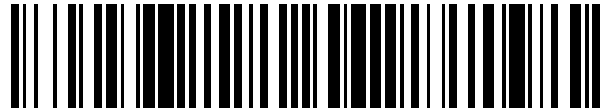


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 498**

21 Número de solicitud: 201830486

51 Int. Cl.:

**A61K 31/536** (2006.01)

**A61P 3/00** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**21.05.2018**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**22.11.2019**

Fecha de concesión:

**20.04.2020**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**27.04.2020**

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)  
C/ Serrano, nº 117  
28006 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**LEDESMA MUÑOZ, María Dolores y  
MITROI, Daniel**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **USO DE EFAVIRENZ PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DE ALMACENAMIENTO LIPÍDICO.**

57 Resumen:

Uso de efavirenz para el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lipídico.

La presente invención se refiere al uso de efavirenz para fabricar un medicamento para el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lipídico tales como enfermedades de Niemann-Pick. Mediante la activación de CYP46, que estimula la eliminación de colesterol en las neuronas, entre otros lípidos, efavirenz es capaz de normalizar los niveles de estos lípidos y la función neuronal. Efavirenz también se puede usar en combinación con otro principio activo considerado eficaz para el tratamiento de estas enfermedades, para mejorar los efectos terapéuticos.

ES 2 732 498 B2

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

## DESCRIPCIÓN

### USO DE EFAVIRENZ PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DE ALMACENAMIENTO LIPÍDICO

5

La invención se refiere al uso del fármaco efavirenz y compuestos similares para el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lipídico, especialmente la enfermedad de Niemann Pick. Por lo tanto, la presente invención pertenece al campo de la química médica o farmacología.

10

#### ESTADO DE LA TÉCNICA

15

El colesterol es un componente principal de las membranas de las células neuronales vital para la función normal del cerebro. Este lípido es particularmente abundante en las membranas sinápticas donde los microdominios ricos en colesterol influyen en una diversidad de complejos de proteínas. Niemann-Pick de tipo C1 (NPC1) es una proteína endolisosomal que media el transporte intracelular de colesterol. Las mutaciones en el gen de NPC1 causan la enfermedad de Niemann-Pick de tipo C (NPC), un trastorno de almacenamiento lisosomal fatal caracterizado por la acumulación de colesterol en compartimentos endosomales tardíos/lisomales. La deficiencia de NPC1 afecta a todas las células en los pacientes con NPC y tiene impacto en órganos periféricos tales como hígado y bazo. Sin embargo, las neuronas son las más vulnerables y el cerebro el órgano diana principal. NPC causa alteraciones cognitivas y psiquiátricas que señalan a defectos sinápticos. La actividad sináptica induce tanto pérdida como redistribución del colesterol. La pérdida de colesterol parece estar mediada por la colesterol hidroxilasa Citocromo P450 46A1 (CYP46), que es una enzima responsable de la renovación de colesterol en las neuronas y se moviliza hacia la membrana plasmática después de los estímulos sinápticos.

30

En la actualidad, NPC no tiene cura. El único tratamiento disponible es la administración del iminoazúcar sintético Miglustat, que inhibe la glucosilceramida sintasa reduciendo la acumulación de gangliósidos. El tratamiento con Miglustat retrasa el progreso neurológico de los pacientes con NPC pero no cura la enfermedad y puede tener efectos secundarios. Por lo tanto, la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para NPC es una necesidad urgente. Se están considerando varios

35

compuestos en la actualidad. Los inhibidores de histona desacetilasa redujeron la acumulación de colesterol y aumentaron los niveles de NPC1 en modelos celulares y animales de NPC. Se consiguieron una reducción del colesterol y una mejora moderada de la esperanza de vida en modelos animales de NPC por activación de la proteína de choque térmico HSP70 con el fármaco arimoclomol o por administración del fármaco secuestrador de colesterol  $\beta$ -ciclodextrina. Se han aprobado ensayos clínicos con estos compuestos en pacientes con NPC pero sus amplias dianas, potencial toxicidad o la administración invasiva debida a la inaccesibilidad a través de la barrera hematoencefálica aumentan la preocupación de su aplicación a pacientes.

5  
10

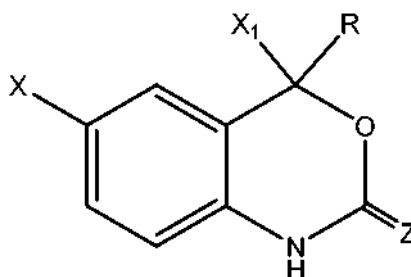
#### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención desvela los beneficios del uso del compuesto activador de CYP46 efavirenz (EFV) para el tratamiento de NPC. EFV es un medicamento aprobado para uso humano que ya se prescribe para el tratamiento de VIH. La dosis que muestra eficacia en el modelo de ratón de NPC es mucho menor que la que se usa en pacientes con VIH. Los ejemplos de la invención muestran un aumento notable en los niveles de plasma de 24-hidroxicolesterol en los ratones NPC1nmf164 tratados con EFV lo que proporciona un biomarcador adecuado para seguir el tratamiento. Los beneficios del tratamiento de EFV no solo conciernen a la función sináptica y el rendimiento cognitivo, también produce una mejora en el fenotipo lisosomal en el tejido cerebral y la prolongación de la esperanza de vida. También es adecuado el uso de un tratamiento combinado de EFV con otros compuestos propuestos para tratar NPC que se encuentran en la actualidad en ensayos clínicos.

20  
25

Por activación de CYP46, que estimula la eliminación de colesterol en las neuronas, efavirenz es capaz de reducir los niveles de colesterol anómalamente elevados descubiertos en las sinapsis de ratones NPC1nmf164 y normalizar la función neuronal.

30 De ese modo, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I):



(I)

en la que:

X es halo,

X<sub>1</sub> se selecciona entre trihalometilo, pentahaloetilo, alquilo C<sub>2-5</sub>, alquinilo C<sub>2-5</sub>,  
5 cicloalquilo C<sub>3-5</sub>; o arilo;

Z se selecciona entre O o S;

R se selecciona entre:

(a) alquilo C<sub>1-8</sub>, sin sustituir o sustituido con A, y A se selecciona entre halo, cicloalquilo  
C<sub>3-6</sub>, CN, hidroxilo, alcoxi C<sub>1-4</sub>, alquinil C<sub>2-4</sub>-alcoxi C<sub>1-4</sub>, ariloxi, alquilcarbonilo C<sub>1-4</sub>, nitro,  
10 di(alquil C<sub>1-2</sub>)amino, alquil C<sub>1-4</sub>amino-alquilo C<sub>1-2</sub>, heterociclo, o ariltio;

(b) alquenilo C<sub>2-4</sub>, sin sustituir o sustituido con

(i) A, o

(ii) arilo, sin sustituir o sustituido con A;

(c) alquinilo C<sub>2-5</sub>, sin sustituir o sustituido con

15 (i) A, o

(ii) arilo, sin sustituir o sustituido con A; o

(d) cicloalquilo C<sub>3-4</sub>, sin sustituir o sustituido con

(i) A, o

(ii) arilo, sin sustituir o sustituido con A,

20 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lipídico.

En una realización preferida, el compuesto de fórmula (I) se selecciona entre el siguiente grupo:

25 (-)6-cloro-4-ciclopropiletinil-4-trifluorometil-1,4-dihidro-2H-3,1-benzoxazin-2-ona,  
(-)6-cloro-4-feniletinil-4-trifluorometil-1,4-dihidro-2H-3,1-benzoxazin-2-ona,  
(+/-)6-cloro-4-(2-cianofenil)etinil-4-(1,1,1-trifluorometil)-1,4-dihidro-2H-3,1-benzoxazin-2-ona,  
(+/-)4-(1-cloro-1,1-difluorometil)-4-(2-feniletinil)-6-cloro-1,4-dihidro-2H-3,1-

benzoxazin-2-ona, o

(+/-)4-(2-[dimetilaminometil]jetinil)-4-trifluorometil-6-cloro-1,4-dihidro-2H-3,1-

benzoxazin-2-ona,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5

En una realización más preferida, el compuesto de fórmula (I) es (-)6-cloro-4-ciclopropiletinil-4-trifluorometil-1,4-dihidro-2H-3,1-benzoxazin-2-ona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 En otra realización preferida, la enfermedad de almacenamiento lipídico se selecciona entre enfermedades de Niemann-Pick, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry, enfermedad de Farber, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Krabbe, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Wolman.

15 En la presente invención, enfermedad de Niemann-Pick se refiere a todas las variantes de la enfermedad conocidas en la actualidad, en concreto los tipos A, B y C, aunque en una realización más preferida la enfermedad de Niemann-Pick se refiere al tipo C.

20 En otra realización preferida, el uso de un compuesto como se ha descrito anteriormente es en combinación con otro principio activo. En una realización más preferida, este principio activo se selecciona entre miglustat, inhibidores de histona desacetilasa, arimoclomol,  $\beta$ -ciclodextrina, ácido ursodesoxicólico, acetil leucina o esfingomielinasa ácida recombinante.

25 Los compuestos de la presente invención pueden tener centros asimétricos y pueden aparecer, excepto cuando se indique de forma específica, en forma de racematos, mezclas racémicas o en forma de diastereómeros, o enantiómeros, individuales, incluyéndose todas las formas isoméricas en la presente invención. El término (+/-) pretende incluir los isómeros ópticos (+) o los isómeros ópticos (-) o las mezclas de los  
30 mismos.

35 Cuando cualquier variable (por ejemplo, R) aparece más de una vez en cualquier constituyente o en la fórmula (I), su definición en cada aparición es independiente de su definición en cualquier otra aparición. Además, las combinaciones de sustituyentes y/o variables son permisibles solo si tales combinaciones dan como resultado compuestos estables.

Como se usa en el presente documento excepto cuando se indique, se pretende que "alquilo" incluya grupos hidrocarburo alifáticos saturados de cadena tanto ramificada como lineal que tienen el número especificado de átomos de carbono; se pretende que "alqueno" incluya grupos alquilo de cadena tanto ramificada como lineal con al menos un doble enlace carbono-carbono; se pretende que "alquino" incluya grupos alquilo de cadena tanto ramificada como lineal con al menos un triple enlace carbono-carbono.

"Halógeno" o "halo", como se usa en el presente documento, significa fluoro, cloro, bromo y yodo.

Como se usa en el presente documento, con excepciones que se indican, se pretende que "arilo" signifique fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, bifenilo, fenantrilo, antrilo o acenaftilo.

El término "heterociclilo" o "heterocíclico", como se usa en el presente documento excepto cuando se indique, representa un anillo heterocíclico monocíclico de 5 a 7 miembros estable o bicíclico de 8 a 11 miembros estable que está saturado, parcialmente insaturado o insaturado, y que consiste en átomos de carbono y de uno a cuatro heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en N, O y S, y en el que los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados, y que incluye cualquier grupo bicíclico en el que cualquiera de los anillos heterocíclicos definidos anteriormente está condensado a un anillo de benceno. El anillo heterocíclico puede estar unido en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé como resultado la creación de una estructura estable. Algunos ejemplos de tales elementos heterocíclicos incluyen piperidinilo, piperazinilo, 2-oxopiperazinilo, 2-oxopiperidinilo, 2-oxopirrolidinilo, 2-oxoazepinilo, azepinilo, pirrolilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, pirazolilo, pirazolidinilo, imidazolilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, oxazolilo, oxazolidinilo, isoxazolilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, tiazolilo, tiazolidinilo, isotiazolilo, quinuclidinilo, isotiazolidinilo, indolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzoimidazolilo, tiadiazolilo, benzopirano, benzotiazolilo, benzoxazolilo, furilo, tetrahydrofurilo, benzofurano, tetrahidropirano, tienilo, benzotienilo, tiamorfolinilo, tiamorfolinil sulfóxido, tiamorfolinil sulfona, y oxadiazolilo.

Para estos fines, los compuestos de la presente invención se pueden administrar por vía oral, parenteral (incluyendo inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intraesternal o técnicas de infusión), mediante pulverización de

inhalación, o por vía rectal, en formulaciones de dosificación unitaria que contienen excipientes, adyuvantes y vehículos convencionales farmacéuticamente aceptables no tóxicos.

- 5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lipídico.

De ese modo, de acuerdo con la presente invención se proporciona además un método de tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lipídico, tal como la enfermedad de Niemann-Pick. El tratamiento implica la administración a un paciente con necesidad de tal tratamiento de una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéutico y una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención.

- 15 Las presentes composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de suspensiones o comprimidos administrables por vía oral; pulverizaciones nasales; preparaciones inyectables estériles, por ejemplo, en forma de suspensiones acuosas u oleaginosas estériles inyectables o supositorios.

20 Cuando se administran por vía oral en forma de una suspensión, las presentes composiciones se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica y pueden contener celulosa microcristalina para impartir masa, ácido alginico o alginato sódico como agente de suspensión, metilcelulosa como potenciador de la viscosidad, y agentes edulcorantes/aromatizantes conocidos en la técnica. En forma de comprimidos de liberación inmediata, las presentes composiciones pueden contener celulosa microcristalina, fosfato dicálcico, almidón, estearato de magnesio y lactosa y/o otros excipientes, aglutinantes, expansores, disgregantes, diluyentes y lubricantes conocidos en la técnica.

30 Cuando se administran mediante aerosol o inhalación nasal, las presentes composiciones se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica y se pueden preparar en forma de soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de absorción para mejorar la biodisponibilidad, fluorocarbonos, y/o otros agentes solubilizantes o dispersantes conocidos en la técnica.

Las soluciones o suspensiones inyectables se pueden formular de acuerdo con la técnica conocida, usando diluyentes o disolventes parenteralmente aceptables no tóxicos adecuados, tales como manitol, 1,3-butanodiol, agua, solución de Ringer o solución isotónica de cloruro sódico, o agentes dispersantes o humectantes y de  
5 de suspensión adecuados, tales como aceites estériles insípidos no volátiles, incluyendo mono o diglicéridos, y ácidos grasos, incluyendo ácido oleico.

Cuando se administran por vía rectal en forma de supositorios, las presentes composiciones se pueden preparar por mezcla del fármaco con un excipiente no  
10 irritante adecuado, tal como manteca de cacao, ésteres de glicéridos sintéticos o polietilenglicoles, que son sólidos a las temperaturas habituales, pero se licuan o se disuelven en la cavidad rectal para liberar el fármaco.

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar por vía oral a seres  
15 humanos en un intervalo de dosificación de 1 a 100 mg/kg de peso corporal en dosis divididas. Un intervalo de dosificación preferido es de 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal por vía oral en dosis divididas. Otro intervalo de dosificación preferido es de 0,01 a 20 mg/kg de peso corporal por vía oral en dosis divididas. Para terapia de combinación con análogos de nucleósido, un intervalo de dosificación preferido es de  
20 0,01 a 20 mg/kg de peso corporal para los compuestos de la presente invención administrados por vía oral en dosis divididas, y de 50 mg a 5 g/kg de peso corporal para análogos de nucleósido administrados por vía oral en dosis divididas. Sin embargo, se ha de entender que el nivel de dosis específico y la frecuencia de dosificación para cualquier paciente particular puede variar y dependerá de una  
25 diversidad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y duración de acción de ese compuesto, la edad, peso corporal, estado general de salud, sexo, dieta, modo y momento de administración, tasa de excreción, combinación de fármacos, la gravedad de la afección particular, y la terapia que experimenta el hospedador.

30

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se usan en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por parte del experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a  
35 los que se describen en el presente documento en la práctica de la presente invención.



En la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Los objetivos, las ventajas y las características adicionales de la invención serán evidentes para los expertos en la materia tras el examen de la descripción o se pueden aprender mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitantes de la presente invención.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10 Figura 1. Ubicación y nivel de NPC1 en ratones wt y NPC1nmf164. (A) Imágenes individuales y fusionadas de inmunofluorescencias frente a las proteínas PSD-95, sinaptofisina-1 (SYP1) y NPC1 en una neurona de hipocampo cultivada de ratón wt. Los gráficos muestran el valor medio  $\pm$  SEM de la colocalización de NPC1 con PSD95 o SYP1 (n = 12 neuronas de 3 cultivos diferentes). (B) Imagen de microscopía  
15 electrónica de marcaje inmunológico con oro frente a NPC1 en la región del hipocampo CA1 de un ratón wt. Las flechas de color negro muestran las partículas de oro de 15 nm unidas a NPC1 (d-dendrita, sv-vesículas sinápticas, m-mitocondrias). (C),(D), Transferencias de Western frente a NPC1 y actina- $\beta$  (ACTB) en cerebro y sinaptosomas totales de ratones wt y NPC1nmf164. Los gráficos muestran el valor  
20 medio  $\pm$  SEM de los niveles de NPC1 normalizados para ACTB como porcentajes del control (valores wt) (n = 4, P<sub>sinaptosomas</sub> = 0,0037).

Figura 2. Morfología y nivel de colesterol de las sinapsis en ratones NPC1nmf164. (A) Micrografías electrónicas representativas de sinapsis en la región del hipocampo CA1  
25 en ratones wt y NPC1nmf164 (las flechas de color negro indican densidades postsinápticas, d-dendrita, sv-vesículas sinápticas, m-mitocondrias, MLB-cuerpos multilamelares). (B) Valor medio  $\pm$  SEM de densidad de sinapsis (n = 3, P = 0,0377). (C) Valor medio  $\pm$  SEM de densidad de vesículas sinápticas (n = 3, 3088 vesículas de sinapsis, 101 wt y 121 NPC1nmf164, P < 0,0001). (D) Diámetro de vesícula sináptica  
30 (n = 3, vesículas, 528 wt y 507 NPC1nmf164). (E) Valor medio  $\pm$  SEM de longitud de densidad postsináptica (n = 3; densidades postsinápticas, 101 wt y 121 NPC1nmf164, P < 0,0001). (F) Valor medio  $\pm$  SEM de espesor de densidad postsináptica (n = 3, P < 0,0001). (G), (H) Valor medio  $\pm$  SEM de niveles de colesterol en sinaptosomas (n = 4, P = 0,0476) y homogenatos de cerebro total (n = 4) en ratones wt y NPC1nmf164  
35 expresado como porcentaje de ratones wt.

Figura 3. Función sináptica y comportamiento en ratones wt y NPC1nmf164. Se registraron los siguientes eventos electrofisiológicos en sinapsis colaterales de Schaffer de ratones wt y NPC1nmf164: (A) Transmisión sináptica basal (n = 5, P = 0,0138); (B) Amplitud de volley de fibra (n = 5); (C) Facilitación de pulso emparejado (n = 5, P = 0,0011); (D) LTP (n = 5, P < 0,0001 en los últimos 10 min de registro); (E) LTD. Se evaluaron los siguientes ensayos de comportamiento en ratones wt y NPC1nmf164: (F) Ensayo de reconocimiento de ubicación de objeto que muestra el tiempo de exploración de los objetos en las ubicaciones nueva y familiar (n = 10, P = 0,0167); (G) Ensayo de laberinto en Y que muestra el porcentaje de entradas en el brazo nuevo (n = 10; P = 0,0015). (H) Ensayo de condicionamiento de miedo contextual que muestra el porcentaje de tiempo de inmovilidad (n = 10; P = 0,0002); (I) Ensayo de campo abierto que muestra la distancia cubierta durante 5 min.

Figura 4. Redistribución de colesterol y distribución en superficie del receptor GluA1 tras inducción de cLTP en ratones wt y NPC1nmf164. (A) Valor medio  $\pm$  SEM de los niveles de colesterol en fracciones de membrana plasmáticas de cultivos de cortes de hipocampo de ratones wt y NPC1nmf164 con o sin inducción de cLTP (n = 6, Pwt = 0,0402). (B) Imágenes representativas de la sonda de unión de colesterol mCherry-D4 antes y después de inducción de cLTP en neuronas de hipocampo cultivadas de ratones wt infectados con ARN sh-scr o sh-NPC1. (C) Transferencia de Western frente a NPC1 y ACTB en extractos de neuronas de hipocampo cultivadas de ratones wt no infectados o infectados con ARN sh-scr o sh-NPC1. El gráfico muestra el valor medio  $\pm$  SEM de los niveles de NPC1 normalizados para ACTB como porcentaje de las condiciones de control (wt no infectados). (D) Imágenes representativas de inmunofluorescencias frente a GluA1 antes y después de inducción de cLTP en neuronas de hipocampo cultivadas no permeabilizadas (superficie) y permeabilizadas (total) que expresan ARN sh-scr o sh-NPC1. El gráfico muestra el valor medio  $\pm$  SEM de tinción superficial de GluA1 con respecto al total en condiciones de cLTP como porcentaje de la línea base en la situación de control (n = 20 por condición de 2 experimentos diferentes, Psh-Scr < 0,001).

Figura 5. Efectos de la activación de CYP46 por EFV en la redistribución sináptica de colesterol y en la plasticidad sináptica en neuronas wt y NPC1nmf164. (A) Transferencias de Western frente a CYP46 y ACTB en extractos de cerebro total y sinaptosomas de ratones wt y NPC1nmf164 como porcentaje del control (valores wt). Los gráficos muestran el valor medio  $\pm$  SEM de los niveles de CYP46 normalizados

para ACTB en unidades arbitrarias. (B) Valor medio  $\pm$  SEM de los niveles de colesterol en sinaptosomas no tratados y tratados con EFV de ratones wt ( $n = 5$ ,  $P = 0,0233$ ) y NPC1nmf164 ( $n = 4$ ,  $P = 0,0188$ ). (C) Transmisión sináptica basal ( $n = 5$ ,  $P = 0,0117$ ); (D) LTP ( $n = 5$ ,  $P < 0,0001$ ) y (E) Facilitación de pulso emparejado en cortes de hipocampo no tratados y tratados con EFV de ratones wt y NPC1nmf164 ( $n = 5$ ,  $P = 0,0229$ ).

Figura 6. Efectos de la activación de CYP46 por EFV en la distribución superficial de GluA1 inducida por cLTP en condiciones wt y de déficit de NPC1. Imágenes representativas de inmunofluorescencias frente a GluA1 antes y después de inducción de cLTP en neuronas de hipocampo cultivadas no permeabilizadas (superficie) y permeabilizadas (total) que expresan ARN sh-Scr o sh-NPC1 y tratadas o no con EFV. El gráfico muestra el valor medio  $\pm$  SEM de tinción superficial de GluA1 con respecto al total tras inducción de cLTP como porcentaje de la línea base en la situación de control ( $n = 20$  por condición de 2 experimentos separados, Psh-Scr  $< 0,001$ , Psh-Scr + EFV  $< 0,01$ , Psh-NPC1 + EFV  $< 0,001$ ).

Figura 7. Efectos de tratamiento con EFV in vivo. (A) Valor medio  $\pm$  SEM de los niveles en plasma de 24(S)-hidroxicolesterol después de 6 y 8 semanas de tratamiento oral con EFV en ratones wt ( $n = 6$ , semanas P6 =  $0,0023$ ) y NPC1nmf164 ( $n = 5$ , semanas P6  $< 0,0001$ , semanas P8  $< 0,0001$ ). Se evaluaron los siguientes ensayos de comportamiento en ratones wt y NPC1nmf164 tratados o no con EFV: (B) Ensayo de reconocimiento de ubicación de objeto que muestra el índice de discriminación en forma de proporción normalizada del tiempo transcurrido con el objeto nuevo y el objeto familiar ( $n = 6$ , PWT/NPC1nmf164 =  $0,0065$ , PNPC1nmf164/NPC1nmf164 + EFV =  $0,0008$ ). (C) Ensayo de laberinto en Y que muestra el porcentaje de entradas en el brazo nuevo ( $n = 10$ ,  $P < 0,0001$ ). (D) Condicionamiento de miedo contextual que muestra el porcentaje de tiempo de inmovilidad ( $n = 10$ , PNPC1  $< 0,0025$ , PNPC1 + EFV  $< 0,0181$ ). (E) Ensayo de condicionamiento de miedo específico que muestra el porcentaje de tiempo de inmovilidad ( $n = 10$ , PNPC1  $< 0,0453$ , PNPC1 + EFV  $< 0,0054$ ). (F) Valor medio  $\pm$  SEM de los niveles de colesterol en sinaptosomas de ratones wt y NPC1nmf164 tratados o no con EFV ( $n = 4$ , PNPC1  $< 0,0476$ , PNPC1 + EFV  $< 0,0118$ ). (G) Imágenes de fluorescencia representativas de la región del hipocampo CA1 de ratones wt y NPC1nmf164 tratados o no con EFV teñida con filipina y un anticuerpo frente a LAMP1. Las flechas de color blanco indican acumulación de lisosomas en los hipocampos no tratados de ratones NPC1nmf164.

(H) Gráfico de supervivencia para ratones wt y NPC1nmf164 tratados o no con EFV (n = 5).

## EJEMPLOS

5

### NPC1 está presente en las sinapsis y sus niveles se reducen en ratones NPC1nmf164

Aunque se ha informado de la presencia de NPC1 en sinaptosomas, su distribución en las sinapsis no se ha abordado con detalle. Para este fin, se usaron los microscopios confocal y electrónico junto con técnicas bioquímicas en cultivos neuronales primarios y en tejido cerebral de ratón. Los análisis de inmunofluorescencia de neuronas del hipocampo maduras de ratones de tipo silvestre (wt) indicaron la presencia de NPC1 en terminaciones tanto presinápticas como postsinápticas con un enriquecimiento relativo en las últimas. Mientras que la colocalización de NPC1 con el marcador presináptico sinaptofisina fue de un 22,5 %, el porcentaje de colocalización con el marcador postsináptico PSD95 aumentó a un 59 % (Figura 1A). La localización postsináptica de NPC1 se confirmó por microscopía electrónica en el hipocampo de ratones wt (Figura 1 B). La transferencia de Western frente a NPC1 en extractos totales y de sinaptosomas de ratones wt también mostró la presencia predominante de esta proteína en las membranas sinápticas (Figuras 1C, D). Es interesante que, aunque los niveles de NPC1 no se alteraron de forma significativa en extractos de cerebro totales (Figura 1C), los niveles sinápticos se redujeron drásticamente (70 %) en los ratones NPC1nmf164 en comparación con los ratones wt (Figura 1D).

### 25 Morfología alterada y niveles de colesterol elevados en las sinapsis de ratones NPC1nmf164

Los niveles reducidos de NPC1 en las sinapsis de ratones NPC1nmf164 condujeron a analizar las características sinápticas en la región del hipocampo CA1. Los análisis morfológicos mediante microscopía electrónica evidenciaron una reducción media de un 25 % en el número de sinapsis por unidad de área en ratones NPC1nmf164 de 3 meses de edad en comparación con ratones wt de la misma edad (Figura 2A). El número de vesículas sinápticas también se redujo en un 51,4 % mientras que su tamaño aumentó en un 62 % (Figuras 2B, C). También se descubrieron alteraciones en el compartimento postsináptico. La longitud de la densidad postsináptica fue un 35,8 % menor mientras que su espesor aumentó en un 42,9 % en los ratones

NPC1nmf164 (Figuras 2D, E). Para tener un mejor conocimiento de la relación entre NPC1 y colesterol, se midieron los niveles de este lípido en las sinapsis de ratones wt y NPC1nmf164. La cuantificación mediante ensayos enzimáticos mostró un aumento de un 16,5 % en los niveles de colesterol en los sinaptosomas pero ninguna diferencia significativa en los extractos de cerebro totales de los ratones NPC1nmf164 en comparación con los ratones wt (Figuras 2F, G).

#### Función sináptica y comportamiento alterados en ratones NPC1nmf164

Las alteraciones morfológicas descubiertas en las sinapsis de los ratones NPC1nmf164 impulsaron a analizar su función. Se usó electrofisiología en cortes del hipocampo para monitorizar las sinapsis colaterales de Schaffer en la región CA1. La transmisión sináptica basal aumentó en los ratones NPC1nmf164 mientras que la amplitud de volley de fibra no se alteró en comparación con los ratones wt (Figuras 3A, B). Los eventos de plasticidad presináptica tales como facilitación de pulso emparejado aumentaron (Figura 3C). También se descubrieron alteraciones específicas en los eventos de plasticidad postsináptica. LTP se disminuyó considerablemente (Figura 3D) mientras que LTD se conservó (Figura 3E).

Dadas las alteraciones en los eventos que controlan la memoria y el aprendizaje, se llevaron a cabo varios ensayos para monitorizar estas capacidades en ratones vivos. En el ensayo de reconocimiento de ubicación de objeto, los ratones NPC1nmf164 reconocieron muy mal el objeto desplazado que indica que el aprendizaje espacial y memoria del hipocampo están perjudicados (Figura 3F). En consecuencia, los ratones NPC1nmf164 entraron con menor frecuencia (12 %) en el brazo nuevo en el ensayo del laberinto en Y que los ratones wt (Figura 3G). El aprendizaje asociativo y la memoria en el ensayo de condicionamiento de miedo contextual también se vieron perjudicados en los ratones NPC1nmf164 en comparación con los ratones wt según evidencia la reducción de un 62 % en el tiempo de inmovilidad (Figura 3H). Para descartar que una actividad locomotora perjudicada pudiera haber influido en el resultado de los ensayos mencionados anteriormente, se analizó la actividad exploratoria en el ensayo de campo abierto. No se descubrió ninguna diferencia significativa en la distancia cubierta por los ratones NPC1nmf164 y wt (Figura 3I).

NPC1 media la redistribución de colesterol y el suministro del receptor AMPA requeridos para LTP

Las evidencias recientes han mostrado que la redistribución de colesterol desencadenada por LTP es necesaria para el suministro sináptico de los receptores AMPA, que a su vez permite el progreso de la LTP. Se postuló que NPC1 media los cambios de colesterol desencadenados por LTP. Para someter a ensayo esta hipótesis, se analizaron los cambios de colesterol en cultivos de cortes organotípicos del hipocampo de ratones wt y NPC1nmf164 después de inducción de la LTP química (cLTP), que activa las sinapsis de forma similar a la LTP fisiológica. Los cortes se centrifugaron posteriormente para separar diferentes poblaciones de colesterol con el sedimento enriquecido en membrana plasmática. cLTP indujo una reducción de un 30,4 % del colesterol en la fracción de membrana plasmática de los cortes de ratones wt. Por el contrario, no se observó ningún cambio significativo en los cortes de los ratones NPC1nmf164 (Figura 4A). Para monitorizar mejor la redistribución del colesterol después de inducción de LTP, este lípido se visualizó en cultivos primarios de neuronas del hipocampo de ratones wt en los que la expresión de NPC1 se había silenciado mediante lentivirus que portan ARNsh de NPC1. El colesterol se marcó mediante la transfección de las neuronas con el ADNc del dominio de unión a colesterol (D4) de perfringolisina O fusionado a mCherry. mCherry-D4 mostró una distribución difusa de tipo membrana plasmática en las neuronas infectadas con el lentivirus que porta sh-scr no específico (Figura 4B). A diferencia de las células que expresan sh-scr, mCherry-D4 mostró un patrón moteado compatible con las fracciones microsomales en las células que expresan sh-NPC1 (Figura 4B) en las que la expresión de NPC1 se redujo en un 64,2 % (Figura 4C). La inducción de cLTP provocó una redistribución evidente de mCherry-D4 de las fracciones de membrana plasmática en fracciones de tipo microsomal en neuronas que expresan sh-scr mientras que no indujo cambios significativos en las neuronas que expresan sh-NPC1 (Figura 4B). Para determinar si esto también iba acompañado por un suministro de Rc AMPA deficiente en la membrana tras la inducción de LTP, se llevó a cabo la tinción por inmunofluorescencia total y superficial en las neuronas cultivadas, permeabilizadas o no, usando un anticuerpo frente a la subunidad GluA1 de Rc AMPA (Figura 4D). Tal y como se esperaba, la inducción de cLTP aumentó la localización en superficie de GluA1 (aumento de un 95,5 %) sin afectar a los niveles totales en las neuronas que expresan sh-scr. Por el contrario, el suministro a la superficie de GluA1 en respuesta a cLTP se bloqueó en las neuronas sh-NPC1 (Figura 4D).

35 La activación farmacológica in vitro de CYP46 restituye los niveles de colesterol, LTP y el suministro a la superficie de GluA1 en sinapsis deficientes en NPC1

Los resultados anteriores indicaron la falta de redistribución de colesterol tras LTP y el aumento en los niveles sinápticos de este lípido cuando existe déficit de NPC1. La colesterol hidroxilasa CYP46 es la enzima responsable de la renovación del colesterol en las neuronas y se moviliza hacia la membrana plasmática tras los estímulos sinápticos mediando la pérdida de colesterol durante la neurotransmisión excitatoria. Por lo tanto, se propuso que la activación de CYP46 podría contrarrestar el exceso de colesterol y el bloqueo tras déficit de NPC1. En primer lugar, se confirmó que los niveles de CYP46 no estaban alterados en extractos de cerebro totales y en sinaptosomas de ratones NPC1nmf164 en comparación con ratones wt (Figura 5A) apoyando su activación farmacológica como estrategia adecuada. Para llevar a cabo esta estrategia, se usó la medicación antiVIH efavirenz (EFV), dado que provoca una estimulación robusta de CYP46. La incubación con EFV 20  $\mu$ M redujo el colesterol en los sinaptosomas de ratones tanto wt como NPC1nmf164 (reducción de un 16,1 % y 18,5 %, respectivamente) (Figura 5B). La incubación con EFV 20  $\mu$ M también restituyó la función sináptica tal como transmisión sináptica basal y LTP, pero no la facilitación de pulso emparejado, en los cortes del hipocampo de los ratones NPC1nmf164. Este tratamiento no tuvo ningún efecto significativo en los cortes de los ratones wt (Figuras 5C-E). Para someter a ensayo si el tratamiento con EFV también restituía el suministro de Rc AMPA a la membrana tras la inducción de LTP en neuronas deficientes en NPC1, se llevó a cabo una tinción antiGluA1 superficial y total en neuronas que expresan sh-scr y sh-NPC1 en las que se indujo cLTP en presencia o ausencia de EFV 20  $\mu$ M (Figura 6). La inducción de cLTP en neuronas sh-scr aumentó la presencia en superficie de GluA1 de manera similar en las neuronas tratadas con EFV y no tratadas (aumento de un 66,6 % y un 71,3 %, respectivamente). De forma notable, el tratamiento con EFV contrarrestó el bloqueo de suministro superficial de GluA1 en respuesta a cLTP en neuronas sh-NPC1 llevándolo a niveles similares que los de las neuronas sh-scr (Figura 6).

El tratamiento oral con EFV previene la acumulación de colesterol y el deterioro de la memoria y prolonga la esperanza de vida en ratones NPC1nmf164

Los efectos positivos del tratamiento con EFV in vitro en los niveles de colesterol y la plasticidad sinápticos llevaron a someter a ensayo este fármaco in vivo. EFV tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y estimula la degradación de colesterol cerebral en ratones a dosis 300 veces menores que las que se usan para pacientes con VIH. Esta dosis, 0,09 mg/kg/día, se administró en el agua de bebida a

ratones wt y NPC1nmf164 de 1,5 meses de edad y se mantuvo el tratamiento durante 8 semanas. Para seguir el tratamiento, se midieron los niveles en plasma del metabolito de CYP46 24(S)-hidroxicoolesterol a diferentes tiempos a lo largo del tratamiento (6 y 8 semanas). Este metabolito tuvo niveles similares en el plasma de los ratones wt y NPC1nmf164 no tratados. En los ratones wt, el tratamiento con EFV provocó un ligero aumento en los niveles de 24(S)-hidroxicoolesterol solo a las 6 semanas de tratamiento. Por el contrario, los niveles de este metabolito aumentaron drásticamente en los ratones NPC1nmf164 tratados con EFV tanto a las 6 como a las 8 semanas de tratamiento (355,7 % y 223,7 %, respectivamente) (Figura 7A).

Inmediatamente antes del sacrificio se determinaron los efectos funcionales mediante diferentes ensayos de comportamiento. EFV aumentó el interés por el objeto situado en la nueva ubicación y mejoró en un 7,8 % el número de entradas en el brazo nuevo del laberinto en Y en ratones NPC1nmf164, indicativo de aprendizaje espacial y memoria del hipocampo mejorados (Figuras 7B, C). EFV también mejoró el aprendizaje y la memoria contextuales y específicos en el paradigma de condicionamiento de miedo (Figura 7D, E). El tratamiento con EFV no tuvo efectos significativos en el comportamiento de los ratones wt (Figuras 6B-E). Los sinaptosomas de los cerebros de los ratones se aislaron para monitorizar los efectos en los niveles sinápticos de colesterol. EFV redujo en un 38,1 % y un 17,2 % los niveles de colesterol en los sinaptosomas de ratones NPC1nmf164 y wt, respectivamente (Figura 7F) según se determinó mediante ensayos enzimáticos. Además de estos medios bioquímicos, se usó Filipina, un antibiótico fluorescente que se une a colesterol, para examinar los niveles de colesterol en el tejido del hipocampo. Dado que la acumulación de este lípido en los lisosomas es un distintivo del déficit de NPC1, se llevó a cabo la tinción conjunta con el marcador lisosomal LAMP1. Mientras que la tinción con Filipina en ratones wt tratados o no con EFV fue apenas detectable, fue evidente una fuerte señal en el hipocampo de los ratones NPC1nmf164 no tratados consistente con el aumento de los niveles del lípido (Figura 7G). EFV redujo de forma significativa la tinción con Filipina en el hipocampo de ratones NPC1nmf164. La tinción con LAMP1 en los ratones NPC1nmf164 mostró la acumulación de lisosomas agrandados habituales del déficit de NPC1. Este fenotipo no fue evidente en el hipocampo de los ratones NPC1nmf164 tratados con EFV (Figura 7G). Dados los efectos positivos de EFV en el comportamiento y la acumulación de colesterol después de 8 semanas de tratamiento, la administración de EFV en un grupo de ratones wt y NPC1nmf164 se prolongó para determinar los efectos en la supervivencia. Todos los ratones NPC1nmf164 no tratados murieron después de 16 semanas de edad con un



tiempo medio de supervivencia de  $100 \pm 2$  días. Ninguno de los ratones NPC1nmf164 tratados con EFV murieron antes de las 16 semanas de edad. El tiempo medio de supervivencia de los ratones NPC1nmf164 tratados con EFV fue de  $129 \pm 2$  días (Figura 7H).

5

## DISCUSIÓN

NPC1 se conoce bien por su contribución al transporte del colesterol a través del compartimento endolisosomal de todas las células que facilita la egresión del colesterol por unión directa al lípido. A pesar de la presencia ubicua de NPC1, el impacto de su déficit es particularmente significativo en las neuronas. De hecho, las alteraciones cognitivas y psiquiátricas son consecuencias frecuentes de las mutaciones de NPC1 en los pacientes con NPC. Los resultados aquí presentados, que revelan un papel fundamental de NPC1 en la función sináptica, contribuyen a explicar la vulnerabilidad neuronal en el déficit de NPC1. Usando ratones que portan una mutación en el gen de NPC1 (NPC1nmf164), similar a la habitual en los pacientes con NPC, se demostró que los defectos de NPC1 tienen un profundo impacto en las sinapsis. Además de las alteraciones morfológicas en las vesículas sinápticas, se revelaron el enriquecimiento relativo de la proteína en la postsinapsis y su contribución a la plasticidad sináptica. NPC1 media la redistribución del colesterol y el dinamismo de Rc AMPA necesario para LTP, que conduce a la plasticidad postsináptica requerida para el aprendizaje y la memoria. El deterioro de estos eventos tras mutaciones de NPC1 puede explicar los déficits cognitivos progresivos en los pacientes con NPC. Estos resultados resaltan la relevancia de la dinámica del colesterol en LTP y la acción cooperativa de las dos proteínas relacionadas con el colesterol para su progreso eficaz. Mientras que la proteína de unión a colesterol NPC1 media la redistribución de colesterol inducida por LTP, la enzima de hidroxilación del colesterol CYP46 se encarga de la eliminación del colesterol. De forma notable, la activación farmacológica de CYP46 previene los déficits de LTP en los ratones NPC1nmf164. En estos ratones se mostró que el colesterol se acumula en los sinaptosomas en los que NPC1 está presente aunque a niveles reducidos en comparación con los ratones wt. Se propone que mejorando la eliminación de colesterol de las sinapsis, la activación de CYP46 fomenta la función de la NPC1 residual, lo que permitiría una redistribución del colesterol.

35

## MATERIALES Y MÉTODOS

Ratones y declaración ética

Se estableció una colonia de cría de ratones NPC1nmf164 que portan la mutación D1005G-Npc1 en el CBMSO a partir de ratones C57BL/6J-Npc1nmf164/J heterocigóticos adquiridos en Jackson Laboratories. Se identificaron crías wt y NPC1nmf164 homocigóticas macho y hembra de la misma camada mediante PCR llevada a cabo en ADN aislado de la cola, y se asignaron de forma aleatoria a grupos experimentales. No se observó ninguna diferencia dependiente del género en ninguno de los resultados. Las juntas de revisión interna de CBMSO y CSIC aprobaron todos los procedimientos que implicaron el uso de ratones que se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices específicas de la Unión Europea para la protección del bienestar de animales (Directiva 2010/63/EU).

Anticuerpos

Se usaron los anticuerpos frente a las siguientes proteínas para transferencias de Western e inmunofluorescencias: NPC1 (policlonal de conejo, Novus Biologicals, Reino Unido, NB 400-148), PSD-95 (monoclonal de ratón, NeuroMab, Ca, EE. UU., 75-028), Sinaptofisina1 (policlonal de cobaya, Synaptic Systems, Alemania, 101004), CYP46A1 (policlonal de conejo, Proteintech, EE. UU., 12486-1-AP), GluR1 C terminal (policlonal de conejo, Abcam, ab31232), GluR1 N terminal (monoclonal de ratón, Merck-Millipore, MAB2263), LAMP1 (monoclonal de rata, DSHB), y anti- $\beta$ -actina (monoclonal de ratón, Sigma-Aldrich, A2228). Se usaron como anticuerpos secundarios anticuerpos de cabra anti-conejo, de conejo anti-ratón, y de burro anti-rata conjugados con Alexa Fluor o HRP (Life Technologies).

Cultivos neuronales

Se prepararon cultivos primarios de neuronas del hipocampo a partir de embriones de 18 días (E18) de ratón. Las neuronas se mantuvieron en atmósfera de un 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C en medio Neurobasal (Thermo Fisher Scientific, 21103-049) complementado con B27 (Thermo Fisher Scientific, 17504044) y GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 35050061). En el día in vitro (DIV) 7, el medio de cultivo se reemplazó con medio sin GlutaMAX. Los cultivos se usaron en el DIV 14.

Cultivos de cortes organotípicos

Se prepararon cultivos de cortes de hipocampo organotípicos como se conoce en la técnica. En resumen, se diseccionaron los hipocampos de ratones postnatales de 7 días y se prepararon cortes de 400 µm con un microtomo tisular (Leica Biosystems). Los cortes se pusieron en un inserto de cultivo celular (Merck) en un medio que  
5 contenía un 20 % de suero de caballo, L-glutamina 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, 1 mg/l de insulina, un 0,0012 % de ácido ascórbico, HEPES 30 mM, D-glucosa 13 mM y NaHCO<sub>3</sub> 5,2 mM. Los cortes se mantuvieron a 35,5 °C y el medio de cultivo se cambió por uno reciente cada 2-3 días. Los cortes se usaron después del DIV 7.

#### 10 Aislamiento de sinaptosomas

Los cerebros de los ratones se homogeneizaron en sacarosa 0,32 mM, EDTA 1 mM, 1 mg/ml de BSA, HEPES 5 mM a pH 7,4) y se centrifugaron a 3000 g durante 12 min a 4 °C. El sobrenadante se centrifugó adicionalmente durante 12 min a 14000 g a 4 °C.  
15 El sedimento se resuspendió en tampón de Krebs-Ringer (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, glucosa 5 mM, EDTA 1 mM, Hepes 10 mM a pH 7,4) y se mezcló con Percoll (45 % v/v). La solución resultante se centrifugó durante 2 min a 14000 rpm a 4 °C. Los sinaptosomas se recogieron de la superficie con una jeringa y se resuspendieron en tampón de Krebs-Ringer, seguido de una centrifugación a 14000 rpm durante 30 s a  
20 4 °C. Los sinaptosomas se obtuvieron en el sedimento que se resuspendió en tampón de Hepes-Krebs (NaCl 147 mM, KCl 3 mM, glucosa 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, Hepes 20 mM a pH 7,4).

#### Microscopía electrónica y marcaje inmunológico con oro

25

Se perfundieron por vía intracardiaca ratones NPC1nmf164 y wt de la misma camada (n = 3 por genotipo) con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y fijador (4 % de paraformaldehído [PFA] y 2 % de glutaraldehído [GTA] en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4 o 2 % de PFA y 0,2 % de GTA en el mismo tampón para marcaje inmunológico con  
30 oro). Los cerebros se fijaron en un 4 % de PFA durante una noche (ON) y se seccionaron en cortes de 200 µm de espesor o 300 µm de espesor para los cortes de marcaje inmunológico con oro. Las secciones del hipocampo se fijaron posteriormente en un 1 % de tetraóxido de osmio (en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4), se deshidrataron en etanol y se embebieron en Epon (Resina TAAB 812, TAAB  
35 Laboratories). Se recogieron las secciones ultradelgadas seriadas de la región CA1 en rejillas de orificio o ranura individual, revestidas con Formvar, y se tiñeron con acetato

de uranilo (Electron Microscopy Sciences) y citrato de plomo. Las muestras para  
 marcaje inmunológico con oro se inactivaron para los aldehídos libres con NH<sub>4</sub>Cl  
 0,05 M. Las secciones se criopreservaron en glicerol, se congelaron por inmersión en  
 propano líquido a -180 °C y se transfirieron a una unidad de sustitución de congelación  
 5 Leica AFS. La sustitución de congelación se llevó a cabo a -90 °C en metanol que  
 contenía un 0,5 % de acetato de uranilo durante 80 h. Se incubaron secciones del  
 hipocampo de CA1 ultradelgadas de 70 nm con el anticuerpo primario frente a NPC1  
 (1:20) seguido de un anticuerpo secundario acoplado a partículas de oro de 15 nm.  
 Finalmente, las secciones se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se  
 10 examinaron con un microscopio electrónico de transmisión (JEM1010, jeol, Akishima,  
 Tokyo, Japón). Las sinapsis de CA1 se identificaron por posición y se muestrearon de  
 forma aleatoria y se fotografiaron con una ampliación de 20.000 x con una cámara  
 CMOS 4 k TemCam-F416 (TVIPS, Gauting, Alemania). Las imágenes se cuantificaron  
 usando el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE. UU.). Se  
 15 calculó la densidad de SV como el número de vesículas por  $\mu\text{m}^2$  dentro de 10 nm de la  
 membrana presináptica y a no más de 300 nm del límite de la zona activa.

#### Inmunofluorescencia

20 Se fijaron neuronas con un 4 % de PFA y un 4 % de sacarosa en PBS a TA. La unión  
 no específica se bloqueó con un 0,2 % de gelatina y un 1 % de BSA (Sigma-Aldrich,  
 A9418) en PBS. Para el marcaje de GluA1 superficial, las neuronas se incubaron  
 durante 2 h con un anticuerpo frente al extremo N-terminal de GluR1. A continuación  
 se detectó inmunológicamente GluA1 total después de una etapa de permeabilización  
 25 (incubación de 30 minutos en un 0,1 % de Triton X-100 y un 0,2 % de gelatina y un  
 1 % de BSA en PBS) con un anticuerpo frente al extremo C-terminal de GluR1. Se  
 incubaron los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor  
 555 y Alexa Fluor 647 (Life Technologies) durante 1 h. Se montaron los cubreobjetos  
 en Permount (Life Technologies). Se adquirieron imágenes de las células usando un  
 30 microscopio confocal invertido (LSM800, Carl Zeiss). La cuantificación se llevó a cabo  
 usando el software ImageJ. Las regiones de interés en dendritas individuales se  
 seleccionaron manualmente en el canal de GluA1 total. Por lo tanto, la cuantificación  
 de las imágenes fue ciega con respecto al canal de GluA1 superficial.

#### 35 Inmunohistofluorescencia

Se perfundieron por vía intracardiaca ratones con PBS y un 4 % de PFA, se fijaron con un 4 % de PFA en PBS ON a 4 °C y a continuación criopreservaron en un 30 % de sacarosa (Merck Millipore, 107687) en PBS durante 48 h. A continuación, las muestras se congelaron en Temperatura de Corte Óptimo (Tissue-Tek; Thermo Fisher Scientific, 5 23-730-571). Se obtuvieron secciones sagitales (30 µm) con un microtomo de congelación CM 1950 Ag Protect (Leica, Solms, Alemania). Las secciones se bloquearon con un 0,2 % de gelatina y un 1 % de BSA en PBS y se incubaron con el anticuerpo primario ON a 4 °C en solución de bloqueo. Las secciones se incubaron en anticuerpo secundario de burro conjugado con Alexa Fluor (Thermo Fisher Scientific, 10 A-21206 o AP180SA6MI) y 100 µg/ml de filipina (un antibiótico poliénico fluorescente con una alta afinidad por el colesterol, Sigma-Aldrich) durante 1,5 h a TA. Finalmente, las secciones se lavaron y se montaron con Prolong Gold Antifade (Thermo Fisher Scientific, P36930). Se tomaron imágenes con un microscopio confocal LSM800 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemania).

15

#### Inducción de LTP química (cLTP)

El tratamiento cLTP se llevó a cabo en cortes del hipocampo. Estos se transfirieron a una cámara de alojamiento de tipo inmersión que contenía líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF; NaCl 119 mM, KCl 2,5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, D-glucosa 11 mM, 20 NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,25 mM y CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM) saturado con un 95 % de O<sub>2</sub>/5 % de CO<sub>2</sub> durante 5 minutos a TA. Se indujo cLTP por transferencia de los cortes a una cámara separada que contenía Rolipram 0,1 µM, Forskolina 50 µM y Picrotoxina 100 µM en ACSF que carecía de MgCl<sub>2</sub> durante 15 minutos a TA. Después del periodo 25 de inducción, los cortes se lavaron en PBS frío y se homogeneizaron inmediatamente en tampón MES (MES 25 mM, EDTA 2 mM y un cóctel de inhibidores de proteasa y fosfatasa (Roche)). Los cortes homogeneizados se centrifugaron a 100.000 g durante 2 horas a 4 °C para separar la membrana plasmática (sedimento, resuspendido en PBS-0,1 % de SDS) y la fracción microsomal (sobrenadante). En los cultivos 30 neuronales, el medio se cambió a ACSF en el DIV 17. Para la redistribución de colesterol con mCherry-D4, se adquirieron imágenes de línea base después de 15 min y, a continuación, la solución se intercambiò por ACSF que contenía Rolipram 0,1 µM, Forskolina 50 µM, y Picrotoxina 100 µM sin MgCl<sub>2</sub>. Después de un tratamiento de 15 min, se adquirieron imágenes de fluorescencia en forma de pilas z usando un 35 microscopio confocal Nikon A1R+. Para el reciclaje de receptores GluA1 se indujo cLTP como se ha descrito anteriormente, seguido de fijación. Las imágenes se

tomaron con un microscopio confocal LSM800 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemania).

5 Producción de partículas lentivirales, infección neuronal y transfección de mCherry-D4 y adquisición de imágenes

Se obtuvieron plásmidos de empaquetamiento y plásmidos de ARN de horquilla corta (ARNsh) frente a NPC1 o un plásmido control mixto (pGFP-C-shLenti) en Origene (Rockville, MD, EE. UU.). Los plásmidos se amplificaron y se siguió el protocolo Maxi prep (Macherey-Nagel, NucleoBond® Xtra Maxi, 740414.10). Se añadieron PCMV y PMD2.G (plásmidos de empaquetamiento), plásmido de ARNsh de NPC1 o ARNsh mixto junto con PEI a células HEK295T. El medio se cambió a Opti-MEM y se aislaron las partículas lentivirales por ultracentrifugación. El sedimento se resuspendió en PBS y se almacenó a -80 °C. Las partículas lentivirales se añadieron al medio de neuronas en el DIV 6 ON y después de eso el medio se cambió completamente por medio reciente. Las neuronas se transfectaron con plásmido de mCherry-D4 en el DIV 13 con Lipofectamina 3000 (Life technologies). Se adquirieron imágenes de pilas z usando un microscopio con focal Nikon A1R+.

20 Cuantificación de colesterol y 24(S)-hidroxicolesterol

Antes de la cuantificación de colesterol, se midió la cantidad de proteínas mediante el Kit de Ensayo de Proteínas de ácido bicinconínico (BCA) (Thermo Fisher Scientific). El contenido de colesterol se midió mediante el Kit de Ensayo de Colesterol Amplex Red (Thermo Fisher Scientific) y se refirió a la cantidad proteínas. Los niveles de 24(S)-hidroxicolesterol se midieron usando el kit de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de 24(S)-hidroxicolesterol (Abcam, ab204530, Cambridge, Reino Unido) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

30 Tratamiento con EFV in vitro, ex vivo e in vivo

Se disolvió EFV en DMSO a una concentración de trabajo de 20 mM y se mantuvo a -20 °C protegido de la luz. Se trataron los sinaptosomas y cultivos neuronales con EFV 20 µM durante 2 h a 37 °C. Los cortes cerebrales se incubaron con EFV 20 µM en el equipo protegido de la luz durante 1 h antes de los registros de campo que duraron otras 2 h durante las cuales se mantuvo el EFV. El tratamiento in vivo comenzó en

ratones a las 6 semanas de edad. Se administró EFV en el agua de la bebida protegida de la luz a una dosis de 0,9 mg/kg/día. Las soluciones de EFV se cambiaron cada 3 días. Los grupos de ratones control recibieron únicamente vehículo (DMSO). El tratamiento duró 8 semanas o hasta la muerte en el caso de los experimentos de supervivencia.

#### Registros electrofisiológicos en cortes del hipocampo

Los ratones se decapitaron y el cerebro se retiró rápidamente y se puso en solución de disección oxigenada enfriada en hielo (sacarosa 233 mM, KCl 4 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM y glucosa 10 mM, saturada con un 95 % de O<sub>2</sub>/5 % de CO<sub>2</sub>). Se prepararon cortes coronales (300 µm de espesor) con un vibratomo (Leica, VT1200S) y se mantuvieron en una cámara que contenía ACSF (glucosa 11 mM, NaCl 119 mM, KCl 2,5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,25 mM y CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, saturado con un 95 % de O<sub>2</sub>/5 % de CO<sub>2</sub>) a 32 °C durante al menos 1 h antes del registro. Después de este tiempo de recuperación, los cortes se mantuvieron a 25 °C. Para los registros electrofisiológicos, los cortes se pusieron en una cámara sumergida y se perfundieron con ACSF a 25 °C. Se registraron las respuestas sinápticas CA1 colaterales de Schaffer como fEPSP extracelulares desde el stratum radiatum CA1 usando un electrodo de estimulación de platino-iridio bipolar concéntrico y un microelectrodo de registro de vidrio de baja resistencia relleno con ACSF. Se usó el software pClamp9 (Molecular Devices) para la adquisición. Para medir la relación de entrada-salida, se evocó fEPSP a diferentes intensidades de estimulación crecientes (de 50 hasta 100 cada 10 µA, 150 y 200 µA) y se calculó la pendiente de la respuesta. Esta curva también se usó para establecer la línea base de fEPSP en ~20 % (para experimentos de PPF), ~30 % (para experimentos de LTP) o ~50 % (para experimentos de LTD) de la pendiente máxima. PPF se midió a través de un rango de intervalos interestímulo (ISI; seis trazas para cada ISI, ISI de 50-400 ms) a 0,067 Hz. Se suministró la estimulación de línea base cada 15 s (pulsos de duración de 0,05 ms) durante al menos 20 min antes de inducción de LTP o LTD para asegurar la estabilidad de la respuesta. LTP se indujo mediante estimulación por ráfaga theta (4 pulsos a 100 Hz, con las ráfagas repetidas a 5 Hz y cada tétano incluyendo tres trenes de 10 estallidos separados por 15 s). LTD se indujo usando 900 pulsos a 1 Hz. Las respuestas se registraron durante 1 h después de inducción de LTP o LTD. Todos los registros se llevaron a cabo en presencia del antagonista del receptor GABAA picrotoxina (0,1 mM).

Análisis de comportamiento

Ensayo de exploración de campo abierto. La actividad locomotora se midió en una caja de plexiglás transparente que medía 43,2 cm x 43,2 cm, equipada en el exterior con detectores de haz fotoeléctrico para monitorizar la actividad horizontal y vertical. Los niveles de actividad se registraron con un monitor de actividad de MED Associates (MED Associates, St. Albans, VT). Los datos de la actividad locomotora se recogieron a través de un PC y se analizaron con el software de análisis de datos de monitorización de actividad de MED Associates. Los ratones se pusieron en el centro del aparato de campo abierto y se permitió que se movieran con libertad. Los datos se recogieron de forma individual para cada animal durante 5 min.

Ensayo de reconocimiento de ubicación de objeto. Después de manipulación y habituación al escenario del ensayo, los ratones se sometieron a 3 sesiones de entrenamiento de 6 minutos, durante las cuales se permitió que exploraran con libertad 2 objetos idénticos (botellas de vidrio pequeñas) que se situaron en ubicaciones definidas en el escenario del ensayo. Al día siguiente, se llevó a cabo una sesión de ensayo de 6 minutos, durante la cual se cambió la ubicación de uno de los objetos, mientras que la ubicación del otro permaneció sin alterar. Se usó una cámara de video para monitorizar y registrar el comportamiento de los animales. El tiempo que los animales pasaron explorando el objeto en la ubicación nueva y en la ubicación conocida durante el ensayo se puntuó manualmente por un observador a partir de la cinta de video.

Ensayo de laberinto en Y. El ensayo de laberinto en Y se llevó a cabo usando un laberinto en Y simétrico hecho de plástico de color negro y la pared en el extremo de cada brazo se marcó con una forma de papel diferente. Se entrenó a los ratones en el laberinto en Y con uno de los brazos cerrados. Los ratones se situaron en el extremo del brazo de salida, alejados del centro, y se permitió que lo explorarán con libertad durante 5 min. Después de la exploración, los ratones se situaron de nuevo en la jaula. Una hora después, se abrió el brazo bloqueado originalmente y se definió como el "brazo nuevo". Los ratones se situaron en el laberinto en Y en el brazo de inicio y se permitió que se movieran con libertad durante 5 min. Se midió el porcentaje de entradas en el brazo nuevo.

35

Ensayo de condicionamiento de miedo contextual y específico. Se usó el sistema



combinado StarFear (Aparato de Panlab-Harvard) para el condicionamiento de miedo contextual y específico. El condicionamiento se llevó a cabo en una cámara con un suelo de rejilla de acero inoxidable en una caja de atenuación de sonido. El suelo de rejilla se conectó a un generador de descargas y se suministró una señal auditiva desde un altavoz en la pared de la cámara. Con el fin de evaluar la sensibilidad de los ratones, se situaron ratones individuales en el aparato de condicionamiento de miedo y se suministraron descargas eléctricas en las patas (2 s) de intensidad creciente hasta que se escuchó una respuesta de vocalización audible por parte del observador. La intensidad de la descarga comenzó en 0,05 mA y se aumentó en incrementos de 0,05 mA; transcurrieron 15 s entre cada descarga. Los dos grupos de ratones analizados, wt y NPC1nmf164, mostraron la misma sensibilidad a las descargas eléctricas. En el día de condicionamiento, los ratones se situaron de forma individual en la cámara de condicionamiento. Después de un periodo de exploración de 3 min, cada ratón se expuso a tres emparejamientos de tono-descarga en las patas (tono (CS), 30 s; descarga en las patas, 2 s, 0,2 mA a la finalización del tono; separados por un intervalo entre pruebas de 1 min). Un min después de la tercera descarga en las patas, se devolvió al ratón a su jaula de alojamiento. En esta sesión, las paredes de las cámaras fueron de color negro, se desconectó cualquier sonido, luz o ventilador, los ratones se situaron directamente en el suelo de rejilla y se usó etanol al 70 % para la limpieza entre animales. Al día siguiente (día de ensayo), se llevó a cabo el ensayo contextual para respuesta condicionada al miedo. El condicionamiento del miedo en el contexto de la cámara de entrenamiento se evaluó devolviendo a cada ratón a la misma cámara de condicionamiento y midiendo la inmovilidad como comportamiento de miedo durante 6 min sin ningún tono o descarga en las patas suministrados. En el tercer día, el contexto y la manipulación de los ratones se cambiaron para evaluar el miedo condicionado únicamente del tono: se usó extracto de limón para perfumar las cámaras, el suelo y las paredes de las cámaras se reemplazaron con cubiertas de plástico de color blanco, se conectaron el ventilador de ventilación y la luz de la cámara, se estableció un ruido de fondo de 67 dB, se usó desinfectante mural CR-36 para la limpieza entre animales y se llevó a cabo el ensayo por parte de un experimentador diferente. Los ratones se pusieron en las cámaras durante 6 min. Se evaluó la inmovilidad durante un periodo de línea base de 3 min (pre-CS) seguido por un periodo adicional de 3 min durante el tono de condicionamiento (CS) durante el cual el tono se presentó de forma persistente durante 3 min. Se registraron de forma automática el tiempo de congelación y el movimiento medio usando software comercial (FREEZINGV1.3, Panlab, Aparato de Harvard). Para evaluar el miedo condicionado,

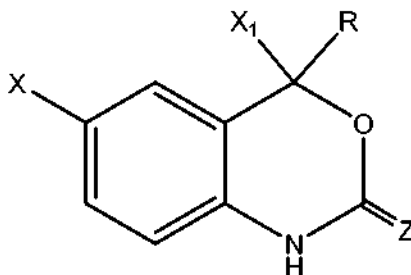
se calculó el porcentaje de tiempo de congelación/inmovilidad en los dos días de ensayo. El episodio de inmovilidad se definió como una falta completa de movimiento además de respiración durante al menos 2 s.

5 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, EE. UU.). Los gráficos se representaron usando GraphPad. Para las comparaciones entre genotipos y grupos experimentales, se usó el ensayo t de Student de dos colas sin emparejar para los datos con distribución paramétrica. Para 10 comparaciones múltiples, los datos con una distribución normal se analizaron mediante ANOVA de dos vías mediante un ensayo post hoc de Bonferroni. Todas las comparaciones estadísticas se basaron en replicados biológicos y todos los valores se presentaron como el valor medio  $\pm$  SEM. Los valores de P inferiores a 0,05 se 15 consideraron significativos y los ensayos estadísticos y el tamaño de la muestra (valores de n) que se usaron los experimentos se especifican en las leyendas de las figuras. En las figuras, los asteriscos indican los valores de P como sigue a continuación: \* < 0,05; \*\* < 0,01; \*\*\* < 0,001.

## REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula (I):



(I)

- 5 en la que:  
 X es halo,  
 X<sub>1</sub> se selecciona entre trihalometilo, pentahaloetilo, alquilo C<sub>2-5</sub>, alquinilo C<sub>2-5</sub>, cicloalquilo C<sub>3-5</sub>; o arilo;  
 Z se selecciona entre O o S;
- 10 R se selecciona entre:
- (a) alquilo C<sub>1-8</sub>, sin sustituir o sustituido con A, y A se selecciona entre halo, cicloalquilo C<sub>3-6</sub>, CN, hidroxilo, alcoxi C<sub>1-4</sub>, alquil C<sub>2-4</sub>-alcoxi C<sub>1-4</sub>, ariloxi, alquilcarbonilo C<sub>1-4</sub>, nitro, di(alquil C<sub>1-2</sub>)amino, alquil C<sub>1-4</sub>amino-alquilo C<sub>1-2</sub>, heterociclo, o ariltio;
- (b) alqueno C<sub>2-4</sub>, sin sustituir o sustituido con
- 15 (i) A, o  
 (ii) arilo, sin sustituir o sustituido con A;
- (c) alquinilo C<sub>2-5</sub>, sin sustituir o sustituido con
- (i) A, o  
 (ii) arilo, sin sustituir o sustituido con A; o
- 20 (d) cicloalquilo C<sub>3-4</sub>, sin sustituir o sustituido con
- (i) A, o  
 (ii) arilo, sin sustituir o sustituido con A,
- o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lipídico.
- 25
2. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en el que dicho compuesto se selecciona entre el siguiente grupo:
- (-)-6-cloro-4-ciclopropiletinil-4-trifluorometil-1,4-dihidro-2H-3,1-benzoxazin-2-ona,  
 (-)-6-cloro-4-feniletinil-4-trifluorometil-1,4-dihidro-2H-3,1-benzoxazin-2-ona,

- (+/-)6-cloro-4-(2-cianofenil)etnil-4-(1,1,1-trifluorometil)-1,4-dihidro-2H-3,1-benzoxazin-2-ona,  
(+/-)4-(1-cloro-1,1-difluorometil)-4-(2-feniletinil)-6-cloro-1,4-dihidro-2H-3,1-benzoxazin-2-ona, o
- 5 (+/-)4-(2-[dimetilaminometil]etnil)-4-trifluorometil-6-cloro-1,4-dihidro-2H-3,1-benzoxazin-2-ona,  
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
3. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2 en el que dicho  
10 compuesto es (-)6-cloro-4-ciclopropiletinil-4-trifluorometil-1,4-dihidro-2H-3,1-benzoxazin-2-ona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
4. Uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1  
a 3 en el que la enfermedad de almacenamiento lipídico se selecciona entre  
15 enfermedades de Niemann-Pick, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry, enfermedad de Farber, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Krabbe, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Wolman.
5. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4 en el que la  
20 enfermedad de almacenamiento lipídico es enfermedad de Niemann-Pick de tipo C.
6. Uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en combinación con otro principio activo.
- 25 7. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 6 en el que el principio activo se selecciona entre miglustat, inhibidores de histona desacetilasa, arimoclomol,  $\beta$ -ciclodextrina, ácido ursodesoxicólico, acetil-leucina o esfingomielinasa ácida recombinante.

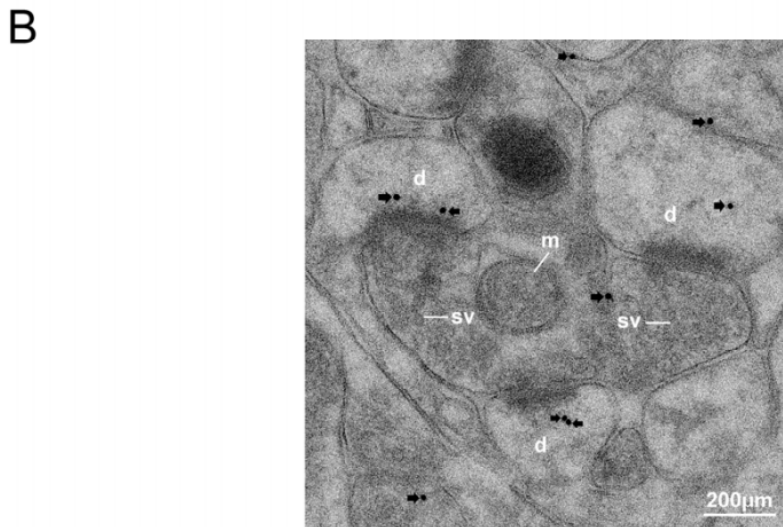
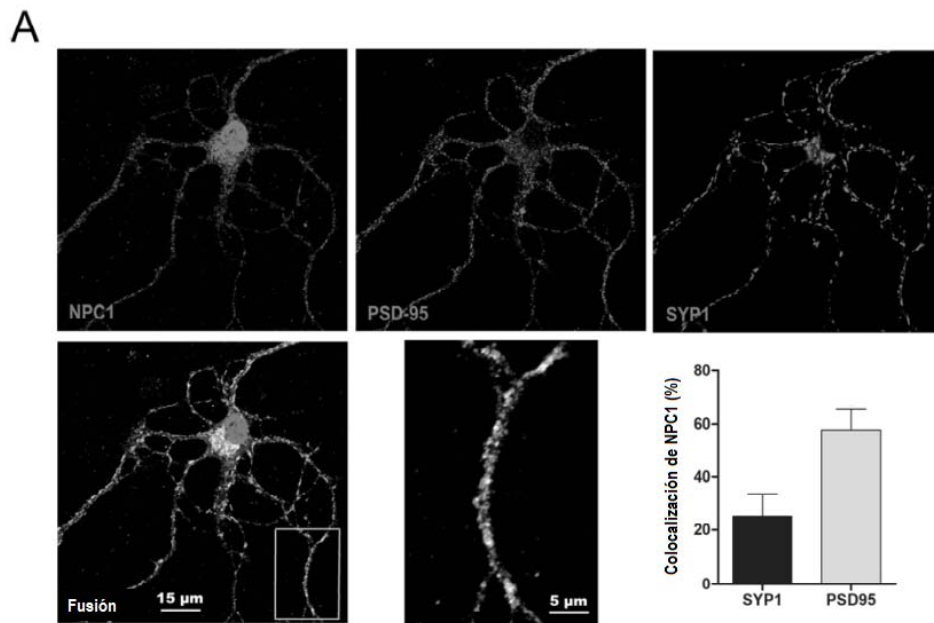
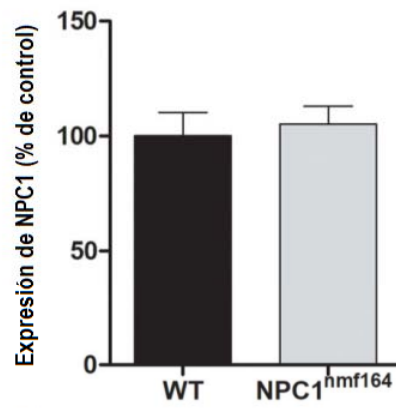
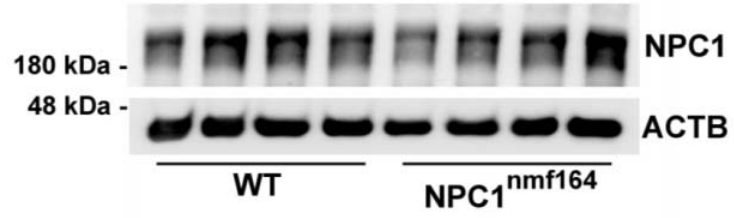


FIG. 1

C



D

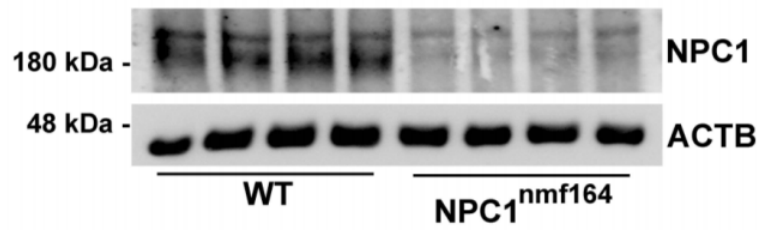


FIG. 1 cont.

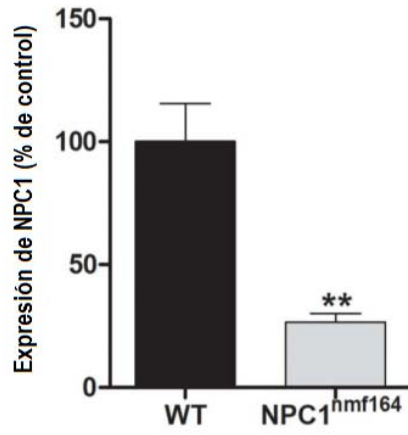


FIG. 1 cont.

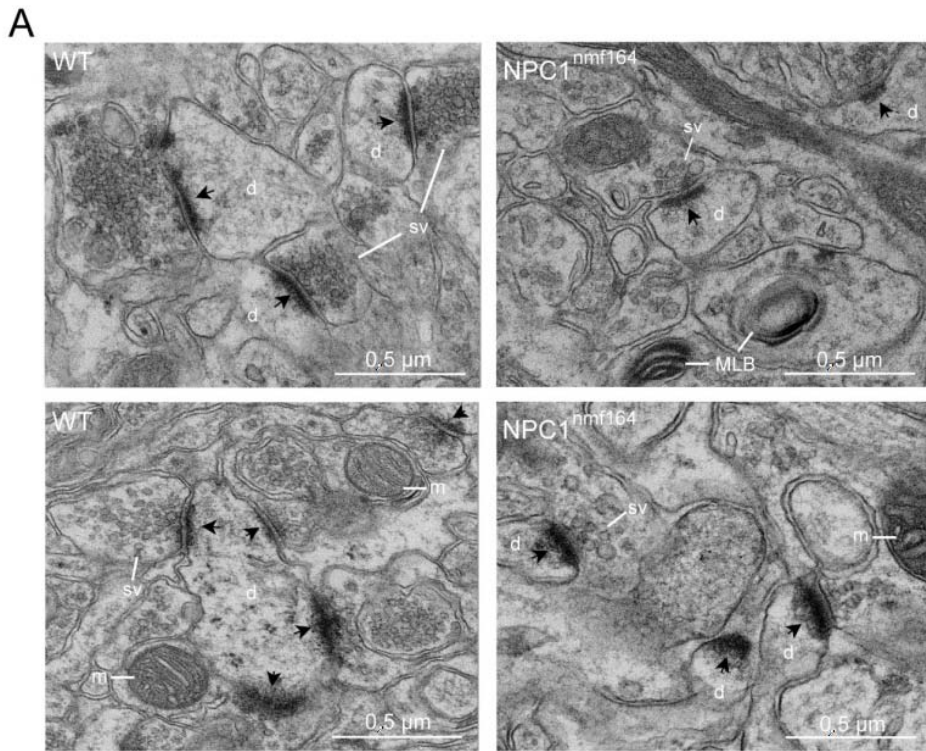


FIG. 2

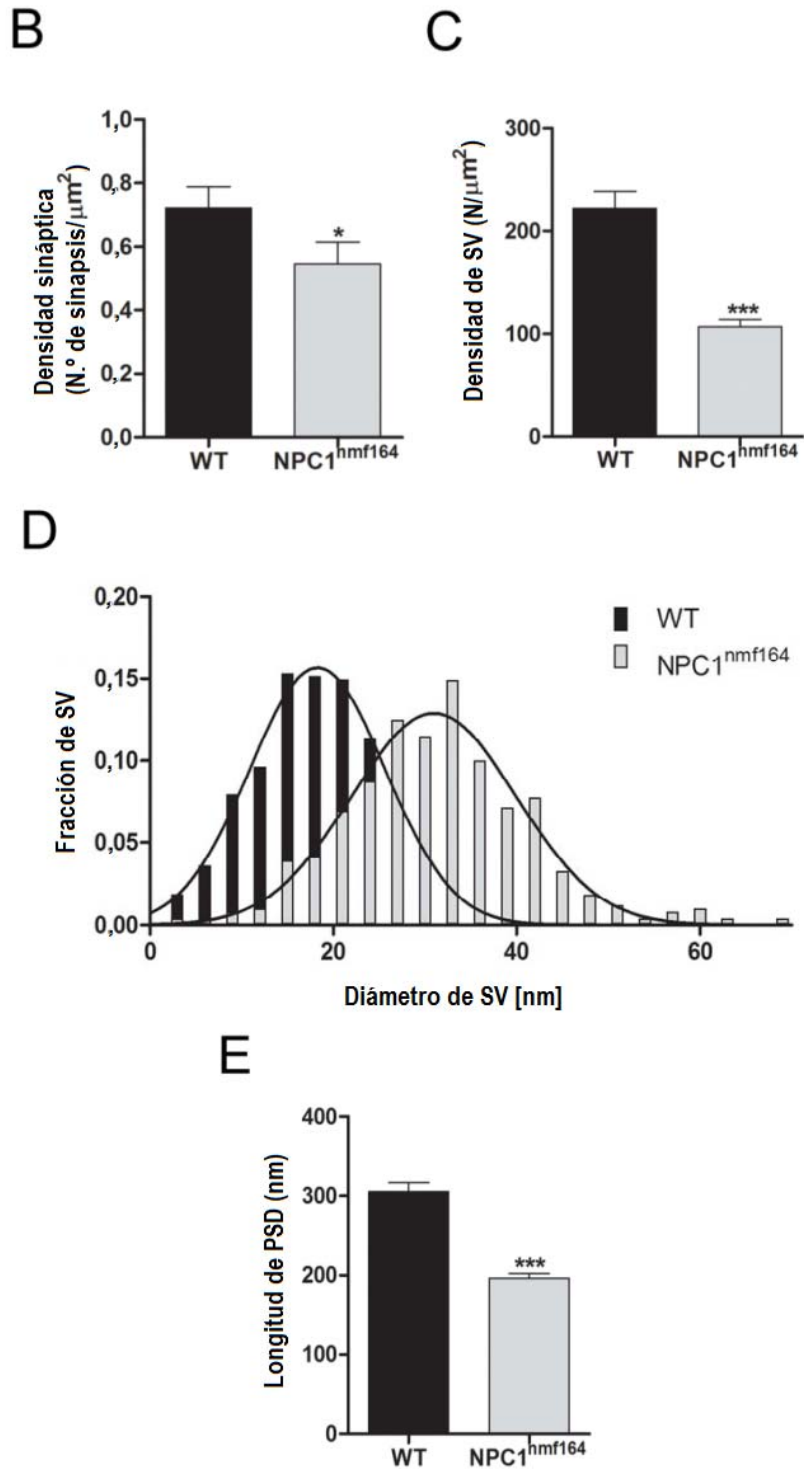


FIG 2 cont.



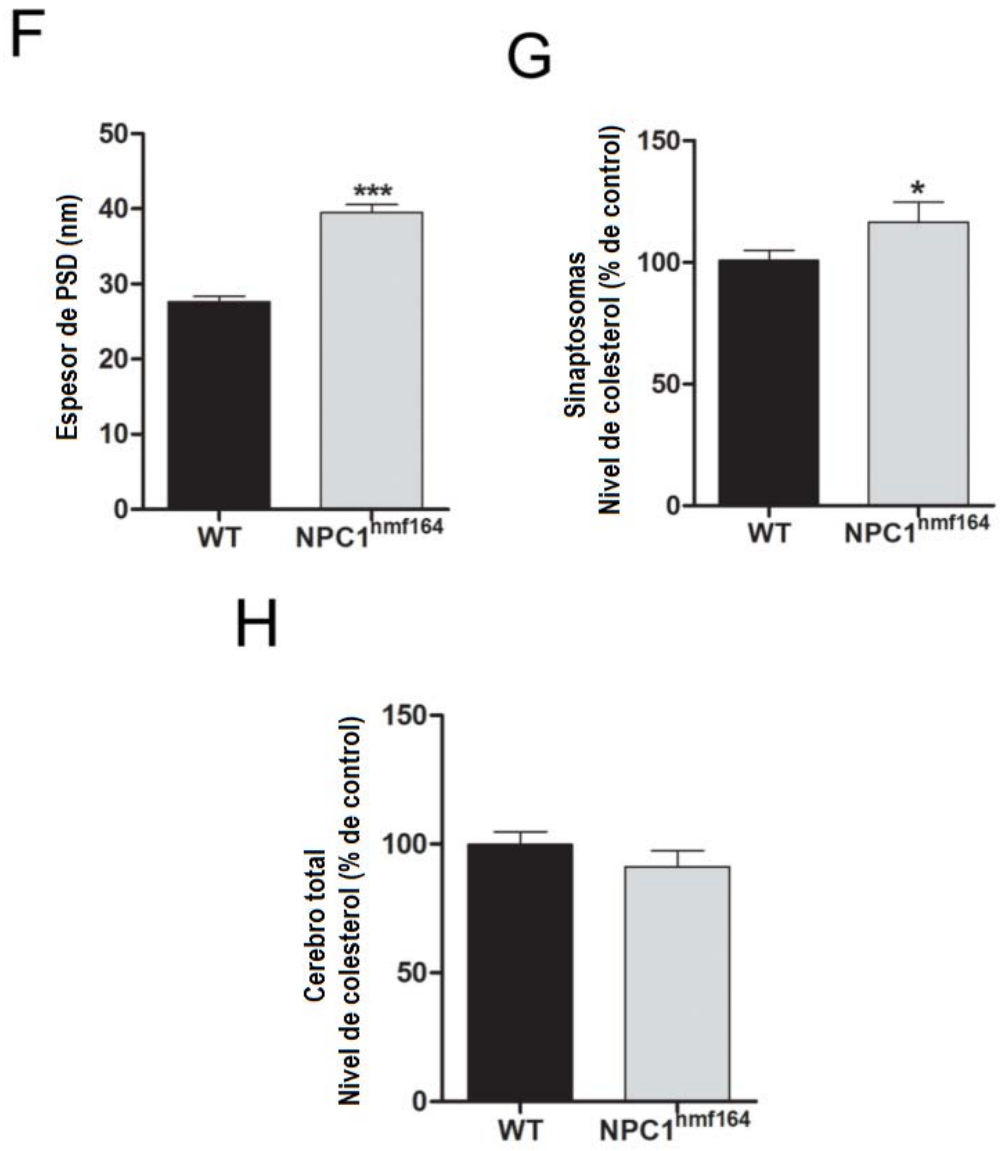


FIG. 2 cont.

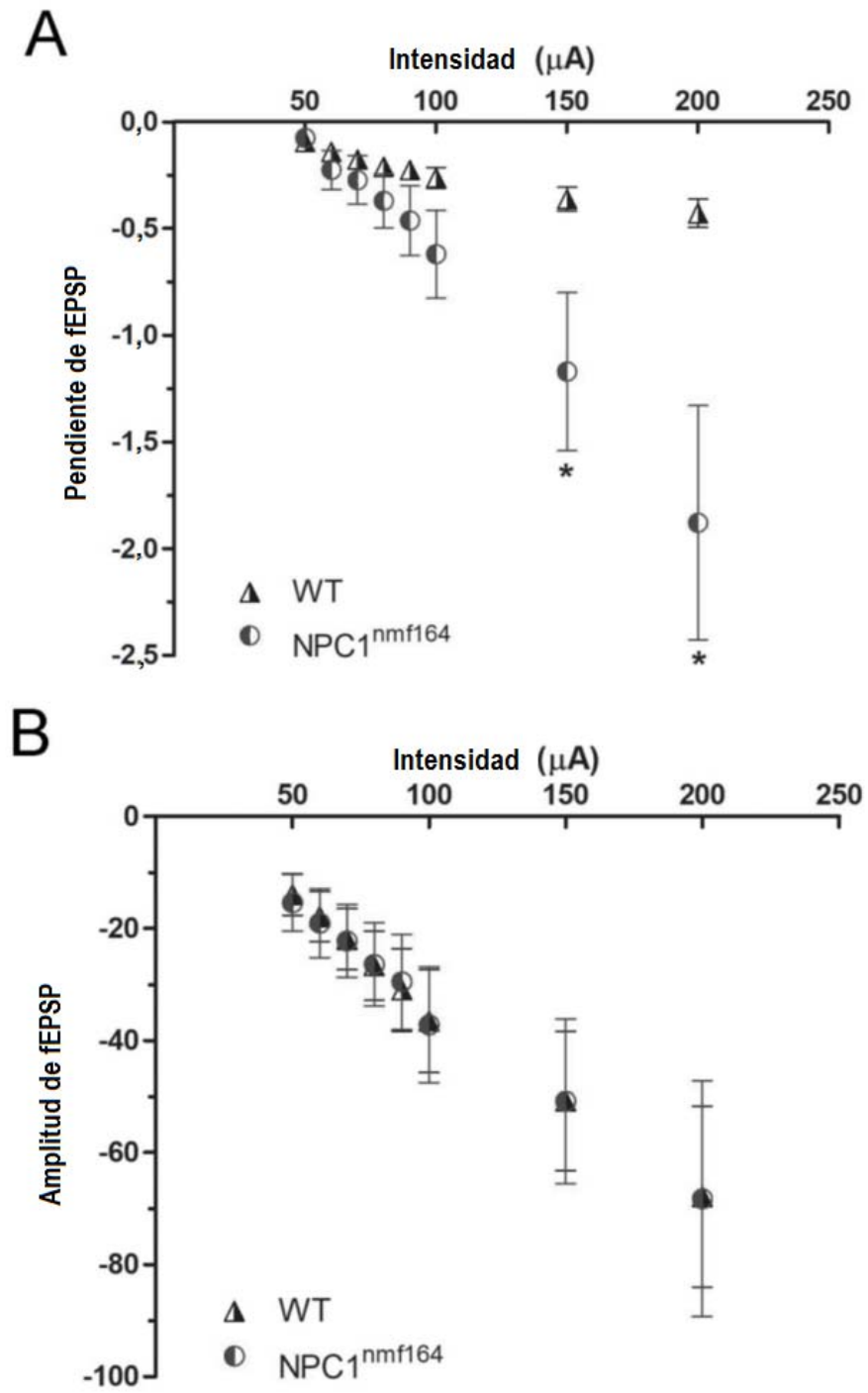
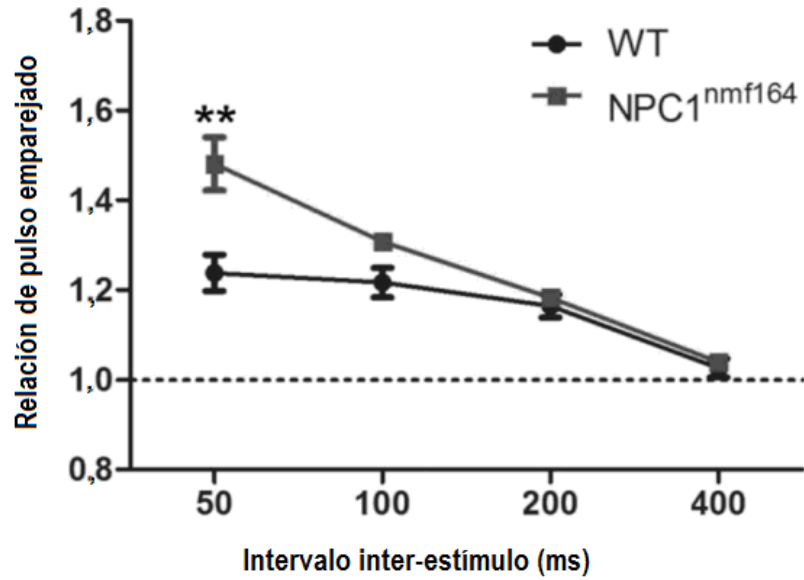


FIG. 3

C



D

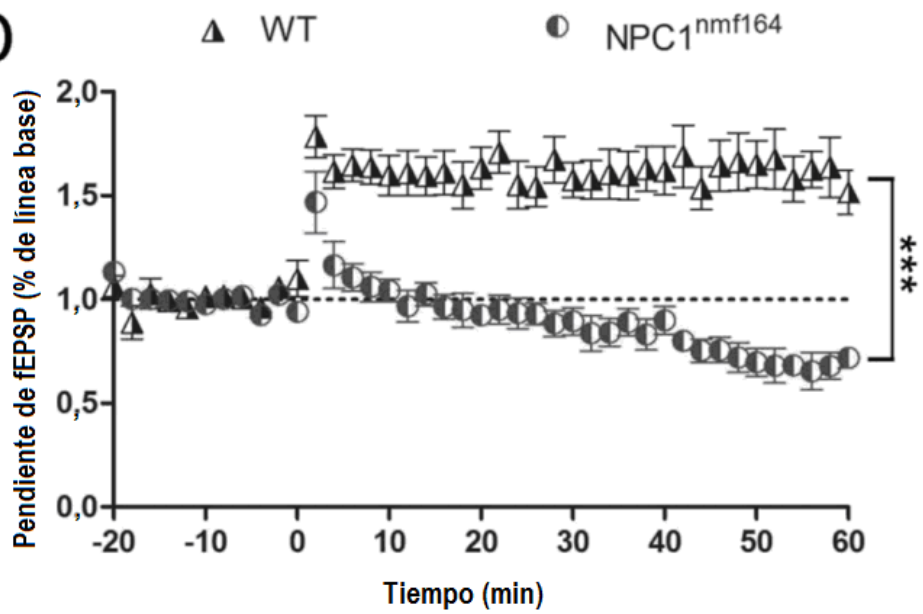


FIG. 3 cont.

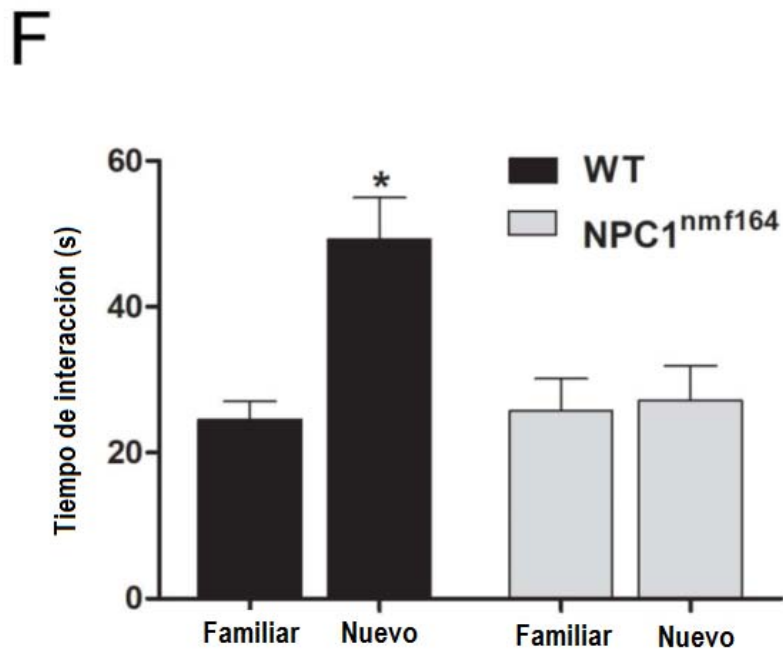
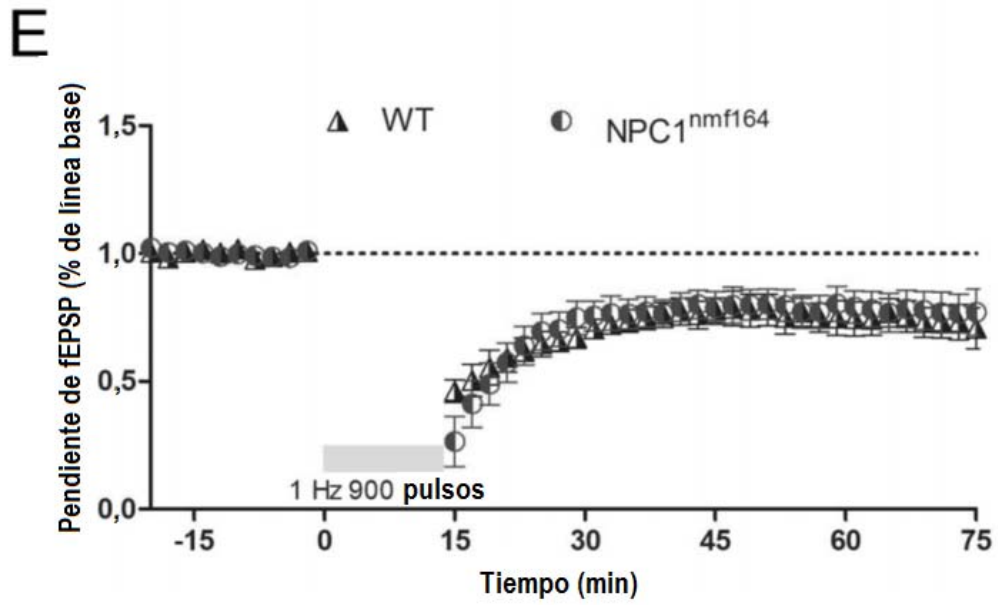


FIG. 3 cont.

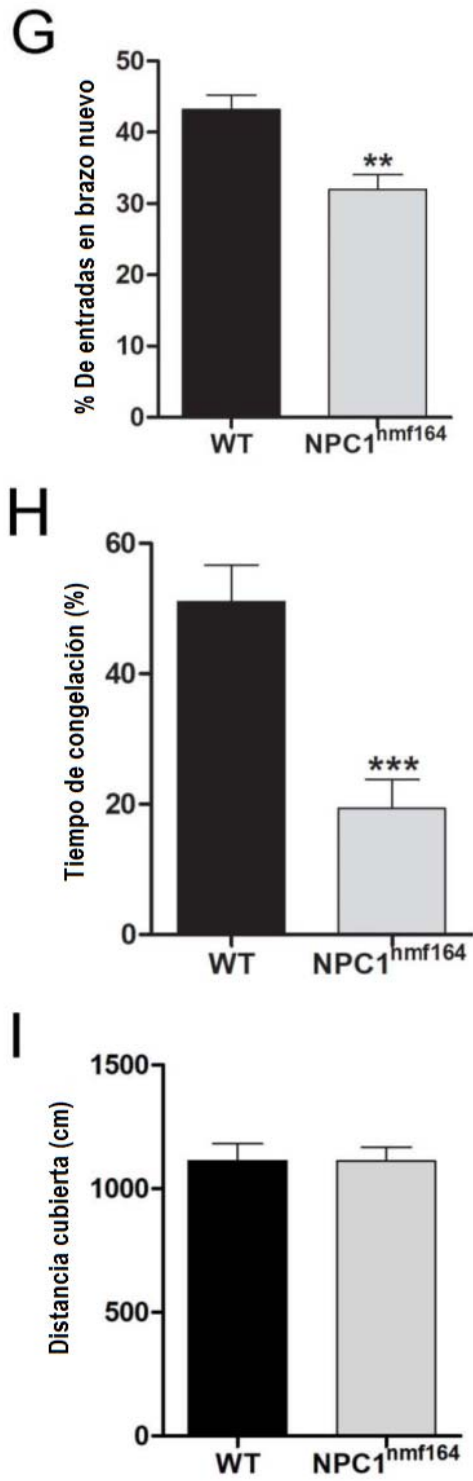


FIG. 3 cont.

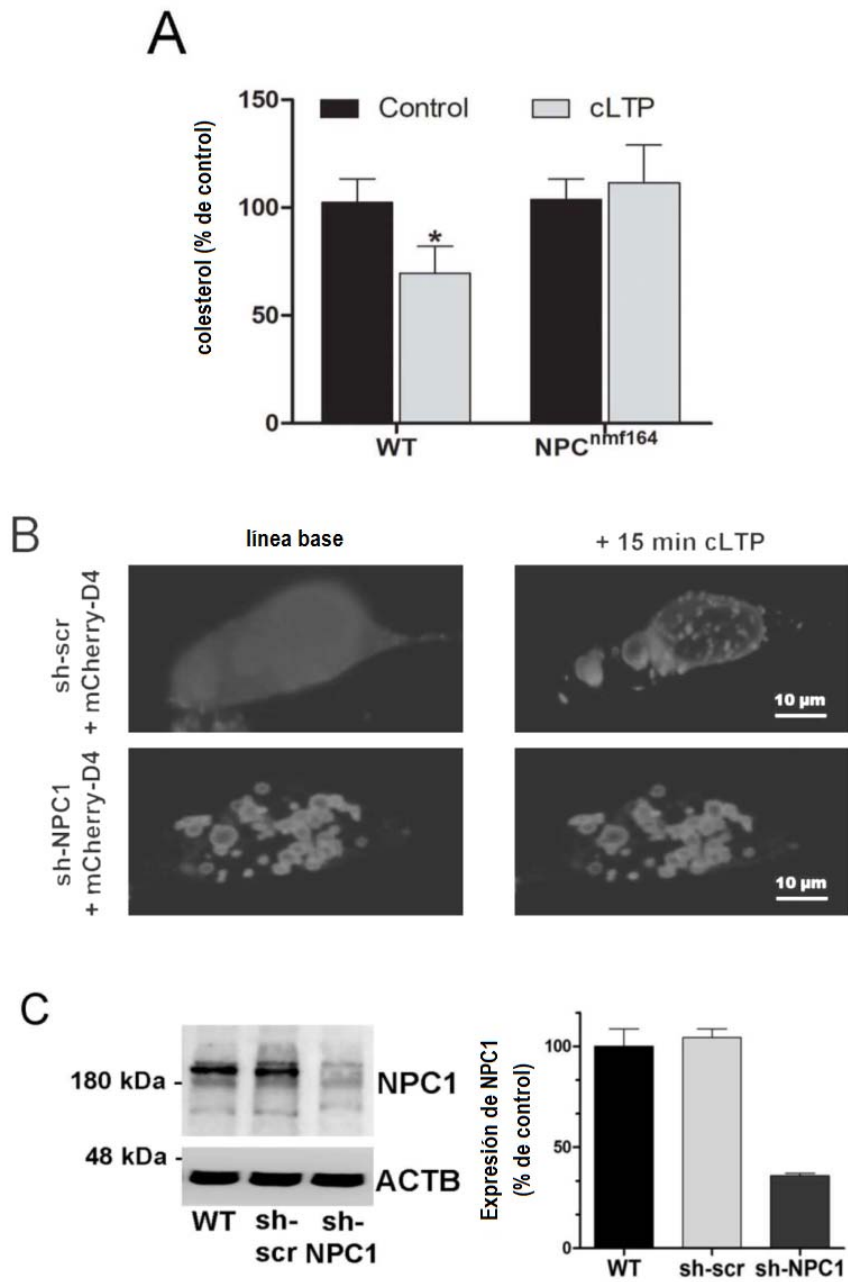


FIG. 4

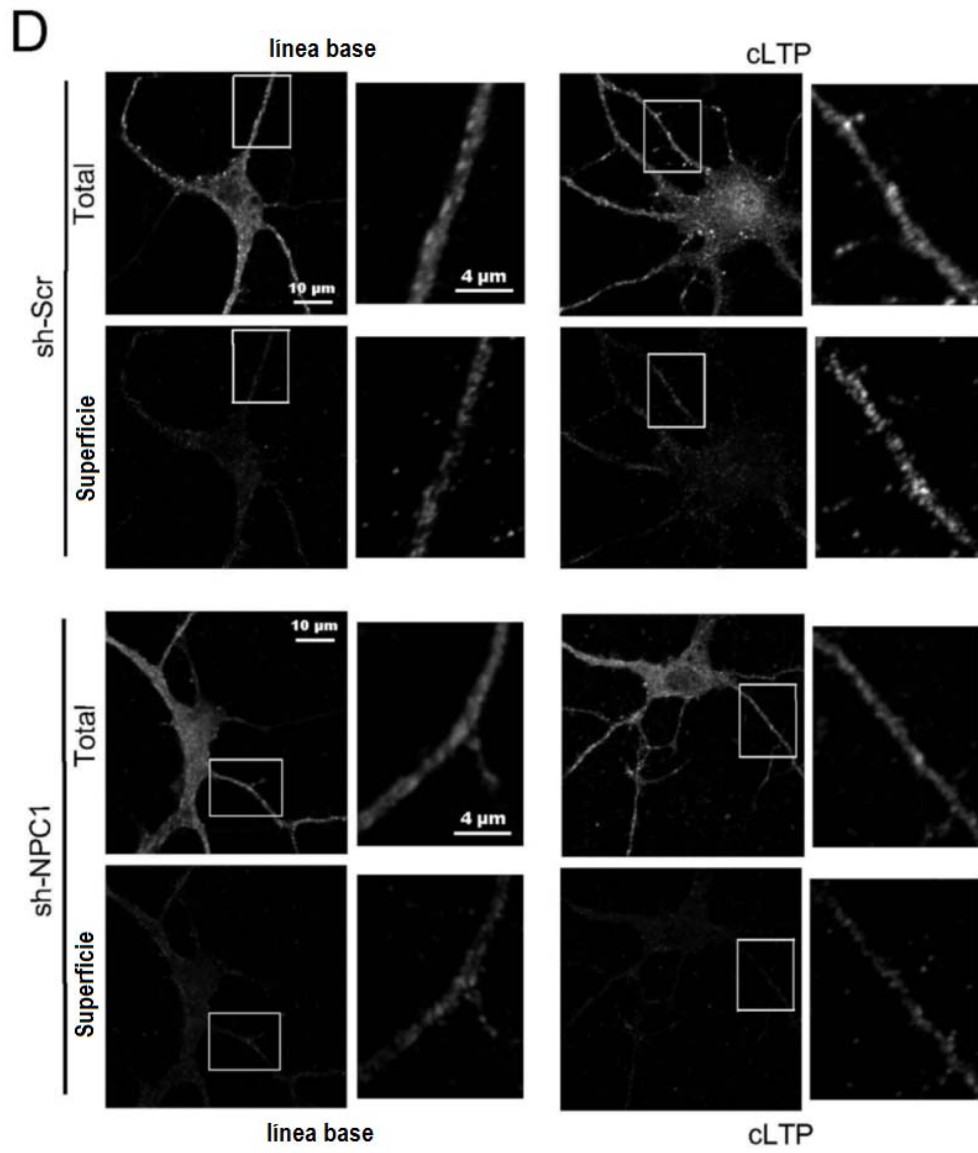


FIG. 4 cont.

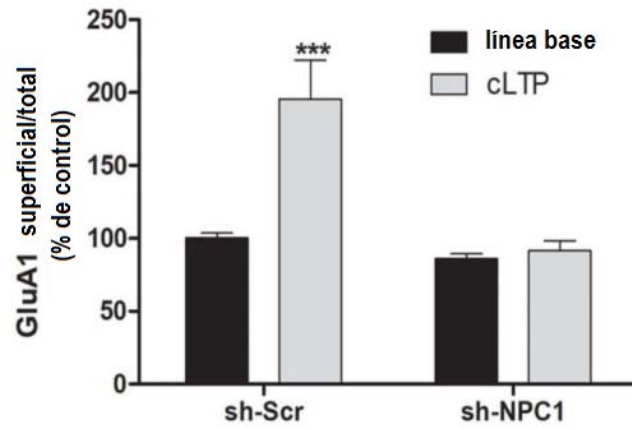


FIG. 4 cont.

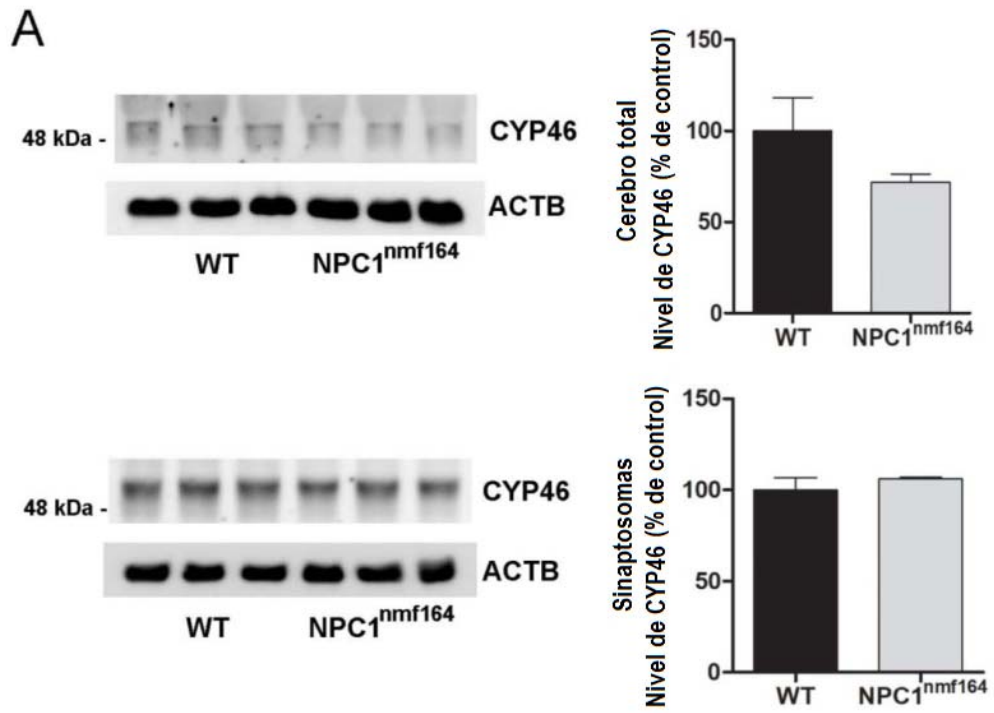
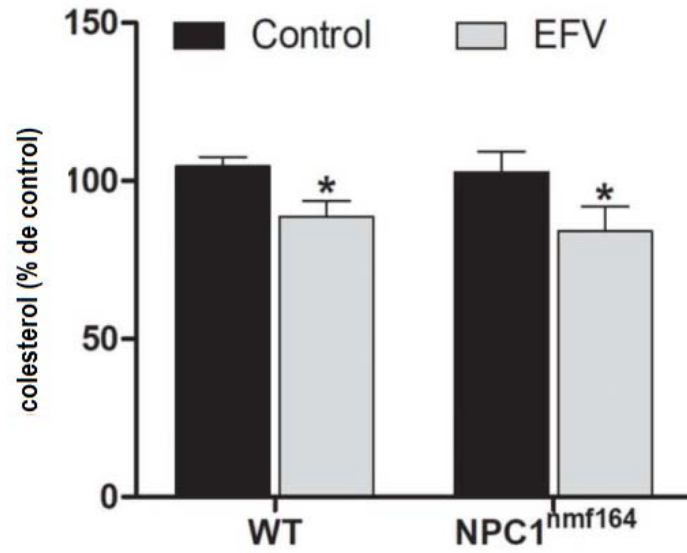


FIG. 5



B



C

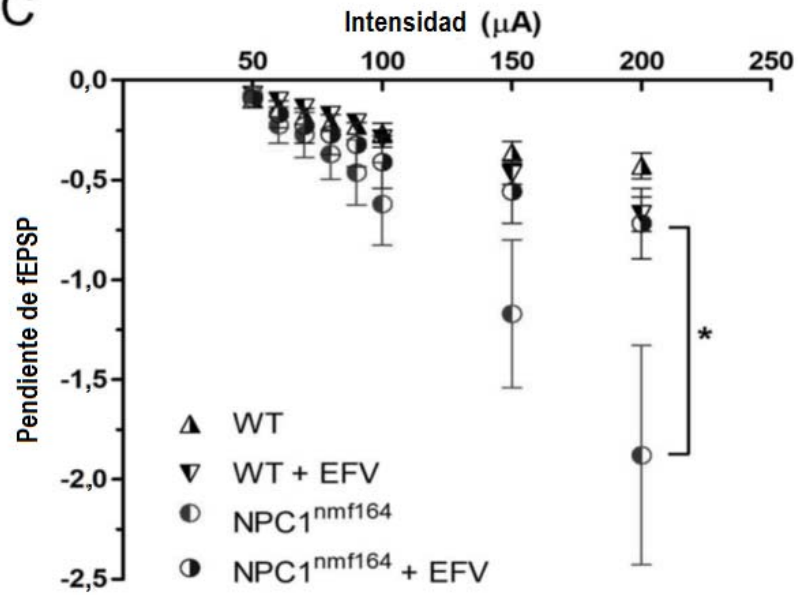
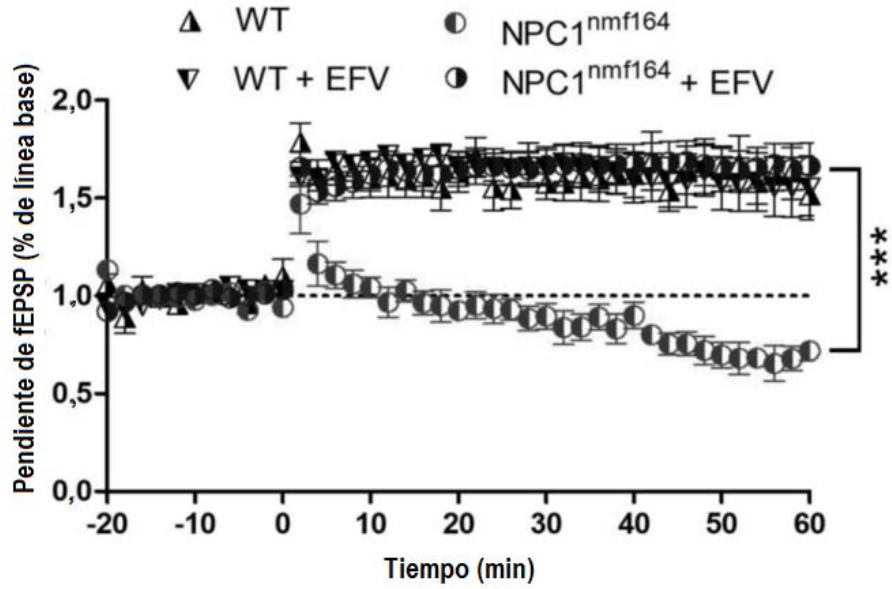


FIG. 5 cont.

D



E

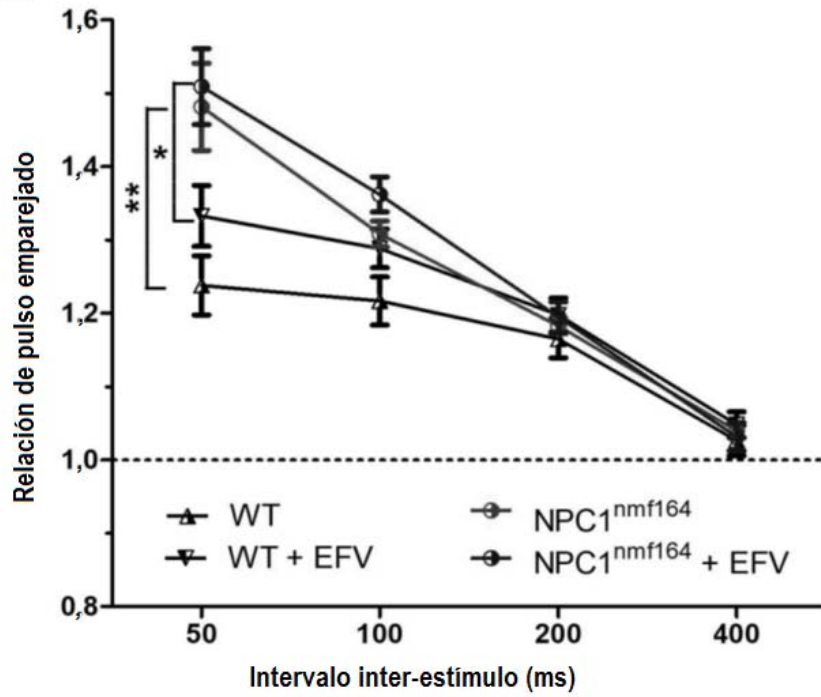


FIG. 5 cont.

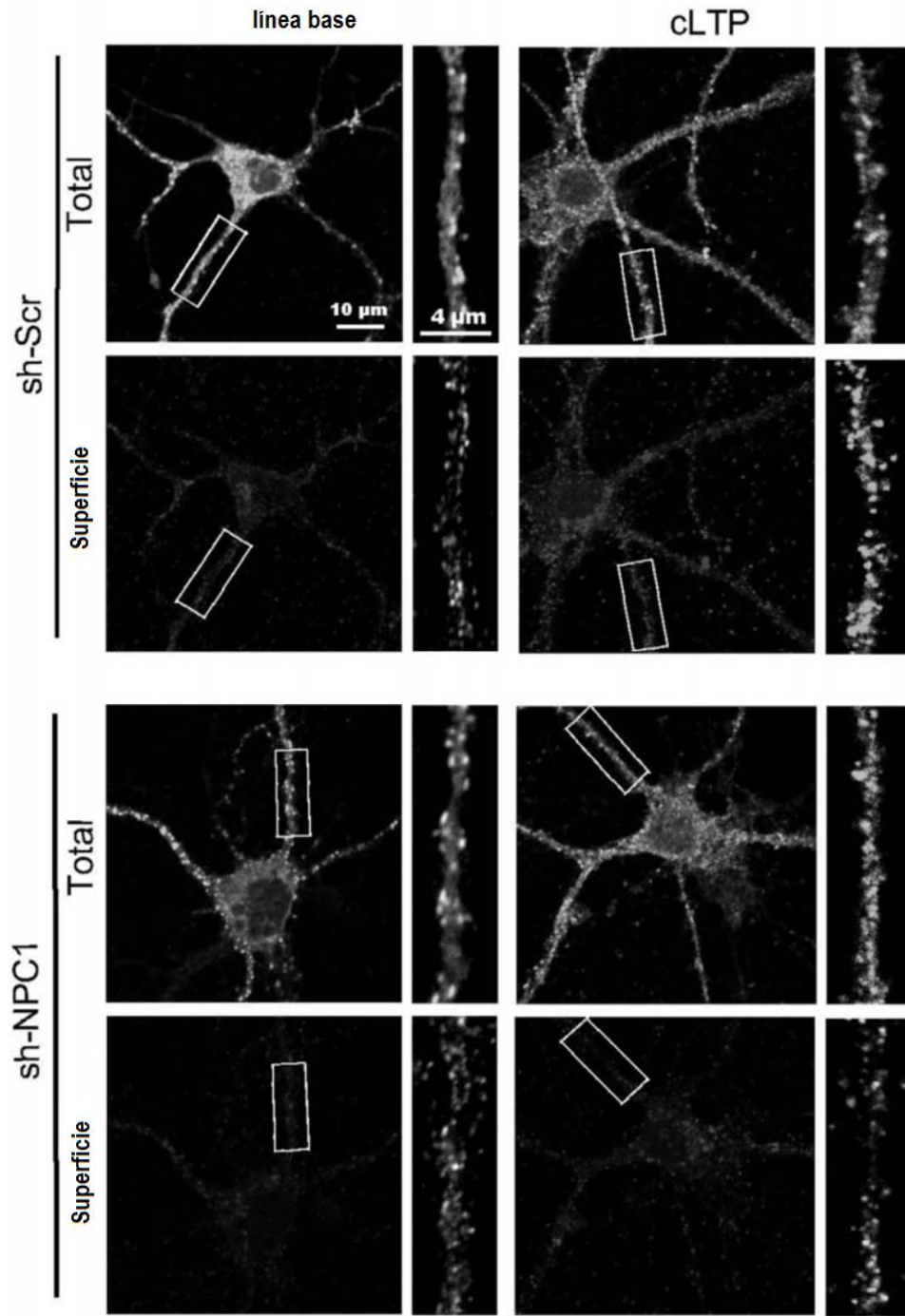


FIG. 6

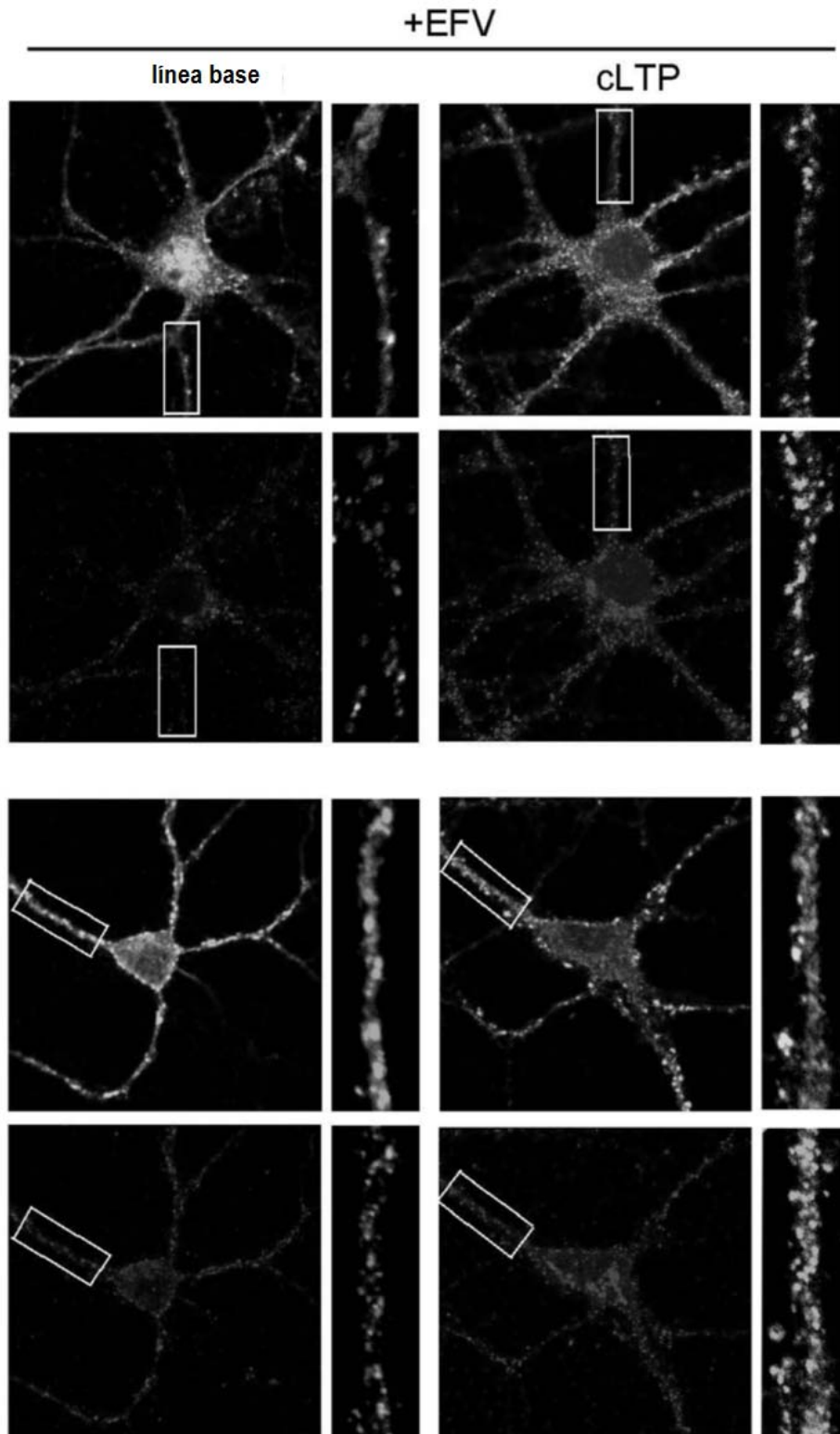


FIG. 6 cont.

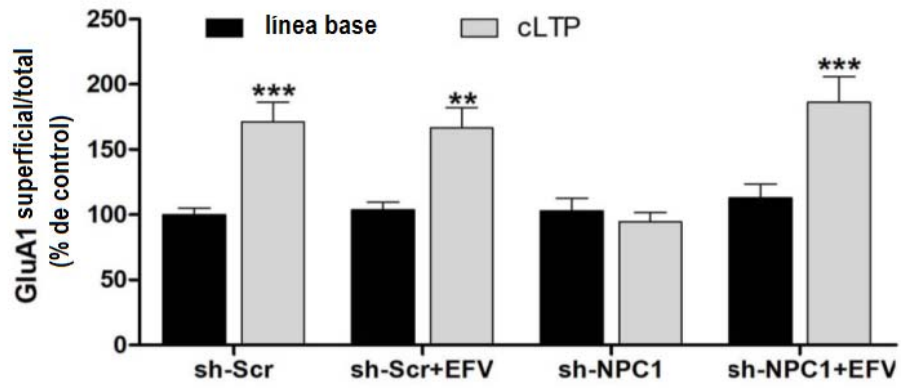


FIG. 6 cont.

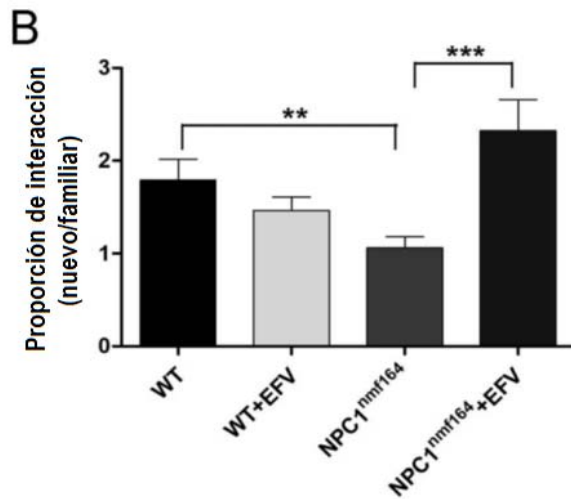
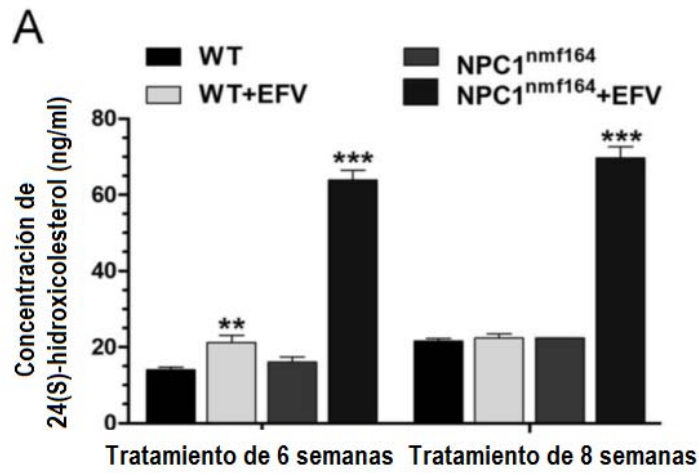


FIG. 7

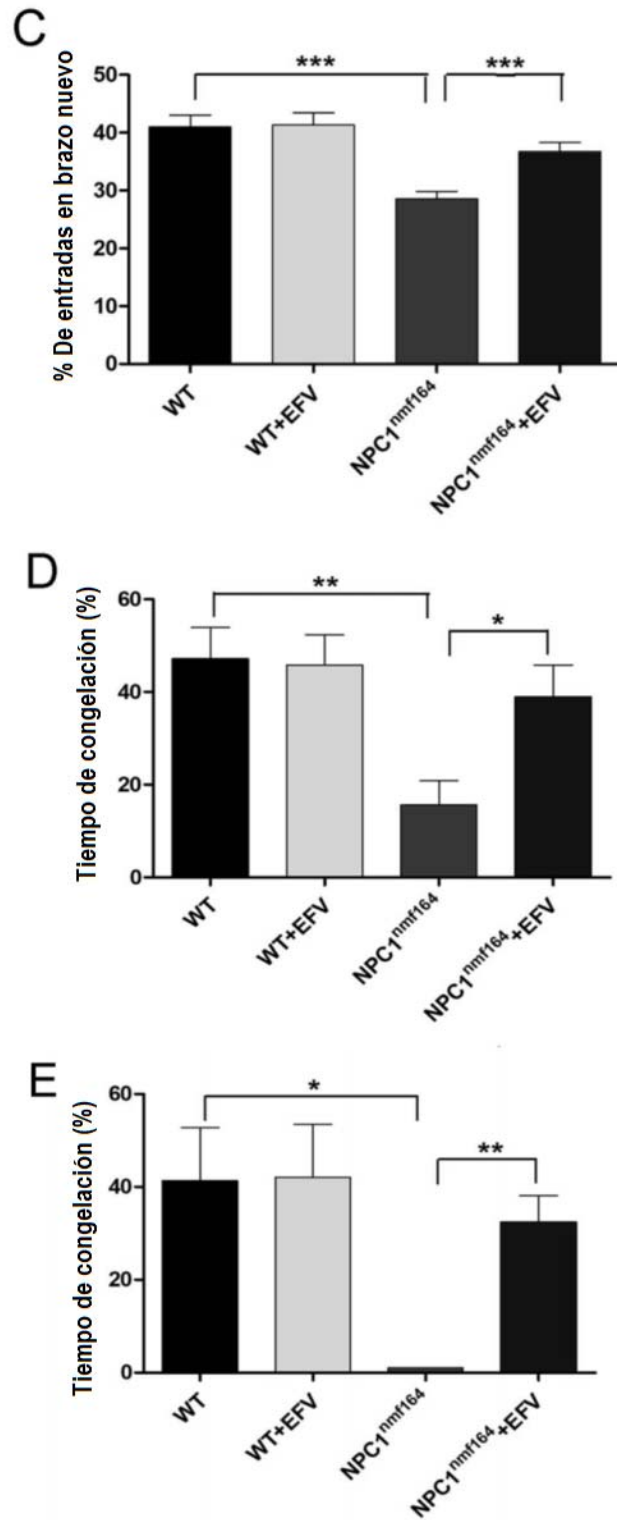


FIG. 7 cont.

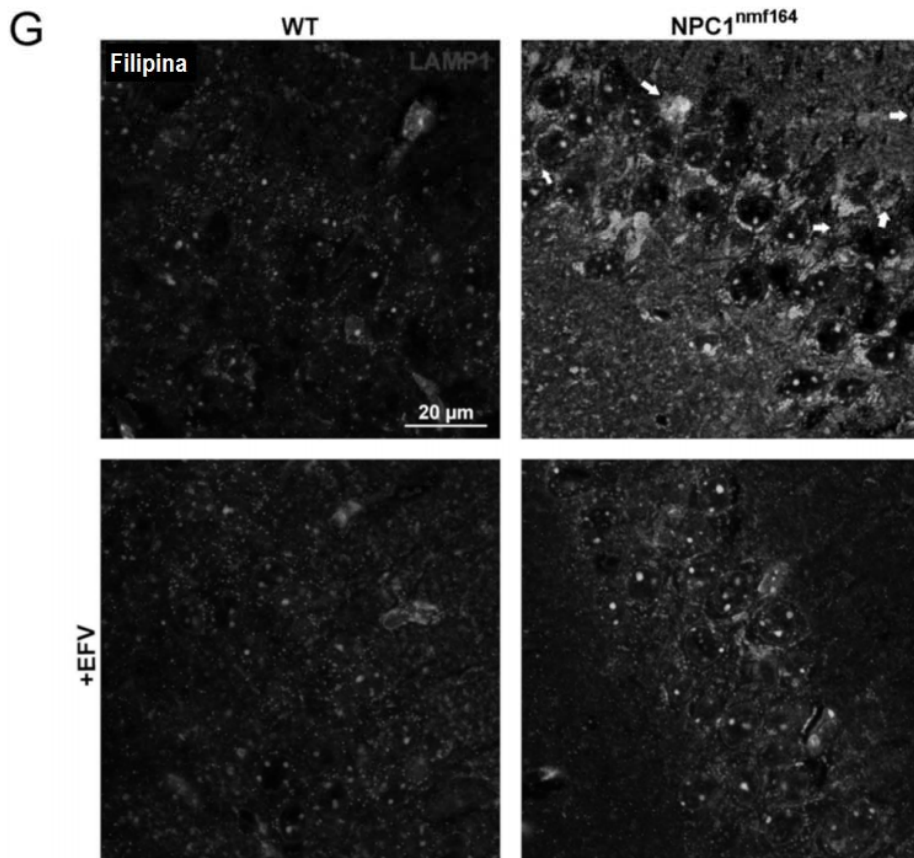
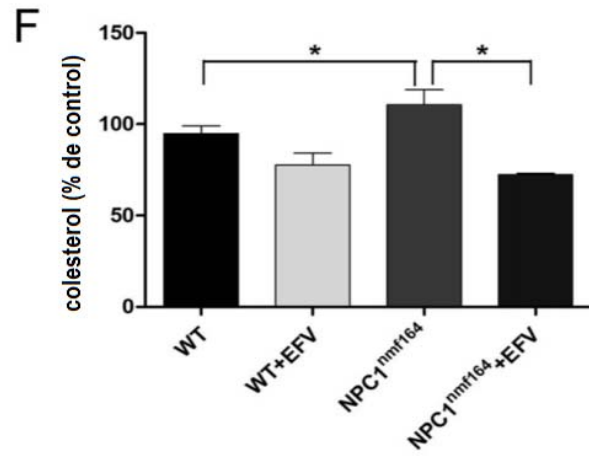


FIG. 7 cont.

H

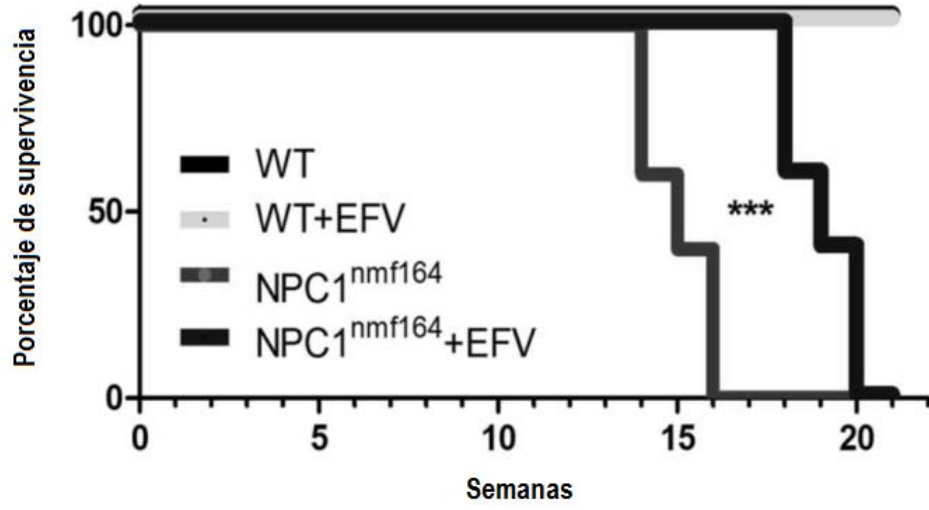


FIG. 7 cont.