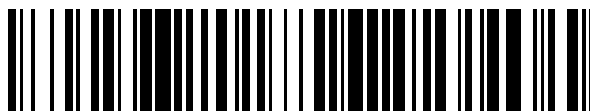


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 475**

51 Int. Cl.:

C07D 409/14 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

C12N 5/0797 (2010.01)

G01N 33/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2011 E 11744969 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015 EP 2536712**

54 Título: **Derivados de oligotiofeno como sondas moleculares**

30 Prioridad:

16.02.2010 US 304820 P

16.02.2010 SE 1050150

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

01.07.2015

73 Titular/es:

CELLUMINOVA AB (100.0%)

Laxholmstorget 3

602 21 Norrköping, SE

72 Inventor/es:

HERMANSSON, OLA;

KONRADSSON, PETER;

ÅSLUND, ANDREAS;

ILKHANIZADEH, SHIRIN;

SIMON, ROZALYN y

NILSSON, PETER

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 539 475 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivados de oligotiofeno como sondas moleculares

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a nuevos derivados de oligotiofeno y a su uso como sondas moleculares. En particular, se contempla el uso de los derivados de oligotiofeno como sondas moleculares para detectar, identificar, separar y aislar células madre neuronales.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Las afecciones neurológicas afectan a un segmento grande de la población humana. Con la expectativa de que el porcentaje de gente que alcance la tercera edad en las próximas décadas aumente, también es de esperar, sin duda, que el porcentaje de gente afligida por una afección neurológica se incremente.

Una de las afecciones neurológicas más prevalentes es la apoplejía, causa principal de discapacidad en todo el mundo. Más allá de las terapias de rehabilitación tras una apoplejía, una vez que la recuperación tras una apoplejía ha alcanzado un nivel estacionario y los déficits neurológicos han quedado fijos, no existen tratamientos aceptados para mejorar dichos déficits neurológicos.

- 15 Las células madre, tal como las células madre neuronales, normalmente son identificadas, caracterizadas y separadas de otras células mediante técnicas inmunohistológicas, tal como mediante anticuerpos, dirigidos a distintas dianas biomoleculares. Sin embargo, dichas técnicas están cargadas de limitaciones - la mayoría de los marcadores actuales no son suficientemente específicos y selectivos para detectar e identificar células madre neuronales en un sistema biológico complejo. Adicionalmente, la mayoría de los marcadores existentes requieren
20 métodos de detección secundarios, lo cual requiere mucho tiempo. También es posible marcar células seleccionadas genéticamente, por ejemplo, con una proteína fluorescente tal como GFP, pero dicho marcaje requiere de técnicas genéticas o invasivas y por tanto una modulación y casi con total seguridad una selección de las células.

- 25 Por consiguiente, las células específicas, p.ej. las células madre neuronales, son identificadas con diversos marcadores. Normalmente, se usa un conjunto de marcadores adecuados detectables por anticuerpos específicos, donde algunos son más selectivos que otros para el tipo de célula específico analizado. Sin embargo, es el uso combinado de varios marcadores el que detecta e identifica el tipo celular, p.ej., las células madre neuronales. Por tanto, cada tipo de célula, tal como una célula madre neuronal, tiene una determinada combinación de marcadores sobre su superficie que la hace distinguible de otros tipos de células.

- 30 Sin embargo, el uso de un conjunto de marcadores menos específicos para detectar e identificar tipos celulares tales como las células madre neuronales, es un procedimiento lento e ineficiente, y también poco preciso. También es difícil usar un conjunto de anticuerpos para la selección específica y el aislamiento de células neuronales, o, alternativamente, el uso de un método de purificación basado en varias etapas secuenciales de aislamiento usando un marcador en cada etapa. Éste último puede prolongar aún más el proceso de aislamiento generando una pérdida
35 de viabilidad y calidad de las células aisladas.

Por lo tanto, es necesario el desarrollo de moléculas para la identificación selectiva y específica de moléculas diana sencillas altamente específicas de células madre neuronales.

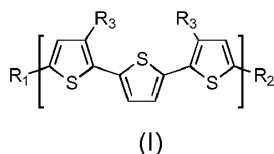
- 40 Las moléculas en las que dos o más anillos de tiofeno están unidos se denominan oligotiofenos. Dichos compuestos poseen propiedades ópticas y electrónicas interesantes. Como ejemplos, están la fluorescencia, la semiconductancia y la emisión de luz, si se estimulan correctamente. Una de las propiedades más destacadas de los oligotiofenos es su fluorescencia. Cambiando su estructura es posible obtener emisiones en el espectro visible completo.

Åslund et al han publicado una nueva clase de derivados de oligotiofeno definidos químicamente para la detección de agregados de proteína patógenas (Åslund et al., ACS Chem. Biol. 2009, 4, 673-684).

- 45 Por lo tanto, existe la necesidad de encontrar marcadores más selectivos y específicos para células madre, particularmente células madre neuronales, para detectar e identificar dichas células, y para permitir un aislamiento selectivo y específico de dichas células usando una única molécula diana en lugar de un conjunto para mejorar la viabilidad y la calidad de las células aisladas. Por consiguiente, la presente invención busca proporcionar los medios y los métodos que permitan dicha detección, identificación y aislamiento selectivos y específicos de células madre
50 neuronales.

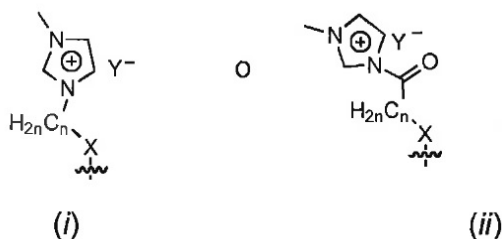
SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Un aspecto de la presente invención proporciona un derivado de oligotiofeno según la fórmula (I)



donde

5 R_3 puede elegirse entre



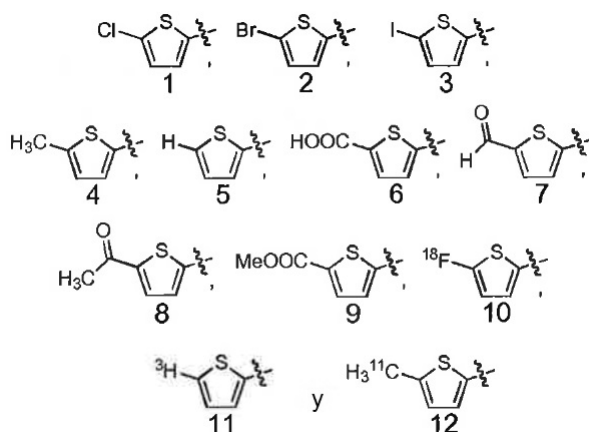
y donde

n varía entre 0 y 3,

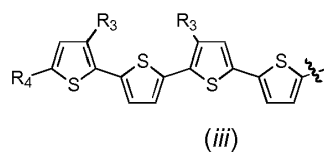
10 Y^- es el contraión aniónico y puede ser, aunque sin limitación, bromo, cloro, yodo, 4-metilbencenosulfonato o cualquier otro anión fisiológicamente posible,

X se puede seleccionar entre O ($n \geq 1$, tal como 1, 2, 3, etc.) ó CH_2 ($n = 0-3$), y

15 cada uno de R_1 y R_2 se selecciona de forma independiente entre 5-clorotiofen-2-ilo (1), 5-bromotiofen-2-ilo (2), 5-iodotiofen-2-ilo (3), 5-metiltiofen-2-ilo (4), tiofen-2-ilo (5), 5-ácido tiofencarboxílico-2-ilo (6), 5-formiltiofen-2-ilo (7), 5-acetiltiofen-2-ilo (8), 2-il-tiofen-5-carboxilato de metilo (9). Adicionalmente, el 5-fluorotiofen-2-ilo (10) puede presentar isótopos enriquecidos de ^{18}F o ^{19}F . Para 5, el protón de la posición 5 puede ser sustituido por un tritio (11) y para 4 el grupo metilo puede constar de un carbono enriquecido isotópicamente tal como ^{11}C (12) (mostrado en la presente memoria a continuación)



En otra realización, R_1 puede ser



donde

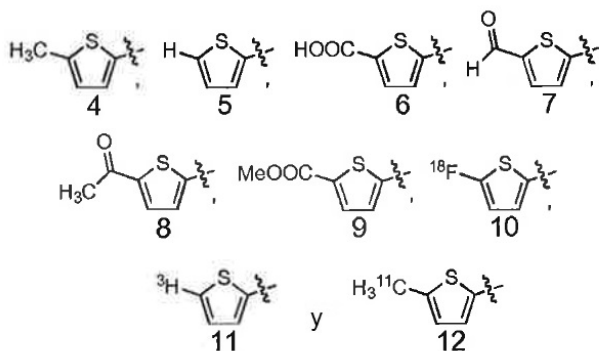
n varía entre 0 y 3

Y⁻ es, como en la anterior fórmula (i), el contraión aniónico y puede ser, aunque sin limitación, bromo, cloro, yodo o 4-metilbencenosulfonato,

5 X se puede elegir entre O ($n \geq 1$) ó CH₂ ($n \geq 0$), y

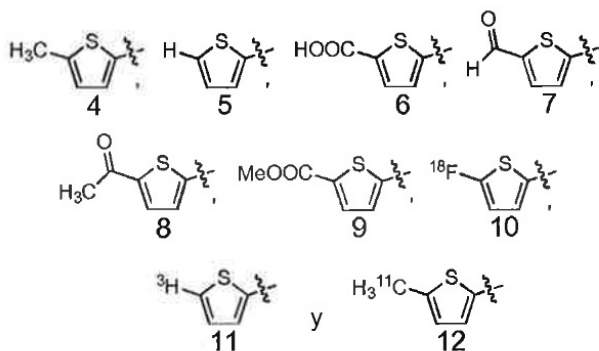
R₄ se selecciona entre bromo, cloro, hidrógeno, yodo, metilo, 5-metiltiofen-2-ilo (4), tiofen-2-ilo (5), 5-ácido tiofencarboxílico-2-ilo (6), 5-formiltiofen-2-ilo (7), 5-acetiltiofen-2-ilo (8) y 2-il-tiofen-5-carboxilato de metilo (9), 5-fluorotiofen-2-ilo (10) con isótopos enriquecidos en ¹⁸F ó ¹⁹F. Comenzando con el 5, el protón de la posición 5 puede ser sustituido por un tritio (11) y para 4 el grupo metilo puede constar de un carbono enriquecido isotópicamente tal como ¹¹C (12).

10

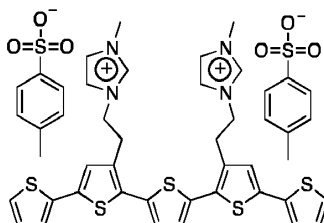


Existen otras realizaciones en las que si R₁ es acorde a la fórmula (iii) entonces R₂ puede seleccionarse entre bromo, cloro, hidrógeno, yodo, metilo, 5-metiltiofen-2-ilo (4), tiofen-2-ilo (5), 5-ácido tiofencarboxílico-2-ilo (6), 5-formiltiofen-2-ilo (7), 5-acetiltiofen-2-ilo (8) y 2-il-tiofen-5-carboxilato de metilo (9), 5-fluorotiofen-2-ilo (10) con isótopos enriquecidos en ¹⁸F ó ¹⁹F (10), 5-tiofen-2-ilo con tritio (11) y 5-metiltiofen-2-ilo enriquecido isotópicamente con ¹¹C (12):

15

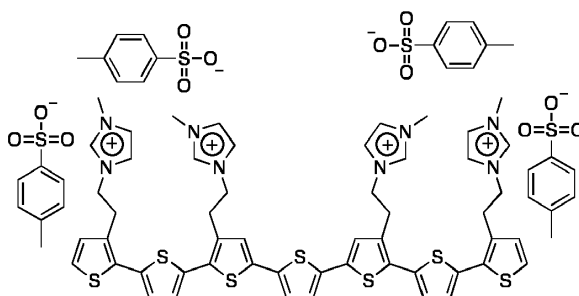


Existen otras realizaciones en las que R₃ es acorde a la fórmula (i), y donde n es 1, X es CH₂, Y⁻ es 4-metilbencenosulfonato, y R₁ y R₂ es 5 según la fórmula



20

Existen otras realizaciones en las que R₃ es acorde a la fórmula (i), y donde n es 1, X es CH₂, Y⁻ es 4-metilbencenosulfonato, R₁ es iii y R₂ es hidrógeno según la fórmula



Existen otras realizaciones en las que los derivados de oligotiofeno según la invención son luminiscentes.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona una composición para detectar células madre neuronales y células madre de cáncer neuronal que comprende cualquiera de los derivados de oligotiofeno según la invención.

- 5 Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un método para detectar células madre neuronales en una muestra biológica *in vitro*, método que comprende las etapas de

a. poner en contacto dicha muestra con un derivado de oligotiofeno según la invención o una composición que comprende al menos un derivado de oligotiofeno según la invención o la composición según la invención, durante un tiempo suficiente para formar al menos un complejo célula madre neuronal - derivado de oligotiofeno,

- 10 b. detectar dichos complejos de célula madre neuronal - derivado de oligotiofeno.

Existen otras realizaciones en las que la cantidad de complejo de célula madre neuronal - derivado de oligotiofeno detectado se compara con un control positivo y/o negativo, detectando de este modo las células madre neuronales.

Existen otras realizaciones en las que la célula madre neuronal es una célula madre de cáncer neuronal.

- 15 Existen otras realizaciones en las que el control positivo comprende células madre neuronales o células madre de cáncer neuronal o partes de las mismas.

Existen otras realizaciones en las que el control negativo no comprende células madre neuronales o células madre de cáncer neuronal.

- 20 En otras realizaciones adicionales, el método comprende además una etapa de puntuar opcionalmente la cantidad de complejo de células madre neuronales - derivados de oligotiofeno o de complejo de células madre de cáncer neuronal - derivados de oligotiofeno.

En otras realizaciones, el método según la invención es un método que se lleva a cabo en un dispositivo de tinción automatizado.

En otras realizaciones adicionales, el método se lleva a cabo manualmente.

En otras realizaciones adicionales, la detección se realiza manualmente.

- 25 Existen otras realizaciones donde la detección se lleva a cabo mediante análisis de imágenes.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para separar células madre neuronales o células madre de cáncer neuronal de otro material biológico en una muestra biológica *in vitro*, método que comprende las etapas de

- 30 a. poner en contacto dicha muestra con un derivado de oligotiofeno según la invención o la composición según la invención, durante un tiempo suficiente para formar al menos un complejo célula madre neuronal - derivado de oligotiofeno o un complejo célula madre de cáncer neuronal - derivado de oligotiofeno,

b. detectar dichos complejos de célula madre neuronal - derivado de oligotiofeno o de célula madre de cáncer neuronal - derivado de oligotiofeno,

- 35 c. separar dicho complejo detectado, separando de este modo las células madre neuronales o las células madre de cáncer neuronal.

Existen realizaciones adicionales donde el método comprende además la etapa de aislar dichas células madre neuronales o dichas células madre de cáncer neuronal.

Existen realizaciones donde el aislamiento se realiza por medios mecánicos, p.ej. usando partículas esféricas, columnas, cribado, etc.

Existen otras realizaciones donde el aislamiento se realiza por medios citométricos de flujo tales como, p.ej., FACS.

En todos los aspectos y realizaciones adicionales, se incluyen tanto las células madre neuronales como las células madre de cáncer neuronal. Tanto juntas, si la muestra biológica comprende ambos tipos de células, como por separado, si la muestra biológica solo comprende células madre neuronales no cancerosas o células madre de cáncer neuronal, respectivamente.

Aspectos adicionales de la invención incluyen los usos de los derivados de oligotiofeno según la invención, o de la composición según la invención, para detectar células madre neuronales *in vitro*,

Otros aspectos proporcionan un kit que comprende

a. un derivado de oligotiofeno según la invención, o una composición según la invención, y

b. opcionalmente, instrucciones para usar el derivado de oligotiofeno o la composición.

Otros aspectos de la invención proporcionan un kit para detectar células madre neuronales *in vitro*, comprendiendo dicho kit

a. un derivado de oligotiofeno según la invención, o la composición según la invención, y

b. opcionalmente, instrucciones para usar el derivado de oligotiofeno o la composición.

Otros aspectos de la invención proporcionan un kit para separar células madre neuronales, comprendiendo dicho kit

a. un derivado de oligotiofeno según la invención, o la composición según la invención, y

b. opcionalmente, instrucciones para usar el derivado de oligotiofeno.

Existen otras realizaciones en las que el kit según la invención comprende además los medios para aislar dichas células madre neuronales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: muestra dos realizaciones de la invención en A) P1 (p-HTMI) y B) P2 (h-HTMI), respectivamente.

Figura 2: muestra histogramas de tinción FACS y la clasificación de células madre neuronales. La Figura 2A muestra el control, la Figura 2B muestra la tinción con el Compuesto 1 (que no se une a células madre neuronales o células madre de cáncer neuronal), la Figura 2C muestra la unión del Compuesto 2 (p-HTMI) a las células madre neuronales. La Figura 2D muestra la tinción de una mezcla del Compuesto 1 y del Compuesto 2 a células madre neuronales, que demuestra una fuerte unión del compuesto 2 (pico a la derecha) con dichas células. La Figura 2E superpone los histogramas del control y del compuesto 1 (pico de la derecha en negrita) y la Figura 2F muestra histogramas solapados del compuesto 2 (pico de la derecha en negrita) y del control.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

"Sujeto" tal cual se usa en la presente memoria denota un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. Preferiblemente, un sujeto según la invención es un humano.

"Al menos uno" tal como se usa en la presente memoria significa uno o más, es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 etc.

"Detección", "detectar", "que detecta" tal como se usan en la presente memoria incluyen la detección cualitativa y/o cuantitativa (niveles de medición) referidos o no a un control, y se refieren además a la identificación de la presencia, la ausencia o la cantidad de una diana dada, específicamente la diana de un derivado de oligotiofeno de la invención.

Tal como se usan en la presente memoria, las formas singulares "uno/a", "y", y "el/la" incluyen los referentes en plural a menos que el contexto dicte lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un anticuerpo" incluye una pluralidad de tales anticuerpos.

"Diagnosis" tal como se usa en la presente memoria abarca la identificación de la naturaleza de una enfermedad.

"Prognosis" tal como se usa en la presente memoria abarca un pronóstico de un resultado probable de una enfermedad, de las perspectivas de recuperación de una enfermedad, indicado por la naturaleza y los síntomas de la enfermedad.

"Sensibilidad", tal como se usa en la presente memoria en el contexto de su aplicación para detectar células madre neuronales en diferentes ensayos o métodos, se refiere a la proporción de todas las muestras biológicas que son identificadas correctamente como tales.

5 "Especificidad" de un ensayo o método, tal como se usa en la presente memoria, se refiere a la proporción de todas las muestras biológicas que son identificadas correctamente como tales.

Tal como se usa en la presente memoria, "células madre neuronales" se refiere a un tipo de célula madre que reside en el cerebro, que puede fabricar nuevas células nerviosas (denominadas neuronas) y otras células que soportan células nerviosas (denominadas gliales). En los adultos, las células madre neuronales se pueden encontrar en áreas muy específicas y muy pequeñas del cerebro, donde se observa un reemplazo de células nerviosas.

10 Tal como se usa en la presente memoria, "células madre de cáncer neuronal" (CMC neuronal) o "células de tipo célula madre de cáncer neuronal" se refiere a un tipo de células madre neuronales de un tumor que tienen la capacidad de auto-renovarse, y que se caracterizan por un crecimiento anormal e incontrolado de dichas células.

15 Tal como se usa en la presente memoria "muestra biológica" o simplemente "muestra" abarca una variedad de tipos de muestras obtenidas de un sujeto cualquiera. Los ejemplos de muestras biológicas útiles en los métodos descritos incluyen, aunque sin limitación, muestras biológicas descritas en la presente memoria tales como, p.ej., muestras de tejidos sólidos tales como un espécimen de biopsia o cultivos celulares o células derivadas de los mismos, y su progenie. Por ejemplo, las muestras biológicas incluyen células obtenidas de una muestra de tejido tomada de un individuo. Por tanto, las muestras biológicas abarcan muestras clínicas, células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisatos celulares y muestras de tejido, p.ej. muestras de tejido procedentes de un cerebro tal como un cerebro adulto, muestras tumorales de cerebro, etc.

20 Las muestras pueden estar frescas o haber sido procesadas tras la recolección (p.ej., con fines de archivo). En algunos ejemplos, las muestras procesadas pueden estar fijadas (p.ej. fijadas en formalina) y/o embebidas en cera (p.ej., en parafina). Los agentes de fijación para preparaciones montadas de células y tejidos son bien conocidos en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, fijador de Bouin en alcohol al 95%; fijador de alcohol al 95%; fijador B5, fijador de Bouin, fijador de formalina, fijador de Karnovsky (glutaraldehído), fijador de Hartman, fijador de Hollande, disolución de Orth (fijador de dicromato) y fijador de Zenker (véase, p.ej., Carson, Histotechnology: A Self-Instructional Text, Chicago:ASCP Press, 1997). En algunos ejemplos, la muestra (o una fracción de la misma) se presenta sobre un soporte sólido.

30 Los soportes sólidos útiles en un método descrito solo necesitan portar la muestra biológica y, opcionalmente, pero de forma ventajosa, permitir una detección adecuada de las células de interés de la muestra. Los ejemplos de soportes incluyen portaobjetos de microscopio (p.ej., portaobjetos de microscopio de vidrio o portaobjetos de microscopio de plástico), cubreobjetos (p.ej., cubreobjetos de vidrio o cubreobjetos de plástico), discos de cultivo de tejidos, placas multi-pocillo, membranas (p.ej., de nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno (PVDF)), partículas esféricas o BIACORE[®]; chips.

35 El término "algoritmo" tal como se usa en la presente memoria se refiere a una fórmula matemática que proporciona una relación entre dos o más cantidades. Dicha fórmula puede ser lineal o no lineal, y puede existir como diversos factores de peso numéricos en la memoria de un ordenador.

40 Con la expresión "que reacciona específicamente con" tal como se usa en la presente memoria se pretende indicar lo mismo que con "capaz de unirse selectivamente" o "que se une específicamente a". Tal como se usan en la presente memoria, las expresiones pretenden significar que los derivados de oligotiofeno según la invención que son capaces de unirse a células madre neuronales y que además se unen al menos 10 veces más fuertemente a las células madre neuronales que a otras células, por ejemplo al menos 50 veces más fuertemente o al menos 100 veces más fuertemente. El derivado de oligotiofeno puede ser capaz de unirse selectivamente a la proteína en condiciones fisiológicas, p.ej. *in vivo*. Los métodos adecuados para medir las fortalezas de unión relativas incluyen el uso de un ensayo competitivo o de un análisis BIACORE[®] (Biacore International AB, Suecia).

45 En los métodos y usos descritos en los que las células madre neuronales son detectadas e identificadas por derivados de oligotiofeno de la invención, se puede usar opcionalmente una escala de puntuación de las células madre neuronales. La escala de puntuación puede ser semi-cuantitativa; por ejemplo, formando la unión del derivado de oligotiofeno con la célula madre neuronal un complejo registrado como 0, 1, 2, 3 ó 4 (que incluye, en algunos casos valores con un más (o un menos) en cada nivel, p.ej. 1+, 2+, 3+, 4+) siendo 0 que prácticamente no se detecta complejo, y siendo 3 (ó 4+) la mayor formación de complejo detectada. En dichos métodos, se mide el aumento o el descenso de la formación de complejos como la diferencia de puntuación con respecto al control aplicable (p.ej., un valor de patrón o una muestra de control); es decir, una puntuación de 4+ en una muestra de ensayo con respecto a una puntuación de 0 para el control, representa un aumento de la formación del complejo en la muestra de ensayo, y una puntuación de 0 en una muestra de ensayo con respecto a una puntuación de 4+ para el control representa una reducción de la formación de complejo en la muestra de ensayo.

El desarrollo de moléculas para la identificación selectiva y específica de células madre neuronales ha recibido una creciente atención debido a su gran potencial para ser usadas como herramientas analíticas en una amplia variedad

de aplicaciones dentro del campo de la biología molecular, la medicina y la biotecnología. Por tanto, como se ha discutido antes, se necesitan marcadores específicos más sensibles y más específicos para identificar células madre neuronales.

5 La presente invención utiliza colorantes moleculares sintéticos de pequeño tamaño que son ventajosos ya que dichos colorantes pueden prepararse químicamente a la carta para identificar selectivamente células madre a través de medios y métodos más sencillos y aun así altamente sensibles y específicos. Los derivados de oligotiofeno luminiscentes y los métodos que usan dichos colorantes para la identificación específica de células madre a través de distintas señales ópticas de los compuestos proporcionados en la presente memoria son altamente apreciados.

10 Como se ha indicado anteriormente, la presente invención proporciona los medios y los métodos para la detección, identificación, separación y aislamiento más sensibles y selectivos de células madre neuronales y de células madre de cáncer neuronal.

Las células madre de cáncer neuronal se encuentran en tejidos de cánceres neuronales. Un ejemplo de cáncer neuronal es el glioma. Un glioma es un tipo de tumor que comienza en el cerebro o la espina dorsal. Se denomina glioma por surge de las células gliales. El sitio más común para los gliomas es el cerebro.

15 Los gliomas se nombran en función del tipo específico de célula con la que tienen más parecido. Los principales tipos de gliomas son:

- Ependimomas - células ependimales.
- Astrocitomas - astrocitos - El glioblastoma multiforme es el astrocitoma más común.
- Oligodendrogliomas - oligodendrocitos.
- Gliomas mixtos, tales como los oligoastrocitomas, que contienen células de diferentes tipos de glía.

20 Los gliomas son difíciles de curar. Se dispone de técnicas quirúrgicas para el oligodendroglioma y el astrocitoma de grado I que son benignos. El pronóstico para pacientes con gliomas de grado alto generalmente es malo, siendo especialmente así para pacientes de edad avanzada. De 10.000 norteamericanos que son diagnosticados cada año con gliomas malignos, aproximadamente la mitad siguen con vida 1 año después del diagnóstico, y el 25% tras dos años. Los que tienen un astrocitoma anaplásico sobreviven aproximadamente tres años. El glioblastoma multiforme tiene un peor diagnóstico, con menos de 12 meses de supervivencia tras el diagnóstico.

25 El tratamiento para los gliomas cerebrales depende de la localización, del tipo celular y del grado de malignidad. A menudo, el tratamiento es una estrategia combinada, que usa cirugía, terapia de radiación y quimioterapia. La terapia de radiación se da en la forma de radiación por haz externo o mediante la opción estereotáctica con radiocirugía. Los tumores de espina dorsal se pueden tratar mediante cirugía y radiación. La temozolomida es un fármaco quimioterapéutico que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica de forma eficaz y se está usando en terapia.

30 Más específicamente, la invención proporciona derivados de oligotiofeno que se unen específicamente a células madre neuronales. Dicho derivado de oligotiofeno es expuesto a una muestra que contiene al menos una célula madre neuronal, con lo que el derivado de oligotiofeno y la célula madre neuronal interactúan, formando un complejo, siendo dicho complejo detectable a través del cambio de luminiscencia del derivado de oligotiofeno en respuesta a la unión con la célula madre neuronal. El cambio de luminiscencia detectado se usa en las aplicaciones posteriores para detectar, identificar, separar o aislar células madre neuronales.

35 Por tanto, la presente invención se basa en las propiedades químicas de la molécula que permiten una captación selectiva (específica) por parte de las células madre neuronales, donde la molécula se vuelve luminiscente en base a las propiedades químicas y estructurales de las interacciones con proteínas dentro de las células madre neuronales.

40 La presente invención se basa en las propiedades químicas de la molécula que permiten una captación selectiva (específica) por parte de las células madre neuronales, donde la molécula se vuelve luminiscente en base a las propiedades químicas y estructurales de las interacciones con proteínas dentro de las células madre neuronales.

La interacción se produce sin enlace covalente y se basa en puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas y no polares - denominadas en la presente memoria enlaces no covalentes y que incluyen también cualquier tipo de enlace que no sea de naturaleza covalente - entre el derivado de oligotiofeno y la estructura molecular de las células madre neuronales.

45 La presente invención utiliza las interacciones entre un derivado de oligotiofeno y una estructura molecular específica de célula madre neuronal, que inducen una restricción configuracional del derivado de oligotiofeno. Además, dichas restricciones conformacionales alteran las propiedades ópticas del derivado de oligotiofeno, dando lugar a un aumento de la emisión del derivado de oligotiofeno. Por tanto, las células madre neuronales son identificadas fácilmente debido a una fluorescencia incrementada distintiva procedente del derivado de oligotiofeno.

50 Adicionalmente, dichos espectros de emisión procedentes del derivado de oligotiofeno unido selectivamente a

diana(s) molecular(es) dentro de las células madre neuronales y no en otros tipos de células diferentes de la diana molecular específica de célula madre neuronal pueden utilizarse para la detección, la identificación, la separación o el aislamiento de dichas células madre.

Los ejemplos de derivados de oligotiofeno que exhiben las características discutidas anteriormente son p-HTMI y h-HTMI (véase la Figura 1A, Fórmula P1, y 1B, Fórmula P2) han demostrado ser útiles para la identificación selectiva de células madre neuronales, mientras que otros politiofenos conjugados y polielectrolitos conjugados similares publicados con anterioridad carecen de dicha propiedad (véase, p.ej., Åslund et al., ACS Chem. Biol. 2009, 4, 673-684). Por tanto, la diferente funcionalización de la cadena lateral de p-HTMI y h-HTMI es necesaria para una interacción selectiva con la diana molecular presente en células madre neuronales. La descripción detallada de la invención que viene a continuación tratará por separado los derivados de oligotiofeno, las células madre y los métodos para la detección, identificación, separación o aislamiento de células madre. Para finalizar, la invención se ilustra a través de ejemplos de una serie de experimentos que demuestran la utilidad de la misma.

Derivados de oligotiofeno

La presente invención se refiere a una variedad de derivados de oligotiofeno, con un número distinto de monómeros que oscila entre 5-10 unidades, consistentes en monómeros derivados de tiofeno o derivados de tiofeno.

Los derivados de oligotiofeno son monodispersos, consisten en cadenas de tiofeno con una longitud de cadena bien definida.

Por tanto, dichos derivados de oligotiofeno según la invención consisten en una o más unidades de trímero de tiofeno. La unidad de trímero consta de un tiofeno con un sustituyente seguido de un tiofeno sin sustituir y, finalmente, viene otro tiofeno con un sustituyente.

La unidad de construcción de trímero puede usarse en diferentes combinaciones, también con otros derivados de tiofeno.

Además, en otras realizaciones adicionales se incluyen monómeros con funcionalidades de cadena lateral aniónicas, catiónicas o zwitteriónicas, cuando los derivados de oligotiofeno están conjugados por cadenas laterales. Las funcionalidades de cadena lateral pueden derivar de, aunque sin limitación, aminoácidos, derivados de aminoácidos, neurotransmisores, monosacáridos, ácidos nucleicos, o combinaciones y derivados químicamente modificados de los mismos.

En otras realizaciones, los oligotiofenos mencionados anteriormente están funcionalizados para una diversidad de instalaciones de imágenes, que incluyen imágenes de resonancia magnética (MRI), imágenes de resonancia de positrón de emisión (EPRI), tomografía de emisión de positrones (PET) o imágenes multi-fotón.

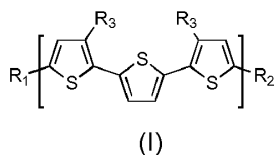
Los radionucleidos usados en el escáner de PET son habitualmente isótopos con vidas medias cortas tales como el carbono-11 (~20 min), nitrógeno-13 (~10 min), oxígeno-15 (~2 min), y flúor-18 (~110 min). Estos radionucleidos se incorporan a los derivados de oligotiofeno según la invención que se unen a las células madre neuronales o a células madre de cáncer neuronal. Dichos compuestos marcados son conocidos como radiotrazadores. Debido a la corta vida media de la mayoría de los radioisótopos, los radiomarcadores deben producirse usando un ciclotrón o un laboratorio de radioquímica que esté próximo a la instalación de imágenes PET. La vida media del flúor-18 es suficientemente larga para que los radiomarcadores de flúor-18 puedan fabricarse comercialmente en una localización no cercana.

Por tanto, existen otras realizaciones en las que las funcionalidades de cadena lateral son, p.ej., aminoácidos, derivados de aminoácido, neurotransmisores, monosacáridos, ácidos nucleicos, o combinaciones y derivados químicamente modificados de los mismos.

Los derivados de oligotiofeno conjugados de la presente invención pueden contener una única funcionalidad de cadena lateral o pueden comprender dos o más funcionalidades de cadena lateral diferentes. Por tanto, existen otras realizaciones adicionales en las que los derivados de oligotiofeno de la presente invención se conjugan con cadenas laterales y en las que las cadenas laterales comprenden una única funcionalidad de cadena lateral o comprenden dos o más funcionalidades de cadena lateral diferentes.

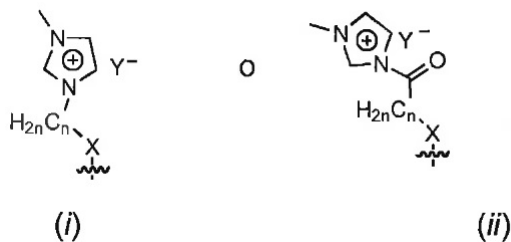
No obstante, en la presente memoria se proporcionan ejemplos, sin pretender ser limitativos de otros evidentes para los especialistas en la técnica, de derivados de oligotiofeno y de sus conjugaciones, funcionalidades, etc.

Por tanto, un aspecto de la presente invención proporciona un derivado de oligotiofeno según la fórmula (I)



en donde

R₃ puede elegirse entre



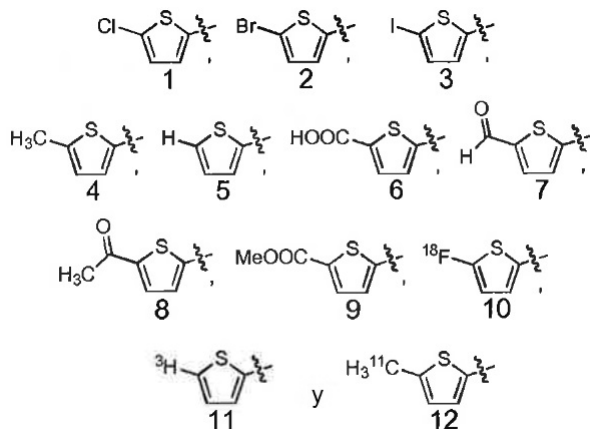
5

y donde

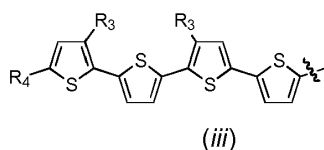
n puede variar entre 0 y 3,

Y⁻ es el contraión aniónico y puede ser, aunque sin limitación, bromo, cloro, yodo o 4-metilbencenosulfonato,

10 X puede elegirse entre O (n ≥ 1) ó CH₂ (n = 0-3), y cada uno de R₁ y R₂ se selecciona de forma independiente del grupo que consiste en 5-clorotiofen-2-ilo (1), 5-bromotiofen-2-ilo (2), 5-iodotiofen-2-ilo (3), 5-metiltiofen-2-ilo (4), tiofen-2-ilo (5), 5-ácido tiofenecarboxílico-2-ilo (6), 5-formiltiofen-2-ilo (7), 5-acetiltiofen-2-ilo (8) y 2-il-tiofen-5-carboxilato de metilo (9), 5-fluorotiofen-2-ilo con isótopos enriquecidos de ¹⁸F ó ¹⁹F (10), 5-tiofen-2-ilo con tritio (11) y 5-metiltiofen-2-ilo con ¹¹C enriquecido isotópicamente (12) mostrado a continuación:



15 En otra realización, R₁ puede ser



y cuando R₁ es (iii),

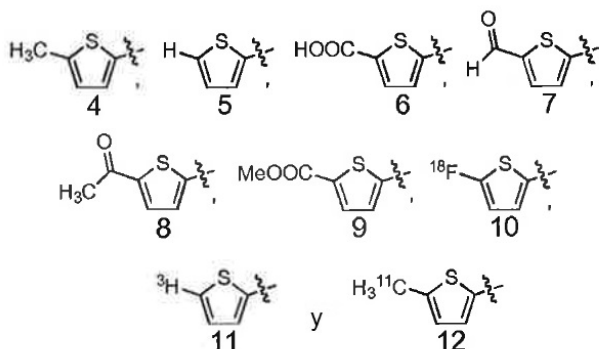
n puede variar entre 0 y 3,

Y⁻ es el contraión aniónico y puede ser, aunque sin limitación, bromo, cloro, yodo ó 4-metilbencenosulfonato, y

X se puede elegir entre O ($n \geq 1$) ó CH_2 ($n \geq 0$), y

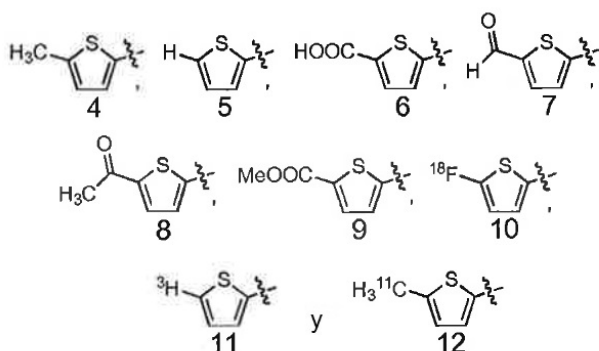
R_4 se selecciona entre bromo, cloro, hidrógeno, yodo, metilo, 5-metiltiofen-2-ilo (4), tiofen-2-ilo (5), 5-ácido tiofenecarboxílico-2-ilo (6), 5-formiltiofen-2-ilo (7), 5-acetiltiofen-2-ilo (8) y 2-il-tiofen-5-carboxilato de metilo (9), 5-fluorotiofen-2-ilo con isótopos enriquecidos de ^{18}F ó ^{19}F (10), 5-tiofen-2-ilo con tritio (11) y 5-metiltiofen-2-ilo con carbono ^{11}C enriquecido isotópicamente (12) mostrado a continuación:

5



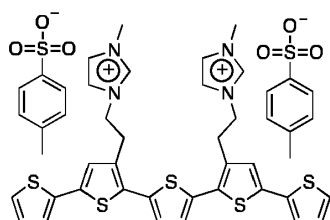
En otras realizaciones adicionales, si R_1 es la fórmula (iii) entonces R_2 puede seleccionarse entre bromo, cloro, hidrógeno, yodo, metilo, 5-metiltiofen-2-ilo (4), tiofen-2-ilo (5), 5-ácido tiofenecarboxílico-2-ilo (6), 5-formiltiofen-2-ilo (7), 5-acetiltiofen-2-ilo (8) y 2-il-tiofen-5-carboxilato de metilo (9), 5-fluorotiofen-2-ilo (10) con isótopos enriquecidos en ^{18}F ó ^{19}F (10), 5-tiofen-2-ilo con tritio (11) y 5-metiltiofen-2-ilo enriquecido isotópicamente con carbono ^{11}C (12), mostrados en las siguientes fórmulas:

10



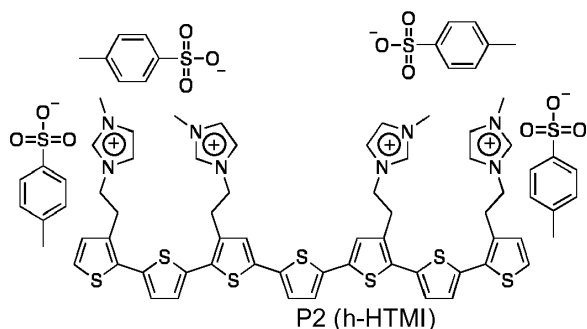
Existen otras realizaciones en las que R_3 es acorde a la fórmula (i), y donde n es 1, X es CH_2 , Y^- es 4-metilbencenosulfonato, R_1 y R_2 son acordes a la fórmula 5, lo que da lugar a la fórmula

15



P1 (p-HTMI)

Existen otras realizaciones adicionales en las que R_3 es (i), n es 1, X es CH_2 , Y^- es 4-metilbencenosulfonato, R_1 es (iii) y R_2 es hidrógeno según la fórmula



Por supuesto, también se contemplan todas las sales farmacéuticamente aceptables de los derivados de oligotiofeno de la presente invención.

5 Los derivados de oligotiofeno según la invención también pueden ser luminiscentes. Por tanto, existen otras realizaciones en las que los derivados de oligotiofeno según la invención son luminiscentes.

Los derivados de oligotiofeno también pueden conjugarse para proporcionar determinadas funcionalidades a dichos derivados de oligotiofeno. Existen otras realizaciones adicionales en las que los derivados de oligotiofeno se conjugan con cadenas laterales para proporcionar al derivado de oligotiofeno determinadas funciones.

10 Los ejemplos son, p.ej., modificaciones mediante unión covalente de polietilenglicol u otro polímero adecuado, y los usos del mismo.

Un ejemplo adicional de modificaciones mediante unión covalente es la unión de una nanopartícula, normalmente con un diámetro < 100 nm, a los derivados de oligotiofeno de la invención.

15 En la presente memoria también se proporciona que los derivados de oligotiofeno según la invención pueden estar marcados directa o indirectamente, con un resto detectable. Con la expresión "marcados directamente" se pretende indicar que el resto detectable está unido al derivado de oligotiofeno. Con la expresión "marcados indirectamente" se pretende indicar que el resto detectable está unido a un ligando, tal como, por ejemplo, un anticuerpo secundario o terciario. El resto detectable puede ser cualquier resto o marcador conocido por los especialistas en la técnica, o tal como se describe en la presente memoria, siendo dicho resto capaz de generar una señal que permita la medición directa o indirecta, cuantitativa o relativa, de una molécula a la cual esté unida.

20 Se conocen ampliamente, y se han publicado, una amplia variedad de restos, o etiquetas, detectables, y de técnicas de conjugación, tanto en bibliografía científica como de patentes. Las etiquetas adecuadas incluyen radionucleidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, partículas magnéticas y otros similares.

25 El resto detectable puede ser un único átomo o molécula, que está implicado, bien directamente o bien indirectamente, en la producción de una especie detectable. Opcionalmente, el resto detectable se selecciona del grupo que consiste en un resto fluorescente, un resto ligado a enzima, un resto biotinilado y un resto radiomarcado, tal como se describe más detalladamente en la presente memoria, p.ej., a continuación. Con "etiqueta" o "resto detectable" se pretende indicar cualquier etiqueta detectable que pueda unirse directamente (p.ej. una molécula fluorescente integrada en un derivado de oligotiofeno) o indirectamente (p.ej., mediante la unión a un derivado de oligotiofeno primario con un reactivo secundario, terciario o superior, tal como p.ej. un anticuerpo con una molécula fluorescente integrada) a la molécula de interés. Por tanto, una etiqueta, marcador o resto detectable es cualquier etiqueta que pueda ser visualizada, por ejemplo, mediante métodos de imagen.

35 En "resto detectable" se incluye adicionalmente el significado de que el resto es tal que, cuando se localiza en el sitio de la estructura diana tras aplicar el derivado de oligotiofeno de la invención o la composición de la invención a una muestra biológica, tal como una muestra de tejido, p.ej. una muestra de tejido cerebral humano, puede detectarse *in vitro*. Eso incluye que el resto detectable es un generador de señal, lo cual también es conveniente, y por tanto se incluye en otras realizaciones si el resto detectable puede ser detectado y si se puede determinar la cantidad relativa y/o la localización del resto (por ejemplo, la localización sobre una muestra de tejido). Los restos detectables son bien conocidos en la técnica.

40 Por tanto, el derivado de oligotiofeno o la composición de la invención son útiles en los métodos que se muestran en los ejemplos de la presente memoria, p.ej., los métodos y usos para la detección *in vitro* de células madre neuronales de muestras biológicas. En otras realizaciones, se usan sistemas de captación de imágenes como los mostrados en los ejemplos de la presente memoria.

45 Los restos detectables adecuados son bien conocidos en la técnica y la unión o ligadura de dichos restos a los derivados de oligotiofeno también es bien conocida en la técnica. Otros ejemplos de restos detectables son una enzima; un sustrato enzimático; un inhibidor enzimático; una coenzima; un precursor enzimático; una apoenzima;

una sustancia fluorescente; un pigmento; un compuesto quimioluminiscente; una sustancia luminiscente; una sustancia colorante; una sustancia magnética; o una partícula metálica tal como oro coloidal; una sustancia radioactiva tal como ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^3H , ^{35}S , ^{18}F , ^{11}C ó ^{14}C ; un derivado fenólico fosforilado tal como nitrofenil fosfato, un derivado de luciferina o un derivado de dioxetano; u otro similar. La enzima puede ser una deshidrogenasa; una oxidorreductasa tal como una reductasa u oxidasa; una transferasa que cataliza la transferencia de grupos funcionales, tal como un grupo amino; carboxilo, metilo, acilo o fosfato; una hidrolasa que puede hidrolizar un enlace tal como un enlace éster, glucósido, éter o péptido; una liasa; una isomerasa; o una ligasa. La enzima también puede estar conjugada a otra enzima. La enzima puede detectarse mediante ciclación enzimática. Por ejemplo, cuando la marca detectable es una fosfatasa alcalina, las mediciones pueden realizarse observando la fluorescencia o la luminiscencia generadas a partir de un sustrato adecuado, tal como un derivado de umbeliferona. El derivado de umbeliferona puede comprender fosfato de 4-metil-umbeliferilo. La etiqueta fluorescente o quimioluminiscente puede ser un isotiocianato de fluoresceína; un derivado de rodamina tal como isotiocianato de rodamina B o isotiocianato de tetrametil rodamina; un cloruro de dancilo (cloruro de 5-(dimetilamino)-1-naftalensulfonilo); un fluoruro de dancilo; una fluorescamina (4-fenilspirofuran-2(3H)il-(3yH)-isobenzofuran 3,3y-diona); una ficobiliproteína tal como una ficocianina o ficoeritrina; una sal de acridinio; un compuesto de luminol tal como lumiferina, luciferasa o acuorina; imidazoles; un éster de ácido oxálico; un compuesto de quelato de elementos de tierras raras tales como europio (Eu), terbio (Tb) o samario (Sm); o un derivado de cumarina tal como la 7-amino-4-metilcumarina. La etiqueta también puede ser un hapteno, tal como la adamantina, el isotiocianato de fluoresceína o el carbazol. El hapteno puede seguir la formación de un agregado cuando se pone en contacto con un anticuerpo multi-valente o un resto que contenga (estrept)avidina. Otros ejemplos adicionales de restos detectables incluyen, aunque sin limitación, los siguientes: radioisótopos, p.ej. ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{90}Y , ^{188}Re ; radionucleidos, p.ej. ^{11}C , ^3H , ^{18}F , ^{64}Cu ; etiquetas fluorescentes, p.ej. FITC, rodamina, fósforos de lantánidos, carbocianina; etiquetas enzimáticas; p.ej. peroxidasa de rábano, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina; grupos quimioluminiscentes de biotililo y epítomos de polipéptido predeterminados reconocidos por una entidad de unión secundaria; p.ej. secuencias de par de cremallera de leucina; sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión de metales, etiquetas de epítomos o proteínas, carbohidratos. En algunas realizaciones, las etiquetas se unen a través de brazos espaciadores de longitudes diversas para reducir los impedimentos estéricos potenciales.

En el marcaje indirecto, se pone en contacto, o se genera en su sitio, una molécula o resto adicional con los complejos de derivado de oligotiofeno - célula madre neuronal o de derivado de oligotiofeno - célula madre neuronal. Por ejemplo, se puede unir o asociar un resto detectable tal como una enzima al derivado de oligotiofeno detector, tal como se muestra en los ejemplos de la presente memoria. La molécula generadora de señal puede generar entonces una señal detectable en el sitio del complejo. Por ejemplo, una enzima, cuando se le suministra el sustrato adecuado, puede producir un producto visible o detectable en el sitio del complejo.

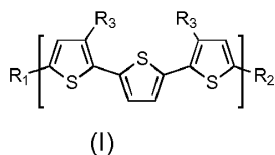
Como ejemplo adicional de marcaje indirecto, una molécula adicional (que puede denominarse agente de unión) se puede unir a la estructura diana de interés o al derivado de oligotiofeno de interés y se puede poner en contacto con el complejo. La molécula diana puede tener una molécula generadora de señal o un resto detectable. La molécula adicional también puede ser, o incluir, un par de moléculas o restos que se pueden unir uno al otro, tal como las moléculas de biotina/avidina, y entonces el anticuerpo de detección o la molécula de detección incluye al otro miembro del par.

Este sistema puede comprender además los medios necesarios para proporcionar una amplificación de señal. Los ejemplos de agentes de unión con amplificación de señal son derivados de oligotiofeno según la invención tales como los derivados de oligotiofeno biotinilados (p.ej., conjugados con avidina/estreptavidina) o la Proteína A estafilococal (se une a IgG), la Proteína G, dextrano, aptámeros, proteínas, péptidos, moléculas orgánicas pequeñas, compuestos naturales (p.ej., esteroides), polímeros no peptídicos, o cualesquier otras moléculas que se unan específica y eficientemente a otras moléculas conjugadas con un resto detectable o no.

El derivado de oligotiofeno descrito en la presente memoria puede liofilizarse para almacenamiento y reconstituirse en un vehículo adecuado antes de ser usado. Se puede emplear cualquier método de liofilización adecuado (p.ej., secado por pulverización, secado en torta) y/o cualquier técnica de reconstitución adecuada. Los especialistas en la técnica apreciarán que la liofilización y la reconstitución pueden dar lugar a diferentes grados de pérdida de actividad, y que los niveles usados pueden tener que ser ajustados al alza para compensar. En una realización, la composición liofilizada (secada por congelación) no pierde más de aproximadamente el 25%, o no más de aproximadamente el 30%, o no más de aproximadamente el 35%, o no más de aproximadamente el 40%, o no más de aproximadamente el 45%, o no más de aproximadamente el 50% de su actividad (previa a la liofilización) cuando es rehidratada.

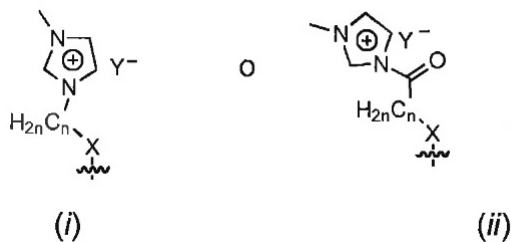
Por tanto, como se muestra en la presente memoria, dichas composiciones de la invención son cualquier derivado de oligotiofeno descrito en la presente memoria, tal como los seleccionados del grupo que consiste en

a) un derivado de oligotiofeno según la fórmula (I)



en donde

R₃ puede elegirse entre



5

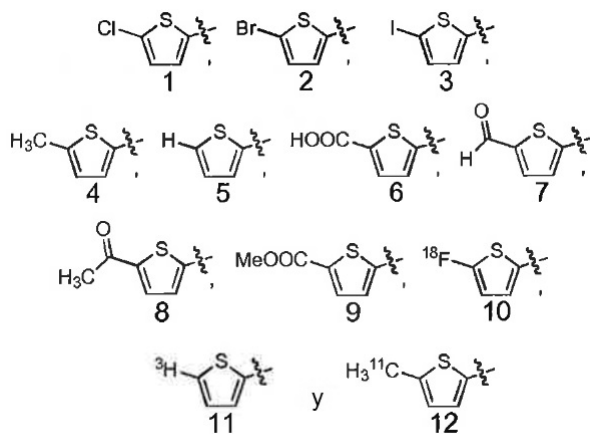
y donde

n puede variar entre 0 y 3,

Y⁻ es contraión aniónico y puede ser, aunque sin limitación, bromo, cloro, yodo o 4-metilbencenosulfonato,

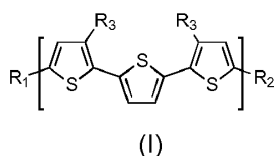
X se puede elegir entre O (n ≥ 1) ó CH₂ (n = 0-3), y

- 10 cada uno de R₁ y R₂ se selecciona de forma independiente del grupo que consiste en 5-clorotiofen-2-ilo (1), 5-bromotiofen-2-ilo (2), 5-iodotiofen-2-ilo (3), 5-metiltiofen-2-ilo (4), tiofen-2-ilo (5), 5-ácido tiofencarboxílico-2-ilo (6), 5-formiltiofen-2-ilo (7), 5-acetiltiofen-2-ilo (8) y 2-il-tiofen-5-carboxilato de metilo (9), 5-fluorotiofen-2-ilo con isótopos enriquecidos de ¹⁸F ó ¹⁹F (10), 5-tiofen-2-ilo con tritio (11) y 5-metiltiofen-2-ilo enriquecido isotópicamente con carbono ¹¹C (12) según las fórmulas

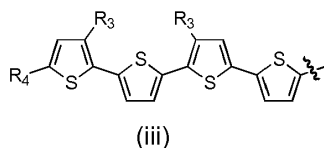


15

b) derivado de oligotiofeno según la fórmula (I),



donde R_1 es



y donde

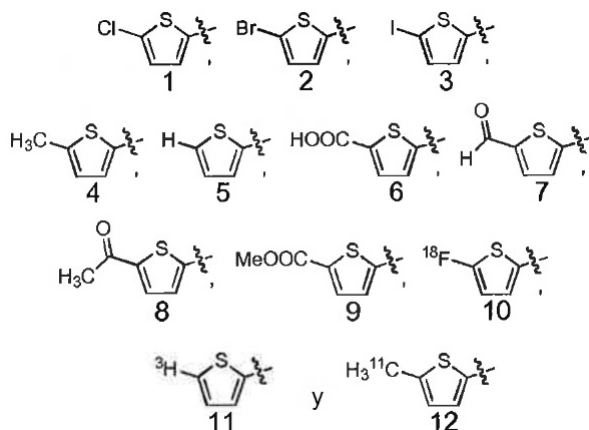
n puede variar entre 0 y 3,

5 Y^- es contraión aniónico y puede ser, aunque sin limitación, bromo, cloro, yodo o 4-metilbencenosulfonato, y

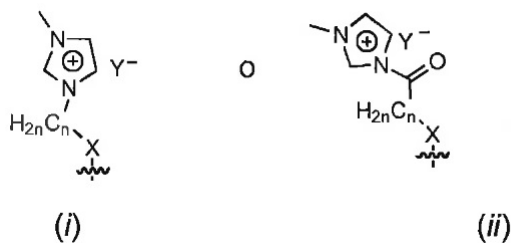
X se puede elegir entre O ($n \geq 1$) ó CH_2 ($n \geq 0$), y

R_2 se selecciona del grupo que consiste en 5-clorotiofen-2-ilo (1), 5-bromotiofen-2-ilo (2), 5-iodotiofen-2-ilo (3), 5-metiltiofen-2-ilo (4), tiofen-2-ilo (5), 5-ácido tiofencarboxílico-2-ilo (6), 5-formiltiofen-2-ilo (7), 5-acetiltiofen-2-ilo (8) y 2-il-tiofen-5-carboxilato de metilo (9), 5-fluorotiofen-2-ilo con isótopos enriquecidos de ^{18}F ó ^{19}F (10), 5-tiofen-2-ilo con tritio (11) y 5-metiltiofen-2-ilo enriquecido isotópicamente con carbono ^{11}C (12) según las fórmulas

10



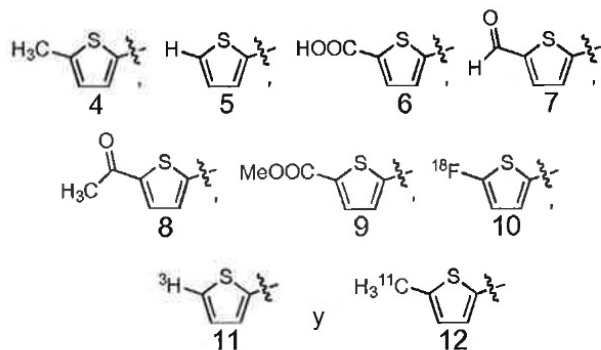
R_3 se elige entre



y

15

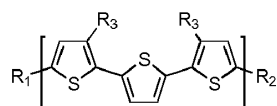
R₄ se selecciona del grupo que consiste en bromo, cloro, hidrógeno, yodo, metilo, 5-metiltiofen-2-ilo (4), tiofen-2-ilo (5), 5-ácido tiofencarboxílico-2-ilo (6), 5-formiltiofen-2-ilo (7), 5-acetiltiofen-2-ilo (8) y 2-il-tiofen-5-carboxilato de metilo (9), 5-fluorotiofen-2-ilo con isótopos enriquecidos de ¹⁸F ó ¹⁹F (10), 5-tiofen-2-ilo con tritio (11) y 5-metiltiofen-2-ilo enriquecido isotópicamente con carbono ¹¹C (12) según las fórmulas:



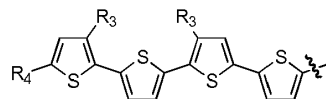
5

, y

c) según la fórmula (I),



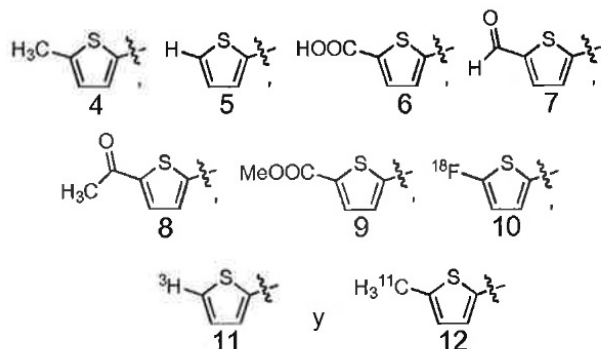
(I)

donde R₁ es la fórmula (iii)

(iii)

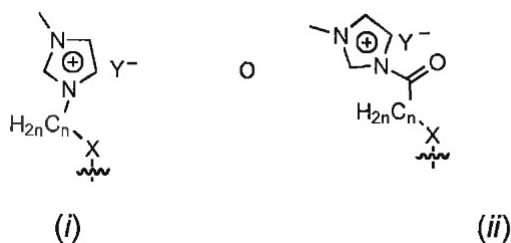
10

y donde R₂ se selecciona del grupo que consiste en bromo, cloro, hidrógeno, yodo, metilo, 5-metiltiofen-2-ilo (4), tiofen-2-ilo (5), 5-ácido tiofencarboxílico-2-ilo (6), 5-formiltiofen-2-ilo (7), 5-acetiltiofen-2-ilo (8) y 2-il-tiofen-5-carboxilato de metilo (9), 5-fluorotiofen-2-ilo con isótopos enriquecidos de ¹⁸F ó ¹⁹F (10), 5-tiofen-2-ilo con tritio (11) y 5-metiltiofen-2-ilo enriquecido isotópicamente con carbono ¹¹C (12) según las fórmulas:



15

R3 se elige entre



y donde

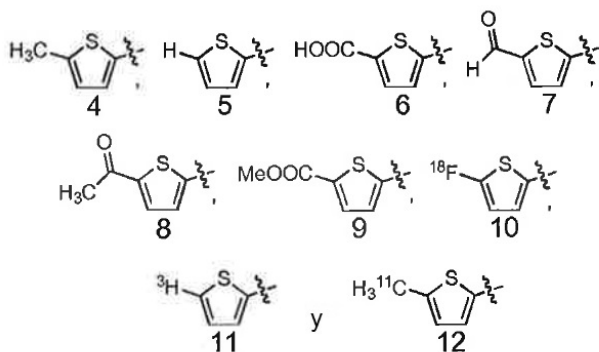
n puede variar entre 0 y 3,

5 Y es el contraión aniónico y puede ser, aunque sin limitación, bromo, cloro, yodo o 4-metilbencenosulfonato,

X se puede elegir entre O ($n \geq 1$) ó CH₂ ($n = 0-3$), y

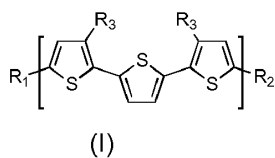
R₄ se selecciona del grupo que consiste en bromo, cloro, hidrógeno, yodo, metilo, 5-metiltiofen-2-ilo (4), tiofen-2-ilo (5), 5-ácido tiofencarboxílico-2-ilo (6), 5-formiltiofen-2-ilo (7), 5-acetiltiofen-2-ilo (8) y 2-il-tiofen-5-carboxilato de metilo (9), 5-fluorotiofen-2-ilo con isótopos enriquecidos de ¹⁸F ó ¹⁹F (10), 5-tiofen-2-ilo con tritio (11) y 5-metiltiofen-2-ilo enriquecido isotópicamente con carbono ¹¹C (12) según las fórmulas:

10



y de todos los derivados de oligotiofeno según la invención, las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

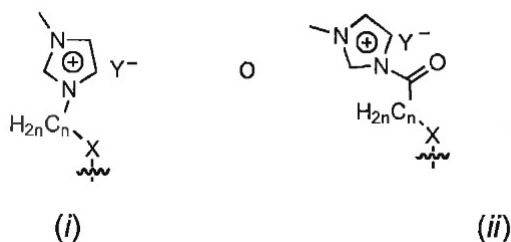
Existen realizaciones adicionales donde dicho derivado de oligotiofeno es un derivado de oligotiofeno según la fórmula (I)



15

en donde

R₃ puede elegirse entre



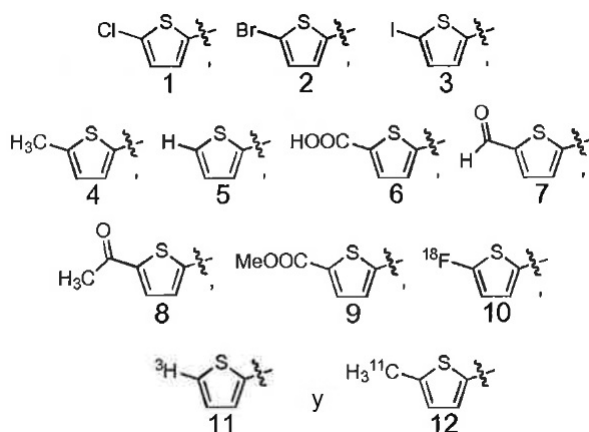
y donde

n puede variar entre 0 y 3,

Y⁻ es el contraión aniónico y puede ser, aunque sin limitación, bromo, cloro, yodo o 4-metilbencenosulfonato,

X se puede elegir entre O (n ≥ 1) ó CH₂ (n = 0-3), y

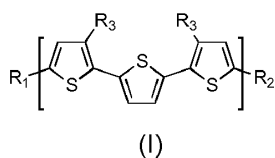
- 5 cada uno de R₁ y R₂ se selecciona de forma independiente del grupo que consiste en 5-clorotiofen-2-ilo (1), 5-bromotiofen-2-ilo (2), 5-iodotiofen-2-ilo (3), 5-metiltiofen-2-ilo (4), tiofen-2-ilo (5), 5-ácido tiofencarboxílico-2-ilo (6), 5-formiltiofen-2-ilo (7), 5-acetiltiofen-2-ilo (8) y 2-il-tiofen-5-carboxilato de metilo (9), 5-fluorotiofen-2-ilo con isótopos enriquecidos de ¹⁸F ó ¹⁹F (10), 5-tiofen-2-ilo con tritio (11) y 5-metiltiofen-2-ilo enriquecido isotópicamente con carbono ¹¹C (12) según las fórmulas



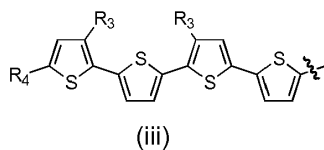
10

y de todos los derivados de oligotiofeno, las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Existen otras realizaciones en las que cuando dicho derivado de oligotiofeno es un derivado de oligotiofeno según la fórmula (I),



- 15 donde R₁ es



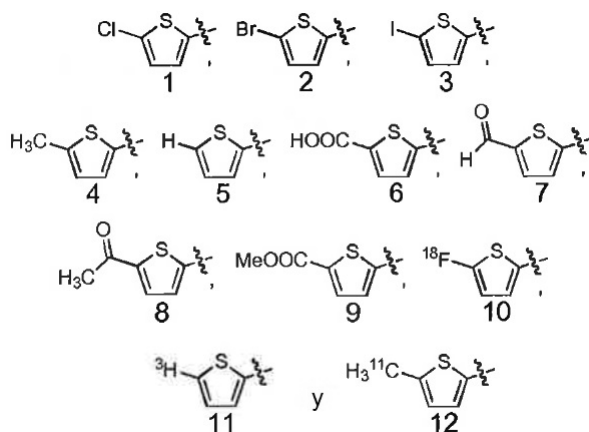
y donde

n puede variar entre 0 y 3,

Y⁻ es contraión aniónico y puede ser, aunque sin limitación, bromo, cloro, yodo o 4-metilbencenosulfonato, y

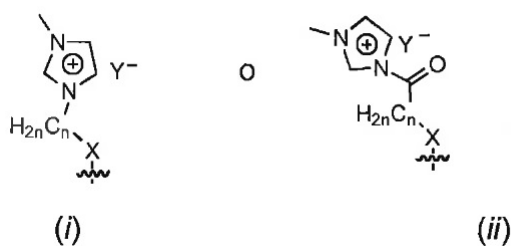
- 20 X se puede elegir entre O (n ≥ 1) ó CH₂ (n ≥ 0), y

R₂ se selecciona del grupo que consiste en 5-clorotiofen-2-ilo (1), 5-bromotiofen-2-ilo (2), 5-iodotiofen-2-ilo (3), 5-metiltiofen-2-ilo (4), tiofen-2-ilo (5), 5-ácido tiofencarboxílico-2-ilo (6), 5-formiltiofen-2-ilo (7), 5-acetiltiofen-2-ilo (8) y 2-il-tiofen-5-carboxilato de metilo (9), 5-fluorotiofen-2-ilo con isótopos enriquecidos de ¹⁸F ó ¹⁹F (10), 5-tiofen-2-ilo con tritio (11) y 5-metiltiofen-2-ilo enriquecido isotópicamente con carbono ¹¹C (12) según las fórmulas



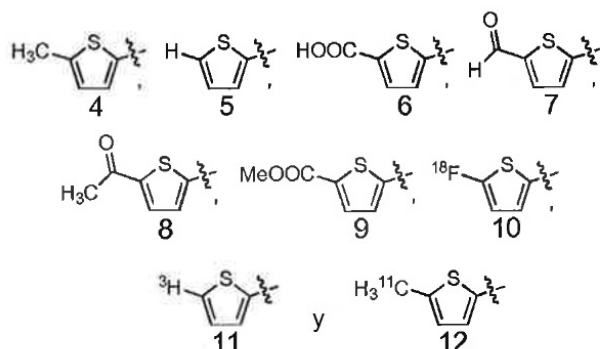
5

R₃ se elige entre



y

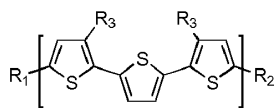
10 R₄ se selecciona del grupo que consiste en bromo, cloro, hidrógeno, yodo, metilo, 5-metiltiofen-2-ilo (4), tiofen-2-ilo (5), 5-ácido tiofencarboxílico-2-ilo (6), 5-formiltiofen-2-ilo (7), 5-acetiltiofen-2-ilo (8) y 2-il-tiofen-5-carboxilato de metilo (9), 5-fluorotiofen-2-ilo con isótopos enriquecidos de ¹⁸F ó ¹⁹F (10), 5-tiofen-2-ilo con tritio (11) y 5-metiltiofen-2-ilo enriquecido isotópicamente con carbono ¹¹C (12) según las fórmulas:



y de todos los derivados de oligotiofeno, las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

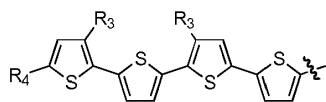
15

Existen otras realizaciones donde dicho derivado de oligotiofeno es acorde a la fórmula (I),



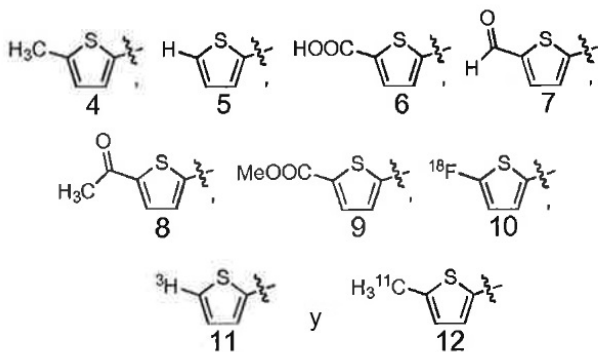
(I)

donde R₁ es la fórmula (iii)

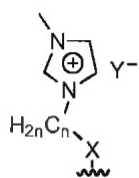


(iii)

- 5 y donde R² se selecciona del grupo que consiste en bromo, cloro, hidrógeno, yodo, metilo, 5-metiltiofen-2-ilo (4), tiofen-2-ilo (5), 5-ácido tiofencarboxílico-2-ilo (6), 5-formiltiofen-2-ilo (7), 5-acetiltiofen-2-ilo (8) y 2-il-tiofen-5-carboxilato de metilo (9), 5-fluorotiofen-2-ilo con isótopos enriquecidos de ¹⁸F ó ¹⁹F (10), 5-tiofen-2-ilo con tritio (11) y 5-metiltiofen-2-ilo enriquecido isotópicamente con carbono ¹¹C (12) según las fórmulas:

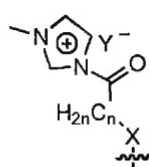


- 10 R₃ se elige entre



(i)

O



(ii)

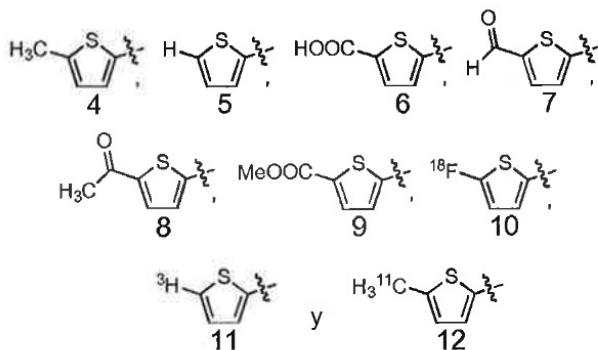
y donde

n puede variar entre 0 y 3,

Y⁻ es el contraión aniónico y puede ser, aunque sin limitación, bromo, cloro, yodo o 4-metilbencenosulfonato,

- 15 X se puede elegir entre O (n ≥ 1) ó CH₂ (n = 0-3), y

R₄ se selecciona del grupo que consiste en bromo, cloro, hidrógeno, yodo, metilo, 5-metiltiofen-2-ilo (4), tiofen-2-ilo (5), 5-ácido tiofencarboxílico-2-ilo (6), 5-formiltiofen-2-ilo (7), 5-acetiltiofen-2-ilo (8) y 2-il-tiofen-5-carboxilato de metilo (9), 5-fluorotiofen-2-ilo con isótopos enriquecidos de ¹⁸F ó ¹⁹F (10), 5-tiofen-2-ilo con tritio (11) y 5-metiltiofen-2-ilo enriquecido isotópicamente con carbono ¹¹C (12) según las fórmulas:



5

y de todos los derivados de oligotiofeno, las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Una composición

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona una composición. Dicha composición puede usarse para detectar, identificar, separar y aislar células madre neuronales o células madre de cáncer neuronal.

10 En otras realizaciones adicionales, las células madre neuronales son células madre neuronales adultas, tales como células madre neuronales humanas adultas.

En otras realizaciones adicionales, las células madre neuronales son células madre neuronales embrionarias, tales como, p.ej., células madre neuronales embrionarias de rata o células madre neuronales embrionarias de cualquier otro roedor. En otras realizaciones adicionales, las células madre neuronales embrionarias son células madre neuronales embrionarias no humanas. En otras realizaciones adicionales, las células madre neuronales embrionarias son células madre neuronales embrionarias humanas.

15 En otras realizaciones adicionales, las células madre de cáncer neuronal son células madre de cáncer neuronal adultas.

En otras realizaciones adicionales, las células madre de cáncer neuronal son células madre de cáncer neuronal adultas.

La composición comprende cualquiera de los derivados de oligotiofeno según la invención.

20 La composición proporcionada en la presente memoria comprende además un tampón. Los ejemplos de tampones son tampones Tris tales como Tris-HCl, y tampones de PBS. Los tampones adecuados se encuentran disponibles y son conocidos en la técnica, disponiéndose de ejemplos, p.ej., en "Current Protocols in Immunology", y en "Current Protocols in Molecular Biology", ambos de John Wiley and Sons, Inc., N.Y.) incorporados a la presente memoria a modo de referencia.

25 Otros aditivos adicionales de los tampones pueden ser, p.ej., Tween[®] 20, BSA, azide sódico, glicerol y agua, y un pH de aproximadamente 5,5 a 7,5, tal como 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 ó 7,5.

El derivado de oligotiofeno y su correspondiente composición pueden proporcionarse, cuando se dan en forma líquida, en una forma "lista para usar" o en una forma concentrada que puede ser diluida antes de usarse en cualquier sistema de tampón apropiado, por ejemplo al menos 1x10, 1x20, 1x30, 1x40, 1x50, 1x60, 1x70, 1x80, 1x90, 1x100, 1x150, 1x200, 1x250, 1x300, 1x350, 1x400, 1x450, 1x500, 1x550, 1x600, 1x650, 1x700, 1x750, 1x800, 1x900, 1x1000, 1x1200, 1x1500, 1x2000, 1x3000, 1x4000, 1x5000, 1x6000, 1x7000, 1x8000, 1x9000, 1x10000 y todos los rangos y valores intermedios, tales como, p.ej., los de los sistemas tamponantes proporcionados en la presente memoria o los que puedan ser evidentes para una persona especialista en la técnica.

30 El derivado de oligotiofeno y su correspondiente composición según la invención también pueden usarse solos o en combinación con otros medios para detectar células madre neuronales o células madre de cáncer neuronal. Dichas células pueden ser de origen mamífero, tal como de roedor, p.ej., ratones, ratas, ardillas, puercoespines, castores, cobayas y topillos, o de no roedor tal como cabra, cerdo, felino, vaca, perro o células humanas, tales como, p.ej., células madre neuronales humanas adultas o células madre de cáncer neuronal adultas. Otros medios para detectar células madre neuronales o células madre de cáncer neuronal en combinación con los derivados de oligotiofeno de la invención incluyen, p.ej., anticuerpos que se unen específicamente a antígenos sobre células madre neuronales. Los protocolos generales para dichos inmuno-métodos basados en anticuerpos son conocidos en la técnica ("Antibodies: A Laboratory Manual", Harlow y Lane, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY

35 El derivado de oligotiofeno y su correspondiente composición según la invención también pueden usarse solos o en combinación con otros medios para detectar células madre neuronales o células madre de cáncer neuronal. Dichas células pueden ser de origen mamífero, tal como de roedor, p.ej., ratones, ratas, ardillas, puercoespines, castores, cobayas y topillos, o de no roedor tal como cabra, cerdo, felino, vaca, perro o células humanas, tales como, p.ej., células madre neuronales humanas adultas o células madre de cáncer neuronal adultas. Otros medios para detectar células madre neuronales o células madre de cáncer neuronal en combinación con los derivados de oligotiofeno de la invención incluyen, p.ej., anticuerpos que se unen específicamente a antígenos sobre células madre neuronales. Los protocolos generales para dichos inmuno-métodos basados en anticuerpos son conocidos en la técnica ("Antibodies: A Laboratory Manual", Harlow y Lane, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY

40 El derivado de oligotiofeno y su correspondiente composición según la invención también pueden usarse solos o en combinación con otros medios para detectar células madre neuronales o células madre de cáncer neuronal. Dichas células pueden ser de origen mamífero, tal como de roedor, p.ej., ratones, ratas, ardillas, puercoespines, castores, cobayas y topillos, o de no roedor tal como cabra, cerdo, felino, vaca, perro o células humanas, tales como, p.ej., células madre neuronales humanas adultas o células madre de cáncer neuronal adultas. Otros medios para detectar células madre neuronales o células madre de cáncer neuronal en combinación con los derivados de oligotiofeno de la invención incluyen, p.ej., anticuerpos que se unen específicamente a antígenos sobre células madre neuronales. Los protocolos generales para dichos inmuno-métodos basados en anticuerpos son conocidos en la técnica ("Antibodies: A Laboratory Manual", Harlow y Lane, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY

1988, "Current Protocols in Immunology", Unidad 21.4, 2003, y "Current Protocols in Molecular Biology", Unidad 14.6, 2001, ambos de John Wiley and Sons, Inc., N.Y.).

Métodos

- 5 Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un método para detectar células madre neuronales o células madre de cáncer neuronal en una muestra biológica *in vitro*, comprendiendo dicho método las etapas de
- a. poner en contacto dicha muestra con un derivado de oligotiofeno según la invención o una composición que comprende al menos un derivado de oligotiofeno según la invención o la composición según la invención, durante un tiempo suficiente para formar al menos un complejo célula madre neuronal - derivado de oligotiofeno,
 - b. detectar dichos complejos de célula madre neuronal - derivado de oligotiofeno.
- 10 Otras etapas del método pueden abarcar la comparación de la cantidad de complejos de célula madre neuronal - derivado de oligotiofeno detectados con un control positivo y/o negativo, detectando de este modo las células madre neuronales. Esto normalmente se lleva a cabo para fijar una niveles de ruido de fondo de una tinción en un ejemplo particular o una instalación experimental y para ser capaz de distinguir una tinción positiva de una negativa, para determinar que el método se ha llevado a cabo según lo esperado y que una tinción positiva se corresponde con una
- 15 detección verdadera de dicha célula madre neuronal.
- Adicionalmente, dicha célula madre neuronal puede ser una célula madre de cáncer neuronal.
- Adicionalmente, se pueden detectar cambios en el número o la cantidad de células madre neuronales o de células madre de cáncer neuronal. Los cambios en el número o la cantidad pueden ser un incremento de las células madre neuronales o de las células madre de cáncer neuronal, o una reducción de las células madre neuronales o de las
- 20 células madre de cáncer neuronal.
- Adicionalmente, el control positivo puede comprender células madre neuronales, células madre de cáncer neuronal o partes de las mismas. Las partes de las mismas pueden ser fragmentos celulares, células lisadas, etc., donde las partes de las mismas aún comprenden la estructura a la cual aún se puede unir el derivado de oligotiofeno o la composición según la invención.
- 25 Además, el control negativo puede no comprender células madre neuronales, células madre de cáncer neuronal, o una parte de las mismas a la cual se pueda unir el derivado de oligotiofeno o la composición según la invención.
- Dichos métodos pueden comprender además una etapa opcional de puntuación de la cantidad de complejos de células madre neuronales - derivado de oligotiofeno, o de complejos de células madre de cáncer neuronal - derivado de oligotiofeno. Se puede llevar a cabo la asignación de una puntuación de los complejos detectados de células
- 30 madre neuronal - derivado de oligotiofeno o de célula madre de cáncer neuronal - derivado de oligotiofeno de acuerdo a un sistema de puntuación estándar conocido en la técnica o descrito en la presente memoria.
- La detección de los complejos de células madre neuronales - derivado de oligotiofeno se puede lograr usando métodos bien conocidos en la técnica de detección celular y de obtención de imágenes tal como imágenes clínicas, descritos en la presente memoria y en la técnica, tales como microscopios de fluorescencia convencionales,
- 35 microscopios confocales, microscopios de 2-fotones, STED, etc. El método específico requerido dependerá de la luminiscencia específica del derivado de oligotiofeno y/o del tipo de etiqueta/conjugado detectable unido al derivado de oligotiofeno de la invención.
- Tras la extracción de un tumor cerebral mediante cirugía, el derivado de oligotiofeno según la invención puede usarse para detectar células madre de cáncer neuronal residuales. Esto se puede realizar mediante contacto del
- 40 espacio del cual se ha extraído el tumor cerebral, aplicando el derivado de oligotiofeno según la invención a la cavidad que queda tras la extracción del tumor. El derivado de oligotiofeno se puede añadir aplicando con un pincel, o mediante una aplicación similar, el derivado de oligotiofeno según la invención a la cavidad del cerebro donde estaba localizado el tumor. De este modo, el derivado de oligotiofeno detectará las células madre de cáncer neuronal residuales - si las hay - de la cavidad dejada tras la eliminación de un tumor en un cerebro.
- 45 Se han desarrollado una serie de estrategias para realizar mediciones no invasivas y detecciones de tejidos o de células *in vivo*. Dichas estrategias generalmente han usado técnicas de medicina nuclear para generar imágenes de una variedad de tejidos o células individuales. Dichos métodos no invasivos basados en imágenes incluyen la tomografía de emisión de positrones (PET) y la tomografía computarizada de emisión de fotones (SPECT). Se han empleado con éxito una amplia variedad de radiofármacos en estudios de imágenes PET y SPECT.
- 50 Por tanto, es de un gran valor en la práctica clínica el poder determinar rápidamente y de una forma no invasiva la eficacia, p.ej., de una cirugía de extracción de un tumor cerebral tal como un glioma, o para detectar la eficacia y la respuesta de un tumor cerebral *in vivo* frente a una combinación de agentes quimioterapéuticos en cada paciente que reciba el tratamiento. También sería de gran valor el poder predecir el resultado de un tratamiento en base a mediciones cuantitativas de la respuesta de un tumor tras iniciarse una quimioterapia. Una rápida retroalimentación,

- proporcionada por una monitorización temprana y frecuente tras el inicio de la terapia, permitiría al oncólogo determinar la eficacia del régimen seleccionado y modificarlo si la enfermedad no estuviera respondiendo apropiadamente. Mediante el uso de una determinación no invasiva de la respuesta de un tejido también se puede reducir drásticamente el tiempo necesario para determinar la eficacia de un régimen particular, disminuyendo el riesgo de que el cáncer pueda crecer o metastatizarse en el tiempo transcurrido durante la espera.
- 5 Por tanto, existen otras realizaciones donde se puede usar PET para detectar células madre de cáncer neuronal residuales en dicha cavidad tras la extracción del tumor.
- Por tanto, existen otras realizaciones donde la detección de células madre de cáncer neuronal se realiza mediante PET, usando un escáner de PET dedicado de un sujeto tal como un roedor, p.ej., una rata o ratón, o un ser humano.
- 10 El escáner PET no es invasivo, pero implica exposición a radiación ionizante. La dosis total de radiación no es significativa, normalmente alrededor de 11 mSv.
- Otros métodos alternativos de escaneo útiles en otras realizaciones como alternativa al PET incluyen la tomografía computarizada (CT) de rayos-X, las imágenes de resonancia magnética (IRM) y las imágenes de resonancia magnética funcional (IRMf), los ultrasonidos y la tomografía computarizada de emisión de fotón simple (SPECT).
- 15 Los métodos proporcionados en la presente memoria pueden llevarse a cabo manualmente, o, preferiblemente, en un dispositivo automatizado.
- Por tanto, en una realización los métodos se llevan a cabo manualmente.
- En una realización adicional, los métodos se llevan a cabo en un dispositivo automatizado.
- En general, los colorantes se almacenan en un pequeño tubo de plástico y se aplican a una muestra biológica que es, p.ej., un cultivo celular o una muestra celular, células en disolución, y/o a un tejido, directamente con una pipeta.
- 20 Tras una incubación de 5-60 minutos (normalmente de unos 10 minutos), las células madre neuronales o las células madre de cáncer neuronal son fácilmente detectables en diversos microscopios convencionales y en aplicaciones de clasificación celular, tal como la clasificación celular asistida por fluorescencia, tal como, p.ej., clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). No se requiere modulación y todos los procedimientos se pueden llevar a cabo a temperatura ambiente en un laboratorio normal.
- 25 Los métodos proporcionados en la presente memoria pueden usarse en microconjuntos de tejidos. Los microconjuntos de tejidos también son conocidos y están descritos en la técnica. Habitualmente, los microconjuntos de tejidos pueden contener normalmente de 50 a 500 tejidos en un único portaobjetos.
- Los ejemplos de dispositivos de tinción automatizados útiles para hacer escrutinios de muestras de tejido y láminas de tejido, tal como explantes, según la presente invención incluyen, aunque sin limitación, Dako Autostainer (DakoCytomation), BioGenex 16000™ (Biogenex), Nemesis™ (BIOCARE) y NexES, Benchmark, Capillary gp stainer (Ventana systems). La muestra queda entonces preparada para visualización, detección y, opcionalmente, puntuación y posterior análisis.
- 30 Los métodos según la invención pueden ser un método que se lleva a cabo sobre un dispositivo automatización de tinción.
- En otras realizaciones adicionales, los métodos se llevan a cabo manualmente.
- Las secciones de tejido que van a ser teñidas frecuentemente tienen un tamaño de aproximadamente 5-100 µm, tal como, p.ej., 10-40 µm, es decir secciones de tejido usadas normalmente para un análisis histológico tal como la inmunohistoquímica.
- 40 Sin embargo, las secciones de tejido pueden ser más gruesas, de aproximadamente >100 µm o más, como láminas de tejido o explantes.
- La detección se puede realizar manualmente, tal como por un patólogo o un doctor en medicina, o cualquier personal igualmente entrenado para visualizar y detectar manualmente células madre neuronales o células madre de cáncer neuronal mediante un sistema de puntuación.
- 45 Por tanto, existen otras realizaciones en las que la detección se lleva a cabo manualmente, p.ej., mediante puntuación con un microscopio.
- La detección se puede realizar adicionalmente mediante análisis de imágenes. Los dispositivos de análisis de imágenes adecuados según la presente invención son conocidos en la técnica y también se muestran como ejemplos en la presente memoria.
- 50 Por tanto, adicionalmente la detección se puede realizar mediante análisis de imágenes *in vivo*, *in situ* o *in vitro*.

Una realización adicional de la invención proporciona un método para separar células madre neuronales de otros materiales biológicos dentro de una muestra biológica, comprendiendo dicho método las etapas de

- 5 a. poner en contacto dicha muestra con un derivado de oligotiofeno según la invención o la composición según la invención, durante un tiempo suficiente para formar al menos un complejo célula madre neuronal - derivado de oligotiofeno,
- b. detectar dichos complejos de célula madre neuronal - derivado de oligotiofeno,
- c. separar dichos complejos detectados de célula madre neuronal - derivado de oligotiofeno, separando de este modo las células madre neuronales.

Adicionalmente, dicha célula madre neuronal puede ser una célula madre de cáncer neuronal.

- 10 La célula madre neuronal o la célula madre de cáncer neuronal puede además ser una célula madre neuronal adulta o una célula madre de cáncer neuronal adulta.

El método puede comprender además la etapa de aislar dichas células madre neuronales o dichas células madre de cáncer neuronal, tales como, p.ej., células madre neuronales adultas o células madre de cáncer neuronal adultas.

- 15 La separación de células madre neuronales puede ser una etapa de selección que puede venir seguida de una etapa de aislamiento para separar las células madre neuronales o las células madre de cáncer neuronal identificadas. Se pueden emplear varias técnicas conocidas por los especialistas en la técnica para separar las células eliminando inicialmente las células dedicadas a otros linajes diferentes a las células madre neuronales. A menudo dichos métodos se basan en una centrifugación de densidad, así como en diferentes métodos inmunológicos que emplean anticuerpos específicos de linaje.

- 20 Por tanto, para la separación, el derivado de oligotiofeno según la invención puede unirse a un soporte sólido para permitir una separación altamente específica de dichas células madre neuronales o de dichas células madre de cáncer neuronal, tal como, p.ej., células madre neuronales adultas o células madre de cáncer neuronal adultas. El procedimiento particular de separación empleado, p.ej. centrifugación, separación mecánica, tal como con columnas, membranas o separación magnética, debería maximizar la viabilidad de la fracción a recoger. Se pueden emplear
- 25 diversas técnicas de eficacia diferente bien conocidas por el especialista en la técnica. La técnica particular empleada dependerá de la eficacia de separación, de la citotoxicidad de la metodología, de la facilidad y la velocidad de realización, y de la necesidad de equipamiento sofisticado y/o habilidades técnicas del personal que maneja la técnica.

- 30 Los procedimientos para la separación de células madre neuronales o de células madre de cáncer neuronal a partir de una suspensión, asistida por el derivado de oligotiofeno según la invención pueden incluir separación magnética, usando, p.ej., partículas magnéticas recubiertas del derivado de oligotiofeno, cromatografía de afinidad basada en el derivado de oligotiofeno según la invención, y "cribado" con el derivado de oligotiofeno unido a una matriz sólida, p.ej. una placa, u otras técnicas convenientes. La clasificación celular magnética es bien conocida por los especialistas en la técnica y se describe, por ejemplo, en Haukanes y Kvam (1993) *Biotechnology* 11(1): 60-63, y en
- 35 Quirici et al (2002) *Exp. Hematol* 30: 783-791.

Por lo tanto, el derivado de oligotiofeno según la invención usado en una selección positiva está ligado a una fase sólida. Los ejemplos de fases sólidas que se pueden usar son partículas activadas con Proteína A ó Proteína G tales como partículas de agarosa, partículas de agarosa reticuladas, partículas de poliacrilamida, copolímeros de poliacrilamida y partículas de agarosa o partículas poliacrílicas.

- 40 La fase sólida puede ser una partícula. Las partículas son activadas, por ejemplo, con carbonildiimidazol, bromuro de cianógeno y mediante cualquier otro método similar bien conocido por los especialistas en la técnica, y que quedan ejemplificados en Harlow y Lane, 1988, incluido a la presente memoria a modo de referencia.

Además, la fase sólida puede ser una partícula magnética. Entonces las células pueden clasificarse mediante métodos magnéticos, tal como el sistema MACS®.

- 45 Las técnicas que proporcionan una separación precisa incluyen los clasificadores activados por fluorescencia mediante el uso del derivado de oligotiofeno según la invención, que pueden presentar varios grados de sofisticación, p.ej., una pluralidad de canales de color, canales de detección de dispersión de luz, canales de impedancia, etc., conocidos por el especialista en la técnica.

- 50 El aislamiento también se puede llevar a cabo por medios mecánicos, tales como, p.ej., cribado, partículas o columnas de afinidad.

El aislamiento se puede llevar a cabo también con medios de citometría de flujo tales como FACS.

Se puede realizar un aislamiento y separación por etapas. Por ejemplo, se realiza una primera etapa de enriquecimiento de células madre neuronales o de células madre de cáncer neuronal en una muestra biológica, tal

como una población de células. Esta primera selección puede ser una selección negativa de células madre neuronales, es decir, se agotan o eliminan las células de linaje comprometido de la población inicial de células.

Dicho primer enriquecimiento puede ser una selección positiva de células madre neuronales o de células madre de cáncer neuronal que se puede repetir hasta alcanzar la pureza deseada para las células madre neuronales.

- 5 Las células madre neuronales o las células madre de cáncer neuronal se pueden aislar a partir de muestras de tejido cerebral tales como de cerebro de mamífero adulto, p.ej., cerebro de roedor (ratones o ratas) o cerebro humano. Alternativamente, las células madre neuronales pueden derivar de células madre embrionarias (ME) o de células madre pluripotentes inducidas (MPi) procedentes de mamíferos, p.ej. roedores o humanos.

- 10 Adicionalmente, el método puede comprender opcionalmente la recuperación de las células que se unen a derivado de oligotiofeno, produciendo con ello una población de células madre neuronales o de células madre de cáncer neuronal, sustancialmente libre de células contaminantes de otros linajes, tal como libre al 90%, 95%, 99% o incluso al 100% de células contaminantes de otros linajes.

Otros aspectos de la invención proporcionan métodos para sintetizar un derivado de oligotiofeno según la invención.

- 15 Otros aspectos de la invención son los usos de los derivados de oligotiofeno según la invención o la composición según la invención, para detectar, identificar, seleccionar o aislar células madre neuronales *in vitro*, *in situ* o *in vivo*.

- 20 El análisis de datos para analizar la presencia o la ausencia de células madre neuronales usando el derivado de oligotiofeno o la composición de la invención puede incluir las etapas de determinar la fortaleza de la señal (p.ej., intensidad de los picos) de los elementos luminiscentes del derivado de oligotiofeno, o cualquier otro medio conjugado directa o indirectamente al derivado de oligotiofeno, y eliminar los datos "falsos" (datos que se desvían de una distribución estadística predeterminada). Un ejemplo es la normalización de picos, un proceso mediante el cual se calcula la intensidad de cada pico respecto a una referencia. Por ejemplo, una referencia puede ser el ruido de fondo generado por un instrumento y/o un producto químico (p.ej., una molécula que absorbe energía), que se fija como cero en la escala. A continuación se puede representar la fortaleza de señal detectada para cada complejo de célula madre neuronal - derivado de oligotiofeno o de célula madre de cáncer neuronal - derivado de oligotiofeno en la forma de intensidades relativas en la escala deseada (p.ej., 100). En una realización, se puede expresar una señal observada para un pico dado como una relación de la intensidad de dicho pico respecto a la suma de la señal observada entera para ambos picos y el ruido de fondo en una masa especificada para cargar el rango de relaciones. En una realización, se puede admitir un patrón con una muestra de tal modo que un pico del patrón se puede usar como referencia para calcular las intensidades relativas de las señales observadas para cada proteína detectada.

- 25 Los datos resultantes pueden transformarse en varios formatos para ser representados, típicamente a través del uso de algoritmos de ordenador. Usando cualquiera de los formatos de representación anteriores, se puede determinar fácilmente a partir de una representación de señal si dichas células madre neuronales o dichas células madre de cáncer neuronal son detectadas en una muestra o no.

35 **Kits**

Otros aspectos proporcionan un kit que comprende

- a. un derivado de oligotiofeno según la invención, o una composición según la invención, y
- b. opcionalmente, instrucciones para usar el derivado de oligotiofeno o la composición.

- 40 Otros aspectos de la invención proporcionan un kit para detectar células madre neuronales o células madre de cáncer neuronal *in vitro*, *in situ* o *in vivo*, comprendiendo dicho kit

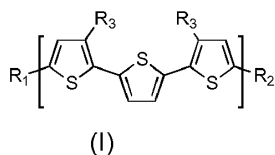
- a. un derivado de oligotiofeno según la invención o la composición según la invención, y
- b. opcionalmente, instrucciones para usar el derivado de oligotiofeno o la composición.

Otros aspectos de la invención proporcionan un kit para separar células madre neuronales o células madre de cáncer neuronal, comprendiendo dicho kit

- 45 a. un derivado de oligotiofeno según la invención o la composición según la invención, y
- b. opcionalmente, instrucciones para usar el derivado de oligotiofeno.

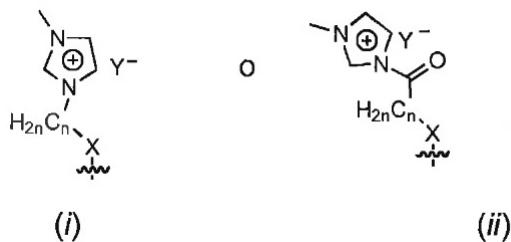
Por tanto, tal como se revela en la presente memoria, dichas composiciones de la invención son cualquier derivado de oligotiofeno descrito en la presente memoria, tal como los seleccionados del grupo que consiste en

a) un derivado de oligotiofeno según la fórmula (I)



en donde

R₃ puede elegirse entre



5

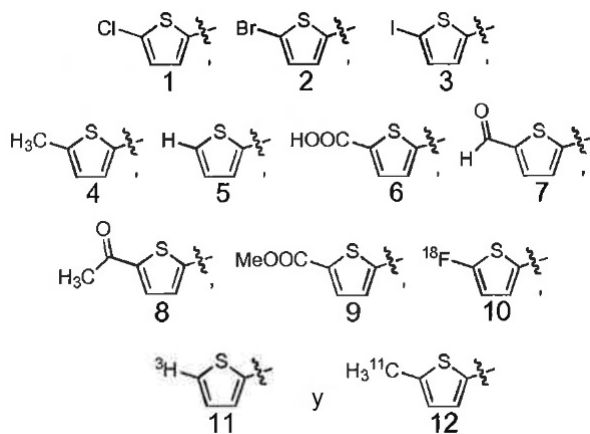
y donde

n puede variar entre 0 y 3,

Y⁻ es el contraión aniónico y puede ser, aunque sin limitación, bromo, cloro, yodo o 4-metilbencenosulfonato,

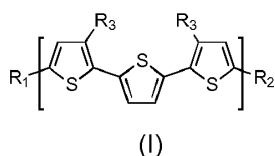
X se puede elegir entre O (n ≥ 1) ó CH₂ (n = 0-3), y

- 10 cada uno de R₁ y R₂ se selecciona de forma independiente del grupo que consiste en 5-clorotiofen-2-ilo (1), 5-bromotiofen-2-ilo (2), 5-iodotiofen-2-ilo (3), 5-metiltiofen-2-ilo (4), tiofen-2-ilo (5), 5-ácido tiofencarboxílico-2-ilo (6), 5-formiltiofen-2-ilo (7), 5-acetiltiofen-2-ilo (8) y 2-il-tiofen-5-carboxilato de metilo (9), 5-fluorotiofen-2-ilo con isótopos enriquecidos de ¹⁸F ó ¹⁹F (10), 5-tiofen-2-ilo con tritio (11) y 5-metiltiofen-2-ilo enriquecido isotópicamente con carbono ¹¹C (12) según las fórmulas

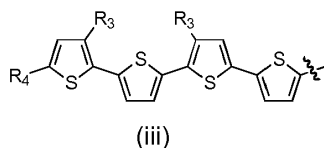


15

b) derivado de oligotiofeno según la fórmula (I),



donde R1 es



y donde

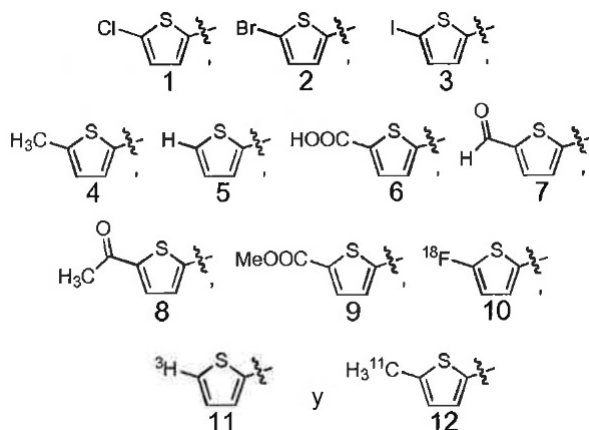
n puede variar entre 0 y 3,

5 Y⁻ es contraión aniónico y puede ser, aunque sin limitación, bromo, cloro, yodo o 4-metilbencenosulfonato, y

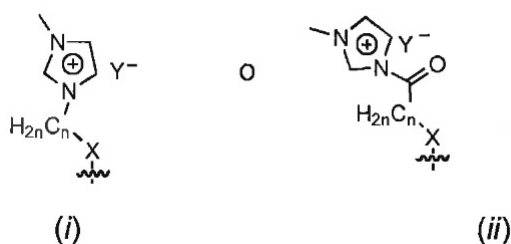
X se puede elegir entre O (n ≥ 1) ó CH₂ (n ≥ 0), y

R₂ se selecciona entre 5-clorotiofen-2-ilo (1), 5-bromotiofen-2-ilo (2), 5-iodotiofen-2-ilo (3), 5-metiltiofen-2-ilo (4), tiofen-2-ilo (5), 5-ácido tiofencarboxílico-2-ilo (6), 5-formiltiofen-2-ilo (7), 5-acetiltiofen-2-ilo (8) y 2-il-tiofen-5-carboxilato de metilo (9), 5-fluorotiofen-2-ilo con isótopos enriquecidos de ¹⁸F ó ¹⁹F (10), 5-tiofen-2-ilo con tritio (11) y 5-metiltiofen-2-ilo enriquecido isotópicamente con carbono ¹¹C (12) según las fórmulas

10



R₃ se elige entre



y donde

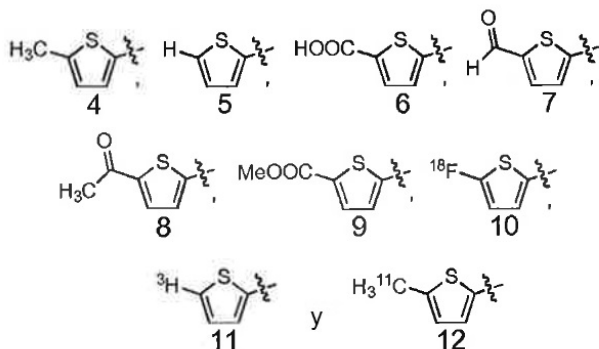
15 n puede variar entre 0 y 3,

Y⁻ es el contraión aniónico y puede ser, aunque sin limitación, bromo, cloro, yodo o 4-metilbencenosulfonato,

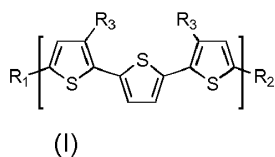
X se puede elegir entre O (n ≥ 1) ó CH₂ (n = 0-3), y

R₄ se selecciona del grupo que consiste en bromo, cloro, hidrógeno, yodo, metilo, 5-metiltiofen-2-ilo (4), tiofen-2-ilo (5), 5-ácido tiofencarboxílico-2-ilo (6), 5-formiltiofen-2-ilo (7), 5-acetiltiofen-2-ilo (8) y 2-il-tiofen-5-carboxilato de metilo (9), 5-fluorotiofen-2-ilo con isótopos enriquecidos de ¹⁸F ó ¹⁹F (10), 5-tiofen-2-ilo con tritio (11) y 5-metiltiofen-2-ilo enriquecido isotópicamente con carbono ¹¹C (12) según las fórmulas:

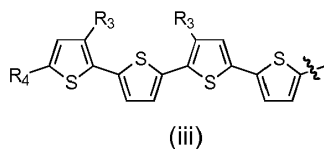
20



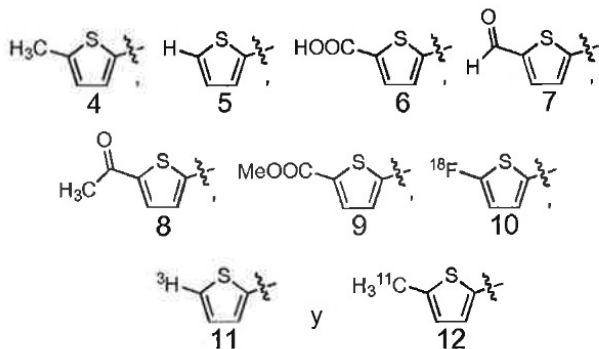
c) según la fórmula (I),



donde R₁ es la fórmula (iii)

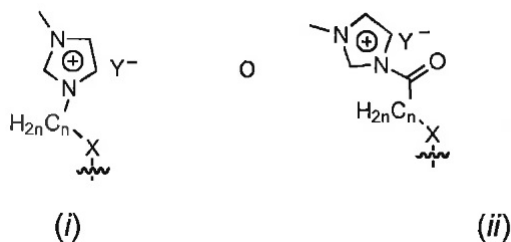


5 y donde R² se selecciona del grupo que consiste en bromo, cloro, hidrógeno, yodo, metilo, 5-metiltiofen-2-ilo (4), tiofen-2-ilo (5), 5-ácido tiofencarboxílico-2-ilo (6), 5-formiltiofen-2-ilo (7), 5-acetiltiofen-2-ilo (8) y 2-il-tiofen-5-carboxilato de metilo (9), 5-fluorotiofen-2-ilo con isótopos enriquecidos de ¹⁸F ó ¹⁹F (10), 5-tiofen-2-ilo con tritio (11) y 5-metiltiofen-2-ilo enriquecido isotópicamente con carbono ¹¹C (12) según las fórmulas:



10

R₃ se elige entre



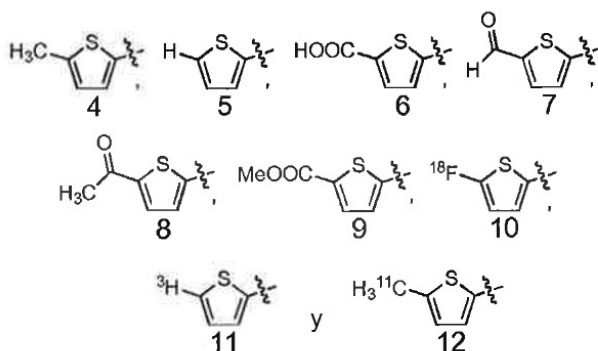
y donde

n puede variar entre 0 y 3,

Y es el contraión aniónico y puede ser, aunque sin limitación, bromo, cloro, yodo o 4-metilbencenosulfonato,

X se puede elegir entre O ($n \geq 1$) ó CH_2 ($n = 0-3$), y

- 5 R4 se selecciona del grupo que consiste en bromo, cloro, hidrógeno, yodo, metilo, 5-metiltiofen-2-ilo (4), tiofen-2-ilo (5), 5-ácido tiofencarboxílico-2-ilo (6), 5-formiltiofen-2-ilo (7), 5-acetiltiofen-2-ilo (8) y 2-il-tiofen-5-carboxilato de metilo (9), 5-fluorotiofen-2-ilo con isótopos enriquecidos de ^{18}F ó ^{19}F (10), 5-tiofen-2-ilo con tritio (11) y 5-metiltiofen-2-ilo enriquecido isotópicamente con carbono ^{11}C (12) según las fórmulas:



- 10 y de todos los derivados de oligotiofeno según la invención, las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El kit según la invención puede comprender además los medios necesarios para aislar dichas células madre neuronales o dichas células madre de cáncer neuronal.

- Además, dicho kit puede incluir muestras de control positivo o negativo, tal como una línea celular o un tejido que se sabe que expresan o que no expresan células madre neuronales o células madre de cáncer neuronal. Los ejemplos de muestras de control incluyen, aunque sin limitación, células o tejidos cerebrales normales, tal como de cerebro humano, líneas celulares de origen de célula madre neuronal, o de origen de célula madre de cáncer neuronal. En otras realizaciones, las células o líneas celulares cerebrales son de origen adulto.

- En algunas realizaciones, un kit incluye material de instrucciones que describen, por ejemplo, los medios necesarios para usar el derivado de oligotiofeno según la invención o una composición según la invención, los medios de detección, o los medios de uso para un reactivo particular. Los materiales de instrucciones pueden ser escritos, estar en formato electrónico (p.ej., un disquete de ordenador o un disco compacto) o pueden ser visuales (p.ej., archivos de video). Los kits también pueden incluir componentes adicionales para facilitar la aplicación particular para la cual se ha diseñado el kit. Por tanto, por ejemplo, el kit puede incluir disoluciones tampón y otros reactivos usados rutinariamente para la práctica de un método descrito particular. Dichos kits y los contenidos apropiados son bien conocidos por los especialistas en la técnica.

El kit puede comprender además, en una cantidad suficiente para al menos un ensayo, el derivado de oligotiofeno según la invención o la composición según la invención como un reactivo empaquetado por separado.

- Habitualmente también se incluyen las instrucciones para uso del reactivo empaquetado. Dichas instrucciones típicamente incluyen una expresión tangible que describe las concentraciones de reactivo y/o al menos un parámetro del método de ensayo tal como las cantidades relativas de reactivo y muestra que han de mezclarse, los periodos de tiempo de mantenimiento para las mezclas reactivo/muestra, la temperatura, las condiciones de tampón, y otros similares.

- Determinadas realizaciones del kit pueden incluir un medio contenedor, tal como una caja, una bolsa, un saquito, un cartón plástico (tal como plástico moldeado u otro empaquetamiento transparente), un envoltorio (tal como un envoltorio sellado o sellable de plástico, papel o metálico), u otro recipiente.

En algunos ejemplos, los componentes del kit estarán incluidos en una única unidad de empaquetamiento, tal como una caja u otro recipiente, unidad de empaquetamiento que puede tener compartimentos en los cuales se pueden ubicar uno o más componentes del kit. En otros ejemplos, un kit incluye uno o más contenedores, por ejemplo viales, tubos, y otros similares que pueden retener, por ejemplo, una o más muestras biológicas que van a ser evaluadas.

- Otras realizaciones de kit incluyen, por ejemplo, jeringas, algodones o guantes de látex, que pueden ser útiles para el manejo, la recolección y/o el procesamiento de una muestra biológica. Los kits también pueden contener

opcionalmente herramientas útiles para trasladar una muestra biológica de un sitio a otro, que incluyen, por ejemplo, cuentagotas, jeringas y similares. Otras realizaciones adicionales pueden incluir medios para de eliminación para desechar los objetos usados o que ya no son necesarios (tales como muestras del sujeto, etc.). Dichos medios de eliminación pueden incluir, sin limitación, recipientes que son capaces de contener fugas de los materiales descartados, tales como bolsas, cajas o recipientes impermeables de plástico, metal u otro material.

Ahora se describen ejemplos no limitantes que muestran determinados aspectos de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - tinción de células madre neuronales inmaduras no diferenciadas y de células neuronales maduras diferenciadas y más maduras.

Cultivo celular y preparación de placas

Si disociaron células madre neuronales (NSCs) y se aislaron de córtex cerebral de embriones E15.5 de ratas Sprague-Dawley preñadas en tiempo controlado. Los animales fueron tratados de acuerdo a las guías institucionales y nacionales (permiso Ético nº N310/05).

En primer lugar se cubrieron las placas de cultivo de tejido con 15 µg/mL de poli-L-ornitina (Sigma-Aldrich) durante 1 h, y a continuación se lavaron con PBS tres veces.

A continuación, las placas fueron cubiertas con 1 µg/mL de fibronectina (Sigma-Aldrich) durante 1 h y después se lavaron una vez en PBS.

Tinción de células madre neuronales de rata (NSCs)

Las células madre neuronales fueron llevadas a placa en placas de 6 pocillos (40.000 células/pocillo) en DMEM:F12 libre de suero (Invitrogen) con suplementos y 10 ng/mL de FGF2 (R&D systems) durante 24 h antes de una estimulación adicional.

A continuación las células fueron estimuladas con 10 ng/mL de FGF2, 10 ng/mL de CNTF (R&D systems), 10% de FBS (Invitrogen), VPA 1 mM (Sigma) o sin factores añadidos (medio N2) durante tres días.

La adición de factores solubles se llevó a cabo cada 24 h, y el medio se cambió cada 48 h. Se administró p-HTMI, a una dilución de 1:500, directamente a cada pocillo y la detección se realizó tras 10 minutos en un microscopio fluorescente.

El p-HTMI generó quimioluminiscencia a una longitud de onda común a las proteínas fluorescentes verdes.

Resultados

Se obtuvo una fuerte señal verde en las células madre inmaduras no diferenciadas, que se acumuló en el citoplasma de las células, mientras que las células diferenciadas y más maduras presentaron una señal significativamente menor o no presentaron señal.

NSCs tratadas con BMP4 y Wnt3

También se trataron células madre neuronales con 10 ng/mL de BMP4 y 10 ng/mL de Wnt3a (R&D Systems) durante 14 días y después se tiñeron con p-HTMI. Las neuronas maduras presentaron una tinción muy débil.

Resultados

El p-HTMI generó quimioluminiscencia a una longitud de onda común a las proteínas fluorescentes verdes.

Se obtuvo una fuerte señal verde en las células madre inmaduras no diferenciadas, que se acumuló en el citoplasma de las células, mientras que las células diferenciadas y más maduras presentaron una señal significativamente menor o no presentaron señal detectable.

Las células madre neuronales también fueron tratadas con los factores de crecimiento extracelulares BMP4 y Wnt3a durante 14 días para inducir la diferenciación en neuronas maduras y funcionales, y a continuación se tiñeron con p-HTMI como se ha descrito anteriormente. Las neuronas maduras presentaron una tinción muy débil.

NSCs (FGF):	5+
Astrocitos (CNTF) :	2
Neuronas (VPA):	2+
Neuronas (BMP4/Wnt3a):	2
Células de músculo liso (FBS):	1

5 **Ejemplo 2 - Tinción de NSCs derivadas de células madre embrionarias (ES) de ratón**

Se cultivaron líneas de células madre embrionarias (ES) según los protocolos estándar. Se generaron NSC derivadas de células ES mediante re-ubicación en placa de cultivos de diferenciación neuronal adherentes de 7 días (típicamente $2-3 \times 10^6$ células en un matraz T75) sobre plástico no cubierto en medio NS-A suplementado con N2 modificado y 10 ng/mL de EGF y FGF-2 (medio de expansión de NSC). A lo largo de 3-5 días, las células formaron agregados que, tras recolección y sedimentación para eliminar residuos, se unieron posteriormente a plástico nuevo y sobrepasaron las NSC. Tras la adición de 0,5 µg/mL de puromicina a cultivos adherentes diferenciadores en el día 7, se generaron células 46C-NS. Las células se volvieron a llevar a placa 3 días después en un matraz T75 no cubierto en medio N2B27 con 10 ng/mL de EGF y FGF-2 en ausencia de puromicina. Para derivar líneas clonales, se llevaron a placa células individuales en placas de microtitulación de 96 pocillos mediante dilución limitante, y se puntuó la presencia de una célula por pocillo 1 h después de llevar a placa.

Resultados

Se obtuvo una fuerte señal verde en las células madre neuronales inmaduras no diferenciadas, que se acumuló en el citoplasma de las células, mientras que las células ES no diferenciadas presentaron una señal significativamente menor o no presentaron señal.

20 **Ejemplo 3 - Tinción de glioma C6 de rata**

El glioma C6 es una línea celular de rata usada como sistema modelo para células de glioma. Las células fueron cultivadas en medio DMEM (Invitrogen) suplementado con FBS al 10%.

Para el propósito de mantenimiento, las células de glioma C6 fueron cultivadas en un matraz de 75 cm².

25 Antes de los experimentos, las células fueron divididas y llevadas a placa (40.000 células/pocillo) en una placa de 6 pocillos. Cuando se tiñeron con p-HTMI (1:500), el 1-2% de las células se tiñó claramente, mientras que el 98-99% permaneció sin teñir. Un 1-2% de las células es la proporción estimada de las denominadas células madre de cáncer en un cultivo de glioma.

Ejemplo 4 - Tinción de glioma C6 de rata cultivado como células madre neuronales

30 Se cultivaron células de glioma C6 con el mismo protocolo que para las NSCs, sobre placas pre-cubiertas con poli-L-ornitina y fibronectina y después se cultivaron en medio N2 con suplementos.

Las células fueron llevadas a placa en placas de 6 pocillos (40.000 células/pocillo) en DMEM:F12 libre de suero (Invitrogen) con suplementos y 10 ng/mL de FGF2 (R&D systems) durante 24 h antes de una estimulación adicional. A continuación las células fueron estimuladas con 10 ng/mL de FGF2, 10 ng/mL de CNTF (R&D systems), 10% de FBS (Invitrogen), VPA 1 mM (Sigma) o sin factores añadidos (medio N2) durante tres días.

35 La adición de factores solubles se llevó a cabo cada 24 h, y el medio se cambió cada 48 h. Se administró p-HTMI, a una dilución de 1:500, directamente a cada pocillo y la detección se realizó tras 10 minutos en un microscopio fluorescente.

Resultados

40 El p-HTMI generó quimioluminiscencia a una longitud de onda común a las proteínas fluorescentes verdes. Se obtuvo una fuerte señal verde en las células madre inmaduras no diferenciadas, que se acumuló en el citoplasma de las células, mientras que las células diferenciadas y más maduras presentaron una señal significativamente menor o

no presentaron señal. Todas las células cultivadas en FGF2 mostraron una fuerte tinción en comparación con las células del medio de diferenciación.

Ejemplo 5 - Tinción de células de glioma humano

- 5 Se usaron células de glioma humano procedentes de pacientes (humanos) para estudiar el glioma *in vitro*. Las células fueron cultivadas en medio DMEM (Invitrogen) suplementado con FBS al 10%. Para el propósito de mantenimiento, las células de glioma C6 fueron cultivadas en un matraz de 75 cm². Antes de los experimentos, las células fueron divididas y llevadas a placa (40.000 células/pocillo) en una placa de 6 pocillos.

Resultados

- 10 Cuando se tiñeron con p-HTMI (1:500), el 1-2% de las células se tiñó claramente, mientras que el 98-99% permaneció sin teñir. Un 1-2% de las células es la proporción estimada de las denominadas células madre de cáncer en un cultivo de glioma.

Ejemplo 6 - Tinción de células de glioma humano cultivadas como NSCs

Se cultivaron células de glioma humano procedentes de pacientes con el mismo protocolo que para las NSCs, sobre placas pre-cubiertas con poli-L-ornitina y fibronectina y después se cultivaron en medio N2 con suplementos.

- 15 Las células fueron llevadas a placa en placas de 6 pocillos (40.000 células/pocillo) en DMEM:F12 libre de suero (Invitrogen) con suplementos y 10 ng/mL de FGF2 (R&D systems) durante 24 h antes de una estimulación adicional.

- A continuación las células fueron estimuladas con 10 ng/mL de FGF2, 10 ng/mL de CNTF (R&D systems), 10% de FBS (Invitrogen), VPA 1 mM (Sigma) o sin factores añadidos (medio N2) durante tres días. La adición de factores solubles se llevó a cabo cada 24 h, y el medio se cambió cada 48 h. Se administró p-HTMI, a una dilución de 1:500, directamente a cada pocillo y la detección se realizó tras 10 minutos en un microscopio fluorescente.

El p-HTMI generó quimioluminiscencia a una longitud de onda común a las proteínas fluorescentes verdes.

Resultados

- 25 Se obtuvo una fuerte señal verde en las células madre inmaduras no diferenciadas, que se acumuló en el citoplasma de las células, mientras que las células diferenciadas y más maduras presentaron una señal significativamente menor o no presentaron señal.

Todas las células cultivadas en FGF2 mostraron una fuerte tinción en comparación con las células del medio de diferenciación.

Ejemplo 7 - Microscopía de 2 fotones de células madre neuronales teñidas con p-HTMI

Las longitudes de onda de emisión y transmisión de p-HTMI fueron caracterizadas en un microscopio de 2 fotones.

- 30 Se cultivaron NSCs en placas de 35 mm (40.000 células/placa) y se trataron con 10 ng/mL de FGF2 durante 48 horas. Antes de la tinción de las células, el medio se cambió a medio DMEM:F12 sin rojo de fenol (Invitrogen) a fin de eliminar las señales de fondo.

- Se administró CellTracker (Invitrogen) junto con p-HTMI (1:500) con el objetivo de ser capaces de encontrar células vivas, dando como resultado una doble tinción, en rojo (CellTracker) y verde (p-HTMI). Esto demuestra que la tinción con p-HTMI se puede combinar con la detección simultánea de otros tipos de biomarcadores.

Ejemplo 8 - Clasificación FACS de células madre neuronales teñidas con p-HTMI

Se cultivaron NSCs embrionarias de rata (15.5) en placas de 35 mm (40.000 células/placa) y se trataron con 10 ng/mL de FGF2 durante 48 horas.

- 40 Antes de la tinción de las células, el medio se cambió a medio DMEM:F12 sin rojo de fenol (Invitrogen) a fin de eliminar las señales de fondo. Las placas fueron incubadas con p-HTMI durante 10 minutos y después se cultivaron con HANKs durante cinco minutos. A continuación las células fueron rascadas y llevadas a una máquina FACS. El análisis se llevó a cabo con un citómetro de flujo FACSCalibur equipado con el software CellQuest (Becton Dickinson).

Resultados

- 45 Los resultados se muestran en la Figura 2.

La Figura 2 muestra histogramas de tinción y clasificación FACS de células madre neuronales. La Figura 2A muestra un control en el que no se había añadido compuesto.

La Figura 2B muestra la tinción con el Compuesto 1 (que no se une a células madre neuronales o a células madre de cáncer neuronal, Acosador 2).

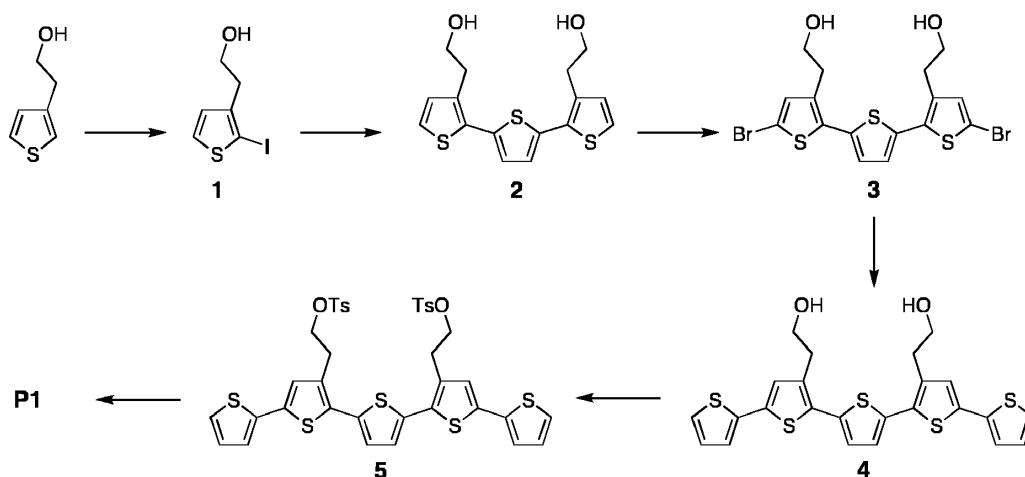
La Figura 2C muestra la unión de Compuesto 2 (p-HTMI, Acosador 1) a células madre neuronales.

La Figura 2D muestra la tinción de Compuesto 1 y Compuesto 2 a células madre neuronales, que muestra la fuerte unión del Compuesto 2 como el pico de más a la derecha respecto a dichas células.

La Figura 2E muestra los histogramas solapados del control y del Compuesto 1 (que no se une a células madre neuronales), y la Figura 2F muestra los histogramas solapados del Compuesto 2 (que se une a células madre neuronales, pico de la derecha) y del control, pico de la izquierda.

Ejemplo 9 - Síntesis del derivado de oligotiofeno p-HTMI

A continuación se muestra una visión general de la reacción de síntesis, etapas 1 - 5, que generan P1 (p-HTMI).



Método general

Los disolventes y los reactivos fueron usados tal cual fueron suministrados por el proveedor químico (Sigma Aldrich Co, Merck Sharp & Dohme Co ó Frontier Scientific Co). Los extractos orgánicos fueron secados sobre sulfato magnésico anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío a 40 °C. El ácido 3-tiofenoacético, el ácido 2-tiofenoborónico y el PEPPSI™-IPr (dicloruro de [1,3-Bis(2,6-Diisopropilfenil)imidazol-2-iliden](3-cloropiridil)paladio (II)) se encuentran disponibles comercialmente en Sigma-Aldrich Co. El ácido 5-(dihidroxiboril)-2-tiofenocarboxílico se adquirió en Maybridge®. Las reacciones de microondas se llevaron a cabo en un reactor de microondas SmithCreator 482. Los espectros de RMN fueron registrados en un instrumento Varian 300 MHz. El desplazamiento químico fue asignado con el pico residual del disolvente como referencia, de acuerdo a Gottlieb *et al.* La TLC se llevó a cabo en placas precubiertas 60 F254 de Merck usando luz UV ($\lambda = 254$ nm y 366 nm) y carbonizando con etanol/ácido sulfúrico/panisalaldehído/ácido acético 90:3:2:1 para visualización. La cromatografía en columna flash (FC) se llevó a cabo usando gel de sílice 60 (0,040-0,063 mm, Merck). Los análisis de gradiente de HPLC-MS se llevaron a cabo en un sistema Gilson (Columna: Phenomenex C-18 250 x 15 mm y Phenomenex C-18 150 x 4,6 mm para los experimentos preparativos y analíticos, respectivamente; Bomba: bomba de gradiente Gilson 322; detector UV/VIS: Gilson 155; detector MS: Thermo Finnigan Surveyor MSQ; recolector de fracciones Gilson FC204) usando acetonitrilo con un 0,1% de ácido fórmico y agua desionizada con un 0,1% de ácido fórmico como fase móvil. Los análisis MALDI-TOF MS fueron registrados en modo lineal positivo con una matriz de ácido a-ciano-4-hidroxycinnámico (CHCA) o con ácido 2,5-dihidroxi benzoico (DHB) como matriz.

Síntesis de 1

Se disolvió 2-(3-tienil) etanol (4,00 g, 31,20 mmol) en $\text{CHCl}_3/\text{AcOH}$ (1:1, 90 mL) y se enfrió a 0°C.

Se añadió *N*-iodosuccinimida (7,37 g, 32,76 mmol) a la mezcla y tras dos horas se añadió más *N*-iodosuccinimida (1,4 g, 6,22 mmol).

Tras una hora se diluyó la mezcla con agua (250 mL) y la fase orgánica se lavó con sulfato sódico al 10% (2 x 70 mL) y agua (2 x 70 mL).

La cromatografía de columna flash (tolueno/DCM) dio lugar al producto 2 (2,08 g, 8,19 mmol).

TLC (Tolueno/acetato de etilo 4:1) $R_f = 0,37$.

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 1,45 (t, 2H), 3,80 (t, 2H), 6,78 (d, 1 H $J = 6\text{Hz}$), 7,46 (d, 1 H, $J = 6\text{Hz}$)

RMN de ^{13}C (CDCl_3) δ : 35,5, 62,5, 75,6, 128,5, 131,0, 143,3.

Síntesis de 2

El compuesto 1 de la etapa anterior (0,050 g, 0,197 mmol), 2'-(2,5-tiofeno)bis[4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano] (0,034 g, 0,101 mmol) y K_2CO_3 (0,024 g, 0,172 mmol) fueron disueltos en disolvente (2 mL) en atmósfera de argón.

- 5 Después de 10 minutos se añadió peppi (0,004 g, 0,001 mmol) a la mezcla y la disolución se burbujeó con argón durante 5 minutos.

La mezcla fue irradiada con microondas a 80 °C durante 10 minutos.

El producto se filtró, se evaporó y se disolvió en metanol antes de ser purificado en columna flash (tolueno/acetato de etilo 1:1) y dio lugar al producto 2 (0,165 g, 0,491 mmol).

- 10 TLC (tolueno/acetato de etilo 2:1) R_f = 0,17.

Síntesis de 3

Se disolvió el producto 2 ((0,816g, 2,42 mmol) en CHCl_3 /ácido acético (30 mL, 1/1) y se enfrió a 0 °C.

Se añadió *N*-bromosuccinimida (0,906g, 5,10 mmol).

- 15 Después de 1 día, la reacción se purificó mediante cromatografía flash (tolueno/acetato de etilo 18:1 a 4:1) y HPLC (acetonitrilo/ H_2O 7:1 a 8:1 a lo largo de 10 minutos) para dar lugar al producto 3 (0,448g, 37%).

Síntesis de 4

El producto 3 (0,052g, 0,105 mmol), éster de pinacol de ácido 2-tiofenborónico (0,066g, 0,314 mmol), K_2CO_3 (0,087g, 0,630 mmol) y PEPPSI-IPr (0,001g, 0,0014mmol) fueron añadidos a una mezcla desgasificada de tolueno/metanol (1:1, 1 mL) y se irradió con microondas durante 10 minutos a 80 °C.

- 20 La disolución se filtró y se diluyó con acetato de etilo antes de ser lavada con HCl (1 M, ac.), salmuera y H_2O .

La cromatografía flash dio lugar al producto con un rendimiento del 93% (0,049 g).

Síntesis de 5

Se añadió el producto 4 (0,049 g, 0,0979 mmol) a CHCl_3 (0,8 mL) y piridina (0,2 mL).

cloruro de *p*-tolueno sulfonilo (0,056 g, 0,294 mmol).

- 25 Después de 4 h, la disolución se diluyó con tolueno y se lavó con HCl (1 M, ac.) y H_2O .

La cromatografía de columna flash (tolueno) dio lugar al producto 5 con un rendimiento del 84 % (0,066 g).

Síntesis de P1

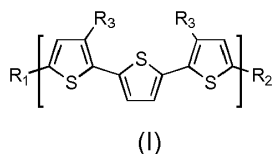
Se disolvió el producto 5 (0,010 g, 0,0124 mmol) y metilimidazol (0,030 mL, 0,376 mmol) en acetonitrilo (1 mL).

Después de un día, la mezcla se concentró para dar lugar a P1 (3 mg) con un rendimiento del 39 %.

- 30 LC-MS calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{S}_5$: $[\text{M}]^{2+}$: 315,05; Observado experimentalmente: 315,10.

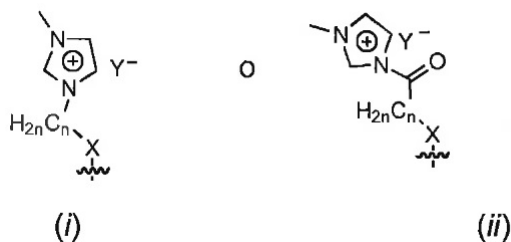
REIVINDICACIONES

1. Un derivado de oligotiofeno según la fórmula (I)



en donde

5 R₃ puede elegirse entre



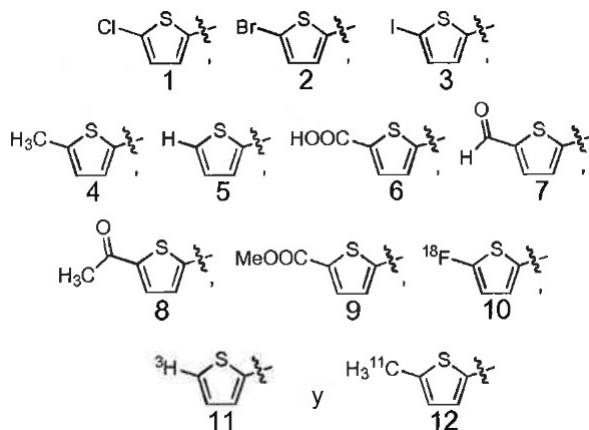
y donde

n puede variar entre 0 y 3,

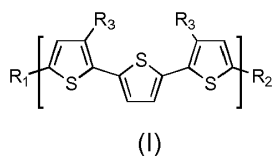
Y⁻ es el contraión aniónico y puede ser, aunque sin limitación, bromo, cloro, yodo o 4-metilbencenosulfonato,

10 X se puede elegir entre O (n ≥ 1) ó CH₂ (n = 0-3), y

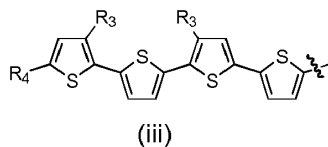
cada uno de R₁ y R₂ se selecciona de forma independiente del grupo que consiste en 5-clorotiofen-2-ilo (1), 5-bromotiofen-2-ilo (2), 5-iodotiofen-2-ilo (3), 5-metiltiofen-2-ilo (4), tiofen-2-ilo (5), 5-ácido tiofencarboxílico-2-ilo (6), 5-formiltiofen-2-ilo (7), 5-acetiltiofen-2-ilo (8) y 2-il-tiofen-5-carboxilato de metilo (9), 5-fluorotiofen-2-ilo con isótopos enriquecidos de ¹⁸F ó ¹⁹F (10), 5-tiofen-2-ilo con tritio (11) y 5-metiltiofen-2-ilo enriquecido isotópicamente con carbono ¹¹C (12) según las fórmulas



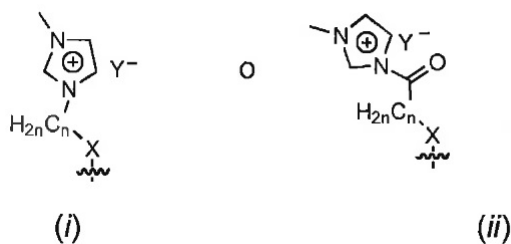
2. Un derivado de oligotiofeno según la fórmula 1



donde R1 es



R3 se elige entre



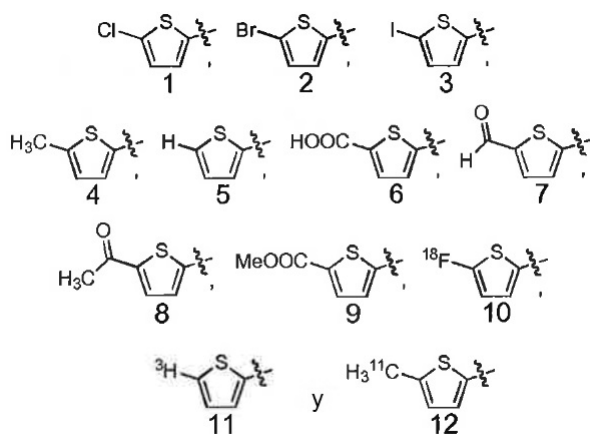
5 y donde

n puede variar entre 0 y 3,

Y⁻ es el contraión aniónico y puede ser, aunque sin limitación, bromo, cloro, yodo o 4-metilbencenosulfonato,

X se puede elegir entre O (n ≥ 1) ó CH₂ (n ≥ 0),

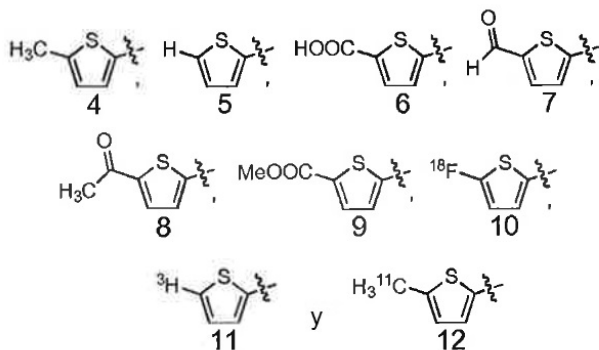
10 R₂ se selecciona del grupo que consiste en 5-clorotiofen-2-ilo (1), 5-bromotiofen-2-ilo (2), 5-iodotiofen-2-ilo (3), 5-metiltiofen-2-ilo (4), tiofen-2-ilo (5), 5-ácido tiofencarboxílico-2-ilo (6), 5-formiltiofen-2-ilo (7), 5-acetiltiofen-2-ilo (8) y 2-il-tiofen-5-carboxilato de metilo (9), 5-fluorotiofen-2-ilo con isótopos enriquecidos de ¹⁸F ó ¹⁹F (10), 5-tiofen-2-ilo con tritio (11) y 5-metiltiofen-2-ilo enriquecido isotópicamente con carbono ¹¹C (12) según las fórmulas



y donde,

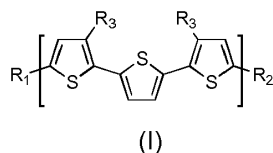
15

R₄ se selecciona del grupo que consiste en bromo, cloro, hidrógeno, yodo, metilo, 5-metiltiofen-2-ilo (4), tiofen-2-ilo (5), 5-ácido tiofencarboxílico-2-ilo (6), 5-formiltiofen-2-ilo (7), 5-acetiltiofen-2-ilo (8) y 2-il-tiofen-5-carboxilato de metilo (9), 5-fluorotiofen-2-ilo con isótopos enriquecidos de ¹⁸F ó ¹⁹F (10), 5-tiofen-2-ilo con tritio (11) y 5-metiltiofen-2-ilo enriquecido isotópicamente con carbono ¹¹C (12) según las fórmulas:

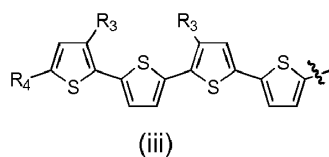


5

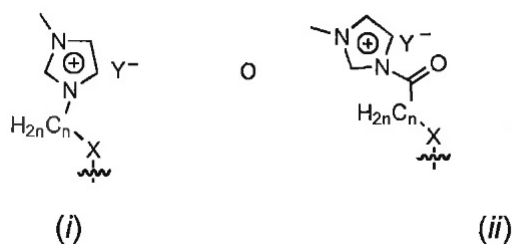
3. Un derivado de oligotiofeno según la fórmula (I),



donde R1 es



10 R3 se elige entre



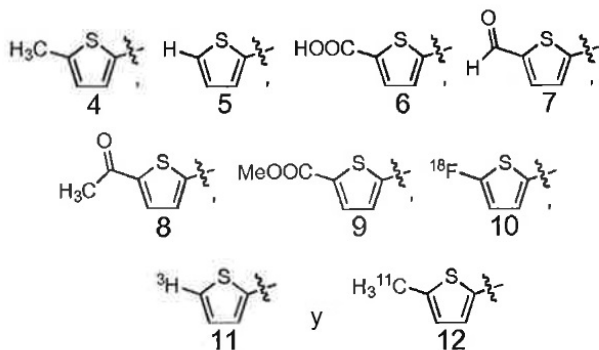
y donde

n puede variar entre 0 y 3,

Y⁻ es el contraión aniónico y puede ser, aunque sin limitación, bromo, cloro, yodo o 4-metilbencenosulfonato,

15 X se puede elegir entre O (n ≥ 1) ó CH₂ (n = 0-3),

y donde R_2 y R_4 se seleccionan de forma independiente del grupo que consiste en bromo, cloro, hidrógeno, yodo, metilo, 5-metiltiofen-2-ilo (4), tiofen-2-ilo (5), 5-ácido tiofencarboxílico-2-ilo (6), 5-formiltiofen-2-ilo (7), 5-acetiltiofen-2-ilo (8) y 2-il-tiofen-5-carboxilato de metilo (9), 5-fluorotiofen-2-ilo con isótopos enriquecidos de ^{18}F ó ^{19}F (10), 5-tiofen-2-ilo con tritio (11) y 5-metiltiofen-2-ilo enriquecido isotópicamente con carbono ^{11}C (12) según las fórmulas:



5

4. El derivado de oligotiofeno según la reivindicación 1,

en donde

R_3 es según la fórmula (i),

y donde

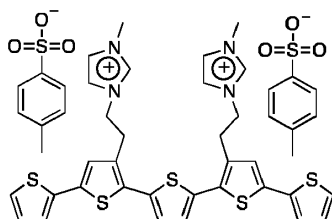
10

n es 1,

X es CH_2 ,

Y^- es 4-metilbenzenosulfonato,

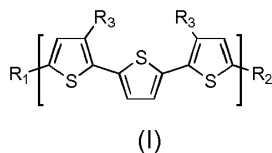
R_1 y R_2 son según la fórmula 5 de la reivindicación 1, lo que proporciona la fórmula



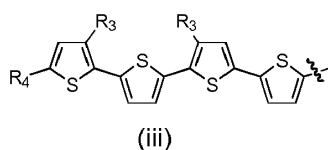
P1 (p-HTMI)

15

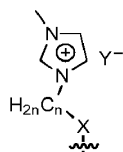
5. Un derivado de oligotiofeno según la fórmula (I),



donde R_1 es



y donde R_3 es,



(i)

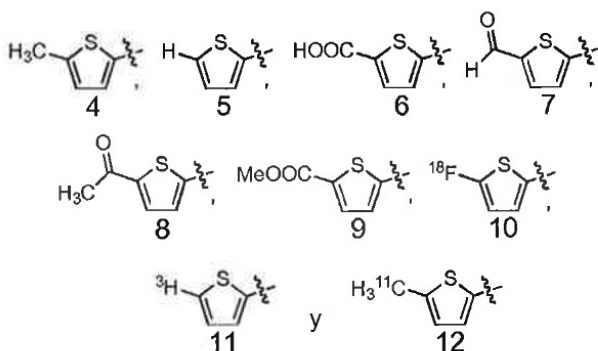
y donde

n es 1,

5 X es CH_2 ,

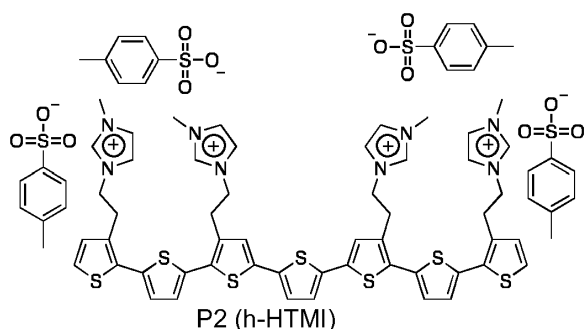
Y es 4-metilbenzenosulfonato,

R_4 se selecciona del grupo que consiste en bromo, cloro, hidrógeno, yodo, metilo, 5-metiltiofen-2-ilo (4), tiofen-2-ilo (5), 5-ácido tiofencarboxílico-2-ilo (6), 5-formiltiofen-2-ilo (7), 5-acetiltiofen-2-ilo (8) y 2-il-tiofen-5-carboxilato de metilo (9), 5-fluorotiofen-2-ilo con isótopos enriquecidos de ^{18}F ó ^{19}F (10), 5-tiofen-2-ilo con tritio (11) y 5-metiltiofen-2-ilo enriquecido isotópicamente con carbono ^{11}C (12) según las fórmulas:



y R_2 es hidrógeno,

lo que proporciona la fórmula



15 6. El derivado de oligotiofeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que es luminiscente.

7. El derivado de oligotiofeno según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que está conjugado a un resto detectable, donde el resto detectable es un radioisótopo, un radionucleido, una marca fluorescente, una marca enzimática, una marca quimioluminiscente, un grupo de biotín y un epítipo de polipéptido predeterminado reconocido por una entidad de unión secundaria; p.ej. secuencias de par de cremallera de leucina; un sitio de unión para un anticuerpo secundario, un dominio de unión de metal, un epítipo, una etiqueta de proteína, o un carbohidrato.

20 8. Una composición para uso en la detección de células madre neuronales que comprende el derivado de oligotiofeno según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y un tampón.

9. Un método para detectar células madre neuronales o células madre de cáncer neuronal en una muestra biológica *in vitro*, método que comprende las etapas de
- 5 a. poner en contacto dicha muestra con una composición que comprende al menos un derivado de oligotiofeno según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o la composición según la reivindicación 8, durante un tiempo suficiente para formar al menos un complejo de célula madre neuronal - derivado de oligotiofeno o para formar al menos un complejo de célula madre de cáncer neuronal - derivado de oligotiofeno,
- b. detectar dichos complejos de célula madre neuronal - derivado de oligotiofeno o dichos complejos de célula madre de cáncer neuronal - derivado de oligotiofeno,
- 10 10. El método según la reivindicación 9, donde el control positivo comprende células madre neuronales o células madre de cáncer neuronal.
11. Un método para separar células madre neuronales o células madre de cáncer neuronal de otros materiales biológicos en una muestra biológica *in vitro*, método que comprende las etapas de
- 15 a. poner en contacto dicha muestra con una composición que comprende al menos un derivado de oligotiofeno según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o la composición según la reivindicación 8, durante un tiempo suficiente para formar al menos un complejo de célula madre neuronal - derivado de oligotiofeno o para formar al menos un complejo de célula madre de cáncer neuronal - derivado de oligotiofeno,
- b. detectar dichos complejos de célula madre neuronal - derivado de oligotiofeno o de célula madre de cáncer neuronal - derivado de oligotiofeno,
- 20 c. separar dichos complejos detectados de célula madre neuronal - derivado de oligotiofeno o dichos complejos detectados de célula madre de cáncer neuronal - derivado de oligotiofeno, separando de este modo las células madre neuronales o las células madre de cáncer neuronal.
12. El método de la reivindicación 11, que además comprende la etapa de aislar dichas células madre neuronales o dichas células madre de cáncer neuronal.
- 25 13. El uso del derivado de oligotiofeno según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o de la composición según la reivindicación 8, para detectar células madre neuronales o células madre de cáncer neuronal *in vitro*.
14. El uso del derivado de oligotiofeno según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o de la composición según la reivindicación 8, para separar células madre neuronales o células madre de cáncer neuronal *in vitro*.
15. Un kit que comprende
- 30 a. el derivado de oligotiofeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o de la composición según la reivindicación 8 y
- b. opcionalmente, instrucciones para usar el derivado de oligotiofeno o la composición.