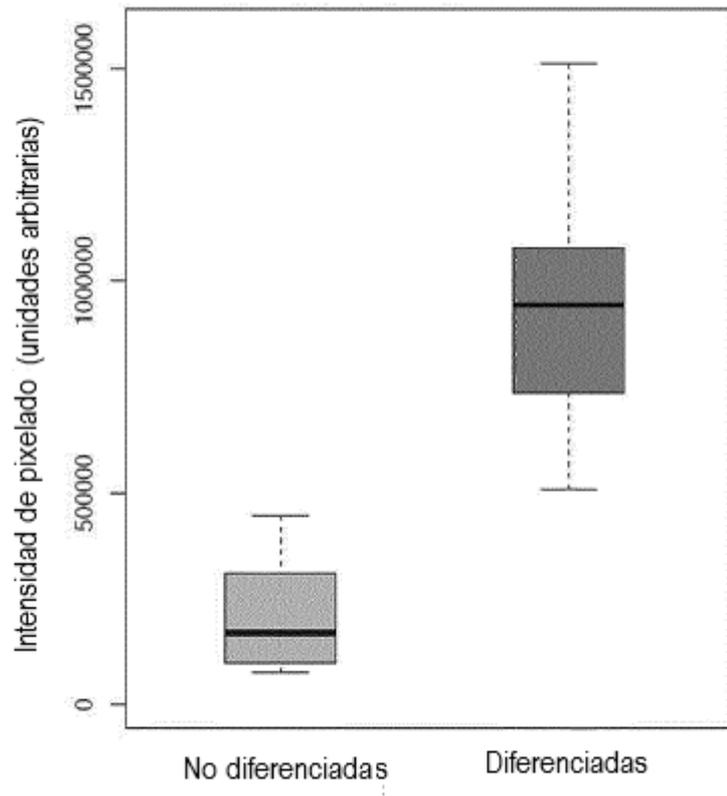


Fig. 11

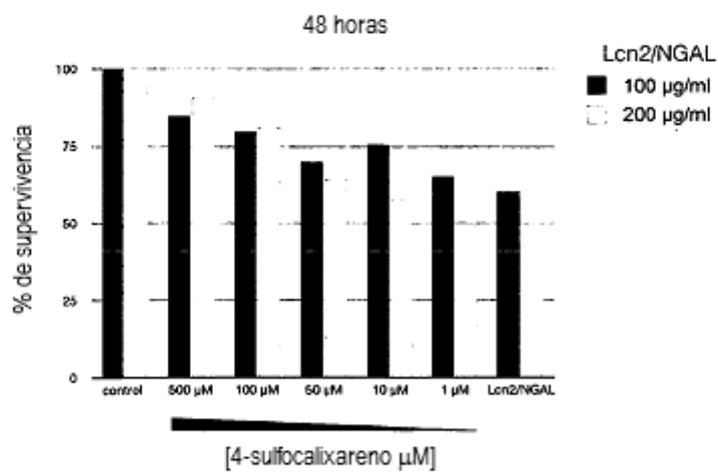
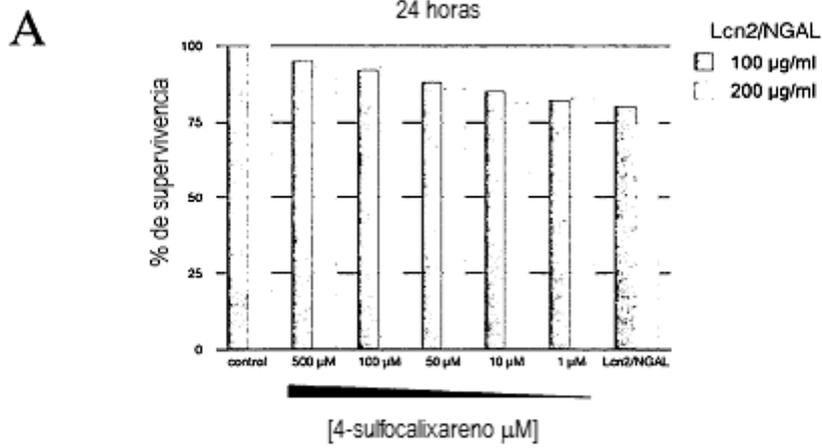


Fig. 11

B

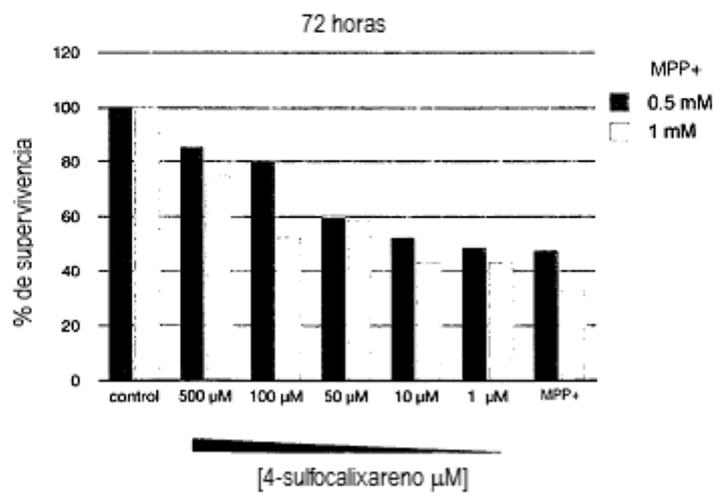
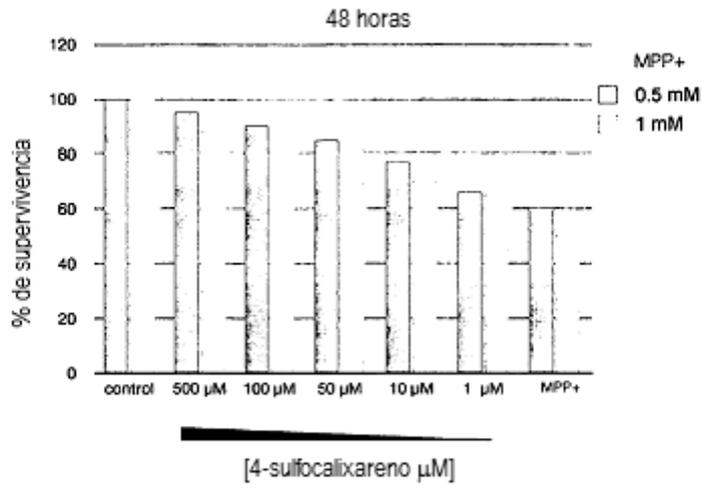
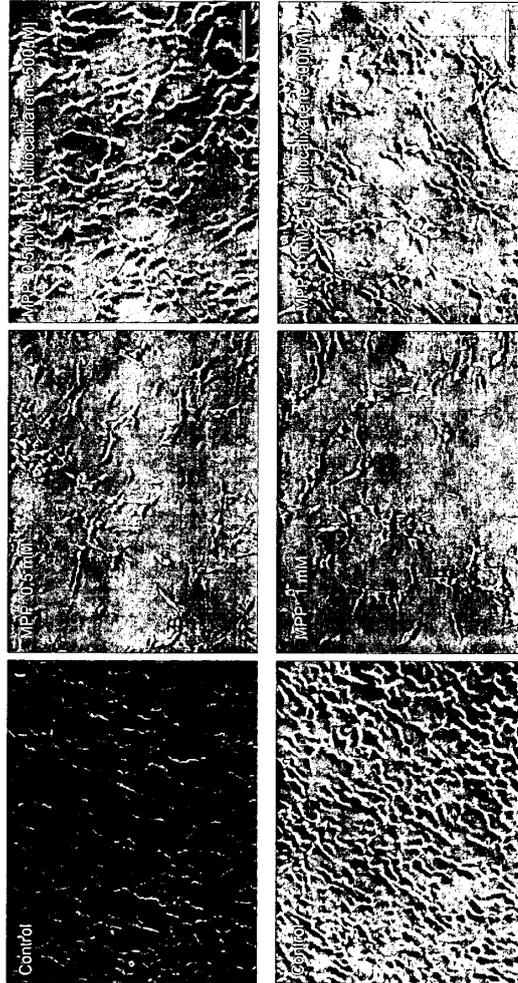


Fig. 12



A

Fig. 12

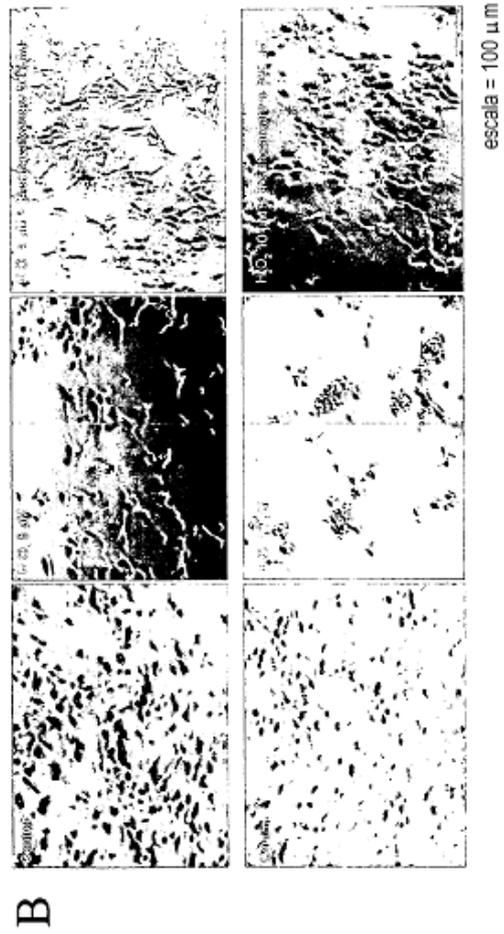


Fig. 13

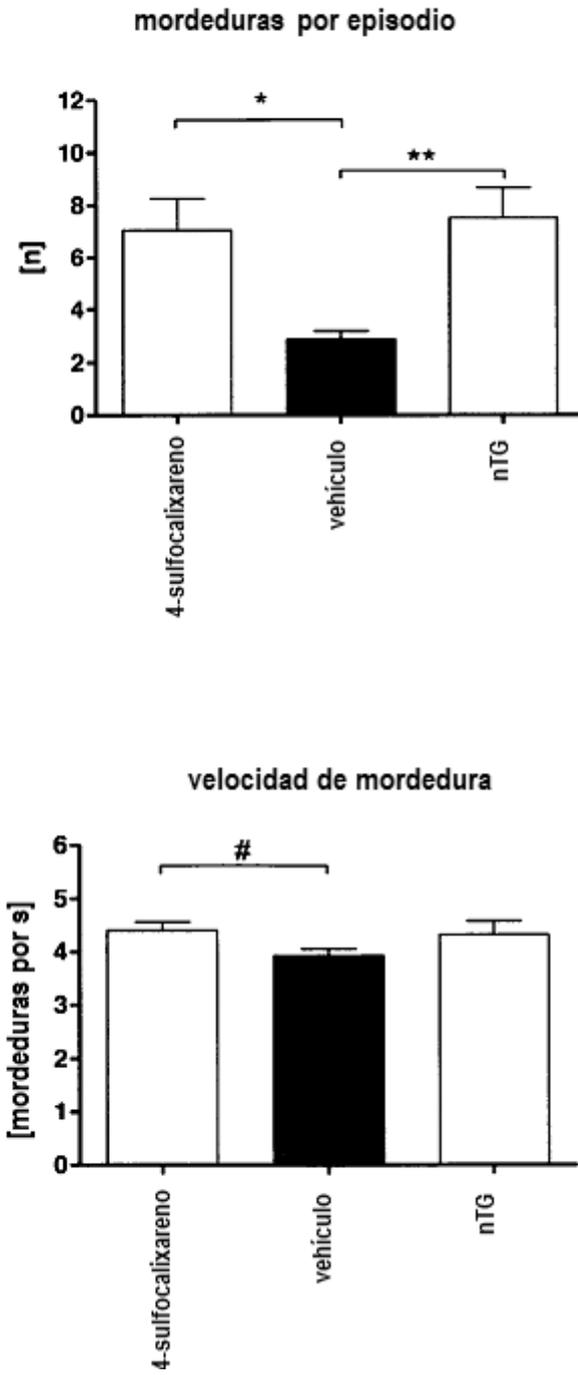


Fig. 14

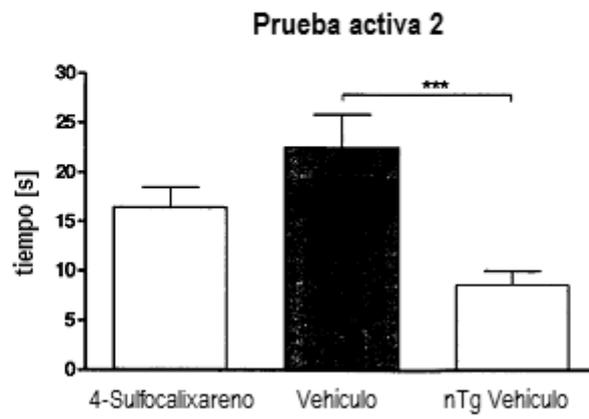
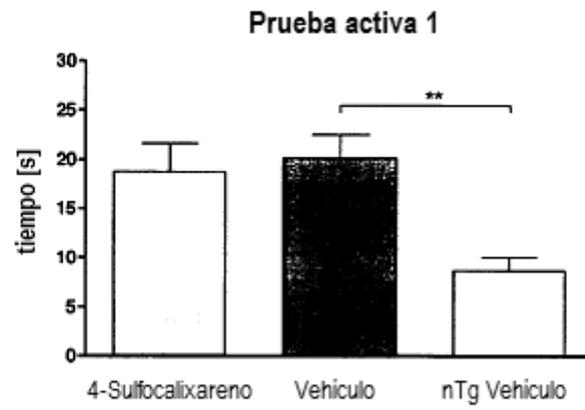


Fig. 14

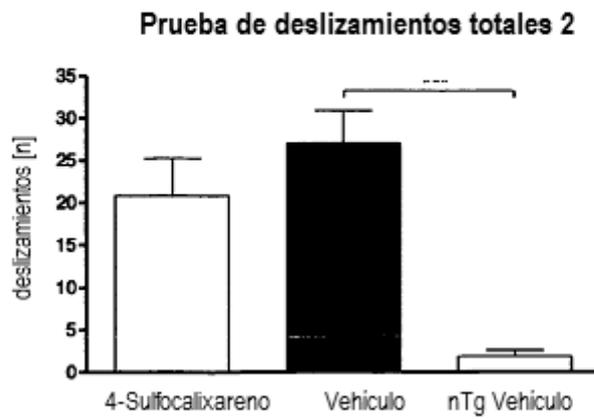
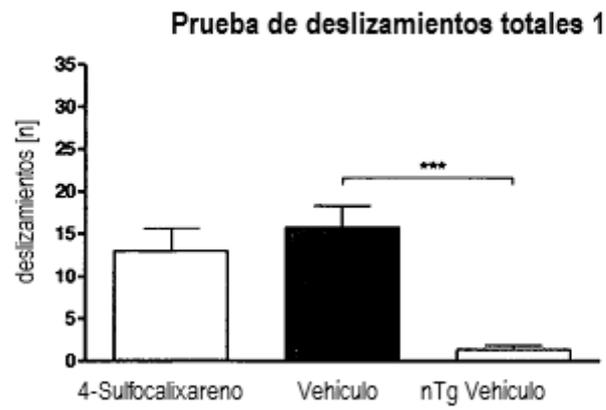
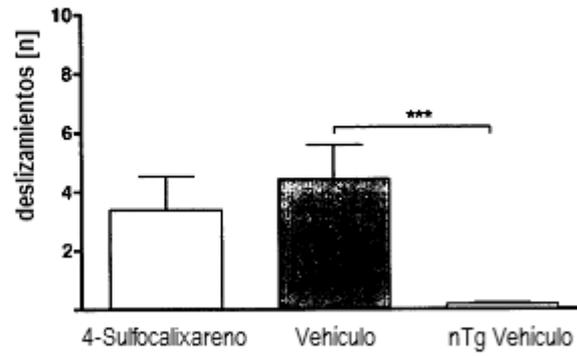


Fig. 14

Prueba de deslizamientos/velocidad 1



Prueba de deslizamientos/velocidad 2

