

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 481**

21 Número de solicitud: 201201149

51 Int. Cl.:

C12N 5/0797 (2010.01)

A61K 31/336 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

18.10.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.05.2013

62 Número y fecha presentación solicitud principal:

P 201101149 18.10.2011

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE CÁDIZ (100.0%)
OTRI-Vicerrectorado de I+D+i
C/ Benito Pérez Galdós, s/n
11002 Cádiz ES**

72 Inventor/es:

**CASTRO GONZÁLEZ, Carmen;
HERNÁNDEZ GALÁN, Rosario;
MACÍAS SÁNCHEZ, Antonio José;
ECHEVERRI, Fernando;
GERIBALDI DOIDAN, Noelia;
AGUILERA DIAZ, Almudena;
DOMINGUEZ RISCART, Jesus;
CASTILLO RODRIGUEZ, Angeles y
MURILLO CARRETERO, Maribel**

54 Título: **Medio de cultivo adecuado para la proliferación de células madre neuronales**

57 Resumen:

Medio de cultivo adecuado para la proliferación de células madre neuronales.

Esta invención está relacionada con el empleo del compuesto 3,12-di-O-acetil-8-O-tigloilingol (de aquí en adelante ELAF) o una sal farmacológicamente activa de dicho compuesto, para favorecer la proliferación de precursores neuronales o células madre neuronales en cultivo. Concretamente está relacionada con un medio de cultivo adecuado para la proliferación de células madre neuronales o precursores neuronales in vitro que comprende el compuesto 3,12-di-O-acetil-8-O-tigloilingol y/o una sal farmacológicamente activa del mismo.

ES 2 404 481 A2

DESCRIPCIÓN

MEDIO DE CULTIVO ADECUADO PARA LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MADRE NEURALES.

SECTOR DE LA TÉCNICA

- 5 Esta invención está relacionada con el empleo del compuesto 3,12-di-*O*-acetil-8-*O*-tigloilingol (de aquí en adelante ELAF) o una sal farmacológicamente activa de dicho compuesto, para favorecer la proliferación de precursores neurales o células madre neurales en cultivo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 La existencia de regeneración de lesiones a partir de células madre neurales en el sistema nervioso central, se ha descrito principalmente en modelos de isquemia transitoria global o focal, epilepsia y en lesiones por traumatismo craneal, entre otras. Así en modelos de isquemia, se ha comprobado que en la zona lesionada, aparecen nuevas neuronas que se han podido generar *in situ* por activación de células madre
- 15 locales, o como resultado de la migración de precursores desde las áreas neurogénicas (giro dentado y zona subventricular). En un modelo de isquemia transitoria global se ha observado un aumento de la proliferación de precursores neurales en el giro dentado (*Liu, J. et al. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. J Neurosci 18:7768–7778, 1998*) y un
- 20 efecto similar puede observarse en modelos de isquemia focal (*Jin, K. et al. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. Proc Natl Acad Sci USA 98:4710–4715, 2001*), así como en modelos de epilepsia (*Parent, J.M. et al. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. J Neurosci.17:3727–3738, 1997*). De forma similar, el efecto se observa en otra de las zonas neurogénicas, la zona subventricular (*Fallon, J. et al. In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. Proc Natl Acad Sci USA 97:14,686–14,691, 2000*). Los precursores neurales proliferantes en estas regiones neurogénicas,
- 30 estimulados tras la lesión, dan lugar a la producción de nuevos neuroblastos que, eventualmente, migran en dirección a la zona lesionada. Cualquiera que sea su origen, la capacidad de regeneración es muy escasa, habiéndose descrito una reposición neuronal entre 0,2 y 10%, según el área afectada y el tipo de lesión (*Arvidsson, A. et al. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. Nat Med 8:963–970, 2002; Nakatomi, H. et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury, by recruitment of endogenous neural progenitors. Cell 110:429–441, 2002; Teramoto, T. et al. EGF*
- 35

amplifies the replacement of parvalbuminexpressing striatal interneurons after ischemia. J Clin Invest. 111:1125–1132, 2003). El hecho de que haya una respuesta neurogénica a la lesión hace pensar que la formación de nuevas neuronas sea un mecanismo eficaz en la reparación de pequeñas lesiones, que permanecen silentes

5 precisamente porque las neuronas que hacen apoptosis son reemplazadas, al menos en parte, por neuronas de nueva formación. Un estudio reciente demuestra que en los animales que han sufrido un traumatismo craneal, se incrementa la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo y posteriormente estos animales recuperan su capacidad de realizar tareas de memoria especial. Sin embargo, si en estos animales

10 se eliminan selectivamente las células madre que comienzan a dividirse en el hipocampo como consecuencia del daño inducido por el traumatismo, estos animales no pueden recuperar la capacidad para realizar tareas de memoria espacial (Blais CA, Yu TS, Zhang G, Chen J, Dimchev G, Parada LF, Powell CM, Kernie SG. Temporally specified genetic ablation of neurogenesis impairs cognitive recovery

15 after traumatic brain injury. *J Neurosci.* 2011 31:4906-4916), demostrando así que la reposición neuronal en estas regiones tiene un efecto sobre la recuperación de la memoria tras un traumatismo craneal. Adicionalmente, la aparición de neurogénesis en lesiones cerebrales, se ha demostrado también en humanos, concretamente se ha podido observar que en muestras de cerebro de pacientes sometidos a cirugía tras una

20 lesión por traumatismo craneal, aparecen en la zona de la corteza cerebral alrededor de la lesión, células madre neurales proliferantes y neuroblastos (Zheng W, Zhuge Q, Zhong M, Chen G, Shao B, Wang H, Mao X, Xie L, Jin K. Neurogenesis in Adult Human Brain after Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma.* 2011. [Epub ahead of print])

25 Sin embargo, las lesiones graves o las experimentales con mayor pérdida neuronal no pueden ser resueltas, a menos que se establezcan medidas terapéuticas eficaces para incrementar de forma significativa el proceso neurogénico. Una de las alternativas que podría contribuir a resolver, los problemas clínicos que plantean las enfermedades que cursan con pérdida neuronal es el transplante de células madre que

30 puedan posteriormente generar nuevas neuronas. Varios laboratorios han intentado esta estrategia en modelos animales a los que se han transplantado células madre de origen embrionario (Cao et al. *Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage. Exp Neurol.* 167:48-58, 2001), células madre neurales de animales adultos (Pluchino, S. et al. *Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. Nature*

35 422: 688-694, 2003), o bien células procedentes de células madre sometidas a diferentes grados de diferenciación *in vitro*. El fenómeno más generalmente observado es que, las células madre que se implantan en las zonas neurogénicas del cerebro (por ejemplo, la zona subventricular o el bulbo olfativo en roedores) se

40 diferencian a neuroblastos y se convierten en neuronas maduras pero no ocurre este

mismo fenómeno en las zonas no neurogénicas del cerebro. (*Herrera, D.G. et al. Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions in the adult brain. Ann Neurol. 46:867-77, 1999; Mligiliche, N.L. et al. Survival of neural progenitor cells from the subventricular zone of the adult rat after transplantation into the host spinal cord of the same strain of adult rat. Anat Sci Int. 80:229-34, 2005*).

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

Adicionalmente y sin perjuicio de lo anterior, la presente invención también se enfrenta al problema de elegir la fuente de los precursores a trasplantar a la hora de realizar este tipo de trasplantes. Las células madre embrionarias diferenciadas *in vitro* a células madre neurales o los precursores neurales fetales son una de las fuentes más abundante. Sin embargo, no es fácil encontrar donantes de precursores embrionarios y fetales por lo que sería de gran utilidad poder aislar precursores neurales de cerebro adulto, cultivarlas y expandirlas *in vitro* para su posterior uso en trasplantes. Así, identificar agentes que favorezcan la expansión de los precursores neurales en cultivo resultará de gran utilidad en el desarrollo de terapias regenerativas del sistema nervioso.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig 1. Ensayo de neuroesferas: efecto de ELAF sobre cultivos de precursores neurales *in vitro*. **A.** Imágenes de microscopía de contraste de fase representativas de cultivos de precursores neurales crecidos en presencia y ausencia de ELAF (10 μ M). En todos los casos la proliferación se estimulaba mediante la adición de los factores de crecimiento EGF+bFGF al medio de cultivo. **B.** Efecto de concentraciones crecientes de ELAF sobre el tamaño de las neuroesferas (* $p < 0.01$ en Test T-student en relación al control sin ELAF). **C.** Efecto de ELAF (10 μ M) sobre el número total de células en los cultivos de neuroesferas.

Fig 2. Ensayo de neuroesferas: efecto de ELAF sobre cultivos de precursores neurales *in vitro* en presencia del inhibidor de las isoformas clásicas y nóveles de PKC G06850. A. Imágenes de microscopía de contraste de fase representativas de cultivos de precursores neurales crecidos en presencia y ausencia de ELAF (10 μ M) y con el inhibidor de PKC G06850. En todos los casos la proliferación se estimulaba mediante la adición de los factores de crecimiento EGF+bFGF al medio de cultivo. B. Efecto de ELAF 10 μ M sobre el tamaño de las neuroesferas en presencia y ausencia del inhibidor de PKC (* $p < 0.01$ en Test T-student en relación al control sin ELAF).

Fig 3. Inmunocitoquímica: efecto de ELAF sobre la proliferación de precursores neurales *in vitro*. A. Imágenes de microscopía de fluorescencia de fase representativas de cultivos de precursores neurales crecidos en presencia y ausencia de ELAF (10 μ M) en los que se ha detectado la proteína marcadora de células en ciclo celular Ki67. En todos los casos la proliferación se estimulaba mediante la adición de los factores de crecimiento EGF+bFGF al medio de cultivo. B. Efecto 10 μ M ELAF sobre el porcentaje de células Ki67⁺ (* $p < 0.01$ en Test T-student en relación al control sin ELAF).

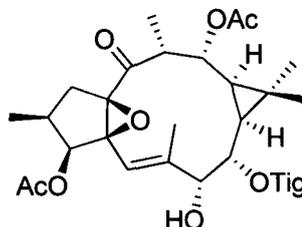
Fig 4. Ensayo de neuroesferas: Efecto de ELAF-1 sobre cultivos de precursores neurales *in vitro*. A. Imágenes de microscopía de contraste de fase representativas de cultivos de precursores neurales crecidos en presencia y ausencia de ELAF-1 (10 μ M). En todos los casos la proliferación se estimulaba mediante la adición de los factores de crecimiento EGF+bFGF al medio de cultivo. B. Efecto de concentraciones crecientes de ELAF-1 sobre el tamaño de las neuroesferas (* $p < 0.01$ en Test T-student en relación al control sin ELAF-1).

25

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El compuesto 3,12-di-O-acetil-8-O-tigloilingol favorece la proliferación de los cultivos celulares de precursores neurales y permite superar la inhibición de la neurogénesis fuera de regiones neurogénicas y favorecer la generación de nuevas neuronas en estas regiones a partir de precursores neurales trasplantados. Por lo tanto, a la hora de regenerar lesiones en la región no-neurogénica de la zona lesionada incrementa la probabilidad de que las células madre trasplantadas puedan dar lugar a neuronas maduras y funcionales.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención, comprende el uso del compuesto 3,12-di-O-acetil-8-O-tigloilingol (de aquí en adelante ELAF) con número CAS 58749-62-5 y cuya estructura química se muestra a continuación:

Estructura I:

o sales farmacológicamente activas del mismo, *in vitro*, para favorecer la
 5 proliferación de 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 una capacidad de
 diferenciación limitada, pues sólo pueden diferenciarse hacia los tres subtipos de
 10 células del linaje neural: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

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

En un aspecto particular de la invención, para cultivar las células madre neurales con
 ELAF se añade ELAF en un rango de concentración desde 1 pmol/L a 40 $\mu\text{mol/L}$.
 Las células madre se cultivan en flotación a una densidad de 20 a 200 $\times 10^6$
 células/L. El compuesto se añade a un cultivo estático a 37°C durante 1 a 14 días en
 20 una atmósfera de 5% CO₂, cambiando el medio de forma total o parcial cada dos
 días.

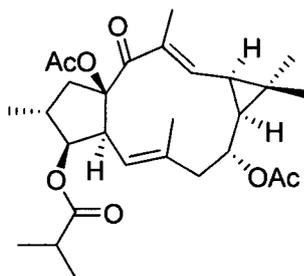
El medio en el que se cultivan las células puede ser cualquier medio que no impida la
 proliferación de las células madre neurales, como ejemplo se puede utilizar
 preferentemente un medio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F-12
 25 (1:1), que contenga 2% del suplemento B27 (Invitrogen), 2mM L-glutamina y
 2 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina. Adicionalmente el medio debe contener bien el factor de
 crecimiento epidérmico (EGF), preferiblemente a una concentración 20 $\mu\text{g/L}$, el
 factor de básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), preferiblemente a una
 concentración de 10 $\mu\text{g/L}$, o una mezcla de ambos.

30 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un medio de cultivo (de
 aquí en adelante medio de cultivo de la presente invención), adecuado para la

proliferación de células *madre* neurales o precursores neurales, que comprenda ELAF en un rango de concentración de 1 pmol/L a 40 µmol/L.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere al uso del medio de cultivo de la presente invención para la proliferación de células *madre* neurales o precursores neurales.

Por último, los inventores de la presente invención han constatado como compuestos estructuralmente similares a ELAF no presentan actividad favorecedora de la proliferación de precursores neurales. En este sentido, en la Fig. 4 se muestra como el compuesto 8 α ,15 β -diacetoxi-3 β -(2-metilpropanoiloxi)-2 β H,4 α H,9 α H,11 α H-latira-5E,12E-dien-14-ona (de aquí en adelante ELAF12-1), con número CAS 1217313-08-0 y la siguiente estructura química:



no es capaz de favorecer de la proliferación de precursores neurales.

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

EJEMPLOS

EJEMPLO 1. Efecto de 3,12-di-O-acetil-8-O-tigloilingol (ELAF) sobre las células madre neurales

Se ha investigado la actividad biológica del compuesto ELAF sobre las células madre neuronales extraídas de la zona subventricular de ratones postnatales de 7 días.

Para ello las paredes laterales de los ventrículos laterales de la zona subventricular de ratones P7, fueron extraídas y disociadas enzimáticamente en líquido cefaloraquídeo (LCR) Ca₂ bajo, Mg₂ alto (5 mM KCl, 124 mM NaCl, 3.2 mM MgCl₂, 100 µM

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 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,
5 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 mg/ml de ovomucoide y disgregadas mecánicamente con una pipeta Pasteur con el diámetro reducido a la mitad. Después fueron centrifugadas
10 nuevamente y resuspendidas en 6 ml de medio definido de neuroesferas (45ml de (DMEM)/F-12, 900 µL de B₂₇, 2mM L-glutamina y 2µg/ml de gentamicina) suplementado con 6 µL 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
15 centrifugación de 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.

Una vez obtenidas las neuroesferas se probó el efecto de ELAF 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 células /µL a la que se le añadieron los factores de crecimiento EGF (20 ng/mL) y bFGF (10 ng/mL). ELAF se añadió al mismo tiempo poniendo en cada pocillo una concentración diferente. Se utilizaron 5 pocillos para
25 las diferentes concentraciones (Control, 1µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml, 50 µg/ml) y por triplicado. Los experimentos se llevaron a cabo de modo que la 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
30 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 ELAF de manera dosis-dependiente hasta la concentración de 10µM. Se observó además que el efecto de esta concentración (10µM) inducía un aumento estadísticamente significativo del tamaño de las neuroesferas (Figura 1 A y B),
35 sugiriendo que a esta concentración el compuesto era capaz de facilitar la proliferación celular. El incremento en el tamaño de las neuroesferas coincidía con un incremento en el número total de células en los cultivos tratados con ELAF 10µM

(Figura 1 C), apoyando la hipótesis de que el incremento en el tamaño de las neuroesferas se debía a una estimulación de la proliferación celular.

EJEMPLO 2. Efecto del inhibidor G06850 de PKC sobre el extracto de ELAF y su acción sobre las células madre neuronales.

Con el fin de confirmar si el efecto sobre el aumento en el tamaño de las neuroesferas estaba mediado por la capacidad de ELAF de estimular PKC, los precursores neurales fueron cultivados y tratados primero con el inhibidor, de las PKC clásicas y nóveles: G06850, y media hora después fueron tratadas con ELAF 10 μ M.

Para ello las neuroesferas fueron centrifugadas y las células fueron resuspendidas y disgregadas en medio definido de neuroesferas y sembradas 20 células / μ L, donde se añadieron los factores de crecimiento EGF y bFGF y el inhibidor G06850. El compuesto 3,12-di-*O*-acetil-8-*O*- tiglioilingol (ELAF) se añadió 30 minutos después de los inhibidores, esta vez sólo se utilizó la concentración de 10 μ g/ml, y por triplicado. El experimento se llevó a cabo de manera que la persona que tomaba las imágenes y realizaba la cuantificación no conocía en ningún momento 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.

Tras 72 horas se midió el área de las neuroesferas y se observó como de nuevo en los cultivos tratados con ELAF 10 μ M el área de las neuroesferas aumentaban significativamente en comparación con el control (Figura 2A). Sin embargo, el área de las neuroesferas de las células tratadas sólo con el inhibidor G06850 y con ELAF 10 μ M en presencia del inhibidor G06850 presentaban un área incluso menor que el control, aunque la diferencia no era estadísticamente significativa.

EJEMPLO 3. Efecto de ELAF sobre el porcentaje de núcleos Ki67⁺. Inmunocitoquímica con anti-Ki67 para detectar células proliferantes.

Con el fin de confirmar si el incremento en el tamaño de las neuroesferas se debía a un aumento en la proliferación de los precursores neurales se realizó una inmunocitoquímica frente a Ki67 que detecta aquellos núcleos que expresan el marcador de ciclo celular Ki67 en cultivos control y en cultivos tratados con ELAF 10 μ M.

Para ello, una vez pasadas las 72 horas de tratamiento, se procedió a fijar las células durante 20 minutos a temperatura ambiente con paraformaldehído (PFA) al 4% preparado en tampón fosfato 0.1 M. Posteriormente se lavaron los pocillos 3 veces con PBS. Se permeabilizaron las células incubando 20 minutos a -20 °C con una
5 solución de etanol/acético (95% etanol absoluto, y 5% de ácido acético glacial). Se lavó 3 veces con PBS y posteriormente se bloqueó con una solución de BSA al 1.5% (albúmina sérica bovina) en PBS; se incubaron durante 30 minutos. Se añadió el anticuerpo anti Ki67 y se dejó durante toda la noche a 4°C en solución de bloqueo. Al día siguiente se lavaron con PBS, se bloquearon nuevamente durante 20 minutos
10 y se incubaron con los anticuerpos secundarios durante 40 minutos en solución de bloqueo en oscuridad. El montaje se realizó con una solución de Electron Microscopy Science y se añadió DAPI en el momento del montaje. Se utilizó un microscopio de epifluorescencia Olympus BX60 para la cuantificación.

Se observó que el tratamiento con ELAF aumentaba el porcentaje de células en ciclo celular con núcleos Ki67⁺, así como el número total de células (núcleos totales teñidos con DAPI) (véase en figura 3). La inhibición de las PKC (clásicas y nóveles) mediante el inhibidor G06850 no afectaba al número de células Ki67⁺ ni en presencia ni en ausencia de ELAF, aunque podía observarse un mayor porcentaje de núcleos mitóticos.

20 En las células tratadas con ELAF 10 µM el porcentaje de núcleos Ki67 positivos (Figura 3) era significativamente mayor que en el control, indicando que ELAF activa la proliferación de los precursores neurales.

EJEMPLO 4. Obtención de 3,12-di-O-acetil-8-O-tigloilingol (ELAF) a partir de
25 *Euphorbia laurifolia*.

Un extracto en acetato de etilo del latex (100 mL) de *E. laurifolia* fue filtrado y el disolvente evaporado a presión reducida para proporcionar 4.0g de extracto crudo. Este crudo fue fraccionado mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluida con gradientes crecientes de hexano:acetato de etilo, lo que permitió
30 obtener 20 fracciones de 30 mL cada una. El disolvente de la fracción 12 fue evaporado a presión reducida y el residuo resultante (25 mg) fue purificado mediante cromatografía preparativa en capa fina, empleando gel de sílice como fase estacionaria y una mezcla hexano/acetona (9:1, v/v) como eluyente, para proporcionar 3,12-di-O-acetil-8-O-tigloilingol (10 mg).

REINVINDICACIONES

- 5 1. Medio de cultivo adecuado para la proliferación de células madre neurales o precursores neurales *in vitro*, que comprenda el compuesto 3,12-di-O-acetil-8-O-tigloilingol y/o una sal farmacológicamente activa del mismo.
- 10 2. Medio de cultivo según la reivindicación 1, que además comprenda el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y/o el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y donde el compuesto 3,12-di-O-acetil-8-O-tigloilingol y/o la sal farmacológicamente activa del mismo se hallen en el medio en un rango de concentración de 1 pmol/L a 40 µmol/L.
3. Uso del medio de cultivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, para favorecer la proliferación de precursores neurales o células madre neurales en cultivo.

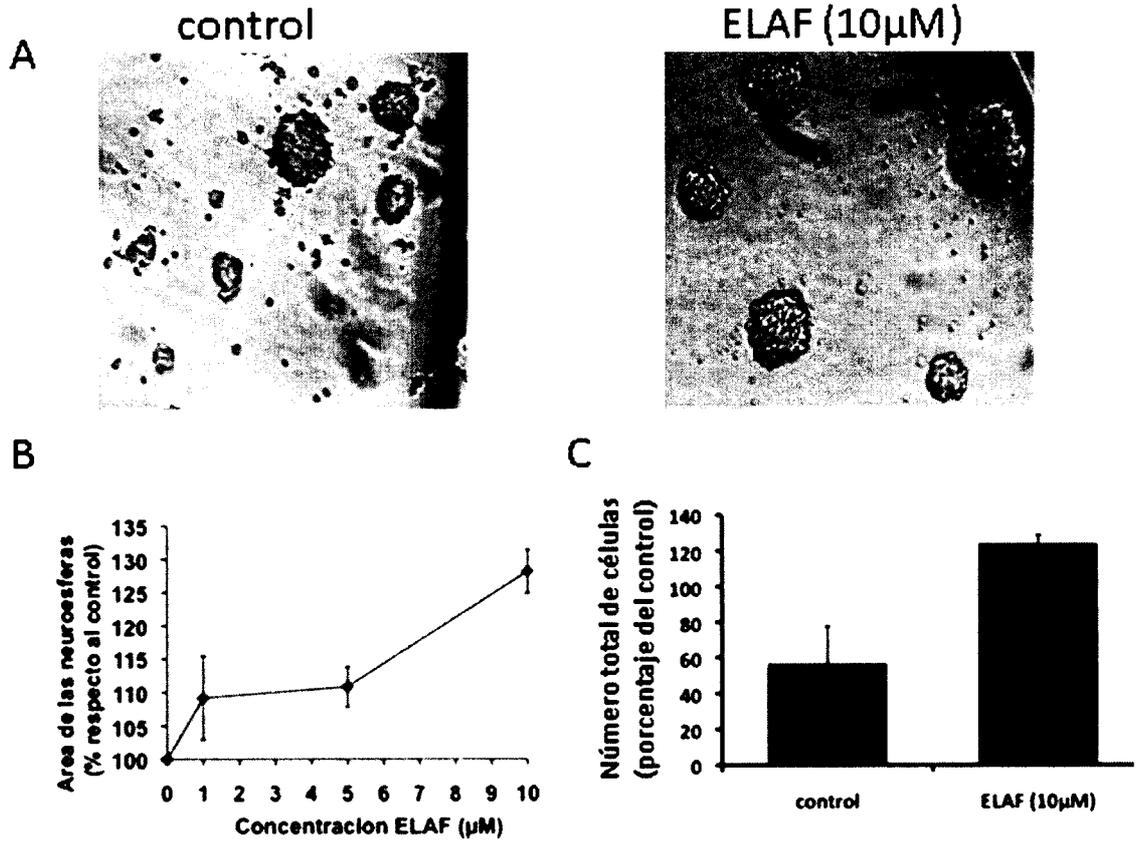


FIG. 1

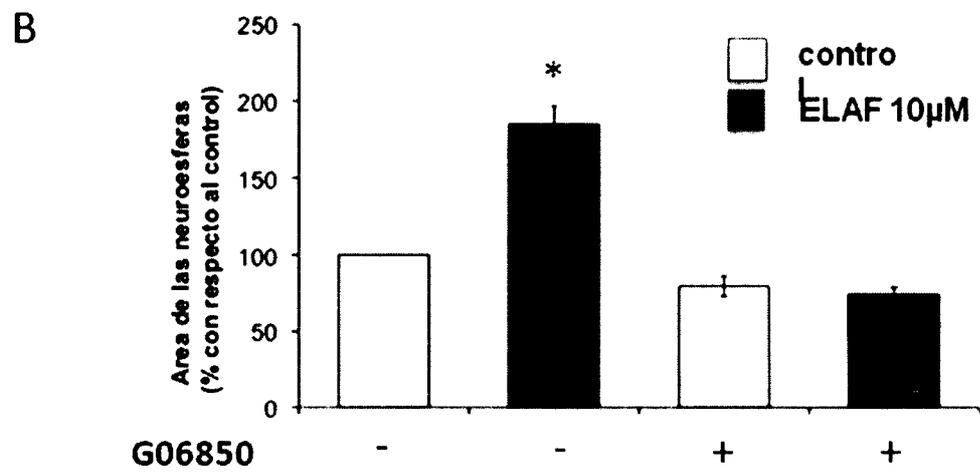
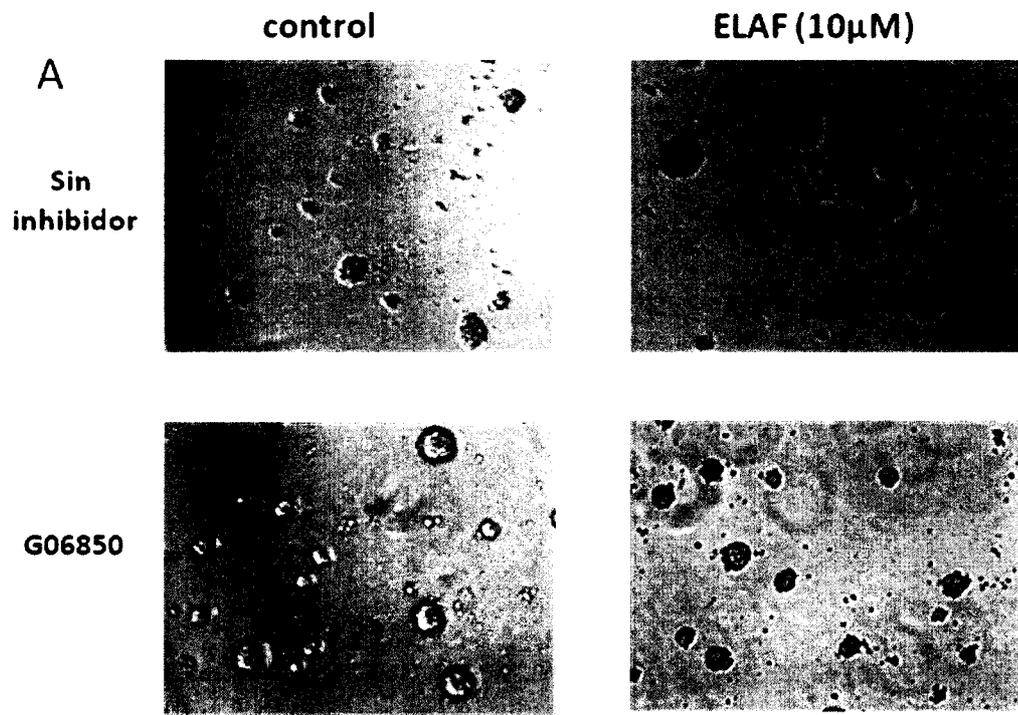


FIG. 2

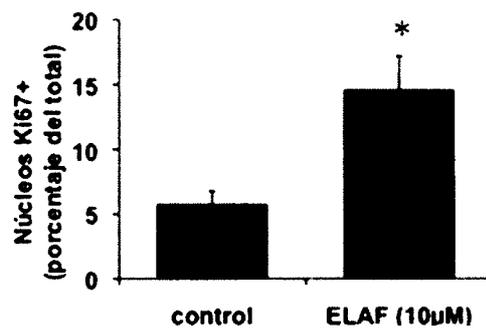
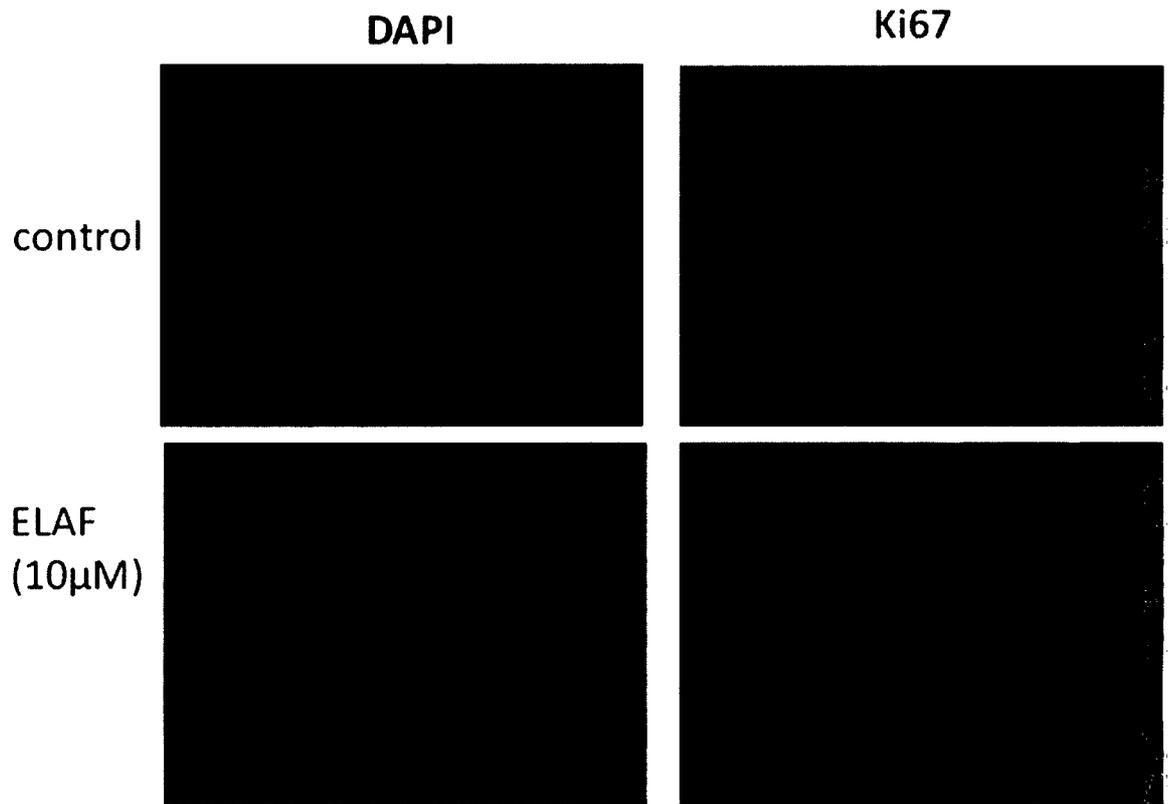


FIG. 3

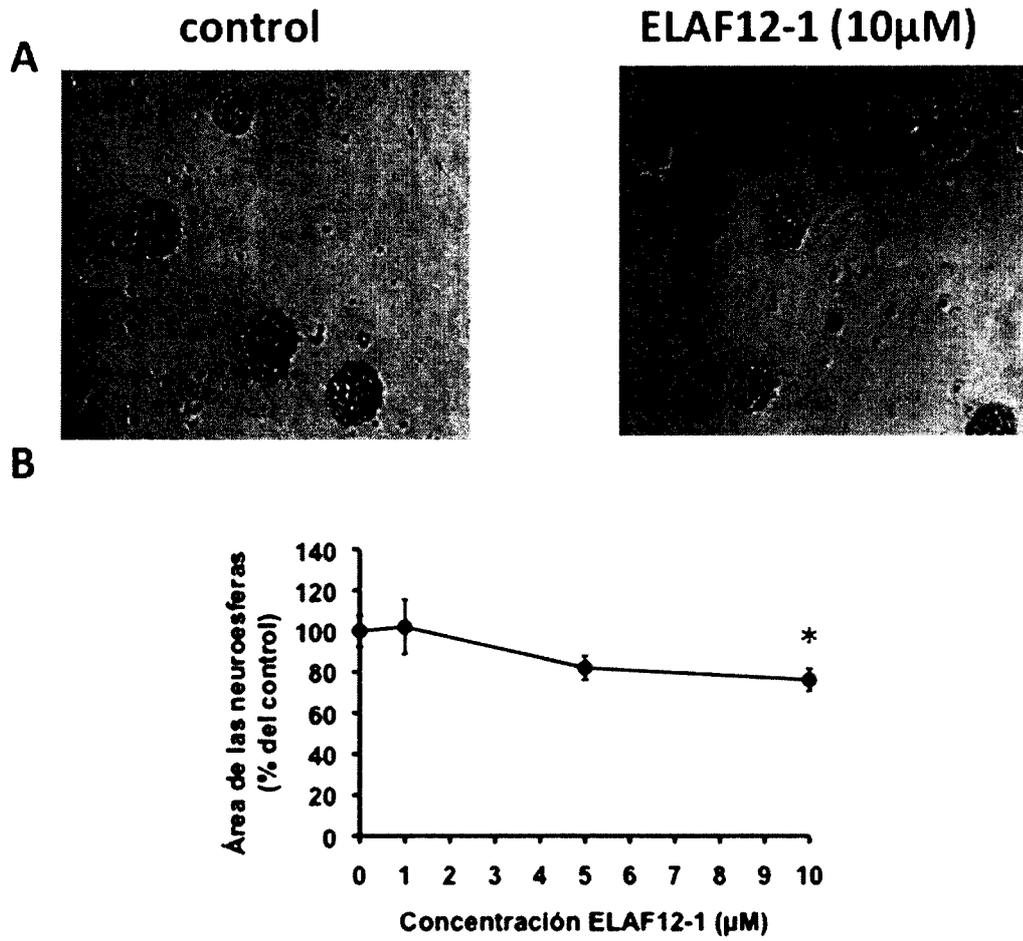


FIG. 4