(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 757 606**

(21) Número de solicitud: 201800246

(51) Int. CI.:

C07D 493/08 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

29.10.2018

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

29.04.2020

(71) Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE CÁDIZ (100.0%)
C/ Ancha, 16
11001 Cádiz ES

(72) Inventor/es:

CASTRO GONZÁLEZ, Carmen;
HERNÁNDEZ GALÁN, Rosario;
DOMINGUEZ GARCIA, Samuel;
GERIBALDI DOLDÁN, Noelia;
MURILLO CARRETERO, María Isabel;
MACÍAS SÁNCHEZ, Antonio José;
CARRASCO VIÑUELA, Manuel y
GARCÍA ALLOZA, Mónica

(54) Título: **Composición capaz de promover la formación de neuronas en cultivo y en lesiones cerebrales**

(57) Resumen:

Composición capaz de promover la formación de neuronas en cultivo y en lesiones cerebrales.

Esta invención está relacionada con el empleo del compuesto 7,8,12-tri-O-acetil-3-O-(4-metoxifenill) acetilingol (de aquí en adelante EOF2) o una sal farmacológicamente activa de dicho compuesto, para favorecer la diferenciación a neuronas de precursores neurales o células madre neurales en cultivo y en lesiones cerebrales. Adicionalmente, también se relaciona con el empleo del mismo compuesto para la elaboración de una composición farmacéutica útil en el tratamiento de lesiones del SNC que cursen con perdida neuronal.

ES 2 757 606 A1

DESCRIPCIÓN

Composición capaz de promover la formación de neuronas en cultivo y en lesiones cerebrales.

Sector de la técnica

Esta invención está relacionada con el empleo del compuesto 7, 8,12-tri-0-acetil-3-0-(4-metoxifenill) acetilingol (de aquí en adelante EOF2) o una sal farmacológicamente activa de dicho compuesto, para favorecer la diferenciación a neuronas de precursores neurales o células madre neurales en cultivo y en lesiones cerebrales. Adicionalmente, también se relaciona con el empleo del mismo compuesto para la elaboración de una composición farmacéutica útil en el tratamiento de lesiones del sistema nervioso central que cursen con perdida neuronal.

Antecedentes de la invención

Las lesiones cerebrales de diferentes causas y origen cursan con una pérdida irreversible de neuronas y actualmente carecen de tratamiento eficaz. Podemos destacar entre este tipo de lesiones las causadas por accidentes cerebrovasculares, enfermedades neurodegenerativas o traumas. Estas lesiones suponen alteraciones cognitivas, así como alteraciones en los sistemas motor y somatosensorial o alteraciones de la conducta y de la personalidad *(Blennow K., et al. 2012. The neuropathology and neurobiology of traumatic brain injury. Neuron 886-899; Xiong Y., et al. 2013. Animal models of traumatic brain injury. Nature reviews. Neuroscience 128- 142).* En la actualidad la búsqueda de opciones terapéuticas que permitan curar o al menos paliar las consecuencias de este tipo patologías es un campo de investigación de especial relevancia *(Grade S. and Gotz M. 2017. Neuronal replacement therapy: previous achievements and challenges ahead. NPJ Regen Med 29).* A pesar de que durante largo tiempo el tratamiento de este tipo de lesiones se ha centrado en terapias de rehabilitación mediante las cuales se facilita que otras regiones del sistema nervioso central (SNC) retomen las funciones de las regiones dañadas, recientemente y tras el descubrimiento de la neurogénesis en el cerebro adulto, se están concentrando bastantes esfuerzos en el desarrollo de terapias de tipo regenerativo que pretenden facilitar la reposición de las neuronas muertas a partir de células madre neurales (NSC). La mayoría de la información disponible hasta el momento sobre regeneración de lesiones se ha obtenido a partir de modelos animales. En roedores parece bien establecido que en condiciones fisiológicas, existe neurogénesis principalmente en dos zonas del cerebro adulto, el giro dentado del hipocampo (DG), que genera neuronas que se integran en los circuitos hipocampales, y la zona subventricular (SVZ) *(Doetsch F., et al. 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. J Neurosci 5046-5061. ; Gage F. H., et al. 1995. Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. Annu Rev Neurosci 159-192)* donde se producen neuroblastos que migran al bulbo olfatorio. En el cerebro humano, los precursores de la SVZ adulta migran también al estriado originando neuronas maduras en esta región *(Dayer A. G., et al. 2005. New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. The Journal of cell biology 415-427; Ernst A., et al. 2014. Neurogenesis in the striatum ofthe adult human brain. Cell 1072-1083; Luzzati F., et al. 2014. Quiescent neuronal progenitors are activated in the juvenile guinea pig lateral striatum and give rise to transient neurons. Development 4065-4075).*

Las lesiones cerebrales alteran la homeostasis de estos nichos neurogénicos, activan células madre neurales en el entorno de la lesión *(Llorens-Bobadilla E., et al. 2015. Single-Cell Transcriptomics Reveáis a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. Cell Stem Cell 329-340)* y modifican las rutas migratorias de su progenie (revisado en *(Grade S. and Gotz M. 2017. Neuronal replacement therapy: previous achievements and challenges ahead. NPJ Regen Med 29)*), de modo que tras un daño

aparecen en las inmediaciones de la lesión células con características de precursores neurales (NPC) multipotentes que pueden generar neuronas en respuesta a la lesión. Además de esta movilización de células desde nichos neurogénicos, ocurre también la activación de NSC localmente en la lesión en un intento de generar nuevas neuronas *(Ohira K., et al. 2010. Ischemia-induced neurogenesis of neocortical layer 1 progenitor cells. Nat Neurosci 173-179).* Desafortunadamente, la capacidad regenerativa del SNC en regiones lesionadas es muy limitada en ausencia de tratamiento *(Jin K., et al. 2001. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone añer focal cerebral ischemia in the rat. Proc Nati Acad Sci USA 4710-4715; Liu J., et al. 1998. Increased neurogenesis in the dentate gyrus añer transient global ischemia in gerbils. J Neurosci 7768-7778; Moraga A., et al. 2014. Toll- like receptor 4 modulates cell migration and cortical neurogenesis añer focal cerebral ischemia. FASEB J 4710-4718; Parent J. M., et al. 1997. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. J Neurosci 3727-3738; Romero-Grimaldi C., et al. 2011. ADAM-17/Tumor Necrosis Factor-alpha-Converting Enzyme Inhibits Neurogenesis and Promotes Gliogenesis from Neural Stem Cells. Stem Cells 1628- 1639; Saha B., et al. 2013. Cortical lesión stimulates adult subventricular zone neural progenitor cell proliferation and migration to the site of injury. Stem Cell Res 965-977).* Este fallido intento de reparación puede deberse a dos elementos principales: por un lado, el proceso inflamatorio inducido por el daño, que favorece la formación de una cicatriz glial, e impide la supervivencia de los neuroblastos que migran desde regiones neurogénicas y por otro el microambiente gliogénico/no-neurogénico que se genera alrededor de la lesión que impide que las células madre que se activan tras el daño produzcan neuroblastos que se diferencien a neuronas maduras. Por tanto, a la hora de regenerar lesiones cerebrales, mediante estrategias dirigidas a promover la neurogénesis endógena, existen dos desafíos: por un lado contrarrestar el ambiente no neurogénico de la lesión y por otro lado facilitar la migración de los neuroblastos desde regiones neurogénicas y su supervivencia y diferenciación a neuronas funcionales que se integran en circuitos pre-existentes *(Grade S. and Gotz M. 2017. Neuronal replacement therapy: previous achievements and challenges ahead. NPJ Regen Med 29).*

Cualquiera que sea su origen, la capacidad de regeneración es muy escasa, habiéndose descrito una reposición neuronal entre 0,2 y 10%, según el área afectada y el tipo de lesión *(Jin K., et al. 2001. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone añer focal cerebral ischemia in the rat. Proc Nati Acad Sci USA 4710-4715; Liu J., et al. 1998. Inere ased neurogenesis in the dentate gyrus añer transient global ischemia in gerbils. J Neurosci 7768-7778; Moraga A., et al. 2014. 7o//- like receptor 4 modulates cell migration and cortical neurogenesis añer focal cerebral ischemia. FASEB J 4710-4718; Parent J. M., et al. 1997. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. J Neurosci 3727-3738; Romero-Grimaldi C., et al. 2011. ADAM-17/Tumor Necrosis Factor-alpha-Converting Enzyme Inhibits Neurogenesis and Promotes Gliogenesis from Neural Stem Cells. Stem Cells 1628- 1639; Saha B., et al. 2013. Cortical lesión stimulates adult subventricular zone neural progenitor cell proliferation and migration to the site of injury. Stem Cell Res 965-977)*. El hecho de que haya una respuesta neurogénica a la lesión hace pensar que la formación de nuevas neuronas sea un mecanismo eficaz en la reparación de pequeñas lesiones, que permanecen silentes precisamente porque las neuronas que hacen apoptosis son reemplazadas, al menos en parte, por neuronas de nueva formación. Se ha demostrado que en los animales que han sufrido un traumatismo craneal, se incrementa la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo y posteriormente estos animales recuperan su capacidad de realizar tareas de memoria espacial. Sin embargo, si se eliminan selectivamente las células madre que comienzan a dividirse en el hipocampo como consecuencia del daño inducido por el traumatismo, estos animales no pueden recuperar la capacidad para realizar tareas de memoria espacial *(Blaiss C. A., et al. 2011. Temporally specified genetic ablation of neurogenesis impairs cognitive recovery after traumatic brain*

injury. J Neurosci 4906-4916) demostrando así que la reposición neuronal en estas regiones tiene un efecto sobre la recuperación de la memoria tras un traumatismo craneal.

Adicionalmente, la aparición de neurogénesis en lesiones cerebrales, se ha demostrado también en humanos, concretamente se ha podido observar que en muestras de cerebro de pacientes sometidos a cirugía tras una lesión por traumatismo craneal, aparecen en la zona de la corteza cerebral alrededor de la lesión, células madre neurales proliferantes y neuroblastos *(Zheng W., et al. 2013. Neurogenesis in adult human brain añer traumatic brain injury. J Neurotrauma 1872-1880)*

Sin embargo, las lesiones graves o las experimentales con mayor pérdida neuronal no pueden ser resueltas, a menos que se establezcan medidas terapéuticas eficaces para incrementar de forma significativa el proceso neurogénico. Una de las alternativas que podría contribuir a resolver, los problemas clínicos que plantean las enfermedades que cursan con pérdida neuronal es el trasplante de células madre que puedan posteriormente generar nuevas neuronas. Varios laboratorios han intentado esta estrategia en modelos animales a los que se han trasplantado células madre de origen embrionario (*Cao et al. Pluripotent stem cells engrafted into the normal orlesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage. Exp Neurol. 167:48-58, 2001)*, células madre neurales de animales adultos *(Pluchino, S. et al. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of múltiple sclerosis. Nature 422: 688-694, 2003)*, o bien células procedentes de células madre sometidas a diferentes grados de diferenciación in vitro. El fenómeno más generalmente observado es que, las células madre que se implantan en las zonas neurogénicas del cerebro (por ejemplo, la zona subventricular o el bulbo olfativo en roedores) se diferencian a neuroblastos y se convierten en neuronas maduras pero no ocurre este mismo fenómeno en las zonas no neurogénicas del cerebro. *(Herrera, D.G. et al. Adult-derived neural precursors transplanted into múltiple regions in the adult brain. Ann Neurol. 46:867-77, 1999;(Mligiliche N. L., etol. 2005. Survivol of neural progenitor cells f rom the subventricular zone of the adult rat after transplantation i rito the host spinal coró of the same strain of adult rat. AnatSci Int 229-234).*

Por lo tanto uno de los problemas con el que se enfrenta la presente invención, es que, si bien las células madre que se implantan en las zonas neurogénicas del cerebro (por ejemplo, la zona subventricular o el bulbo olfativo en roedores) se diferencian a neuroblastos y se convierten en neuronas maduras, cuando el trasplante se produce en otras zonas, inician la ruta de diferenciación glial. En las lesiones que ocurren en zonas no neurogénicas aparecen precursores neurales proliferantes que posteriormente podrían diferenciarse y la fuente endógena de precursores neurales en estas regiones es la glía parenquimal. Estas células de glía se activan tras una lesión y dan lugar a precursores neurales, la mayoría de los cuales se diferencian a células de glía y muy pocas a neuronas.

Teniendo en cuenta el estado del arte, es necesario encontrar moléculas con actividad farmacológica que promuevan la neurogénesis en lesiones cerebrales.

Descripción de la invención

Breve descripción de las figuras

Figura 1: EOF2 favorece la diferenciación a neuronas y disminuye la diferenciación a células de glía de los NPC *in vitro*, mientras que EOF3 no ejerce este efecto.

Las células disgregadas derivadas de neuroesferas se sembraron en condiciones de diferenciación, en ausencia (Control), presencia del compuesto EOF2 (5 µM) o presencia del compuesto EOF3 (5 µM) durante 72 h.

A. Imágenes de microscopía de fluorescencia representativas de cultivos de precursores neurales procesadas para la detección inmunohistoquímica del marcador de células gliales GFAP y el marcador de neuronas β-lll-tubulina. Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI.

B. Efecto de EOF2 y EOF3 sobre el porcentaje de células $GFAP^+$ con respecto al control.

C. Efecto de EOF2 y EOF3 sobre el porcentaje de células β-lll-$tubulina^+$ con respecto al control.

D. Efecto de los compuestos EOF2 y EOF3 sobre la apoptosis referido al control. Cada barra representa la media ± error estándar de al menos tres experimentos independientes. Estadística: *p<0,05 comparado con el control mediante el test de la *t* de Student.

Figura 2. EOF2 sobre promueve la proliferación celular y la generación de neuroblastos en corteza cerebral lesionada.

Se realizaron lesiones mecánicas en corteza cerebral primaria de ratones adultos, y se los dividió en dos grupos experimentales: a través de minibombas osmóticas de liberación controlada, unos fueron tratados localmente en la lesión con el compuesto EOF2 (5 µM) y otros recibieron únicamente vehículo (suero salino). El tratamiento se prolongó durante 14 días posteriores a la lesión, y los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales de BrdU (100 mg/ml) los días 12, 13 y 14 postlesión. Los animales fueron perfundidos y sus cerebros procesados para la detección inmunohistoquímica. A. Imágenes de microscopía de fluorescencia de secciones coronales de corteza cerebral lesionada, procesadas para la detección inmunohistoquímica del marcador de proliferación BrdU y el marcador de neuroblastos doblecortina (DCX). La barra de calibración representa 50 µm y la línea punteada representa el límite de la lesión. B-C. Los gráficos representan el número de células positivas para BrdU (B) y el número de neuroblastos positivos para el marcador DCX (C) por mm^3 de tejido lesionado. Cada barra representa la media ± error estándar de al menos 4 animales por condición. Estadística: *p<0.05 comparado con el vehículo mediante el test de la *t* de Student.

Figura 3. EOF2 disminuye la generación de células gliales tras una lesión mecánica cortical.
Se realizaron lesiones mecánicas en corteza cerebral de ratones adultos. Los grupos experimentales se corresponden a los mismos explicados en la figura 2. El tratamiento se prolongó durante 14 días posteriores a la lesión, y los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales de BrdU (100 mg/ml) los días 12, 13 y 14 postlesión. Los animales fueron perfundidos y sus cerebros procesados para inmunohistoquímica.

A. Imágenes de microscopía de fluorescencia de secciones coronales de corteza cerebral lesionada, procesadas para la detección inmunohistoquímica del marcador de proliferación BrdU y el marcador de células gliales GFAP. La barra de calibración representa 50 µm y la línea punteada representa el límite de la lesión.

B. El gráfico muestra el porcentaje de células $BrdU^+$ que coexpresan el marcador GFAP

C. Porcentaje del área lesionada que muestra expresión del marcador GFAP. Cada barra representa la media ± error estándar de al menos 4 animales por condición. Estadística: *p<0.05 comparado con el vehículo mediante el test de la *t* de Student.

Figura 4. EOF2 no tiene efecto sobre células indiferenciadas en una lesión mecánica cortical.

Se realizaron lesiones mecánicas en corteza cerebral de ratones adultos Los grupos experimentales se corresponden con los explicados en la figura 2 El tratamiento se prolongó durante 14 días posteriores a la lesión, y los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales de BrdU los días 12, 13 y 14 postlesión Los animales fueron perfundidos y sus cerebros procesados para inmunohistoquímica.

A. Imágenes de microscopía de fluorescencia de secciones coronales de corteza cerebral lesionada, procesadas para la detección inmunohistoquímica del marcador de proliferación BrdU y el marcador de precursores indiferenciados nestina. La barra de calibración representa 50 µm y la línea punteada representa el límite de la lesión.

B. El gráfico representa el número de células nestina* por mm^3

C. Porcentaje de células $BrdU^+$ que expresan el marcador de precursores indiferenciados nestina. Cada barra representa la media ± error estándar de al menos 4 animales por condición. Estadística: *p<0.05 comparado con el vehículo mediante el test de la *t* de Student.

Figura 5. Efecto de administración intranasal de EOF2 sobre la migración de los neuroblastos desde la SVZ hasta la lesión.

A. Procedimiento experimental para marcar exclusivamente las células proliferantes con BrdU en nichos neurogénicos y no en la lesión.

B. imágenes de microscopía de confocal del área peri-lesión de ratones a los que se ha administrado EOF2 o vehículo. Los tejidos han sido procesados mediante inmunohistoquímica para detectar el marcador de proliferación BrdU y el marcador de neuroblastos DCX. Barra de calibración 50 µm. Las líneas punteadas delimitan la lesión.

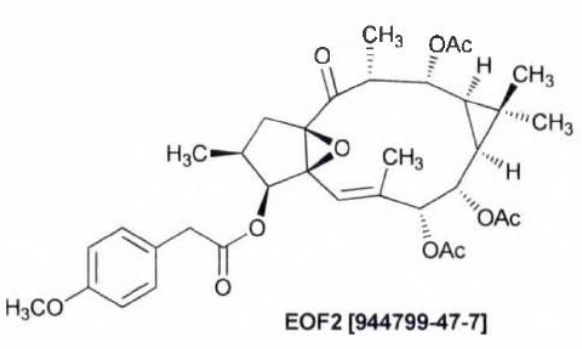
C. La gráfica muestra el número de células $BrdU^+/mm^3$ en el perímetro de la lesión.

D. La gráfica muestra el número de células DCX^+/mm^3 en el perímetro de la lesión No pudo encontrarse ninguna célula DCX^+ en los animales tratados con vehículo.

E. La gráfica muestra el número de células doblemente marcadas $BrdU^+/DCX^+$. No se pudieron encontrar células doblemente marcadas en el perímetro de la lesión de animales tratados con vehículo.

Descripción detallada de la invención

La presente invención resuelve el problema de generación de nichos neurogénicos tanto en zonas neurogénicas como no neurogénicas del SNC, basándose en el empleo del compuesto 7, 8,12-tri-0-acetil-3-0-(4-metoxi fenil)acetil ingol (de aquí en adelante EOF2)



Fórmula I

Este compuesto favorece la diferenciación a neuronas de las células madre neurales y, perfundido dentro del cerebro lesionado (por ejemplo, a través de una administración intranasal), favorece la diferenciación a neuronas de las NSC activadas en la región perilesión en respuesta al daño y puede facilitar la reparación del tejido dañado.

Este nuevo fármaco permite superar el ambiente no-neurogénico que se genera en regiones lesionadas del cerebro adulto y favorecer la generación de nuevas neuronas en estas regiones a partir de precursores neurales, bien endógenos o bien trasplantados. Por lo tanto, a la hora de regenerar lesiones, en la región no-neurogénica de la zona lesionada, EOF2 incrementa la probabilidad de que las células madre endógenas como las trasplantadas puedan dar lugar a neuronas maduras y funcionales.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención, comprende el uso del compuesto EOF2 con número CAS 944799-47-7 y cuya estructura química se mostraba anteriormente, o sales farmacológicamente activas del mismo o una mezcla enantiomérica que incluya el compuesto de la fórmula I o sus sales, y donde el compuesto de la fórmula I se encuentre en un porcentaje mayor o igual a un 50% del total, para la elaboración de un medicamento (de aquí en adelante composición farmacéutica de la presente invención), donde preferiblemente dicho medicamento o composición farmacéutica se utiliza para el tratamiento de enfermedades o lesiones que cursen con perdida neuronal. Alternativamente, en la presente invención se reivindica el compuesto EOF2 o sales farmacológicamente activas del mismo o una mezcla enantiomérica que incluya el compuesto de la fórmula I o sus sales, y donde el compuesto de la fórmula I se encuentre en un porcentaje mayor o igual a un 50% del total, para su uso en terapia, preferiblemente en el tratamiento de enfermedades o lesiones que cursen con pérdida neuronal.

En un aspecto aún más concreto de la presente invención, la composición farmacéutica de la presente invención comprende al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En el contexto de la presente invención, se entiende por precursores neurales o células madre neurales a aquellas células madre neurales aisladas de tejido adulto o fetal, que presentan capacidad de auto-replicarse, pero una capacidad de diferenciación limitada, pues sólo pueden diferenciarse hacia los tres subtipos de células del linaje neural: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

En un aspecto particular de la presente invención, las enfermedades o lesiones que cursan con pérdida neuronal son las seleccionadas de la lista que consiste en:

- Enfermedades neurodegenerativas: Se producen como consecuencia de la muerte neuronal. Las más frecuentes son las demencias, entre las que destacan la enfermedad de Alzheimer, con pérdida neuronal en el hipocampo y corteza cerebral fundamentalmente, y la demencia vascular, con pérdida neuronal asociada a

enfermedad de pequeño vaso y; la enfermedad de Parkinson, con muerte selectiva de neuronas en la sustancia negra; la esclerosis lateral amiotrófica -con déficit de neuronas en la médula espinal; la demencia vascular.

- Traumatismo craneoencefálico: es una lesión de origen traumático que incide sobre el cráneo, con afectación cerebral. El daño puede ser focal—limitado a una sola área del cerebro—o involucrar a más de un área del cerebro. En el contexto de esta invención el traumatismo craneoencefálico puede producir daño cerebral por muerte neuronal que podría ser tratado mediante terapias dirigidas a favorecer la regeneración neuronal.

- Lesión hipóxico-isquémica: Reducción del flujo sanguíneo cerebral hasta niveles que son insuficientes para mantener el metabolismo necesario para la normal función y estructura del cerebro. En los adultos, la isquemia es causada fundamentalmente por accidentes cerebrovasculares, que pueden ser focales (de origen isquémico, hemorrágico o mixto), o múltiples (como en la demencia multiinfarto). En el recién nacido, dicha hipoxia/isquemia se debe fundamentalmente a sufrimiento fetal o perinatal. En el contexto de la presente invención la hipoxia-isquemia es una condición que produce sufrimiento celular debido a la falta de aporte de oxígeno al tejido cerebral que en la mayoría de los casos produce muerte neuronal.

- Infecciones del SNC: Afectación cerebral por distintos agentes infecciosos que originan meningitis, encefalitis o meningoencefalitis. En el contexto de esta invención, las infecciones del SNC originan sufrimiento celular bien directamente o indirectamente por el edema cerebral que originan, pudiendo causar muerte neuronal.

- Epilepsia: Enfermedad crónica caracterizada por uno o varios trastornos neurológicos que deja una predisposición para generar convulsiones recurrentes, que suele dar lugar a consecuencias neurobiológicas, cognitivas y psicológicas.

- Enfermedad de Huntington: La enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno neurodegenerativo del SNC caracterizado por movimientos coreicos involuntarios, trastornos conductuales y psiquiátricos, y demencia. Está causada por una expansión de repeticiones del triplete CAG en el brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3) en el gen huntingtina, *HTT*. Cuanto mayores la expansión de repeticiones CAG, antes aparece la enfermedad.

En un aspecto aún más particular de la presente invención, las enfermedades o lesiones que cursan con pérdida neuronal son isquemia cerebral focalizada, traumatismo craneoencefálico con daño neuronal, Parkinson, epilepsia y esclerosis lateral amiotrófica. Más particularmente, la composición farmacéutica de la presente invención se administra de forma no invasiva tratando de evitar la barrera hematoencefálica, como por ejemplo la administración por vía intranasal.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un método (de aquí en adelante método de la presente invención) para obtener neuronas a partir células madre o precursores neurales hacia neuronas in vitro que comprende:

a. poner en contacto células madre neurales o precursores neurales con un rango de concentración desde 1 pmol/ a 40 µM de EOF2, en un medio que no impida la diferenciación de las células *madre* neurales o precursores neurales; y preferiblemente entre 1-10 µM. más preferiblemente entre 3.5 y 6.5 µM; y opcionalmente

b. cosechar posteriormente las neuronas obtenidas.

Para utilizar el EOF2 en un cultivo *in vitro* es preferible disolverlo previo a su utilización en una solución que pueda disolver tanto el compuesto como su sal farmacéuticamente aceptada. Ejemplos del disolvente pueden ser dimetilsufóxido, agua o similares. Adicionalmente este compuesto puede estar disuelto en tampón fosfato salino (PBS).

En un aspecto particular de la invención, para cultivar las células madre neurales con EOF2 se añade EOF2 en un rango de concentración desde 1 pM a 40 µM. Las células madre se cultivan adheridas a un sustrato a una densidad de 20 a 200 x 10^6 células/L. El compuesto se añade a un cultivo estático a 37°C durante 1 a 14 días en una atmósfera de 5% C02, cambiando el medio de forma total o parcial cada dos días.

El medio en el que se cultivan las células puede ser cualquier medio que no impida la diferenciación de las células madre neurales, como ejemplo se puede utilizar preferentemente un medio Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM)/F-12 (1:1), que contenga 2% del suplemento B27 (Invitrogen), 2mM L-glutamina y 2µg/ml de gentamicina.

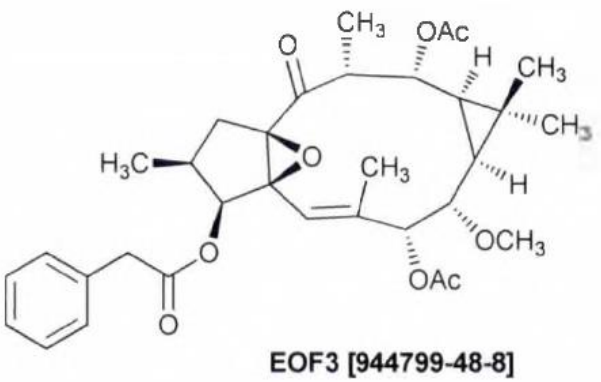
Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un medio de cultivo (de aquí en adelante medio de cultivo de la presente invención), adecuado para la diferenciación a neuronas de células madre o de precursores neurales, que comprenda EOF2 en un rango de concentración de 1 pM a 40 µM preferiblemente entre 1-10 µM, más preferiblemente entre 3.5 y 6.5 µM

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere al uso del medio de cultivo de la presente invención para la diferenciación a neuronas de células madre o de precursores neurales

Un sexto aspecto de la invención se refiere a una población de neuronas obtenibles por el método de la presente invención.

Un séptimo aspecto de la presente invención se refiere al uso de la población de células madre neurales o precursores neurales obtenibles por el método de la presente invención para la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento de enfermedades o lesiones que cursen con perdida neuronal.

Por último, los inventores de la presente invención han constatado cómo compuestos estructuralmente similares a EOF2 como el compuesto EOF3 (Figura 2) no presentan actividad favorecedora de la diferenciación de precursores neurales En este sentido, en la Fig. 2 se muestra como el compuesto 7,12-di-0-acetil-8-0-methil-3-0-fenilacetilingol (EOF3) con número CAS 944799-48-8 y la estructura química que se muestra a continuación no es capaz de favorecer de la diferenciación a neuronas de los precursores neurales.



EOF3 [944799-48-8]

Fórmula 2

Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos de la presente invención y en ningún lugar han de entenderse como limitativos de la misma.

Ejemplos

EJEMPLO 1 Efecto de los compuestos naturales EOF2 y EOF3 sobre la diferenciación de neuroesferas *in vitro*

Con el fin de comprobar si EOF2 y EOF3 favorecían la diferenciación de las neuroesferas, se disgregaron las células de las neuroesferas y se cultivaron adheridas a un sustrato de PLO en ausencia de factores de crecimiento para favorecer su diferenciación. Estas células se cultivaron en presencia y ausencia de EOF2 o EOF3 durante 72 h.

Para analizar la diferenciación de los precursores neurales aislados de la SVZ *in vitro*, se sembraron las células en portas de vidrio, cada uno con una superficie de 0.8 cm^2. Los pocilios se trataron previamente con poli-L-ornitina (PLO) (25 µg/ml) en tampón borato 0.1 M pH 8.4. Se añadió 300 µl de PLO a cada pocilio y se incubó durante toda la noche a 37° C; al día siguiente se lavó con agua estéril y se dejó secar al menos dos horas en condiciones estériles. Una vez seca la placa, se disgregaron las neuroesferas y se sembraron en medio definido en ausencia de factores de crecimiento a una densidad de 40.000 células por pocilio en 300 µl finales. Los compuestos EOF2 y EOF3 se añadieron a una concentración de 5 µM. La ausencia de factores de crecimiento favorece la salida del ciclo celular y la diferenciación de los precursores neurales a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, permitiendo el estudio *in vitro* de este proceso.

Posteriormente, se analizaron mediante inmunocitoquímica los fenotipos celulares presentes en el cultivo. En estas condiciones las células procedentes de cultivos de neuroesferas se diferencian a los diferentes fenotipos neurales (gliales o neuronales). Se cuantificó el porcentaje de neuroblastos y neuronas (células βIII-tubulina$^+$) y de astrocitos o progenitores gliales (células GFAP$^+$). Se observó que en presencia de EOF2 el porcentaje de células βIII-tubulina$^+$ era aproximadamente el doble que en los cultivos control (Figura 2 A, C). También se observó una pequeña tendencia a la disminución en el porcentaje de células GFAP$^+$ que sin embargo no fue estadísticamente significativa. Se aprecia también que el compuesto EOF2 disminuye significativamente la muerte celular con respecto al control y EOF3 no tiene ningún efecto sobre esta misma comparado con el control (Figura 2). Estos resultados indican que EOF2 es capaz de inducir la diferenciación de las neuroesferas a neuroblastos a expensas de la diferenciación a glioblastos y sugieren que su utilización en lesiones cerebrales podría revertir el ambiente gliogénico/no-neurogénico de estas lesiones y transformarlo en un ambiente neurogénico donde se podrían generar nuevas neuronas. Por este motivo el compuesto EOF2 se postulaba como candidato para el tratamiento de lesiones cerebrales, como compuesto capaz de modificar el nicho gliogénico de la lesión convirtiéndolo en un nicho neurogénico. Así, decidimos analizar si realmente este compuesto infundido *in vivo* en lesiones cerebrales era capaz de promover la neurogénesis en la lesión. El compuesto EOF3 no tuvo efectos sobre la diferenciación de neuroesferas a neuronas o células gliales.

EJEMPLO 2. El compuesto EOF2 no tiene efecto sobre la proliferación pero favorece la generación de neuroblastos en corteza cerebral lesionada

Para determinar el efecto de EOF2 en lesiones cerebrales, se realizaron lesiones mecánicas controladas en la corteza motora primaria de ratón adulto, restringidas a la sustancia gris. Trabajos previos han demostrado que en este tipo de lesiones se activan células madre neurales pero no son capaces de generar neuroblastos o neuronas debido al ambiente gliogénico que se crea en la lesión *(Romero-Grimaldi C., et al. 2011. ADAM-17/tumor necrosis*

factor-alpha-converting enzyme inhibits neurogenesis and promotes gliogenesis from neural stem cells. Stem Cells 1628-1639).

Los ratones adultos fueron anestesiados con una combinación de ketamina (100 mg/kg; Imalgene® 500, Merial) y xilazina (10 mg/kg; Rompún® 2%, Bayer). Los animales se colocaron en un aparato estereotáxico y se les realizó una incisión antero-posterior en la piel, en la línea media, dejando el cráneo a la vista. Una vez retirado el periostio se procedió a ubicar Bregma como punto de referencia. Se practicó una craneotomía +1.4 mm rostral y 1.5 mm lateral derecha a Bregma. La corteza motora primaria derecha se lesionó introduciendo una broca de 0.7 mm de diámetro hasta una profundidad de 1 mm.

Los animales lesionados se dividieron en dos grupos de 5 animales cada uno. Inmediatamente después de realizar las lesiones, se implantaron localmente sobre las mismas unas cánulas de infusión conectadas a mini bombas osmóticas, capaces de liberar su contenido de manera local y sostenida durante 14 días. La mitad de los animales lesionados se conectaron a mini bombas que liberaban vehículo (suero salino), y la otra mitad se conectó a mini bombas que liberaban el compuesto EOF2 en una concentración de 5pm hasta el momento del sacrificio. Catorce días después de la lesión, los ratones se sacrificaron y sus cerebros fueron extraídos para su posterior análisis. Todos los ratones recibieron inyecciones de BrdU (120 mg / kg) los días 12, 13 y 14 post lesión, y fueron sacrificados 2 horas después de la última inyección.

La bromodesoxiuridina o BrdU (Sigma-Aldrich) es un nucleótido sintético análogo a la desoxitimidina, que se incorpora al ADN de las células mientras se produce la replicación de su material genético (fase S del ciclo celular) para dividirse, de manera que las células que proliferan durante la administración exógena de este compuesto quedan marcadas.

Los cerebros se extrajeron y se realizaron secciones seriadas. En las secciones que contenían la zona lesionada se analizó mediante inmunohistoquímica el número de células proliferantes, el número de neuroblastos y de astrocitos y glioblastos.

La inmunodetección de BrdU en el tejido lesionado mostró la existencia de núcleos $BrdU^+$ en el perímetro de la lesión, indicando así la presencia de células que se están dividiendo activamente durante las 9 horas previas al sacrificio del animal. Al analizar el efecto del tratamiento con EOF2 sobre el tejido cortical lesionado, pudimos observar que, en los animales tratados con EOF2 durante los 14 días posteriores a la lesión, el número de células proliferantes $BrdU^+$ no era diferente al de los animales control, corroborando que tal como se había observado *in vitro*, EOF2 tampoco promovía la proliferación de las NSC o NPC *in vivo* (Figura 2 A-B). Como marcador de la presencia de neuroblastos o precursores neuronales se detectó la proteína DCX mediante inmunohistoquímica tanto en animales control como en los tratados con EOF2. En los animales control solamente aparecían células DCX^+ esporádicamente en algunos animales y en muy escaso número, no así en todos. Sin embargo, en las lesiones tratadas con EOF2 podían observarse una cantidad abundante y cuantificable de neuroblastos DCX^+ en todas las lesiones de todos los animales analizados. Es decir, el tratamiento con EOF2 incrementaba drásticamente, y de manera significativa con respecto al control (Figura 2 A, C), el número de neuroblastos en el área periférica a la lesión.

EJEMPLO 3. El compuesto EOF2 disminuye las células gliales en el entorno de una lesión mecánica cortical.

Utilizando la metodología del ejemplo 2 se analizaron las células de glía en el entorno de la lesión. Para cuantificar el número de astrocitos y glioblastos en las lesiones control y tratadas con EOF2 se cuantificó el número de células GFAP+. Nuestros resultados mostraban que, en las lesiones de ratones tratados con EOF2, el área ocupada por células $GFAP^+$ disminuía de forma estadísticamente significativa con respecto a las lesiones de los animales control (Figura

3 A, C). El análisis del porcentaje de células proliferantes ($BrdU^+$), que co-localizaban con el marcador GFAP, mostraba además, que en los ratones que recibieron el tratamiento con EOF2, el porcentaje de células gliales proliferantes era menor que en los ratones control, tal y como puede observarse en la figura 3 (Figura 3 A, B).

EJEMPLO 4. Efecto del compuesto EOF2 sobre la generación de precursores indiferenciados tras una lesión mecánica cortical

Utilizando la metodología explicada en el ejemplo 2, se estudió también el número de precursores indiferenciados en la lesión (células $nestina^+$) en el perímetro de la lesión en ambos grupos de animales (Figura 4).

Los resultados indicaron que en el perímetro de la lesión existen neuroesferas indiferenciados en ambos grupos de animales que constituyen alrededor de un 45% de todas las células que incorporan BrdU (Figura 4). Sin embargo, aunque no existen diferencias significativas en este parámetro entre ambos grupos, las tendencias muestran que en presencia de EOF2 hay un menor número de precursores indiferenciados. Por tanto, el incremento en neuroblastos observado tras el tratamiento con EOF2 no se debería a un incremento en el número de precursores indiferenciados, sino a una mayor tasa de diferenciación neuronal a expensas de una menor diferenciación glial.

EJEMPLO 5: El tratamiento con EOF2 por vía intranasal permite la migración de precursores neuronales desde la SVZ hacia la lesión.

Para determinar el efecto de EOF2 en lesiones cerebrales, se realizaron lesiones mecánicas controladas en la corteza motora primaria de ratón adulto, restringidas a la sustancia gris. Trabajos previos han demostrado que en este tipo de lesiones se activan células madre neurales pero no son capaces de generar neuroblastos o neuronas debido al ambiente gliogénico que se crea en la lesión *(Romero-Grimaldi C., et al. 2011. ADAM-17/tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme inhibits neurogenesis and promotes gliogenesis from neural stem cells. Stem Cells 1628-1639).*

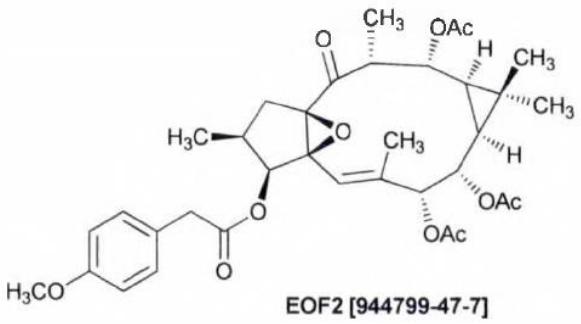
Seis días antes de realizar la lesión se inyectó a los ratones con BrdU para marcar las células proliferantes de la SVZ y del DG. Se esperó tres días a que el organismo del animal eliminase todo el BrdU y se realizaron lesiones como está explicado en el ejemplo 2. Posteriormente se dividieron los ratones en dos grupos de 5, un grupo (EOF2) recibió EOF2 por vía intranasal durante 14 días mientras que otro grupo recibió únicamente el vehículo, suero salino. La administración intranasal de fármacos está siendo muy utilizada en la actualidad para administrar fármacos al sistema nervioso. En recientes publicaciones se ha puesto de manifiesto que la administración intranasal de sustancias biológicas permite atravesar la barrera hematoencefálica y la distribución de estas sustancias hasta diferentes regiones del cerebro incluidas DG y SVZ, como es el caso por ejemplo del IGF o de la insulina. La administración intranasal se realizó manualmente en animales sin anestesia mientras el animal está sujeto en posición supina con el cuello en extensión tal como está descrito previamente *(Francis G. J., et al. 2008. Intranasal insulin prevenís cognitive decline, cerebral atrophy and white matter changes in murine type I diabetic encephalopathy. Brain 3311-3334).* Se administraron 18 µL de una solución 5 µM de EOF2 y o de vehículo sobre los dos orificios nasales alternativamente añadiendo 3µL cada vez con una micropipeta Gilson p10. El ratón se mantuvo en esa posición durante 10 s adicionales para asegurar que hubo inhalado todo el fluido.

Finalmente, tras los 14 días de tratamiento, como está explicado en la figura 5, los animales se sacrificaron y en ellos se analizaron las células BrdU+ y DCX+ según está explicado en el ejemplo 2.

Los resultados muestran cómo sólo en los ratones tratados con EOF2 aparecen neuronas en el perímetro de la lesión que no pueden verse en los animales control (Figura 5).

REIVINDICACIONES

1. Uso *in vitro* del compuesto de formula I (EOF2):



EOF2 [944799-47-7]

Formula I

una sal farmacológicamente activa del mismo, o una mezcla enantiomérica que incluya el compuesto de la fórmula I o sus sales, y donde el compuesto de la fórmula I se encuentre en un porcentaje mayor o igual a un 50% del total, para promover la diferenciación neuronal de precursores neurales o células madre neurales, a neuronas en cultivo.

2. Método para la diferenciación neuronal de precursores neurales o células madre neurales a neuronas en cultivo que comprende:

   a. Disolver el compuesto de formula I o una sal farmacológicamente activa del mismo en una solución que pueda disolver tanto el compuesto como su sal farmacéuticamente aceptada o una mezcla enantiomérica que incluya el compuesto de la fórmula I o sus sales, y donde el compuesto de la fórmula I se encuentre en un porcentaje mayor o igual a un 50% del total; y

   b. Poner en contacto células madre neurales o precursores neurales con la disolución descrita en (a), en un medio adecuado para la diferenciación a neuronas de las células madre neurales o precursores neurales; y donde el compuesto de formula I o una sal farmacológicamente activa del mismo compuesto o una mezcla enantiomérica que incluya el compuesto de la fórmula I o sus sales, donde el compuesto de la fórmula I se encuentre en un porcentaje mayor o igual a un 50% del total, se halle en el medio en un rango de concentración de 1 pM a 40 µM. preferiblemente entre 1-10 µM. más preferiblemente entre 3.5 y 6.5 µM.

3. Medio de cultivo adecuado para la diferenciación neuronal de precursores neurales o células madre neurales a neuronas en cultivo, que comprenda el compuesto de formula I o una sal farmacológicamente activa del mismo, o una mezcla enantiomérica que incluya el compuesto de la fórmula I o sus sales, y donde el compuesto de la fórmula I se encuentre en un porcentaje mayor o igual a un 50% del total.

4. Medio de cultivo según la reivindicación 3, donde el compuesto de formula I o la sal farmacológicamente activa del mismo, se hallen en el medio en un rango de concentración de 1 pM a 40 µM, preferiblemente entre 1-10 µM, más preferiblemente entre 3.5 y 6.5 µM.

5. Uso del medio de cultivo según cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, para promover la diferenciación neuronal de precursores neurales o células madre neurales a neuronas en cultivo.

6. Composición farmacéutica que comprende el compuesto de formula I o una sal farmacológicamente activa del mismo, o una mezcla enantiomérica que incluya el compuesto de la fórmula I o sus sales, donde el compuesto de la fórmula I se encuentre en un porcentaje mayor o igual a un 50% del total.

7. Compuesto de formula I o una sal farmacológicamente activa del mismo o una mezcla enantiomérica que incluya el compuesto de la fórmula I o sus sales, donde el compuesto de la fórmula I se encuentre en un porcentaje mayor o igual a un 50% del total., para su uso en terapia.

8. Composición que comprende el compuesto de formula I o una sal farmacológicamente activa del mismo o una mezcla enantiomérica que incluya el compuesto de la fórmula I o sus sales, donde el compuesto de la fórmula I se encuentre en un porcentaje mayor o igual a un 50% del total, para su uso en el tratamiento de enfermedades o lesiones que cursen con pérdida neuronal seleccionadas del grupo que consiste en: isquemia cerebral focalizada, traumatismo craneoencefálico con daño neuronal, Parkinson, epilepsia y esclerosis lateral amiotrófica.

9. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, donde dicha composición es adecuada para su administración intranasal.

10. Composición para su uso según la reivindicación 7 o 8, donde dicha composición se administra vía intranasal.

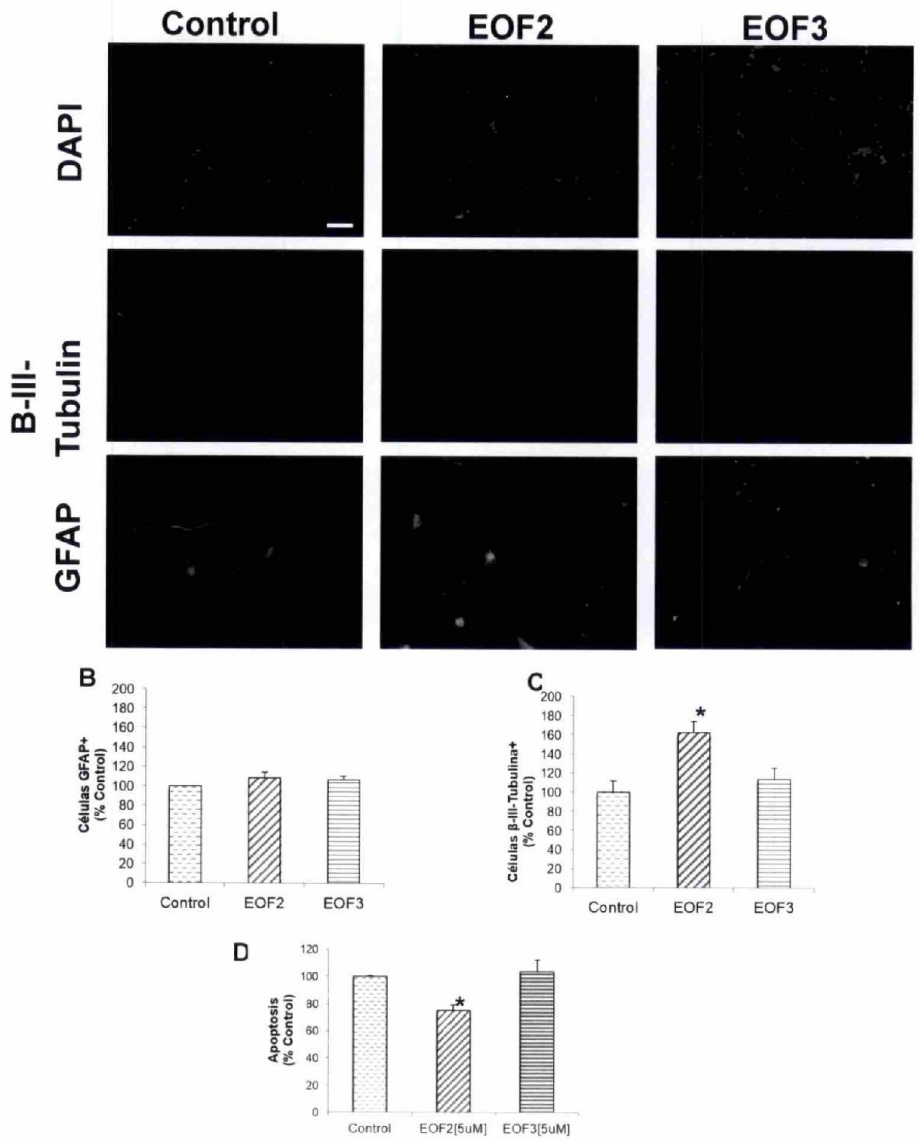

Control
EOF2
EOF3
DAPI
B-III-Tubulin
GFAP
B
Células GFAP+ (% Control)
Control
EOF2
EOF3
C
Células β-III-Tubulina+ (% Control)
Control
EOF2
EOF3
D
Apoptosis (% Control)
Control
EOF2[5uM]
EOF3[5uM]

FIGURA 1

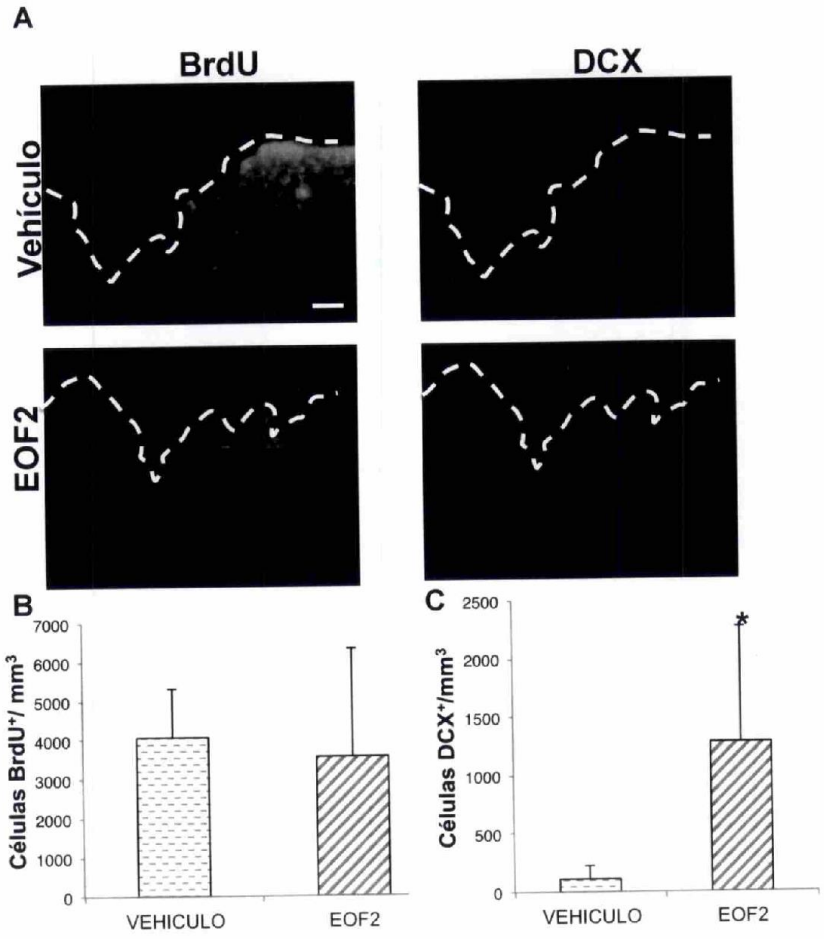

A
BrdU
DCX
Vehículo
EOF2
B
Células BrdU+/ mm3
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
VEHICULO
EOF2
C
Células DCX+/mm3
2500
2000
1500
1000
500
0
*
VEHICULO
EOF2

FIGURA 2

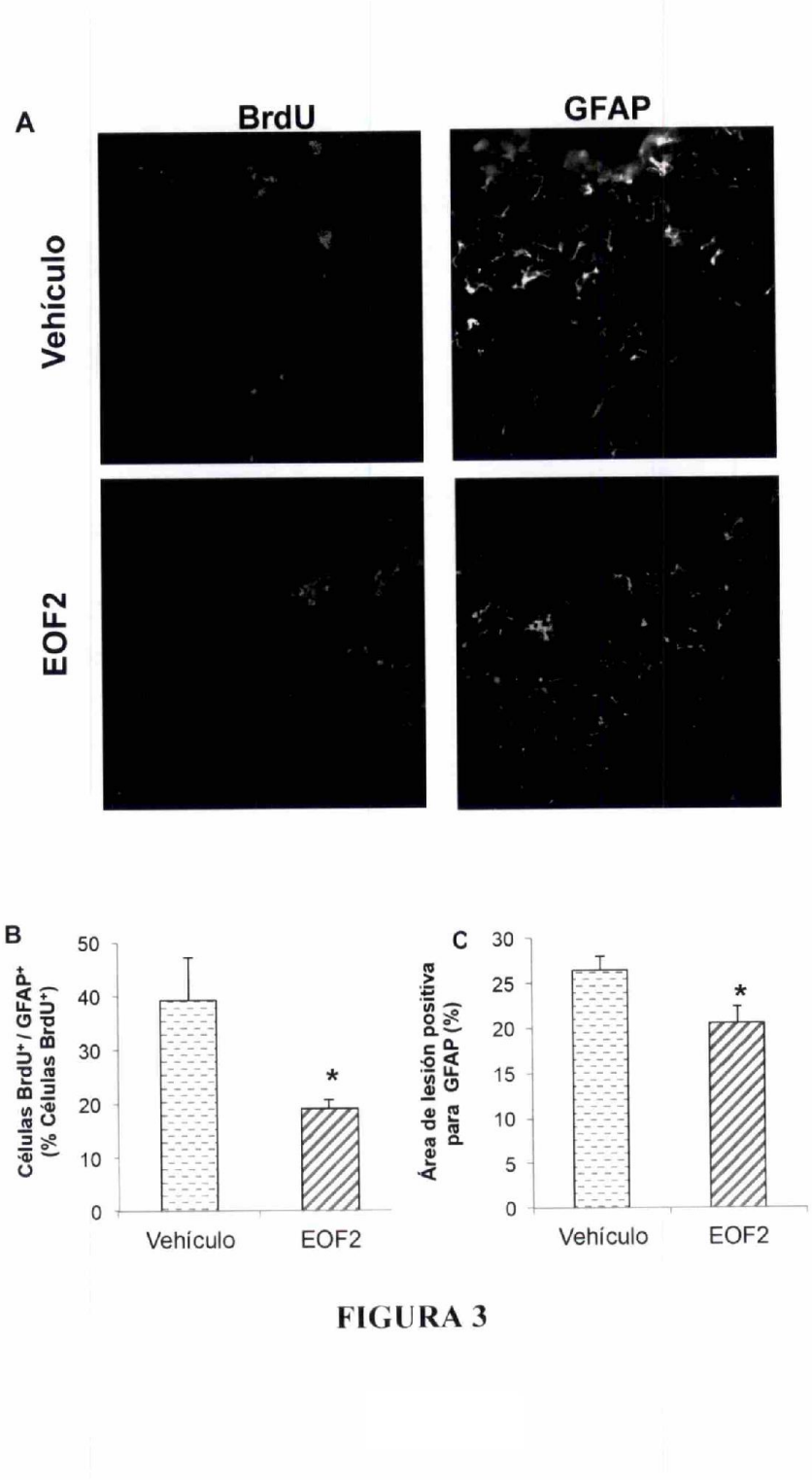

A
BrdU
GFAP
Vehículo
EOF2
B
Células BrdU+ / GFAP+ (% Células BrdU+)
50
40
30
20
10
0
*
Vehículo
EOF2
C
Área de lesión positiva para GFAP (%)
30
25
20
15
10
5
0
*
Vehículo
EOF2

FIGURA 3

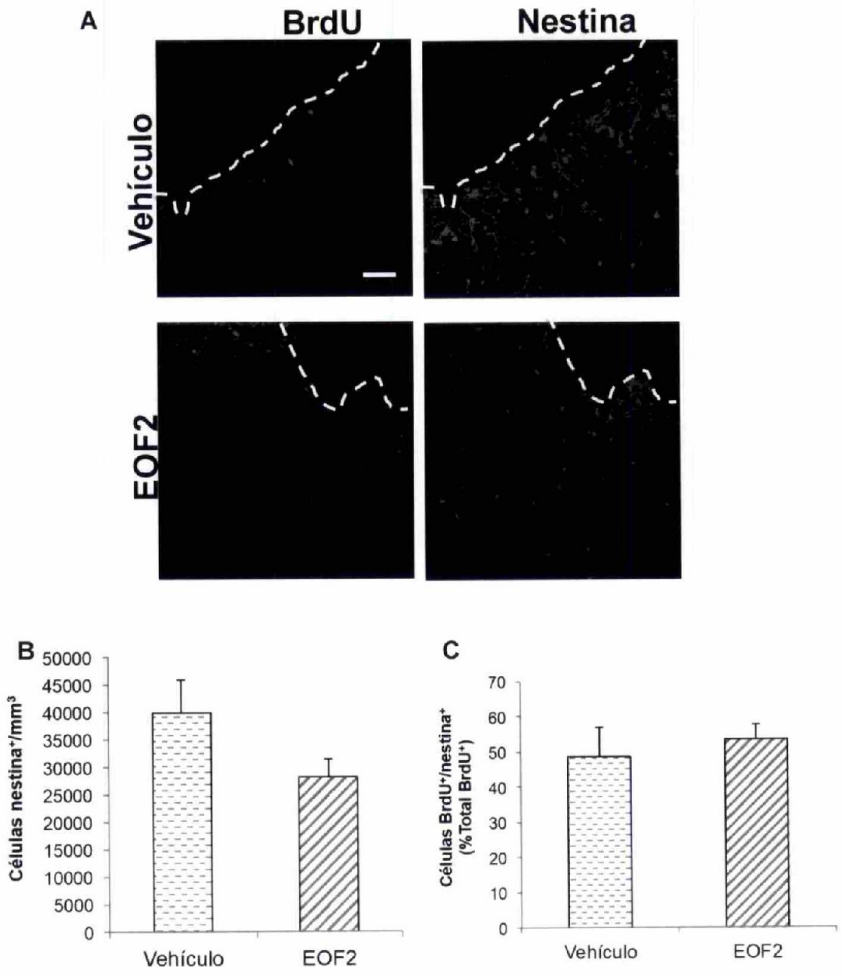

A
BrdU
Nestina
Vehículo
EOF2
B
Células nestina+/mm3
50000
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
Vehículo
EOF2
C
Células BrdU+/nestina+ (%Total BrdU+)
70
60
50
40
30
20
10
0
Vehículo
EOF2

FIGURA 4

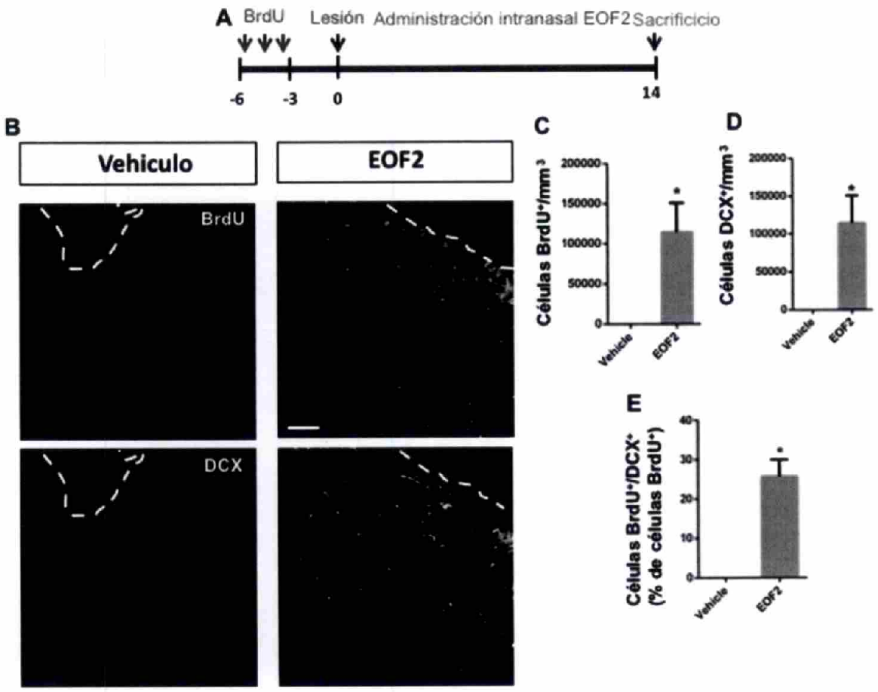

A
BrdU
Lesión
Administración intranasal EOF2
Sacrificicio
-6
-3
0
14
B
Vehiculo
EOF2
BrdU
DCX
C
Células BrdU+/mm3
200000
150000
100000
50000
0
Vehicle
EOF2
D
Células DCX+/mm3
200000
150000
100000
50000
0
Vehicle
EOF2
E
Células BrdU+/DCX+
(% de células BrdU+)
40
30
20
10
0
Vehicle
EOF2

FIGURA 5

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201800246

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 29.10.2018

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***C07D493/08*** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MURILLO-CARRETERO MARIBEL et al. ELAC (3,12-di-O-acetyl-8-O-tigloilingol), a plant-derived lathyrane diterpene, induces subventricular zone neural progenitor cell proliferation through PKC beta activation. British Journal of Pharmacology JUL 2017. , 30/06/2017, Vol. 174, Páginas 2373-2392, ISSN 0007-1188(print) ISSN 1476-5381(electronic), <DOI: doi:10.1111/bph.13846>. figura 1, resultados y discusión	1-10
A	DAOUBI et al. Isolation of new phenylacetylingol derivatives that reactivate HIV-1 latency and a novel spirotriterpenoid from Euphorbia officinarum latex. Bioorganic & medicinal chemistry : a Tetrahedron publication for the rapid dissemination of full original research papers and critical reviews on biomolecular chemistry, medicinal chemistry and related disciplines, 20070523 Elsevier, NL. Neidle Stephen, 23/05/2007, Vol. 15, Páginas 4577 - 4584, ISSN 0968-0896, <DOI: doi:10.1016/j.bmc.2007.04.009>. Esquema 1, compuestos 2 y 3.	1-10
A	GERIBALDI-DOLDÁN, N. et al. 12-Deoxyphorbols Promote Adult Neurogenesis by Inducing Neural Progenitor Cell Proliferation via PKC Activation. International Journal of Neuropsychopharmacology , 00/01/2016, Vol. 19, Nº 1, Páginas 1-14. ver página 7 figura 4	1-10
A	US 2014056995 A1 (CHEN YU-JEN et al.) 27/02/2014, página 2, párrafos 12 y 17.	1-10
A	CAO QI-LIN et al. Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage. Experimental Neurology January, 2001. , 31/12/2000, Vol. 167, Páginas 48-58, ISSN 0014-4886. página 56, columna 1.	1-10
A	WATANABE, T.K. A Review of Stem Cell Therapy for Acquired Brain Injuries and Neurodegenerative Central Nervous System Diseases. PM and R, 01/09/2018, Vol. 10, Nº 9, Supplement 2, Páginas S151 - S156. resumen	1-10

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
08..08.2019	H. Aylagas Cancio	1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07D

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, PATENW, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, NPL, XPESP, REGISTRY, HCAPLUS