

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 916 383**

21 Número de solicitud: 202031312

51 Int. Cl.:

C07C 35/44 (2006.01)

A61K 31/047 (2006.01)

A61K 35/30 (2015.01)

C12N 5/0797 (2010.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

29.12.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.06.2022

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

11.09.2023

Fecha de concesión:

04.12.2023

45 Fecha de publicación de la concesión:

13.12.2023

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE CÁDIZ (90.0%)
Avenida Carlos III, número 9
11003 Cádiz (Cádiz) ES y
UNIVERSIDAD DE SEVILLA (10.0%)

72 Inventor/es:

CASTRO GONZÁLEZ, Carmen;
HERNÁNDEZ GALÁN, Rosario;
MACÍAS SÁNCHEZ, Antonio José;
GERIBALDI DOLDÁN, Noelia;
DURÁN PATRÓN, Rosa María;
GÓMEZ OLIVA, Ricardo;
DOMÍNGUEZ GARCÍA, Samuel;
BOTUBOL ARES, José Manuel;
ESCOBAR MONTAÑO, Felipe;
EZZANAD, Abdellah y
NÚÑEZ ABADES, Pedro

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **DERIVADOS DE 12-DESOXIFORBOLES Y USOS DE LOS MISMOS**

57 Resumen:

Derivados de 12-desoxiforboles y usos de los mismos.

Esta invención está relacionada con la síntesis y el empleo de derivados de 12-desoxiforboles (o esteres de forbol) para favorecer la diferenciación a neuronas de precursores neurales o células madre neurales en cultivo y en cerebro adulto. Adicionalmente, también se relaciona con el empleo del mismo tipo de compuesto para la elaboración de una composición farmacéutica útil en el tratamiento de daños en el sistema nervioso central que cursen con pérdida neuronal.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 916 383 B2

DESCRIPCIÓN**DIESTERES DE DERIVADOS DE FORBOL Y USOS DE LOS MISMOS****SECTOR DE LA TÉCNICA**

5 Esta invención está relacionada con la síntesis de moléculas estructuralmente relacionados con
12-desoxiforboles, con capacidad para sustituir a factores de crecimiento que activan el receptor
EGFR y favorecer así la proliferación de precursores neurales o células madre neurales en cultivo
10 y para promover la neurogénesis en el cerebro adulto. Adicionalmente, también se relaciona con
el empleo de la misma familia de compuestos para la elaboración de una composición
farmacéutica útil en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central que cursen con
pérdida neuronal y deterioro cognitivo.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 La edad tiene un gran impacto sobre el cerebro y la capacidad cognitiva. El envejecimiento está
asociado a deterioro cognitivo y al riesgo de desarrollar patologías que cursan con deterioro
cognitivo (*Murman 2015. The Impact of Age on Cognition. Semin Hear, 36: 111-121*). Aunque
existen grandes diferencias entre individuos y múltiples causas para estas alteraciones, a nivel
25 poblacional los patrones de deficiencia cognitiva en individuos de avanzada edad están
demostrados (*Murman 2015. The Impact of Age on Cognition. Semin Hear, 36: 111-121*). Esta
disminución de la capacidad cognitiva, que afecta principalmente a individuos mayores de 65
30 años, resulta muy inhabilitante y constituye un gasto económico y social difícilmente asumible
(*WHO World Report on Ageing and Health, 2015*).

A nivel del sistema nervioso central (SNC), el envejecimiento afecta diferencialmente a distintas
35 regiones cerebrales, influyendo mayoritariamente sobre algunos tipos específicos de memoria
(*Gray and Barnes 2015. Distinguishing adaptive plasticity from vulnerability in the aging
hippocampus. Neuroscience, 309: 17-28*). Concretamente, la memoria episódica (que se refiere
40 a tiempo, localizaciones geográficas, emociones asociadas e información contextual) es una de
las más afectadas en la mayoría de la población envejecida (*Nyberg et al. 2012. Memory aging
and brain maintenance. Trends Cogn Sci, 16: 292-305*). Según muestran estudios realizados en
modelos animales, el mantenimiento de la memoria episódica en adultos de avanzada edad está
45 relacionada con la integridad de estructuras como el hipocampo (*Thome et al. 2016. Memory
impairment in aged primates is associated with region-specific network dysfunction. Mol*

50

5 *Psychiatry*, 21: 1257-1262). Así, algunas teorías proponen incluso que la resiliencia del cerebro de algunos individuos al deterioro cognitivo durante el envejecimiento está más relacionada con una alta plasticidad neural en estas regiones que con la resistencia al daño neuronal *per se* (Gonzalez-Escamilla et al. 2018. *Brain Networks Reorganization During Maturation and Healthy Aging-Emphases for Resilience. Front Psychiatry*, 9: 601;Montaron et al. 2020. *Responsiveness of dentate neurons generated throughout adult life is associated with resilience to cognitive aging. Aging Cell*, e13161). Una de las formas de plasticidad que ayudan a proteger el cerebro durante el envejecimiento es la capacidad de algunas estructuras, particularmente el giro dentado del hipocampo (DG), para generar nuevas neuronas. Esta neurogénesis se ha observado en el cerebro adulto de muchas especies de mamíferos incluido el humano y a lo largo de toda la vida del individuo (Aimone et al. 2014. *Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. Physiol Rev*, 94: 991-1026). Las neuronas generadas influyen en la capacidad cognitiva afectando a tareas como la memoria, el aprendizaje y la separación de patrones (Deng et al. 2010. *New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? Nat Rev Neurosci*, 11: 339-350; Aimone et al. 2011. *Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. Neuron*, 70: 589-596). A pesar de que existe cierta controversia respecto a la existencia de neurogénesis en el hipocampo del humano adulto y durante el envejecimiento (Sorrells et al. 2018. *Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. Nature*, 555: 377-381;Moreno-Jimenez et al. 2019. *Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. Nature Medicine*, 25: 554-+), estudios recientes parecen apoyar la existencia de neurogénesis a lo largo de toda la vida adulta (Moreno-Jimenez et al. 2019. *Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. Nature Medicine*, 25: 554;Tobin et al. 2019. *Human Hippocampal Neurogenesis Persists in Aged Adults and Alzheimer's Disease Patients. Cell Stem Cell*, 24: 974-982 e973). El proceso de neurogénesis, generación de neuronas a partir de células madre neurales (NSC), necesita de un entorno fisiológico adecuado formado por células, factores tróficos, elementos de la matriz extracelular, etc. que, a nivel celular y molecular, dirija el destino de las NSC hacia neuronas. Este entorno constituye lo que se denomina un nicho neurogénico. Al igual que el resto del organismo, los nichos neurogénicos envejecen alterando y reduciendo la capacidad de las NSC para generar neuronas (Encinas et al. 2011. *Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. Cell Stem Cell*, 8: 566-579;Diaz-

50

Moreno et al. 2018. *Noggin rescues age-related stem cell loss in the brain of senescent mice with neurodegenerative pathology. Proc Natl Acad Sci U S A, 115: 11625-11630*). Por este motivo, la búsqueda de estrategias que promuevan el rejuvenecimiento de los nichos neurogénicos, es de crucial importancia a la hora de desarrollar tratamientos que permitan paliar el deterioro cognitivo asociado al envejecimiento.

La presente invención se enfrenta al problema de proporcionar herramientas que promuevan la neurogénesis tanto *in vitro* como *in vivo*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Los compuestos semisintéticos P-12,13-diIBu (S1), P-12-iBu-13-PhAc (S2), P-13-iBu-12-PhAc (S3) estimulan la secreción del factor de crecimiento TGF α en un sistema a tiempo real *in vitro*. A) Esquema de construcción y mecanismo de acción mCherry-TGF α -GFP. **B)** Análisis cuantitativo de las imágenes microscópicas obtenidas de los ensayos a tiempo real de cultivos celulares de HEK293T que expresan mCherry-TGF α -GFP. La proporción de mCherry/GFP se normalizó con respecto a la media obtenida de la proporción de mCherry/GFP antes de la adición de los compuestos semisintéticos. En las gráficas se muestran las proporciones de mCherry/GFP normalizadas del cultivo celular sin compuesto, con P-12,13-diIBu (0,5 μ M), con P-12-iBu-13-PhAc (0,5 μ M) y con P-13-iBu-12-PhAc (0,5 μ M), n = 40. **C)** Imágenes de las células HEK293T transfectadas con la construcción mCherry-TGF α -GFP, en presencia o ausencia de los diferentes compuestos semisintéticos durante 180 min. Las imágenes de la proporción de mCherry/GFP se muestran a 0, 60, 120 y 180 min. La proporción de mCherry/GFP se muestra en una variación de gris, siendo la proporción más alta blanca y la más baja negra. Los límites superior e inferior del rango de la proporción se muestran a la derecha.

Figura 2. Los compuestos P-12,13-diPhAc (S4), P-12,13-diAc (S5), P-13-iBu-12-Tig (S6), DPPI (N1), DPPT (N2), y DP-13,16-diPhAc (N3) estimulan la secreción del factor de crecimiento TGF α en un sistema a tiempo real *in vitro*. A) Esquema de construcción y mecanismo de acción mCherry-TGF α -GFP. **B)** Análisis cuantitativo de las imágenes microscópicas obtenidas de los ensayos a tiempo real de cultivos celulares de HEK293T que expresan mCherry-TGF α -GFP. La proporción de mCherry/GFP se normalizó respecto a la media obtenida de la proporción de mCherry/GFP antes de la adición de los compuestos semisintéticos. En las gráficas se muestra las proporciones de mCherry/GFP normalizadas del cultivo celular sin

compuesto, con P-12,13-diPhAc (0,5 μ M), con P-12,13-diAc (0,5 μ M), con P-12,13-diAc (0,5 μ M), con DPPI (0,5 μ M), con DPPT (0,5 μ M) y con DP-13,16-diPhAc (0,5 μ M) n = 40. **C)** Imágenes de las células HEK293T transfectadas con la construcción mCherry-TGF α -GFP, en presencia o ausencia de los diferentes compuestos semisintéticos durante 180 min. Las imágenes de la proporción de mCherry/GFP se muestran a 0, 60, 120 y 180 min. La proporción de mCherry/GFP se muestra en una variación de gris, siendo la proporción más alta blanca y la más baja negra. Los límites superior e inferior del rango de la proporción se muestran a la derecha.

10 **Figura 3. El forbol, el P-13-iBu (S7) y el DP-13PhAc-16-Bz (N4) no estimulan la secreción de TGF α en un sistema a tiempo real *in vitro*. 5.1)** Estructuras químicas del forbol, forbol-13-isobutirato (P-13-iBu, **S7**), y 12-desoxi-16-hidroxiforbol-16-benzoato-13-fenilacetato (DP-13-PhAc-16-Bz **N4**). **5.2) A)** Esquema de construcción y mecanismo de acción mCherry-TGF α -GFP. **B)** Análisis cuantitativo de las imágenes microscópicas obtenidas de los ensayos a tiempo real de cultivos celulares de HEK293T que expresan mCherry-TGF α -GFP. La proporción de mCherry/GFP se normalizaron respecto a la media obtenida de la proporción de mCherry/GFP antes de la adición del forbol y del P-13-iBu. En las gráficas se muestra las proporciones de mCherry/GFP normalizadas del cultivo celular sin compuesto, con forbol (0,5 μ M) y con P-13-iBu (0,5 μ M) y DP-13-PhAc-16-Bz (0,5 μ M) n = 40. **C)** Imágenes de las células HEK293T transfectadas con la construcción mCherry-TGF α -GFP, en presencia o ausencia de los diferentes compuestos durante 180 min. Las imágenes de la proporción de mCherry/GFP se muestran a 0, 60, 120 y 180 min. La proporción de mCherry/GFP se muestra en una variación de gris, siendo la proporción más alta blanca y la más baja negra. Los límites superior e inferior del rango de la proporción se muestran a la derecha.

35 **Figura 4. El compuesto P-12,13-diiBu (S1), que estimula la secreción de TGF α , promueve la proliferación de las células madre neurales *in vitro*.** Efecto del P-12,13 diiBu (**S1**) a diferentes a concentraciones (1 nM, 10 nM, 50 nM, 0,1 μ M, 0,5 μ M y 1 μ M) sobre la proliferación de células progenitoras neurales (NPC) *in vitro*. La proliferación fue testada en cultivos de NPC en presencia del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF). **A)** Imágenes al microscopio de contraste de fase de neuroesferas cultivadas durante 72 horas en presencia o ausencia de P-12,13 diiBu (**S1**) a diferentes concentraciones. **B)** La gráfica muestra el efecto del P-12,13 diiBu (**S1**) a diferentes concentraciones sobre el área de las neuroesferas después de 72 horas en cultivo. Se midió el área de un mínimo de 540 neuroesferas por tratamiento.

50

Figura 5. El compuesto P-12,13-diAc (S5) que estimula la secreción de TGF α , promueve la proliferación de las células madre neurales *in vitro*. Efecto del P-12,13 diAc (S5) a diferentes a concentraciones (0,1 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M y 5 μ M) sobre la proliferación de células progenitoras neurales (NPC) *in vitro*. La proliferación fue testada en cultivos de NPC en presencia del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF). **A)** Imágenes al microscopio de contraste de fase de neuroesferas cultivadas durante 72 horas en presencia o ausencia de P-12,13 diAc a diferentes concentraciones. **B)** La gráfica muestra el efecto del P-12,13 diAc (S5) a diferentes concentraciones sobre el área de las neuroesferas después de 72 horas en cultivo. Se midió el área de un mínimo de 540 neuroesferas por tratamiento.

Figura 6. El compuesto DPPI (N1) que estimula la secreción de TGF α , promueve la proliferación de las células madre neurales *in vitro*. Efecto del DPPI (N1) a diferentes a concentraciones (0,01 μ M, 0,05 μ M, 0,1 μ M y 0,5 μ M, 1 μ M, y 5 μ M) sobre la proliferación de células progenitoras neurales (NPC) *in vitro*. La proliferación fue testada en cultivos de NPC en presencia del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF). **A)** Imágenes al microscopio de contraste de fase de neuroesferas cultivadas durante 72 horas en presencia o ausencia de DPPI (N1) a diferentes concentraciones. **B)** La gráfica muestra el efecto de DPPI (N1) a diferentes concentraciones sobre el área de las neuroesferas después de 72 horas en cultivo. Se midió el área de un mínimo de 540 neuroesferas por tratamiento.

Figura 7. El forbol, que no estimula la secreción de TGF α , tampoco promueve la proliferación de las células madre neurales. Efecto del forbol a diferentes a concentraciones (0,1, 0,5, 1 y 5 μ M) sobre la proliferación de células progenitoras neurales (NPC) *in vitro*. La proliferación fue testada en cultivos de NPC en presencia del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF). **A)** Imágenes al microscopio de contraste de fase de neuroesferas cultivadas durante 72 horas en presencia o ausencia de forbol a diferentes concentraciones. **B)** La gráfica muestra el efecto del forbol a diferentes concentraciones sobre el área de las neuroesferas después de 72 horas en cultivo. Se midió el área de un mínimo de 540 neuroesferas por tratamiento. **C)** Efecto de las diferentes concentraciones de forbol sobre el número de neuroesferas contadas 72 horas después del tratamiento. Los experimentos se hicieron por triplicado y un mínimo de tres veces independientes. Estadística: *p < 0,5 comparado respecto al control mediante un post hoc de Dunnett.

Figura 8. La administración del compuesto P-12,13-diAc (S5) por vía intranasal en un modelo animal estimula la neurogénesis en el cerebro adulto. A) Se muestran imágenes de

microscopía confocal de secciones coronales de la SVZ de ratón adulto tras la administración intranasal de 12 μ L de P-12,13-diAc (5 μ M) durante siete días. Las imágenes fueron procesadas para la detección inmunohistoquímica del marcador de proliferación BrdU y el marcador de neuroblastos DCX. La administración del P-12,13-diAc (**S5**) se realizó intranasalmente durante 5 siete días consecutivos, así como la de BrdU de forma intraperitoneal. Los ratones fueron sacrificados el día posterior a la última dosis. **B)** La gráfica representa el número de células positivas para el marcador de proliferación BrdU por mm^3 . **C)** La gráfica muestra el porcentaje de área ocupada por células DCX⁺ respecto del área total de la SVZ. **D)** Representación gráfica del 10 número de células que co-expresan el marcador de proliferación BrdU y el marcador de neuroblastos DCX por mm^3 . Cada barra representa la media \pm error estándar de al menos 6 animales por condición. Estadística: * $p < 0.05$, representa las diferencias estadísticamente 15 significativas mediante una prueba t de Student.

Figura 9. La administración del compuesto P-12,13-diiBu (S1) por vía intranasal en un modelo animal estimula la neurogénesis en el cerebro adulto. **A)** Se muestran imágenes de 20 microscopía confocal de secciones coronales de la SVZ de ratón adulto tras la administración intranasal de P-12,13-diiBu (0,01 μ M) durante siete días. Las imágenes fueron procesadas para la detección inmunohistoquímica del marcador de proliferación BrdU y el marcador de 25 neuroblastos DCX. La administración del P-12,13-diiBu (**S1**) se realizó intranasalmente durante siete días consecutivos, así como la de BrdU de forma intraperitoneal. Los ratones fueron sacrificados el día posterior a la última dosis. **B)** La gráfica representa el número de células positivas para el marcador de proliferación BrdU por mm^3 . **C)** La gráfica muestra el porcentaje de 30 área ocupada por células DCX⁺ respecto del área total de la SVZ. **D)** Representación gráfica del número de células que co-expresan el marcador de proliferación BrdU y el marcador de neuroblastos DCX por mm^3 . Cada barra representa la media \pm error estándar de al menos 6 35 animales por condición. Estadística: * $p < 0.05$, representa las diferencias estadísticamente significativas mediante una prueba t de Student.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

40 Un paso importante para la comprensión de los mecanismos de proliferación, diferenciación y muerte de precursores neurales ha sido la demostración de que los progenitores inmaduros multipotenciales pueden ser aislados del SNC adulto y propagados en cultivo. Estas células 45 crecen in vitro como agregados esféricos no adherentes llamados neuroesferas, cuando se las cultivan en presencia de factores tróficos que activan el receptor del factor de crecimiento

50

epidérmico (EGFR) o el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) (*Kuhn et al. 1997. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. J Neurosci, 17: 5820-5829; Reynolds and Rietze 2005. Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship. Nat Methods, 2: 333-336*). Varios factores tróficos son capaces de activar EGFR e inducir proliferación en células en cultivo. Estos ligandos son anfiregulina, epiregulina factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante alfa (TGF α), o factor de unión a la heparina parecido al factor crecimiento epidérmico (HB-EGF). La presencia de estos factores tróficos es esencial a la hora de cultivar células madre neurales (*Tropepe et al. 1997. Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. J Neurosci, 17: 7850-7859*).

Los factores tróficos influyen también en la función del nicho neurogénico. La neurogénesis está regulada por factores de crecimiento extracelulares presentes en los nichos, como las neuregulinas 1 y 2 (NRG1 y NRG2), que activan el receptor ErbB4 o los ligandos del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), como el factor de crecimiento transformante alfa (TGF α) (*Alipanahzadeh et al. 2014. Transforming Growth Factor-alpha Improves Memory Impairment and Neurogenesis Following Ischemia Reperfusion. Cell J, 16: 315-324; Mahar et al. 2016. Effects of neuregulin-1 administration on neurogenesis in the adult mouse hippocampus, and characterization of immature neurons along the septotemporal axis. Sci Rep, 6: 30467; Mahar et al. 2017. Disrupted hippocampal neuregulin-1/ErbB3 signaling and dentate gyrus granule cell alterations in suicide. Transl Psychiatry, 7: e1243*). Curiosamente, se han encontrado alteraciones del comportamiento en individuos que presentaban una señalización alterada de la neuregulina (*Mahar et al. 2017. Disrupted hippocampal neuregulin-1/ErbB3 signaling and dentate gyrus granule cell alterations in suicide. Transl Psychiatry, 7: e1243*) y se ha observado una mejora cognitiva en modelos de isquemia en ratones tras el tratamiento con TGF α (*Alipanahzadeh et al. 2014. Transforming Growth Factor-alpha Improves Memory Impairment and Neurogenesis Following Ischemia Reperfusion. Cell J, 16: 315-324*). Estos factores tróficos regulan vías de señalización que generan respuestas como cambios en la expresión de ciclinas que pueden alterar el equilibrio qNSC/aNSC (*Morales and Mira 2019. Adult Neural Stem Cells: Born to Last. Front Cell Dev Biol, 7: 96; Montaron et al. 2020. Responsiveness of dentate neurons generated throughout adult life is associated with resilience to cognitive aging. Aging Cell, e13161*). De igual modo, la delección en ratones del receptor de neuregulina ErbB4 reduce las capacidades de memoria y aprendizaje espacial (*Skirzewski et al. 2020. ErbB4 Null Mice Display Altered*

50

Mesocorticolimbic and Nigrostriatal Dopamine Levels as well as Deficits in Cognitive and Motivational Behaviors. eNeuro, 7).

Los ligandos de receptor EGFR, como el TGF α , se sintetizan en forma de pre-proteínas que atraviesan la membrana y son secretados al medio extracelular en una reacción proteolítica catalizada por la convertasa ADAM17 (Blobel 2005. *ADAMs: key components in EGFR signalling and development. Nat Rev Mol Cell Biol, 6: 32-43*). La selectividad de esta enzima para cada ligando está determinada por las reacciones de fosforilación catalizadas por quinasas de la familia de las proteínas quinasa C (PKC) (Dang et al. 2013. *Regulated ADAM17-dependent EGF family ligand release by substrate-selecting signaling pathways. Proc Natl Acad Sci U S A, 110: 9776-9781*). La PKC consta de 3 subfamilias de quinasas: las clásicas (cPKC), las noveles (nPKC) y las atípicas. La PKC α , perteneciente a la familia de cPKC, es activada por el forbol 12-miristato-13-acetato (PMA) catalizando la fosforilación de los precursores de TGF α y anfiregulina facilitando su desprendimiento mediado por el ADAM17 y la liberación del ligando soluble fuera de la célula. Del mismo modo, la activación de la PKC novel δ es necesaria para la secreción de neuregulina mediada por ADAM17. En general, la especificidad y selectividad del sustrato de ADAM17 está mediada por la activación de diferentes isoenzimas de PKC, desempeñando así un papel clave en la secreción de diferentes tipos de factores de crecimiento (Dang et al. 2011. *Epidermal growth factor (EGF) ligand release by substrate-specific a disintegrin and metalloproteases (ADAMs) involves different protein kinase C (PKC) isoenzymes depending on the stimulus. J Biol Chem, 286: 17704-17713*; Dang et al. 2013. *Regulated ADAM17-dependent EGF family ligand release by substrate-selecting signaling pathways. Proc Natl Acad Sci U S A, 110: 9776-9781*; Geribaldi-Doldan et al. 2019. *Protein Kinase C: Targets to Regenerate Brain Injuries? Front Cell Dev Biol, 7: 39*).

La actividad de las PKC se regula fisiológicamente mediante la unión a diacilglicerol. Existen además compuestos de naturaleza farmacológica pertenecientes a la familia de los diterpenos capaces de regular su actividad. Estas moléculas constituyen un vasto grupo de compuestos de un esqueleto de 20 carbonos que, por ciclación, generan estructuras policíclicas (Duran-Peña et al. *Biologically active diterpenes containing a gem-dimethylcyclopropane subunit: An intriguing source of PKC modulators. Nat. Prod. Rep. 2014, 31: 940-952*) capaces de mimetizar al DAG activando así a las PKC. Una de estas estructuras policíclicas son los ésteres de forbol con estructura de tiglianos. Los ésteres de forbol son diterpenos naturales derivados de plantas, muy abundantes en el látex de las plantas de la familia Euphorbiaceae. Uno de los más conocidos es

50

el forbol 12-miristato-13-acetato (PMA), muy usado en investigación, pero sin utilidad clínica por ser altamente tumorigénico (*Deleers, M. and Malaisse, W. J. Binding of tumor-promoting and biologically inactive phorbol esters to artificial membranes. Cancer Lett. 1982, 17:135-140*).

5 Algunos estudios han testado el efecto de 12-desoxiforboles aislados y purificados del látex de *Euphorbia resinífera*, algunos de los cuáles, como el ER272, se ha demostrado que inducen la proliferación de los NPC, tanto *in vitro* como *in vivo*, mediante su interacción con PKC (*Geribaldi-Doldán et al. 12-Deoxyphorbols promote adult neurogenesis by inducing neural progenitor cell proliferation via PKC activation. Int. J. of Neuropsychopharmacology 2016, 19: 1-14*).

15 El mayor problema que presenta el uso de 12-desoxiforboles para el desarrollo de fármacos es la variabilidad en la producción a partir del látex de *E. resinífera*, y la escasa biodisponibilidad de estos compuestos. Por lo tanto, uno de los problemas con el que se enfrenta la presente invención, es que, si bien el tratamiento con 12-desoxiforboles promueve la neurogénesis, y puede constituir una herramienta farmacológica para el tratamiento de patologías que cursan con pérdida neuronal durante el envejecimiento, es difícil disponer de suministro suficiente de éstos a la hora de elaborar fármacos. Adicionalmente y sin perjuicio de lo anterior, la presente invención también se enfrenta al problema de buscar compuestos estructuralmente relacionados con los 12-desoxiforboles previamente descritos, con un efecto mayor que los ya existentes, y que puedan utilizarse a menor concentración. Por este motivo, en esta invención se han sintetizado a partir del esqueleto de forbol, 12,13-diésteres de forbol con capacidad para estimular la secreción de factores tróficos, favorecer la proliferación de células madre neurales en cultivo y estimular la neurogénesis en el cerebro adulto. Estos compuestos semisintéticos, que no han sido descritos previamente, ejercen su efecto a concentraciones menores que los 12-desoxiforboles previamente descritos.

35 En concreto, y tal y como se muestra en el ejemplo 5, se ha comprobado el efecto de los compuestos P-12,13-diiBu (**S1**), P-12-iBu-13-PhAc (**S2**) y P-13-iBu-12-PhAc (**S3**) sobre la secreción de factores tróficos tales como el TGF α . Más concretamente, en la figura 1 se puede ver un esquema de la construcción realizada y en el panel derecho, se ha representado la tasa de fluorescencia mCherry/GFP en cultivos de células HEK293T a las que se ha añadido suero salino (\emptyset) o los compuestos **S1**, **S2** y **S3**. Puede verse como en presencia de los compuestos P-12,13-diiBu (**S1**), P-12-iBu-13-PhAc (**S2**) y P-13-iBu-12-PhAc (**S3**) la tasa de fluorescencia mCherry/GFP disminuye indicando que la proteína m-Cherry está siendo liberada al medio extracelular junto con el segmento soluble de TGF α .

50

Adicionalmente, en el ejemplo 6, se analizó el efecto de otros compuestos sobre la secreción de TGF α . En concreto, se adicionaron, los compuestos P-12,13-diPhAc (**S4**), P-12,13-diAc (**S5**), P-13-iBu-12-Tig (**S6**), DPPI (**N1**), DPPT (**N2**), y DP-13,16-diPhAc (**N3**) a células transfectadas con la construcción indicada en el ejemplo 5 percibiéndose un cambio en la tasa mCherry/GFP. A
5 pesar de que el efecto de todos ellos era algo menor que el de los descritos en el ejemplo 5, se observaba una reducción de la tasa mCherry/GFP indicando que en todos los casos había una facilitación de la secreción de TGF α cuando se administraba el compuesto a los cultivos (ver
10 Figura 2).

Más aún, en el ejemplo 7 y figura 3, se puede observar como en presencia de forbol o de forbol-13-isobutirato (**S7**) o DP-13PhAc-16-Bz (**N4**), la tasa de fluorescencia mCherry/GFP en células
15 HEK293T transfectadas con la construcción mChery-TGF α -EGFP, no se ve alterada, indicando que esta modificación del forbol resulta en un compuesto que no ejerce ningún efecto sobre la escisión de TGF α .

20 Por lo tanto, el grupo éster en C-12 resulta fundamental para inducir la secreción de TGF α .

A partir de todos los datos mostrados a lo largo de los ejemplos y las figuras se ha comprobado como 12-desoxiforboles de fórmula (I) resultan especialmente útiles para promover la
25 neurogénesis tanto *in vitro* como *in vivo*. Por lo tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende un compuesto de fórmula I o cualquier sal o isómero del mismo:

30

35

40

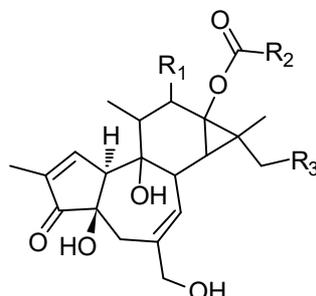
45

50

Fórmula (I)

5

10



15

20

$R_1 = \text{H, OCOCH}_3, \text{OCOCH}_2\text{CH}_3, \text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3, \text{OCOCH}(\text{CH}_3)_2,$
 $\text{OCOCH}=\text{CHCH}_3, \text{OCOC}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2, \text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3,$
 $\text{OCOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2, \text{OCOC}(\text{CH}_3)_3, \text{OCOCH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3,$
 $\text{OCOCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_3, \text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2, \text{OCOC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3,$
 $\text{OCOCH}(\text{CH}_3)\text{CH}=\text{CH}_2, \text{OCOC}(\text{CH}_2\text{CH}_3)=\text{CH}_2, \text{OCOCH}_2\text{Ph}$

$R_2 = \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{CH}_3, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3, \text{CH}(\text{CH}_3)_2, \text{CH}=\text{CHCH}_3, \text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2,$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3, \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2, \text{C}(\text{CH}_3)_3, \text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3,$
 $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_3, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2, \text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3, \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}=\text{CH}_2,$
 $\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)=\text{CH}_2, \text{CH}_2\text{Ph}$

$R_3 = \text{H, OCOCH}_3, \text{OCOCH}_2\text{CH}_3, \text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3, \text{OCOCH}(\text{CH}_3)_2,$
 $\text{OCOCH}=\text{CHCH}_3, \text{OCOC}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2, \text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3,$
 $\text{OCOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2, \text{OCOC}(\text{CH}_3)_3, \text{OCOCH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3,$
 $\text{OCOCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_3, \text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2, \text{OCOC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3,$
 $\text{OCOCH}(\text{CH}_3)\text{CH}=\text{CH}_2, \text{OCOC}(\text{CH}_2\text{CH}_3)=\text{CH}_2, \text{CH}_2\text{Ph}$

donde R_1, R_2 y R_3 se seleccionan, de manera independiente, de la lista arriba indicada.

25

30

35

40

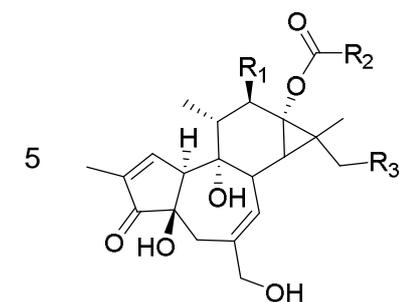
45

50

Se hace notar que, hasta el momento, los autores de la invención han determinado como activos para promover la neurogénesis los siguientes productos: $R_1=R_3=\text{H}$ $R_2=\text{CH}_3$; $R_1=R_3=\text{H}$ $R_2=\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3$; $R_1=R_3=\text{H}$ $R_2=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$; $R_1=R_3=\text{H}$ $R_2=\text{CH}_2\text{Ph}$; $R_1=\text{OCOCH}_3$ $R_2=\text{CH}_3$ $R_3=\text{H}$; $R_1=\text{OCOCH}(\text{CH}_3)_2$ $R_2=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ $R_3=\text{H}$; $R_1=\text{OCOCH}_2\text{Ph}$ $R_2=\text{CH}_2\text{Ph}$ $R_3=\text{H}$; $R_1=\text{OCOCH}_2\text{Ph}$ $R_2=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ $R_3=\text{H}$; $R_1=\text{OCOC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3$ $R_2=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ $R_3=\text{H}$; $R_1=\text{OCOCH}(\text{CH}_3)_2$ $R_2=\text{CH}_2\text{Ph}$ $R_3=\text{H}$; $R_1=\text{H}$ $R_2=\text{CH}_2\text{Ph}$ $R_3=\text{OCOCH}_2\text{Ph}$; $R_1=\text{H}$ $R_2=\text{CH}_2\text{Ph}$ $R_3=\text{OCOC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3$; y $R_1=\text{H}$ $R_2=\text{CH}_2\text{Ph}$ $R_3=\text{OCOCH}(\text{CH}_3)_2$. Como se puede observar, han sido activos mono o diésteres donde los grupos éster se sitúan en C-13, C-12 y C13, o C13 y C-16. La actividad radica en la naturaleza de esos grupos éster. Los activos hasta ahora pueden tener cadenas de hasta 5 átomos de carbono. También han sido activos los que contienen un grupo fenil acetato, pero el benzoato no ha sido activo.

En concreto, en la presente invención se han testado compuestos presentando la estereoquímica indicada en la fórmula II. Por lo tanto, un segundo aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende un compuesto de fórmula I o cualquier sal del mismo:

Fórmula (II)



$R_1 = \text{H, OCOCH}_3, \text{OCOCH}_2\text{CH}_3,$
 $\text{OCOCH}(\text{CH}_3)_2, \text{OCOC}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$
 $\text{OCOC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3, \text{OCOCH}_2\text{Ph}$

$R_2 = \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{CH}_3, \text{CH}(\text{CH}_3)_2, \text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$
 $\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3, \text{OCOCH}_2\text{Ph}$

$R_3 = \text{H, OCOCH}_3, \text{OCOCH}_2\text{CH}_3,$
 $\text{OCOCH}(\text{CH}_3)_2, \text{OCOC}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$
 $\text{OCOC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3, \text{OCOCH}_2\text{Ph}$

10

15 donde R_1, R_2 y R_3 se seleccionan, de manera independiente, de la lista arriba indicada.

En una realización preferida del primer o segundo aspecto de la invención, el compuesto es un compuesto de fórmula I seleccionado de cualquiera de los siguientes:

20

- a. $R_1=R_3=\text{H}$ $R_2=\text{CH}_3$;
- b. $R_1=R_3=\text{H}$ $R_2=\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3$;
- 25 c. $R_1=R_3=\text{H}$ $R_2=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$;
- d. $R_1=R_3=\text{H}$ $R_2=\text{CH}_2\text{Ph}$;
- e. $R_1=\text{OCOCH}_3$ $R_2=\text{CH}_3$ $R_3=\text{H}$;
- 30 f. $R_1=\text{OCOCH}(\text{CH}_3)_2$ $R_2=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ $R_3=\text{H}$;
- g. $R_1=\text{OCOCH}_2\text{Ph}$ $R_2=\text{CH}_2\text{Ph}$ $R_3=\text{H}$;
- h. $R_1=\text{OCOCH}_2\text{Ph}$ $R_2=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ $R_3=\text{H}$;
- 35 i. $R_1=\text{OCOC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3$ $R_2=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ $R_3=\text{H}$;
- j. $R_1=\text{OCOCH}(\text{CH}_3)_2$ $R_2=\text{CH}_2\text{Ph}$ $R_3=\text{H}$;
- k. $R_1=\text{H}$ $R_2=\text{CH}_2\text{Ph}$ $R_3=\text{OCOCH}_2\text{Ph}$;
- l. $R_1=\text{H}$ $R_2=\text{CH}_2\text{Ph}$ $R_3=\text{OCOC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3$; or
- 40 m. $R_1=\text{H}$ $R_2=\text{CH}_2\text{Ph}$ $R_3=\text{OCOCH}(\text{CH}_3)_2$

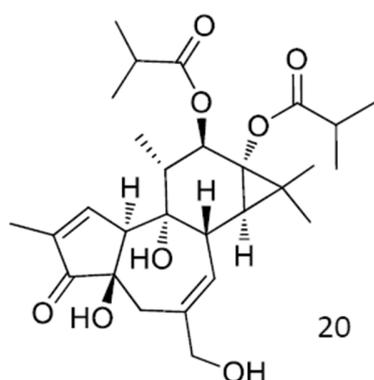
Preferiblemente, el compuesto es un compuesto de fórmula I seleccionado de cualquiera de los siguientes:

45

- a. $R_1=\text{OCOCH}_3$ $R_2=\text{CH}_3$ $R_3=\text{H}$;
- b. $R_1=\text{OCOCH}(\text{CH}_3)_2$ $R_2=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ $R_3=\text{H}$;
- 50 c. $R_1=\text{OCOCH}_2\text{Ph}$ $R_2=\text{CH}_2\text{Ph}$ $R_3=\text{H}$;

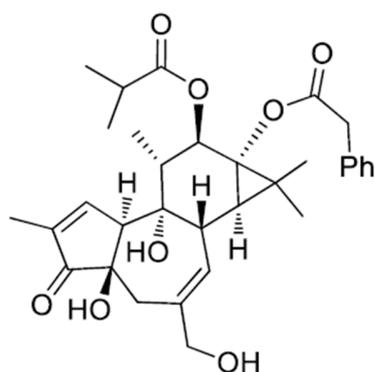
- d. $R_1=OCOCH_2Ph$ $R_2=CH(CH_3)_2$ $R_3=H$;
 e. $R_1=OCOC(CH_3)=CHCH_3$ $R_2=CH(CH_3)_2$ $R_3=H$;
 5 f. $R_1=OCOCH(CH_3)_2$ $R_2=CH_2Ph$ $R_3=H$;
 g. $R_1=H$ $R_2=CH_2Ph$ $R_3=OCOCH_2Ph$;
 h. $R_1=H$ $R_2=CH_2Ph$ $R_3=OCOC(CH_3)=CHCH_3$; or
 10 i. $R_1=H$ $R_2=CH_2Ph$ $R_3=OCOCH(CH_3)_2$

Más preferiblemente, el compuesto consiste en forbol 12,13-diisobutirato de fórmula:



o cualquier sal del mismo.

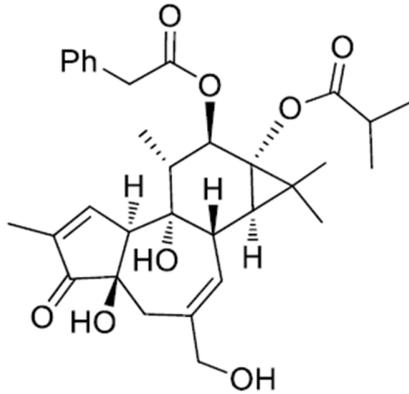
Más preferiblemente, el compuesto consiste en forbol-12-isobutirato-13-fenilacetato de fórmula:



o cualquier sal del mismo.

50

Más preferiblemente, el compuesto consiste en forbol 13-isobutirato-12-fenilacetato de fórmula:



o cualquier sal del mismo.

En otra realización preferida del primer o segundo aspecto de la invención, la composición además comprende precursores neurales o células madre neurales.

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

Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso *in vitro* de las composiciones según cualquiera de los dos primeros aspectos de la invención, para favorecer o promover la proliferación o expansión de precursores neurales o células madre neurales en cultivo.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un medio de cultivo adecuado para estimular la proliferación o expansión de precursores neurales, preferiblemente en ausencia de EGF, que comprende al menos un compuesto tal y como se definen estos en cualquiera de los dos primeros aspectos de la invención y opcionalmente el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF).

Un quinto aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la proliferación de células madre neurales o precursores neurales *in vitro* caracterizado por que comprende poner en contacto células madre neurales o precursores neurales con:

- a. una solución o disolución que comprenda los compuestos definidos en cualquiera de los dos primeros aspectos de la invención, y/o con una sal de los mismos, y opcionalmente el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF); o
- b. el medio de cultivo según el cuarto aspecto de la invención;

5 durante un tiempo suficiente para la proliferación efectiva de las células madre neurales o precursores neurales.

10 Se hace notar que para utilizar compuestos de la invención en cultivo *in vitro* es preferible disolverlos, previo a su utilización, en una solución que pueda disolver tanto el compuesto como su sal farmacéuticamente aceptada. Ejemplos del disolvente pueden ser dimetilsulfóxido (DMSO), agua o similares. Adicionalmente, este compuesto puede estar disuelto en tampón fosfato salino (PBS).

15 En un aspecto particular de la invención, para cultivar las células madre neurales con los compuestos de la invención, es preferiblemente utilizar un rango de concentración para los compuestos de la invención de entre 1 pmol/L a 40 µmol/L, las células madre se deben cultivar en flotación a una densidad de 20 a 200 x 10⁶ células/L. El compuesto se añade, preferiblemente, a un cultivo estático, preferiblemente a 37°C, durante 1 a 14 días, preferiblemente en una atmósfera de 5% CO₂, opcionalmente 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 proliferación de las células madre neurales, como ejemplo se puede utilizar preferentemente un medio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F-12 (1:1), que contenga 2% del suplemento B27 (Invitrogen), 2mM L-glutamina y 2µg/ml de gentamicina. Adicionalmente el medio puede o no, contener el factor de básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), preferiblemente a una concentración de 10µg/L.

20 25 Un sexto aspecto de la invención se refiere a una composición que comprenda los compuestos definidos en cualquiera de los dos primeros aspectos de la invención, para su uso en terapia.

30 35 40 Un séptimo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto tal y como se define en cualquiera de los dos primeros aspectos de la invención, donde dicha composición farmacéutica opcionalmente comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

45 50

Preferiblemente, la composición farmacéutica del séptimo aspecto de la invención es adecuada o está formulada para su administración en el sistema nervioso central, preferiblemente por vía intranasal.

5 Un octavo aspecto de la presente invención se refiere al uso de la composición farmacéutica de la presente invención para el tratamiento de enfermedades o lesiones que cursen con pérdida neuronal o con una disminución de la neurogénesis en regiones neurogénicas. Alternativamente,
10 la presente invención se refiere a la composición farmacéutica de la presente invención para su uso en el tratamiento de enfermedades o lesiones que cursen con pérdida neuronal o con una disminución de la neurogénesis.

15 En realización preferida del octavo aspecto de la presente invención, las enfermedades o lesiones que cursan con pérdida neuronal son las seleccionadas de la lista que consiste en:

20 1. Enfermedades neurodegenerativas: se producen como consecuencia de la muerte neuronal precoz. Las más frecuentes son la enfermedad de Alzheimer, con pérdida neuronal en el hipocampo y corteza cerebral fundamentalmente, la enfermedad de Parkinson, con muerte selectiva de neuronas en la sustancia negra, o la esclerosis lateral
25 amiotrófica (ELA), con déficit de neuronas en la médula espinal.

30 2. 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
35 podría ser tratado mediante terapias dirigidas a favorecer la regeneración neuronal.

40 3. 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
45 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.

50 4. 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.

5. 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.

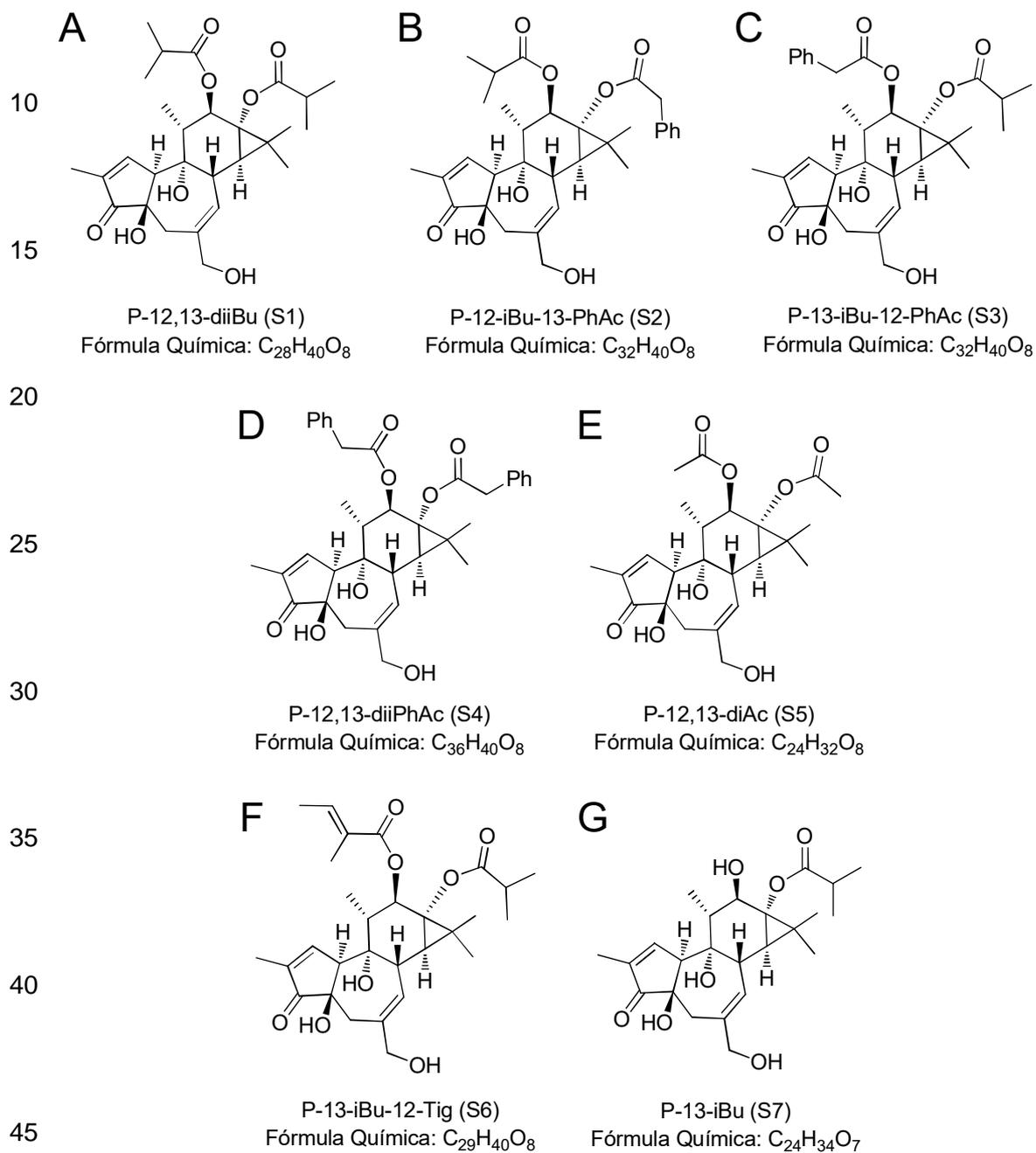
6. Esquizofrenia: trastorno mental grave por el cual las personas interpretan la realidad de manera anormal. La esquizofrenia puede provocar una combinación de alucinaciones, delirios y trastornos graves en el pensamiento y el comportamiento, que afecta el funcionamiento diario y puede ser incapacitante.

En una realización preferida del octavo aspecto de la invención, la composición farmacéutica es 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, enfermedad de Alzheimer, epilepsia y esclerosis lateral amiotrófica. Preferiblemente, dicha composición se administra en el sistema nervioso central vía intranasal.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de los compuestos

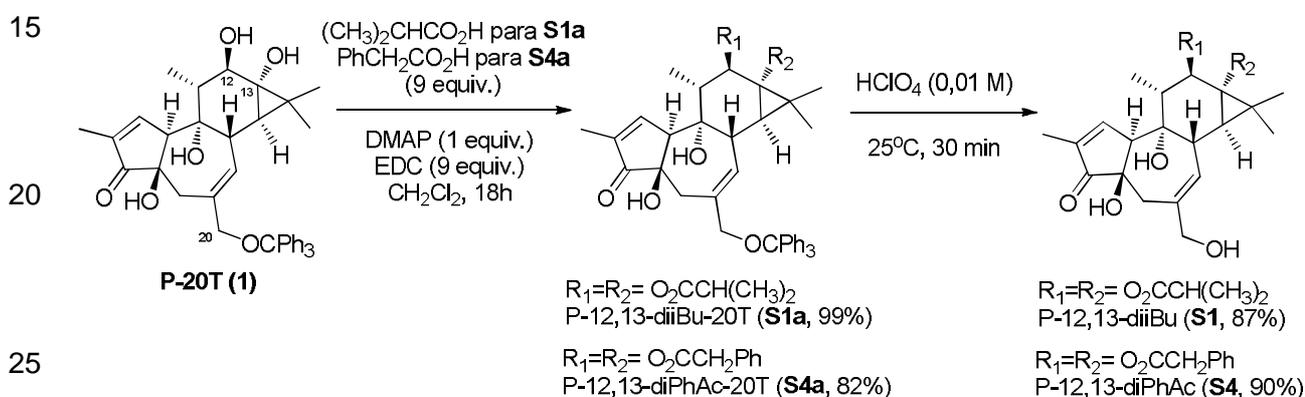
5 1.1).



50

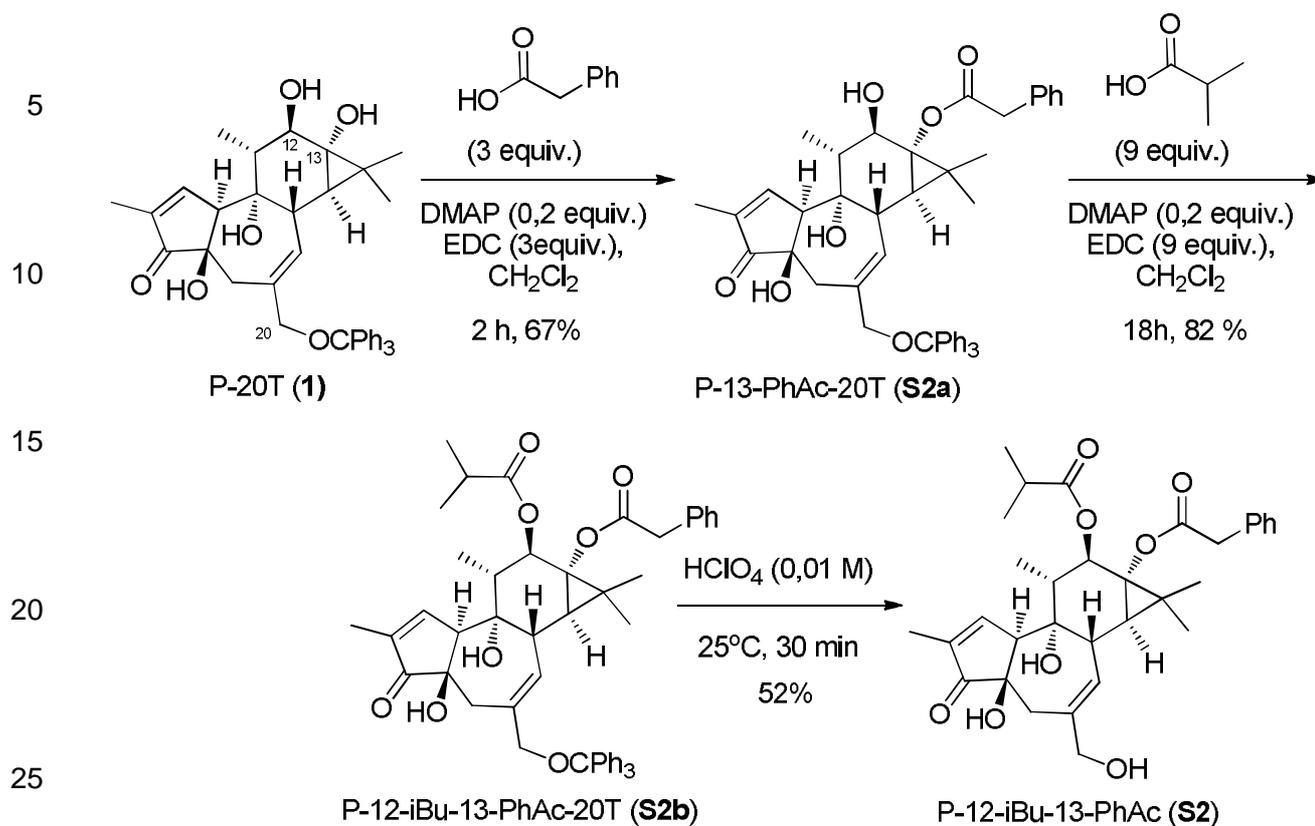
Estructuras químicas de los compuestos estructuralmente relacionados con 12-desoxiforboles, sintetizados a partir de derivados de forbol. **A)** Estructura química del compuesto forbol-12, 13-diisobutirato (P-12,13-di*i*Bu, **S1**). **B)** Estructura química de forbol-12-isobutirato-13-fenilacetato (P-12-*i*Bu-13-PhAc, **S2**). **C)** Estructura química del compuesto forbol-13-isobutirato-12-fenilacetato (P-13-*i*Bu-12-PhAc, **S3**). **D)** Estructura química del compuesto forbol-12,13-difenilacetato (P-12,13-diPhAc, **S4**), **E)** Estructura química del compuesto forbol-12,13-diacetato (P-12,13-diAc, **S5**). **F)** Estructura química del compuesto forbol-13-isobutirato-12-tigliato (P-13-Tig-12-*i*Bu, **S6**). **G)** Estructura química del compuesto forbol-13-isobutirato (P-13-*i*Bu, **S7**).

1.2).



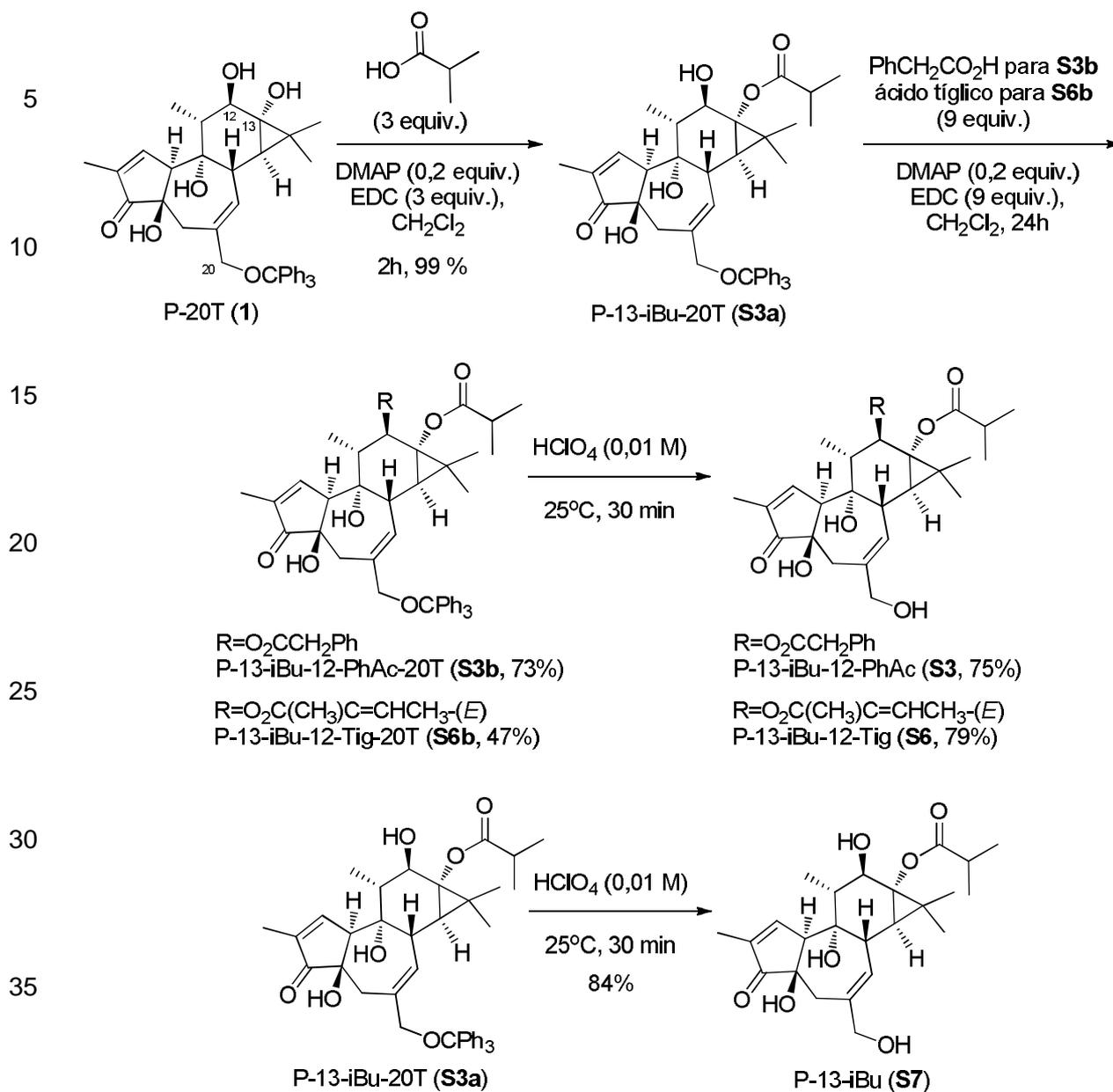
Esquema de preparación de forbol-12, 13-diisobutirato (P-12,13-di*i*Bu, **S1**) y forbol-12,13-difenilacetato (P-12,13-diPhAc, **S4**) desde forbol-20-tritilo (P-20T, **1**).

1.3).

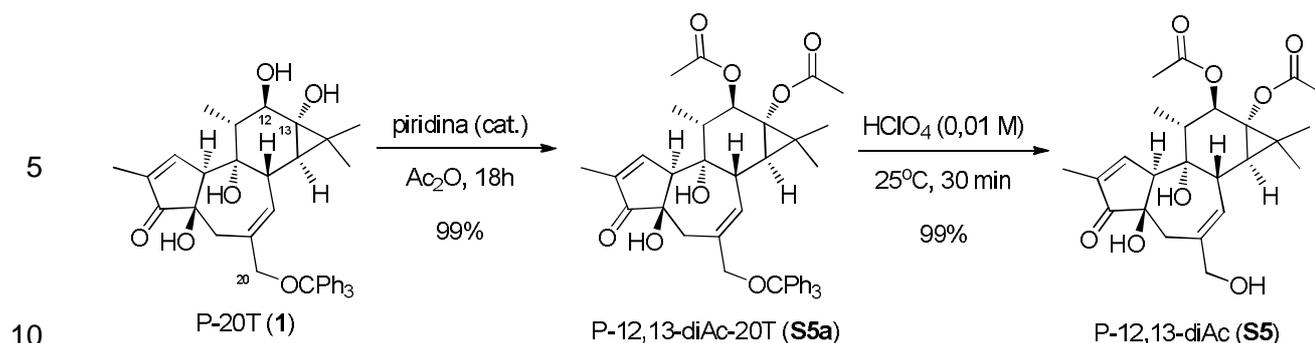


Esquema de preparación de forbol-12-isobutirato-13-fenilacetato (P-12-iBu-13-PhAc, **S2**) desde forbol-20-tritilo (P-20T, **1**).

1.4).



1.5).

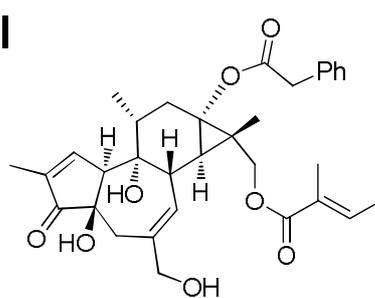
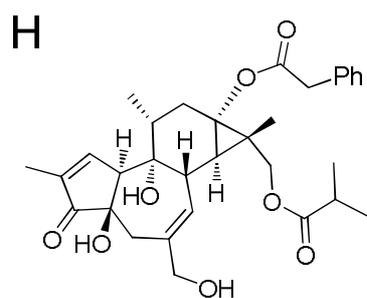


Esquema de preparación de forbol-12, 13-diacetato (P-12,13-diAc, **S5**) desde forbol-20-tritilo (P-20T, **1**).

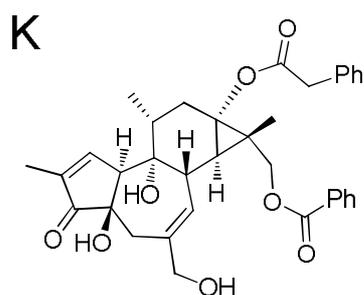
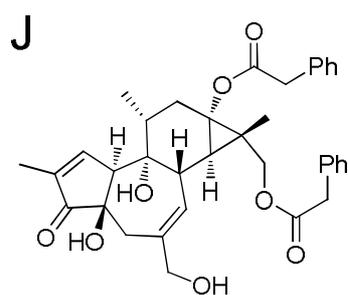
15

Ejemplo 2. Compuestos aislados de *Euphorbia resinifera*.

20



30



45

Estructuras químicas de los compuestos estructuralmente relacionados con 12-desoxiforboles, aislados del látex de *E. resinifera*. **H)** Estructura química del compuesto 12-desoxi-16-hidroxiforbol-16-isobutirato-13-fenilacetato (DPPI, **N1**). **I)** Estructura química del compuesto 12-

50

desoxi-16-hidroxforbol-16-tigliato-13-fenilacetato (DPPT, **N2**). **J**) Estructura química del compuesto 12-desoxi-16-hidroxforbol-13,16-difenilacetato (DP-13,16-diPhAc, **N3**). **K**) Estructura química del compuesto 12-desoxi-16-hidroxforbol-16-benzoato-13-fenilacetato (DP-13-PhAc-16-Bz, **N4**).

5

EJEMPLO 3. Descripción y obtención de los compuestos de las estructuras **S1-S7**

10 Preparación de forbol-20-tritilo (P-20T, **1**) desde aceite de croton

A una solución 0.01M de HClO₄ en metanol (MeOH, 180 mL), se añadió aceite de croton (49.0 g). Al cabo de 72 horas de agitación vigorosa, se neutralizó con acetato sódico (AcONa·3H₂O) y se lavó con hexano (3 x 150 mL). La fase metanólica se evaporó a presión reducida y el crudo resultante se fraccionó mediante cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con 1:1 hexano:éter etílico (Et₂O, 400 mL), 100% Et₂O (300 mL) y finalmente MeOH (200 mL). El disolvente de la fracción obtenida al eluir con la mezcla 1:1 hexano:Et₂O, se evaporó a presión reducida para dar 13.2 g de crudo de reacción, el cual se sometió a una reacción de tritilación, añadiendo piridina (60 mL) y cloruro de tritilo (25.0 g). Tras 72 horas de reacción, el disolvente se evaporó a presión reducida y se añadió acetato de etilo (90 mL). La fase orgánica resultante se lavó, sucesivamente, con una solución saturada de NaHCO₃ (120 mL) y salmuera (120 mL). Por último, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. El crudo de reacción resultante se disolvió en MeOH (50 mL), se añadió lentamente metóxido sódico (MeONa, 550 mg) y se mantuvo en agitación durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, la mezcla de reacción se neutralizó con una solución de ácido acético (AcOH) 10% y el disolvente se evaporó a presión reducida. La purificación del crudo de reacción mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo, dio lugar a forbol-20-tritilo (**1**) (536 mg, 1,1% en peso, desde aceite de croton).

Los datos espectroscópicos de P-20T (**1**) son consistentes con los descritos en la literatura (Bertolini TM, Giorgione J, Harvey DF, Newton AC. *Protein Kinase C Translocation by Modified Phorbol Esters with Functionalized Lipophilic Regions. J Org Chem* 2003; **68**: 5028–5036.).

45

50

Preparación de forbol-12,13-diisobutirato-20-tritilo (P-12,13-diiBu-20T, **S1a**) y de forbol-12,13-difenilacetato-20-tritilo (P-12,13-diiBu-20T, **S4a**).

Una mezcla de forbol-20-tritilo (P-20T, **S1a**, 0.13 mmol), 1.13 mmol del correspondiente ácido
5 (ácido isobutírico para **S1a**, ácido fenil acético para **S4a**) y *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP, 0.13 mmol) en diclorometano seco (2 mL) se agitó durante 10 minutos. A continuación se añadieron
10 1.13 mmol de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDCI) y se mantuvo en agitación durante 18 h, transcurridas las cuales, se evaporó el disolvente mediante destilación a presión reducida. El crudo resultante fue disuelto en Et₂O (5 mL) y lavado secuencialmente con H₂O (5 mL), una disolución saturada de NaHCO₃ (5 mL) y finalmente con H₂O (5 mL). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida obteniendo
15 los compuestos **S1a** y **S4a**, respectivamente.

*Datos físicos y espectroscópicos para el compuesto P-12,13-diiBu-20T, (**S1a**) (99% Rto):*

Sólido amorfo; $[\alpha]_D^{21} +50.9$ (c=2.0 mg/mL, CH₃OH); IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$: 3408; 3059; 2975; 2934;
20 1735; 1714; 1469; 1389; 1194; 1076; 980; 758 cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CD₃OD) δ_{H} (ppm): 7.56 (1H, s ancho), 7.39- 7.22 (18H, m), 5.56 (1H, d, 6.1 Hz), 5.42 (1H, d, 9.8 Hz), 3.58 (1H, d, 11.0 Hz), 3.50 (1H, d, 11.0 Hz), 2.57 (2H, dc, 6.9 Hz), 3.19 (2H, m), 2.50 (2H, s),
25 2.23 (1H, dc, 9.8 y 6.3Hz), 1,20-1,14 (12H, m), 1.75 (3H, dd, 3.0 y 1.4 Hz), 1.29 (3H, s ancho), 1.24 (3H, s ancho), 1.08 (1H, d, 5.2 Hz), 0.89 (1H, d, 6.3 Hz); RMN-¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ_{C} (ppm): 210.2 (s), 180.8 (s), 178.5 (s), 160.4 (d), 145.5 (s), 140.7 (s), 134.4 (s),
30 130.8 (d), 129.8 (d), 128.8 (d), 128.1 (d), 88.1 (s), 79.5 (d), 78.1 (d), 74.9 (s), 69.9 (t), 66.8 (s), 57.4 (d), 44.3 (d), 40.4 (d), 38.9 (t), 37.0 (d), 35.5 (2C, d), 27.3 (s), 24.2 (c), 19.5 (c), 19.2 (c), 19.0 (c), 18.9 (c), 17.4 (c), 14.7 (c), 10.2(c); HRMS (ESI+): m/z calcd para C₄₇H₅₄O₈Na [M+Na]⁺ 769.3716, encontrada 769.3714.

*Datos físicos y espectroscópicos de P-12,13-diPhAc, (**S4a**) (82% Rto):* consistentes con los descritos en la literatura (*Appendino, G., Cravotto, G., Palmisano, G., Annunziata, R. & Szallasi, A. Synthesis and Evaluation of Phorboid 20-Homovanillates: Discovery of a Class of Ligands Binding to the Vanilloid (Capsaicin) Receptor with Different Degrees of Cooperativity. J. Med. Chem. 1996, 39, 3123–3131.*)
40

45

50

Procedimiento general de esterificación selectiva en la posición C-13. Preparación de forbol-13-fenilacetato-20-tritilo (P-13-PhAc-20T, **S2a**) y de forbol-13-isobutirato-20-tritilo (P-13-iBu-20T, **S3a**).

Una mezcla de 0.13 mmol de forbol-20-tritilo (P-20T, **S1a**), 0.4 mmol del correspondiente ácido (ácido fenilacético para **S2a** y ácido isobutírico para **S3a**) y 0.03 mmol de DMAP en diclorometano seco (2 mL) se agitó durante 10 minutos. A continuación, se añadieron 0.4 mmol de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDCI) y se mantuvo en agitación durante 2 h, transcurridas las cuales, se evaporó el disolvente mediante destilación a presión reducida. El crudo resultante fue disuelto en Et₂O (5 mL) y lavado secuencialmente con H₂O (2 x 5 mL), una disolución saturada de NaHCO₃ (5 mL) y finalmente con H₂O (5 mL). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida obteniendo **S2a** (63.1 mg) y **S3a** (87.0 mg, 99%).

*Datos físicos y espectroscópicos para el compuesto forbol-13-fenilacetato-20-tritilo (**S2a**) (67% Rto) consistentes los descritos en la literatura (Appendino, G., Cravotto, G., Palmisano, G. Synthesis and biological evaluation of phorbol-resiniferatoxin (RTX) hybrids. European J. Org. Chem. 2004, 3413–3421).*

*Datos físicos y espectroscópicos para el compuesto forbol-13-isobutirato-20-tritilo (**S3a**) (99% Rto):* Sólido blanco amorfo; $[\alpha]_D^{20} +0,7$ (c=4,7 mg/mL, CH₃OH); IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$: 3411, 3059, 2977, 2927, 2877, 1710, 1448, 1324, 1204, 1159, 1048, 992, 758, 706 cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CD₃OD) δ_{H} (ppm): 7.58 (1H, s ancho), 7.39 - 7.22 (10H, m), 5.54 (1H, d, 6.0 Hz), 3.87 (1H, d, 9.9 Hz), 3.56 (1H, d, 11.0 Hz), 3.49(1H, d, 11.0 Hz), 3.15 (1H, m), 2.63 (1H, sept, 7.0 Hz), 2.49 (2H, s), 2.04 (1H, dc, 9.9 y 6.6 Hz), 1.76 (3H, dd, 3.0 y 1.4 Hz), 1.24 (6H, s), 1.19 (3H, d, 7.0 Hz), 1.06 (3H, d, 6.6 Hz), 0.98 (3H, d, 5.3 Hz); RMN-¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ_{C} (ppm): 210.5 (s), 181.6 (s), 160.9 (s), 145.5 (3C, s), 140.3 (s), 134.2 (s), 131.3 (s), 129.8 (2C, d), 128.8 (6C, d), 128.1(d), 88.1 (s), 79.4 (s), 77.5 (d), 74.9 (s), 70.0 (t), 69.0 (s), 57.7 (d), 46.2 (d), 40.4 (d), 39.0 (t), 36.6 (d), 35.5 (d), 27.1 (s), 24.3 (q), 19.2 (q), 19.1 (q), 17.4 (q), 15.4 (q), 10.3(q); HRMS (ESI+): m/z calcd para C₄₃H₄₈O₇Na [M+Na]⁺ 699.3298, encontrada 699.3287.

Preparación de forbol-12,13-diacetato-20-tritilo (P-12,13-diAc-20T, **S5a**).

Una mezcla de forbol-20-tritilo (P-20T, **S1a**, 0.1 mmol) y piridina (2 gotas) en anhídrido acético (2 mL) se agitó durante 18 h a temperatura ambiente. Entonces, se añade ciclohexano (5 mL) y la mezcla de disolventes resultante se evapora a presión reducida, repitiendo este proceso tres veces, para dar forbol-12,13-diacetato-20-tritilo (P-12,13-diAc-20T, **S5a**, 99%).

Los datos espectroscópicos de forbol-12,13-diacetato-20-tritilo (S5a) son consistentes con los descritos en la literatura (Bertolini TM, Giorgione J, Harvey DF, Newton AC. Protein Kinase C Translocation by Modified Phorbol Esters with Functionalized Lipophilic Regions. *J Org Chem* 2003; **68**: 5028–5036.).

5

Preparación de forbol-12-isobutirato-13-fenilacetato-20-tritilo (P-12-iBu-13-PhAc-20T, S2b).

10 Partiendo de forbol-13-fenilacetato-20-tritilo (S2a) y empleando las condiciones arriba descritas para la preparación de S1a desde forbol-20-tritilo (1), se obtuvo, S2b.

15 *Datos físicos y espectroscópicos para el compuesto forbol-12-isobutirato-13-fenilacetato-20-tritilo (P-12-iBu-13-PhAc-20T, S2b)* (82% Rto.): Sólido blanco amorfo; $[\alpha]_D^{20} +28.5$ (c 1.5, CH₃OH); IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3414, 2976, 2924, 2878, 1715, 1626, 1469, 1269, 1218, 1154, 759, 705 cm⁻¹; RMN-¹H (CD₃OD, 500 MHz) δ_{H} (ppm): 7.54 (1H, dd, J= 2.4 y 1.4 Hz), 7.39-7.19 (20H, m), 5.51, (1H, d, J= 6.2 Hz), 5.46, (1H, d, J= 10.5 Hz), 3.66 (2H, s), 3.56, (1H, d, J= 11.0 Hz), 3.48, (1H, d, J= 11.0 Hz), 3.14, (2H, m), 2.56 (1H, sept, J= 7.0 Hz), 2.51-2.46 (2H, s), 2.21, (1H, dq, J= 10.5, 6.4 Hz), 1.73, (3H, d, J= 2.8 Hz), 1.23, (3H, s), 1.16, (3H, d, J= 7.0 Hz), 1.15, (3H, d, J= 7.0 Hz), 1.04, (3H, s), 0.98, (1H, d, J= 6.2 Hz), 0.87, (3H, d, J= 6.4 Hz); RMN-¹³C (CD₃OD, 125 MHz) δ_{C} (ppm): 210.2 (s), 178.6 (s), 175.7 (s), 160.3 (s), 145.5 (3C, s), 140.7 (s), 134.9 (s), 134.4 (s), 130.7 (2C, d), 130.6 (d), 129.8 (6C, d), 129.5 (2C, d), 128.8 (6C, d), 128.14 (d), 128.10 (3C, d), 88.1 (s), 79.5 (s), 78.1 (d), 74.8 (s), 69.8 (t), 67.4 (s), 57.4 (d), 44.3 (d), 42.1 (t), 40.3 (d), 38.8 (t), 36.9 (d), 35.4 (d), 27.5 (s), 24.0 (q), 19.4 (q), 19.2 (q), 17.4 (q), 14.7 (q), 10.2 (q); HRMS (ESI+): m/z calcd para C₅₁H₅₄O₈Na [M+Na]⁺ 817.3716, encontrada 817.3706.

35 Preparación de forbol-13-isobutirato-12-fenilacetato-20-tritilo (P-13-iBu-12-PhAc-20T, S3b).

Partiendo de forbol-13-isobutirato-20-tritilo (S3a) y empleando las condiciones arriba descritas para la preparación de S1a desde forbol-20-tritilo (1), se obtuvo, S3b

40

Datos físicos y espectroscópicos para el compuesto forbol-13-isobutirato-12-fenilacetato-20-tritilo (S3b) (73%). Sólido blanco amorfo; $[\alpha]_D^{20} + 26.3$ (c 3.1, CH₃OH); IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3330, 3059, 3022, 2972, 2917, 2872, 1706, 1447, 1348, 1251, 1157, 1049, 980, 702 cm⁻¹; RMN-¹H (CD₃OD, 500 MHz) δ_{H} (ppm): 7.53 (1H, dd, 2.6 y 1.4 Hz), 7.37-7.19 (20H, m), 5.52 (1H, d, 5.4 Hz), 5.4 (1H, d, 10.4 Hz), 3.64 (2H, s), 3.54 (1H, d, 11.1 Hz), 3.47 (1H, d,

50

11.1 Hz), 3.16 (1H, quint, 2.6 Hz), 3.12 (1H, t, 5.4 Hz), 2.53 (1H, sept, 7.0 Hz), 2.48 (2H, s), 2.18 (1H, dc, 10.4 y 6.4 Hz), 1.73 (3H, dd, 2.6 y 1.4 Hz), 1.12 (6H, d, 7.0 Hz), 1.08 (3H, sa), 1.05 (3H, sa), 1.00 (1H, d, 5.4 Hz), 0.84 (3H, d, 6.4 Hz); RMN-¹³C (CD₃OD, 125 MHz) δ_c (ppm): 210.2 (s), 173.3 (s), 160.3 (s), 145.4 (s), 140.6 (s), 135.8 (s), 134.4 (s), 130.7 (d), 130.2 (d), 129.8 (s), 129.6 (d), 128.8 (d), 128.1 (2C, d), 88.1 (s), 79.4 (s), 78.7 (d), 74.8 (s), 69.9 (t), 66.6 (s), 57.3 (d), 44.1 (d), 42.5 (t), 40.3 (d), 38.8 (t), 37.0 (d), 27.3 (s), 24.0 (c), 17.0 (c), 14.7 (c), 10.3 (c); HRMS (ESI⁺): *m/z* calcd para C₅₁H₅₄O₈Na [M+Na]⁺ 817.3716, encontrada 817.3705.

Preparación de forbol-13-isobutirato-12-tigliato-20-tritilo (P-13-iBu-12-PhAc-20T, **S6b**).

Partiendo de forbol-13-isobutirato-20-tritilo (**S3a**) y empleando las condiciones arriba descritas para la preparación de **S1a** desde forbol-20-tritilo (**1**), se obtuvo, **S6b**, pero empleando ácido tíglico, en lugar de ácido isobutírico.

*Datos físicos y espectroscópicos para el compuesto forbol-13-isobutirato-12-tigliato-20-tritilo (**S6b**) (47%).* Sólido blanco amorfo; $[\alpha]_D^{21} + 17.5$ (c 1.25, CH₃OH). IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3402, 2978, 2950, 1712, 1448, 1361, 1254, 1219, 1156, 1082, 770, 705 cm⁻¹. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ_H : 7.56 (dd, *J* = 2.6, 1.4 Hz, 1H), 7.41-7.37 (m, 6H), 7.30-7.21 (m, 9H), 6.85 (dq, *J* = 7.2, 1.4 Hz, 1H), 5.56 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 5.48 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H), 3.58 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 3.50 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 3.20 (m, 2H), 2.57 (sept, *J* = 7.0 Hz, 1H), 2.51 (s, 2H), 2.26 (dq, *J* = 10.4, 6.4 Hz, 1H), 1.83 (m, 3H), 1.80 (m, 3H), 1.75 (dd, *J* = 2.6, 1.4 Hz, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.17 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.15 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.08 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 0.87 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H). ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ_c : 210.0 (s), 180.7 (s), 169.1 (s), 160.2 (d), 145.3 (3C, s), 140.5 (s), 138.8 (d), 134.2 (s), 130.6 (d), 129.6 (6C, d), 129.4 (d), 128.6 (6C, d), 127.9 (3C, d), 87.9 (s), 79.3 (s), 78.0 (d), 74.7 (s), 69.7 (t), 66.6 (s), 57.1 (d), 44.3 (d), 40.2 (d), 38.7 (t), 36.9 (d), 35.2 (d), 27.1 (s), 23.9 (c), 18.80 (c), 18.79 (c), 17.3 (c), 14.5 (c), 14.2 (c), 12.1 (c), 10.0 (c); HRMS (ESI): *m/z* calcd para C₄₈H₅₄O₈Na [M+Na]⁺ 781.3716, encontrada 781.3712.

Procedimiento general para la desprotección del éter tritilo en la posición C-20. Preparación de forbol-12,13-diisobutirato(P-12,13-diiBu, **S1**), forbol-12-isobutirato-13-fenilacetato (P-12-iBu-13-PhAc-20T, **S2**), forbol-13-isobutirato-12-fenilacetato-20-tritilo (P-13-iBu-12-iBu, **S3**), forbol-12,13-difenilacetato (P-12,13-diPhAc, **S4**), forbol-12,13-diacetato (P-12,13-diAc, **S5**), forbol-13-isobutirato-12-tigliato (P-13-iBu-12-Tig, **S6**), y de forbol-13-isobutirato (P-13-iBu, **S7**).

HClO₄ (0.01 M en MeOH, 1 mL, 0.01 mmol) se añadió a una solución del correspondiente forbol (**S1a, S3a S4a, S5a, S2b, S3b, S6b**) (0.05 mmol) en MeOH (1 mL). Una vez finalizada la reacción, se añadió AcONa hasta pH= 7. El disolvente fue evaporado bajo presión reducida y el crudo obtenido fue purificado en columna de sílica gel eluyendo con mezclas Hexano:AcOEt (50:50) obteniéndose los correspondientes diésteres de forbol **S1-S6** y P-13-iBu (**S7**)

*Datos físicos y espectroscópicos para el compuesto forbol-12,13-diisobutirato (**S1**) (87% Rto.):* Sólido blanco amorfo; $[\alpha]_D^{21} + 19.1$ (c 2.2, CHCl₃); IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3405, 2975, 2926, 2878, 1712, 1469, 1389, 1275, 1160, 1080, 978, 754 cm⁻¹; RMN-¹H (CD₃OD, 500 MHz) δ_H (ppm): 7.54 (1H, s ancho), 5.62 (1H, d, 5.6 Hz), 5.41(1H, d, 10.2 Hz), 3.96 (1H, d, 13.2 Hz), 3.91 (1H, d, 13.2 Hz), 3.30 (1H,m), 3.16 (1H, quint, 2.8 Hz), 2.56 (2H, m), 2.52 (1H, m), 2.48 (1H, d, 19.0 Hz), 2.23 (1H, dc, 10.2 y 6.8 Hz), 1.73 (3H, s ancho), 1.27 (3H, s), 1.22 (3H, s), 1,16 (12H, m), 1.10 (1H, d, 5.6 Hz), 0,88 (3H, d, 6.6 Hz); RMN-¹³C (CD₃OD, 125 MHz) δ_C (ppm): 210.3 (s), 180.7 (s), 178,5 (s), 160.5 (s), 142.8 (s), 134.6 (s), 129.3 (d), 79.8 (s), 78.1 (s), 74.7 (s), 68.0 (t), 66.8 (d), 57.3 (d), 44.3 (d), 40.0 (d), 38.5 (t), 37.3 (d), 35.5 (2C, d), 27.3 (s), 24.2 (c), 19.4 (c), 19.2(c), 19.0 (c), 18.9 (c), 17.5 (c), 14.8 (c), 10.2 (c); HRMS (ESI): m/z calcd para C₂₈H₃₉O₈ [M-H]⁻, 503.2645; encontrada 503.2641.

*Datos físicos y espectroscópicos para el compuesto forbol-12-isobutirato-13-fenilacetato (**S2**) (52% Rto.):* Sólido blanco amorfo; $[\alpha]_D^{21} + 12.8$ (c 0.4, CHCl₃); IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3430, 2924, 2854, 1710, 1457, 1376, 787 cm⁻¹; RMN-¹H (CD₃OD, 400 MHz) δ_H (ppm): 7.53 (1H, br s), 7.32-7.22 (5H, m), 5.58 (1H, d, 5.7 Hz), 5.47 (1H, d, 10.4 Hz), 3.94 (1H, d, 13.2 Hz), 3.89 (1H, d, 13.2 Hz), 3.67 (2H, s), 3.26 (1H, t, 5.7 Hz), 3.14 (1H, quint, 3.0 Hz), 2.56 (1H, sept, 7.0 Hz), 2.52 (1H, d, 19.0 Hz), 2.46 (1H, d, 19.0 Hz), 2.21 (1H, dq, 10.4 y 6.4 Hz), 1.73 (3H, dd, 3.0, 1.3 Hz), 1.23 (3H, s), 1.16 (3H, d, 7.0 Hz), 1.15 (3H, d, 7.0 Hz) 1.04 (1H, d, 5.7 Hz), 1.03 (3H, s), 0.88 (3H, d, 6.4 Hz); RMN-¹³C (CD₃OD, 100 MHz) δ_C : 210.3 (s), 178.7 (s), 175.7 (s), 160.5 (d), 142.9 (s), 134.9 (s), 134.6 (s), 130.7 (2C, d), 129.5 (2C, d), 129.2 (d), 128.2 (d), 79.8 (s), 78.2 (d), 74.7 (s), 67.9 (t), 67.4 (s), 57.3 (d), 44.3 (d), 42.1 (t), 40.0 (d), 38.4 (t), 37.1 (d), 35.5 (d), 27.5 (s), 24.0 (q), 19.4 (q), 19.2 (q), 17.4 (q), 14.8 (q), 10.2 (q); HRMS (ESI): m/z calcd para C₃₂H₃₉O₈ [M-H]⁻ 551.2645, encontrada 551.2631.

Datos físicos y espectroscópicos para el compuesto forbol-13-isobutirato-12-fenilacetato (S3) (75% Rto.): Sólido blanco amorfo; $[\alpha]_D^{21} + 10.0$ (c 5.1, CHCl₃); IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3402, 2980, 2926, 2880, 1713, 1497, 1391, 1251, 1161, 988, 757 cm⁻¹; RMN-¹H (CD₃OD, 400 MHz) δ_{H} (ppm): 7.52 (1H, dd, 2.6 y 1.4 Hz), 7.34-7.23 (5H, m), 5.58 (1H, d, 5.7 Hz), 5.39 (1H, d, 10.4 Hz), 3.94 (1H, d, 13.0 Hz), 3.89 (1H, d, 13.0 Hz), 3.65 (2H, s), 3.24 (1H, t, 5.7 Hz), 3.13 (1H, quint, 2.6 Hz), 2.53 (1H, sept, 7.0 Hz), 2.49 (2H, s), 2.17 (1H, dc, 10.4 y 6.5 Hz), 1.72 (3H, dd, 2.6 y 1.4 Hz), 1.12 (3H, d, 7.0 Hz), 1.11 (3H, d, 7.0 Hz), 1.03 (1H, d, 5.7 Hz), 1.03 (3H, s), 1.07 (3H, s), 0.84 (3H, d, 6.5 Hz); RMN-¹³C (CD₃OD, 125 MHz) δ_{C} (ppm): 210.2 (s), 180.7 (s), 173.4 (s), 160.5 (d), 142.8 (s), 135.8 (s), 134.5 (s), 130.2 (2C, d), 129.6 (2C, d), 129.2 (d), 128.1 (d), 79.8 (s), 78.8 (d), 74.7 (s), 67.9 (t), 66.7 (s), 57.2 (d), 44.2 (d), 42.5 (t), 40.0 (d), 37.2 (d), 35.5 (d), 27.3 (s), 24.0 (c), 19.0 (c), 18.9 (c), 17.1 (c), 14.7 (c), 10.2 (c); HRMS (ESI+): *m/z* calcd para C₃₂H₃₀O₈Na [M+Na]⁺ 575.2621, encontrada 575.2639.

Datos físicos y espectroscópicos para el compuesto forbol 12,13-difenilacetato (S4) (90%): Sólido blanco amorfo; $[\alpha]_D^{21} + 24.2$ (c 7.0, CHCl₃). IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3415, 2924, 2854, 1710, 1628, 1455, 1330, 1076, 998, 751 cm⁻¹. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ_{H} : 7.51 (dd, *J* = 2.6, 1.4 Hz, 1H), 7.34 - 7.21 (m, 10H), 5.54 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 5.45 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H), 3.92 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H), 3.89 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H), 3.65 (s, 4H), 3.20 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 3.11 (quint, *J* = 2.6 Hz, 1H), 2.47 (d, *J* = 19.0 Hz, 1H), 2.44 (d, *J* = 19.0 Hz, 1H), 2.14 (dq, *J* = 10.4, 6.6 Hz, 1H), 1.72 (dd, *J* = 2.6, 1.4 Hz, 3H), 0.98 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 0.96 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.84 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H). ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ_{C} : 210.3 (s), 175.7 (s), 173.5 (s), 160.5 (d), 142.8 (s), 135.8 (s), 134.8 (s), 134.6 (s), 130.7 (2C,d), 130.3 (2C,d), 129.6 (2C, d), 129.5 (2C, d), 129.2 (d), 128.2 (d), 128.1 (d), 79.8 (s), 78.9 (d), 74.7 (s), 67.9 (t), 67.3 (s), 57.3 (d), 44.2 (d), 42.5 (t), 42.2(t), 39.9 (d), 38.4 (d), 37.1 (d), 27.5 (s), 23.8 (c), 17.0 (c), 14.7 (c), 10.2 (c); HRMS (ESI+): *m/z* calcd para C₃₆H₄₀O₈Na [M+Na]⁺ 623.2621, encontrada 623.2616.

Datos físicos y espectroscópicos para el compuesto forbol-12,13-diacetato (S5) (99%): son consistentes con los descritos en la literatura (Szczepanski, C. V, Schairer, H.-U., Gschwendt, M. & Hecker, E. Zur Chemie des Phorbols, III. Mono- und Diacetate des Phorbols. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1967**, 705, 199–210).

Datos físicos y espectroscópicos para el compuesto forbol-13-isobutirato-12-tigliato (S6) (79%): son consistentes con los descritos en la literatura, a) Marshall, G. T. & Kinghorn, A. D. Short-chain phorbol ester constituents of croton oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1984**, *61*, 1220–1225. b) Zhang, X.-L., Wang, L., Li, F., Yu, K. & Wang, M.-K. Cytotoxic Phorbol Esters of Croton tiglium. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 858–864).

Datos físicos y espectroscópicos para el compuesto forbol-13-isobutirato (S7) (número de registro CAS: 1349561-94-9) (84% Rto.): Sólido blanco amorfo; $[\alpha]_D^{21} + 48.4$ (c 2.0, CHCl₃); IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3414, 2924, 2854, 1638, 1491, 1329, 1291, 1159, 1015, 792 cm⁻¹; RMN-¹H (CD₃OD, 400 MHz) δ_{H} (ppm): 7.56 (1H, m), 5.59 (1H, d, 5.7 Hz), 3.95 (1H, d, 13.0 Hz), 3.91 (1H, d, 13.0 Hz), 3.86 (1H, d, 10.2 Hz), 3.26 (1H, t, 5.7 Hz), 3.12 (1H, m), 2.62 (1H, sept, 7.0 Hz), 2.52 (1H, d, 12.0 Hz), 2.45 (1H, d, 12.0 Hz), 2.02 (1H, dc, 10.2, 6.5 Hz), 1.74 (3H, m), 1.23 (3H, s), 1.22 (3H, s), 1.19 (3H, d, 7.0 Hz), 1.18 (3H, d, 7.0 Hz), 1.06 (3H, d, 6.5 Hz), 1.01 (1H, s, 5.7 Hz); RMN-¹³C (CD₃OD, 100 MHz) δ_{C} (ppm): 210.5 (s), 181.6 (s), 161.0 (d), 142.5 (s), 134.4 (s), 129.9 (d), 79.7 (s), 77.6 (d), 74.8 (s), 69.0 (s), 68.1 (t), 57.7 (d), 46.2(d), 40.1 (d), 38.6 (t), 36.8 (d), 35.5 (d), 27.2 (s), 24.2 (c), 19.2 (c), 19.1(c), 17.5 (c), 15.5 (c), 10.2 (c); HRMS (ESI+): m/z calcd para C₂₄H₃₄O₇Na [M+Na]⁺ 457.2202, encontrada 457.2200.

EJEMPLO 4. Obtención de los diésteres de 12-desoxi-16-hidroxiforbol (N1-N4)

Los compuestos N1-N4 fueron obtenidos por aislamiento y purificación a partir del látex de *Euphorbia resinifera* colectada en Demnate, Beni Mellal-Khenifera province (Marruecos), en noviembre de 2016.

La obtención de los productos se realizó a partir del extracto metanólico del látex de la planta que fue sometido a un fraccionamiento posterior mediante cromatografía en columna de gel de sílice controlando mediante cromatografía en capa fina, lo que condujo a la obtención de seis fracciones (FR1-FR6). La fracción FR4 fue fraccionada nuevamente mediante cromatografía en columna de gel de sílice obteniendo 4 sub-fracciones (FR4-1 a FR4-4) y esta última (FR4-4) fue purificada mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) lo que condujo a la obtención de 4 productos (N1-N4, Figura 2) que fueron identificados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

Datos físicos y espectroscópicos para el compuesto 12-desoxi-16-hidroxi-forbol-16-isobutirato-13-fenilacetato (DPPI, **N1**): Sólido blanco amorfo; $[\alpha]_D^{24} +9.61$ (c 0.08, CD₃OD); IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3416, 1712, 1633, 1100 cm⁻¹; RMN-¹H (CD₃OD) δ_{H} (ppm): 7.53 (1H, m), 7.31-7.23 (5H, m), 5.56 (1H, d, 5.9 Hz), 4.05 (1H, d, 11.4 Hz), 3.93 (1H, d 12.9 Hz), 3.87 (1H, d, 12.9Hz), 3.85 (1H, d, 11.4 Hz), 3.63 (2H, s), 3.16 (1H, t, 2.9 Hz), 3.08 (1H, t, 5.7 Hz), 2.53 (1H, sp, 7.0 Hz), 2.50 (1H, d, 19.0 Hz), 2.42 (1H, d, 19.0 Hz), 2.13 (1H, dd 7.0, 14.8 Hz), 2.02 (1H, dt, 11, 6.8 Hz), 1.73 (3H, dd, 3.0, 1.4 Hz), 1.57 (1H, dd, 11.0, 14.8 Hz), 1.15 (3H, d 7.0 Hz), 1.14 (3H, d 7.0 Hz), 1.12 (1H, d, 5.7 Hz), 1.13 (3H, s), 0.84 (3H, d, 6.6 Hz); RMN-¹³C (CD₃OD) δ_{C} (ppm):): 210.5 (s), 178.6 (s), 175.23 (s), 160.8 (d), 142.4 (s), 130.4 (d), 135.0 (s), 134.9 (s), 129.9 (d), 128.3 (d), 77.6 (s), 74.7 (s), 70.2 (t), 68.2 (t), 65.1 (s), 57.2 (d), 42.3 (d), 39.3 (d), 38.6 (t), 37.4 (d), 35.2 (d), 33.0 (t), 31.6 (c), 31.5 (d), 28.3 (s), 19.4 (c), 18.9 (c), 11.7 (c), 10.2 (c); HRMS (ESI+): m/z calcd. para C₃₂H₄₀O₈Na [M + Na]⁺ 575.2621, encontrada 575.2621.

Datos físicos y espectroscópicos para el compuesto 12-desoxi-16-hidroxi-forbol-16-tigliato-13-fenilacetato (DPPT, **N2**): Sólido blanco amorfo; $[\alpha]_D^{24} + 18.52$ (c 0.14, CD₃OD); IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3416, 2923, 1705, 1269 cm⁻¹; RMN-¹H (CD₃OD) δ_{H} (ppm): 7.53 (1H, bs), 7.32-7.19 (5H, m), 6.84 (1, q, 6.8 z), 5.58 (1H, d, 5.6 Hz), 4.14 (1H, d, 11.4 Hz), 3.94 (1H, d 12.9 Hz), 3.84 (1H, d, 12.9Hz), 3.84 (1H, d, 11.4 Hz), 3.62 (2H, s), 3.16 (1H, t, 2.7 Hz), 3.10 (1H, t, 5.7 Hz), 2.51 (1H, d, 19.0 Hz), 2.42 (1H, d, 19.0 Hz), 2.14 (1H, dd 7.0, 15.0 Hz), 2.04 (1H, m), 1.74 (3H, d, 2.8 Hz), 1.57 (1H, dd, 11.0, 15.0 Hz), 1.82 (3H, s) 1.81 (3H, d, superpuesto con H3-4") 1.16 (3H, d, 5.6 Hz), 1.14 (3H, s), 0.89 (3H, d, 6.6 Hz); RMN-¹³C (CD₃OD) δ_{C} (ppm): 210.5 (s), 178.6 (s), 175.1 (s), 160.8 (d), 169.5 (s), 142.4 (s), 138.8 (d), 134.9 (s), 134.6 (s), 130.4 (d), 129.7 (s), 129.6 (d), 128.2 (d), 77.7 (s), 74.7 (s), 70.5 (t), 68.3 (t), 65.2 (s), 57.2 (d), 42.4 (d), 39.3 (d), 38.6 (t), 37.4 (d), 33.1 (t), 31.5 (c), 28.3 (s), 18.9 (c), 14.4 (c), 12.2 (c), 11.8 (c), 10.2 (c); HRMS (ESI+): m/z calcd. para C₃₃H₄₀O₈Na [M + Na]⁺ 587.2621, encontrada 587.2662.

Los datos físicos y espectroscópicos de los compuestos **N3** y **N4** son consistentes con los compuestos 12-desoxi-16-hidroxi-forbol-13,16-difenilacetato (DP-13,16-diPhAc, **N3**) y 12-desoxi-16-hidroxi-forbol-16-benzoato-13-fenilacetato (DP-13-PhAc-16-Bz, **N4**) (Hergenbahn, M., Kusumoto, S. & Hecker, E. On the active principles of the spurge family (Euphorbiaceae). *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1984**, *108*, 98–109)

50

EJEMPLO 5. Efecto de los compuestos de las estructuras P-12,13-diiBu (S1), P-12-iBu-13-PhAc (S2), P-13-iBu-12-PhAc (S3) sobre la secreción de TGF α

Se ha comprobado el efecto de los compuestos P-12,13-diiBu (S1), P-12-iBu-13-PhAc (S2), P-13-iBu-12-PhAc (S3) sobre la secreción de TGF α . Para ello se ha construido un cDNA que
5 codifica una proteína recombinante en la que TGF α está flanqueado por la proteína roja fluorescente mCherry y por la proteína verde fluorescente EGFP en los extremos N- y C-terminal respectivamente.

10 Para ello, el cDNA que codifica la isoforma de la pro-TGF α humana (TGFA, secuencia de referencia del NCBI: NM_003236.4), que contiene el cDNA de mCherry entre los nucleótidos 126 y 127 del cDNA de TGFA fue clonado en el vector pEGFP-N1 para añadir el cDNA de la proteína
15 verde fluorescente GFP al final del extremo 3'. La construcción fue diseñada en nuestro laboratorio y sintetizada por GeneCust (Boynes, Francia) para generar la construcción mCherry-TGF α -GFP que contiene el cDNA. Esta construcción se transfectó en células HEK293T como se explica a continuación. Las células HEK293T se obtuvieron de ATCC (Manassas, VA, USA). Se
20 cultivaron en medio DMEM a 37 °C y 5% de CO₂ (Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA), complementadas con suero bovino fetal (10%), 1× GlutaMATM-I (Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA) y penicilina/estreptomicina (1%). Para la transfección, las células se
25 pasaron, se sembraron y se dejaron adherir durante 24 h. La transfección se realizó mediante lipofectamina 2000 (Invitrogen; Carlsbad, CA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después, se cambió el medio para eliminar la lipofectamina. Tras una incubación (Thermo Fisher Scientific) libre de suero que contiene 1% P/S, 0.25% de albúmina de suero bovino (BSA), y 1×
30 GlutaMAXTM-I. Posteriormente se realizaron los experimentos de microscopía de fluorescencia en vivo y en tiempo real. Se realizaron controles para asegurarnos de que la ausencia de suero durante 3.5 h no afectaba a la viabilidad de las células. Los porcentajes de células viables
35 transfectadas con o sin suero fueron 95.12 ± 0.73 vs 94.97 ± 0.5 respectivamente; lo que indica que la privación de suero durante 3.5 h no ejercía un efecto sobre la viabilidad celular. Seguidamente, las células HEK293T transfectadas se colocaron en placas de 35 mm de alto
40 (Ibidi, Munich, Alemania) y se trataron con EOF2 o inhibidores, como se describe en los resultados y en los pies de figuras. Los ensayos de microscopía en tiempo real se realizaron con un microscopio invertido Zeiss Axio Observer.Z1, utilizando un objetivo con una lente aérea plan-
45 Las imágenes capturadas se procesaron con el software ZEN lite y la eficiencia de la escisión de

TGF α se determinó analizando la intensidad de la fluorescencia mCherry/GFP en todas las áreas celulares. Las proporciones de mCherry/GFP se calcularon y normalizaron con respecto a la media medida antes de la estimulación con los compuestos indicados utilizando el software Microsoft Excel. Las imágenes ratiométricas se construyeron utilizando el software ImageJ, después de la sustracción del fondo, la imagen mCherry/GFP se calculó dividiendo el canal mCherry por el canal GFP. Para cada píxel, se utiliza una escala de pseudocolores para codificar la tasa de fluorescencia mCherry/GFP.

En la figura 1 se puede ver un esquema de la construcción realizada y en el panel derecho, se ha representado la tasa de fluorescencia mCherry/GFP en cultivos mediante una escala de grises de células HEK293T a las que se ha añadido suero salino (\emptyset) o los compuestos **S1**, **S2** y **S3** tal como se indica en la figura. Puede verse como en presencia de los compuestos P-12,13-diiBu (**S1**), P-12-iBu-13-PhAc (**S2**) y P-13-iBu-12-PhAc (**S3**) la tasa de fluorescencia mCherry/GFP disminuye indicando que la proteína m-Cherry está siendo liberada al medio extracelular junto con el segmento soluble de TGF α .

EJEMPLO 6. El efecto sobre la secreción de TGF α de otros compuestos estructuralmente relacionados con los del ejemplo 5.

Se analizó el efecto de otros compuestos sobre la secreción de TGF α . En concreto, se adicionaron, los compuestos P-12,13-diPhAc (**S4**), P-12,13-diAc (**S5**), P-13-iBu-12-Tig (**S6**), DPPI (**N1**), DPPT (**N2**), y DP-13,16-diPhAc (**N3**) a células transfectadas con la construcción arriba indicada percibiéndose un cambio en la tasa mCherry/GFP. A pesar de que el efecto de todos ellos era algo menor que el de los descritos en el ejemplo 5 en todos los casos se observaba una reducción de la tasa mCherry/GFP indicando que en todos los casos había una facilitación de la secreción de TGF α cuando se administraba el compuesto a los cultivos (ver Figura 2).

EJEMPLO 7. Efecto de forbol y de determinados compuestos relacionados, sin grupo éster en C-12, sobre la secreción de TGF α .

Utilizando el mismo procedimiento descrito en el ejemplo 5 o 6, se analizó la capacidad del forbol, forbol 13-isobutirato (**S7**) y DP-13PhAc-16-Bz (**N4**) (ver estructuras en la figura 3.1).

Como se puede observar en la figura 3.2 en presencia de forbol o de forbol-13-isobutirato (**S7**) o DP-13PhAc-16-Bz (**N4**), la tasa de fluorescencia mCherry/GFP en células HEK293T transfectadas con la construcción mChery- TGF α -EGFP, no se ve modificada, indicando que

esta modificación del forbol resulta en un compuesto que no ejerce ningún efecto sobre la escisión de TGF α .

Por lo tanto, el grupo éster en C-12 resulta fundamental para inducir la secreción de TGF α .

5 **EJEMPLO 8. Efecto de P-12,13-diiBu (S1) sobre la proliferación de precursores neurales en cultivo.**

10 Se ha investigado la actividad biológica del compuesto P-12,13-diiBu (S1) sobre la proliferación células madre neurales extraídas de la zona subventricular de ratones postnatales de 7 días.

15 Para ello las paredes laterales de los ventrículos laterales de la zona subventricular de ratones posnatales de 7 días (P7), fueron extraídas y disociadas enzimáticamente en líquido cefalorraquídeo (Ca₂ bajo Mg₂ alto: 5 mM KCl, 124 mM NaCl, 3.2 mM MgCl₂, 100 μ M CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, and 10 mM glucosa) suplementado con 1 mg/ml de tripsina y 0.2 mg/ml de ácido quinurénico calentado previamente a 37°C durante 15 minutos. Se incubó a 37° en estufa 13
20 minutos. El tejido fue centrifugado a 9.000 r.p.m 5 minutos y resuspendido en LCR normal (5 mM KCl, 124 mM NaCl, 1.3 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, y 10 mM glucosa). Fue incubado en estufa 5 minutos y centrifugado en las mismas condiciones. Luego, las células fueron resuspendidas en Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F-12 (1:1) suplementado con 0.7
25 mg/ml de ovomucoide y disgregadas mecánicamente con una pipeta Pasteur con el diámetro reducido a la mitad. Después fueron centrifugadas nuevamente y resuspendidas en 6 ml de medio definido de neuroesferas (45ml de (DMEM)/F-12, 900 μ L de B₂₇, 2mM L-glutamina y 2 μ g/ml de
30 gentamicina) suplementado con 6 μ L de EGF 20ng/ml y bFGF 10ng/ml, y mantenido a 37° en atmósfera con 5% CO₂. Después de 1–2 días, los agregados celulares que se forman son lo que llamamos neuroesferas. Los subcultivos fueron pasados cada 3-4 días por centrifugación de
35 neuroesferas y disociación mecánica de las células en 1 ml de medio definido de neuroesferas; después la suspensión de células fue cultivada en nuevos flaks con medio fresco para obtener nuevas neuroesferas. Los experimentos se llevaron a cabo entre los pases 3 y 5.

40 Una vez obtenidas las neuroesferas se analizó el efecto de P-12,13-diiBu (S1) sobre las células madre neurales a distintas concentraciones. Para ello las neuroesferas fueron centrifugadas y las células fueron resuspendidas y disgregadas en medio definido de neuroesferas y sembradas 20
45 células / μ L a la que se le añadió el factor de crecimiento bFGF (10 ng/mL). P-12,13-diiBu se añadió al mismo tiempo poniendo en cada pocillo una concentración diferente. Se analizaron las diferentes concentraciones por triplicado. Los experimentos se llevaron a cabo de modo que la

50

persona que toma las imágenes y realiza la cuantificación no conoce las condiciones de cada uno de los cultivos. El número de nuevas neuroesferas formadas fue contada 72h después en el microscopio invertido y de contraste de fase Olympus IX70. Para medir el área de las neuroesferas se obtuvieron imágenes de 50 neuroesferas por pocillo y se analizaron empleando el sistema de análisis Image J.

Se observó cómo el área de las neuroesferas aumentaba en los cultivos tratados con P-12,13-diiBu (**S1**) de manera dosis-dependiente hasta la concentración de 100 nM, apoyando la hipótesis de que el incremento en el tamaño de las neuroesferas se debía a una estimulación de la proliferación celular (Figura 6). No se observó muerte celular inducida por P-12,13-diiBu.

EJEMPLO 9. Efecto de P-12,13-diAc (**S5**) sobre la proliferación de precursores neurales en cultivo

De igual manera, en ensayos similares se analizó el efecto del P-12,13-diAc (**S5**) (con capacidad para inducir la secreción de TGF α) sobre la proliferación de cultivos de células madre neurales utilizando la técnica descrita en el ejemplo anterior. Se observó cómo el área de las neuroesferas aumentaba en los cultivos tratados con P-12,13-diAc (**S5**) a la concentración de 5 μ M. El incremento en el tamaño de las neuroesferas apoya la hipótesis de que el incremento en el tamaño de las neuroesferas se debía a una estimulación de la proliferación celular (Figura 5). No se observó muerte celular inducida por P-12,13-diAc (**S5**). El efecto proliferativo de este compuesto no es muy potente, y se relaciona con la baja estimulación de la secreción de TGF α .

EJEMPLO 10. Efecto de DPPI (**N1**) sobre la proliferación de precursores neurales en cultivo

De igual manera, en ensayos similares se analizó el efecto del DPPI (**N1**) (con capacidad para inducir la secreción de TGF α) sobre la proliferación de cultivos de células madre neurales utilizando la técnica descrita en el ejemplo anterior. Se observó cómo el área de las neuroesferas aumentaba en los cultivos tratados con DPPI (**N1**) de forma dependiente de dosis desde 10 nM hasta 5 μ M (Figura 6). El incremento en el tamaño de las neuroesferas apoyando la hipótesis de que el incremento en el tamaño de las neuroesferas se debía a una estimulación de la proliferación celular. No se observó muerte celular inducida por DPPI (**N1**). El efecto proliferativo de este compuesto es muy potente, y se relaciona con la estimulación de la secreción de TGF α .

EJEMPLO 11. Efecto de forbol sobre la proliferación de precursores neurales en cultivo.

De igual manera, en ensayos similares se analizó el efecto del forbol (sin capacidad para inducir la secreción de TGF α) sobre la proliferación de cultivos de células madre neurales utilizando la técnica descrita en el ejemplo anterior. Podemos observar como en presencia de diferentes
5 concentraciones de forbol, el área y el número de las neuroesferas no varía, indicando que el forbol no induce tampoco la proliferación de las células madre neurales en cultivo (Figura 7).

EJEMPLO 12: La administración por vía intranasal del compuesto P-12,13-diAc (**S5**) durante 7
10 días promueve la neurogénesis en el cerebro de ratón adulto

Para determinar si este tipo de compuestos ejercían un efecto neurogénico *in vivo* en el cerebro de ratón adulto, se administró una dosis diaria de 12 μ L de una solución 5 μ M del compuesto S5
15 durante 7 días por vía intranasal, a ratones de dos meses de edad. Los ratones recibieron inyecciones del análogo de timidina BrdU cada dos días a lo largo del tratamiento. La incorporación de BrdU a las células permite determinar aquellas que han proliferado durante la
20 duración del tratamiento. Al cabo de los 7 días el cerebro se perfundió, y se obtuvieron secciones de 30 μ M de grosor. Se detectaron mediante inmunohistoquímica los marcadores BrdU (células proliferantes) y el marcador de neuroblastos doblecortina (DCX) en las secciones
25 correspondientes a la zona subventricular. Como puede verse en la figura 8, el tratamiento induce un aumento en el número de células proliferantes y en el número de progenitores neuronales (neuroblastos DCX⁺). Estos resultados indican que el compuesto P-12,13-diAc (**S5**), que previamente había estimulado la secreción de TGF α y la proliferación *in vitro*, también facilitan la
30 neurogénesis en el cerebro de ratón cuando es administrado por vía intranasal.

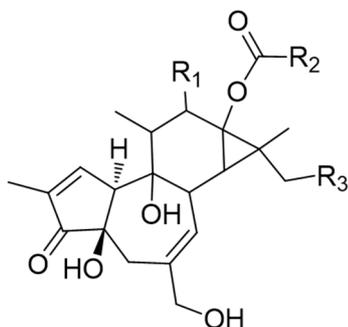
EJEMPLO 13: La administración por vía intranasal del compuesto P-12,13-diiBu (**S1**) durante 7
35 días promueve la neurogénesis en el cerebro de ratón adulto

Para determinar si este tipo de compuestos ejercían un efecto neurogénico *in vivo* en el cerebro de ratón adulto, se administró una dosis diaria de 12 μ L de una solución 10 nM del compuesto
40 **S1** durante 7 días por vía intranasal, a ratones de dos meses de edad. Los ratones recibieron inyecciones del análogo de timidina BrdU cada dos días a lo largo del tratamiento. La incorporación de BrdU a las células permite determinar aquellas que han proliferado durante la
45 duración del tratamiento. Al cabo de los 7 días el cerebro se perfundió, y se obtuvieron secciones de 30 μ M de grosor. Se detectaron mediante inmunohistoquímica los marcadores BrdU (células proliferantes) y el marcador de neuroblastos doblecortina (DCX) en las secciones
50 correspondientes a la zona subventricular. Como puede verse en la figura 9, el tratamiento induce

5 un aumento en el número de células proliferantes y en el número de progenitores neuronales (neuroblastos DCX⁺). Estos resultados indican que el compuesto P-12,13-diiBu (**S1**), que previamente había estimulado la secreción de TGF α y la proliferación in vitro, también facilitan la neurogénesis en el cerebro de ratón cuando es administrado por vía intranasal.

REIVINDICACIONES

1. Uso *in vitro* de una composición que comprende un compuesto de fórmula I o cualquier sal o isómero del mismo:



Formula I

5 donde

10 R1 = OCOCH₃, OCOCH₂CH₃, OCOCH₂CH₂CH₃, OCOCH(CH₃)₂, OCOCH=CHCH₃,
OCOC(CH₃)=CH₂, OCOCH₂CH₂CH₂CH₃, OCOCH₂CH(CH₃)₂, OCOC(CH₃)₃,
OCOCH=CHCH₂CH₃, OCOCH₂CH=CHCH₃, OCOCH₂CH₂CH=CH₂,
OCOC(CH₃)=CHCH₃, OCOCH(CH₃)CH=CH₂, OCOC(CH₂CH₃)=CH₂, OCOCH₂Ph;

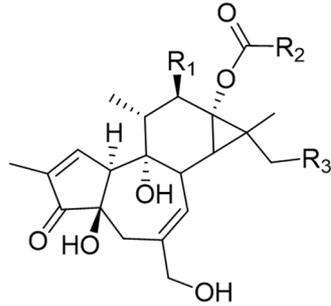
15 R2 = CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, CH(CH₃)₂, CH=CHCH₃, C(CH₃)=CH₂,
CH₂CH₂CH₂CH₃, CH₂CH(CH₃)₂, C(CH₃)₃, CH=CHCH₂CH₃, CH₂CH=CHCH₃,
CH₂CH₂CH=CH₂, C(CH₃)=CHCH₃, CH(CH₃)CH=CH₂, C(CH₂CH₃)=CH₂, CH₂Ph;

20 R3 = H, OCOCH₃, OCOCH₂CH₃, OCOCH₂CH₂CH₃, OCOCH(CH₃)₂, OCOCH=CHCH₃,
OCOC(CH₃)=CH₂, OCOCH₂CH₂CH₂CH₃, OCOCH₂CH(CH₃)₂, OCOC(CH₃)₃,
OCOCH=CHCH₂CH₃, OCOCH₂CH=CHCH₃, OCOCH₂CH₂CH=CH₂,
25 OCOC(CH₃)=CHCH₃, OCOCH(CH₃)CH=CH₂, OCOC(CH₂CH₃)=CH₂, OCOCH₂Ph;

y donde R₁, R₂ y R₃ se seleccionan, de manera independiente, de la lista arriba indicada, para favorecer la proliferación de precursores neurales o células madre neurales en cultivo.

30

2. Uso *in vitro* de una composición que comprende un compuesto de fórmula II o cualquier sal del mismo:



Formula II

5 donde

R1 = OCOCH₃, OCOCH₂CH₃, OCOCH(CH₃)₂, OCOC(CH₃)=CH₂,
OCOC(CH₃)=CHCH₃, OCOCH₂Ph;

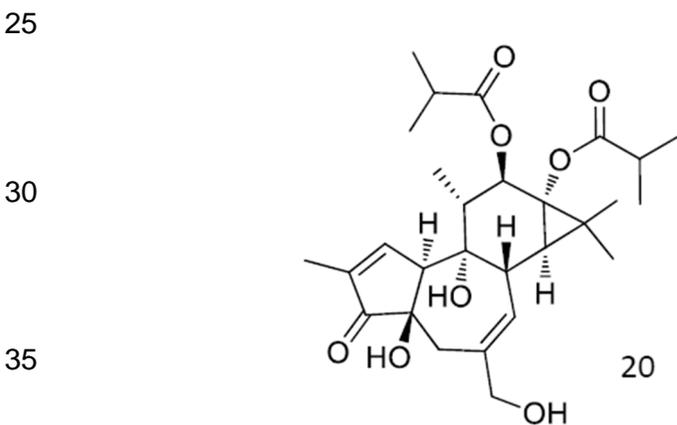
10 R2 = CH₃, CH₂CH₃, CH(CH₃)₂, C(CH₃)=CH₂, C(CH₃)=CHCH₃, CH₂Ph;

15 R3 = H, OCOCH₃, OCOCH₂CH₃, OCOCH(CH₃)₂, OCOC(CH₃)=CH₂,
OCOCH(CH₃)CH=CH₂, OCOCH₂Ph; y

donde R₁, R₂ y R₃ se seleccionan, de manera independiente, de la lista arriba indicada, para
favorecer la proliferación de precursores neurales o células madre neurales en cultivo.

20

3. Uso *in vitro* de la composición de acuerdo a la reivindicación 2, donde el compuesto
consiste en forbol-12,13-diisobutirato de formula:



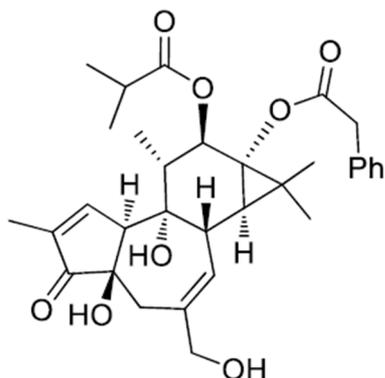
40 o cualquier sal del mismo.

4. Uso in vitro de la composición de acuerdo a la reivindicación 2, donde el compuesto consiste en forbol-12-isobutirato-13-fenilacetato de fórmula:

5

10

15



o cualquier sal del mismo.

20

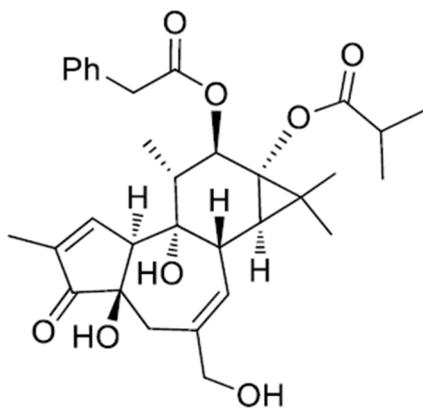
5. Uso in vitro de la composición de acuerdo a la reivindicación 2, donde el compuesto consiste en forbol-13-isobutirato-12-fenilacetato de fórmula:

25

30

35

40



o cualquier sal del mismo.

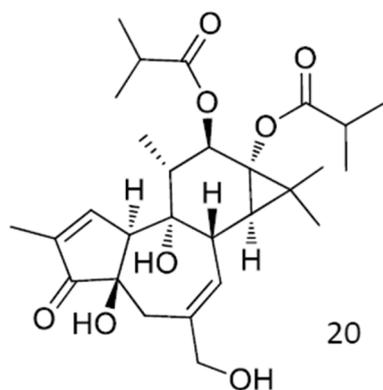
45

6. Composición que comprende un compuesto de fórmula I, donde el compuesto consiste en forbol-12,13-diisobutirato de fórmula:

50

5

10



o cualquier sal del mismo.

15

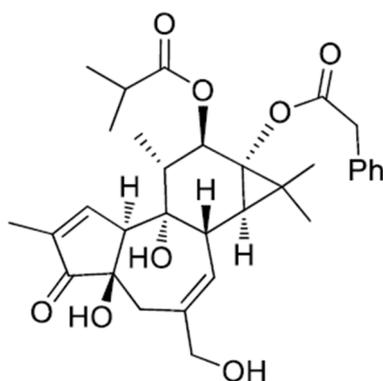
20

7. Composición que comprende un compuesto de formula I, donde el compuesto consiste en forbol-12-isobutirato-13-fenilacetato de fórmula:

25

30

35



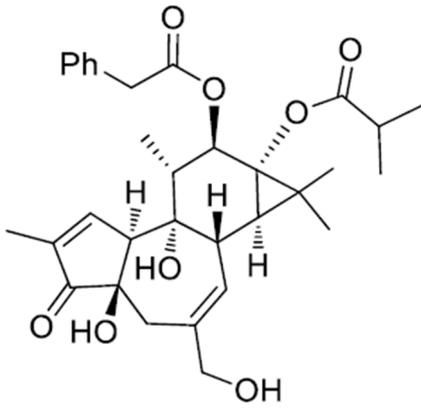
o cualquier sal del mismo.

40

45

50

8. Composición que comprende un compuesto de formula I, donde el compuesto consiste en forbol-13-isobutirato-12-fenilacetato de fórmula:



5

10

o cualquier sal del mismo.

15

9. Procedimiento para la proliferación de células madre neurales o precursores neurales *in vitro* caracterizado por que comprende poner en contacto células madre neurales o precursores neurales con:

20

a. una solución o disolución que comprenda los compuestos definidos en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y/o con una sal de los mismos, y opcionalmente el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF); o

25

b. con un medio de cultivo adecuado para estimular la proliferación de los precursores neurales en ausencia de EGF;

30

durante un tiempo suficiente para la proliferación efectiva de las células madre neurales o precursores neurales.

35

10. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, para su uso en terapia.

40

11. Composición farmacéutica que comprende un compuesto tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde dicha composición farmacéutica opcionalmente comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

45

12. La composición según la reivindicación 11, donde dicha composición es adecuada para su administración en el sistema nervioso central.

50

13. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, para su uso en el tratamiento de enfermedades o lesiones que cursen con pérdida neuronal.

- 5 14. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, 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, enfermedad de Alzheimer, epilepsia y esclerosis lateral amiotrófica.
- 10 15. Composición para su uso según la reivindicación 12, donde dicha composición se administra en el sistema nervioso central, preferiblemente via intranasal.

FIGURA 1

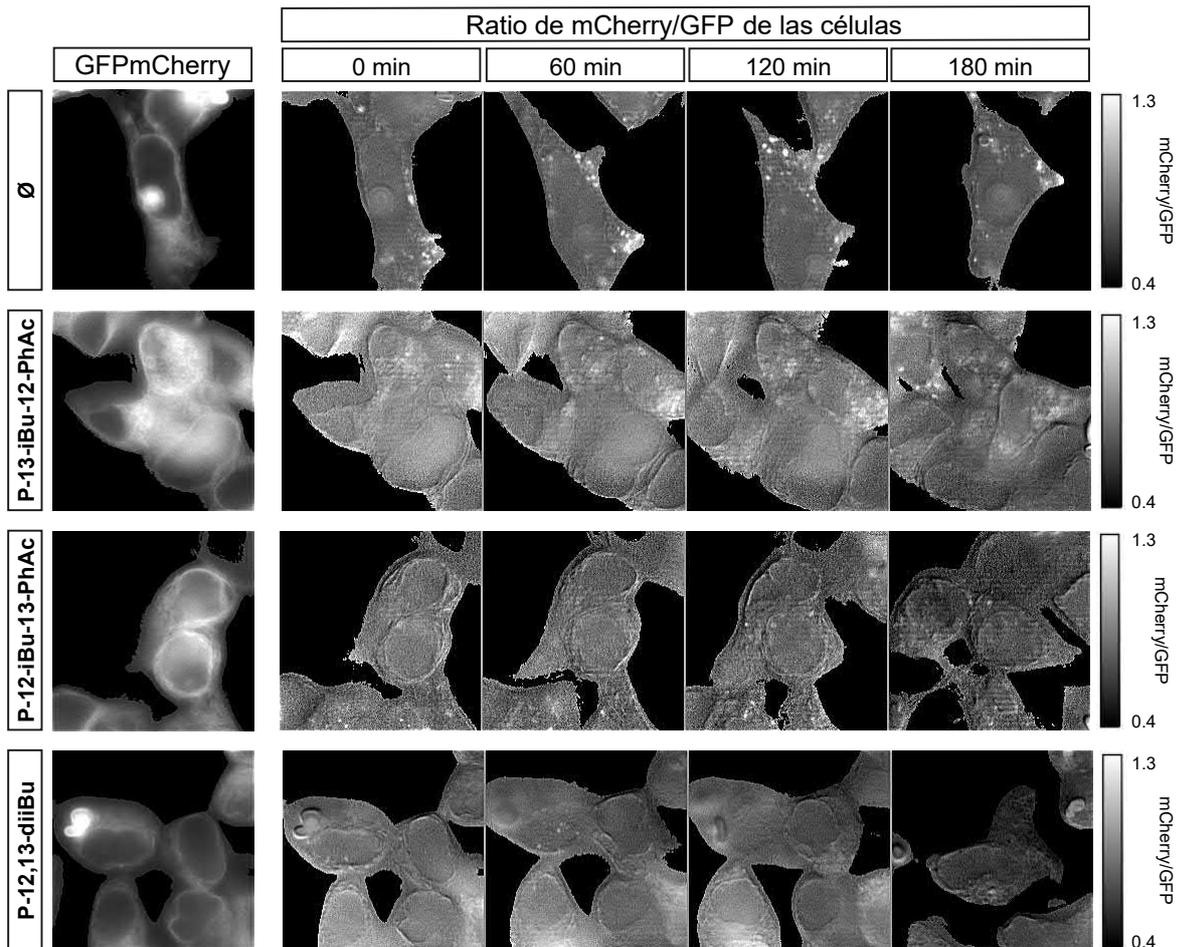
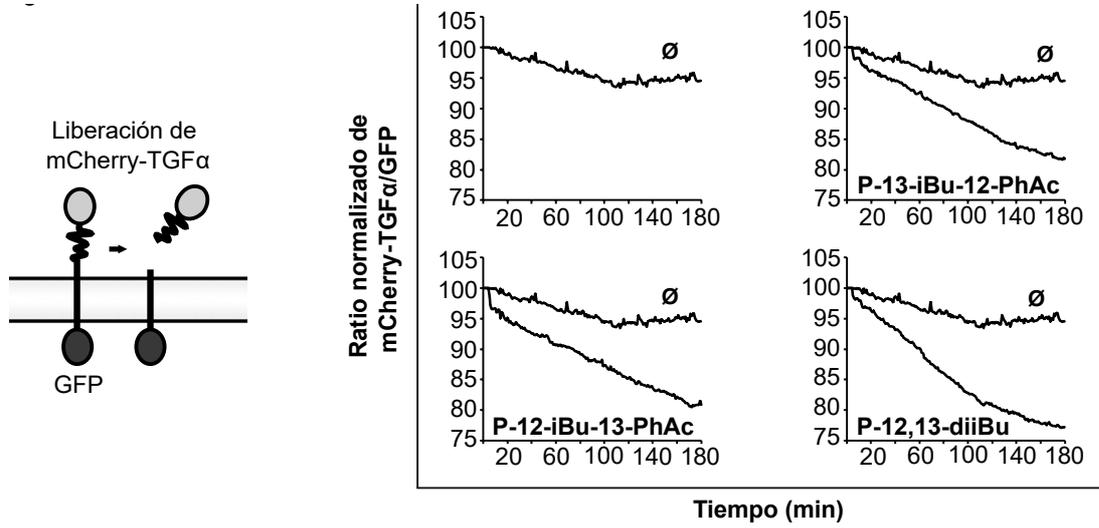


FIGURA 2

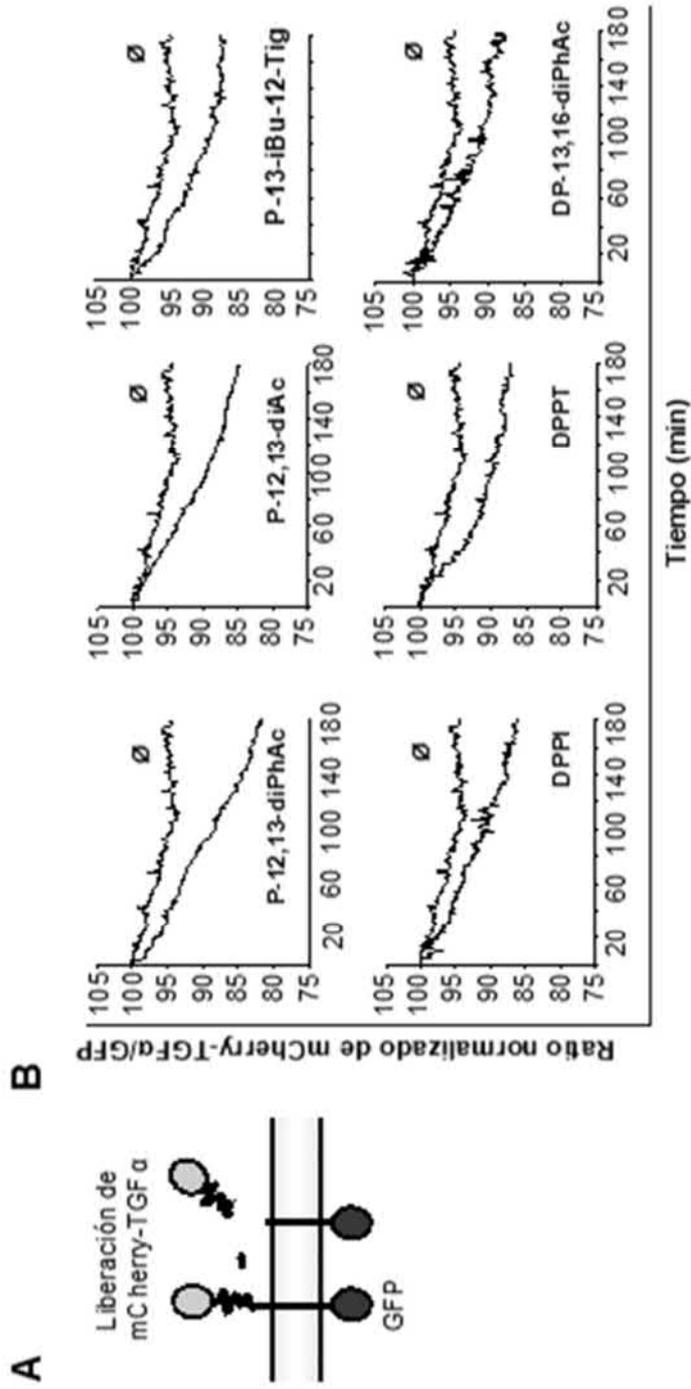


FIGURA 2 (Cont.)

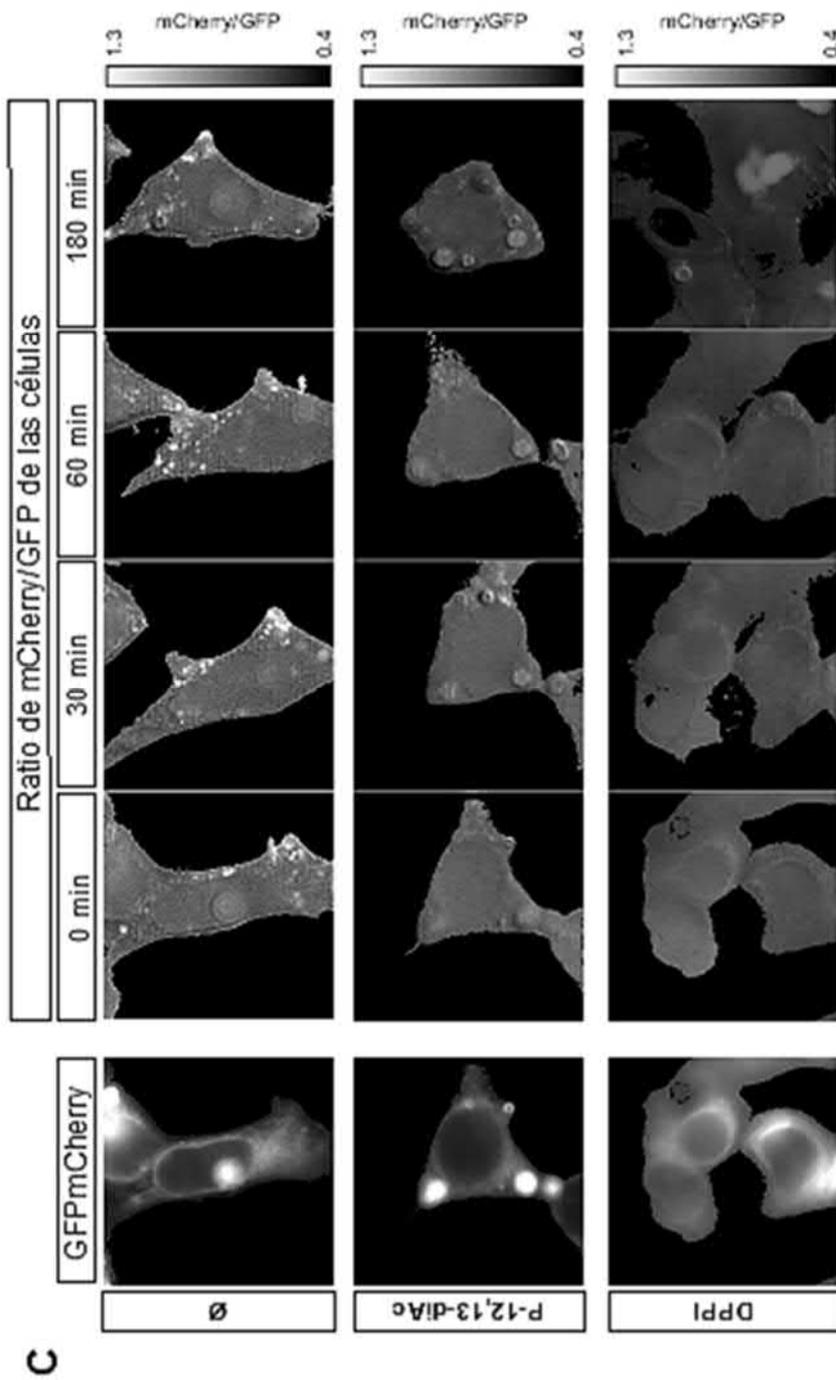
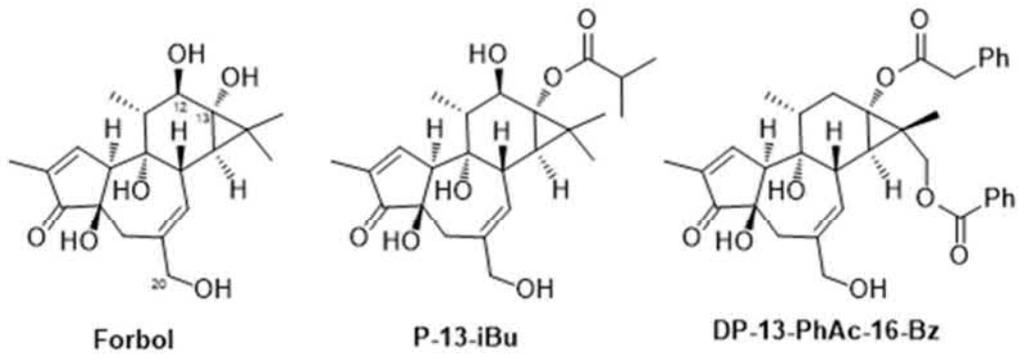


FIGURA 3

3.1)



3.2)

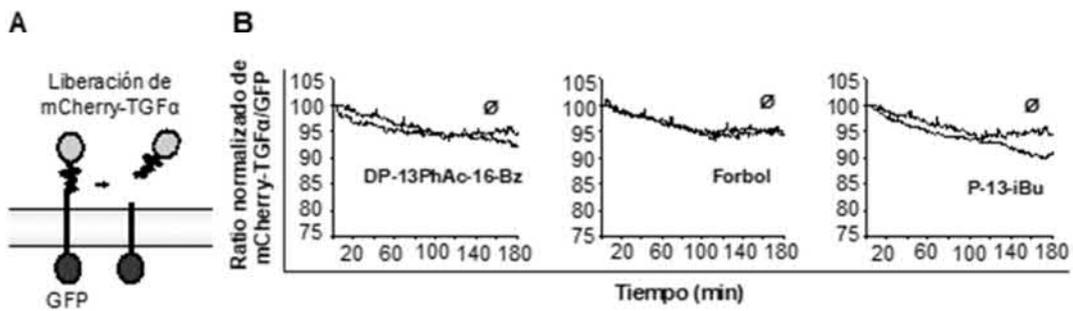


FIGURA 3 (Cont.)

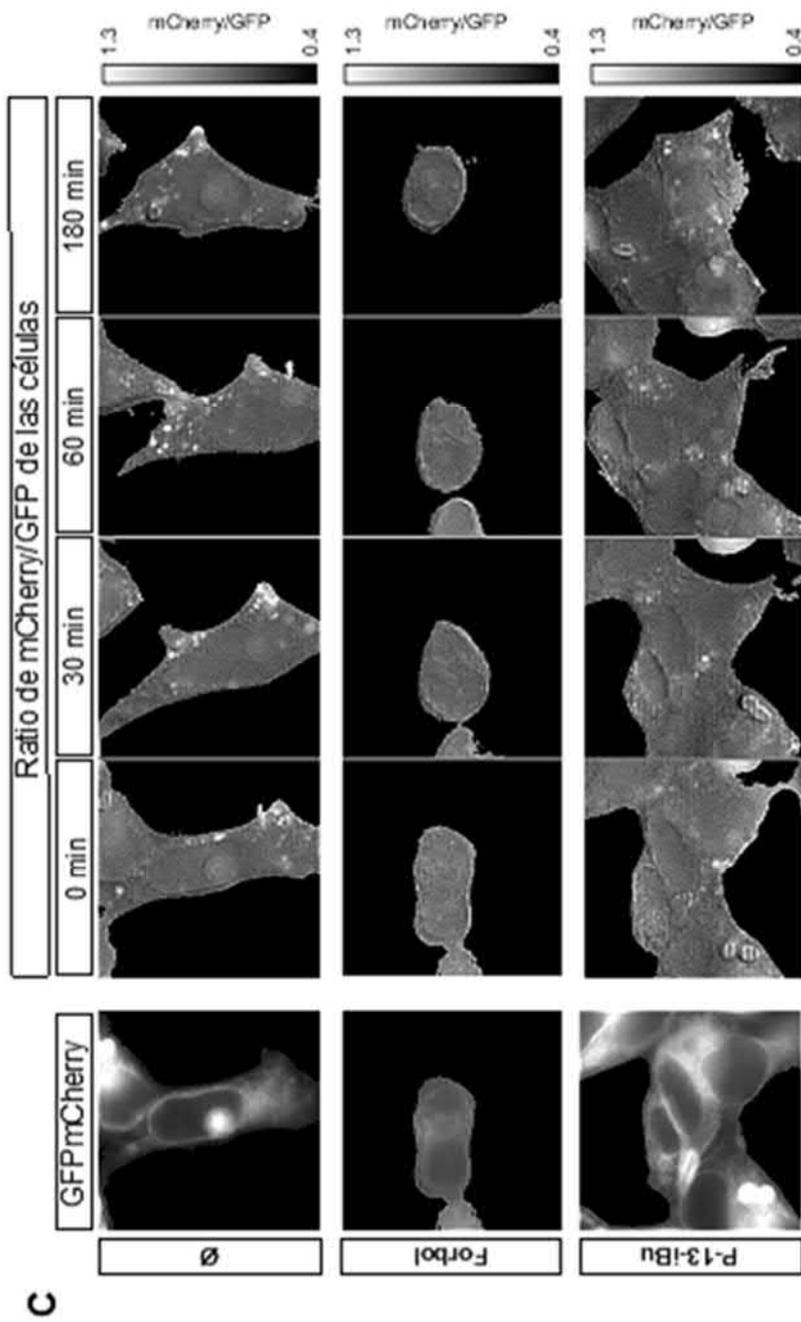
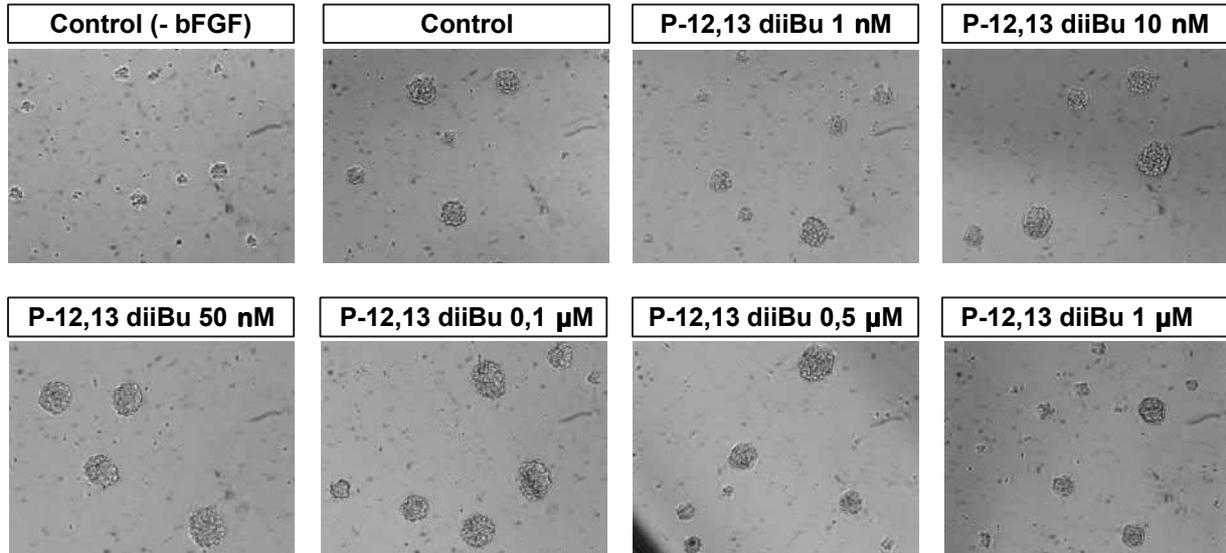


FIGURA 4

A



B

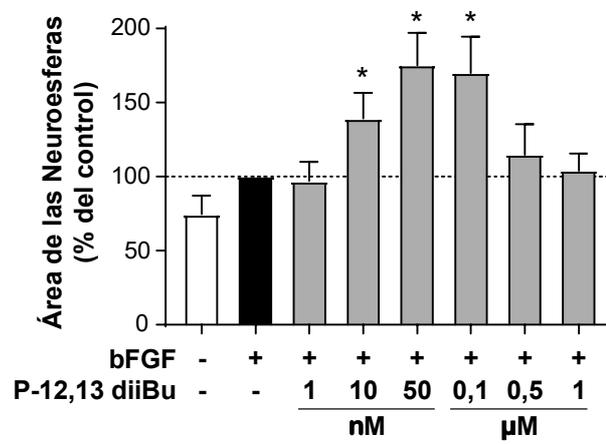
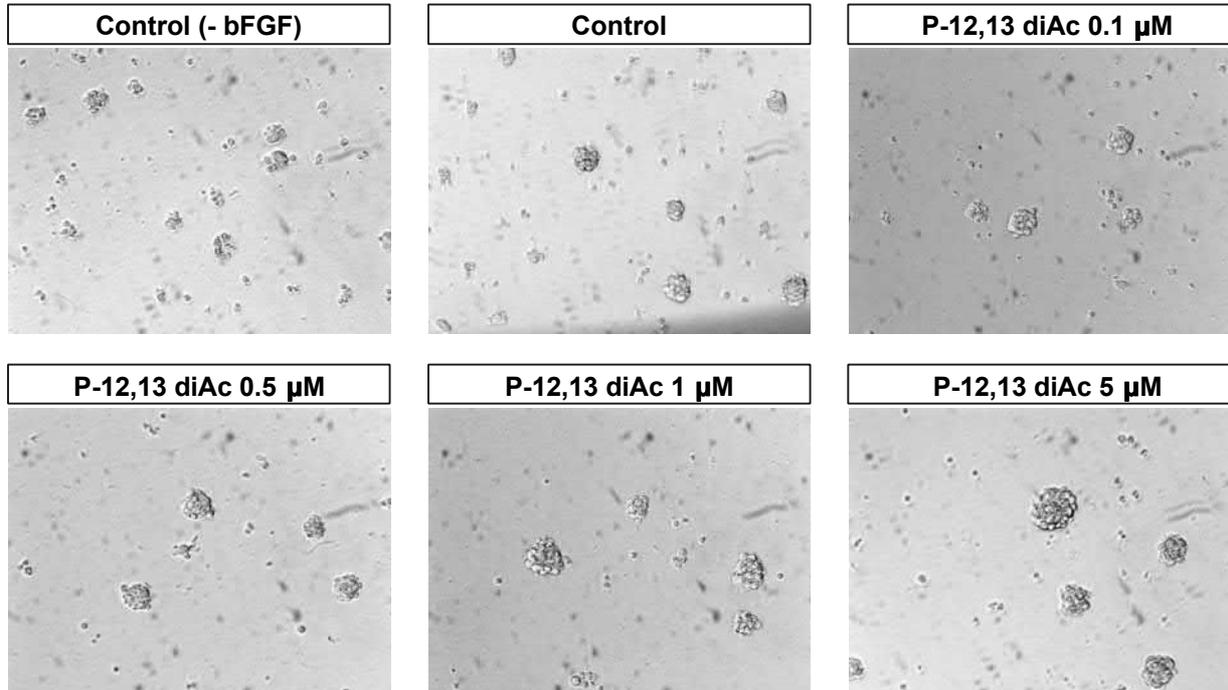


FIGURA 5

A



B

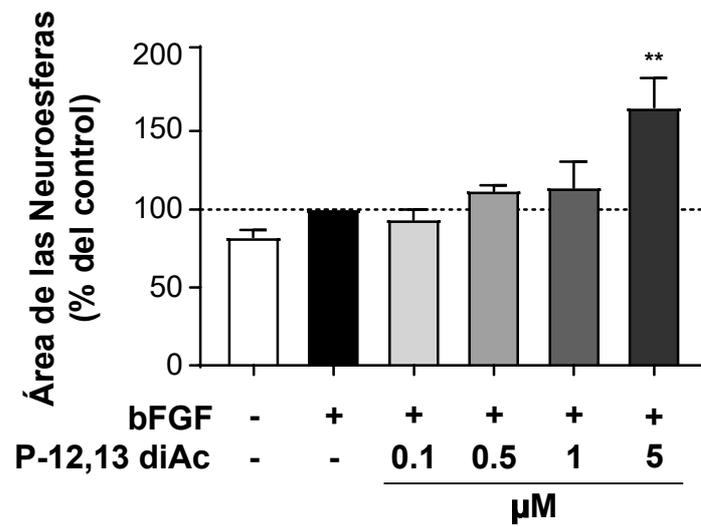
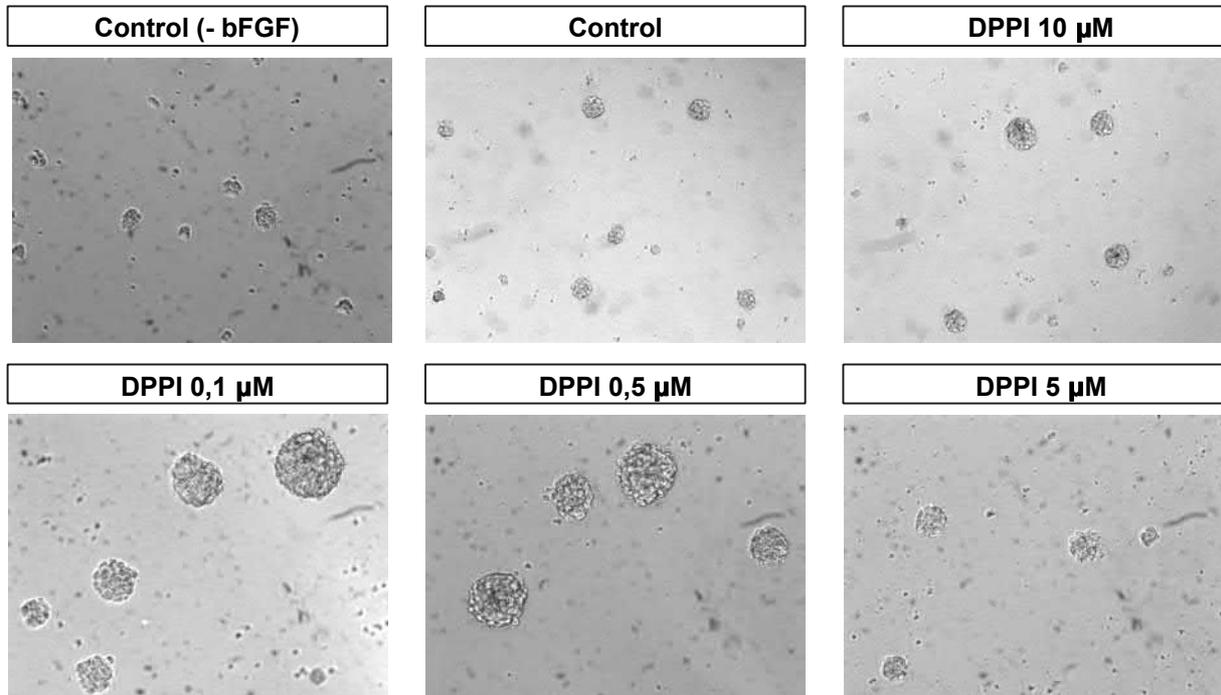


FIGURA 6

A



B

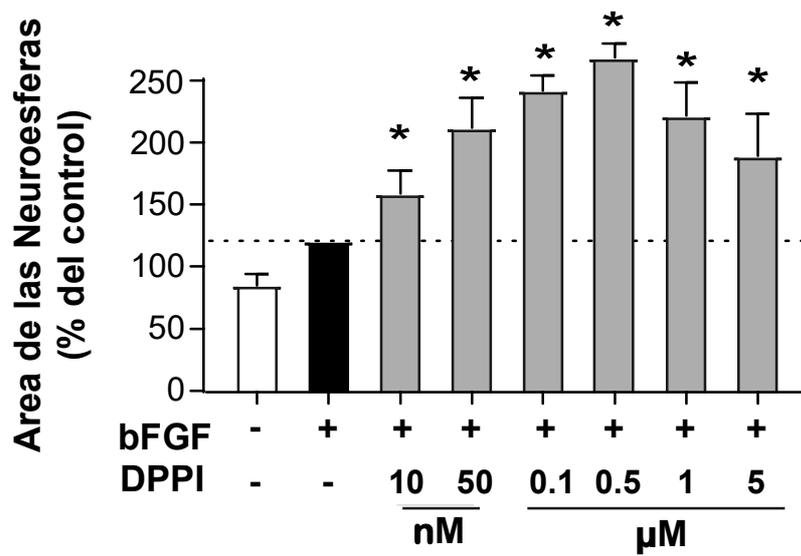
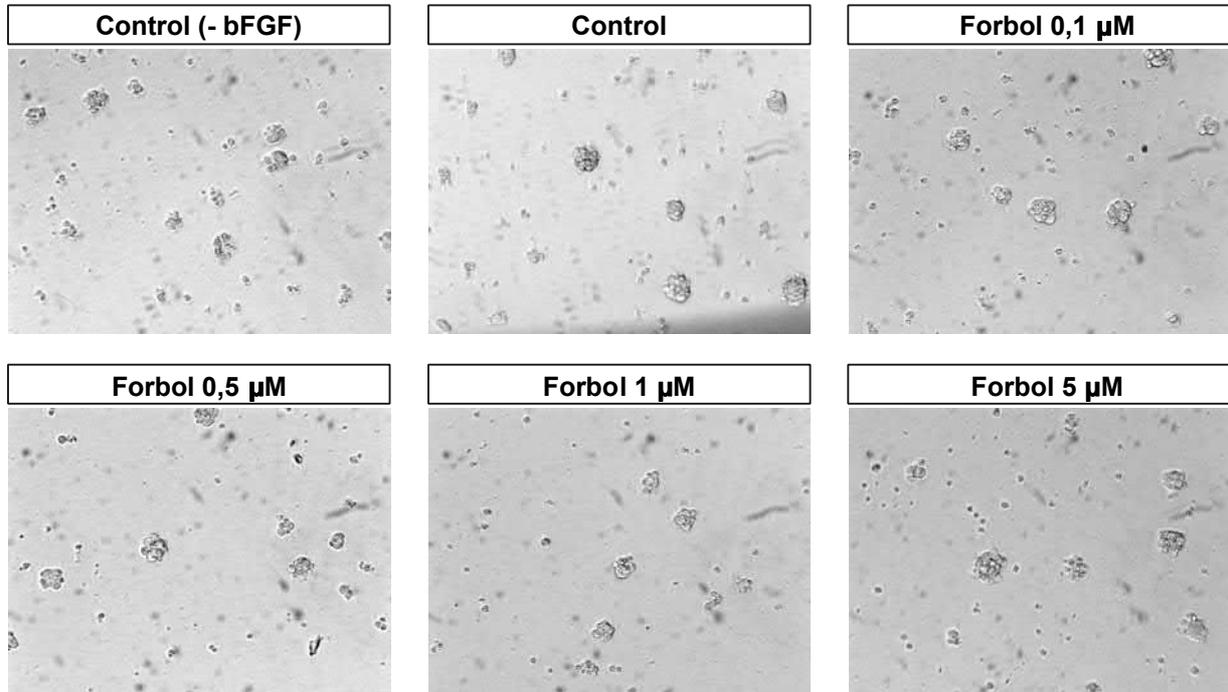


FIGURA 7

A



B

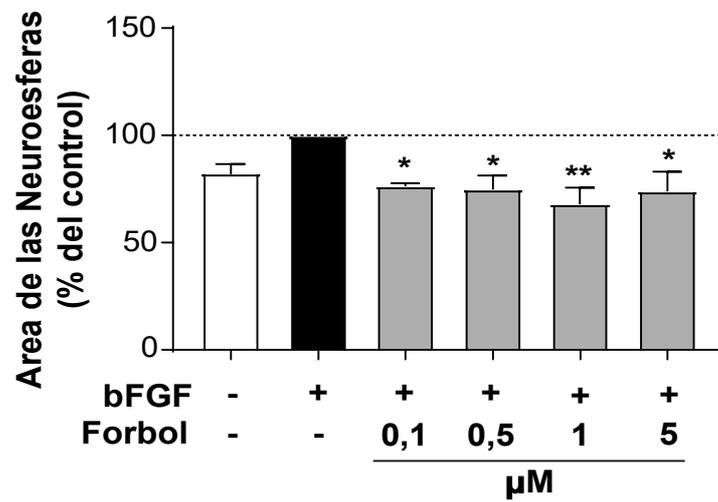


FIGURA 8

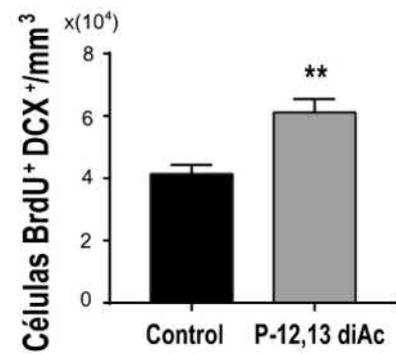
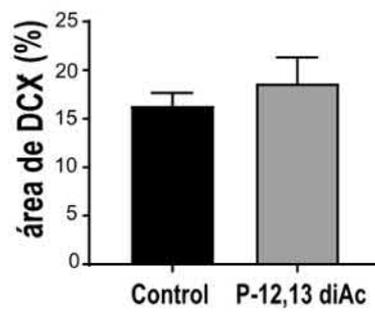
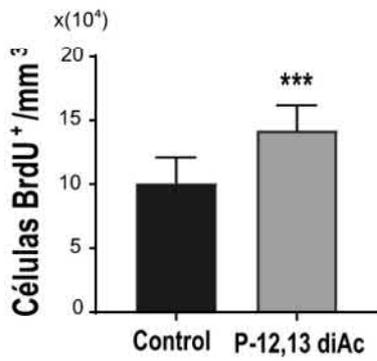
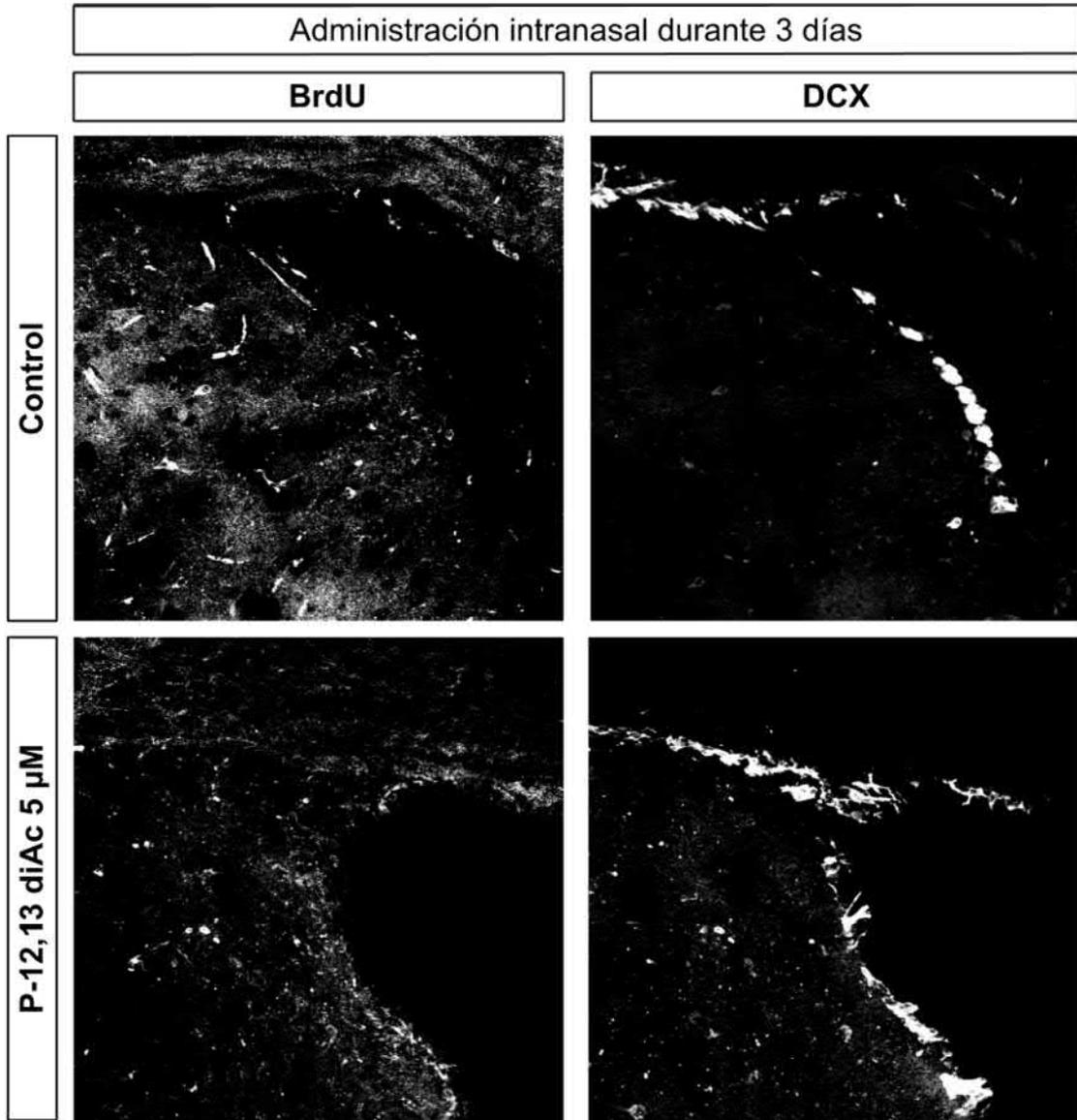


FIGURA 9

