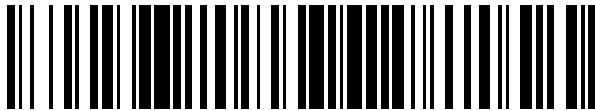


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 537 905**

(21) Número de solicitud: 201301153

(51) Int. Cl.:

**A61K 31/045** (2006.01)

(12)

## SOLICITUD DE PATENTE

A2

(22) Fecha de presentación:

**11.12.2013**

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

**15.06.2015**

(71) Solicitantes:

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

(72) Inventor/es:

**CASTRO GONZÁLEZ , Carmen ;**  
**GERIBALDI DOLDÁN, Noelia;**  
**MURILLO CARRETERO, Maribel;**  
**DOMINGUEZ RISCART, Jesús;**  
**ORTIZ CUELLAR, Purificación;**  
**GARCÍA BERNAL, Francisco;**  
**FLORES GIUBI, Eugenia;**  
**HERNÁNDEZ GALÁN, Rosario;**  
**MACÍAS SÁNCHEZ, Antonio José y**  
**VERÁSTEGUI ESCOLANO, Cristina**

(54) Título: **Uso de 12- desoxiforboles para promover la proliferación de las células madre neurales**

(57) Resumen:

Uso de 12-desoxiforboles para promover la proliferación de células madre neurales. Esta invención está relacionada con el empleo de compuestos de la familia 12-desoxiforboles o una sal farmacológicamente activa de dichos compuestos, para favorecer la proliferación de precursores neurales o células madre neurales en cultivo. Adicionalmente, también se relaciona con el empleo de esta familia de compuestos para la elaboración de una composición farmacéutica útil en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central que cursen con perdida neuronal.

**DESCRIPCIÓN**

**USO DE 12-DESOXIFORBOLES PARA PROMOVER LA EXPANSIÓN DE CÉLULAS MADRE NEURALES.**

**SECTOR DE LA TÉCNICA**

- 5 Esta invención está relacionada con el empleo de 12-desoxiforboles o una sal farmacológicamente activa de compuestos de esta familia, para favorecer la proliferación de precursores neurales o células madre neurales en cultivo. Adicionalmente, también se relaciona con el empleo de la misma familia de compuestos para la elaboración de una composición farmacéutica útil en el
- 10 tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central que cursen con pérdida neuronal.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

La reposición neuronal dentro del Sistema Nervioso Central (en adelante SNC) se lleva a cabo a partir de células madre neurales. Éstas son células indiferenciadas que mediante divisiones asimétricas pueden dar lugar a cada uno de los tipos celulares propios del tejido nervioso: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Las células madre neurales se distribuyen a lo largo de diversas regiones del cerebro adulto, aunque en condiciones fisiológicas la mayoría de estas células permanecen quiescentes y no producen neuronas. Sólo existe generación de nuevas neuronas en dos regiones del cerebro adulto: el giro dentado del hipocampo (en adelante DG) y la zona subventricular (en adelante SVZ), en las que estas células madre neurales no están quiescentes sino que se dividen con una baja frecuencia y generan precursores neurales indiferenciados (en adelante NPC) altamente proliferativos que, posteriormente pueden dar lugar a precursores ya comprometidos con la estirpe neuronal, llamados neuroblastos, cuya diferenciación final da lugar a neuronas maduras (*Goldman, S. Glia as neural progenitor cells. Trends in Neuroscience 2003 26, 590-596; Alvarez-Buylla, A.*,

and Garcia-Verdugo, J. M. Neurogenesis in adult subventricular zone. *Journal of Neuroscience* 2002, 22, 629-634).

En distintos tipos de lesiones cerebrales experimentales (isquemia transitoria global o focal, epilepsia, entre otras) se ha observado un aumento de la 5 proliferación de precursores neurales en el giro dentado y en la zona subventricular (*Liu, J. et al. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. Journal of Neuroscience* 1998 18, 7768-7778; *Jin, K., et al. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. Proceedings of the 10 National Academy of Sciences U S A* 2001 98, 4710-4715; *Parent, J. M. et al. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. Journal of Neuroscience* 1997, 17, 3727-3738), dando lugar a la producción de nuevos neuroblastos que, paulatinamente, migran en dirección a la zona lesionada. Sin 15 embargo, a pesar de este incremento en la neurogénesis, la capacidad de regeneración neuronal en las zonas lesionadas es muy escasa, habiéndose descrito una reposición neuronal de 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. Nature Medicine* 2002, 8, 963-970; *Nakatomi, et al. 20 Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. Cell* 2002 110, 429-441; *Teramoto, T., et al. EGF amplifies the replacement of parvalbumin-expressing striatal interneurons after ischemia. The Journal of clinical investigation* 2003, 111, 1125-1132). Por otra parte, las lesiones cerebrales inducen la aparición 25 localizada de células con características de precursores neurales que proliferan y que generan nuevas células gliales pero no neuronas (*Seidenfaden, R et al., Glial conversion of SVZ-derived committed neuronal precursors after ectopic grafting into the adult brain. Mol Cell Neurosci* 2006 32, 187-198).

- Todos estos resultados indican que en el tejido cerebral lesionado se dan las condiciones que favorecen la diferenciación glial, pero no neuronal, de las células madre neurales, ya sean propias o transplantadas. Esto se debe a que el conjunto de interacciones de citoquinas y de contactos celulares que se genera en una zona
- 5 de lesión tisular (expresión de nuevos factores de crecimiento y sus correspondientes receptores, etc.), difiere notablemente de las condiciones existentes en las regiones neurogénicas. Se trataría por tanto de modificar el nicho no-neurogénico de la zona lesionada y convertirlo en un nicho neurogénico en el que tanto las células madre endógenas como las transplantadas pudieran dar lugar
- 10 a neuronas maduras y funcionales. Por ello, un objetivo de la investigación actual en el campo de las enfermedades y lesiones neurodegenerativas es establecer qué moléculas favorecen o impiden la neurogénesis para, mediante la inserción de las primeras y/o la eliminación de las segundas, tratar de generar un nicho neurogénico donde sea necesario.
- 15 En el nicho neurogénico por tanto existen un conjunto de señales extracelulares locales que permiten la continua generación de nuevas neuronas (*Alvarez-Buylla, A., and Lim, D. A. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. Neuron 2004, 41, 683-686; Lee, C., et al. The molecular profiles of neural stem cell niche in the adult subventricular zone. PLoS One 2012, 7, e50501*).
- 20 Además, estos factores inciden sobre rutas de señalización intracelulares. De este modo, a la hora de favorecer la neurogénesis, se puede actuar tanto sobre los factores extracelulares como sobre las proteínas que conforman las rutas de señalización intracelular.
- El hecho de que haya una respuesta neurogénica a la lesión hace pensar que la
- 25 formación de nuevas neuronas sea un mecanismo eficaz en la reparación de pequeñas lesiones, que permanecen silentes precisamente porque las neuronas que hacen apoptosis son reemplazadas, al menos en parte, por neuronas de nueva formación. 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 espacial. Sin embargo, si en estos animales se eliminan selectivamente las células madre que comienzan a dividirse en el hipocampo como consecuencia del daño inducido por el traumatismo, estos animales no 5 pueden recuperar la capacidad para realizar tareas de memoria espacial (*Blaiss CA, et al. Temporally specified genetic ablation of neurogenesis impairs cognitive recovery 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 10 aparición de células madre neurales activadas en lesiones cerebrales se ha demostrado también en humanos. Concretamente se ha podido observar que en muestras de cerebro de pacientes sometidos a cirugía tras una lesión por traumatismo craneal, aparecen en la zona de la corteza cerebral alrededor de la lesión, células que expresan marcadores de precursores neurales (*Zheng, W., et al. 15 Neurogenesis in adult human brain after traumatic brain injury. J Neurotrauma 2013 30, 1872-1880*).

Sin embargo, las lesiones graves o las experimentales con mayor pérdida neuronal no pueden ser resueltas, a menos que se descubran medidas terapéuticas eficaces para incrementar de forma significativa el proceso neurogénico. La principal 20 causa del fallo en la reposición neuronal es que los precursores neurales en las regiones lesionadas tienden a diferenciarse en células de glía, mientras la mayoría de los neuroblastos mueren antes de diferenciarse a neuronas maduras dentro de las regiones lesionadas.

Una de las alternativas que podría contribuir a resolver los problemas clínicos que 25 plantean las enfermedades que cursan con pérdida neuronal es el transplante de células madre. Varios laboratorios han intentado esta estrategia en modelos animales transplantados con células madre de origen embrionario (*Cao, Q. et al. Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage. Exp Neurol 2001 167, 48-58*), células madre

neurales de animales adultos (*Pluchino, S., et al. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. Nature 2003 422, 688-694*), o bien con células procedentes de células madre sometidas a diferentes grados de diferenciación *in vitro*. El fenómeno más generalmente observado es 5 que, si bien las células madre que se implantan en las zonas neurogénicas del cerebro se diferencian a neuroblastos y se convierten en neuronas maduras, aquellas que se implantan en zonas del cerebro no neurogénicas inician la ruta de diferenciación glial (*Herrera, D. G., et al. A. Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions in the adult brain. Ann Neurol 1999, 46, 867-877; 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 2005, 80, 229-234*).

Por lo tanto, la presente invención se enfrenta al siguiente problema: si bien las 10 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 transplante se realiza en otras zonas, inician la ruta de diferenciación glial. Por otro lado, en las zonas 15 no neurogénicas del cerebro, las células de glía parenquimal se activan tras una lesión y dan lugar a precursores neurales, pero la mayoría de ellos se diferencian a células de glía y muy pocos a neuronas.

Adicionalmente y sin perjuicio de lo anterior, la presente invención también se 20 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 de las fuentes más abundantes. Sin embargo, no es fácil encontrar donantes de 25 precursores embrionarios o fetales, por lo que sería de gran utilidad poder aislar precursores neurales de cerebro adulto, cultivarlos y expandirlos *in vitro* para su posterior uso en trasplantes. Así, identificar agentes que favorezcan la expansión

de los precursores neurales de cerebro adulto en cultivo resultará de gran utilidad en el desarrollo de terapias regenerativas del sistema nervioso.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

5

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1. Efecto de prostratina sobre cultivos de precursores neurales *in vitro*.** Ensayo de neuroesferas: Imágenes representativas de microscopía de contraste de fases de cultivos de precursores neurales crecidos respectivamente en ausencia (A), presencia de prostratina (5  $\mu$ M) (B). La línea blanca representa una distancia de 200  $\mu$ m. (C y D). Efecto de diferentes concentraciones de prostratina sobre el área y número de neuroesferas respectivamente. (E y F) Ensayo de viabilidad: Efecto de prostratina (5  $\mu$ M) sobre el porcentaje de células no viables (E) y sobre el número total de células vivas a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento (F). En todos los casos la proliferación se estimuló mediante la adición del factor de crecimiento bFGF al medio de cultivo. (\* p < 0.05 en test T-Student en relación al control).

**Figura 2. Efecto de prostratina sobre la proliferación de precursores neurales.** (A) Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de cultivos de precursores neurales crecidos respectivamente en ausencia y presencia de prostratina (5  $\mu$ M) en los que se ha detectado la proteína marcadora de células en ciclo celular, Ki67 y el marcador de núcleos, DAPI. La línea blanca representa una distancia de 100  $\mu$ m. (B) Cuantificación del efecto de prostratina sobre el porcentaje de células Ki67+. (C) Efecto de prostratina sobre el porcentaje de núcleos picnóticos. En todos los casos la proliferación se estimuló mediante la adición del factor de crecimiento bFGF al medio de cultivo. (\* p < 0.05).

**Figura 3. Efecto de prostratina sobre la expresión de ciclinas en cultivos de NPCs.** (A) Imágenes de autorradiografías obtenidas después de la inmunodetección de las ciclinas A, E y D1 bajo las condiciones de cultivo indicadas, y de  $\alpha$ -tubulina como control de la carga proteica total. (B-D)

- 5 Cuantificación de la inmunodetección de ciclinas A, E y D1 expresada en relación a los valores de  $\alpha$ -tubulina. (\* p < 0.05, en test T-Student en relación al control sin tratamiento).

**Figura 4. Efecto de 12-desoxiforboles sobre cultivos de NPCs.** (A) Estructura

- 10 química de los 12-desoxiforboles evaluados en el ensayo de neuroesferas. (B) Imágenes representativas de microscopía de contraste de fase de cultivos de precursores neurales crecidos en ausencia (1-2) y presencia de los 12-desoxiforboles (1  $\mu$ M): ER271 (3), ER272 (4), ER14 (5), ER2 (6), ER3 (7) y ER8 (8). La línea blanca representa una distancia de 200  $\mu$ m. (C y D) Efecto de 15 diferentes concentraciones de 12-desoxiforboles sobre el área de las neuroesferas (% del control). En todos los casos la proliferación se estimuló mediante la adición del factor de crecimiento bFGF al medio de cultivo (\* p < 0.05 en test T-Student en relación al control).

- 20 **Figura 5. Efecto de ER271 sobre la proliferación celular en cultivos de precursores neurales *in vitro*.** (A y B) Imágenes representativas de microscopía de contraste de fase de cultivos de precursores neurales crecidos respectivamente en ausencia y presencia de ER271 (1  $\mu$ M). La línea blanca representa una distancia de 200  $\mu$ m. (C y D) Efecto de diferentes concentraciones de ER271 25 sobre el área y el número de neuroesferas, respectivamente. (E) Efecto de ER271 (1  $\mu$ M) sobre el porcentaje de células no viables a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento. En todos los casos la proliferación se estimuló mediante la adición del factor de crecimiento bFGF al medio de cultivo. (\* p < 0.05).

**Figura 6. Efecto de ER272 sobre la proliferación celular en cultivos de precursores neurales *in vitro*.** (A y B) Imágenes representativas de microscopía de contraste de fase de cultivos de precursores neurales crecidos respectivamente en ausencia y presencia de ER272 (1  $\mu$ M). La línea blanca representa una 5 distancia de 200  $\mu$ m. (C y D) Efecto de diferentes concentraciones de ER272 sobre el área y el número de neuroesferas, respectivamente. (E) Efecto de ER271 (1  $\mu$ M) sobre el porcentaje de células no viables a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento. En todos los casos la proliferación se estimulaba mediante la adición del factor de crecimiento bFGF al medio de cultivo (\* p < 0.05).

10

**Figura 7. Efecto del tratamiento con ER271 sobre el porcentaje de células en ciclo celular en cultivos de precursores neurales.** (A) Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de cultivos de precursores neurales crecidos respectivamente en ausencia y presencia de ER271 (1  $\mu$ M) en los que se ha 15 detectado la proteína marcadora de células en ciclo celular, Ki67 y el marcador de núcleos, DAPI. La línea blanca representa una distancia de 100  $\mu$ m. (B) Cuantificación del efecto de ER271 sobre el porcentaje de células Ki67+. En todos los casos la proliferación se estimulaba mediante la adición del factor de crecimiento bFGF al medio de cultivo. (\* p < 0.05).

20

**Figura 8. Efecto del tratamiento con ER272 sobre el porcentaje de células en ciclo celular en cultivos de precursores neurales.** (A) Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de cultivos de precursores neurales crecidos respectivamente en ausencia y presencia de ER272 (1  $\mu$ M) en los que se ha 25 detectado la proteína marcadora de células en ciclo celular, Ki67 y el marcador de núcleos, DAPI. La línea blanca representa una distancia de 100  $\mu$ m. (B) Cuantificación del efecto de ER272 sobre el porcentaje de células Ki67+. En todos los casos la proliferación se estimulaba mediante la adición del factor de crecimiento bFGF al medio de cultivo. (\* p < 0.05).

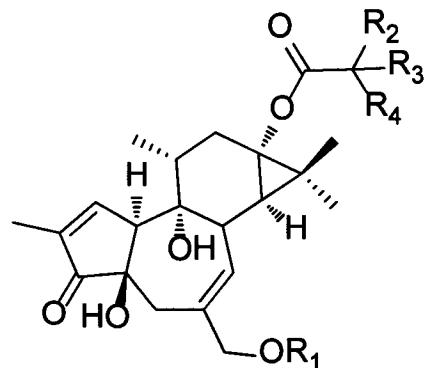
## **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**

La presente invención resuelve el problema de generación de nichos neurogénicos tanto en zonas neurogénicas como no neurogénicas del Sistema Nervioso Central, basándose en el empleo de compuestos de la familia de los 12-desoxiforboles

- 5   Estos compuestos promueven la proliferación de los cultivos celulares de precursores neurales y su perfusión en el cerebro adulto lesionado favorece la proliferación de precursores neurales que posteriormente se diferenciarán a neuronas y repararán el tejido dañado.

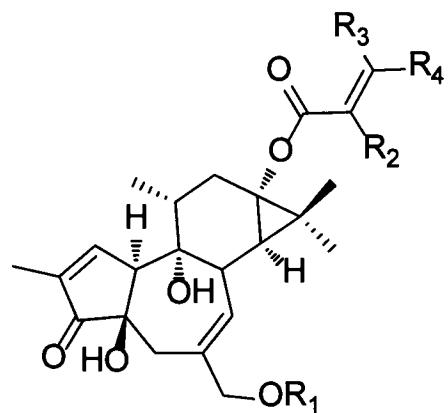
Estos nuevos fármacos basados en 12-desoxiforboles permiten superar la  
10 inhibición de la neurogénesis fuera de regiones neurogénicas y favorecer la generación de nuevas neuronas en estas regiones a partir de precursores neurales, bien endógenos o bien transplantados. Por lo tanto, a la hora de regenerar lesiones, en la región no-neurogénica de la zona lesionada el tratamiento con 12-desoxiforboles incrementa la probabilidad de que las células madre endógenas  
15 como las transplantadas puedan dar lugar a neuronas maduras y funcionales.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención, comprende el uso de compuestos de la familia 12-desoxiforboles o de sales farmacológicamente activas de dichos compuestos, para la elaboración de un medicamento (de aquí en adelante composición farmacéutica de la presente invención) para el tratamiento  
20 de enfermedades o lesiones que cursen con perdida neuronal. La estructura química de estos compuestos se describirá a continuación para las estructuras genéricas Ia y Ib:

Estructura Ia:

Donde  $R_1$  puede ser hidrógeno ó acetilo ( $\text{COCH}_3$ ),  $R_2$  y  $R_3$  pueden ser hidrógeno ó alquilo y  $R_4$  puede ser hidrógeno, metilo ( $\text{CH}_3$ ) ó fenilo (Ph).

5

Estructura Ib:

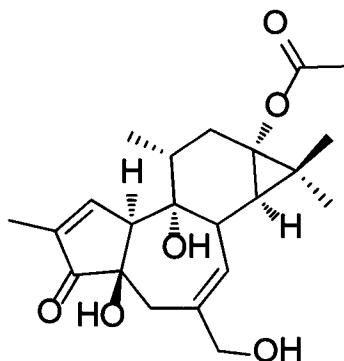
Donde  $R_1$  puede ser hidrógeno ó acetilo ( $\text{COCH}_3$ ),  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  pueden ser hidrógeno ó alquilo.

10

Son ejemplos de compuestos de esta familia:

13-O-Acetyl-12-desoxiforbol con número CAS 60857-08-1 (en adelante prostratina) cuya estructura química es la siguiente:

Estructura II:



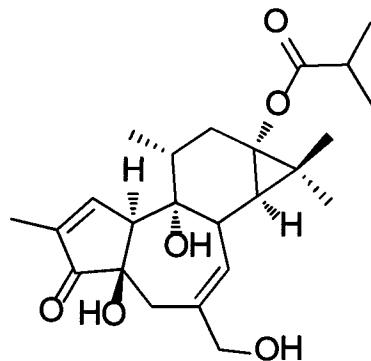
**Prostratina**

5

13-O-Isobutyroil-12-desoxiforbol con número CAS 25090-74-8 (en adelante ER272), cuya estructura química es la siguiente:

Estructura III:

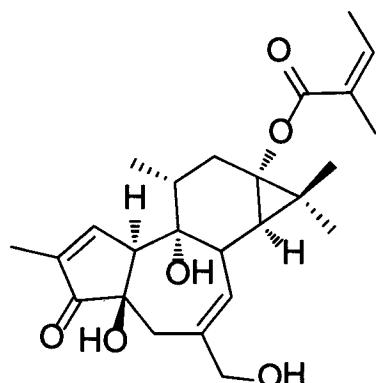
10



**ER272**

13-O-angeloil-12-desoxiforbol con número CAS 28152-96-7 (en adelante ER271) cuya estructura química es la siguiente:

Estructura IV:

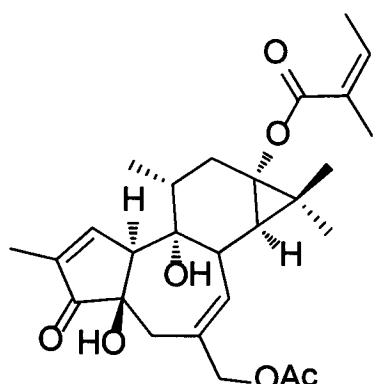


**ER271**

5

20-O-acetyl-13-O-angeloil-12-desoxiforbol con número CAS 25090-72-6 (en adelante ER2) cuya estructura química es la siguiente:

Estructura V:

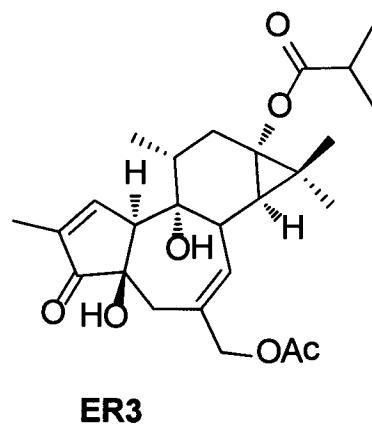


**ER2**

10

20-O-acetyl-13-O-isobutiroil-12-desoxiforbol (en adelante ER3) y cuya estructura química se muestra a continuación.

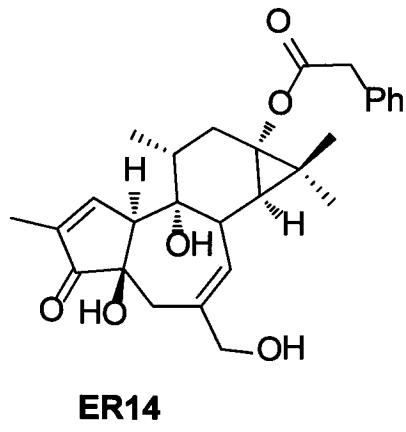
Estructura VI:



5

13-O-Fenilacetil-12-desoxiforbol (en adelante ER14) y cuya estructura química se muestra a continuación.

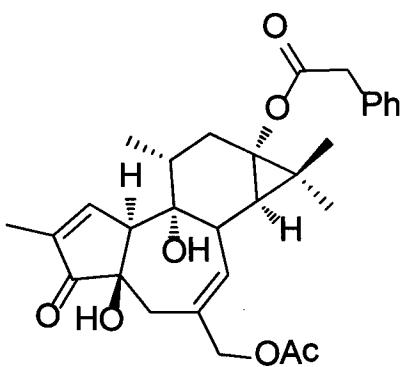
Estructura VII:



10

ó 20-O-Acetyl-13-O-fenilacetil-12-desoxiforbol (en adelante ER8) y cuya estructura química se muestra a continuación.

Estructura VIII:



**ER8**

5

Alternativamente, el primer aspecto de la presente invención se refiere a compuestos de la familia de los 12-desoxiforboles como son prostratina, ER272, ER271, ER2, ER3, ER8 y ER14 o sales farmacológicamente activas de los mismos para su uso en el tratamiento de enfermedades o lesiones que cursen con 10 pérdida neuronal.

En un aspecto concreto de la presente invención, la composición farmacéutica de la presente invención además comprende precursores neurales o células madre neurales. En un aspecto aún más concreto, la composición farmacéutica de la presente invención comprende al menos un excipiente farmacéuticamente 15 aceptable.

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 potencialidad limitada, pues sólo pueden diferenciarse hacia los tres subtipos de células del linaje neural: 20 neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

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

- **Enfermedades neurodegenerativas:** Se producen como consecuencia de la muerte neuronal 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 amiotrófica (ELA), con déficit de neuronas en la médula espinal.
- **Traumatismo craneoencefálico:** es una lesión de origen traumático que incide sobre el cráneo, con afectación cerebral. El daño puede ser focal—limitado a una sola área del cerebro—o involucrar a más de un área del cerebro. En el contexto de esta invención el traumatismo craneoencefálico puede producir daño cerebral por muerte neuronal que podría ser tratado mediante terapias dirigidas a favorecer la regeneración neuronal.
- **Lesión hipóxico-isquémica:** Reducción del flujo sanguíneo cerebral hasta niveles que son insuficientes para mantener el metabolismo necesario para la normal función y estructura del cerebro. En los adultos, la isquemia es causada fundamentalmente por accidentes cerebro-vasculares, que pueden ser focales (de origen isquémico, hemorrágico o mixto), o múltiples (como en la demencia multiinfarto). En el recién nacido, dicha hipoxia/isquemia se debe fundamentalmente a sufrimiento fetal o perinatal. En el contexto de la presente invención la hipoxia-isquemia es una condición que produce sufrimiento celular debido a la falta de aporte de oxígeno al tejido cerebral que en la mayoría de los casos produce muerte neuronal.
- **Infecciones del SNC:** Afectación cerebral por distintos agentes infecciosos que originan meningitis, encefalitis o meningoencefalitis. En el contexto de esta invención, las infecciones del SNC originan sufrimiento celular bien directamente o indirectamente por el edema cerebral que originan, pudiendo causar muerte neuronal.

- **Epilepsia:** Enfermedad crónica caracterizada por uno o varios trastornos neurológicos que deja una predisposición para generar convulsiones recurrentes, que suele dar lugar a consecuencias neurobiológicas, cognitivas y psicológicas.
- 5 En un aspecto aún más particular de la presente invención, las enfermedades o lesiones que cursan con pérdida neuronal son isquemia cerebral focalizada, traumatismo craneoencefálico con daño neuronal, Parkinson, epilepsia y esclerosis lateral amiotrófica.
- Un segundo aspecto de la presente invención, se refiere al uso *in vitro* de 10 compuestos de la familia de 12-desoxiforboles como son por ejemplo prostratina, ER272, ER271, ER2, ER3, ER8 y ER14 para favorecer la proliferación de precursores neurales o células madre neurales.
- Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un método (de aquí en adelante método de la presente invención) para la expansión de células madre 15 neurales o precursores neurales *in vitro* que comprende:
- a. poner en contacto células madre neurales o precursores neurales con un rango de concentración desde 1 pmol/L a 40 µmol/L de 12-desoxiforboles, en un medio que no impida la proliferación de las células *madre* neurales o precursores neurales y que comprenda el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y/o el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF); y
  - b. cosechar posteriormente las células.
- Para utilizar compuestos de la familia de 12-desoxiforboles como por ejemplo prostratina, ER272, ER271, ER2, ER3, ER8 y ER14 en un 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 dimetilsufóxido, agua o similares. Adicionalmente este compuesto puede estar disuelto en tampón fosfato salino (PBS).

En un aspecto particular de la invención, para cultivar las células madre neurales con 12-desoxiforboles se añade el compuesto de la familia de 12-desoxiforboles como por ejemplo prostratina, ER272, ER271, ER2, ER3, ER8 y ER14 en un rango de concentración desde 1 pmol/L a 40  $\mu$ mol/L. Las células madre se 5 cultivan en flotación a una densidad de 20 a 200 x  $10^6$  células/L. El compuesto se añade a un cultivo estático a 37°C durante 1 a 14 días en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, 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 10 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 2 $\mu$ g/ml de gentamicina. Adicionalmente el medio debe contener bien el factor de crecimiento epidérmico (EGF), preferiblemente a una concentración 20 $\mu$ g/L, el factor de básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), 15 preferiblemente a una concentración de 10 $\mu$ g/L, o una mezcla de ambos.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un medio de cultivo (de aquí en adelante medio de cultivo de la presente invención), adecuado para la proliferación de células *madre* neurales o precursores neurales, que comprenda un compuesto de la familia de 12-desoxiforboles como son por ejemplo prostratina, 20 ER272, ER271, ER2, ER3, ER8 y ER14, en un rango de concentración de 1 pmol/L a 40  $\mu$ mol/L.

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

25 Un sexto aspecto de la invención se refiere a una población de células madre neurales o precursores neurales obtenibles por el método de la presente invención.

Un séptimo aspecto de la presente invención se refiere al uso de la población de células madre neurales o precursores neurales obtenibles por el método de la

presente invención para la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento de enfermedades o lesiones que cursen con perdida neuronal.

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

5

**EJEMPLO 1. Efecto de prostratina sobre las células madre neuronales**

Se ha investigado la actividad biológica del compuesto prostratina sobre las células madre neurales extraídas de la zona subventricular de ratones postnatales de 7 días. Se ha utilizado el denominado “ensayo de neuroesferas”. El fundamento 10 de este ensayo es que los precursores neurales cuando se cultivan en condiciones de flotación y no están adheridos al sustrato del material sobre el cual se realiza el cultivo, proliferan formando unos agregados llamados neuroesferas formados por las células proliferantes y su progenie.

Para realizar este ensayo, las paredes laterales de los ventrículos laterales de la 15 zona subventricular de ratones posnatales de 7 días (P7), fueron extraídas y disociadas enzimáticamente en LCR Ca<sub>2</sub> bajo Mg<sub>2</sub> alto (5 mM KCl, 124 mM NaCl, 3.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM CaCl<sub>2</sub>, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 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 5 minutos y resuspendido en LCR normal (5 20 mM KCl, 124 mM NaCl, 1.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, y 10 mM glucosa). Fue incubado a 37°C durante 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 25 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 µL de suplemento B<sub>27</sub>, 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%

- CO<sub>2</sub>. Después de 1–2 días en estas condiciones se forman los agregados celulares llamados neuroesferas. Los subcultivos fueron pasados cada 3-4 días por 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 5 nuevos frascos con medio fresco para obtener nuevas neuroesferas. Los experimentos se llevaron a cabo entre los pasos 3 y 5.
- Una vez obtenidas las neuroesferas se analizó el efecto de prostratina sobre las células madre neurales a distintas concentraciones. Para ello las neuroesferas fueron centrifugadas y las células fueron resuspendidas y disgregadas en medio 10 definido de neuroesferas y sembradas 20 células /μL a la que se le añadió el factor de crecimiento bFGF (10 ng/mL). Prostratina se añadió al mismo tiempo poniendo en cada pocillo una concentración diferente. Se utilizaron 5 pocillos para las diferentes concentraciones (Control, 1μg/ml, 5μg/ml, y 10 μg/ml) y por triplicado. Los experimentos se llevaron a cabo de modo que la persona que toma 15 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.
- 20 Se observó cómo el área de las neuroesferas aumentaba en los cultivos tratados con prostratina de manera dosis-dependiente hasta la concentración de 10μM. Se observó además que el mayor efecto se obtenía a la concentración 5μM pues inducía un mayor aumento del tamaño de las neuroesferas (Figura 1). El incremento en el tamaño de las neuroesferas coincidía con un incremento en el 25 número total de células en los cultivos tratados con prostratina 5 μM, 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 prostratina.

**EJEMPLO 2. Efecto de prostratina sobre el porcentaje de núcleos en ciclo celular. Immunocitoquímica frente a Ki67.**

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 detectó mediante 5 immunocitoquímica el marcador Ki67 que detecta aquellos núcleos que están ciclo celular. El análisis se realizó en cultivos control y en cultivos tratados con prostratina 5  $\mu$ M.

Para ello, una vez pasadas las 48 horas de tratamiento, se procedió a fijar las células durante 20 minutos a temperatura ambiente con paraformaldehido (PFA) 10 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 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 15 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 y se incubaron con los anticuerpos secundarios 20 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 prostratina (5 mM) aumentaba el porcentaje de células en ciclo celular con núcleos Ki67<sup>+</sup>, así como el número total de células (núcleos totales teñidos con DAPI). En las células tratadas con prostratina el 25 porcentaje de núcleos Ki67 positivos (Figura 2) era significativamente mayor que en el control, indicando que prostratina activa la proliferación de los precursores neurales.

**EJEMPLO 3.** Efecto de prostratina sobre la expresión de ciclinas. Las ciclinas son proteínas que determinan la entrada de la célula en distintas fases del ciclo celular y su expresión es indicadora de proliferación. La expresión de ciclinas tipo D está regulada por señales mitogénicas, de esa manera, estas proteínas son los

- 5 principales sensores de un microambiente que favorece el crecimiento celular. Con el fin de evaluar el efecto de los 12-desoxiforboles sobre la expresión de ciclinas, se llevó a cabo el tratamiento de las células en presencia y ausencia de prostratina con y sin bFGF. Transcurrido el tiempo de incubación y tratamiento, las células fueron lisadas y procesadas para realizar un western-blot. Como se 10 indican los resultados en la figura 3, la prostratina presenta un leve efecto sobre la expresión de ciclina A, cuando las células fueron tratadas con bFGF. Por otro lado, el aumento de la cantidad de ciclina D1 y E es mayor en presencia de prostratina, siendo más del doble con respecto a sus controles. Cuando las células crecieron en 15 medio con prostratina y bFGF los valores correspondientes a las cantidades de proteínas son notablemente más altos que en el resto de las condiciones. Indicando que prostratina incrementa la concentración de ciclinas, proteínas que 20 determinan la entrada en ciclo celular.

**EJEMPLO 4.** Efecto de 12-desoxiforboles aislados de *Euforbia resinifera* sobre

- la formación de neuroesferas en cultivos de precursores neurales.

Se ha investigado la actividad biológica de compuestos de la familia de los 12-desoxiforboles sobre cultivos de células madre neurales extraídas de la zona subventricular de ratones postnatales de 7 días. Siguiendo la metodología indicada en el ejemplo 2, se analizó el efecto de ER271, ER272, ER2, ER3, ER8, y ER14 25 sobre la formación de neuroesferas en cultivos de precursores neurales.

Se seleccionaron seis 12-desoxiforboles aislados en *E. Resinifera* (ER271, ER272, ER2, ER3, ER8 y ER14). Los resultados se exponen en la figura 4. Los seis 12-desoxiforboles fueron evaluados mediante ensayos de neuroesferas tratados con concentraciones crecientes de los mismos (1, 5, 10  $\mu$ M). Se observó que el

tratamiento con todos los 12-desoxiforboles evaluados incrementaban el área de neuroesferas a, al menos, una de las concentraciones evaluadas. Los 12-desoxiforboles ER271, ER272 y ER14 fueron capaces de incrementar el tamaño de las neuroesferas con un máximo de actividad a la concentración 1 $\mu$ M. El 5 tratamiento con ER2 aumentaba el tamaño de las neuroesferas de forma dependiente de dosis, alcanzando un aumento del 200% en el tamaño de las neuroesferas a la concentración 10  $\mu$ M. El tratamiento con ER3 aumentaba la proliferación tanto como ER2, aunque la concentración necesaria para ver el efecto máximo era 1  $\mu$ M. El tratamiento con ER8 sólo aumentaba el tamaño de las 10 neuroesferas en un 20% y sólo a la concentración de 1  $\mu$ M comparando con el control.

**EJEMPLO 5:** Estudio detallado del efecto proliferativo de ER271 y ER272 sobre la proliferación de los precursores neurales.

15 De modo arbitrario se seleccionaron el ER271 y ER272 para estudiar este efecto más detenidamente.

En primer lugar utilizando el ensayo de neuroesferas estimulados con bFGF, se analizó el efecto de concentraciones menores de ER271 y ER272 (0.1, 0.25, 0.5 y 1  $\mu$ M) y se midieron los efectos sobre área y número de neuroesferas 20 comparándolas con el control sin tratamiento. Tanto con ER271 como con ER272 se observó un aumento en el área de las neuroesferas a las concentraciones 0.25 y 0.5  $\mu$ M (Figuras 5 y 6). Este aumento era similar al obtenido con la concentración de 1  $\mu$ M. No se observaron cambios significativos en el número de neuroesferas. En el ensayo de viabilidad celular se observó que tanto ER271 como ER272 25 incrementaban de forma significativa la supervivencia de las células (Figuras 7 y 8). Los resultados de la inmunodetección de Ki67 en cultivos tratados con ER271 y ER272 indicaron que ambos compuestos eran capaces de aumentar de forma significativa el porcentaje de células Ki67<sup>+</sup>.

Obtención de 12-desoxiforboles de *Euphorbia resinifera*.

Los 12-desoxiforboles 13-*O*-angeloil-12-desoxiforbol o **ER271**, 13-*O*-isobutiroil-12-desoxiforbol o **ER272**, 13-*O*-fenilacetil-12-desoxiforbol o **ER14**, 20-*O*-acetil-13-*O*-angeloil-12-desoxiforbol o **ER2**, 20-*O*-acetil-13-*O*-isobutiroil-12-desoxiforbol o **ER3** y 20-*O*-acetil-13-*O*-fenilacetil-12-desoxiforbol o **ER8** fueron obtenidos por aislamiento y purificación a partir del látex de *Euphorbia resinifera* colectada en Tanant, Marruecos (Diciembre, 2007). La obtención de los productos purificados se realizó a partir del extracto metanólico del látex de la planta y sometido a un fraccionamiento posterior mediante cromatografía en gel de sílice y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC); este fraccionamiento fue controlado mediante cromatografía en capa fina. Los productos fueron identificados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Los datos espectroscópicos de los productos obtenidos en *E. resinifera* coinciden plenamente con los datos reportados previamente en la literatura.

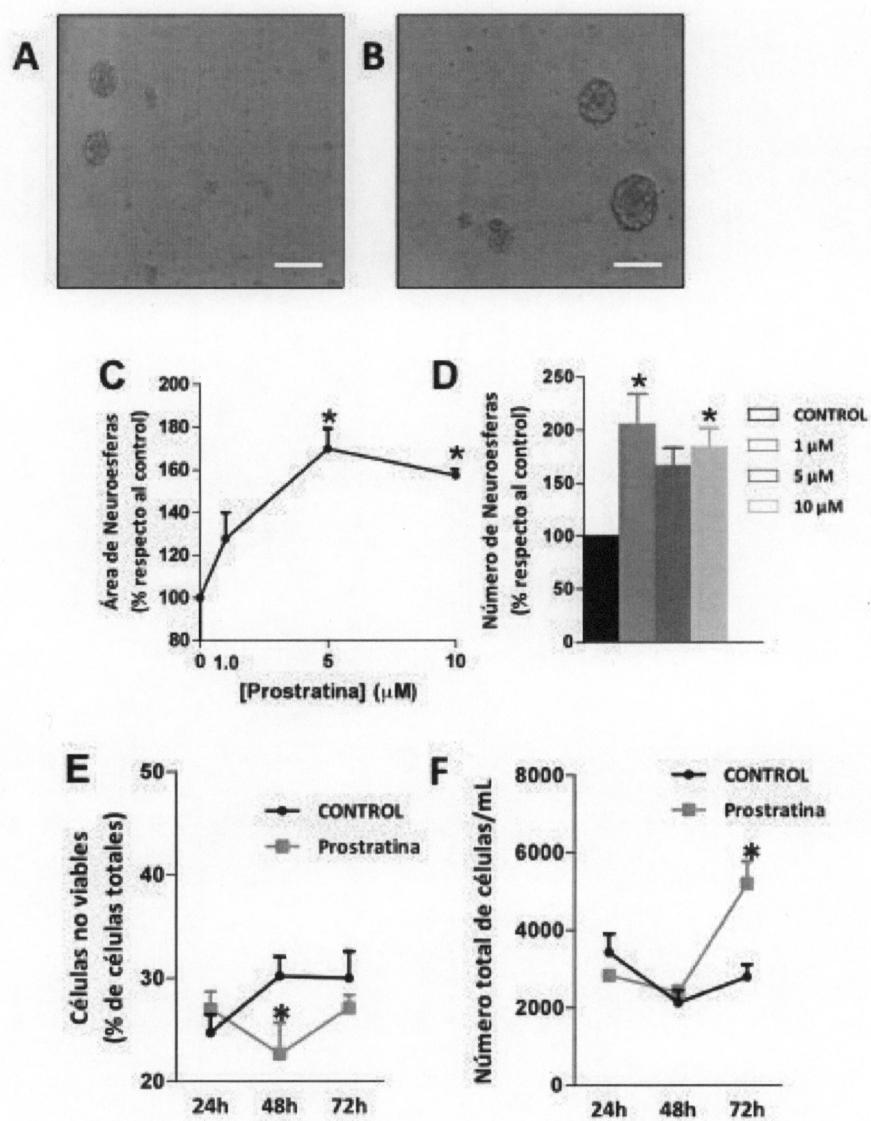
**REIVINDICACIONES**

1. Uso *in vitro* de compuestos de la familia de los 12-desoxiforboles tales como los detallados en las estructuras Ia y Ib o una sal farmacológicamente activa de los mismos, para favorecer la proliferación de precursores neurales o células madre neurales en cultivo.
2. Uso *in vitro* del compuesto según la reivindicación 1 denominado 13-O-acetil-12-desoxiforbol para favorecer la proliferación de precursores neurales o células madre neurales en cultivo.
3. Uso *in vitro* del compuesto según la reivindicación 1 denominado 13-O-Isobutiroil-12-desoxiforbol para favorecer la proliferación de precursores neurales o células madre neurales en cultivo.
4. Uso *in vitro* del compuesto según la reivindicación 1 denominado 13-O-angeloil-12-desoxiforbol para favorecer la proliferación de precursores neurales o células madre neurales en cultivo.
5. Uso *in vitro* del compuesto según la reivindicación 1 denominado 20-O-acetil-13-O-angeloil-12-desoxiforbol para favorecer la proliferación de precursores neurales o células madre neurales en cultivo.
6. Uso *in vitro* del compuesto según la reivindicación 1 denominado 20-O-acetil-13-O-Isobutiroil-12-desoxiforbol para favorecer la proliferación de precursores neurales o células madre neurales en cultivo.
7. Uso *in vitro* del compuesto según la reivindicación 1 denominado 20-O-acetil-13-O-fenilacetil-12-desoxiforbol para favorecer la proliferación de precursores neurales o células madre neurales en cultivo.
8. Uso *in vitro* del compuesto según la reivindicación 1 denominado 13-O-fenilacetil-12-desoxiforbol para favorecer la proliferación de precursores neurales o células madre neurales en cultivo.

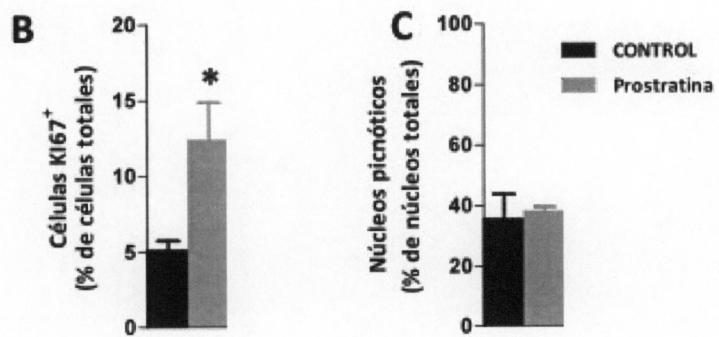
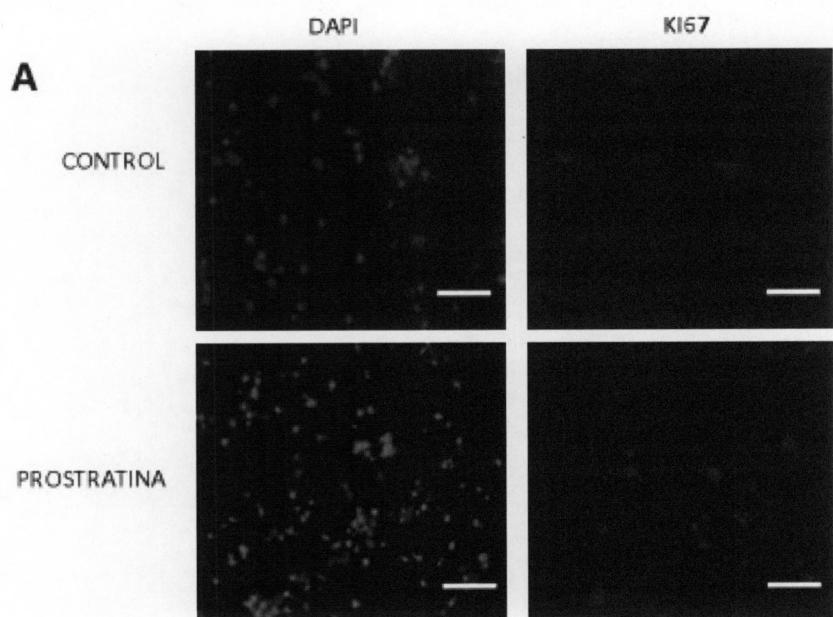
9. Método para la proliferación de células madre neurales o precursores neurales *in vitro* que comprende:
- Disolver un compuesto de la familia de 12-desoxiforboles o cualquiera de los compuestos recogidos en las reivindicaciones 2-8 o una sal farmacológicamente activa de los mismos en una solución que pueda disolver tanto el compuesto como su sal farmacéuticamente aceptada; y
  - Poner en contacto células madre neurales o precursores neurales con la disolución descrita en (a), en un medio adecuado para la proliferación de las células *madre* neurales o precursores neurales y que comprenda el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y/o el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF); y donde los compuestos de la familia de 12-desoxiforboles o cualquiera de los compuestos recogidos en las reivindicaciones 2-8 o una sal farmacológicamente activa de dichos compuestos se hallen en el medio en un rango de concentración de 1 pmol/L a 40 µmol/L.
10. Medio de cultivo adecuado para la proliferación de células madre neurales o precursores neurales *in vitro*, que comprenda un compuesto de la familia de 12-desoxiforboles o cualquiera de los compuestos recogidos en las reivindicaciones 2-8 y/o una sal farmacológicamente activa de dichos compuestos.
11. Medio de cultivo según la reivindicación 10, que además comprenda el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y/o el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y donde los compuestos de la familia de 12-desoxiforboles o cualquiera de los compuestos recogidos en las reivindicaciones 2-8 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.

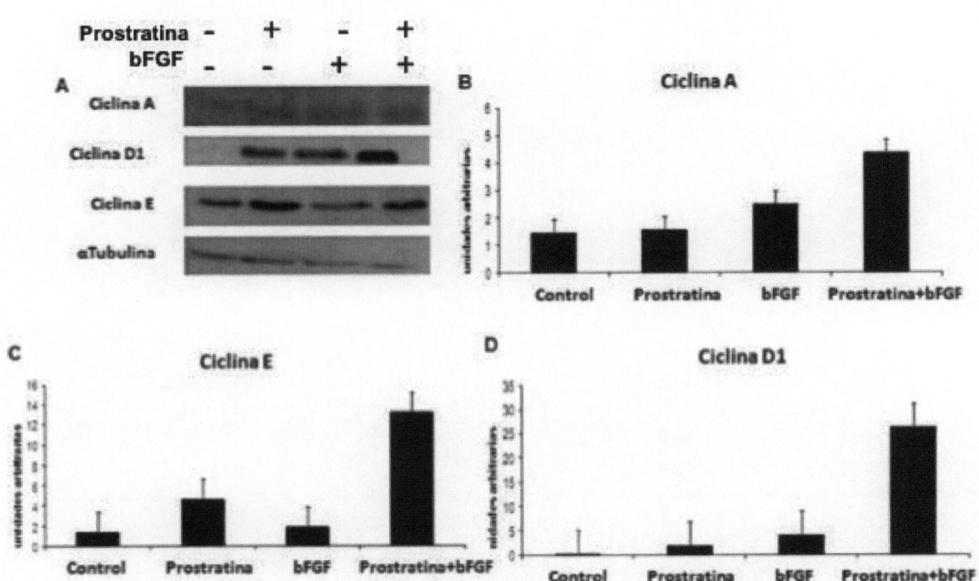
12. Uso del medio de cultivo según cualquiera de las reivindicaciones 10 o 11, para favorecer la proliferación de precursores neurales o células madre neurales en cultivo.
13. Precursores neurales o células madre neurales obtenibles por el método de la reivindicación 9.
14. Uso de compuesto de la familia de 12 desoxiforboles o cualquiera de los compuestos recogidos en las reivindicaciones 2-8 y/o una sal farmacológicamente activa de dichos compuestos, para la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento de enfermedades o lesiones que cursen con perdida neuronal seleccionadas del grupo que consiste en: isquemia cerebral focalizada, traumatismo craneoencefálico con daño neuronal, Parkinson, epilepsia y esclerosis lateral amiotrófica.
15. Uso según la reivindicación 14, que además comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
16. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, que además comprende una población de precursores neurales o células madre neurales.
17. Uso según la reivindicación 16, donde dicha población de precursores neurales o células madre neurales es la población de la reivindicación 13.

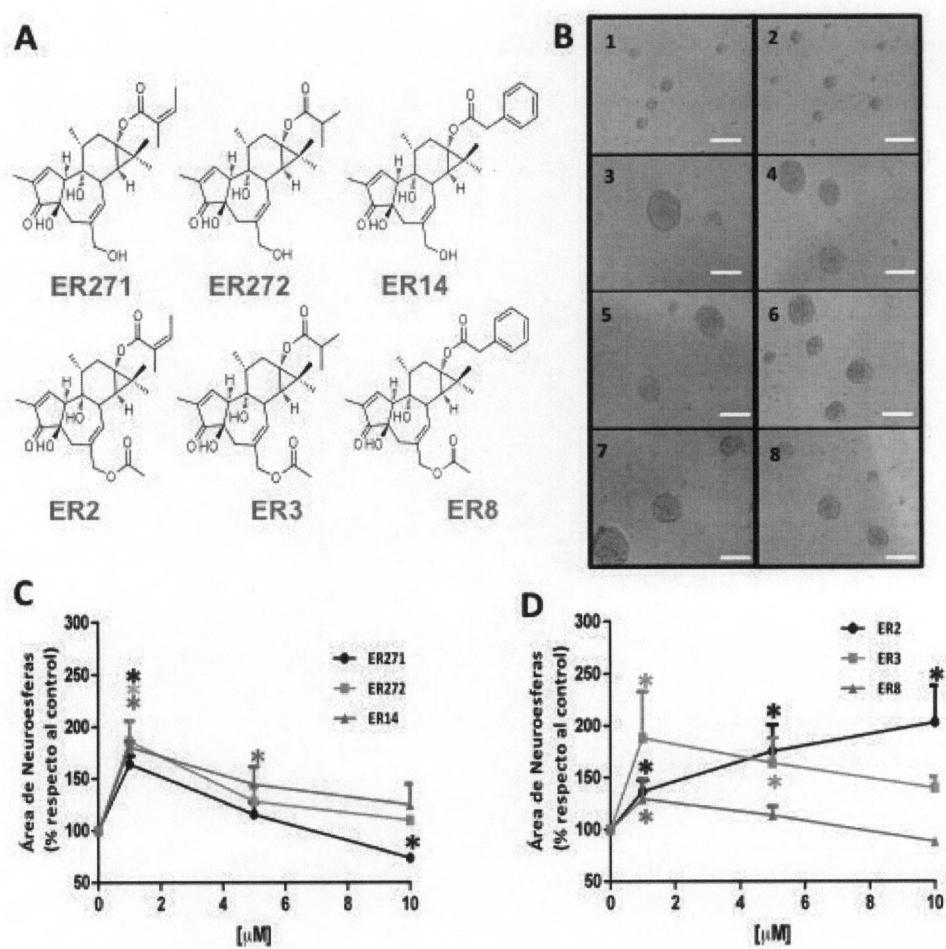
20

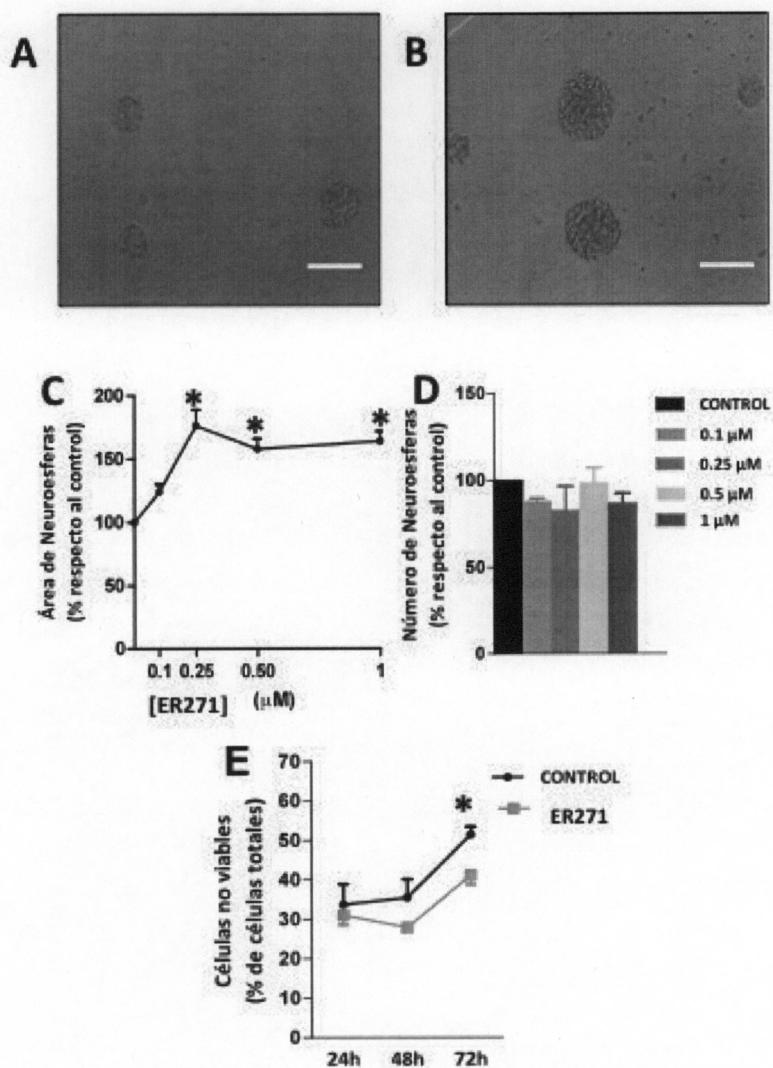
**Figura 1**

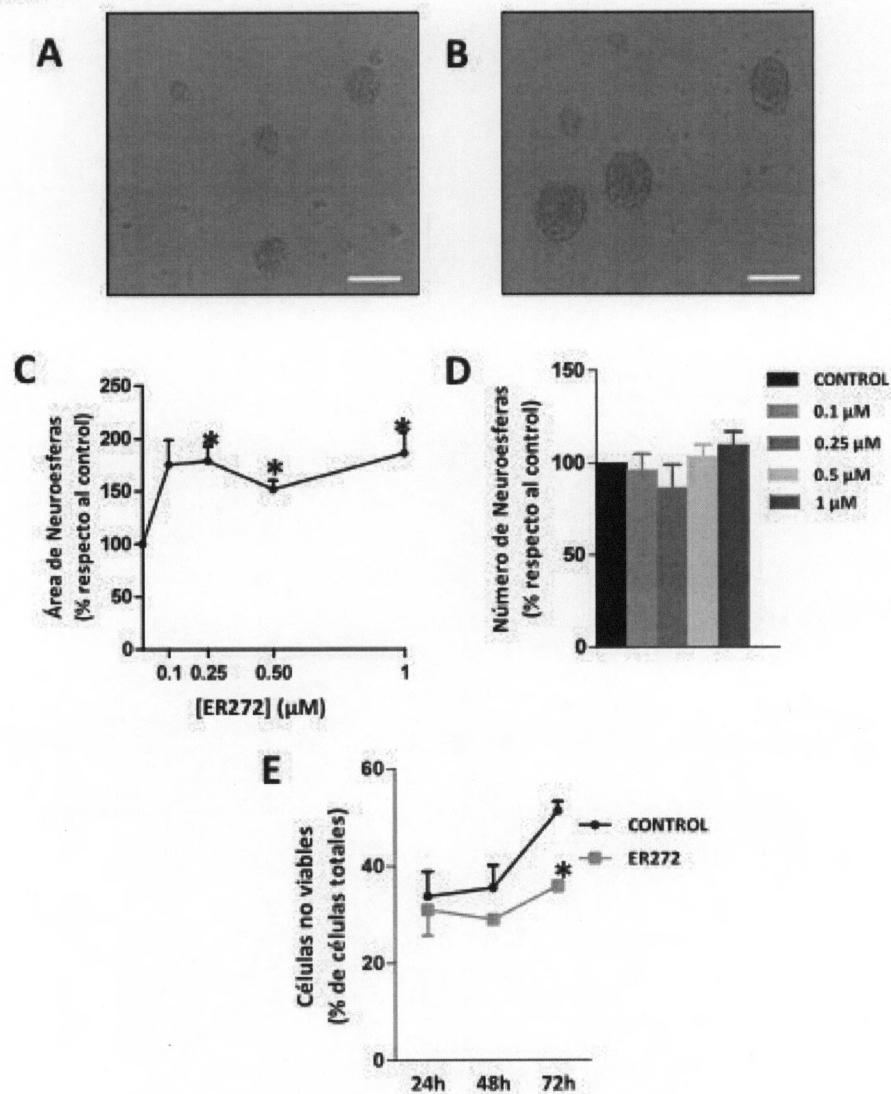
**Figura 2**



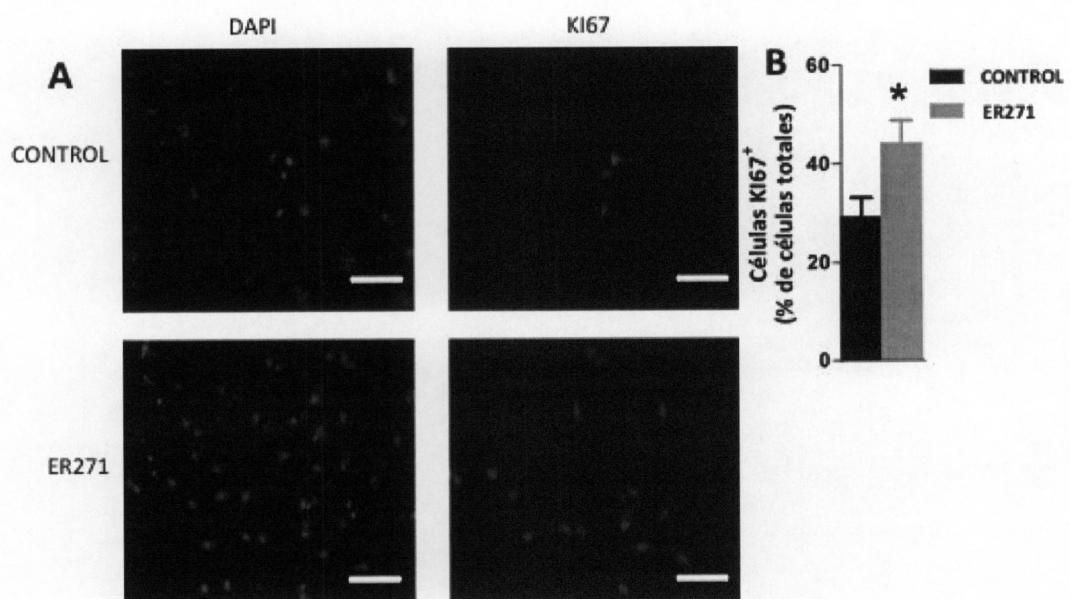
**Figura 3.**

**Figura 4**

**Figura 5**

**Figura 6**

**Figura 7**



**Figura 8**

