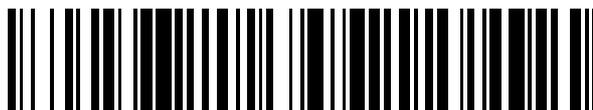


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 836**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/21** (2006.01)

**A61P 25/16** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2011 PCT/EP2011/059665**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2011 WO11157642**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2011 E 11726386 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 2582368**

54 Título: **Acetil-carnitina para uso en un método para incrementar la neurogénesis en el tejido neuronal**

30 Prioridad:

**16.06.2010 EP 10166094**

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

**01.06.2018**

73 Titular/es:

**ALFASIGMA S.P.A. (100.0%)  
Viale Sarca, 223  
20126 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**GRILLI, MARIAGRAZIA;  
CANONICO, PIER LUIGI y  
KOVERECH, ALEARDO**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 670 836 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**

Acetil-carnitina para uso en un método para incrementar la neurogénesis en el tejido neuronal

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de acetil L-carnitina para incrementar la neurogénesis.

- 5 En particular, la presente invención se refiere al uso de acetil L-carnitina o una sal de la misma para incrementar la neurogénesis.

**Antecedentes de la invención**

10 Se creía que la neurogénesis, o la formación de nuevas células neuronales, se daba solamente en los organismos en desarrollo. Sin embargo, la investigación reciente ha demostrado que la neurogénesis continúa, de hecho, a lo largo de la vida adulta tanto en los organismos vertebrados como en los invertebrados.

15 Las células madre neuronales (CMN) son una fuente de neuronas nuevas en el sistema nervioso central (SNC) mamífero. Las CMN están localizadas en la zona endimaria y/o subventricular (ZSV) que tapiza el ventrículo lateral (Cell 1999; 97:703-716; Cell 1999; 96:25-34) y en el giro dentado de la formación hipocámpica (J. Neurobiol. 1998; 36:249-266). Los estudios han revelado la posibilidad de varias localizaciones adicionales de CMN en el SNC adulto (J. Neurosci. 1999; 19:8487-8497). La división asimétrica de las CMN mantiene su número inicial, a la vez que se genera una población de células precursoras o progenitoras que se dividen rápidamente (Cell 1999; 96:25-34). Las células progenitoras responden a una diversidad de señales que dictan el grado de su proliferación y su destino, desde el punto de vista tanto de la diferenciación como de la ubicación.

20 Las CMN del sistema ventricular del adulto son probablemente homólogos de las células madre de la zona ventricular embrionaria que tapizan el tubo neural. La progenie de estas células embrionarias migra para formar el SNC como neuronas y glía diferenciadas (Developmental Neurobiology. 1991; págs. 401-451). Las CMN persisten en la pared del ventrículo lateral (PVL) del adulto, y generan progenitores neuronales que migran por la corriente migratoria rostral hacia el bulbo olfativo. Allí se diferencian en células granulares y neuronas periglomerulares (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90:2074-2077). En el bulbo olfativo se da una muerte neuronal sustancial, lo que crea la necesidad de una sustitución continua de las neuronas perdidas que se satisface mediante los progenitores migratorios derivados de la PVL (Neurosci. Lett. 2000; 291:17-20). Además, existen indicaciones de que las neuronas perdidas de otras regiones del cerebro se pueden sustituir por progenitores de la PVL que se diferencian hasta el fenotipo de las neuronas perdidas, con proyecciones neuronales adecuadas y sinapsis con el tipo correcto de células objetivo (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997; 94:11663-11668; Nature 2000; 405:951-955).

30 Se han establecido técnicas de cultivo in vitro para identificar las señales externas implicadas en la regulación de la proliferación y diferenciación de CMN (Cell 1999; 96:25-34; Exp. Cell Res. 1999; 253:733-736). Los mitógenos EGF y FGF básico permiten la expansión de cultivos celulares de progenitores neuronales aislados de la pared del ventrículo y del hipocampo (Science 1997; 276:66-71; Exp. Cell Res. 1999; 253:733-736). Estos progenitores en división permanecen en un estado indiferenciado, y crecen hasta grandes clones de células conocidos como neuroesferas. Tras la retirada de los mitógenos y la adición de suero, los progenitores se diferencian en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, que son los tres linajes de células del cerebro (Cell 1999; 97:703-716; Cell 1999; 96:25-34). Se pueden añadir factores de crecimiento específicos para alterar las proporciones de cada tipo celular formado. Por ejemplo, CNTF actúa para dirigir los progenitores neuronales hacia un destino astrocítico (Genes Dev. 1996; 10:3129-3140; J. Neurosci. 1998; 18:3620-3629). La hormona tiroidea, triyodotironina (T3), estimula la diferenciación hasta oligodendrocitos (Genes Dev. 1996; 10:3129-3140), mientras PDGF aumenta la diferenciación neuronal de las células progenitoras (Genes Dev. 1996; 10:3129-3140; Neuron 1997; 18:553-562). Recientemente se ha demostrado que, de hecho, las neuronas regeneradas adultas se integran en el circuito cerebral existente, y contribuyen a mejorar los déficits neurológicos (Cell 2002; 110:429-441). De manera interesante, las observaciones también han demostrado que la neurogénesis no solamente se está dando a nivel del bulbo olfativo y el hipocampo. 45 A este respecto, se ha propuesto que este proceso también se puede dar en la sustancia negra del ratón adulto, lo que abre un nuevo campo de investigación para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003; 100:7925-7930).

50 La capacidad de expandir los progenitores neuronales y manipular su destino celular tiene implicaciones enormes para las terapias de trasplante para enfermedades neurológicas en las que se pierden tipos celulares específicos. La enfermedad de Parkinson (EP), por ejemplo, se caracteriza por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra. Los tratamientos previos de trasplante para pacientes de EP han usado tejido fetal tomado del mesencéfalo ventral en un momento en el que las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra están experimentando una diferenciación terminal (Prog. Neurobiol. 1994; 44:1-35). Estas células se han injertado en el núcleo estriado, en el que forman contactos sinápticos con las neuronas estriatales del hospedador, su objetivo sináptico normal. Esto restablece el recambio y la liberación de dopamina hasta los niveles normales, con beneficios funcionales significativos para el paciente (Prog. Neurobiol. 1994; 44:1-35). Sin embargo, el injerto de tejido fetal está limitado por consideraciones éticas y la escasez de tejido donante. La expansión y manipulación de CMN adultas puede proporcionar potencialmente una diversidad de células bien caracterizadas para estrategias basadas en

trasplante para una enfermedad neurodegenerativa tal como EP. Para este objetivo, es de importancia fundamental la identificación de los factores y las rutas que controlan la proliferación y diferenciación de los tipos de células neuronales.

5 Los estudios han demostrado que la infusión intraventricular de EGF y FGF básico induce la proliferación de la población de células de la pared del ventrículo adulto. En el caso de EGF, se ha observado una gran migración de progenitores hacia el parénquima estriatal cercano (J. Neurosci 1996; 16:2649-2658; J. Neurosci 1997; 17:5820-5829). EGF incrementa la diferenciación hasta el linaje glial, y reduce la generación de neuronas (J. Neurosci 1997; 17:5820-5829). Además, la infusión intraventricular de BDNF en ratas adultas incrementa el número de neuronas recién generadas en el bulbo olfativo y la corriente migratoria rostral, y en las estructuras parenquimatosas, que incluyen el núcleo estriado, tabique, tálamo e hipotálamo (J. Neurosci. 2001; 21:6706-6717). Así, varios estudios han demostrado que se puede estimular la proliferación de progenitores en la ZSV de la PVL y que su linaje se puede guiar hacia destinos neuronales o gliales. Aun así, el número de factores que se sabe que afectan a la neurogénesis in vivo es pequeño, y sus efectos son adversos o limitados.

10 Como se mencionó anteriormente, la identificación de factores y rutas que controlan la proliferación y diferenciación de los tipos de células neuronales es de importancia fundamental en el campo médico.

Ya se conoce el uso de acetil L-carnitina o propionil L-carnitina en el campo médico.

El documento US 4346107 se refiere al uso de acetil L-carnitina para el tratamiento terapéutico de pacientes con un metabolismo cerebral alterado, como por ejemplo en los estados de involución psicomotriz senil y presenil y en la demencia senil y presenil.

20 El documento US 4343816 se refiere al uso de acetil L-carnitina para el tratamiento terapéutico de pacientes con enfermedades vasculares periféricas tales como, en general, la enfermedad de Raynaud.

25 El documento WO 9857629 se refiere al uso de acetil L-carnitina para el tratamiento terapéutico de individuos jóvenes que padecen trastornos del estado de ánimo clasificables como distimia (DMS IV) y una personalidad o temperamento depresivo, irritable, ciclotímico basándose en las clasificaciones DMS IV y AXIS II, que implican el abuso definido de sustancias psicotrópicas.

El documento WO 03066041 se refiere al uso de acetil L-carnitina para el tratamiento terapéutico de la depresión en sujetos geriátricos sin demencia que tienen un trastorno depresivo mayor (NDG-MDD).

El documento EP 0256999 se refiere al uso de acetil L-carnitina para el tratamiento terapéutico de pacientes afectados por neuropatía periférica aguda o crónica.

30 El documento EP 0498144 se refiere al uso de acetil L-carnitina para el tratamiento terapéutico del coma traumático. En esta publicación también se informa de que la acetil L-carnitina es capaz de incrementar el flujo sanguíneo cerebral (FSC) medido por medio de SPECT (tomografía computerizada por emisión de fotón único).

El documento EP 0793962 describe el uso de propionil L-carnitina para tratar la arteriosclerosis obliterante crónica en pacientes con una claudicación intermitente gravemente incapacitante.

35 El documento US 2005/043312 describe el uso de acetil-L-carnitina para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica y otras enfermedades neurodegenerativas.

El documento US 6 572 899 describe composiciones que comprenden acetil-L-carnitina para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, la demencia y pérdida de memoria.

40 El documento EP 0 514 359 describe amidas de alcanoil L-carnitina con aminoácidos y composiciones farmacéuticas que contienen las mismas, para estimular la regeneración del tejido nervioso, inhibir la degeneración neuronal, mejorar los procesos de aprendizaje y memoria, y para el tratamiento del coma.

45 PETTEGREW J W ET AL: "Acetyl-L-carnitine physical-chemical, metabolic, and therapeutic properties: relevance for its mode of action in Alzheimer's disease and geriatric depression", MOLECULAR PSYCHIATRY, BASINGSTOKE, GB LNKD-DOI:10.1038/SJ.MP. 4000805, vol. 5, nº 6, 1 de enero de 2000 (01-01-2000), páginas 616-632, XP009010394, describe el uso de acetil-L-carnitina en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Este documento informa además de los efectos neurotróficos de la acetil-L-carnitina durante el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que se modulan mediante la estimulación de NGF.

50 DE ANGELIS C ET AL: "Acetyl-L-carnitine prevents age-dependent structural alterations in rat peripheral nerves and promotes regeneration following sciatic nerve injury in young and senescent rats.", julio de 1994 (07-1994), EXPERIMENTAL NEUROLOGY JUL 1994 LNKD-PUBMED:8070513, VOL. 128, NR. 1, PÁGINA(S) 103 - 114, XP002590826, describe que un tratamiento con acetil-L-carnitina reduce el porcentaje de fibras mielinizadas caracterizadas por alteraciones morfológicas dependientes de la edad, tales como globos de mielina, giros envueltos de mielina, reduplicación de mielina, y ovoides.

BIGINI P ET AL: "Acetyl-L-carnitine Shows neuroprotective and neurotrophic activity in primary culture of rat embryo motoneurons", 6 de septiembre de 2002 (06-09-2002), NEUROSCIENCE LETTERS, VOL. 329, NR. 3, PÁGINA(S) 334-338, XP002590825, describe el papel de la acetil-L-carnitina en la protección de cultivos primarios de motoneuronas expuestas a agentes excitotóxicos o privadas de suero-factor neurotrófico derivado de cerebro. Se ha descubierto que el tratamiento con acetil-L-carnitina mejora la actividad de las motoneuronas, lo que actúa como un factor neurotrófico.

El documento WO 00/21526 describe acilcarnitinas para tratar la demencia senil y el Alzheimer.

El documento EP 0 681 839 describe acetil y propionil carnitina para tratar trastornos neuropsicológicos.

Se ha establecido que se generan neuronas nuevas en el hipocampo adulto a lo largo de la vida a partir de células madre/progenitoras neuronales (CMNs). La neurogénesis es un proceso regenerativo sensible a los estímulos externos, implicado en el aprendizaje, la memoria y la regulación del estado de ánimo. Por lo tanto, se cree que la neurogénesis es una forma importante de regeneración neuronal, que permite a los organismos adaptarse a los cambios ambientales a lo largo de la vida.

La tasa de neurogénesis hipocámpica cambia significativamente con las influencias fisiológicas o patológicas, tales como la actividad física, el enriquecimiento ambiental, el estrés, los trastornos del estado de ánimo, el envejecimiento y los trastornos neurodegenerativos. De hecho, durante el envejecimiento, existe una disminución relacionada con la edad de la neurogénesis adulta. Esta disminución está muy relacionada con una proliferación disminuida, asociada a una estimulación disminuida hacia la proliferación en el cerebro envejecido. La neurogénesis hipocámpica natural o estimulada desempeña un papel importante en los efectos clínicos de los antidepresivos, y posiblemente la neurogénesis reducida puede estar implicada en las atroñas de áreas cerebrales (lo que incluye el hipocampo) asociadas a la depresión. En la enfermedad de Alzheimer (EA), también existen pruebas de una neurogénesis disminuida, que acompaña a la pérdida neuronal característica de la enfermedad.

En el campo médico se percibe la necesidad de disponer de un compuesto nuevo, o un nuevo uso de un compuesto conocido, útil para estimular la neurogénesis para la prevención de la pérdida neuronal en los procesos normales o patológicos del cerebro.

#### Descripción de las figuras

La Figura 1 describe que ALC tiene un efecto fortalecedor dependiente de la concentración sobre la diferenciación de células madre/progenitores adultos hacia neuronas maduras e inmaduras. De hecho, ALC tiene una notable actividad neurogénica hipocámpica dependiente de la concentración, tal como se demuestra mediante el incremento del porcentaje de células MAP-2 positivas (es decir, neuronas nuevas) en cultivo.

La Figura 2 muestra la actividad neurogénica hipocámpica de ALC (células MAP2-positivas) analizada mediante tinción de MAP-2 en neuronas cultivadas con tinción de inmunofluorescencia. Los núcleos se tiñeron con Draq5.

Las Figuras 3 y 4 describen que la actividad neurogénica de ALC no se correlaciona con la actividad neuroprotectora. De hecho, a las concentraciones que indujeron la neurogénesis, ALC (100  $\mu$ M; 300  $\mu$ M o 1 mM) no redujo el porcentaje de núcleos apoptóticos (Fig. 3) o incluso la actividad de la enzima LDH, un índice de necrosis (Fig. 4).

En la Figura 5 se muestra el efecto específico de ALC sobre las células en diversas etapas de la diferenciación. Para entender mejor la Figura 5, es importante aclarar que se usó "Nestina", una proteína filamentosa intermedia expresada de manera predominante por las células madre neuronales, como marcador específico. De hecho, solamente las células positivas para nestina (nestina<sup>+</sup>) forman esferas cuando se colocan en las condiciones de cultivo usadas para las células madre neuronales. En particular, las neuronas maduras son positivas para MAP2 y negativas para nestina, las neuronas inmaduras son positivas para MAP2 y nestina, las células madre/progenitoras son negativas para MAP2 y positivas para nestina, y las células progenitoras son negativas para MAP2 y nestina (véase la Figura 5).

En la Figura 6 se muestra que PLC y ALC son activadores de la diferenciación neuronal de CPN. De hecho, PLC incrementó el número tanto de neuronas maduras como de neuronas inmaduras, y redujo el número de una subpoblación de células madre/progenitoras neuronales indiferenciadas, aunque en menor grado en comparación con ALC. Por el contrario, LC no tuvo ningún efecto. Además, los resultados demostraron que los efectos de ALC y PLC sobre la diferenciación de CPN no se debieron a los efectos neuroprotectores sobre las neuronas inmaduras o maduras recién generadas.

(Sinónimo: acetil L-carnitina=ALC=ALCAR=L-acet; propionil L-carnitina=PLC=L-Prop; LC=L-carnitina=L-car).

#### Descripción de la invención

La presente invención se refiere a acetil L-carnitina, o una sal de la misma, para el uso en la prevención de un trastorno del sistema nervioso central incrementando la neurogénesis, seleccionado del grupo que consiste en

síndrome de Shy-Drager, enfermedad de cuerpos de Lewy, e isquemia espinal, en el que dicha neurogénesis incrementada disminuye la aparición de dichos trastornos.

5 Las enfermedades o alteraciones debidas a una predisposición genética y/o asociadas al envejecimiento que se pueden prevenir según la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en: síndrome de Shy-Drager, enfermedad de cuerpos de Lewy e isquemia espinal.

Es evidente que, según la presente invención, no se incluyen los pacientes que tienen alteraciones traumáticas de los nervios (por ejemplo, nervios lesionados) o del SNC (por ejemplo, coma traumático).

10 La "neurogénesis" se define en la presente memoria como la proliferación, diferenciación, migración, o supervivencia de una célula neuronal in vivo o in vitro. En una realización preferida, la célula neuronal es una célula madre o célula progenitora neuronal adulta, fetal, o embrionaria. La neurogénesis también se refiere a un incremento neto del número de células o a un incremento neto de la supervivencia de las células. Tal como se usa en la presente memoria, "CMN" incluiría, al menos, todas las células madre cerebrales, todas las células progenitoras cerebrales, y todas las células precursoras cerebrales.

En esta descripción, los términos enfermedad o trastorno tendrán el mismo significado.

15 La administración de acetil L-carnitina puede ser sistémica o directa al SNC de un paciente. Las vías de administración incluyen la administración oral, subcutánea, transdérmica, intraperitoneal, intramuscular, venosa, intracerebroventricular, intraparenquimatosa, intratecal, intracraneal, bucal, mucosa, nasal, pulmonar, y rectal, o la administración mediante un sistema de administración con liposomas.

20 Preferiblemente, la composición farmacéutica se usa para prevenir enfermedades estimulando la neurogénesis (es decir, el crecimiento, la proliferación, migración, supervivencia y/o diferenciación celular). Para la prevención, el uso de la invención comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que incluye acetil L-carnitina en un intervalo de dosis de 0,1 g/día a 4,00 g/día; preferiblemente a una dosis de 1 a 2,00 g/día; lo más preferiblemente 1,5 g/día en una dosis individual o múltiple.

La composición de la invención puede comprender además vehículos fisiológicamente aceptables.

25 Según la presente invención, los vehículos fisiológicamente aceptables pueden ser cualquier vehículo conocido en el campo por ser adecuado para una aplicación farmacéutica (es decir, tópica, oral, y parenteral). Los vehículos y formulaciones farmacéuticas adecuadas se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (19<sup>a</sup> ed.) (Gennaro, ed. (1995) Mack Publishing Co., Easton, Pa.).

30 La utilidad de la invención se puede usar para tratar a cualquier mamífero, lo que incluye seres humanos, vacas, caballos, perros, ovejas, y gatos. Preferiblemente, la utilidad de la invención se usa para tratar a seres humanos. En un aspecto, la invención proporciona una prevención regenerativa para los trastornos neurológicos estimulando a las células (p.ej., células madre) para que crezcan, proliferen, migren, sobrevivan, y/o se diferencien para sustituir a las células neuronales que se hayan perdido o destruido. La estimulación in vivo de tales células (p.ej., células madre) se puede llevar a cabo administrando localmente (por medio de cualquier vía) el agente modulador de la neurogénesis de la invención a las células en una formulación adecuada.

35 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso en la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir su fin deseado. De manera más específica, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad eficaz para estimular de manera óptima la proliferación (p.ej., de células madre o células progenitoras). Se apreciará que el contenido unitario de ingrediente o ingredientes activos contenidos en una dosis individual de cada forma farmacéutica no necesita constituir por sí mismo una cantidad eficaz, ya que la cantidad eficaz necesaria se puede alcanzar mediante la administración de una diversidad de unidades de dosis (tales como cápsulas o comprimidos o combinaciones de los mismos). Además, se entiende que, a ciertos niveles de dosis, una cantidad eficaz puede no mostrar ningún efecto medible (el efecto medible podría ser la ausencia de deterioro) hasta después de una semana, un mes, tres meses, seis meses o un año o más de uso. La determinación de las cantidades eficaces se halla dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. El nivel de dosis específico para cualquier usuario particular dependerá de una diversidad de factores, que incluyen la edad, el nivel de actividad física, la salud general, y la gravedad del trastorno a prevenir.

Para cualquier compuesto, se puede estimar inicialmente la dosis terapéuticamente eficaz en ensayos con cultivos celulares o en modelos animales, normalmente ratones o ratas.

50 El modelo animal también se puede usar para determinar el intervalo de concentraciones adecuado y la vía de administración. Tal información se puede usar después para determinar las dosis y vías útiles para la administración en seres humanos.

55 La dosis eficaz precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado de enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el sexo del sujeto, la dieta, el momento y la frecuencia de la administración, las sensibilidades de reacción, y la tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad se puede determinar mediante

experimentación rutinaria, y está dentro del juicio del clínico.

Lo que pretende significar sal de acetil L-carnitina es cualquier sal con un ácido que no dé lugar a efectos tóxicos o secundarios.

5 Los ejemplos no limitantes de tales sales son: cloruro, bromuro, orotato, aspartato, aspartato ácido, citrato ácido, citrato de magnesio, fosfato, fosfato ácido, fumarato y fumarato ácido, fumarato de magnesio, lactato, maleato y maleato ácido, oxalato, oxalato ácido, pamoato, pamoato ácido, sulfato, sulfato ácido, fosfato de glucosa, tartrato y tartrato ácido, glicerofosfato, mucato, tartrato de magnesio, 2-amino-etanosulfonato, 2-amino-etanosulfonato de magnesio, metanosulfonato, tartrato de colina, tricloroacetato, y trifluoroacetato.

10 Se proporciona una lista de las sales farmacéuticamente aceptables aprobadas por la FDA en la publicación Int. J. of Pharm. 33 (1986), 201-217.

La acetil L-carnitina es un compuesto conocido, y su proceso de preparación se describe en el documento US 4.254.053. Su obtención, por lo tanto, es muy sencilla, ya que estos productos han estado en el mercado durante mucho tiempo y son de un grado adecuado para la administración a seres humanos.

15 Como se muestra en la parte experimental informada a continuación, la actividad neurogénica de la acetil L-carnitina o propionil L-carnitina (referencial) según la presente invención no se correlaciona con su actividad neuroprotectora.

De hecho, a las concentraciones que indujeron neurogénesis, la acetil L-carnitina y propionil L-carnitina (referenciales) no redujeron el porcentaje de núcleos apoptóticos o la actividad de la enzima LDH, un índice de necrosis.

Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran adicionalmente la invención.

## 20 EJEMPLO 1

ALC in vitro modula la diferenciación neuronal de progenitores neuronales adultos tomados del hipocampo de ratón.

### INTRODUCCIÓN

25 Durante la edad adulta tiene lugar un grupo complejo de eventos relacionados con la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia celular que caracterizan la neurogénesis adulta partiendo de células madre neuronales. Estos eventos tienen lugar principalmente en dos regiones diferentes del cerebro: la zona subgranular en la fascia dentada del hipocampo (*Zona SubGranular*, ZSG) y la zona subventricular en la pared del ventrículo lateral (*Zona SubVentricular*, ZSV), en la que se cree que hay un micromedio favorable (nicho) que posibilita que la célula madre sobreviva y se divida periódicamente y asimétricamente, lo que da lugar a progenitores que se dividen rápidamente, algunos de los cuales se desplazan hacia la diferenciación neuronal.

## 30 MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y preparación de neuroesferas hipocámpicas en cultivo.

Las células madre adultas del hipocampo de ratón se prepararon y se mantuvieron en cultivo en forma de neuroesferas como se describió previamente en Denis-Donini S. et al. J. Neuroscience, 2008. En particular, se usaron ratones CD1 macho de una edad de 3-5 meses, de acuerdo con las leyes de experimentación con animales.

35 Proliferación de células madre/progenitoras neuronales adultas.

Se disociaron neuroesferas con pases de entre 4-12 y se colocaron en placas a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/ml en una placa de 96 pocillos con ALC (0,1-2 mM) a diferentes concentraciones o un vehículo. Después de 24, 48, 72 y 96 horas, las células se procesaron para medir la cantidad de ATP celular presente mediante el uso del kit CellTiter-Glow™ Luminescent (Promega).

40 Diferenciación de células madre/progenitores neuronales adultos.

45 Para la diferenciación, las células derivadas de las neuroesferas hipocámpicas con pases de entre 4-12 se disociaron y se colocaron en placas sobre portaobjetos con cámara Lab-Tek Permanox de 8 pocillos (Nunc, Wiesbaden, Alemania) previamente revestidos con laminina de ratón ( $2,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , Sigma) a una densidad de alrededor de  $40.000 \text{ células}/\text{cm}^2$ . La composición del medio de diferenciación fue: Neurobasal-A, suplemento B27, glutamina 2 mM, 100 U/100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de penicilina/estreptomina. Se añadió ALC (0,1-2 mM) o un vehículo al medio. Después de 24 horas, las células se lavaron y se fijaron en un 4% de paraformaldehído durante 20 min para el análisis posterior mediante el uso de inmunofluorescencia.

Análisis mediante el uso de inmunofluorescencia.

50 Las células fijadas tras la diferenciación en presencia de ALC, un vehículo o fármacos de referencia se lavaron tres veces en PBS y se permeabilizaron mediante incubación durante 5 min a temperatura ambiente con PBS

complementado con un 0,48% (vol/vol) de Triton X-100 (Sigma). Posteriormente, las células se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal anti-*nestina* de ratón, 1:1200, Abcam, Cambridge, MA); anti-MAP-2 (anticuerpo policlonal de conejo, 1:600, Chemicon). Las células se incubaron en el anticuerpo primario durante 150 min a temperatura ambiente en una disolución que contenía un 8% (vol/vol) de suero de cabra. Los anticuerpos secundarios fueron los siguientes: anticuerpo anti-ratón de burro conjugado a Alexa Fluor 594 (1:1400, Molecular Probes), anti-conejo de burro conjugado a Alexa Fluor 488 (1:1 600, Molecular Probes), en una disolución que contenía un 16% (vol/vol) de suero de burro. Después se realizó una tinción de contraste de los núcleos con Draq5 (1:2000, Alexis Biochemicals) preparado en PBS. Los portaobjetos se montaron mediante el uso de medio de montaje fluorescente (DakoCytomation, Glostrup).

En cada experimento, se cuantificó si las células de al menos 5 campos/pocillo (que correspondían a alrededor de 150 células) fueron positivas para uno o más marcadores fenotípicos usados para distinguir entre ellas: células madre progenitoras indiferenciadas, neuronas inmaduras, neuronas maduras. El recuento de las células lo realizó un operador (con enmascaramiento respecto de la naturaleza del tratamiento al que se sometió a las células) mediante el uso de un microscopio de fluorescencia ECLIPSE E600 (NIKON, Calenzano, Italia) con una lente de 60X. Todos los experimentos se llevaron a cabo con al menos cinco preparaciones de células, y cada punto experimental por triplicado.

#### Análisis y Supervivencia Celular.

Tras la diferenciación en presencia de ALC, un vehículo o fármacos de referencia, se recogió el medio y se determinó la actividad de la enzima LDH mediante el uso del kit de detección de citotoxicidad LDH (Roche Applied Science), siguiendo las instrucciones del fabricante, para cuantificar la muerte debida a la necrosis. En paralelo, para analizar también la muerte apoptótica, tras la fijación, se marcaron los núcleos celulares con 0,8 ng/ml de Hoechst (Sigma-Aldrich) diluido en PBS. El recuento de los núcleos apoptóticos lo realizó un operador (con enmascaramiento respecto de la naturaleza del tratamiento al que se sometió a las células) mediante el uso de un microscopio de fluorescencia ECLIPSE E600 (NIKON, Calenzano, Italia) con una lente de 60X. Todos los experimentos se llevaron a cabo con al menos cinco preparaciones de células, y cada punto experimental por triplicado.

#### RESULTADOS

En este estudio se usó la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2) como marcador específico de neuronas. MAP-2 es la principal proteína asociada a microtúbulos del tejido cerebral. Existen ciertos indicios de que MAP2 se expresa a niveles mayores en ciertos tipos de neuronas que en otras. Se sabe que MAP2 estimula el ensamblaje de los microtúbulos, y que forma brazos laterales en los microtúbulos, lo cual es una etapa esencial de la neurogénesis. También interacciona con los neurofilamentos, la actina, y otros elementos del citoesqueleto.

En las neuroesferas adultas del hipocampo de ratón, en comparación con ácido valproico (AVP), un modulador positivo de la neurogénesis, se ha demostrado que ALC tiene un efecto fortalecedor dependiente de la dosis sobre la diferenciación de las células madre/progenitores adultos hacia neuronas maduras e inmaduras (Fig. 1). De hecho, ALC tiene una notable actividad neurogénica hipocámpica dependiente de la concentración, tal como se demuestra mediante el incremento del porcentaje de células MAP-2 positivas en cultivo.

La actividad neurogénica hipocámpica de ALC también se analizó mediante tinción de MAP-2 (verde) en neuronas cultivadas con tinción de inmunofluorescencia. Los núcleos se tiñeron con Draq5 (Fig. 2).

La actividad neurogénica de ALC no se correlaciona con la actividad neuroprotectora. De hecho, a las concentraciones que indujeron la neurogénesis, ALC (100  $\mu$ M; 300  $\mu$ M o 1 mM) no redujo el porcentaje de núcleos apoptóticos (Fig. 3) o incluso redujo la actividad de la enzima LDH, un índice de necrosis, en el medio de cultivo (Fig. 4).

También se usó *nestina*, una proteína filamentosa intermedia expresada de manera predominante por las células madre neuronales, como marcador específico. De hecho, solamente las células positivas para *nestina* forman esferas cuando se colocan en las condiciones de cultivo usadas para las células madre neuronales. En particular, las neuronas maduras son positivas para MAP2 y negativas para *nestina*, las neuronas inmaduras son positivas para MAP2 y *nestina*, las células madre/progenitoras son negativas para MAP2 y positivas para *nestina*, y las células progenitoras son negativas para MAP2 y *nestina* (Fig. 5).

El tratamiento con ALC incrementó el número de neuronas maduras de una manera dependiente de la concentración, así como el número de neuronas inmaduras; ALC no tuvo efecto sobre el número de células madre/progenitoras, y disminuyó el número de células progenitoras.

Los datos experimentales informados en las Figuras 1-6 muestran que ALC y PLC (referenciales) son capaces de estimular la diferenciación neuronal de los progenitores neuronales hipocámpicos de ratón adulto. En particular, ALC incrementa el número de neuronas maduras y neuronas inmaduras; reduce el número de una subpoblación de células madre/progenitoras neuronales indiferenciadas; y lleva a cabo una actividad que no es debida a su efecto neuroprotector.

EJEMPLO 2

Comparación in vitro de ALC, PLC y LC sobre la modulación de la diferenciación neuronal de progenitores neuronales adultos obtenidos del hipocampo de ratón.

5 En el Ejemplo 2, mediante el uso de los mismos procedimientos experimentales del Ejemplo 1, se ha comparado la actividad de ALC (1 mM) como modulador de la neurogénesis hipocámpica adulta en un modelo in vitro de células progenitoras neuronales adultas con la de propionil-L-carnitina (PLC) (referencial) (0,3-1 mM) y L-carnitina (LC) (0,3-1 mM).

10 Como se informa en la Figura 6, en comparación con ALC, PLC (referencial) pareció ser un activador menos potente de la diferenciación neuronal de CPN. De hecho, PLC (referencial) incrementó el número tanto de neuronas maduras como de neuronas inmaduras, y redujo el número de una subpoblación de células madre/progenitoras neuronales indiferenciadas, aunque en menor grado en comparación con ALC. Por el contrario, LC no tuvo ningún efecto.

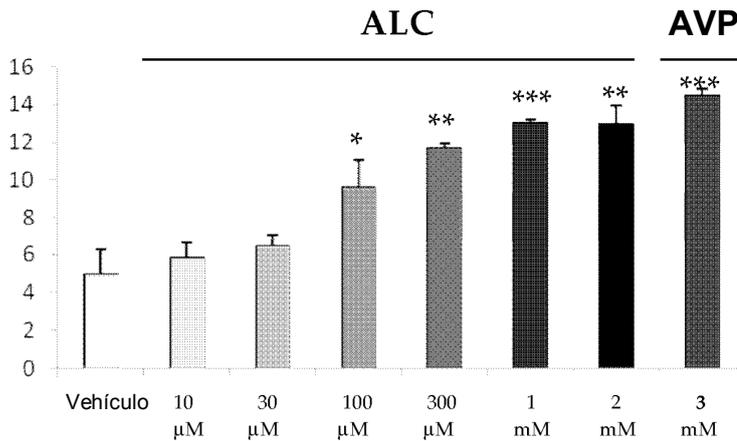
Además, los resultados demostraron que los efectos de ALC y PLC (referenciales) sobre la diferenciación de CPN no se debieron a efectos neuroprotectores sobre las neuronas inmaduras o maduras recién generadas.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Acetil L-carnitina, o una sal de la misma, para el uso en la prevención de un trastorno del sistema nervioso central incrementando la neurogénesis, seleccionado del grupo que consiste en síndrome de Shy-Drager, enfermedad de cuerpos de Lewy, e isquemia espinal, en la que dicha neurogénesis incrementada disminuye la aparición de dichos trastornos.
- 10 2. La acetil-L-carnitina para el uso según la reivindicación 1, en la que la sal se selecciona del grupo que consiste en: cloruro, bromuro, orotato, aspartato, aspartato ácido, citrato ácido, citrato de magnesio, fosfato, fosfato ácido, fumarato y fumarato ácido, fumarato de magnesio, lactato, maleato y maleato ácido, oxalato, oxalato ácido, pamoato, pamoato ácido, sulfato, sulfato ácido, fosfato de glucosa, tartrato y tartrato ácido, glicerofosfato, mucato, tartrato de magnesio, 2-aminoetanosulfonato, 2-amino-etanosulfonato de magnesio, metanosulfonato, tartrato de colina, tricloroacetato, o trifluoroacetato.
- 15 3. La acetil-L-carnitina para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se administra a una dosis de 0,1 a 4,00 g/día; preferiblemente a una dosis de 1 a 2,00 g/día; lo más preferiblemente a una dosis de 1,5 g/día, en una dosis individual o múltiple.
4. La acetil-L-carnitina para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se administra mediante una vía enteral o parenteral seleccionada de: administración oral, subcutánea, transdérmica, intraperitoneal, intramuscular, venosa, intracerebroventricular, intraparenquimatosa, intratecal, intracraneal, bucal, mucosa, nasal, pulmonar, rectal o liposómica.

**FIGURA 1**

% de células MAP-2-positivas (nuevas neuronas)



ALC= acetil L-carnitina; AVP= ácido valproico.

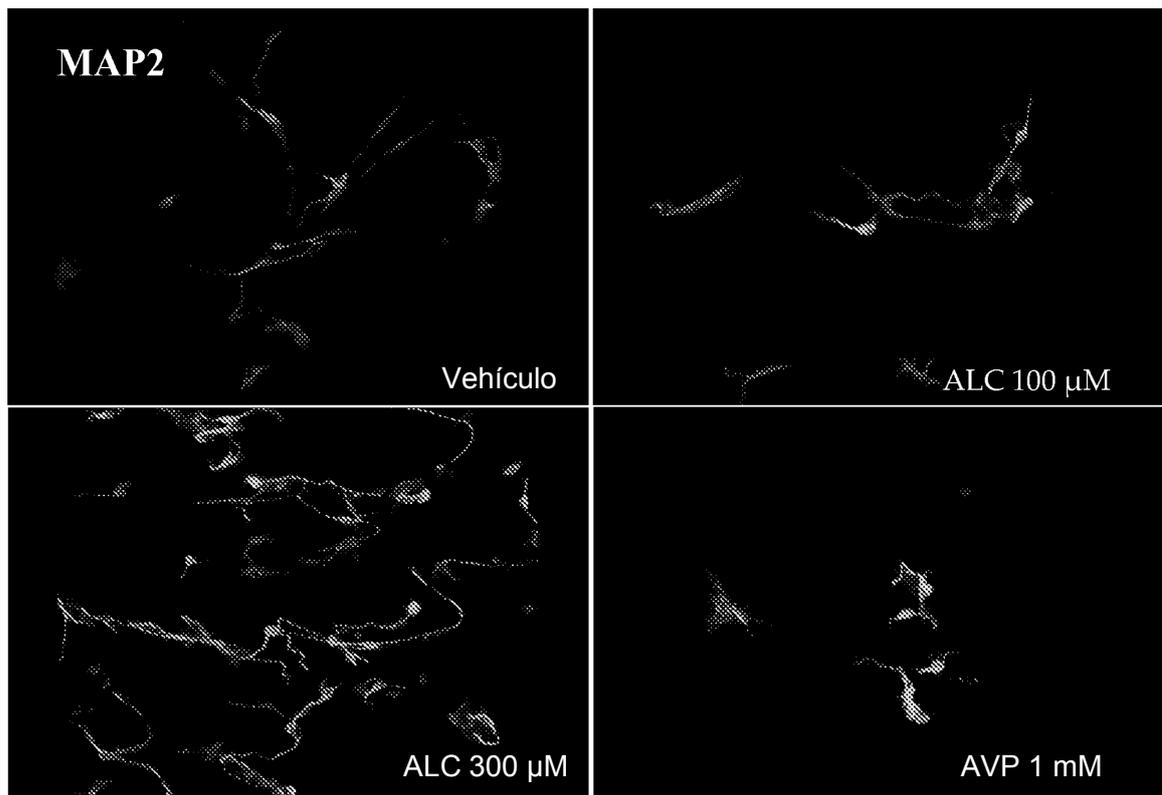
Media ± DE (n=3 exp, por triplicado).

Prueba t de Student; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; frente a vehículo.

La Figura 1 muestra que ALC tiene un efecto fortalecedor dependiente de la concentración sobre la diferenciación de células madre/progenitores adultos hacia neuronas maduras e inmaduras. De hecho, ALC tiene una notable actividad neurogénica hipocámpica dependiente de la concentración, tal como se demuestra mediante el incremento del porcentaje de células MAP-2 positivas en cultivo.

**FIGURA 2**

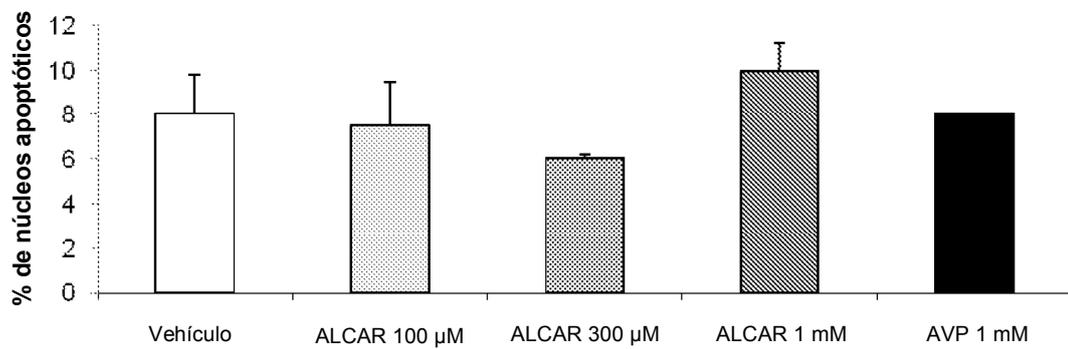
Células MAP2-positivas (nuevas neuronas), núcleos con tinción de contraste con Draq5



La Figura 2 muestra la actividad neurogénica hipocámpica de ALC (células MAP2-positivas, es decir, nuevas neuronas) analizada mediante tinción MAP-2 en neuronas cultivadas con tinción de inmunofluorescencia. Los núcleos se tiñeron con Draq5.

**FIGURA 3**

% de apoptosis tras incubación con ALC (acetil L-carnitina) y AVP (ácido valproico)

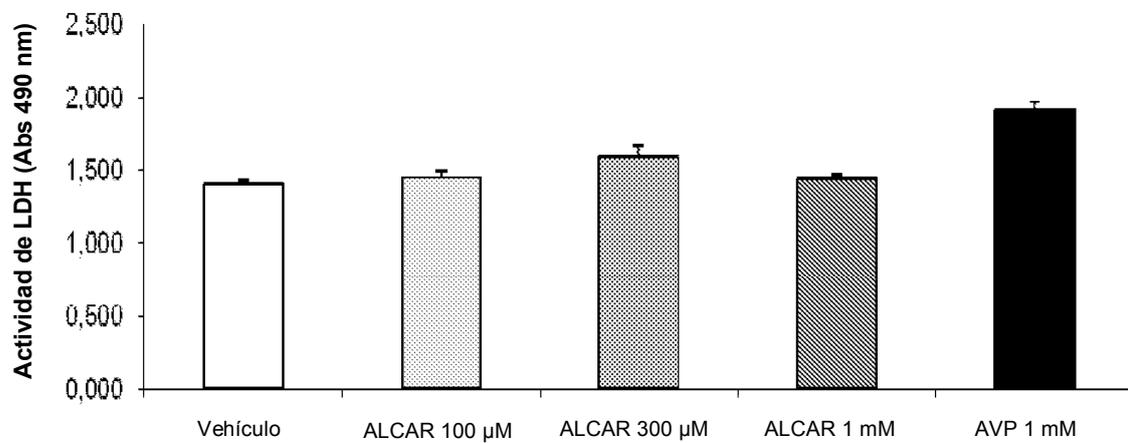


ALCAR= acetil L-carnitina.

La Figura 3 muestra que la actividad neurogénica de ALC no se correlaciona con la actividad neuroprotectora. De hecho, a las concentraciones que indujeron la neurogénesis, ALC (100 µM; 300 µM o 1 mM) no redujo el porcentaje de núcleos apoptóticos.

**FIGURA 4**

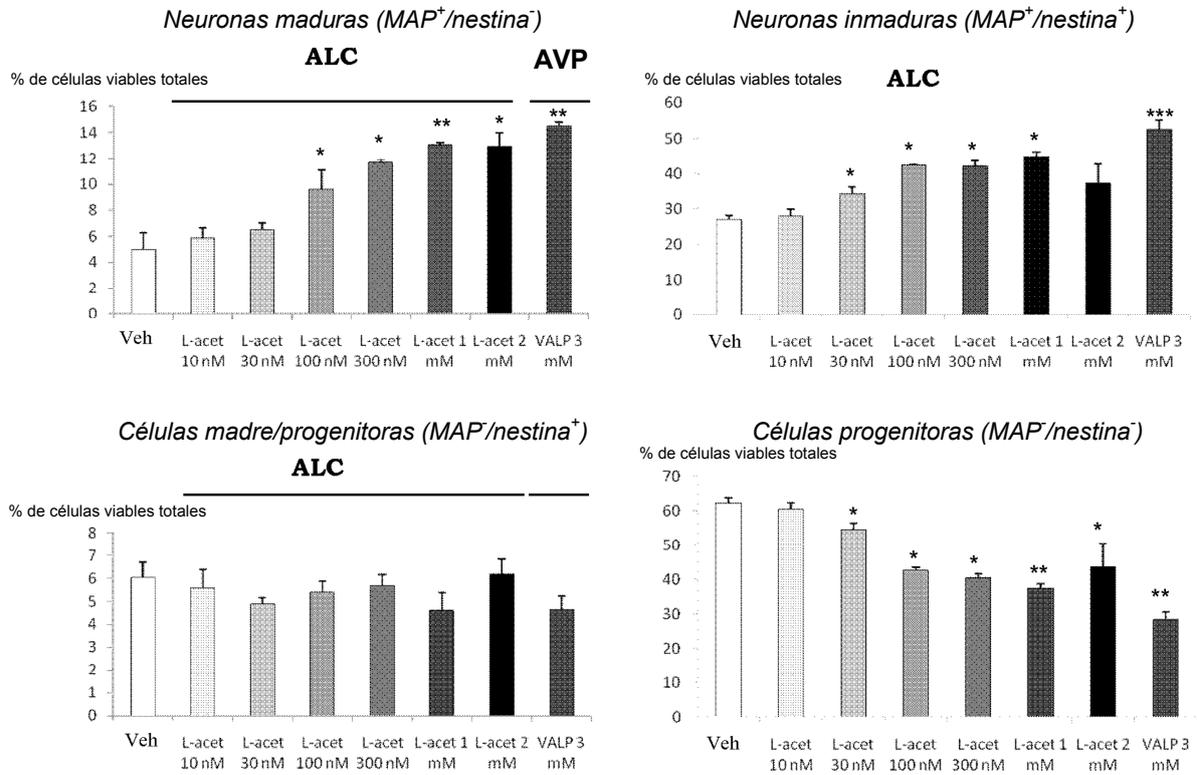
% de necrosis tras incubación con ALC (100  $\mu$ M; 300  $\mu$ M y 1 mM) y AVP



La Figura 4 muestra que la actividad neurogénica de ALC no se correlaciona con la actividad neuroprotectora. De hecho, a las concentraciones que indujeron la neurogénesis, ALC (100  $\mu$ M; 300  $\mu$ M o 1 mM) no redujo la actividad de la enzima LDH, un índice de necrosis, en el medio de cultivo.

**FIGURA 5**

Efecto específico de ALC sobre células en diferentes etapas de diferenciación



Sinónimo: acetil L-carnitina=ALC=ALCAR=L-acet.

Media ± DE (n=3 exp, por triplicado).

Prueba t de Student; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; frente a vehículo.

La Figura 5 muestra el efecto específico de ALC sobre las células en diversas etapas de la diferenciación. Las neuronas maduras son positivas para MAP2 y negativas para nestina, las neuronas inmaduras son positivas para MAP2 y nestina, las células madre/progenitoras son negativas para MAP2 y positivas para nestina, y las células progenitoras son negativas para MAP2 y nestina.

FIGURA 6

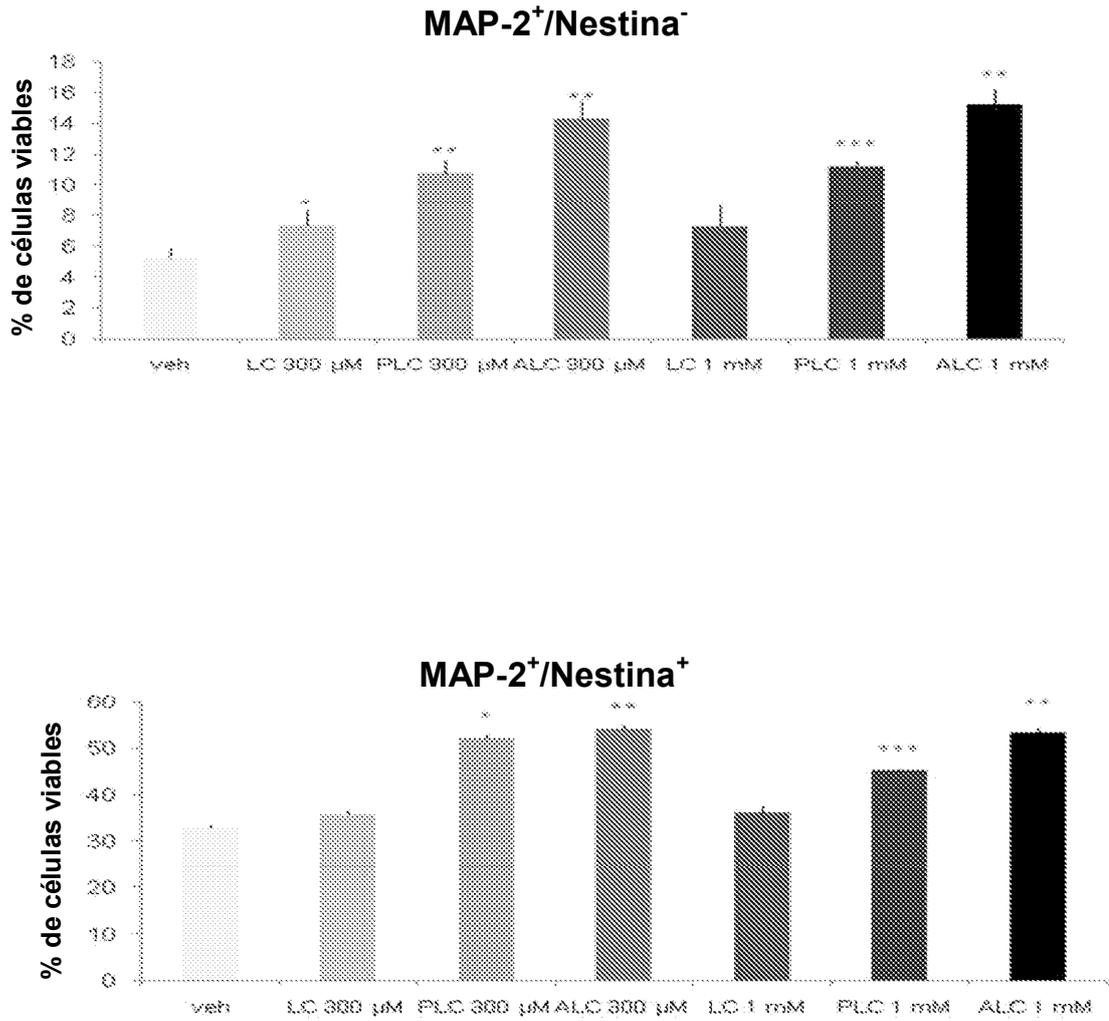
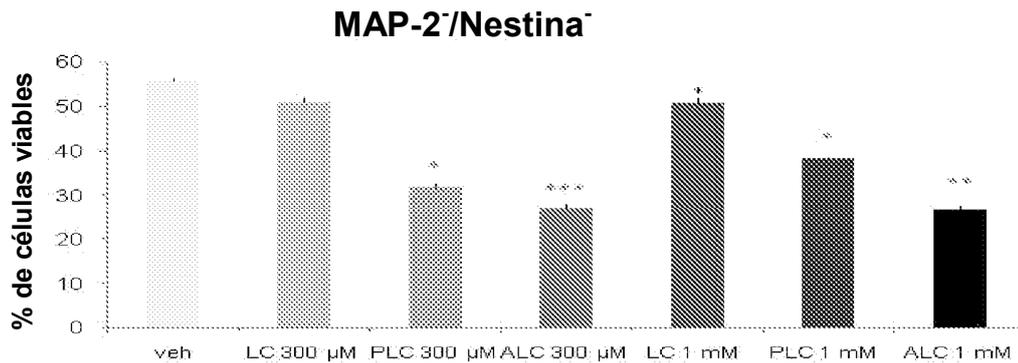


FIGURA 6 (continuación)



En la Figura 6 se muestra que PLC y ALC son activadores de la diferenciación neuronal de CPN. De hecho, PLC incrementó el número tanto de neuronas maduras como de neuronas inmaduras, y redujo el número de una subpoblación de células madre/progenitoras neuronales indiferenciadas, aunque en menor grado en comparación con ALC. Por el contrario, LC no tuvo ningún efecto.

Además, los resultados demostraron que los efectos de ALC y PLC sobre la diferenciación de CPN no se debieron a los efectos neuroprotectores sobre las neuronas inmaduras o maduras recién generadas.