

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 848 720**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/483** (2006.01)

**C12N 5/0793** (2010.01)

**A61K 31/519** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2017 PCT/KR2017/013444**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2018 WO18097628**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2017 E 17874605 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2020 EP 3425390**

54 Título: **Composición para promover la diferenciación y la protección de células madre neurales y método para inducir la regeneración neural utilizando la misma**

30 Prioridad:

**25.11.2016 KR 20160158739**

**22.03.2017 KR 20170036268**

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

**11.08.2021**

73 Titular/es:

**GENUV INC. (100.0%)**

**5F., 14, Cheonggyecheon-ro, Jung-gu  
Seoul 04520, KR**

72 Inventor/es:

**CHOI, KANG-YELL;**

**KIM, MI-YEON y**

**HAN, SUNGHO**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 848 720 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

Composición para promover la diferenciación y la protección de células madre neurales y método para inducir la regeneración neural utilizando la misma

5

**Campo técnico**

En el presente documento se describe un método para inducir la neuroregeneración que comprende administrar un inhibidor de MEK 1/2 a un paciente que lo necesita y una composición que comprende un inhibidor de MEK1/2 para utilizar en el método anterior. El inhibidor de MEK1/2 descrito en el presente documento induce la neuroregeneración diferenciando las células madre neurales en neuronas, protegiendo a las células madre neurales y a las neuronas contra la citotoxicidad de las beta amiloides o mediante los dos anteriores. Además, en el presente documento se describe un método para proteger neuronas contra la pérdida o daño neuronal que comprende administrar un inhibidor de MEK1/2 y una composición que comprende un inhibidor de MEK1/2 para utilizar en el método anterior. También se describe en el presente documento un método para prevenir o tratar una enfermedad neurodegenerativa debida a la pérdida o daño neuronal para pacientes que lo necesitan, que comprende administrar un inhibidor de MEK 1/2 y la composición que comprende el inhibidor de MEK1/2 para utilizar en el método anterior.

10

15

**Técnica anterior**

20

Las enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer (EA; en inglés, AD) y la enfermedad de Parkinson (EP; en inglés, PD) son prevalentes en la población anciana y el número de pacientes está aumentando exponencialmente con el envejecimiento de la sociedad. Además, los informes de tipos de enfermedades neurodegenerativas de inicio temprano en los jóvenes no son infrecuentes. Por tanto, existe un gran interés en desarrollar tratamientos que ayuden a detener el progreso de la enfermedad o recuperar tejidos cerebrales dañados.

25

Las causas exactas de tal enfermedad neurodegenerativa no se han establecido todavía. Según lo que se conoce hasta ahora, las células neuronales en ubicaciones específicas del cerebro (por ejemplo, el hipocampo o la sustancia negra) se dañan conduciendo a una red neuronal defectuosa entre el número reducido de células neuronales, lo que da como resultado diversos síntomas de la enfermedad neurodegenerativa.

30

Se ha llevado a cabo investigación en diversos campos para buscar tratamientos. Hasta la fecha, los fármacos relacionados con el alivio de los síntomas incluyen memantina (antagonista del receptor NMDA), L-DOPA (fármaco que imita la dopamina), etc. Otros fármacos también se limitan a un efecto a corto plazo o se ha descubierto que tienen efectos secundarios con el uso continuo, haciendo difícil esperar que proporcionen un tratamiento más allá del alivio temporal de los síntomas. Por tanto, es de gran necesidad un tratamiento fundamental para la causa de la enfermedad neurodegenerativa.

35

Las células madre neurales (CMN; en inglés, NSC) y las células progenitoras neurales (CPN; en inglés, NPC), células que son capaces de diferenciarse en células neurales, están presentes en el cerebro adulto. Las células madre neurales están presentes en la zona subventricular del ventrículo lateral y el giro dentado del hipocampo y es en esta región donde se produce la neurogénesis a lo largo de toda la vida del animal a través de la diferenciación y proliferación de las células madre neurales (Zhao *et al.* (2008) Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. Cell 132:645-660).

45

Dado que el daño y la pérdida de células neuronales cerebrales ocurren en las enfermedades neurodegenerativas, el reemplazo de neuronas dañadas o perdidas por neuronas que funcionan normalmente mediante la estimulación de CMN y CPN podría ser un tratamiento fundamental para la enfermedad neurodegenerativa. Este método de tratamiento incluye el método de tratamiento con células madre, donde las CMN y las CPN se aíslan del cuerpo del paciente, se estimulan *in vitro* para que se diferencien en neuronas y a continuación, se trasplantan de nuevo a los pacientes. Sin embargo, es difícil aislar CMN y CPN de los pacientes y a continuación, trasplantarlos nuevamente a los pacientes. Además, las CMN y CPN trasplantadas pierden rápidamente su actividad en el cerebro, requiriendo repetidos trasplantes. Como alternativa, en lugar de trasplantar células madre neurales a los pacientes, se ha propuesto recientemente un método para generar neuronas en el cerebro del paciente estimulando las CMN y las CPN para diferenciarlas con el uso de fármacos (Davies *et al.* (2015) Stemistry: The Control of Stem Cells in Situ Using Chemistry. J. Med. Chem. 58:2863-2894).

50

55

La beta amiloide (A $\beta$ ) es un péptido de 36-43 aminoácidos, que se produce por la escisión de la proteína precursora de amiloide (APP; del inglés, amyloid precursor protein), una proteína integral de membrana de tipo 1, por la  $\beta$ -secretasa y la  $\gamma$ -secretasa. La beta amiloide (A $\beta$ ) se agrega como oligómeros solubles de beta amiloide (A $\beta$ ) y a continuación, a través de protofibrillas, forma fibrillas de A $\beta$  insolubles que con el tiempo se acumulan como placas amiloides en el cerebro. La deposición de A $\beta$  en el cerebro se asocia con daño en las sinapsis, daño neuronal y atrofia cerebral y con el tiempo da como resultado daño en la memoria y las funciones cognitivas, dos síntomas muy típicos de la enfermedad de Alzheimer (EA). Entre las diversas formas de A $\beta$ , los oligómeros solubles de A $\beta$ , especialmente trímeros y tetrámeros, se cree que son las formas más tóxicas de A $\beta$  que se asocian con disfunción neuronal y daño sináptico (Murakami, (2014) Conformation-specific antibodies to target amyloid  $\beta$  oligomers and their application to

60

65

immunotherapy for Alzheimer's disease. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78(8):1293-1305; Jana *et al.* (2016) Membrane-bound tetramer and trimer A $\beta$  oligomeric species correlate with toxicity towards cultured neurons. *J Neurochem.* 136(3):594-608).

5 Por tanto, la protección de las neuronas de A $\beta$ , especialmente las formas oligoméricas de A $\beta$ , se considera el objetivo potencial para el tratamiento de la EA. Sin embargo, los pacientes con EA ya han sufrido un daño neuronal significativo, por lo que además de la neuroprotección, se requiere la neuroregeneración a través de la diferenciación de células madre neurales endógenas para el tratamiento fundamental de la EA.

10 MEK (proteína quinasa quinasa activada por mitógenos; del inglés, mitogen-activated protein kinase kinase; también conocida como MAP2K o MAPKK) es un miembro de la ruta de transducción de señales de la MAP quinasa (proteína quinasa activada por mitógenos; MAPK; del inglés, mitogen-activated protein kinase) (escrita en el presente documento como "ruta MAPK/ERK") que sigue en la secuencia de Ras-Raf-MEK-ERK. Cuando diversas moléculas de señalización tales como factores de crecimiento, hormonas, citocinas, etc., se unen a los receptores de la membrana celular y activan el receptor tirosina quinasa, se activa la proteína Ras GTPasa, que da como resultado el reclutamiento de Raf citoplasmático hacia la membrana celular. El Raf activado fosforila y activa MEK y ERK, secuencialmente y la ERK activada a su vez se traslada al núcleo para activar varios factores de transcripción. Estos factores de transcripción a continuación, se unen a los promotores de diversos genes para controlar la proliferación, diferenciación y supervivencia. Debido a que la ruta de transducción de señales MAPK/ERK está hiperactivada en las células tumorales, las quinastas se consideraron dianas importantes para inhibir el progreso de la enfermedad en el cáncer y otras enfermedades proliferativas.

25 Hay 7 proteínas (MEK1-MEK7) conocidas por pertenecer a la familia MEK y de estas, solo MEK1 y MEK2 están implicadas en la transducción de señales de la ruta Ras-Raf-MEK-ERK. Aunque MEK1 y MEK2 están codificados por genes diferentes, comparten una alta homología (80 %) tanto dentro de los dominios de quinasa catalítica C-terminal como en la mayoría de las regiones reguladoras N-terminales. Aunque no se han encontrado formas oncogénicas de MEK1 y MEK2 en cánceres humanos, se sabe que la activación constitutiva de MEK se ha demostrado que da como resultado la transformación celular. Además, MEK también puede activarse mediante otros oncogenes. Por consiguiente, la inhibición de MEK1 y MEK2 se ha estudiado como un objetivo para el desarrollo de fármacos contra el cáncer. No está claro, sin embargo, qué papel tienen MEK1 y MEK2 y la ruta MAPK/ERK en la proliferación y diferenciación de las células madre neurales adultas.

35 Adicionalmente, hay resultados de estudios que indican un vínculo entre la ruta MAPK/ERK y las proteínas A $\beta$  o tau en el cerebro de los pacientes con Alzheimer (EA). Desafortunadamente, no está claro si el tratamiento de la EA requerirá la activación o la inhibición de esta ruta de señalización y si el control de esta ruta de transducción de señales se puede o no vincular al tratamiento de la EA.

40 Hay informes de niveles aumentados de expresión de proteínas en la ruta MAPK/ERK en pacientes de enfermedad de Alzheimer en etapa muy temprana (Arendt *et al.* (1995) Increased Expression and Subcellular Translocation of the Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase and Mitogen-Activated Protein Kinase in Alzheimer's Disease. *Neuroscience* 68(1): 5-18; Gartner *et al.* (1999) Elevated Expression of p21ras is an Early Event in Alzheimer's Disease and Precedes Neurofibrillary Degeneration. *Neuroscience* 91(1);1-5), de la asociación entre ERK1/2 y MEK1/2 con la hiperfosforilación de tau en el cerebro de un paciente de Alzheimer (Pei *et al.* (2002) Up-Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinases ERK1/2 and MEK1/2 is Associated with the Progression of Neurofibrillary Degeneration in Alzheimer's Disease. *Brain Res Mol Brain Res.* 109(1-2):45-55) y de una mayor expresión de Ras y activación de ERK1/2 en células B103 (células de neuroblastoma de ratón) que expresan la proteína precursora de amiloide (APP) (Chaput *et al.* (2012) SILAC-based Proteomic Analysis to Investigate the Impact of Amyloid Precursor Protein Expression in Neuronal-Like B103 Cells. *Electrophoresis* 33(24):3728-3737).

50 Entretanto, otros estudios han demostrado que cuando se activa ERK1/2, la apoptosis inducida por A $\beta$  se inhibe y la acumulación de A $\beta$  disminuye (Guerra *et al.* (2004) Plasma Membrane Oestrogen Receptor Mediates Neuroprotection Against  $\beta$ -Amyloid Toxicity Through Activation of Raf-1/MEK/ERK Cascade in Septal-Derived Cholinergic SN56 Cells. *J. Neurochem.* 91:99-109; Watson *et al.* (2005) Macrophage Inflammatory Protein 2 Inhibits  $\beta$ -Amyloid Peptide (1-42)-Mediated Hippocampal Neuronal Apoptosis through Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathways. *Molecular Pharmacology* 67(3):757-765; Mills *et al.* (1997) Regulation of Amyloid Precursor Protein Catabolism Involves the Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathway. *J. Neurosci.* 17:9415-9422). Además, se ha notificado que ERK1/2 disminuye la actividad de la  $\gamma$ -secretasa, que produce A $\beta$  a partir de APP y disminuye la expresión y actividad de BACE1 ( $\beta$ -secretasa1) en condiciones de estrés oxidativo (Tamagno *et al.* (2009) JNK and ERK1/2 Pathways Have a Dual Opposite Effect on the Expression of BACE1. *Neurobiology of Aging* 30:1563-1573).

65 Por tanto, existen puntos de vista contradictorios sobre los papeles de la regulación de la ruta MAPK/ERK y la inhibición de MEK en relación con las enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer, que aún no se han dilucidado claramente.

## Divulgación de la invención

**Problema técnico**

La presente invención se refiere al tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa debida a una pérdida o daño neuronal. También se describe en el presente documento un método para inducir la neuroregeneración diferenciando las células madre neurales en neuronas y protegiendo las células madre neurales y las neuronas de la A $\beta$  con un compuesto que inhibe tanto MEK1 como MEK2. También se describe en el presente documento un método para proteger neuronas contra la pérdida o el daño neuronal y un método para prevenir o tratar una enfermedad neurodegenerativa debida a la pérdida o al daño neuronal con el compuesto que inhibe tanto MEK 1 como MEK2.

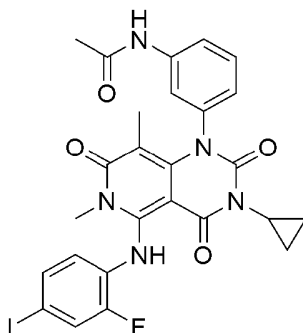
**Solución del problema**

La invención proporciona trametinib para utilizar en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa debida a la pérdida o al daño neuronal, en donde la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA, en inglés, ALS; enfermedad de Lou-Gehrig), demencia, demencia vascular, demencia frontotemporal, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica, degeneración corticobasal, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular espinal, parálisis bulbar progresiva (PBP), atrofia muscular progresiva (PMA; del inglés, progressive muscular atrophy), parálisis pseudobulbar, paraplejia espástica hereditaria (HSP; del inglés, hereditary spastic paraplegia) y ataxia cerebelar.

La invención proporciona también trametinib para utilizar en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson mediante la inducción de neuroregeneración a través de la diferenciación de células madre neurales en neuronas.

También se describe en el presente documento un compuesto que inhibe tanto MEK1 como MEK2 (denominado en el presente documento "inhibidor de MEK 1/2"), específicamente, el compuesto representado por la [Fórmula 1] puede inducir eficazmente la diferenciación de células madre neurales en neuronas; más específicamente, protege las células madre neurales y las neuronas contra la beta-amiloide al mismo tiempo que induce la diferenciación de las células madre neurales en neuronas.

[Fórmula 1]



Un aspecto descrito en el presente documento se refiere a la composición inductora de diferenciación de células madre neurales que comprende el compuesto de [Fórmula 1]. La composición no provoca el crecimiento canceroso en las células madre neurales.

La composición inductora de diferenciación de células madre neurales induce la diferenciación de células madre neurales en neuronas, incluso en presencia de beta amiloide.

La inducción de la diferenciación neuronal mediante la composición inductora de diferenciación de células madre neurales puede ser el resultado de la inhibición tanto de MEK1 como de MEK2.

La composición descrita en el presente documento puede incluir un inhibidor de MEK 1/2 específico distinto del compuesto de [Fórmula 1]. Esta composición induce la diferenciación de las células madre neurales en neuronas incluso en presencia de beta amiloide.

Otro aspecto descrito en el presente documento se refiere al método de diferenciación de células madre neurales en neuronas utilizando la composición inductora de diferenciación de células madre neurales.

El método de diferenciación puede consistir en tratar las células madre neurales con la composición inductora de diferenciación de células madre neurales y en permitir de 1 a 7 días para que se complete la diferenciación.

Otro aspecto descrito en el presente documento se refiere al compuesto de [Fórmula 1] para utilizar en la inducción de la diferenciación de células madre neurales, específicamente para utilizar en la protección de células madre neurales y de neuronas y la diferenciación de células madre neurales en neuronas incluso en presencia de amiloide. Todavía otro aspecto descrito en el presente documento se refiere a un inhibidor de MEK 1/2 específico para utilizar en la inducción de la diferenciación de células madre neurales, específicamente para utilizar en la protección de células madre neurales y de neuronas y la diferenciación de células madre neurales en neuronas incluso en presencia de amiloide.

Otro aspecto descrito en el presente documento se refiere a un kit para utilizar en la inducción de la diferenciación de células madre neurales en neuronas *in vitro*. Este kit puede incluir la composición inductora de diferenciación de células madre neurales, medio de cultivo, placas, soluciones de revestimiento y aditivos necesarios para cultivar células tales como factores de crecimiento, etc.

Otro aspecto descrito en el presente documento se refiere a un método para inducir la neuroregeneración que comprende administrar un inhibidor de MEK 1/2 específico a un paciente que lo necesita. El inhibidor de MEK 1/2 induce la neuroregeneración diferenciando células madre neurales en neuronas, protegiendo a las células madre neurales y a las neuronas contra la citotoxicidad de las beta amiloides o mediante los dos anteriores. El inhibidor de MEK 1/2 más preferible para este método es el compuesto de [Fórmula 1]. Un aspecto adicional descrito en el presente documento se refiere al inhibidor específico de MEK 1/2, específicamente el compuesto de [fórmula 1], para utilizar en la inducción de la neuroregeneración.

Otro aspecto descrito en el presente documento se refiere a un método para proteger las neuronas contra la pérdida o el daño neuronal administrando un inhibidor de MEK 1/2 específico a un paciente que lo necesita. El inhibidor de MEK 1/2 más preferible para este método es el compuesto de [Fórmula 1]. Un aspecto adicional descrito en el presente documento se refiere al inhibidor específico de MEK 1/2, específicamente el compuesto de [fórmula 1], para utilizar en la protección de neuronas contra la pérdida o el daño neuronal.

Otro aspecto descrito en el presente documento se refiere a una composición farmacéutica que comprende el compuesto de [Fórmula 1] como su principio activo para la prevención o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas o el método de prevención o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas utilizando el compuesto de [Fórmula 1].

La enfermedad neurodegenerativa pertenece a los trastornos funcionales en diversos sistemas como el control motor, cognición, percepción, función sensorial y sistema nervioso autónomo debido a la pérdida o disminución de la función neuronal. Entre los ejemplos de enfermedades neurodegenerativas se incluyen demencia, enfermedad de Alzheimer (EA), demencia vascular, demencia senil, demencia frontotemporal (DFT; en inglés, FTD), demencia con cuerpos de Lewy (DCL; en inglés, DLB), enfermedad de Parkinson (EP), atrofia multisistémica (AMS; en inglés, MSA), degeneración corticobasal (DCB; en inglés, CBD), parálisis supranuclear progresiva (PSP), la enfermedad de Huntington (EH; en inglés, HD), esclerosis lateral amiotrófica (ELA, enfermedad de Lou-Gehrig), esclerosis lateral primaria (ELP; en inglés, PLS), atrofia muscular espinal, parálisis bulbar progresiva (PBP), atrofia muscular progresiva (PMA), parálisis pseudobulbar, paraplejia espástica hereditaria (HSP), ataxia cerebelar, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ; en inglés, CJD), esclerosis múltiple (EM; en inglés, MS), Síndrome de Guillain-Barré (GBS; del inglés, Guillain-Barré syndrome), etc.

La composición farmacéutica o el método descritos en el presente documento puede incluir un inhibidor de MEK1/2 específico distinto del compuesto de [Fórmula 1].

Otro aspecto adicional descrito en el presente documento se refiere al compuesto de [Fórmula 1] para utilizar en la prevención y tratamiento de la enfermedad neurodegenerativa. Además, se refiere al inhibidor de MEK 1/2 específico para utilizar en la prevención y tratamiento de la enfermedad neurodegenerativa.

Otro aspecto descrito en el presente documento se refiere a un método de cribado para compuestos que inducen la diferenciación de células madre neurales en neuronas y las protegen en entornos simulados de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer. El método de cribado descrito en el presente documento comprende las etapas de:

1) tratamiento de células madre neurales aisladas de ratones adultos con sustancias que inducen daño neuronal tales como beta amiloide (específicamente en su forma oligomérica), MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), rotenona, oxidopamina, glutamato, LPS (lipopolisacárido), S100B (proteína B de unión a calcio S100);

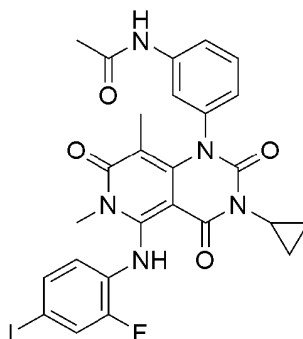
2) añadir un material de prueba a las células madre neurales tratadas con las sustancias inductoras de daño neuronal anteriores; y

3) examinar la diferenciación o muerte de las células madre neurales mediante análisis morfológico.

En lo sucesivo, diversos aspectos de la presente divulgación se describirán en detalle.

- 5 Como se usa en el presente documento, "células madre neurales" se refiere a tener la capacidad de proliferar continuamente en el estado indiferenciado (autorrenovación) y la capacidad de diferenciarse en varias neuronas y glía de una célula madre (multipotencia). La célula madre neural es de origen animal. El término animal no solo se refiere a humanos y primates, sino que pretende incluir animales como vacas, cerdos, ovejas, caballos, ratones, ratas, gatos, etc. y preferentemente, seres humanos. En unos casos, el término "célula madre neural" se usa para incluir "célula progenitora neural".
- 10 Como se usa en el presente documento, el término "diferenciación" se refiere al desarrollo de una célula en una célula especializada. Más específicamente, se refiere al fenómeno en el que la estructura o función de la célula se especializa a través de la división celular, proliferación y crecimiento de la célula y a los cambios en la estructura (morfología) o función de las células y tejidos con el fin de realizar las tareas que se les asignen. La diferenciación de las células madre neurales está precedida por la división asimétrica de la célula madre en dos células que tienen propiedades diferentes. Una de las células hijas es igual que la célula madre, quedando como la célula madre y la otra se diferencia en una célula especializada. El hecho de que este tipo de proceso de división asimétrica acompañe a la diferenciación de células madre neurales significa que la "diferenciación de células madre neurales" abarca el significado de "proliferación".
- 15 Como se usa en el presente documento, el término "proliferación" se refiere al fenómeno en el que una célula se divide y prolifera. Esto se refiere específicamente al aumento en el mismo tipo de células a través de la división celular, al aumento en el número de células a través de la reproducción de exactamente la misma forma de células.
- 20 Como se usa en el presente documento, el término "protección" se refiere a evitar que las células resulten dañadas por estímulos externos dañinos para que las células madre neurales puedan proliferar o diferenciarse sin sufrir la muerte celular y las neuronas diferenciadas puedan sobrevivir en presencia de factores citotóxicos, específicamente, beta amiloide. En conexión con la EA, el término "protección" incluye el aspecto de que las células madre neurales y las neuronas están protegidas contra el daño causado por la beta amiloide a través de la disminución de la relación A $\beta$  (1-42)/A $\beta$ (1-40) en el cerebro (Majid *et al.* (2015) Pharmacologic Treatment with Histone Deacetylase 6 Inhibitor (ACY-738) Recovers Alzheimer's Disease Phenotype in Amyloid Precursor Protein/Presenilin 1 (APP/PS1) Mice. *Alzheimers Dement.* 170-181; Borchelt *et al.* (1996) Familial Alzheimer's Disease-Linked Presenilin 1 Variants Elevate A $\beta$ 1-42/1-40 Ratio *In Vitro* and *In Vivo*. *Neuron.* 17:1005-1013).
- 25 Como se usa en el presente documento, el término "prevención" se refiere a todas las actividades de supresión de una enfermedad arterial periférica o de retraso del progreso de una enfermedad arterial periférica mediante la administración de la composición descrita en el presente documento. "Tratamiento" se refiere a todas las actividades que alivian los síntomas o mejoran el estado de la enfermedad en pacientes neurodegenerativos sospechosos o diagnosticados.
- 30 Un aspecto descrito en el presente documento se refiere a la composición inductora de diferenciación de células madre neurales que comprende el compuesto representado como [Fórmula 1].
- 35
- 40

[Fórmula 1]



- 45 El nombre común del compuesto representado anteriormente como [Fórmula 1] es trametinib y su denominación química es N-(3-(3-ciclopropil-5-[(2-fluoro-4-yodofenil)amino]-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidropirido[4,3-d]pirimidin-1(2H)-il)fenil)acetamida. Se describe en el Ejemplo 4-1 del documento WO2005/121142, cuyo solicitante es Japan Tobacco Inc. El compuesto de [Fórmula 1] inhibe tanto MEK1 como MEK2, los componentes aguas arriba de ERK en la ruta de transducción de señales MAPK/ERK (proteína quinasa activada por mitógeno/quinasa regulada extracelular). Este compuesto se utiliza como fármaco contra el cáncer para el melanoma y el cáncer de células no pequeñas. Como se describe en el presente documento, se utiliza en forma de una base libre o una sal o solvato
- 50

farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de solvatos posibles son hidratos, dimetilsulfóxido, ácido acético, etanol, nitrometano, clorobenceno, 1-pentanol, alcohol isopropílico, etilenglicol, 3-metil-1-butanol, etc.

5 En particular, un aspecto descrito en el presente documento se refiere a una composición que comprende el compuesto de [Fórmula 1], que protege tanto las células madre neurales como las neuronas y diferencia las células madre neurales en neuronas. La beta amiloide se acumula en el cerebro como placas amiloides, se asocia con daño sináptico, daño neuronal y atrofia cerebral y se sabe que finalmente causa los síntomas típicos de la enfermedad de Alzheimer, la memoria y la disfunción cognitiva. Por tanto, proteger las células madre neurales y las neuronas contra la beta amiloide al tiempo que se regeneran las neuronas mediante la diferenciación de las células madre neurales endógenas puede constituir un tratamiento fundamental para la enfermedad de Alzheimer.

15 Aβ(1-42) que consta de 42 aminoácidos tiene una mayor tendencia a formar agregados que Aβ(1-40) y una mayor tendencia a formar trímeros o tetrámeros más tóxicos y por tanto, se considera que está fuertemente asociado con el estado patológico de la enfermedad de Alzheimer. Por tanto, es preferible la composición que puede proteger y diferenciar las células madre neurales incluso en presencia de Aβ(1-42), especialmente oligómeros Aβ(1-42).

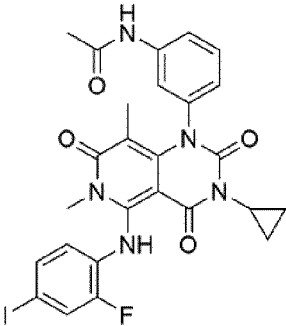
20 Como se muestra en los ejemplos de prueba, con el fin de encontrar una composición que induzca la diferenciación de células madre neurales de ratón en neuronas, los inventores han confirmado que el compuesto de [Fórmula 1] es muy eficaz para inducir la diferenciación de células madre neurales aisladas de cerebro embrionario o adulto de ratón en neuronas.

25 Las células madre neurales tienen la capacidad de diferenciarse en diversas neuronas o en glía, tales como oligodendrocitos, astrocitos y microglía. El compuesto de [Fórmula 1] diferencia las células madre neurales principalmente en neuronas y limita la diferenciación en glía. Por tanto, el compuesto de [Fórmula 1] puede inducir eficazmente la generación de neuronas (neurogénesis), permitiendo de este modo el reemplazo de neuronas dañadas por estas "nuevas" neuronas en el cerebro de pacientes con enfermedades neurodegenerativas con daño neuronal y puede utilizarse usarse como un fármaco que promueve la regeneración neural o neurorregeneración.

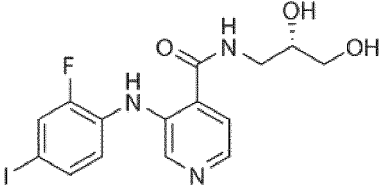
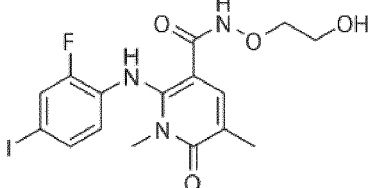
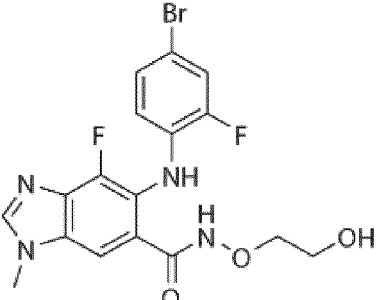
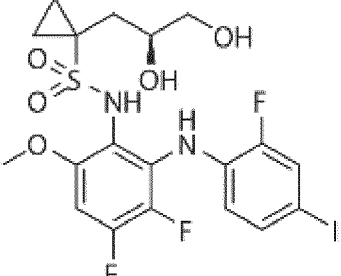
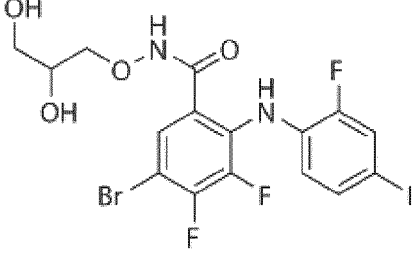
30 De acuerdo con los ejemplos específicos descritos en el presente documento, se ha establecido mediante experimentos *in vitro* tratados con Aβ oligomérica que simulan el entorno cerebral de pacientes con Alzheimer que el compuesto de [Fórmula 1] protege contra la muerte de células madre neurales o neuronas e induce la diferenciación de células madre neurales en neuronas (Fig. 2)

35 Adicionalmente, un aspecto descrito en el presente documento se refiere a la composición inductora de diferenciación de células madre neurales que comprende el compuesto específico que inhibe tanto MEK1 como MEK2. El compuesto descrito en el presente documento que inhibe tanto MEK1 como MEK2 también se denomina "inhibidor de MEK 1/2". El "inhibidor de MEK 1/2" tiene preferentemente un valor de CI50 en el nivel nM y una diferencia de menos de 10x en los valores de CI50 de MEK1 y MEK2, preferentemente menos de 5x. La CI50 para MEK1 y 2 se puede medir mediante métodos en referencias tales como [Yamaguchi *et al.* (2011) Revista Internacional de Oncología 39:23-31]. El inhibidor de MEK 1/2 que se puede utilizar es un compuesto que induce la diferenciación de las células madre neurales en neuronas al tiempo que protege las células madre neurales y las neuronas contra materiales tóxicos tales como Aβ. Los ejemplos de inhibidores de la MEK 1/2 que se pueden usar son los siguientes: trametinib, pimasertib (AS703026), AZD8330, binimetinib (MEK162, ARRY-162, ARRY-438162), refametinib (RDEA119, Bay 86-9766), PD318088, PD0325901, RO5126766.

45 La estructura química de los inhibidores de MEK 1/2 preferidos y sus valores IC50 y las referencias que describen los métodos de medición de los valores IC50 se enumeran a continuación:

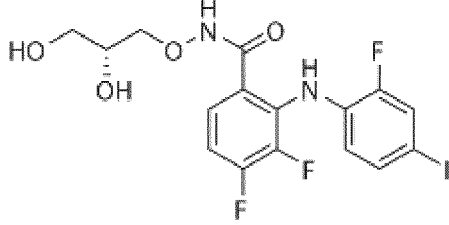
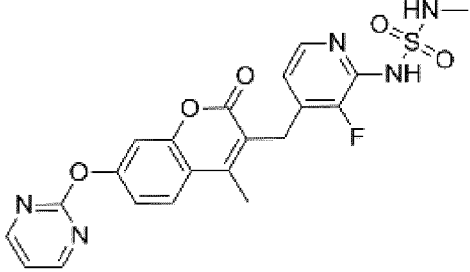
Nombre	Estructura química	MEK2 (Referencias para el método de medición de los valores de CI50)
Trametinib		0,92 ~ 3,4 nM (International Journal of Oncology 2011;39:23-31)

(continuación)

Nombre	Estructura química	MEK2 (Referencias para el método de medición de los valores de CI50)
Pimasertib (AS703026)		<p>≤ 1 μM (Documento US 2009/0093462, Tabla I, Ejemplo 115)</p>
AZD8330		<p>7 nM (AACR Annual Meeting, 2009, Abst 3696)</p>
Binimetinib (ARRY-162, ARRY-438162)		<p>12 nM (American College of Rheumatology, 2006 Annual Scientific Meeting, Abst 794)</p>
Refametinib (RDEA119, Bay 86-9766)		<p>MEK1: 19 nM, MEK2: 47 nM (Cancer Res. 2009;69(17): 6839-47)</p>
PD318088		<p>1,4 nM (Documento WO 02/06213, Ejemplo 40)</p>



(continuación)

Nombre	Estructura química	MEK2 (Referencias para el método de medición de los valores de CI50)
PD0325901		3,6 ~ 24 nM (Oncotarget 2012;3: 1533-1545)
RO5126766 (CH5126766)		160 nM (Cancer Res. 2013;73(13): 4050-4060)

Además, un aspecto descrito en el presente documento se refiere a una composición que comprende un inhibidor de MEK 1/2 para diferenciar las células madre neurales en neuronas al tiempo que protege las células madre neurales y las neuronas contra la beta amiloide, especialmente la forma A $\beta$ (1-42) oligomérica.

5

El uso de un inhibidor selectivo para MEK1 o MEK2, no el inhibidor de MEK 1/2 que inhibe tanto MEK1 como MEK2, no es deseable, dado que su actividad inductora de diferenciación de células madre neurales es débil. Por ejemplo, cobimetinib es un inhibidor selectivo de MEK1 que muestra una selectividad 100x o mayor hacia MEK1 en comparación con MEK2 (CI50 de MEK1= 0,95 nM, CI50 de MEK2 =199 nM; Molecules 2017;22:1551). A diferencia del inhibidor de MEK 1/2, cobimetinib no induce la diferenciación de células madre neurales adultas de ratón incluso a una alta concentración de 10  $\mu$ M, independientemente de si se trataron o no con beta amiloide (Ejemplo 7).

10

Además, el hecho de que la inhibición tanto de MEK1 como de MEK2 esté implicada en la inducción de la diferenciación de CMN en neuronas y en la protección de CMN y neuronas se confirmó mediante experimentos en el Ejemplo 5. Estos experimentos utilizaron ARNhc (ARN corto en horquilla) para inhibir la expresión de MEK1 y MEK2 y utilizaron plásmidos con MEK1 constitutivamente activa (CAMEK1) y MEK2 constitutivamente activa (CAMEK2) para activar la expresión de MEK1 y MEK2 (Ejemplo 5).

15

Sin embargo, no todos los inhibidores de MEK 1/2 muestran el mismo efecto. Por ejemplo, los inhibidores de MEK 1/2 U0126, PD184352 y BI847325 mostraron efectos inductores de diferenciación de células madre neurales (CMN) débiles a neuronas o causaron citotoxicidad, haciéndoles inadecuados para utilizar como la composición inductora de diferenciación de células madre neurales como se describe en el presente documento (Fig. 10a y Fig. 10c). Por tanto, la actividad inductora de diferenciación de CMN a neuronas o la actividad de protección de CMN y de neuronas pueden diferir dependiendo de las propiedades únicas diferentes que tiene el compuesto además de su actividad inhibitoria de MEK 1/2. Los inhibidores de MEK 1/2 descritos en el presente documento, que mostraron actividad inductora de diferenciación de CMN a neuronas o actividad de protección de CMN y neuronas son trametinib, pimaseritib (AS703026), AZD8330, binimetinib, refametinib, PD318088, PD0325901 y RO5126766.

20

25

En particular, el compuesto de [Fórmula 1] (trametinib) mostró una diferenciación y protección marcadamente superiores contra las capacidades de A $\beta$  incluso cuando se comparó con los otros inhibidores de MEK1/2. Por ejemplo, el compuesto de [Fórmula 1] mostró capacidades de diferenciación y protección contra A $\beta$  notablemente superiores en comparación con AS703026 a una concentración inferior 100x o más. Este efecto del compuesto de [Fórmula 1] es notablemente superior al mero efecto predicho de su actividad inhibitoria de MEK1/2.

30

El compuesto de [Fórmula 1] nunca se ha utilizado con el propósito de inducir la diferenciación de células madre neurales en neuronas y solo se ha conocido como un inhibidor de MEK 1/2 que inhibe las actividades de MEK1 y MEK2 a través de la unión no competitiva de ATP y como fármacos para el tratamiento del melanoma y el cáncer de células no pequeñas.

35

Otro aspecto descrito en el presente documento se refiere al método de inducir la diferenciación de CMN en neuronas utilizando el compuesto de [Fórmula 1] u otros inhibidores de MEK1/2.

40

En cuanto al método descrito en el presente documento, las células madre neurales pueden aislarse del cerebro embrionario o adulto de acuerdo con métodos conocidos. Como alternativa, las células madre neurales se pueden adquirir en el mercado o se pueden cultivar mediante cualquier método convencional conocido en la técnica. No hay ninguna restricción particular en cuanto a lo anterior. En la sección de Ejemplos que sigue, se utilizaron células madre neurales aisladas de los lóbulos frontales de embriones de ratón del día 14,5 y la zona subventricular de los ratones de la semana 8.

Antes de la diferenciación, las células madre neurales pueden inocularse en un medio de cultivo y cultivarse a 37 °C. El medio de cultivo puede ser cualquier medio sin suero suplementado con factor de crecimiento sin restricciones particulares. El medio puede ser, por ejemplo, medio de Eagle modificado de Dulbecco/mezcla de nutrientes F12 (DMEM/F12) (1:1) con la adición de uno o más componentes de medios seleccionados del grupo que consiste en putrescina 90-110 µM, selenita 20-40 nM, progesterona 10-30 nM, d-(+) glucosa 1,0-2,0 mg/ml, insulina 20-30 µg/ml, apo transferrina 0,05-0,2 mg/ml, Glutamax 0,3-0,6 mM, penicilina 50-150 UI/ml y estreptomicina 50-150 µg/ml y con la adición adicional de factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en bFGF 10-30 ng/ml, EGF 10-30 ng/ml o mezclas de los mismos.

Las células madre neurales se pueden cultivar en medio N2 suplementado con factor de crecimiento [medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM/F12 (1:1) suplementado con putrescina 100 µM, selenita 30 nM, progesterona 20 nM, d-(+) - glucosa 1,55 mg/ml, insulina 25 µg/ml, apo transferrina 0,1 mg/ml, Glutamax 0,5 mM, penicilina 100 UI/ml y estreptomicina 100 µg/ml)] para obtener células madre neurales indiferenciadas.

La diferenciación de células madre neurales cultivadas en neuronas implica el tratamiento de células madre neurales con la composición inductora de diferenciación que comprende el compuesto de [Fórmula 1] y a continuación, permitiendo la diferenciación según un método conocido en la técnica. Por ejemplo, la composición inductora de diferenciación de células madre neurales descrita en el presente documento se añade al medio que contiene las células madre neurales cultivadas y la diferenciación se induce a 37 °C.

Las células madre neurales se diferencian en neuronas a través de un proceso de diferenciación en las diversas condiciones de cultivo mencionadas anteriormente (por ejemplo, los contenidos y la cantidad de los componentes del medio y el período de cultivo). Las condiciones de cultivo no se limitan concretamente a las condiciones mencionadas anteriormente. Preferentemente, Preferiblemente, la temperatura de cultivo es de 35 °C a 40 °C, a la cual se puede inducir la diferenciación de las células madre neurales. Si la temperatura del cultivo es inferior a 35 °C o supera los 40 °C, las células madre neurales sufren la muerte celular antes de diferenciarse en neuronas.

Antes de añadir la composición inductora de diferenciación de células madre neurales que comprende el compuesto de [Fórmula 1], es preferible asegurar una concentración suficiente de células en el cultivo de células madre neurales. Además, para observar cambios en el cultivo, tales como la proliferación, diferenciación o muerte celular, es preferible tratar las células madre neurales con la composición inductora de diferenciación de células madre neurales que comprende el compuesto de [Fórmula 1] mediante el método descrito anteriormente dentro de un período de cultivo de 7 días o menos. Para este fin, el período de cultivo de las células madre neurales es preferentemente de al menos 1 día a un máximo de 7 días para asegurar una concentración suficiente de células.

En cuanto a la concentración del compuesto de [Fórmula 1], es preferible añadirlo a las células madre neurales a una concentración de 1 nM a 20 µM. Si la concentración es inferior a 1 nM, la capacidad inductora de diferenciación de células madre neurales se reduce, si es mayor de 20 µM, la citotoxicidad celular se convierte en un problema. Para la adición del compuesto, normalmente se siembran células madre neurales en los pocillos de la placa para cubrir hasta el 70-80 % de la superficie del pocillo. Por ejemplo, se siembran  $1 \times 10^5$  células/pocillo en placas de 12 pocillos,  $5 \times 10^5$  células/pocillo para placas de 6 pocillos.

Adicionalmente, como se explicará más adelante en la sección de Ejemplos, es preferible utilizar el compuesto de [Fórmula 1] a una concentración de 10 nM a 10 µM, más preferentemente, 10 nM a 100 nM. Si la concentración es inferior a 10 nM, aumenta el tiempo que lleva inducirla diferenciación, lo que no es económico. Sin embargo, si es mayor de 10 µM, el compuesto de [Fórmula 1] como principio activo se convierte en exceso y tras la administración *in vivo* posterior, la inhibición de MEK1 y MEK2 puede volverse demasiado fuerte, puede afectar muchas rutas de señalización intracelular y como resultado, puede inducir muchas reacciones no deseadas.

Después de la adición de la composición inductora de diferenciación de células madre neurales que comprende el compuesto de [Fórmula 1] que es un inhibidor tanto de MEK1 como de MEK2 al cultivo de células madre neurales, se necesitan de 1 a 7 días, preferentemente aproximadamente 3 a 5 días, para que se complete el proceso de diferenciación.

### Efectos ventajosos

Cuando la composición inductora de diferenciación de células madre neurales descrita en este documento se aplica a pacientes con enfermedad neurodegenerativa, induce a las células madre neurales en el cerebro del paciente a

diferenciarse en neuronas y permite la sustitución de neuronas dañadas o perdidas por neuronas "recién hechas". Es decir, la composición descrita en el presente documento induce la regeneración neural o la neuroregeneración a través de la neurogénesis a partir de células madre neurales. Por tanto, la composición se puede utilizar para la prevención o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. "Neurogénesis" significa la generación de neuronas a partir de células madre neurales y "regeneración neural" o "neuroregeneración" significa la regeneración organizativa y funcional del sistema nervioso que se degeneró debido a la muerte de las células neuronales a través de la neurogénesis. Además, la composición descrita en el presente documento puede ejercer un efecto de tratamiento o prevención protegiendo las células madre neurales o las neuronas contra los oligómeros de beta amiloide.

Adicionalmente, las aplicaciones descritas en el presente documento se pueden utilizar ampliamente como materiales para el examen de los efectos de los fármacos o para numerosos estudios en el desarrollo de nuevos fármacos para enfermedades neurodegenerativas.

### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es el análisis morfológico del Ejemplo 1 en el que se observa la diferenciación de células madre neurales embrionarias de ratón en neuronas cuando se tratan con diversas concentraciones de trametinib y pimasertib (AS703026) mediante microscopía de contraste de fase. UD y D son células madre neurales embrionarias de ratón indiferenciadas obtenidas de la Etapa 1A del Ejemplo 1 y células madre neurales embrionarias de ratón diferenciadas obtenidas de la Etapa 1B, respectivamente, que no están tratadas con ningún material de prueba.

La Fig. 2 es el análisis de morfología del Ejemplo 2, donde la fila inferior muestra el resultado de células madre neurales adultas de ratón tratadas con beta amiloide oligomérica 10  $\mu\text{M}$  ( $\text{A}\beta_{1-42}$ ) y la fila superior muestra células madre neurales no tratadas con beta amiloide. UD y D son células madre neurales adultas de ratón indiferenciadas obtenidas de la Etapa 1A del Ejemplo 2 y células madre neurales adultas de ratón diferenciadas obtenidas de la Etapa 1B, respectivamente, que no están tratadas con ningún material de prueba. Trametinib (10 nM), trametinib (100 nM), memantina (5  $\mu\text{M}$ ), memantina (10  $\mu\text{M}$ ) y AS703026 (10  $\mu\text{M}$ ) son los resultados obtenidos cuando se trataron las células madre neurales adultas de ratón indiferenciadas obtenidas del Ejemplo 2, Etapa 1A con los respectivos materiales de prueba en las respectivas concentraciones.

La Fig. 3 es la comparación del análisis de la morfología celular de células madre neurales embrionarias de ratón de 14,5 días que se tratan (fila inferior) o no (fila superior) con beta amiloide oligomérica 10  $\mu\text{M}$  de acuerdo con el Ejemplo comparativo 1. UD (indiferenciadas) y D (diferenciadas) son células madre neurales embrionarias de ratón indiferenciadas y diferenciadas obtenidas de la Etapa 1 del Ejemplo Comparativo 1, respectivamente, que no están tratadas con ningún material de prueba. trametinib (100 nM), memantina (10  $\mu\text{M}$ ) y AS703026 (10  $\mu\text{M}$ ) son los resultados obtenidos cuando se trataron las células madre neurales adultas de ratón indiferenciadas obtenidas de la Etapa 1 del Ejemplo Comparativo 1 con los respectivos materiales de prueba a las respectivas concentraciones.

La Fig. 4 son las imágenes de microscopía fluorescente del Ejemplo 3. En la primera fila, UD y D son células madre neurales embrionarias indiferenciadas y diferenciadas, respectivamente, no tratadas con ningún material de prueba. La segunda y tercera filas son imágenes de células tratadas con las concentraciones respectivas de trametinib y AS703026. Los puntos azules representan núcleos celulares teñidos con DAPI y las células con ramas delgadas alargadas rojas representan neuronas teñidas con Tuj1 acoplado a rodamina.

La Fig. 5 muestra el resultado del Ejemplo 4-1 que muestra los niveles de expresión relativa de ARNm del marcador específico neuronal Tuj1 (Fig. 5a) y el marcador neuronal dopaminérgico TH (Fig. 5b) en células madre neurales embrionarias de ratón tratadas con diferentes concentraciones de trametinib y AS703026.

La Fig. 6 es parte del resultado del Ejemplo 4-2 que muestra los niveles de expresión relativa de ARNm del marcador neuronal dopaminérgico TH (Fig. 6a), el marcador neuronal colinérgico ChAT (Fig. 6b), el marcador de neuronas motoras Isl1 (Fig. 6c) y el marcador neuronal GABAérgico Gad1 (Fig. 6d) en células madre neurales embrionarias de ratón tratadas con diversas concentraciones de trametinib.

La Fig. 7 es parte del resultado del Ejemplo 4-2 que muestra los niveles de expresión relativa de ARNm del marcador neuronal Tuj1 (Fig. 7a), el marcador neuronal colinérgico ChAT (Fig. 7b) y el marcador neuronal dopaminérgico TH (Fig. 7c) en células madre neurales adultas de ratón tratadas con trametinib 10 nM (Tra) y AS703026 10  $\mu\text{M}$  (AS).

La Fig. 8a es el resultado del Ejemplo 5-1 que confirma la presencia o ausencia de expresión del marcador neuronal dopaminérgico TH mediante RT-PCR con el fin de analizar la capacidad de las células madre neurales embrionarias de ratón, donde la expresión de MEK1 o de tanto MEK1 como MEK2 está inhibida, para diferenciarse en neuronas.

La Fig. 8b es parte del resultado del Ejemplo 5-1 que muestra los niveles de expresión relativa de ARNm de Tuj1 y TH en células madre neurales embrionarias de ratón donde la expresión de MEK1 o MEK2 o tanto de MEK1 como de MEK2 se inhibe mediante MEK1hc y MEK2hc y confirma la presencia o ausencia de las proteínas Tuj1 y

TH a través de transferencia Western.

La Fig. 8c es parte del resultado del Ejemplo 5-2 que muestra los niveles de expresión relativa de ARNm de Tuj1 y TH en células madre neurales embrionarias de ratón donde la expresión de MEK1 o MEK2 o de MEK1 y MEK2 se activan mediante CAMEK1 y CAMEK2 y confirma la presencia o ausencia de las proteínas Tuj1 y TH a través de transferencia Western.

La Fig. 9 es el resultado del Ejemplo 5-3 que muestra las observaciones de la morfología celular como se observa mediante microscopía de contraste de fases (Fig. 9a) y el análisis de los niveles de expresión relativa de ARNm del marcador neuronal Tuj1 (Fig. 9b) en células madre neurales adultas de ratón tratadas o no tratadas con A $\beta$  donde la expresión de MEK1 o MEK2 o tanto de MEK1 como de MEK2 se inhibe por MEK1hc y MEK2hc.

La Fig. 10 es el resultado del Ejemplo 6 que muestra las observaciones de la morfología celular como se observa mediante microscopía de contraste de fases (Fig. 10a) y el nivel relativo de expresión de ARNm de Tuj1 (Fig. 10b) en células madre neurales embrionarias de ratón tratadas con los inhibidores de MEK1/2 trametinib, AZD8330, PD184352, refametinib, PD318088, binimetinib y AS703026 en concentraciones de 0,1  $\mu$ M, 1,0  $\mu$ M y 10  $\mu$ M. La Fig. 10c son las observaciones de microscopía de contraste de fases de células madre neurales adultas de ratón tratadas con PD0325901, RO5126766, BI847325 y U0126 (Fig. 10c).

La Fig. 11 es el resultado del Ejemplo 7 que muestra observaciones de morfología celular como se observa mediante microscopía de contraste de fases de células madre neurales adultas de ratón tratadas o no tratadas con A $\beta$  que a continuación, se sometieron a tratamiento con los inhibidores de MEK1/2 trametinib (0,1  $\mu$ M), AS703026 (10  $\mu$ M), AZD8330 (1  $\mu$ M), PD318088 (1  $\mu$ M), binimetinib (10  $\mu$ M), refametinib (1  $\mu$ M), PD0325901 (10  $\mu$ M), RO5126766 (10  $\mu$ M) y cobimetinib (10  $\mu$ M) que se conoce por ser un inhibidor selectivo de MEK1 en comparación con MEK2. Las filas marcadas con "-" son células no tratadas con beta amiloide y las marcadas con "A $\beta$ <sub>1-42</sub>" son células tratadas con beta amiloide 10  $\mu$ M.

La Fig. 12 es parte del resultado del Ejemplo 8 que muestra la tinción inmunohistoquímica de NeuN en cortes en el córtex somatosensorial de ratones 5XFAD a los que se les administró trametinib (Fig. 12a). La Fig. 12b muestra la relación cuantificada del número de células de células teñidas con NeuN en ratones a los que se administró trametinib en comparación con los controles a los que solo se les administraron vehículos (Fig. 12b).

La Fig. 13 es parte del resultado del Ejemplo 8 que muestra la tinción inmunohistoquímica de NeuN en cortes en el córtex motor de ratones 5XFAD a los que se administró trametinib (Fig. 13a). La Fig. 13b muestra la relación cuantificada del número de células de células teñidas con NeuN en ratones a los que se administró trametinib en comparación con los controles a los que solo se les administraron vehículos (Fig. 13b).

La Fig. 14 es parte del resultado del Ejemplo 8 que muestra la tinción inmunohistoquímica de NeuN en cortes del subículo hipocampal de ratones 5XFAD a los que se administró trametinib (Fig. 14a). La Fig. 14b muestra la relación cuantificada del número de células de células teñidas con NeuN en ratones a los que se administró trametinib en comparación con los controles a los que solo se les administraron vehículos (Fig. 14b).

La Fig. 15 es el resultado del Ejemplo 9-1 que muestra la tinción inmunohistoquímica de Tuj1 en cortes del córtex somatosensorial de ratones 5XFAD a los que se administró trametinib. En las imágenes, las partes marcadas con flechas ( $\rightarrow$ ) indican células teñidas con Tuj1 y las partes marcadas con puntas de flecha ( $\blacktriangledown$ ) indican placas formadas por agregación de beta amiloide.

La Fig. 16 es el resultado de los Ejemplos 9-2 y 9-3 que muestran tinción de Nissl, NeuN, Dcxy BrdU en cortes del giro dentado hipocampal de ratones 5XFAD a los que se administró trametinib (Fig. 16a) y la cuantificación de células marcadas con BrdU (Fig. 16b). En la Fig. 16a, las partes marcadas con flechas ( $\rightarrow$ ) indican células teñidas con Dcx y las partes marcadas con puntas de flecha ( $\blacktriangledown$ ) indican células marcadas con BrdU.

La Fig. 17 es el resultado del Ejemplo 10 que muestra la tinción de TUNEL (marcaje del extremo de corte de dUTP mediado por la desoxinucleotidil transferasa terminal; del inglés, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), un indicador de apoptosis, en cortes del subículo hipocampal y el córtex somatosensorial de ratones 5XFAD a los que se administró trametinib. Las células en el subículo hipocampal que han sufrido apoptosis y muestran fluorescencia verde se indican con flechas ( $\rightarrow$ ).

La Fig. 18 es el resultado del Ejemplo 11 que muestra células de Purkinje a través de la tinción de Tuj1 y de calbindina en cortes del cerebelo de ratones 5XFAD a los que se administró trametinib. Se muestran dos (tinción de Tuj1) o tres (tinción de calbindina) diapositivas de cada grupo.

La Fig. 19 es el resultado del Ejemplo 12 que confirma la presencia o ausencia de la proteína pERK mediante transferencia Western utilizando los hemisferios cerebrales de ratones 5XFAD a los que se les administró trametinib (Fig. 19a); La Fig. 19b es la cuantificación de los niveles de proteína pERK (Fig. 19b).

La Fig. 20 es el resultado del Ejemplo 13 que muestra la cuantificación de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 y la relación (A $\beta$ 42/A $\beta$ 40) mediante ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas; del inglés, Enzyme-linked immunosorbent assay) utilizando los hemisferios cerebrales de ratones 5xFAD a los que se les administró trametinib.

- 5 Las marcas de asterisco (\*) en los gráficos de las Figuras indican lo siguiente a través de los resultados estadísticos de la prueba t: \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,005$ .

### Mejor forma de realización

10 Cuando se trataron células madre neurales con el compuesto de [Fórmula 1] descrito en el presente documento, hubo un nivel de expresión aumentado en el marcador neuronal Tuj1, así como unos niveles de expresión aumentados en todos los siguientes: el marcador de neuronas dopaminérgicas TH, el marcador de neuronas GABAérgicas Gad1, el  
 15 marcador de neuronas motoras Isl1 y el marcador de neuronas colinérgicas ChAT (Ejemplo 4). Esto significa que el compuesto de [Fórmula 1] puede diferenciar las células madre neurales en diversos tipos de neuronas tales como neuronas dopaminérgicas, neuronas GABAérgicas, neuronas colinérgicas y neuronas motoras. Por consiguiente, el  
 20 compuesto de [Fórmula 1] puede usarse en el tratamiento de diversas enfermedades neurodegenerativas que están causadas por diversas pérdidas o daños neuronales. Por ejemplo, la enfermedad de Parkinson se asocia habitualmente con la pérdida de neuronas dopaminérgicas, enfermedades de neuronas motoras tales como la enfermedad de Lou-Gehrig/ELA, parálisis bulbar progresiva (PBP), atrofia muscular progresiva (PMA), esclerosis lateral primaria (ELP), parálisis pseudobulbar (PBA; del inglés, pseudobulbar palsy) y paraplejia espástica hereditaria (HSP) se asocian con la pérdida de neuronas motoras y la demencia tal como la de Alzheimer, demencia vascular y demencia senil se asocian normalmente con la pérdida de neuronas colinérgicas. Además, la enfermedad de Huntington se asocia normalmente con la pérdida de neuronas espinosas medianas GABAérgicas en el cuerpo estriado del ganglio basal.

25 En particular, debido a que el compuesto de [Fórmula 1] permite la diferenciación de células madre neurales en neuronas al tiempo que las protege contra A $\beta$ , la principal característica neuropatológica de la enfermedad de Alzheimer, se puede aplicar de manera útil como tratamiento para la enfermedad de Alzheimer.

30 Los presentes inventores han confirmado que el compuesto de [Fórmula 1] aumentó el número de neuronas en las regiones del subículo y la capa 5 del córtex cerebral en el modelo de ratón con Alzheimer (5xFAD) que expresa los genes humanos de Alzheimer (Ejemplo 8). El ratón 5xFAD porta mutaciones genéticas para APP (proteína precursora de amiloide) y presenilina (PSEN1) que se sabe que causan la enfermedad de Alzheimer familiar humana y acumulan elevados niveles de depósito de amiloide en el subículo y la capa 5 del córtex cerebral con pérdida neuronal  
 35 concomitante en estas regiones. El hallazgo de que el compuesto de [Fórmula 1] aumentó el número de neuronas en el modelo de ratón 5xFAD apoya el hecho de que el compuesto de [Fórmula 1] induce la diferenciación de células madre neurales en neuronas *in vivo* para aumentar el número de neuronas y/o protege las neuronas contra la beta amiloide.

40 Además, el compuesto de [Fórmula 1] aumentó el número de neuronas en varias regiones del córtex cerebral en el ratón 5xFAD, especialmente el córtex motor y las regiones del córtex somatosensorial, cuando se comparó con los controles (Ejemplo 8, Figura 12, 13). Esto muestra que el compuesto de [Fórmula 1] se puede utilizar para el tratamiento de enfermedades de las neuronas motoras, tales como ELA, causada por la pérdida de neuronas en esa  
 45 región.

Además, el compuesto de [Fórmula 1] aumentó la arborización del axón o conservó la estructura del axón de las células de Purkinje en el cerebelo de ratón 5xFAD cuando se comparó con los controles (Ejemplo 11, Fig. 18). Esto muestra que el compuesto de [Fórmula 1] puede utilizarse para el tratamiento de la ataxia cerebelar causada por la pérdida o daño de las células de Purkinje del cerebelo.

50 El compuesto de [Fórmula 1] genera nuevas neuronas (neurogénesis), protege neuronas o hace ambas cosas y a través de esto, tiene el efecto de inducir la regeneración neural o neuroregeneración. Como se muestra en los resultados del Ejemplo 9, el compuesto de [Fórmula 1] aumentó la expresión del marcador neuronal Tuj1 (marcador de neuronas en el proceso de neurogénesis) en la región del córtex somatosensorial del ratón de modelo de Alzheimer (5xFAD), aumentó el número de células con forma de tipo 2 o tipo 3 (que aparecen específicamente durante la neurogénesis) en la zona subgranular (SGZ; del inglés, subgranular zone) del giro dentado (resultados de la tinción de Nissl y NeuN en la Fig. 16) y aumentó el número de células neuronales inmaduras que expresan DCX y células en división teñidas con BrdU (Fig. 16). Los resultados apoyan que trametinib induce la neurogénesis en el córtex cerebral y el giro dentado hipocampal del ratón.

60 Además, el compuesto de [Fórmula 1] disminuyó el número de células que mueren como se detectó mediante el ensayo de TUNEL en el ratón 5xFAD (Ejemplo 10, Fig. 17), aumentó la arborización del axón o conservó la estructura del axón de las células de Purkinje cerebelares (Ejemplo 11, Fig. 18) y disminuyó la relación de A $\beta$  (1-42)/A $\beta$ (1-40) en el tejido cerebral de ratón 5xFAD (Ejemplo 13, Fig. 20). Esto muestra que el compuesto de [Fórmula 1] puede  
 65 desempeñar un papel en la neuroregeneración protegiendo neuronas y mejorando su condición o actividad en un entorno donde se producen daños y pérdidas neuronales.

Por consiguiente, otro aspecto adicional descrito en el presente documento se refiere a la composición farmacéutica que comprende el compuesto de [Fórmula 1] como principio activo para la prevención y tratamiento de la enfermedad neurodegenerativa, al método de prevención y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas utilizando el compuesto de [Fórmula 1] y al compuesto de [Fórmula 1] para utilizar en la prevención y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. También se describen en el presente documento otros inhibidores de MEK1/2 que diferencian CMN en neuronas al tiempo que las protegen de sustancias tóxicas tales como A $\beta$ , pueden utilizarse en lugar del compuesto de [Fórmula 1], pero es particularmente preferible usar el compuesto de [Fórmula 1].

Como se ha mencionado anteriormente, la enfermedad neurodegenerativa significa la degeneración de la función mental y física causada por la pérdida gradual de la estructura y función de las neuronas. Específicamente, incluye trastornos seleccionados de demencia, enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, demencia senil, demencia frontotemporal, demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson, atrofia multisistémica, degeneración corticobasal, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Huntington, enfermedad de Lou-Gehrig/ELA, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular espinal, parálisis bulbar progresiva (PBP), atrofia muscular progresiva (PMA), parálisis pseudobulbar, paraplejia espástica hereditaria (HSP), ataxia cerebelar, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barre, etc.

En particular, debido a que el compuesto de [Fórmula 1] muestra un efecto inductor de diferenciación significativo y un efecto neuroprotector, incluso a concentraciones más bajas que las concentraciones anteriores utilizadas para su actividad anticancerosa, se puede administrar de forma segura en una dosis más baja que la utilizada para el tratamiento del cáncer. Cuando se utiliza el compuesto de [Fórmula 1] como fármaco contra el cáncer, la dosis recomendada es de 2 mg una vez al día y si se requiere una dosis menor debido a los efectos secundarios, la dosis se reduce a 1,5 mg una vez al día y a continuación, a 1 mg una vez al día. Se confirmó que el compuesto de [Fórmula 1] muestra actividad inductora de diferenciación de células madre neurales a una dosis tan baja como 0,1 mg/kg/día en experimentos con ratones 5xFAD. Cuando esta dosis se convierte para ajustarse a una persona de 60 kg, se traduce en 0,48 mg/día (Journal of Basic and Clinical Pharmacy, 7(2), 27-31,2016).

La expresión "que comprende como principio activo" indica que incluye suficiente del principio para suprimir la enfermedad neurodegenerativa descrita en el presente documento.

La composición preventiva o terapéutica descrita en el presente documento se puede producir en formulaciones comúnmente utilizadas en la técnica, por ejemplo, medicación oral o medicación parenteral tal como inyectables.

La composición farmacéutica descrita en el presente documento puede incluir vehículos, excipientes y diluyentes adecuados comúnmente utilizados en preparaciones farmacéuticas y puede formularse en forma de formulaciones orales tales como polvo, gránulos, comprimidos, cápsulas, suspensiones, emulsiones, jarabes, aerosoles, etc. o preparaciones tópicas, supositorios, parches y soluciones inyectables esterilizadas.

Los vehículos, excipientes y diluyentes que se pueden incluir en la composición descrita en el presente documento son lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma arábiga, alginato, gelatina, fosfato cálcico, silicato cálcico, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, croscarmelosa de sodio, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio, dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa de sodio, aceite mineral, etc.

Los diluyentes y excipientes comúnmente utilizados tales como rellenos, extensores, aglutinantes, agentes humectantes, desintegradores y tensioactivos se utilizan para formulaciones farmacéuticas. Las formulaciones sólidas para administración oral incluyen comprimidos, píldoras, polvo, gránulos, cápsulas, etc. La formulación sólida se prepara añadiendo al menos un excipiente tal como almidón, carbonato cálcico, sacarosa, lactosa o gelatina a la composición descrita en el presente documento. Además de los excipientes simples, se usan también lubricantes tales como estearato de magnesio y talco. Las formulaciones líquidas para la administración oral incluyen suspensión, líquidos para uso interno, emulsión, jarabes, etc. y además de los diluyentes simples comúnmente usados tales como agua y parafina líquida, incluyen diversos excipientes tales como agentes humectantes, edulcorantes, fragancias, conservantes, etc. Las formulaciones para administración parenteral pueden incluir soluciones acuosas estériles, soluciones no acuosas, suspensiones, emulsiones, formulaciones liofilizadas, supositorios y parches. Para soluciones y suspensiones no acuosas, se pueden utilizar propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como el aceite de oliva y ésteres inyectables como el oleato de etilo. Pueden utilizarse para la base del supositorio witepsol, macrogol, Tween 61, manteca de cacao, manteca láurica, glicogelatina, etc.

La composición descrita en el presente documento puede administrarse por vía oral o parenteral y puede ser una administración sistémica o tópica.

La dosis recomendada de la composición terapéutica descrita en el presente documento puede variar dependiendo de la condición del paciente, el peso del paciente, la gravedad de la enfermedad, forma de medicación, vía de administración, período de tratamiento, etc. y en consecuencia, puede determinarse por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la composición descrita en el presente documento se puede administrar diariamente en una dosis de

0,0001 a 10 g/kg, preferentemente de 0,001 a 8 mg/kg. La dosificación puede hacerse una vez al día o dividirse en varias veces al día. Preferentemente, el compuesto de [Fórmula 1] puede administrarse en una dosis diaria que varía de 0,1 mg a 10 mg, 0,1 mg a 5 mg, 0,1 mg a 2 mg, 0,1 mg a 1 mg, 0,1 mg a 0,5 mg, 0,25 mg a 2 mg, 0,25 mg a 1 mg, 0,25 mg a 0,5 mg, 0,5 mg a 2 mg, 0,5 mg a 1 mg. Por ejemplo, el compuesto de [Fórmula 1] puede administrarse en una dosis diaria de 0,1 mg, 0,125 mg, 0,25 mg, 0,5 mg, 0,75 mg, 1 mg, 1,5 mg o 2 mg.

En otro aspecto descrito en el presente documento, existe un método de cribado de materiales que inducen la diferenciación de células madre neurales en neuronas si bien al mismo tiempo protegen las CMN y las neuronas en entornos simulados de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. El método de detección utiliza sustancias que inducen daño neuronal tal como beta amiloide, MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), rotenona, oxidopamina, glutamato, LPS (lipopolisacárido) y S100B (proteína B de unión al calcio S100) y células madre neurales derivadas del ratón e incluye las etapas de:

- 1) tratamiento de células madre neurales aisladas de ratones adultos con sustancias que inducen daño neuronal tales como beta amiloide, específicamente en su forma oligomérica, MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), rotenona, oxidopamina, glutamato, LPS (lipopolisacárido) y S100B (proteína B de unión a calcio S100);
- 2) añadir un material de prueba a las células madre neurales tratadas con las sustancias inductoras de daño neuronal anteriores; y
- 3) examinar la diferenciación o muerte de las células madre neurales mediante análisis morfológico.

En el método de cribado, es preferible que las células madre neurales utilizadas procedan del ratón. La utilización de células madre neurales de animales tales como el ratón sobre células madre neurales humanas tiene las ventajas de métodos de cultivo celular más fáciles y de cuestiones éticas menos controvertidas. Los cultivos de células madre neurales humanas requieren un reemplazo frecuente de los medios de cultivo y factores de crecimiento caros, si bien los cultivos de células madre neurales de ratón no. Los cultivos de células madre neurales humanas requieren 7 días cada uno para el proceso de expansión y diferenciación celular, si bien cultivos de células madre neurales de ratón requieren 3-4 días para la expansión y solo un corto período de tiempo para la diferenciación, permitiendo una velocidad más rápida de cribado.

Las células madre neurales pueden aislarse del cerebro de un ratón adulto y cultivarse para su uso. Las células madre neurales adultas de ratón se aíslan de ratón de la semana 8 a la semana 12, por ejemplo, de la zona subventricular de ratón de la semana 8. Es común aislar células madre neurales de ratón de los lóbulos frontales de embriones de ratón que tienen entre 12 y 16 días de gestación. En comparación con las células madre neurales adultas de ratón, las células madre neurales embrionarias de ratón tienen una estaminalidad más fuerte, lo que las haría más propensas a resistir entornos tóxicos. Sin embargo, los presentes inventores observaron que cuando se trataron células madre neurales embrionarias de ratón con beta amiloide, sin importar si se añadió o no el material de prueba, todas las células murieron y no se pudo observar diferenciación neuronal (Ejemplo comparativo 1, Fig. 3). Por el contrario, las células madre neurales aisladas de cerebros adultos de ratones mostraron una tolerancia más fuerte a la beta amiloide y por tanto, se consideraron más adecuadas para el cribado del material inductor de diferenciación de células madre neurales en un entorno simulado de EA. Por tanto, los presentes inventores utilizan células madre neurales del ratón adulto para los métodos descritos en el presente documento.

Las células madre neurales aisladas de ratón adulto pueden inocularse en un medio de cultivo en el estado indiferenciado y cultivarse a 37 °C. El medio de cultivo para las células madre neurales puede ser cualquier medio sin suero complementado con factor decrecimiento, pero es preferentemente un medio IPM complementado con factor de crecimiento cuando se aíslan y cultivan por primera vez células madre neurales de ratones adultos y a continuación, medio N2 cuando se aíslan y cultivan células individuales después de la formación de neuroesferas. El medio IPM es un medio Neurobasal que puede incluir suplemento de B27 al 1-4 %, Glutamax 0,5-2 %, penicilina 100 UI/ml y estreptomycin 100 µg/ml. El medio N2 es un medio de Eagle modificado de Dulbecco/mezcla de nutrientes F12 (DMEM/F12) (1:1) que puede contener uno o más componentes de medios seleccionados del grupo que consiste en putrescina 90-110 µM, selenita 20-40 nM, progesterona 10-30 nM, d-(+)-glucosa 1,0-2,0 mg/ml, insulina 20-30 µg/ml, apo transferrina 0,05-0,2 mg/ml, Glutamax 0,3-0,6 mM, penicilina 50-150 UI/ml y estreptomycin 50-150 µg/ml. El medio N2 puede complementarse con factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en bFGF 10-30 ng/ml, EGF 10-30 ng/ml y mezclas de los mismos. Los factores de crecimiento juegan un papel en el mantenimiento de las células madre neurales en el estado indiferenciado. Con el fin de determinar con precisión la actividad del material de prueba para inducir la diferenciación de células madre neurales, el material de prueba debe añadirse a las células madre neurales mantenidas en el estado indiferenciado mediante factores de crecimiento que suprimen la diferenciación.

En el método de cribado descrito en el presente documento, puede utilizarse beta amiloide comercial, la que está disponible en Gibco (Waltham, Massachusetts), por ejemplo. Es preferible utilizar beta amiloide de origen humano. Las formas más comunes de beta-amiloide son Aβ(1-40) que consiste en 40 aminoácidos y Aβ(1-42) que consiste en 42 aminoácidos. De las dos, Aβ(1-42) tiene una tendencia más fuerte a formar agregados, especialmente los trímeros y tetrámeros altamente tóxicos y por tanto se considera que está más altamente correlacionada con el estado patológico de la enfermedad de Alzheimer (Dahlgren *et al.* (2002) Oligomeric and Fibrillar Species of Amyloid-β

Peptides Differentially Affect Neuronal Viability, *J. Biol. Chem.* 277(35):32046-32053; K. Murakami (2014) Conformation-Specific Antibodies to Target Amyloid- $\beta$  Oligomers and Their Application to Immunotherapy for Alzheimer's Disease, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78(8): 1293-1305). Por tanto, es preferible utilizar A $\beta$ (1-42), particularmente la forma oligomérica de A $\beta$ (1-42), en el método de cribado descrito en el presente documento.

5 En el método de cribado descrito en el presente documento, la forma oligomérica de beta amiloide debe ser oligómeros de menos de 24, preferentemente 12 monómeros beta amiloide o menos, más preferentemente una mezcla que consta principalmente de tetrámeros beta amiloide y trimeros casi sin protofibrillas o fibrillas de beta amiloide. La forma oligomérica de A $\beta$ (1-42) descrita en el presente documento puede prepararse mediante el método descrito en la  
10 referencia [Dahlgren *et al.* (2002) Oligomeric and Fibrillar Species of Amyloid- $\beta$  Peptides Differentially Affect Neuronal Viability, *J. Biol. Chem.* 277(35): 32046-32053]. Específicamente, se disuelve A $\beta$ (1-42) en hexafluoroisopropanol (HFIP), se seca al vacío y el péptido seco se resuspende en DMSO a una concentración de 5 mM. Se agrega DMEM /F12 (sin rojo de fenol) y la concentración de péptido se ajusta a 100  $\mu$ M, después de lo cual se cultiva a 4 °C durante 24 horas.

15 En el método de cribado descrito en el presente documento, MPTP es un profármaco para la neurotoxina MPP+ (1-metil-4-fenilpiridinio). MPP+ provoca síntomas permanentes de la enfermedad de Parkinson (EP) a través de la destrucción de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra del cerebro.

20 Se sabe que la rotenona, una sustancia que causa la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra inhibiendo la actividad del complejo mitocondrial 1 en la célula, produce las características patológicas de la EP.

La oxidopamina, también denominada 6-hidroxidopamina (6-OHDA) o 2,4,5-trihidroxi-fenilamina, es un compuesto neurotóxico utilizado por los investigadores para destruir selectivamente las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas en el cerebro. Se cree que la oxidopamina entra en la neurona a través de los transportadores de  
25 recaptación dopaminérgicos y noradrenérgicos. Para dañar selectivamente las neuronas dopaminérgicas, también se utiliza con un inhibidor selectivo de recaptación de noradrenérgicos tal como la desipramina.

El glutamato actúa como el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central (SNC), pero se sabe que daña las neuronas y causa la muerte celular cuando está presente en concentraciones altas. La excitotoxicidad del glutamato no solo se asocia con daño agudo del SNC como isquemia o daño cerebral traumático, sino también con enfermedades neurodegenerativas crónicas como ELA, esclerosis múltiple, EP, etc.

El LPS (lipopolisacárido) es un componente de la superficie celular de las bacterias Gram negativas y se puede utilizar, por ejemplo, el aislado de *Salmonella typhimurium* (Sigma, San Luis, Misuri), por ejemplo. El LPS provoca una respuesta inmunitaria fuerte en los animales y provoca una respuesta inflamatoria al activar la microglía en el sistema nervioso. La secreción de sustancias inflamatorias debido a la microglía hiperactivada puede alterar la homeostasis del sistema inmunitario y causar enfermedades neurodegenerativas relacionadas con enfermedades autoinmunitarias del SNC, tales como esclerosis múltiple, EA y EP.

40 S100B es una proteína de unión a calcio expresada y secretada por los astrocitos. Tiene actividad neurotrófica para el desarrollo y mantenimiento de las neuronas y afecta las funciones cognitivas normales del cerebro. Sin embargo, unos niveles anormalmente altos de S100B activarán la glía y provocarán respuestas neuroinflamatorias que son dañinas para las neuronas.

45 En el método de cribado descrito en el presente documento, las células madre neurales se tratan con sustancias que inducen daño neuronal, tales como beta amiloide, antes de la adición del material de prueba. En experimentos publicados anteriormente, las células madre neurales se trataron primero con los materiales de prueba un cierto tiempo antes de que se añadiera beta amiloide para observar el efecto de protección neural de los materiales de prueba (*J. Korean Neurol. Assoc.* 21(2): 174-182, 2003). Este método no refleja la situación de tratamiento real donde a los  
50 pacientes de Alzheimer se les administran fármacos después de que la beta amiloide ya está presente en sus cerebros. Las células madre neurales deben tratarse primero con beta-amiloide antes de la adición del material de prueba, como se describe en el presente documento, para simular más de cerca el entorno cerebral de los pacientes con Alzheimer en el punto temporal cuando comienza el tratamiento.

55 El material de prueba se añade a las células madre neurales después de tratarse con beta amiloide y se cultivan adicionalmente con la adición diaria de factores de crecimiento. Después de tratar las células madre neurales con el material de prueba, se puede determinar si el material de prueba tiene o no actividad inductora de diferenciación de células madre neurales mediante un análisis morfológico como muy pronto, a las 12 horas y como muy tarde, 48-72  
60 horas después del tratamiento.

El análisis de morfología utiliza el microscopio de contraste de fases para observar y determinar la morfología de la célula. Como puede observarse en la parte superior de la Fig. 2 unas marcadas UD (indiferenciadas) y D (diferenciadas), las células madre neurales diferenciadas (D) se pueden distinguir claramente de las indiferenciadas (UD). En las células indiferenciadas, los cuerpos celulares son anchos, la forma de las neuritas, tales como axones y dendritas son difíciles de discernir y el número total de células es elevado, dado que las células se dividen



continuamente. En las células diferenciadas, los cuerpos celulares son pequeños y redondos, si bien las neuritas son delgadas y extendidas.

5 Las células madre neurales utilizadas en el método de cribado descrito en el presente documento son células relativamente frágiles en comparación con las líneas celulares normales o cancerosas y responden sensiblemente a la toxicidad del material de prueba. Si el material de prueba muestra toxicidad celular, las células muertas se pueden ver al microscopio, lo que permite determinar la toxicidad celular al mismo tiempo que se determina la actividad inductora de diferenciación.

10 De acuerdo con el método de cribado descrito en el presente documento, los materiales que tienen actividades inductoras de la diferenciación de células madre neurales se pueden cribar en un entorno que simula el entorno cerebral de un paciente con Alzheimer, especialmente en el que están presentes formas oligoméricas de beta amiloide, la forma que se sabe que está fuertemente correlacionada con la pérdida neuronal. Esto hace que el método de cribado descrito en el presente documento sea adecuado para el cribado de materiales candidatos que pueden utilizarse para el tratamiento fundamental de la enfermedad de Alzheimer. Además, el método de selección es conveniente porque permite la determinación de si las células se han diferenciado o no examinando la morfología celular, sin la necesidad de análisis experimentales adicionales. Además, cuando se permite que las células madre neurales se diferencien de forma natural en medios sin factores de crecimiento, se necesitan al menos 48 horas, después de las que se puede observar el cambio en la morfología celular. En el caso de células tratadas con materiales que tienen una actividad inductora de diferenciación altamente eficiente, su efecto puede observarse tan pronto como 12 horas después del tratamiento y como máximo, 48-72 horas después del tratamiento, a pesar de la presencia de factores de crecimiento en los medios de cultivo celular para la supresión de la diferenciación. De esta manera, el método de cribado es rápido y eficaz, ya que la toxicidad del material de prueba también puede determinarse al mismo tiempo que el efecto inductor de diferenciación.

25 Además, otro aspecto descrito en el presente documento se refiere al kit que se puede utilizar para realizar el método de cribado mencionado anteriormente. Este kit puede incluir células madre neurales derivadas de ratones adultos, sustancias que inducen daño neuronal tales como beta amiloide, MPTP, rotenona, oxidopamina, glutamato, LPS o S100B, factores de crecimiento, medio de cultivo, suplementos para cultivos celulares y placas de cultivo (revestidas o con soluciones de revestimiento separadas).

La presente invención se explicará en más detalle con referencia a los siguientes Ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos no se han de interpretar como que limitan o restringen el alcance y la divulgación de la invención.

## 35 Ejemplos

### **Ejemplo 1: La capacidad inductora de diferenciación de CMN del compuesto de [Fórmula 1] en células madre neurales embrionarias de ratón**

40 Etapa 1: Cultivo de células madre neurales embrionarias de ratón

Etapa 1A: Cultivo de células madre neurales embrionarias de ratón en el estado indiferenciado

45 Se aislaron células madre neurales del cerebro de un embrión de ratón de 14,5 días, tratado con 10 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico humano (bFGF) (Peprotech, Princeton, Nueva Jersey, n.º de cat.100-18B) y 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico humano (EGF) (Peprotech, n.º de cat. AF-100-15) en un medio de cultivo N2 y se cultivó en suspensión en un matraz de 25 cm<sup>2</sup> (Nunc, Pittsburgh, Pensilvania) durante 4 días. Se observó formación de neuroesferas después de 2 días.

50 Con el fin de aislar células individuales, se prepararon placas de 6 pocillos el día anterior tratando los pocillos con solución de poli-L-ornitina (Sigma, San Luis, Misuri, n.º de cat. P2533) 15 µg/ml y se incubaron durante la noche a 37 °C para el revestimiento. El día del aislamiento de células individuales, se retiró la solución de poli-L-ornitina, se lavaron las placas tres veces con PBS y se añadió solución de fibronectina (Gibco, Waltham, Massachusetts, n.º de cat. 33016015) 10 µg/ml y se incubaron a 37 °C durante 2 horas para el revestimiento. Cuando se completó la preparación de la placa, las neuroesferas se trataron con TryPLE (Gibco n.º de cat. 12604013), se separaron en células individuales y se contaron y prepararon para comprender 4~5x10<sup>5</sup> células por 200~300 µl de solución de cultivo (medio de cultivo N2 con bFGF 10 ng/ml y EGF 20 ng/ml). Justo antes de la siembra, la solución de revestimiento se succionó y las células individuales se sembraron uniformemente en la placa de cultivo antes de que la placa se secase. Se permitió que las células se adhirieran a las placas durante aproximadamente 1 minuto y después de comprobar que las células estaban suficientemente adheridas, se añadieron 1,5 ml más de medio de cultivo (medio de cultivo N2 con bFGF 10 ng/ml y EGF 20 ng/ml) a las células y se cultivaron en una incubadora a 37 °C.

La composición del medio de cultivo N2 es la siguiente:

65 medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)/F12 (1:1) (Gibco, n.º de cat. 11320033), putrescina 100 µM (Sigma, n.º de cat. 51799), selenita 30 nM (Sigma n.º de cat. S5261), progesterona 20 nM (Sigma n.º de cat. P0130), d-(+)-glucosa 1,55 mg/ml (Sigma, n.º de cat. G8270), insulina 25 µg/ml (Gibco, n.º de cat. 12585014), apo transferrina 0,1

mg/ml (Sigma n.º de cat. T1147), Glutamax 0,5 mM (Gibco, n.º de cat. A1286001), penicilina 100 UI/ml (Gibco, n.º de cat. 15140122), estreptomycin 100 µg/ml (Gibco, n.º de cat. 15140122).

Etapa 1B: cultivo de células madre neurales sin inhibir la diferenciación

5 Se cultivaron células madre neurales embrionarias de ratón de acuerdo con el procedimiento de la Etapa 1A, excepto por la adición de bFGF y EGF cuando las células madre neurales se separaron en células individuales y se sembraron.

Etapa 2: Adición de material de prueba

10 Diversas concentraciones del compuesto de [Fórmula 1] (en lo sucesivo en este documento también denominado trametinib) (Medchem express, Monmouth Junction, Nueva Jersey, n.º de cat. HY-10999A) y AS703026 (pimasertib) (Selleckchem, Houston, Texas, n.º de cat. S1475) se añadieron diariamente a células madre neurales embrionarias de ratón cultivadas como se describe en el Etapa 1A y se cultivaron durante 4 días.

Etapa 3: Análisis de morfología

20 La morfología celular se observó mediante microscopía de contraste de fases después de cuatro días de cultivo y los resultados se muestran en la Fig. 1.

En la Fig. 1, UD (indiferenciadas) es CMN embrionarias de ratón indiferenciadas obtenidas en la Etapa 1A donde las células no se tratan con ningún material de prueba. D (diferenciadas) es CMN embrionarias de ratón diferenciadas obtenidas en el Etapa 1B donde las células no se tratan con ningún material de prueba. Las CMN indiferenciadas del grupo UD tienen cuerpos celulares anchos, la forma de las neuritas es difícil de distinguir y el número total de células es mayor en comparación con el grupo D debido a la división celular continua. Las células diferenciadas del grupo D tienen cuerpos celulares redondos más pequeños con neuritas delgadas alargadas, haciéndolas fácilmente distinguibles de las células del grupo UD.

30 Como se muestra en la Fig. 1, el compuesto de [Fórmula 1] (trametinib) indujo fácilmente la diferenciación de CMN en neuronas a concentraciones bajas de 10 nM, 25 nM y 100 nM (0,1 µM). El grupo tratado con AS703026 requirió 1,0 µM, una concentración 100 veces mayor que la de trametinib, para que se iniciara la diferenciación neuronal.

Tomados en conjunto, estos resultados indican que el compuesto de [Fórmula 1] (trametinib) induce la diferenciación de CMN en neuronas y este efecto se observa incluso a concentraciones muy bajas (a 10 nM y mayores). Esto sugiere que el compuesto de [Fórmula 1] puede utilizarse para la composición y el método de diferenciación para inducir la diferenciación de CMN a neuronas y para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

**Ejemplo 2: La capacidad inductora de diferenciación de CMN del compuesto de [Fórmula 1] en CMN adultas de ratón (Método de cribado de sustancias que pueden inducir la diferenciación de CMN en neuronas protegiéndolas al mismo tiempo)**

Etapa 1: Cultivo de CMN adultas de ratón

Etapa 1A: Cultivo de CMN adultas de ratón en el estado indiferenciado

45 Las CMN de la zona subventricular de cerebro de ratón de semana 8 se aislaron, se trataron con factor de crecimiento de fibroblastos básico humano (bFGF) 20 ng/ml y factor de crecimiento epidérmico humano (EGF) 20 ng/ml en un medio IPM y se cultivaron como una suspensión en placas de 24 pocillos durante 7 días. La formación de neuroesferas se observó después de 4 días.

50 Dos días antes del aislamiento de células individuales, se prepararon placas de 6 pocillos tratando los pocillos con una solución de poli-L-ornitina 10 µg/ml e incubando durante la noche a temperatura ambiente para el revestimiento. Al día siguiente, se eliminó la solución de poli-L-ornitina y las placas se lavaron 3 veces con agua triple destilada esterilizada. A continuación, se añadió una solución de laminina 0,5 mg/ml (Roche, Alta Baviera, Alemania, n.º de cat. 11243217001) y se incubó durante la noche a 37 °C para el revestimiento. Cuando se completó la preparación de la placa, las neuroesferas se trataron con tripsina-EDTA al 0,025 %, se separaron en células individuales y se contaron y prepararon para comprender 4~5x10<sup>5</sup> células por 200~300 µl de solución de cultivo. La solución de cultivo utilizada es medio de cultivo N2 (complementado con bFGF 20 ng/ml y EGF 20 ng/ml). Justo antes de la siembra, la solución de revestimiento se succionó y las células individuales se sembraron uniformemente en la placa de cultivo antes de que la placa se seque. Se permitió que las células se adhirieran a las placas durante aproximadamente un minuto y después de comprobar que las células estaban suficientemente adheridas, se añadieron 1,5 ml más de medio de cultivo (medio de cultivo N2 con bFGF 20 ng/ml y EGF 20 ng/ml) a las células y se cultivaron en una incubadora a 37 °C durante 24 horas.

65 Las composiciones del medio de cultivo IPM y N2 son las siguientes:  
medio IPM: Medio neurobasal (Gibco, n.º de cat. 21103049), B27 PennStrep (Gibco, n.º de cat. A3582801), Glutamax,

penicilina 100 UI/ml, estreptomycin 100 µg/ml.

Medio N2: medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)/F12 (1:1), putrescina 100 µM, selenita 30 nM, progesterona 20 nM, d-(+) - glucosa 1,55 mg/ml, insulina 25 µg/ml, apo transferrina 0,1 mg/ml, Glutamax 0,5 mM, penicilina 100 UI/ml, estreptomycin 100 µg/ml.

Etapa 1B: cultivo de células madre neurales sin inhibir la diferenciación

Se cultivaron células madre neurales adultas de ratón de acuerdo con el procedimiento de la Etapa 1A, excepto por la adición de bFGF y EGF cuando las células madre neurales se separaron en células individuales y se sembraron.

Etapa 2: Tratamiento de beta amiloide

Después de cambiar el medio de las CMN cultivadas en el Etapa 1, cada pocillo se trató con beta amiloide (Aβ) 10 µM (Gibco, n.º de cat. 03112). Los pocillos no tratados con beta amiloide se dejaron para utilizar como controles negativos.

Se adquirió Aβ(1-42) humana de Gibco (Waltham, Massachusetts) para utilizar para la beta amiloide (Aβ) y se siguió el siguiente proceso para crear oligómeros. En primer lugar, se disolvió beta amiloide en HFIP (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol) (Sigma, n.º de cat. 105228) al 100 % para obtener una concentración de 1 mg/ml y se agitó con formación de vórtice a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, se secó durante 10 minutos en un Speed Vac, tras lo que se añadió DMSO (Sigma, n.º de cat. D2650) para llevar la concentración a 5 mM y a continuación, se agitó con formación de vórtice ligeramente a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadió DMEM/F12 (sin rojo de fenol) (Gibco, n.º de cat. 21041025) para una concentración final de 100 µM. La solución se incubó a 4 °C durante 24 horas y a continuación, se añadió a las células cultivadas.

Etapa 3: Adición de material de prueba

Inmediatamente después del tratamiento con beta amiloide, se añadieron trametinib 10 nM, 100 nM, memantina 5 µM, 10 µM (Sigma, n.º de cat. M9292) y AS703026 10 µM (pimasertib) a los cultivos celulares. Las CMN se cultivaron con la adición diaria de EGF, bFGF, beta amiloide y materiales de prueba durante 4 días.

Etapa 4: Análisis de morfología

La morfología celular se observó mediante microscopía de contraste de fases después de cuatro días de cultivo y los resultados se muestran en la Fig. 2.

En la Fig. 2, la fila superior es CMN adultas de ratón no tratadas con beta amiloide y la fila inferior es CMN tratadas con beta amiloide 10 µM. UD (indiferenciadas) es CMN adultas de ratón indiferenciadas obtenidas en la Etapa 1A donde las células no se tratan con ningún material de prueba. D (diferenciadas) es CMN adultas de ratón diferenciadas obtenidas en el Etapa 1B donde las células no se tratan con ningún material de prueba. Del grupo superior no tratado con Aβ, las CMN indiferenciadas del grupo UD tienen cuerpos celulares anchos, la forma de las neuritas es difícil de distinguir y el número total de células es mayor en comparación con el grupo D debido a la división celular continua. Las células diferenciadas del grupo D tienen cuerpos celulares redondos más pequeños con neuritas delgadas alargadas, haciéndolas fácilmente distinguibles de las células del grupo UD.

El grupo tratado con trametinib indujo fácilmente la diferenciación de CMN en neuronas a concentraciones bajas de 10 nM y 100 nM, independientemente de si se trató o no con beta amiloide. El grupo tratado con AS703026 requirió una concentración mucho mayor que la de trametinib, 10 µM, para la diferenciación neuronal, independientemente de si se trató o no con beta amiloide. Ambos materiales no provocaron toxicidad celular a estas concentraciones, confirmando que son candidatos adecuados para la enfermedad de Alzheimer (EA).

Además, en el grupo tratado con memantina, un fármaco utilizado actualmente para el alivio de los síntomas de la EA, no se observó diferenciación de CMN en neuronas, sino más bien lo contrario, se observó la muerte de células madre neurales. La memantina es un antagonista del receptor de NMDA involucrado en la transducción de señales de glutamato y trabaja para ayudar a normalizar la transducción de señales neuronales en pacientes con EA. Este tipo de mecanismo no proporciona un tratamiento fundamental para la EA mediante la recuperación de neuronas dañadas. El hallazgo de que la memantina no induce la diferenciación de CMN sino que causa muerte celular confirma que no se puede utilizar como tratamiento fundamental para la demencia.

### **Ejemplo Comparativo 1: Efecto del tratamiento con beta amiloide sobre células madre neurales embrionarias de ratón**

Etapa 1: Cultivo de CMN embrionarias de ratón

Las células se cultivaron como se describe en el Ejemplo 1, Etapa 1A y 1B.

**Etapas 2: Tratamiento con beta amiloide**

Las CMN embrionarias de ratón cultivadas como se describe en la Etapa 1 anterior se trataron con beta amiloide utilizando el mismo método que en el Ejemplo 2, Etapa 2.

5

**Etapas 3: Adición de material de prueba**

Inmediatamente después del tratamiento con beta amiloide, se añadieron trametinib 100 nM, memantina 10  $\mu$ M y AS703026 (pimasertib) 10  $\mu$ M. Las CMN se cultivaron con la adición diaria de EGF, bFGF, beta amiloide y materiales de prueba durante 4 días.

10

**Etapas 4: Análisis de morfología**

La morfología celular se observó mediante microscopía de contraste de fases después de cuatro días de cultivo y los resultados se muestran en la Fig. 3.

15

En la Fig. 3, la fila superior es CMN embrionarias de ratón no tratadas con beta amiloide y la fila inferior es CMN tratadas con beta amiloide. UD (indiferenciadas) es CMN embrionarias de ratón indiferenciadas (no tratadas con ningún material de prueba) y D (diferenciadas) es CMN embrionarias de ratón diferenciadas (no tratadas con ningún material de prueba). En el grupo tratado con A $\beta$ , todas las células murieron, independientemente de si se añadieron o no los materiales de prueba y por tanto, no se pudo determinar el efecto de los materiales de prueba.

20

**Ejemplo 3: Análisis de inmunocitoquímica**

Con el fin de ratificar la diferenciación de CMN en neuronas en el Ejemplo 1, se realizó la tinción inmunocitoquímica de los marcadores Tuj1 y DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Tuj1 (beta tubulina de clase III específica de neuronas) es una proteína marcadora específica de neuronas, que se conjugó con rodamina para mostrar un rojo fluorescente, si bien que DAPI se une al ADN celular y tiñe los núcleos celulares de azul fluorescente.

25

Las CMN embrionarias cultivadas como se describe en el Ejemplo 1 se sembraron en placas de 24 pocillos con cubreobjetos y se trataron con trametinib y AS703026 en las concentraciones respectivas durante 4 días consecutivos. Se eliminó el retiró y las células se lavaron con PBS. Después de fijar con formaldehído al 10 % (Sigma n.º de cat. HT501128) a temperatura ambiente durante 10 minutos, se lavaron nuevamente con PBS. Se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,2 % (Sigma, n.º cat. 93443) a temperatura ambiente durante 15 minutos, se lavaron con PBS y se incubaron con BSA al 10 % (Sigma, n.º cat. A2153) + suero normal de cabra 1 % (Vector lab, Burlingame, California, n.º de cat. S1000) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se diluyó anticuerpo antiTuj1 (Cell signaling, Danvers, Massachusetts, n.º de cat. 4466) en BSA al 1 % + suero normal de cabra al 1 % en una relación de 1:200 y se añadió a las células y se incubó a 4 °C durante la noche. La solución se retiró, se lavó con PBS y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con el anticuerpo secundario (anticuerpo conjugado con rodamina) diluido en BSA al 1 % + suero normal de cabra al 1 % en una proporción de 1: 200. A continuación, las células se lavaron con PBS, se incubaron con DAPI 5  $\mu$ g/ml (Sigma, n.º de cat. D9542) durante 5 minutos, se lavaron de nuevo con PBS y se montaron en un portaobjetos de vidrio para su análisis con un microscopio fluorescente. Los resultados se muestran en la Fig. 4. Tal como se observa en la Fig. 4, el grupo tratado con AS703026 1,0  $\mu$ M mostró imágenes de neuritas alargadas delgadas rojas, indicando que la diferenciación de neuronas se produce a esta concentración, aunque sólo en un grado marginal. A concentraciones inferiores a esta (0,1  $\mu$ M), no se observó diferenciación.

30

35

40

45

Por el contrario, el grupo tratado con trametinib, incluso a una concentración muy baja de 10 nM, mostró una actividad de diferenciación cada vez más activa. En cuanto a la morfología de las células, son visibles un número creciente de neuronas que muestran neuritas alargadas en las células tratadas con trametinib 10 nM.

50

**Ejemplo 4: Análisis de los niveles de expresión relativa de ARNm****Ejemplo 4-1: Análisis de la expresión de ARNm de Tuj1 y TH inducida por el compuesto de [Fórmula 1] en CMN embrionarias de ratón**

Con el fin de determinar en qué tipo de células se diferenciaron las CMN en el Ejemplo 1, se analizó la expresión de ARNm del marcador neuronal específico Tuj1 y del marcador neuronal dopaminérgico TH (tirosina hidroxilasa) mediante RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR).

55

**Etapas 1: Aislamiento de ARN**

Después de completar el análisis de morfología del Ejemplo 1, se retiró el medio de cada grupo tratado de células y se añadió TRIzol® (Invitrogen, Waltham, Massachusetts) a la placa y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente para facilitar la lisis celular. Los lisados celulares, junto con TRIzol, se transfirieron a un tubo, se mezclaron a fondo con cloroformo (Sigma, n.º de cat. 366919), se centrifugaron y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Se añadió isopropanol (Ducsan, GyunggiDo, Corea, n.º de cat. 67-63-0) y se mezcló para el aislamiento de ARN, a

60

65

continuación, se centrifugó de nuevo para eliminar el sobrenadante y obtener el sedimento. El sedimento de ARN se resuspendió en etanol al 75 % (Ducsan, n.º de cat. 64-17-15), se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. A continuación, el sedimento se resuspendió en agua esterilizada triple destilada para obtener el ARNm, se incubó durante 10 minutos a 55 °C y se almacenó a -80 °C.

5

Etapa 2. Transcripción inversa

Después de medir la concentración de ARN, cada grupo de ARN se ajustó a 2 µg y el experimento se realizó utilizando un kit de transcripción inversa (Invitrogen, n.º de cat. 28025013). Se añadieron agua triple destilada esterilizada, oligo dT 1 pM y dNTP 1 mM al ARN y se incubaron durante 5 minutos a 65 °C. A esto le siguió la adición de 5X tampón de primera hebra (5X First-strand buffer), DTT 10 mM y M-MLV transcriptasa inversa y se incubó a 42 °C durante 1 hora, a continuación, a 72 °C durante 15 minutos y a 4 °C durante 30 minutos. El ADNc de sintetizado se almacenó a -20 °C.

10

Etapa 3: qRT-PCR

La PCR se realizó mezclando 1 µl de ADNc (sintetizado anteriormente), cebador 1 pM, agua triple destilada y Rotor-Gene SYBR® Green (Qiagen, Venlo, Países Bajos, n.º de cat. 204074) y utilizando el Rotor-Gene Q (Qiagen). Los cebadores (Bioneer, Daejeon, Corea) utilizados se muestran en la Tabla 2.

15

20

[Tabla 2]

Gen	Cebador directo	Cebador inverso
GAPDH	5'-CGTGCCGCCTGGAGAAACC-3'	5'-TGGAAGAGTGGGAGTTGCTGTTG-3'
Tuj1	5'-GGTCTGGCGCCTTTGGA-3'	5'-CACCACTCTGACCAAAGATAAAGTTG-3'
TH	5'-AGGTATACGCCACGCTGAAG-3'	5'-CTCGGGTGAGTGCATAGGTG-3'

Los resultados se muestran en la Fig. 5. Las Fig. 5a, 5b, son los valores medios de los niveles de expresión relativa de ARNm para cada grupo después de 3 rondas de experimentos. La expresión nivel de expresión relativa de ARNm significa que con el fin de normalizar el nivel de ARN total de cada grupo, el nivel de expresión de ARNm de cada marcador de diferenciación se divide por el nivel de expresión de GAPDH cuyo nivel de expresión es bastante constante en todas las células y a continuación, los valores de cada material de prueba se comparan con los de los controles (CMN indiferenciadas) en cada grupo.

25

Como se muestra en la Fig. 5, el grupo tratado con trametinib mostró elevados niveles de expresión del marcador neuronal específico Tuj1 y del marcador neuronal dopaminérgico TH a concentraciones de 10 nM, 25 nM y 100 nM. Este resultado indica que trametinib induce eficazmente la diferenciación de CMN en neuronas, especialmente en neuronas dopaminérgicas. Además, trametinib ejerció su efecto inductor de diferenciación a una concentración muy baja de 1 nM. Esto sugiere que la composición descrita en el presente documento puede utilizarse para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

30

35

AS703026 10 µM (10000 nM) produjo resultados comparables a los de trametinib 25 nM, indicando que trametinib induce la diferenciación de CMN en neuronas a una concentración 400 veces (o más) menor que la de AS703026.

**Ejemplo 4-2: Análisis de la expresión de ARNm de TH, ChAT, Isl1 y Gad1 inducida por el compuesto de [Fórmula 1] en CMN embrionarias y adultas de ratón**

40

Con el fin de determinar si el compuesto de [Fórmula 1] induce la diferenciación de CMN en tipos de células distintas de las neuronas dopaminérgicas, se determinó la expresión del ARNm del marcador de neuronas colinérgicas ChAT (colina acetiltransferasa), el marcador de neuronas motoras Isl1 (Isl1) y el marcador de neuronas GABAérgico Gad1 (glutamato descarboxilasa 1) mediante qRT-PCR.

45

Se cultivaron células madre neurales como se describe en el Ejemplo 1 y después de la adición de trametinib 1 nM, 10 nM, 25 nM y 100 nM durante 2 días, se aisló el ARN y se examinó respecto a los marcadores de diferenciación. La expresión de ARNm se determinó mediante el mismo método que en el Ejemplo 4-1 y los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 3. Los resultados se muestran en la Fig. 6.

50

[Tabla 3]

Gen	Cebador directo	Cebador inverso
GAPDH	5'-CGTGCCGCCTGGAGAAACC-3'	5'-TGGAAGAGTGGGAGTTGCTGTTG-3'
Tuj1	5'-GGTCTGGCGCCTTTGGA-3'	5'-CACCACTCTGACCAAAGATAAAGTTG-3'

(continuación)

Gen	Cebador directo	Cebador inverso
TH	5'-AGGTATACGCCACGCTGAAG-3'	5'-CTCGGGTGAGTGCATAGGTG-3'
ChAT	5'-CCTGCCAGTCAACTCTAGCC-3'	5'-TACAGAGAGGCTGCCCTGAG-3'
Gad1	5'-TCATGTTATGGAAATCTTGCTTCAG-3'	5'-CGAGTCACAGAGATTGGTCATATACTACT-3'
Isl1	5'-CGGAGAGACATGATGGTGGT-3'	5'-GGCTGATCTATGTCGCTTTGC-3'

Como se muestra en la Fig. 6, la expresión de todos los marcadores neuronales probados, marcador de neuronas dopaminérgicas TH, marcador de neuronas colinérgicas ChAT, marcador de neuronas motoras Isl1 y marcador de neuronas GABAérgicas Gad1, aumentó con el aumento de concentración del trametinib añadido. Esto sugiere que trametinib puede utilizarse en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas causadas por diversos tipos de daño neuronal.

Para determinar si el mismo efecto tiene lugar en el CMN de ratón adulto, se añadieron trametinib 10 nM y AS703026 10 µM cada uno durante 2 días a CMN adultas de ratón cultivadas como se describe en el Ejemplo 2, Etapa 1A y los niveles de expresión de ARNm del marcador neuronal Tuj1, el marcador neuronal dopaminérgico TH y el marcador neuronal colinérgico ChAT se analizaron mediante qRT-PCR.

Este resultado se muestra en la Fig. 7. Trametinib aumentó la expresión de Tuj1, TH y ChAT en CMN adultas, como lo hizo en CMN embrionarias. Es de destacar que trametinib mostró un efecto inductor de diferenciación de CMN a neuronas más fuerte a una concentración 1000 veces menor que AS703026.

#### **Ejemplo 5: Examen de la capacidad inductora de diferenciación de CMN mediante el control de la expresión de MEK1 y MEK2 en células madre neurales**

##### **Ejemplo 5-1: Inhibición de la expresión de MEK1, MEK2 en células madre neurales embrionarias de ratón**

Se examinó la capacidad de inducir diferenciación de CMN a neuronas en relación con los niveles de expresión de MEK1 y MEK2. El siguiente método se utilizó para producir células en las que se controla la expresión de MEK1 y MEK2.

En primer lugar, con el fin de producir CMN donde se inhibe la expresión de MEK1 y MEK2, se utilizaron los ARNhc respectivos que inhiben la expresión de MEK1 y MEK2. Específicamente, las CMN embrionarias de ratón cultivadas como se describe en el Ejemplo 1, Etapa 1A se sembraron en placas y se cultivaron durante 24 horas. A continuación, se transfeció 1 µg/ml de ARNhc-MEK1 (CCGGGCCATCCAACATTCTAGTGAAGTTCGAGTTCACTAGAATGTTGGATG GCTTTTT) o de ARNhc-MEK2 (CCGGCCTCCGAGAGAAGCACCAGATCTCGAGATCTGGTGCTTCTCTCGGA GGTTTTT) a las células utilizando lipofectamina (Invitrogen, n.º de cat. 18324010) para crear CMN donde está inhibida la expresión de MEK1 o de MEK2 o de ambos.

Después de 4 horas, el medio de cultivo de estas células transfectadas se reemplazó con medio de cultivo N2, se cultivó durante 4 días adicionales y a continuación, se extrajo el ARN utilizando el método del Ejemplo 4-1. La capacidad inductora de diferenciación de CMN a neuronas se analizó mediante PCR de transcripción inversa (RT-PCR). Específicamente, el ARN se convirtió en ADNc mediante transcripción inversa y a continuación, se añadieron la ADN polimerasa EX-Taq (SG Bio, Kyunggi Do, Corea) y el cebador para realizar la PCR en el ciclador térmico T100™ (Bio-rad, Hercules, California). La PCR se realizó incubando a 95 °C durante 5 minutos, a continuación, repitiendo 25-35 ciclos de reacción donde 1 ciclo consiste en incubar a 95 °C durante 30 segundos, a 55-62 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 30 segundos. Los resultados de la PCR se analizaron realizando una electroforesis en gel de agarosa al 2 %, que a continuación, se analizó mediante un analizador de imágenes, LAS-3000 (Fujifilm, Tokio, Japón).

Los cebadores usados para la RT-PCR y la qRT-PCR en el presente Ejemplo, así como para los Ejemplos 5-2 y 5-3 se muestran en la Tabla 4.

[Tabla 4]

Gen	Cebador directo	Cebador inverso
GAPDH	5'-CGTGCCGCCTGGAGAAACC-3'	5'-TGGAAGAGTGGAGTTGCTGTTG-3'
Tuj1	5'-GGTCTGGCGCCTTTGGA-3'	5'-CACCCTCTGACCAAAGATAAAGTTG-3'

(continuación)

Gen	Cebador directo	Cebador inverso
TH	5'-AGGTATACGCCACGCTGAAG-3'	5'-CTCGGGTGAGTGCATAGGTG-3'
MEK1	5'-CGGCGGTTAACGGGACCA-34'	5'-GGATTGCGGGTTTGATCTCCA-3'
MEK2	5'-CCTGGATGAGCAGCAAAGGA-3'	5'-CAGTGAGCCACCATCCATGT-3'

Los resultados se muestran en la Fig. 8a. Como se muestra en la Fig. 8a, la expresión del marcador de neuronas de dopamina TH aumenta significativamente en las CMN donde tanto MEK1 como MEK2 se inhiben por la transfección tanto de MEK1hc como de MEK2hc (MEK1hc+, MEK2hc+) en comparación con CMN donde solo se inhibe la expresión de MEK2 (MEK1hc-, MEK2hc+).

Con el fin de examinar una vez más el efecto de inhibir solo MEK1 o MEK2 o de inhibir tanto MEK1 como MEK2, se examinó el efecto inductor de diferenciación de CMN a neuronas mediante qRT-PCR y transferencia Western. Se produjeron CMN donde solo se inhiben MEK1 o MEK2 y CMN donde se inhiben tanto MEK1 como MEK2 con los métodos mencionados anteriormente. Después de 4 horas, el medio de cultivo de las células transfectadas se reemplazó con medio de cultivo N2, se cultivó durante 4 días adicionales y se realizó qRT-PCR utilizando el método del Ejemplo 4-1. Los resultados se muestran en el gráfico de la Fig. 8b. Como se muestra en el gráfico de la Fig. 8b, la expresión de los marcadores neuronales Tuj1 y TH aumenta significativamente cuando se inhibe la expresión tanto de MEK1 como de MEK2 en comparación con cuando solo lo está MEK1 o MEK2.

Se realizó una transferencia Western para examinar si el efecto inductor de diferenciación de CMN a neuronas se observa con la inhibición de la expresión de MEK1 y MEK2, no solo en el ARNm sino también en los niveles de proteínas.

Se realizó transferencia Western en cada grupo de células mediante el siguiente método: Después de cultivar las CMN donde se inhibe la expresión de MEK1 y MEK2 durante 4 días, se retiró el medio, se añadieron tampón RIPA (Tris HCl 0,05 M pH 7,4 (Sigma, n.º de cat. T3253), NaCl 0,15 M (Ducsan, n.º de cat. 7647-14-5), ácido desoxicólico al 0,25 % (Sigma, n.º de cat. D6750), NP-40 al 1 % (USB, Waltham, Massachusetts, n.º de cat. 19628), EDTA 1 mM (Sigma, n.º de cat. EDS) PMSF 1 mM (Acros organics, Geel, Bélgica, n.º de cat. 215740050), ortovanadato sódico 1 mM (Bio Labs, Ipswich, Massachusetts, n.º de cat. P0758L), fluoruro de sodio 1 mM (Sigma, n.º de cat. S7920), inhibidores de proteasa (Sigma, n.º de cat. P83430)) a la placa sobre hielo y las células se recogieron con un raspador. Después de la incubación en hielo durante 10 minutos, se recogió el sobrenadante tras centrifugar a 13000 rpm a 4 °C. Se midió la concentración de proteínas, se añadió tampón de muestra (Tris-HCl 0,25 M pH 6,8, SDS al 0,05 % (Amersco, Solon, OH, n.º de cat. 227), glicerol al 50 % (Ducsan, n.º de cat. 56-81-5), DTT 0,25 M (Invitrogen, n.º de cat. R0861), BPB (Bio-rad, Hercules, CA, n.º de cat. 161-0404) 0,5 mg/ml y la muestra se hirvió a 100 °C durante 10 minutos y a continuación, se almacenó a -20 °C.

10~20 µg de muestras de proteínas se cargaron en gel de SDS-PAGE al 8-12 %, se separaron y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, que a continuación, se bloqueó con leche desnatada al 5 % a temperatura ambiente durante 1 hora. Los anticuerpos contra Tuj1, TH (Cell signaling, n.º de cat. 2792), MEK1/2 (Santa Cruz, Dallas, Texas, n.º de cat. Sc-292838) y ERK (Santa Cruz, n.º de cat. Sc-135900) se prepararon cada uno en Tween 20 (Sigma, n.º de cat. P1379) al 0,1 % que contiene solución salina tamponada con tris (TBS) y se incubó con la membrana a temperatura ambiente durante 2 horas o a 4 °C durante la noche, tras lo que se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP; del inglés, horseradish peroxidase) a temperatura ambiente durante 1 hora. La expresión de proteínas se detectó con un equipo fotosensible y el resultado se muestra en la imagen inferior de la Fig. 8b. Como se muestra en la Fig. 8b, los niveles de expresión tanto de ARNm como de proteínas en el marcador de neuronas Tuj1 y el marcador de neuronas de dopamina TH aumentaron significativamente en CMN donde la expresión de MEK1 y MEK2 está inhibida para ambos por el uso tanto de MEK1hc como de MEK2hc (MEK1hc+, MEK2hc+).

Por el contrario, en el caso de CMN donde sólo se inhibe una expresión de MEK1 o de MEK2, se observa un nivel más bajo de expresión de Tuj1 y TH en comparación con la de CMN con inhibición tanto de MEK1 como de MEK2.

#### **Ejemplo 5-2: Inhibición de la expresión de CAMEK1 y CAMEK2 en células madre neurales embrionarias de ratón**

Con el fin de examinar el efecto inductor de diferenciación de CMN a neuronas en relación con la activación de MEK1 y MEK2, se utilizaron en los experimentos de cultivo un plásmido de MEK1 (CAMEK1) constitutivamente activo y un plásmido de MEK2 (CAMEK2) constitutivamente activo que tienen mutaciones para la expresión constitutiva de MEK1 y MEK2, respectivamente. Específicamente, las CMN embrionarias de ratón cultivadas como se describe en el Ejemplo 1, Etapa 1A se sembraron en placas y se incubaron durante 24 horas. A continuación, se transfectaron 1 µg/ml de CAMEK1 y CAMEK2 en las células utilizando lipofectamina para crear CMN donde se expresa la expresión de CAMEK1 o CAMEK2 o de ambos. Después de 4 horas, el medio de cultivo de estas células transfectadas se reemplazó

con medio de cultivo N2 que no contiene EGF o bFGF, se cultivaron durante 4 días adicionales, se extrajo el ARN y la proteína y se realizaron RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) y transferencia Western. A través de estos experimentos, se examinó el efecto de la activación de MEK1 y MEK2 en el efecto inductor de diferenciación de CMN a neuronas y se mostró en la Fig. 8c.

5 En contraste con la Fig. 8b, la Fig. 8c muestra que cuando MEK1 y MEK2 se activan en un entorno de otro modo inductor de diferenciación, se inhibe la diferenciación de las CMN. Se demostró que la expresión de ARNm y proteína del marcador de neuronas Tuj1 y el marcador de neuronas dopaminérgicas TH estuvo inhibida mediante qRT-PCR y transferencia Western. La expresión de Tuj1 y TH fue significativamente menor en el caso de la activación tanto de  
10 MEK1 como de MEK2 en comparación con solo uno de ellos activado.

### Ejemplo 5-3: Inhibición de MEK1 y MEK2 en células madre neurales adultas de ratón

15 Los siguientes experimentos se realizaron para determinar si la inhibición de MEK1 y MEK2 induce la diferenciación de CMN en CMN adultas de ratón y si el efecto es el mismo en condiciones donde está presente beta amiloide.

Las CMN adultas de ratón cultivadas como se describe en el Ejemplo 2, Etapa 1A se sembraron en placas y se cultivaron durante 24 horas. A continuación, 1 µg/ml de ARNhc-MEK1 (CCGGGCCATCCAACATTCTAGTGAAGTTCGAGTTCACTAGAAATGTTGGATG GCTTTTT) o de ARNhc-MEK2 (CCGGCCTCCGAGAGAAGCACCAGATCTCGAGATCTGGTGCTTCTCTCGGAGGTTTTTG) se transfirió en las  
20 células utilizando lipofectamina (Invitrogen) para crear CMN donde está inhibida la expresión de MEK1 o de MEK2 o de ambos.

Después de 4 horas, el medio de cultivo de estas células transfectadas se reemplazó con medio de cultivo N2 o con  
25 medio de cultivo N2 tratado con beta amiloide 10 µM, se cultivó durante 2 días adicionales y se observó la morfología celular al microscopio. Se extrajo ARN utilizando el método del Ejemplo 4, se realizó qRT-PCR y se analizó el efecto inductor de diferenciación de CMN a neuronas.

30 El resultado se muestra en la Fig. 9.

Como se muestra en la Fig. 9a, la diferenciación se indujo más fácilmente en CMN donde tanto la expresión de MEK1 como de MEK2 se inhibió, por la transfección tanto de MEK1hc como de MEK2hc, que en CMN donde solo se transfirió uno de los MEK1hc o MEK2hc. En el caso de las células tratadas con Aβ, las células murieron en el grupo donde no se inhibieron ni MEK1 ni MEK2, pero en el grupo en el que se inhibieron MEK1 o MEK2 o MEK1 y MEK2, la  
35 muerte celular no ocurrió, pero sí la inducción de la diferenciación.

Además, como se muestra en la Fig. 9b, la expresión del marcador de neuronas de Tuj1 aumentó significativamente en las CMN donde se inhibieron tanto MEK1 como MEK2 por la transfección tanto de MEK1hc como de MEK2hc (MEK1hc+MEK2hc). Por el contrario, en las CMN donde se inhibió la expresión de MEK1 o MEK2 (MEK1hc, MEK2hc),  
40 la expresión del marcador neuronal Tuj1 fue baja, al igual que el efecto inductor de diferenciación de CMN a neuronas en comparación con el caso donde se inhibieron tanto MEK1 como MEK2. En el caso de las células tratadas con Aβ, se observó algún efecto protector e inductor de diferenciación en las CMN donde se inhibió MEK1 o MEK2, pero en las CMN donde se inhibió la expresión de MEK1 y MEK2, el efecto protector e inductor de diferenciación fue significativamente mayor.

45 A partir de estos resultados, se revela que la inhibición de MEK1 y MEK2 en CMN adultas no solo induce la diferenciación de CMN, sino que también demuestra un efecto protector contra la beta amiloide.

### Ejemplo 6: Efecto inductor de diferenciación de CMN de otros inhibidores de MEK1/2

50 Con el fin de probar si otros inhibidores de MEK 1/2 además de trametinib demuestran un efecto inductor de diferenciación de CMN y protector, se trataron CMN embrionarias de ratón con cada uno de los materiales de prueba. Específicamente, las CMN embrionarias de ratón cultivadas como se describe en el Ejemplo 1, Etapa 1A se trataron con los inhibidores de MEK1/2 respectivos AZD8330 (Selleckchem, n.º de cat. 2134), PD184352 (Selleckchem, n.º de cat. S1020), refametinib (Selleckchem, n.º de cat. S1089), PD318088 (Selleckchem, n.º de cat. S1568), binimetinib (Selleckchem, n.º de cat. S7007) y AS703026 a concentraciones de 0,1 µM, 1,0 µM, y 10 µM y se incubaron. A modo de comparación, las CMN también se trataron con trametinib a las mismas concentraciones. El día 2 de cultivo, se observó la morfología celular mediante microscopía de contraste de fases y los resultados se muestran en la Fig. 10a. La Fig. 10b es el análisis de la expresión de ARNm de Tuj1 en las células de cada grupo.

60 Como se muestra en las Figs. 10a y 10b, AZD8330, refametinib, PD318088, binimetinib y AS703026 indujeron todos diferenciación, aunque comenzando a diferentes concentraciones. AZD8330, refametinib y PD318088 mostraron una morfología de diferenciación comenzando a 1,0 µM, si bien binimetinib y AS703026 comenzaron a 10 µM. El examen de la expresión del marcador de diferenciación neuronal Tuj1 mediante RT-PCR mostró también que inducen la diferenciación a las mismas concentraciones. Trametinib mostró un excelente efecto inductor de diferenciación de  
65 CMN en comparación con otros compuestos, incluso a una concentración baja de 0,1 µM. Por el contrario, PD184352



mostró solo un efecto inductor de diferenciación de CMN débil a 0,1  $\mu\text{M}$  y a 1,0  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ , todas las células murieron.

Además, las CMN adultas de ratón cultivadas como en el Ejemplo 2, Etapa 1A se trataron con otros inhibidores de MEK 1/2 PD0325901 (Selleckchem, n.º de cat. S1036), RO5126766 (Selleckchem, n.º de cat. S7170), BI847325 (Selleckchem, n.º de cat. S7843) y U0126 (A.G. Scientific, San Diego, California, n.º de cat. U-102) a diversas concentraciones y se examinaron sus efectos inductores de diferenciación de CMN. Después del tratamiento con los materiales de prueba, se observó la morfología celular mediante microscopía de contraste de fases el día 2 de cultivo. Los resultados se muestran en la Fig. 10c. Como se muestra en la Fig. 10c, PD0325901 mostró un efecto inductor de diferenciación comenzando a 0,1  $\mu\text{M}$ , RO5126766 a 1,0  $\mu\text{M}$ . PD0325901, en particular, mostró un excelente efecto inductor ya que indujo la diferenciación en un amplio intervalo de concentraciones, de 0,1  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ . Por el contrario, BI847325 mostró solo un efecto inductor de diferenciación débil a 0,1  $\mu\text{M}$  y a 1,0  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ , todas las células murieron. Cuando se trataron con concentraciones más bajas de BI847325 (1,0 nM y 10 nM), la proliferación celular pareció estar algo inhibida y no se observó un efecto inductor de diferenciación. U0126 mostró inhibición de la proliferación celular a 0,1  $\mu\text{M}$  y 1,0  $\mu\text{M}$  y a 10  $\mu\text{M}$ , mostró citotoxicidad celular. Adicionalmente, U0126 no mostró ningún efecto inductor de diferenciación claro a 2,5  $\mu\text{M}$  y por tanto no demostró ningún efecto inductor de diferenciación de CMN en todas las concentraciones ensayadas.

Estos resultados revelan que no todos los inhibidores de MEK1/2 previamente conocidos inducen eficazmente la diferenciación de CMN. De acuerdo con los resultados del Ejemplo 5, está claro que la inhibición de MEK1 y MEK2 está implicada en la inducción de la diferenciación de CMN. Sin embargo, se cree que la propiedad distinta de cada inhibidor de MEK 1/2 afecta a sus capacidades de inducción de diferenciación de CMN, conduciendo a las diferencias observadas en el Ejemplo 6.

#### **Ejemplo 7: Efecto inductor de diferenciación de CMN de otros inhibidores de MEK1/2 en presencia de factores citotóxicos celulares**

Las CMN adultas cultivadas como se describe en el Ejemplo 2, Etapa 1A se trataron con beta amiloide 10  $\mu\text{M}$  como se describe en el Ejemplo 2, Etapa 2 para crear un entorno citotóxico, después de lo cual los inhibidores de MEK1/2 AS703026 (10  $\mu\text{M}$ ), AZD8330 (1  $\mu\text{M}$ ), PD318088 (1  $\mu\text{M}$ ), binimetinib (10  $\mu\text{M}$ ), refametinib (1  $\mu\text{M}$ ), PD0325901 (10  $\mu\text{M}$ ) y RO5126766 (10  $\mu\text{M}$ ) se añadieron a la concentración que provocó el mayor efecto inductor de diferenciación del Ejemplo 6 y se cultivaron. A modo de comparación, se incluyeron el grupo tratado con trametinib 0,1  $\mu\text{M}$  y el grupo tratado con cobimetinib 10  $\mu\text{M}$  (conocido como un inhibidor selectivo de MEK1 en comparación con MEK2), así como grupos no tratados con beta amiloide para cada uno de los compuestos ensayados. La morfología celular se observó mediante microscopía de contraste de fases el segundo día de cultivo y los resultados se muestran en la Fig. 11.

En la Fig. 11, la fila marcada con "-" es el grupo de CMN adultas de ratón que no se trata con beta amiloide y la fila marcada con " $\text{A}\beta_{1-42}$ " es el grupo tratado con beta amiloide 10  $\mu\text{M}$ . En condiciones donde el tratamiento de beta amiloide 10  $\mu\text{M}$  causa la citotoxicidad, se demostró que la adición de AS703026, AZD8330, PD318088, binimetinib, refametinib, PD0325901 y RO5126766, en cada una de las concentraciones óptimas que inducen la mayor diferenciación, proporcionó protección celular e indujo la diferenciación de CMN. Por el contrario, la adición de cobimetinib, un inhibidor que se sabe que es más selectivo para MEK1 que para MEK2, no indujo la diferenciación de CMN adultas incluso a una alta concentración de 10  $\mu\text{M}$ , independientemente de si se añadió o no beta amiloide.

#### **Ejemplo 8: Detección de un aumento en el número de neuronas en el modelo de ratón con enfermedad de Alzheimer**

A través de estos experimentos previos, se demostró que entre los compuestos que suprimen tanto MEK1 como MEK2, ciertos compuestos inducen la diferenciación de CMN en neuronas y protegen CMN y neuronas contra beta amiloide, el trametinib, en particular, mostrando un efecto potente. Para confirmar este hallazgo también en el modelo de ratón con enfermedad neurodegenerativa, se examinó la neuroregeneración y el efecto terapéutico de trametinib utilizando el ratón 5XFAD, un modelo animal que muestra síntomas de EA, que es la forma más común de enfermedad neurodegenerativa. El ratón 5XFAD presenta patologías neuronales, la degeneración y muerte celular de las neuronas, especialmente en la capa 5 cortical somatosensorial y subículo del cerebro (Oakley *et al.* (2006) Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci.* 26(40):10129-10140).

Se administró trametinib por vía oral a los ratones modelo de EA 5XFAD (B6SJL-Tg (APP<sup>Sw</sup>FILon, PSEN1 M146L L286V)6799Vas/Mmjax) a los 12 meses de edad diariamente durante 28 días consecutivos a una dosis de 0,1 mg/kg y 1,0 mg/kg, si bien el vehículo (DMSO al 4 % + aceite de maíz) se administró a los ratones del grupo de control en el mismo método (7 ratones/grupo). Para que la tinción con BrdU se realice posteriormente, se añadieron 50 mg/kg de BrdU (Sigma, n.º de cat. B5002) a la dosis diaria durante los últimos 5 días. A continuación, se anestesió al ratón y se perfundió con PBS para la extracción del cerebro. De los cerebros extraídos de 3 ratones de cada grupo, la mitad del tejido cerebral (hemisferios) se almacenó inmediatamente en el congelador para experimentos de transferencia Western y ELISA a realizar posteriormente. La otra mitad de los hemisferios más otros 3 cerebros de ratones extraídos por grupo se colocaron en una solución de formalina al 10 % a 4 °C durante 1 día, a lo que le siguieron a continuación, las etapas de procedimiento para permitir una buena penetración de la parafina en el tejido cerebral. Los tejidos

cerebrales se sumergieron secuencialmente en alcohol al 70 %, al 80 %, al 95 %, al 100 % durante 1 hora cada uno para la deshidratación, a continuación, se sumergieron en xileno 3 veces durante 1 hora cada uno para aclarar y se incluyeron en parafina colocándolos en parafina líquida 2 veces durante 1 hora cada uno. Después de estos procedimientos, el tejido cerebral incluido en parafina (bloque de parafina) se cortó en secciones de 5 µm, se montó en portaobjetos y se almacenó a temperatura ambiente. Antes de la tinción inmunohistoquímica, los tejidos de los portaobjetos se rehidrataron sumergiéndolos secuencialmente en xileno, alcohol al 100 %, al 90 %, al 80 %, al 70 %, al 50 % y a continuación, agua durante 5 minutos cada uno. Después de colocarlo en tampón de citrato de sodio (10 mM, pH 6) (Sigma, S4641), el proceso de recuperación de antígeno se realizó a 120 °C durante 15 minutos, se bloqueó con BSA al 10 % (albúmina de suero bovino; del inglés, bovine serum albumin) y se incubó con anticuerpos contra el marcador neuronal NeuN (Cell signaling, n.º de cat. 24307) a 4 °C durante 1 día. Al día siguiente, los portaobjetos se incubaron con anticuerpos anticonejo (Vector lab, n.º de cat. PI-1000) a temperatura ambiente durante 1 hora y a continuación, se tiñeron con tinción DAB para el análisis de la distribución neuronal en el cerebro.

Dado que se sabe que el ratón 5XFAD tiene un daño neuronal extenso en la capa 5 del córtex cerebral y el subículo hipocampal, estas regiones del cerebro se examinaron primero.

La Fig. 12 es el resultado del análisis de las secciones sagitales del córtex somatosensorial en el córtex cerebral. Como se muestra en la Fig. 12a, en el ratón 5XFAD administrado con vehículo (DMSO al 4 % + aceite de maíz) (control, primera imagen a la izquierda), el número de células teñidas con NeuN (positivas) ha disminuido debido a un daño considerable de las neuronas en la capa 5 del córtex cerebral. En comparación, el ratón 5XFAD administrado con 0,1 mg/kg y 1,0 mg/kg de trametinib mostró un aumento significativo en el número de neuronas teñidas con NeuN. La Fig. 12b indica el número de células teñidas con NeuN contadas y representadas como el porcentaje del número de células por unidad de área en la región de la capa 5 de la corteza somatosensorial. Se tomaron muestras de área de 3 áreas por ratón, 3 ratones por grupo, por lo que el número de células contadas fue de un total de 9 áreas. Se calculó y mostró el porcentaje del número de células teñidas con NeuN en el grupo al que se administró trametinib en comparación con el grupo al que se administró vehículo.

La Fig. 13 es el resultado del análisis de las secciones coronales del córtex motor en el córtex cerebral de ratón. Como se muestra en la Fig. 13a, el ratón 5XFAD al que se administró vehículo (control) mostró un daño neuronal extenso en la capa 5 del córtex motor con un número disminuido de neuronas teñidas con NeuN, si bien el grupo de trametinib de nuevo mostró un aumento significativo en el número de neuronas, al igual que con los resultados del córtex somatosensorial. La Fig. 13b indica el número de células teñidas con NeuN contadas y representadas como el porcentaje del número de células por unidad de área en la región de la capa 5 de la corteza somatosensorial. Se tomaron muestras de área de 6 áreas por ratón, 3 ratones por grupo, por lo que el número de células contadas fue de un total de 18 áreas. Se calculó y mostró el porcentaje del número de células teñidas con NeuN en el grupo al que se administró trametinib en comparación con el grupo al que se administró vehículo.

La Fig. 14 es el resultado del análisis de las secciones sagitales del subículo en el hipocampo de ratón. Como se muestra en la Fig. 14a, el ratón 5XFAD al que se administró vehículo (control) mostró que un número significativamente pequeño de neuronas se tiñeron con el marcador neuronal NeuN en el subículo hipocampal, si bien el grupo al que se administró trametinib de nuevo mostró un aumento significativo en el número de neuronas, como con los resultados del córtex cerebral. La Fig. 14b indica el número de células teñidas con NeuN contadas y representadas como el porcentaje del número de células por unidad de área en el área de puntos del subículo hipocampal mostrado en la Fig. 14a. Se tomaron muestras de área de 3 áreas por ratón, 3 ratones por grupo, por lo que el número de células contadas fue de un total de 9 áreas. Se calculó y mostró el porcentaje del número de células teñidas con NeuN en el grupo al que se administró trametinib en comparación con el grupo al que se administró vehículo. A través de los experimentos anteriores, se demostró que trametinib tiene el efecto de aumentar el número de neuronas en la capa 5 del córtex cerebral y el subículo hipocampal del ratón 5XFAD.

#### **Ejemplo 9: Detección de neurogénesis en el modelo de ratón con enfermedad de Alzheimer**

Con el fin de determinar si el aumento en el número de neuronas en la capa 5 del córtex cerebral y el subículo hipocampal del ratón 5XFAD al que se administró trametinib, como se muestra en el Ejemplo 8, se debió al efecto de neurogénesis del trametinib, se realizó un análisis inmunohistoquímico con diversos marcadores celulares que aparecen durante todo el proceso de diferenciación de CMN a neuronas.

DCX (doble cortina), una proteína expresada en células precursoras neurales, se expresa principalmente en neuronas migratorias o diferenciadoras e indica que la célula es una neurona inmadura en el proceso de neurogénesis. Tuj1 (tubulina de clase IIIβ específica de neuronas), una proteína expresada en células precursoras neurales en división activamente o en neuronas posmitóticas inmaduras recién generadas, indica que la célula es una neurona en el proceso de neurogénesis. Por tanto, al detectar la presencia de DCX o Tuj1 mediante tinción inmunohistoquímica, se puede determinar que la neurogénesis sucede a través de la diferenciación de CMN en neuronas.

BrdU (5-bromodesoxicitidina), un análogo de la nucleobase timidina, reemplaza a la timidina durante la síntesis de ADN en una célula en división, lo que permite la detección de células en división durante la neurogénesis mediante tinción inmunohistoquímica.

**Ejemplo 9-1: Detección de la expresión de Tuj1 en el córtex somatosensorial del cerebro**

5 Se añadieron anticuerpos antiTuj1 a los portaobjetos de tejido cerebral del ratón 5XFAD del Ejemplo 8 y se incubaron a 4 °C durante 1 día, después de lo que los portaobjetos de tejido se tiñeron con fluorescencia incubando con anticuerpos secundarios de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Invitrogen, n.º de cat. A21121) a temperatura ambiente durante 1 hora. La imagen de microscopía fluorescente del córtex somatosensorial del córtex cerebral se muestra en la Fig. 15. En la Fig. 15, las áreas marcadas con flechas (→) indican células teñidas con Tuj1 y las áreas marcadas con puntas de flecha (▼) indican placas formadas por agregación de beta amiloide. Las placas estaban presentes tanto en los grupos tratados con vehículo como en los tratados con trametinib. Sin embargo, el grupo tratado con 0,1 mg/kg de trametinib, en particular, mostró un aumento significativo en el número de células teñidas con Tuj1 en comparación con el grupo tratado con vehículo, a pesar de niveles similares de placas de beta amiloide presentes en las muestras.

**15 Ejemplo 9-2: Detección de la expresión de Nissl, NeuN y DCX en el giro dentado hipocampal**

Cuando se activa la neurogénesis en la zona subgranular (SGZ; del inglés, subgranular zone) del giro dentado, tiene lugar la división celular asimétrica y como resultado, se generan células de Tipo 2 desde el principio. Las células de Tipo 2 tienen un soma pequeño con un núcleo atípico, son cortas y están orientadas horizontalmente y expresan nestina o Dcx. Las células de Tipo 3 son células que han sufrido una diferenciación adicional desde células de Tipo 2 y se denominan también el neuroblasto. Las células de Tipo 3 son células en la etapa temprana de diferenciación en el linaje celular neuronal, no glial. Las células de Tipo 3 se sitúan más cerca hacia la capa granular de la zona subgranular del giro dentado y a diferencia de las células de Tipo 2, han cambiado de la forma orientada horizontalmente a la orientada verticalmente. El hecho de que las células de Tipo 2 y de Tipo 3 estén presentes en la zona subgranular del giro dentado indica que está teniendo lugar la neurogénesis.

La tinción de Nissl, que tiñe el cuerpo de Nissl de la neurona, es un método que muestra la distribución y la afección de las neuronas en el cerebro. Los tejidos del cerebro de los portaobjetos del Ejemplo 8 se rehidrataron sumergiéndolos secuencialmente en xileno, alcohol al 100 %, al 90 %, al 80 %, al 70 %, al 50 % y a continuación, agua durante 5 minutos cada uno. Después de colocar en solución de violeta de cresilo al 0,1 % (Sigma, n.º de cat. C5042) a temperatura ambiente durante 15 minutos, se deshidrataron sumergiéndolos secuencialmente en alcohol al 80 %, al 90 %, al 100 % y xileno. Se colocaron cubreobjetos sobre los portaobjetos y se examinaron las neuronas. La tinción con NeuN se realizó mediante el mismo método descrito en el Ejemplo 8 como fue con la tinción de DCX, pero utilizando anticuerpos antiDCX (Santa Cruz, n.º de cat. Sc271390) en lugar de anticuerpos antiNeuN.

Los resultados se muestran en la Fig. 16a. A partir de las tinciones de Nissl y NeuN en el ratón 5XFAD al que se administró trametinib, se demostró que el número de células que tienen la morfología de las células de Tipo 2 o Tipo 3 que aparecen específicamente durante la neurogénesis aumentó considerablemente en la zona subgranular (SGZ) y en un área más próxima a la zona granular que la SGZ en el giro dentado. Además, se observó la presencia de neuronas inmaduras (marcadas con flechas (→) en la columna marcada como "Dcx" en la Fig. 16) que también están teñidas por DCX, confirmando que la neurogénesis sucede en el giro dentado hipocampal en un ratón al que se administró trametinib.

**45 Ejemplo 9-3: Tinción de BrdU en la región del giro dentado hipocampal**

La división asimétrica de las células madre neurales debe transcurrir para que suceda la neurogénesis y esto se examinó mediante el siguiente experimento.

Los portaobjetos de tejido cerebral de ratón 5XFAD al que se administró BrdU (administración diaria de 50 mg/kg de BrdU durante 5 días consecutivos antes del sacrificio como se describe en el Ejemplo 8) se rehidrataron, se colocaron en HCl 1,5 M (ácido clorhídrico) y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Los portaobjetos se bloquearon con una solución que contenía BSA (albúmina de suero bovino) al 0,5 %, TritonX-100 al 0,3 % y suero normal de cabra al 10 % y se incubaron con anticuerpo antiBrdU (Cell signaling, n.º de cat. 5292) a 4 °C durante 1 día. La tinción inmunofluorescente se realizó al día siguiente incubando los portaobjetos con anticuerpo secundario de isotiocianato de fluoresceína (FITC) a temperatura ambiente durante 1 hora, después de lo cual se examinó la tinción de la región del giro dentado hipocampal con un microscopio fluorescente.

Los resultados se muestran en la Fig. 16a en la columna denominada "BrdU". Las células marcadas con puntas de flecha (▼) son las células marcadas con BrdU. En comparación con el grupo al que se administró vehículo, el ratón 5XFAD al que se administró trametinib mostró un aumento en el número de células teñidas con BrdU en el giro dentado. La Fig. 16b muestra el número de células marcadas con BrdU, que de nuevo mostró que el grupo al que se administró trametinib mostró un aumento en el número de células teñidas con BrdU. La Fig. 16b cuantificó el número de células de un total de 9 áreas (3 ratones por grupo y 3 áreas por ratón) y el promedio se muestra en el gráfico.

65 A partir de estos resultados, se revela que trametinib induce la neurogénesis a través de la diferenciación de CMN en el modelo de ratón de EA. Esto sugiere que no solo se puede utilizar trametinib como tratamiento fundamental para la

EA, sino también para el tratamiento y la prevención de enfermedades causadas por daño o pérdida neuronal en el córtex cerebral, concretamente en el córtex motor.

#### **Ejemplo 10: Actividad neuroprotectora en el modelo de ratón de EA**

Con el fin de determinar si trametinib tiene un efecto neuroprotector en el córtex cerebral y el subículo hipocampal del ratón 5XFAD, se realizó el ensayo inmunohistoquímico TUNEL (marcaje del extremo de corte de dUTP mediado por la desoxinucleotidil transferasa terminal) para detectar la apoptosis celular. El ensayo TUNEL tiñe el extremo 3'-hidroxilo del ADN fragmentado, lo que permite la detección de células que sufren apoptosis en el tejido.

Los portaobjetos de tejido cerebral sagital descritos en el Ejemplo 8 se rehidrataron y tiñeron con el kit de ensayo TUNEL (Promega, Wisconsin, EE.UU., n.º de cat. G3250). Específicamente, los portaobjetos de tejido cerebral se permeabilizaron con solución de proteinasa K 20 µg/ml durante 10 minutos, se incubaron con tampón de equilibrio durante 10 minutos y a continuación, se incubaron con solución de TdT a 37 °C durante 1 hora. Se observó la tinción del córtex somatosensorial y del área del subículo, áreas que se sabe que muestran una muerte celular significativa en el ratón 5XFAD. El ensayo TUNEL también se realizó en los portaobjetos de tejido de cerebro de ratón adulto normal (como control) para confirmar que la tinción se realizó correctamente.

Los resultados se muestran en la Fig. 17. No se observó tinción de fluorescencia verde en el ratón normal (marcado como "ratón normal" en la Fig. 17) porque no se produjo la apoptosis. Sin embargo, se observó fluorescencia verde en muchas de las células del córtex somatosensorial (fila marcada como "córtex" en la Fig. 17) y subículo (fila marcada como "subículo" en la Fig. 17) del ratón 5XFAD. En la Fig. 17, las células teñidas se marcaron con flechas (→) en el subículo; en el córtex somatosensorial, no se realizó un marcado por separado debido a que se tiñeron muchas células. En el caso del ratón 5XFAD al que se administró trametinib, el número de células teñidas con TUNEL en el córtex somatosensorial y el subículo fue significativamente menor en comparación con el grupo al que se administró vehículo.

Estos resultados demuestran que trametinib ejerce un efecto protector contra la muerte neuronal en el modelo de ratón de EA.

#### **Ejemplo 11: Protección de células de Purkinje cerebelares en el modelo de ratón de EA**

Los portaobjetos de tejido cerebral (de ratón 5XFAD) descritos en el Ejemplo 8 se incubaron con anticuerpos antiTuj1 y anticálbindina (Cell Signaling, n.º de cat. 13176) a 4 °C durante 1 día y se tiñeron por inmunofluorescencia con isotiocianato de fluoresceína (FITC)-anticuerpos secundarios o rodamina-anticuerpos secundarios a temperatura ambiente durante 1 hora. La imagen de inmunofluorescencia de la capa de células de Purkinje se muestra en la Fig. 18. Se muestran dos portaobjetos para la tinción de Tuj1 y tres para la tinción de calbindina para cada grupo de tratamiento.

Como se muestra en la Fig. 18, las células de Purkinje del grupo tratado con vehículo exhibieron axones delgados protuberantes que muestran un patrón de corte en el medio. Por el contrario, el grupo al que se le administró trametinib, concretamente el grupo tratado con 0,1 mg/kg de trametinib, mostró células de Purkinje con una arborización de axones aumentada o al menos con una estructura de axones conservada en comparación con el control tratado con vehículo.

Se sabe que el cerebelo juega un papel importante en la integración del reconocimiento sensorial y la regulación y el control de los movimientos motores. Las células más llamativas del cerebelo, las células de Purkinje, son unas de las células más grandes del cerebro y a través de su arborización de axones elaborada, forman sinapsis entre sí y se extienden profundamente en el núcleo del cerebelo para regular y controlar el músculo motor. Los resultados experimentales anteriores indican que trametinib protege las células de Purkinje y aumenta la arborización de los axones en el cerebelo, posiblemente proporcionando tratamiento a enfermedades, como la ataxia cerebelar, que están causadas por la pérdida o daño de las células de Purkinje en el cerebelo.

#### **Ejemplo 12: Inhibición del trametinib de la actividad de MEK en el modelo de ratón de EA**

Dado que los fármacos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas actúan sobre el sistema nervioso central, es importante la cuestión de si pueden o no cruzar la barrera hematoencefálica para actuar sobre el cerebro. Entre los inhibidores de MEK 1/2, se sabe que compuestos tales como AS703026 cruzan eficazmente la BHE (en inglés, BBB) e inhiben MEK y disminuyen la expresión de ERK fosforilada en el cerebro del ratón (Shaw *et al.* (2012) Evaluation of brain pharmacokinetics as a potential differentiation factor for the MEK inhibitors, MSC2015103 and pimasertib. Abstract LB-456, American Association for Cancer Research Annual Meeting, Chicago, Illinois). Para confirmar que el inhibidor de MEK1/2 trametinib entra en el cerebro para producir los resultados experimentales anteriores cuando se administra PO (vía oral) a un ratón 5XFAD, se midió el nivel de expresión de pERK en el tejido cerebral.

Los hemisferios cerebrales de ratón 5XFAD (3 ratones por grupo) del Ejemplo 8 almacenados en un congelador se colocaron en nitrógeno líquido y se molieron en un mortero lleno de nitrógeno líquido. El polvo se dividió en 6 partes,

se colocó en tubos nuevos y se volvió a colocar en el congelador. Se sacó uno de los tubos y se utilizó para transferencia Western como se describe en el Ejemplo 5-2. El polvo se suspendió cuidadosamente con una pipeta en tampón RIPA, se incubó en hielo durante 10 minutos, se centrifugó a 13000 rpm, 4 °C y se recogió el sobrenadante. Después de medir la concentración de proteínas, se añadió tampón de muestra (Tris-HCl 0,25 M pH 6,8, SDS al 0,05 %, glicerol al 50 %, DTT 0,25 M, BPB 0,5 mg/ml), se hirvió a 100 °C durante 10 minutos y se almacenó a -20 °C. Se cargaron 10 µg de muestra de proteínas en un gel SDS-PAGE al 10 %, se sometió a electroforesis, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se bloqueó con leche desnatada al 5 % a temperatura ambiente durante 1 hora. La transferencia Western se realizó utilizando anticuerpos antiPERK (Cell signaling, n.º de cat. 4370) y antiERK en solución salina tamponada con tris (TBS) con Tween 20 al 0,1 %, que se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y posteriormente se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante a temperatura ambiente durante 1 hora. Las bandas de proteínas se detectaron con un sistema de formación de imágenes fotosensibles (Fig. 19a). Con el fin de cuantificar el cambio en la expresión de pERK, se midieron los niveles de expresión de pERK y ERK por densitometría y el nivel de expresión de pERK se normalizó frente al nivel de expresión de ERK. El nivel de expresión normalizado de pERK en el grupo tratado con trametinib frente al grupo tratado con vehículo se muestra en la Fig. 19b.

Como se muestra en la Fig. 19, el nivel de proteínas de pERK en el cerebro de ratón al que se administró trametinib 0,1 mg/kg y 1,0 mg/kg es considerablemente más bajo que el del grupo de vehículo.

Este hallazgo indica que la administración PO de trametinib da como resultado el suministro de trametinib al cerebro para inhibir posteriormente la actividad de MEK y disminuir la expresión de pERK, por lo que parece que se manifiesta la neurogénesis y la neuroprotección.

#### **Ejemplo 13: Disminución de la deposición de beta amiloide en el modelo de ratón de EA**

Dado que la principal característica patológica de la EA es la deposición de A $\beta$ , se examinó la capacidad de trametinib para disminuir la deposición de A $\beta$ . Utilizando el polvo molido de los hemisferios de cerebro de ratón 5XFAD obtenidos en el Ejemplo 12, se cuantificó la cantidad de A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42) mediante ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas). El ensayo se realizó utilizando un kit de ELISA (Invitrogen, Massachusetts, n.º de cat. KHB3442) como sigue: En primer lugar, el polvo de cerebro de ratón se suspendió cuidadosamente con una pipeta en una solución de guanidina-HCl 5 M, se centrifugó a 16000xg (rpm), 4 °C y se recogió el sobrenadante. Después de medir la concentración de proteínas, se añadió tampón de dilución para obtener de 30~50 µg de proteína en 100 µl de solución. Se añadieron 100 µl de cada uno de los anticuerpos antiA $\beta$ (1-40) y antiA $\beta$ (1-42) a las placas de 96 pocillos, se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas, a continuación, se retiraron y lavaron 4 veces con tampón de lavado. Se añadieron 100 µl de cada uno de los anticuerpos secundarios conjugados con HRP y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, la solución se retiró y se lavó de nuevo 4 veces con tampón de lavado. Se añadieron a los pocillos 100 µl de la proteína preparada a partir del polvo de cerebro de ratón, se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos y se añadieron 100 µl de la solución de detención para terminar la reacción. A continuación, se midió la reacción de quimioluminiscencia a 450 nm con un lector de placas de ELISA. La absorbancia se convirtió en referencia respecto a la concentración estándar y se determinó la concentración de cada proteína. Se calculó la cantidad de A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42) en referencia a la cantidad total de proteína (30-50 µg) y a continuación, se calculó la cantidad de A $\beta$ (1-42) en referencia a la cantidad de A $\beta$ (1-40). Se obtuvieron los promedios de las 3 medidas de ratón para cada grupo y se muestran en la Fig. 20. Como se muestra en la Fig. 20, la cantidad de A $\beta$ (1-42)/A $\beta$ (1-40) disminuyó en el grupo tratado con trametinib en comparación con el grupo tratado con vehículo.

Este hallazgo indica que en el modelo animal con EA, trametinib disminuyó la cantidad de A $\beta$ , concretamente la forma A $\beta$ (1-42) que tiene una fuerte tendencia a formar oligómeros o agregados tóxicos y de esta manera, podría proporcionar protección a las neuronas.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Trametinib para utilizar en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa debida a la pérdida o al daño neuronal, en donde la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA, enfermedad de Lou-Gehrig), demencia, demencia vascular, demencia frontotemporal, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica, degeneración corticobasal, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular espinal, parálisis bulbar progresiva (PBP), atrofia muscular progresiva (PMA), parálisis pseudobulbar, paraplejia espástica hereditaria (HSP) y ataxia cerebelar.
- 10 2. Trametinib para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enfermedad neurodegenerativa se trata mediante la inducción de neuroregeneración mediante la diferenciación de las células madre neurales en neuronas.
- 15 3. Trametinib para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde a enfermedad neurodegenerativa se trata adicionalmente mediante la protección de las células madre neurales y las neuronas contra la citotoxicidad de las beta amiloides.
- 20 4. Trametinib para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde las neuronas diferenciadas a partir de células madre neurales son al menos una seleccionada de neurona dopaminérgica, neurona GABAérgica, neurona colinérgica y neurona motora.
- 25 5. Trametinib para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer.
- 30 6. Trametinib para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enfermedad neurodegenerativa es la demencia vascular.
- 35 7. Trametinib para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enfermedad neurodegenerativa es la esclerosis lateral amiotrófica (ELA, enfermedad de Lou-Gehrig).
- 40 8. Trametinib para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Huntington.
- 45 9. Trametinib para utilizar en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson mediante la inducción de neuroregeneración a través de la diferenciación de células madre neurales en neuronas.
10. Trametinib para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde las neuronas diferenciadas a partir de células madre neurales son neuronas dopaminérgicas.
11. Trametinib para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde se administran de 0,1 mg a 2 mg de trametinib diariamente una vez.
12. Trametinib para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde se administran de 0,1 mg a 1 mg de trametinib diariamente una vez.
13. Trametinib para el uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde se administran de 0,1 mg a 0,5 mg de trametinib diariamente una vez.

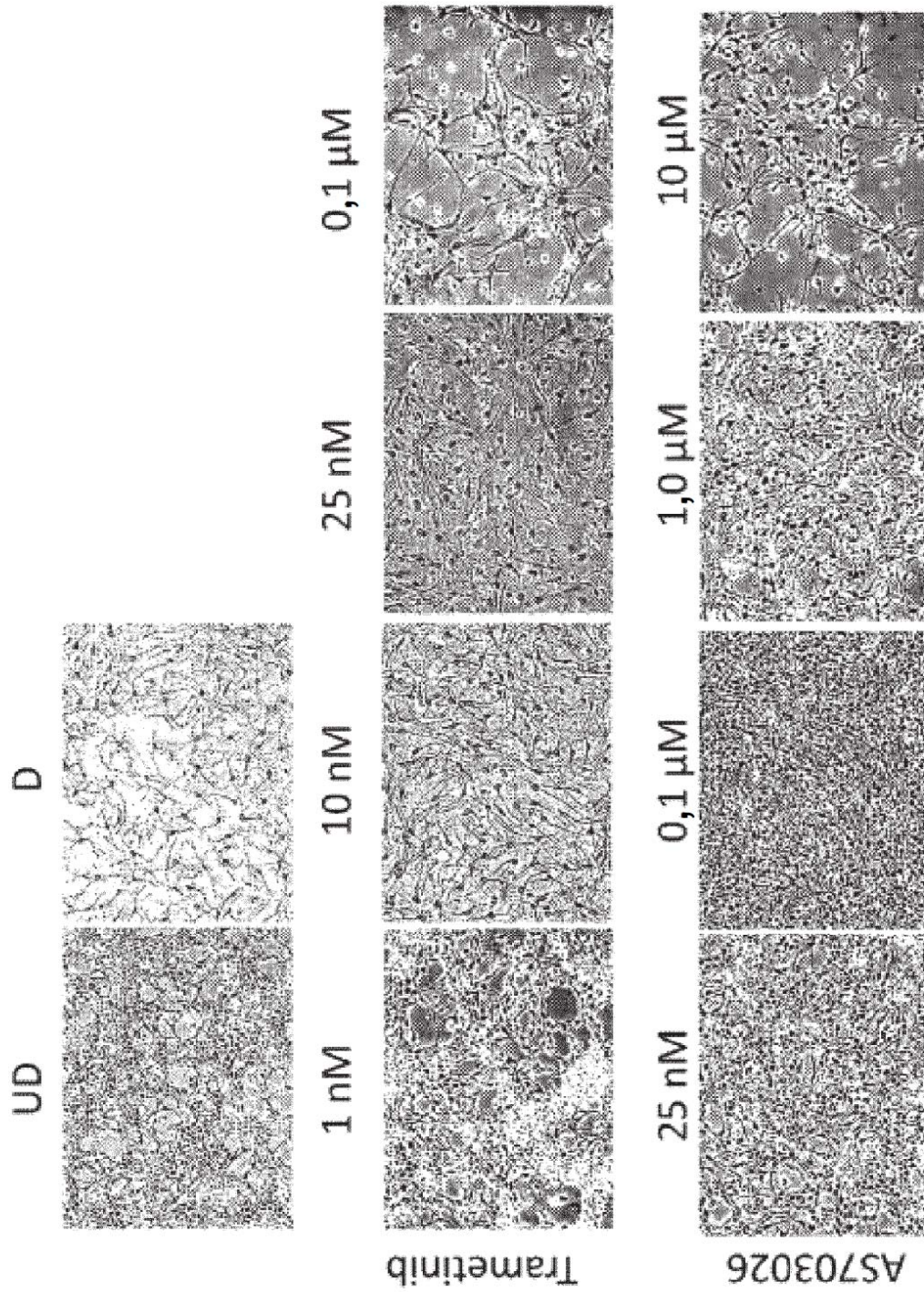


Figura 1

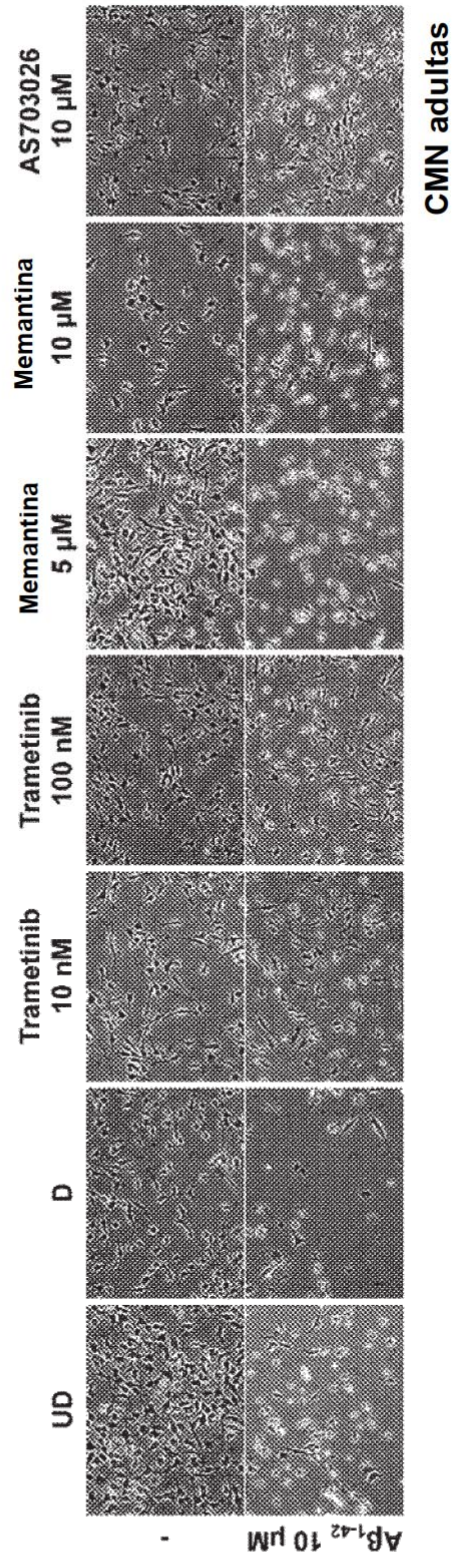


Figura 2



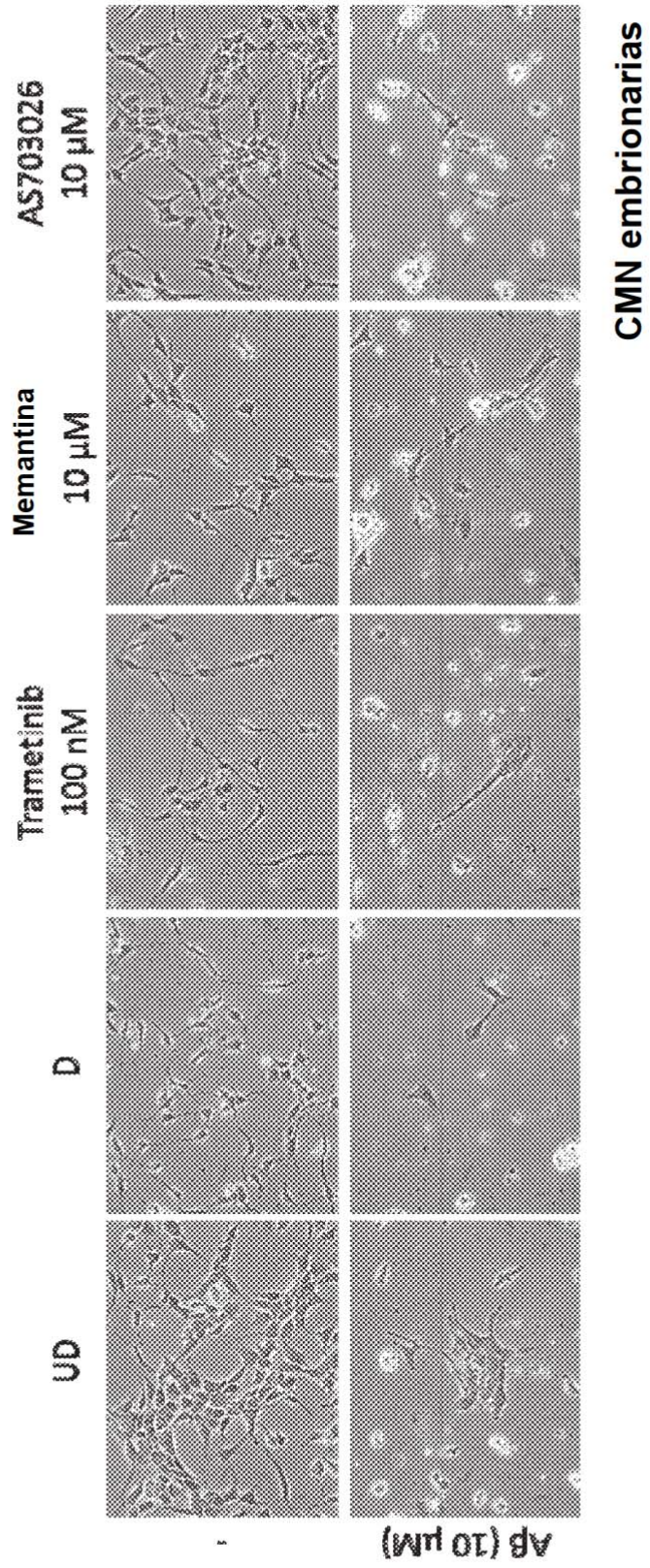


Figura 3

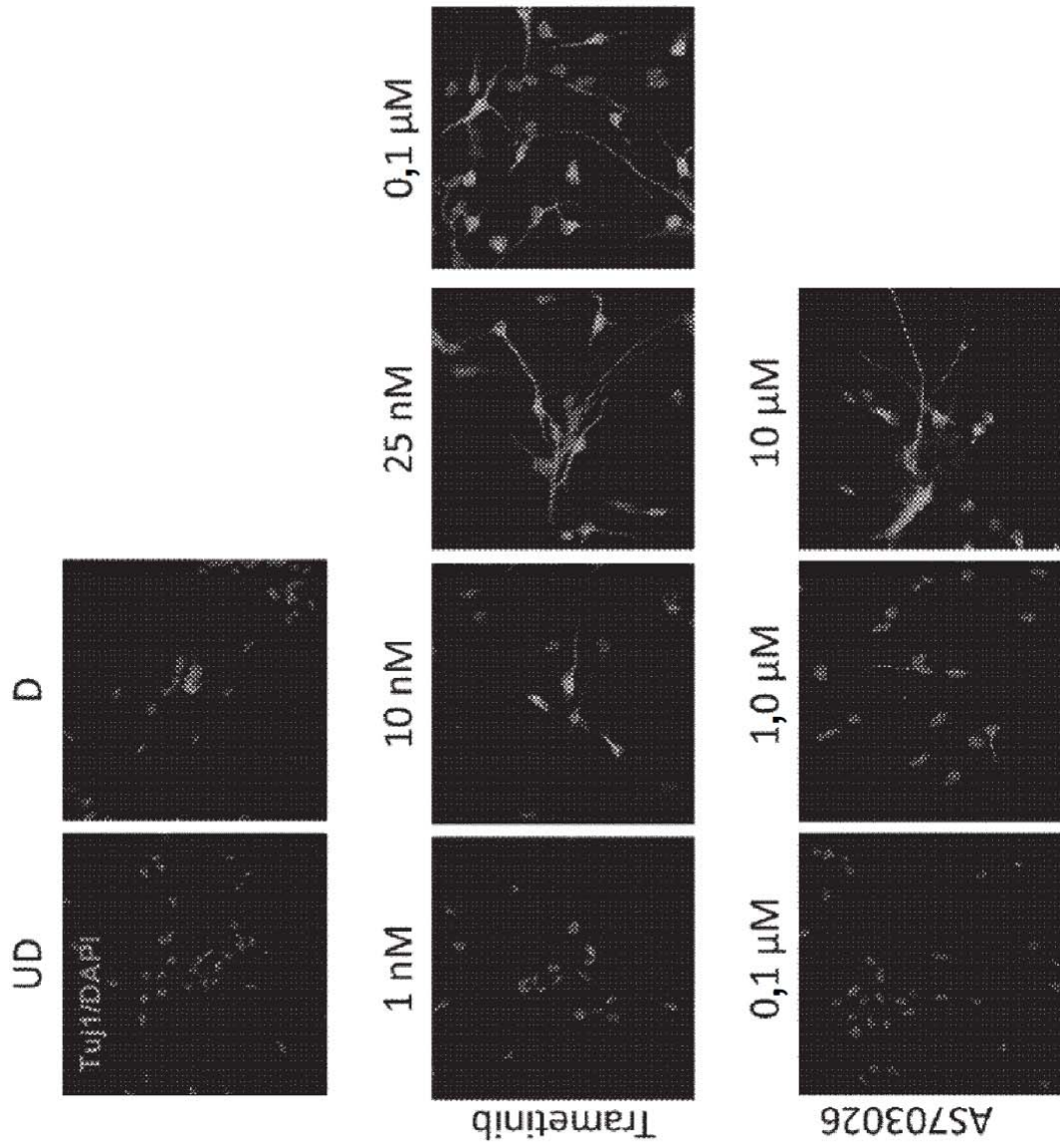


Figura 4

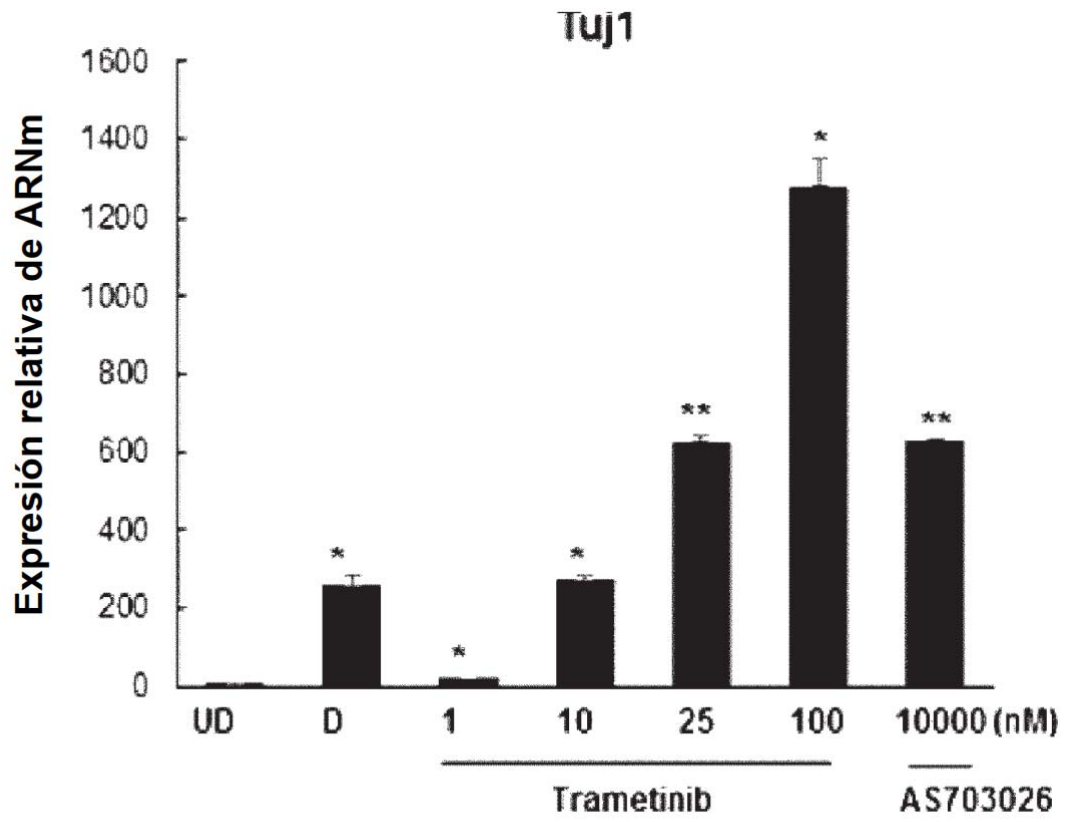


Figura 5a

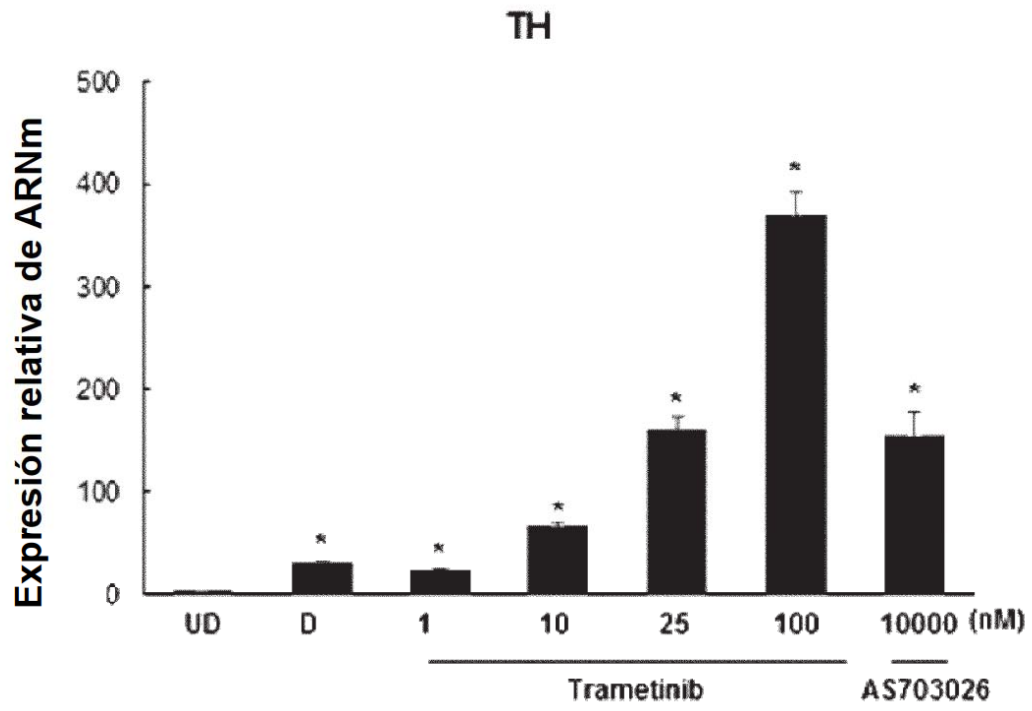


Figura 5b

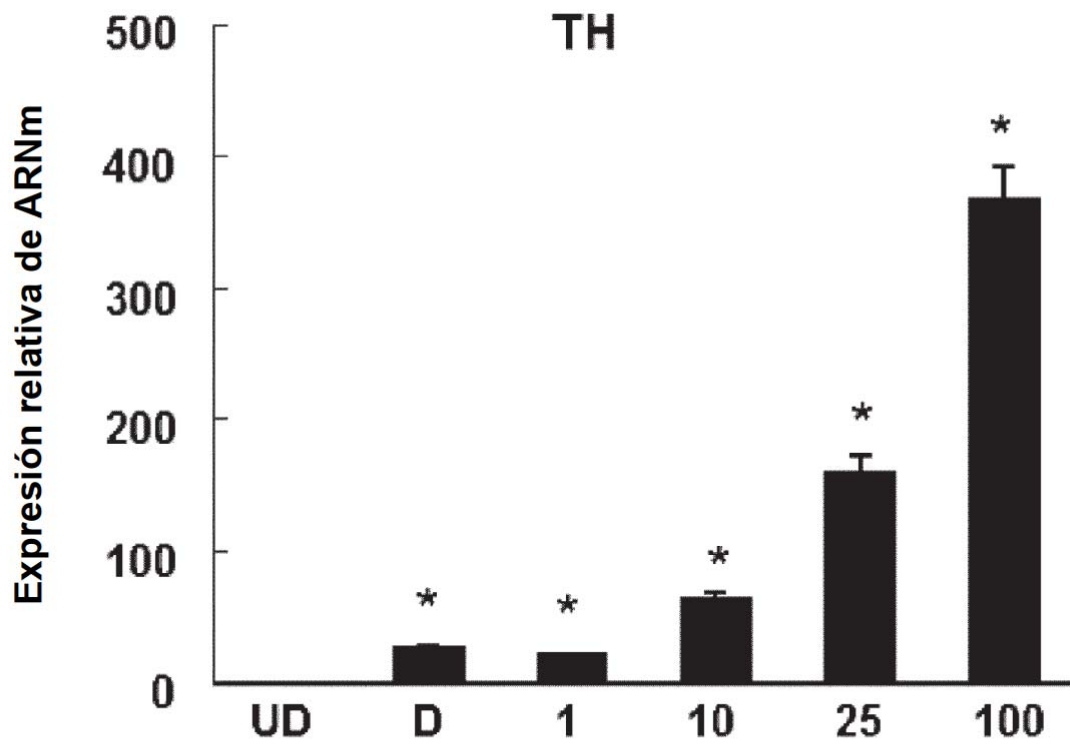


Figura 6a

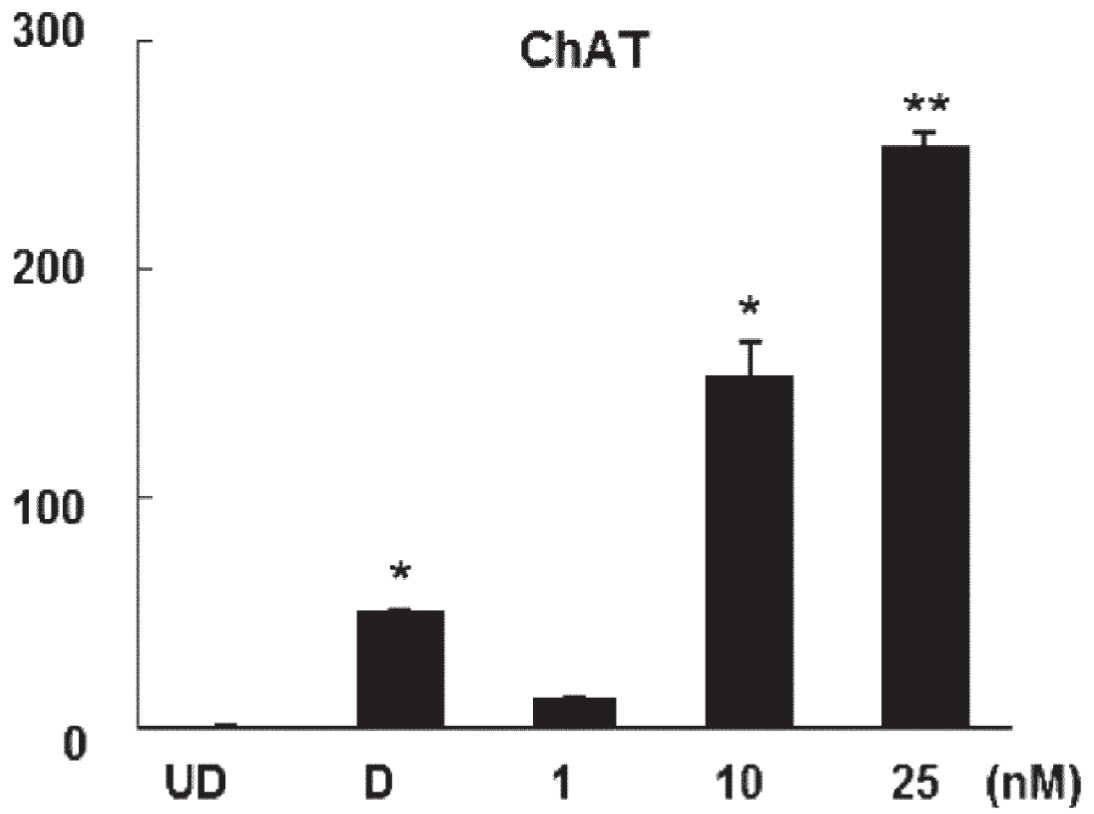


Figura 6b

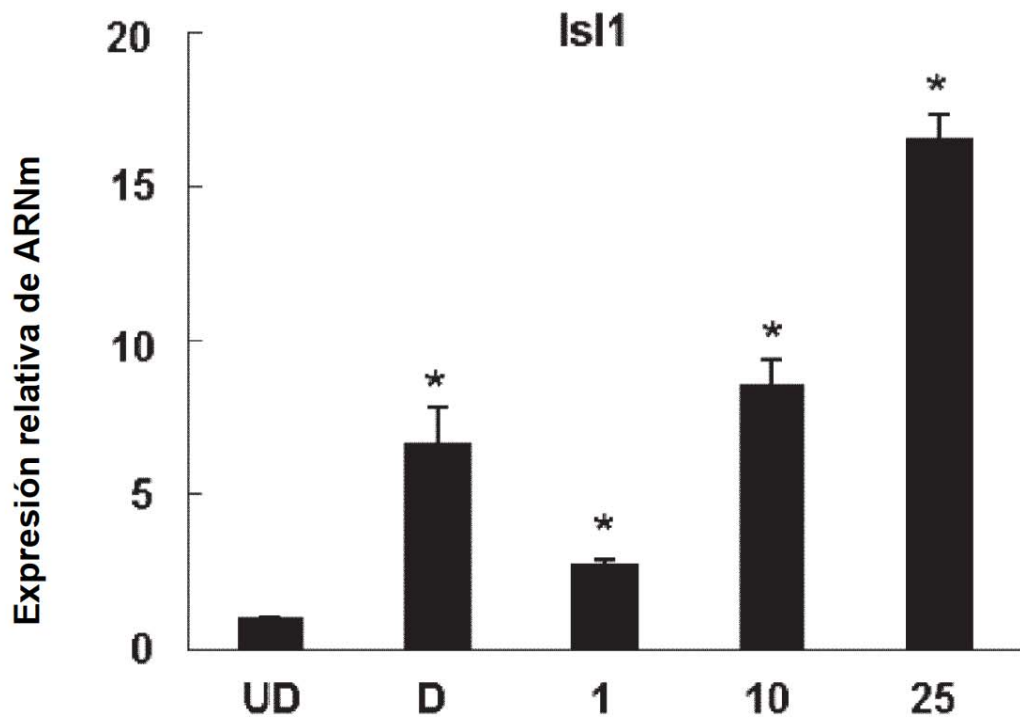


Figura 6c

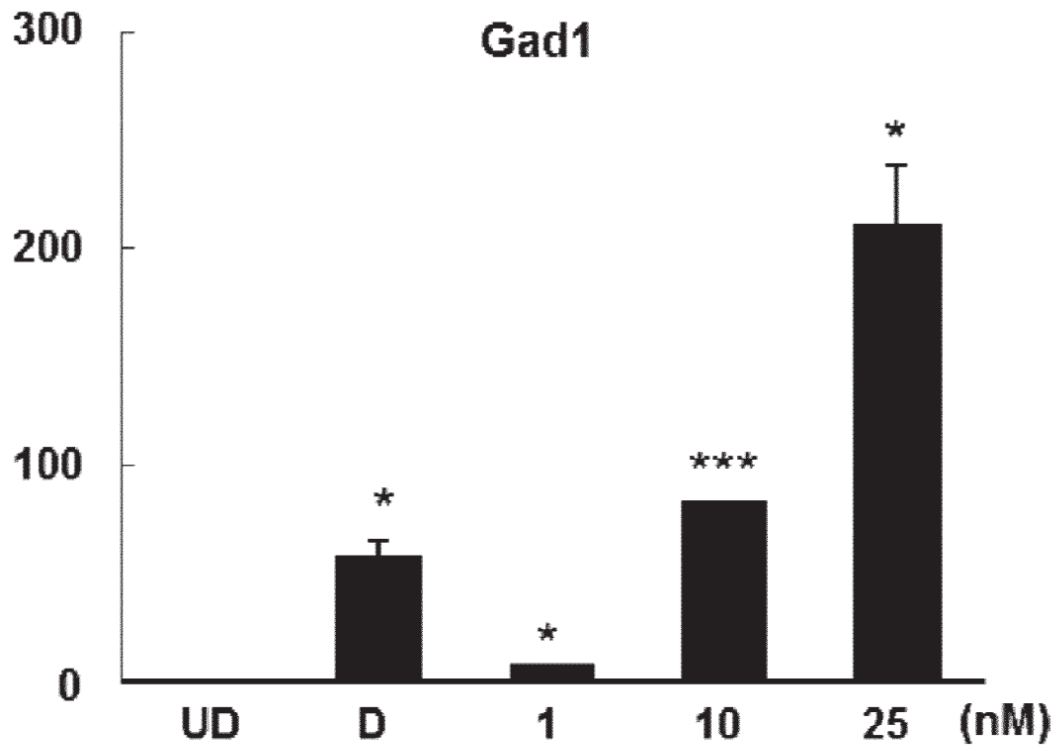


Figura 6d



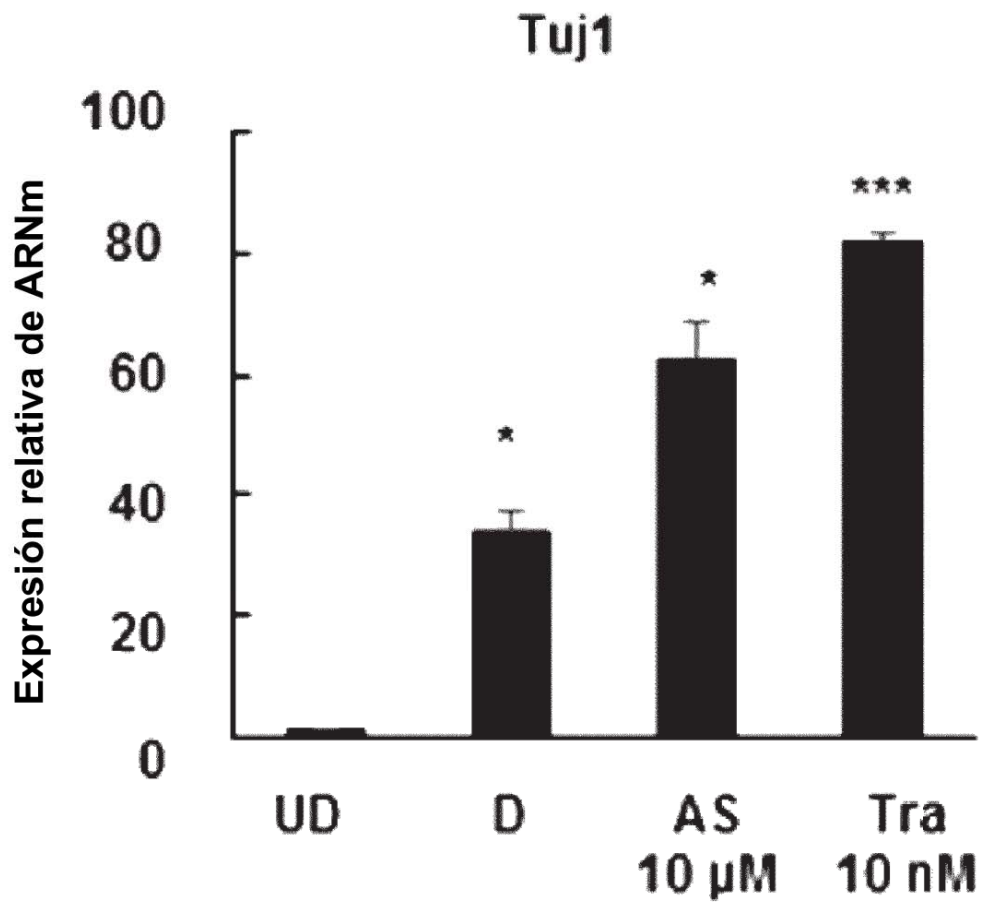


Figura 7a

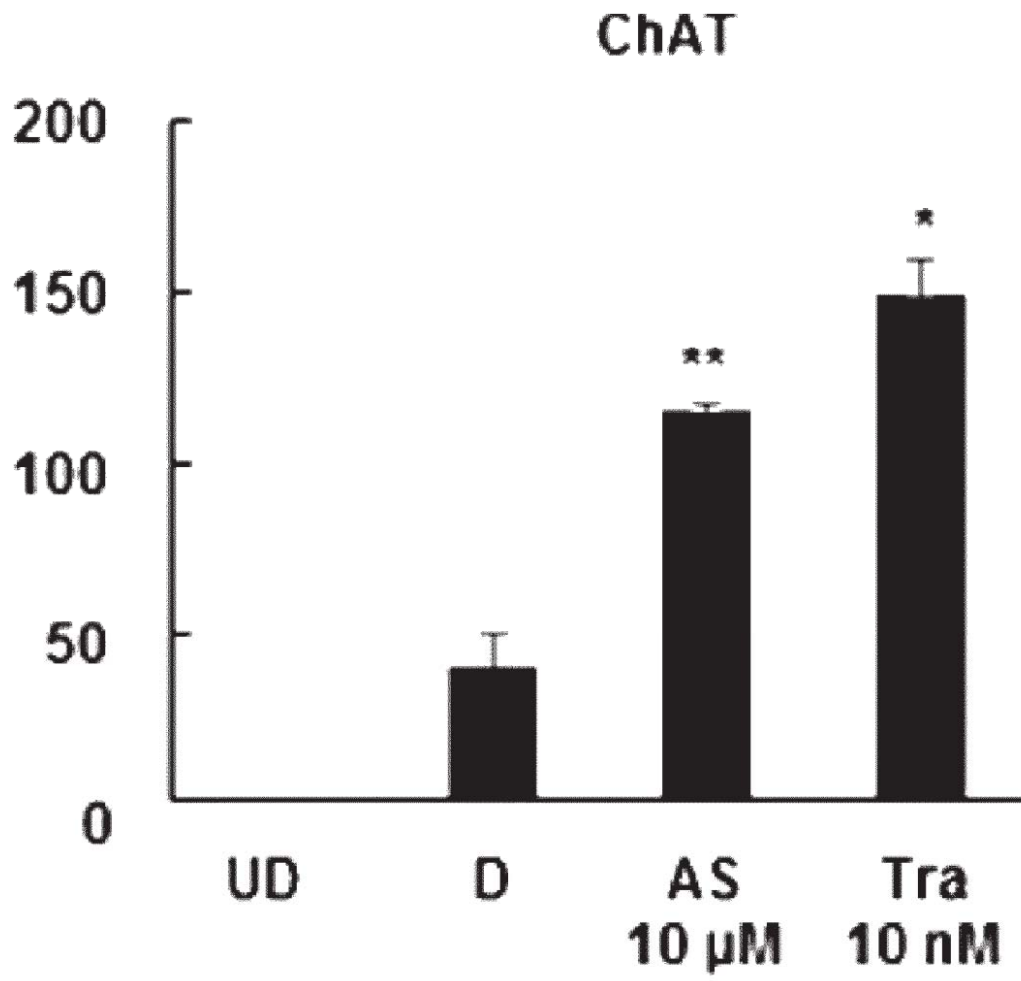


Figura 7b

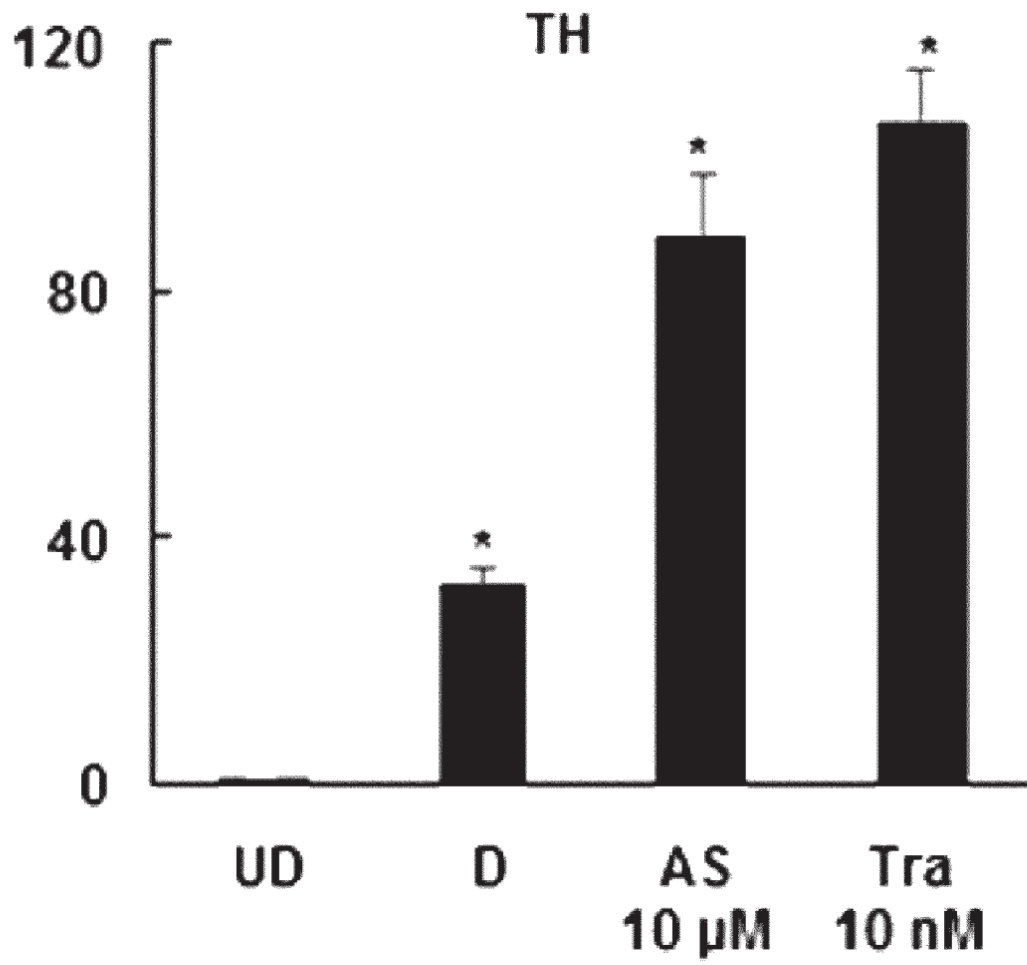


Figura 7c

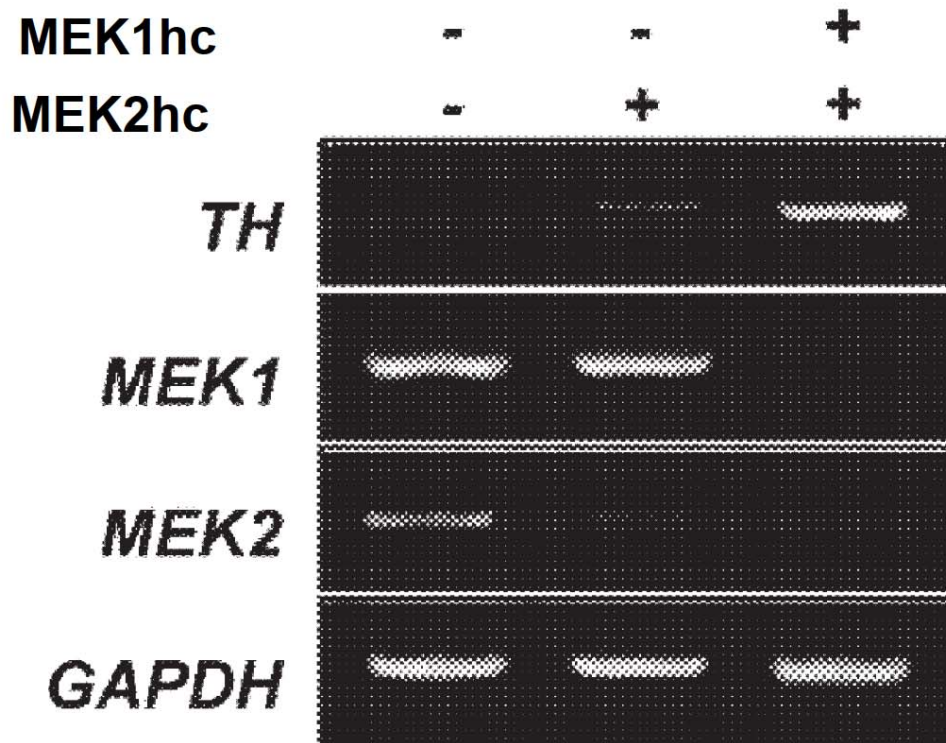


Figura 8a

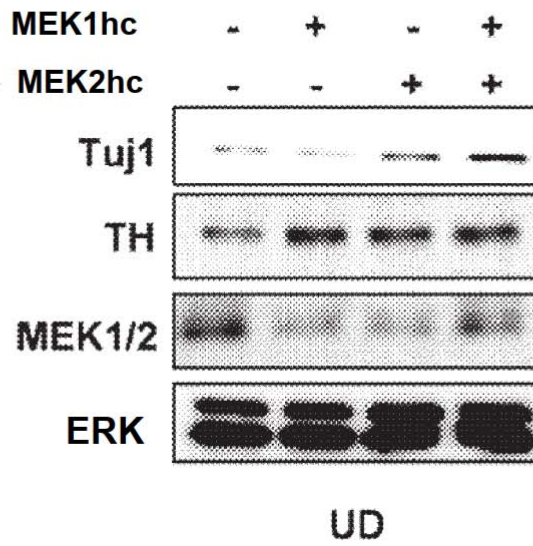
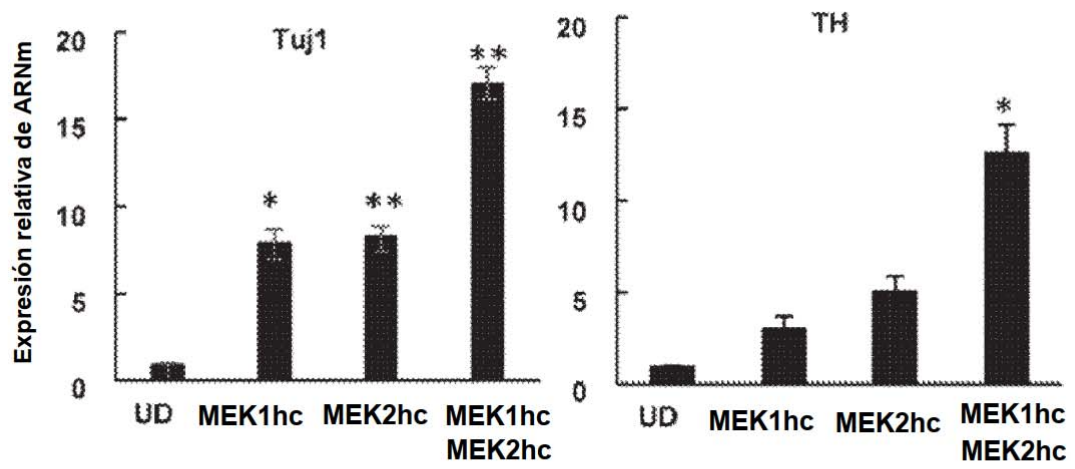


Figura 8b

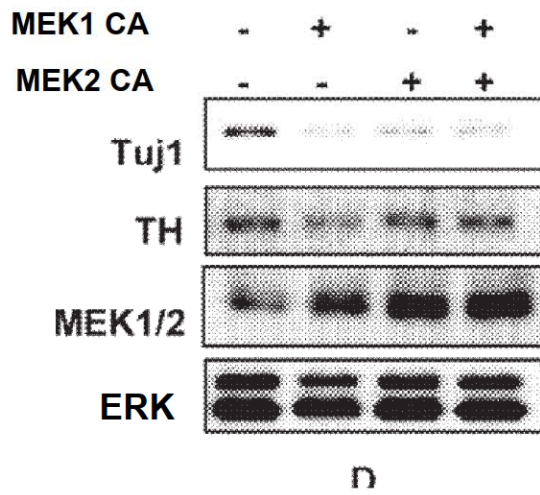
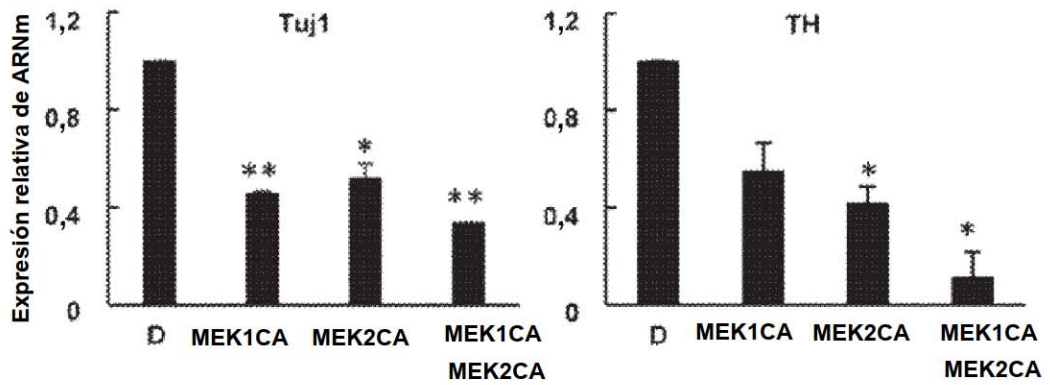


Figura 8c

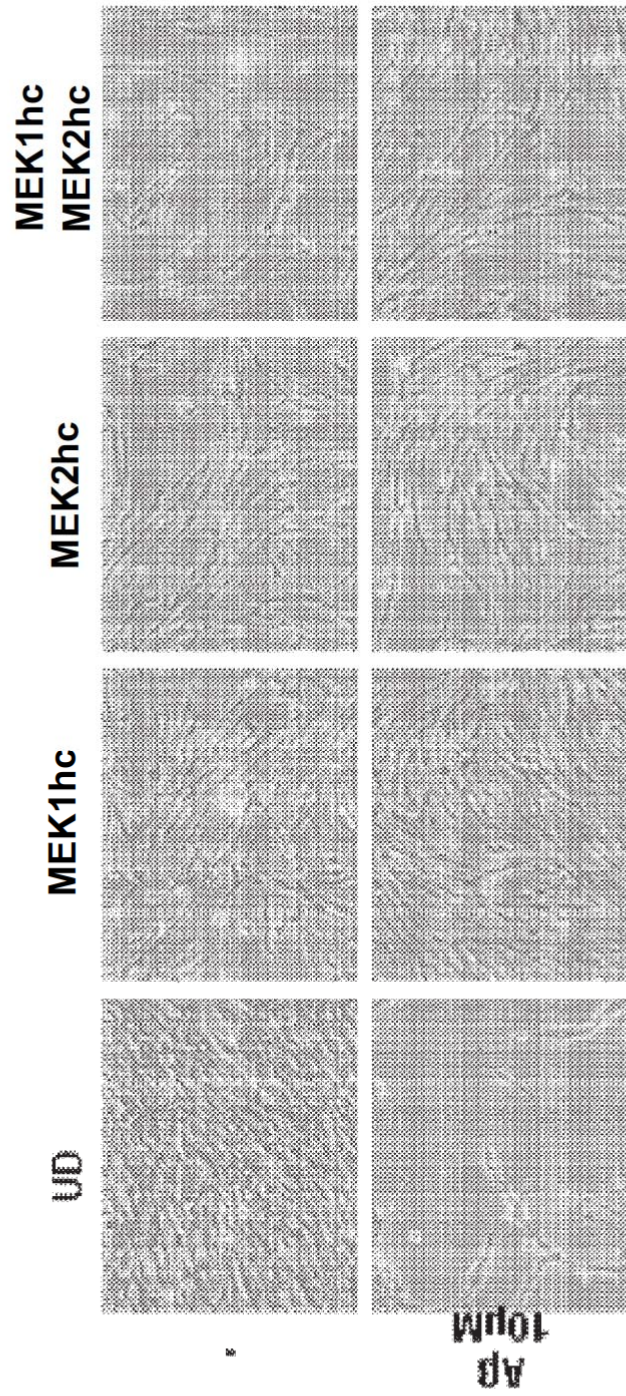


Figura 9a

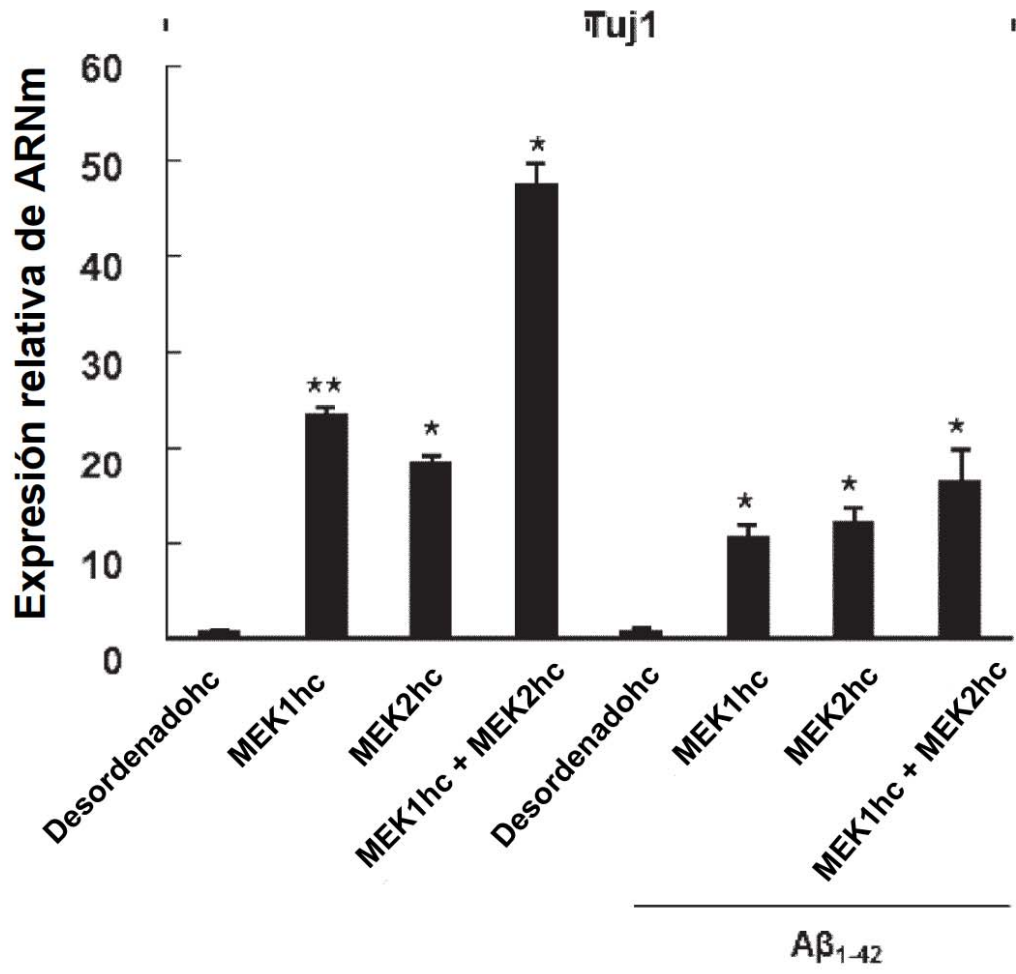


Figura 9b



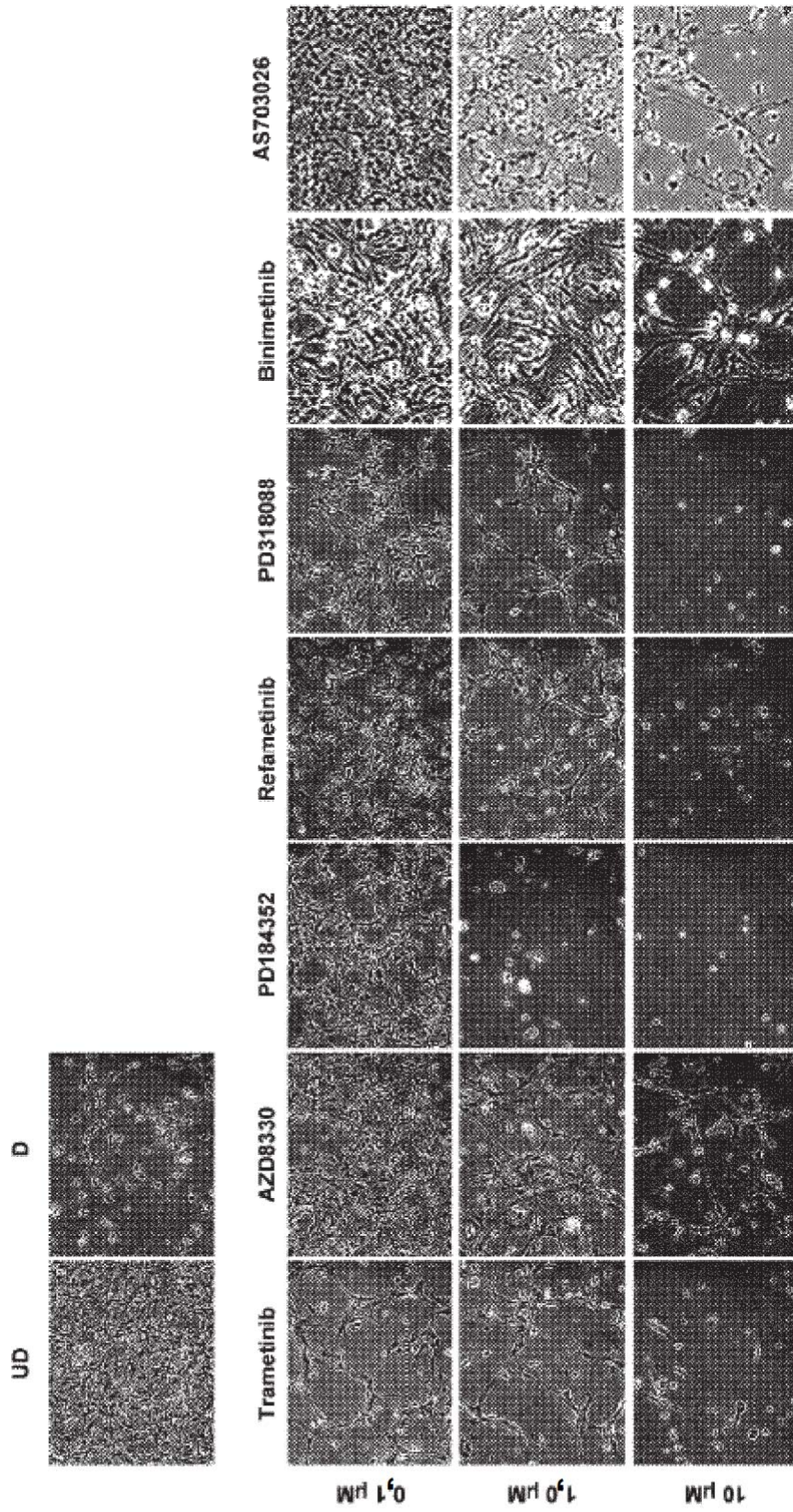


Figura 10a

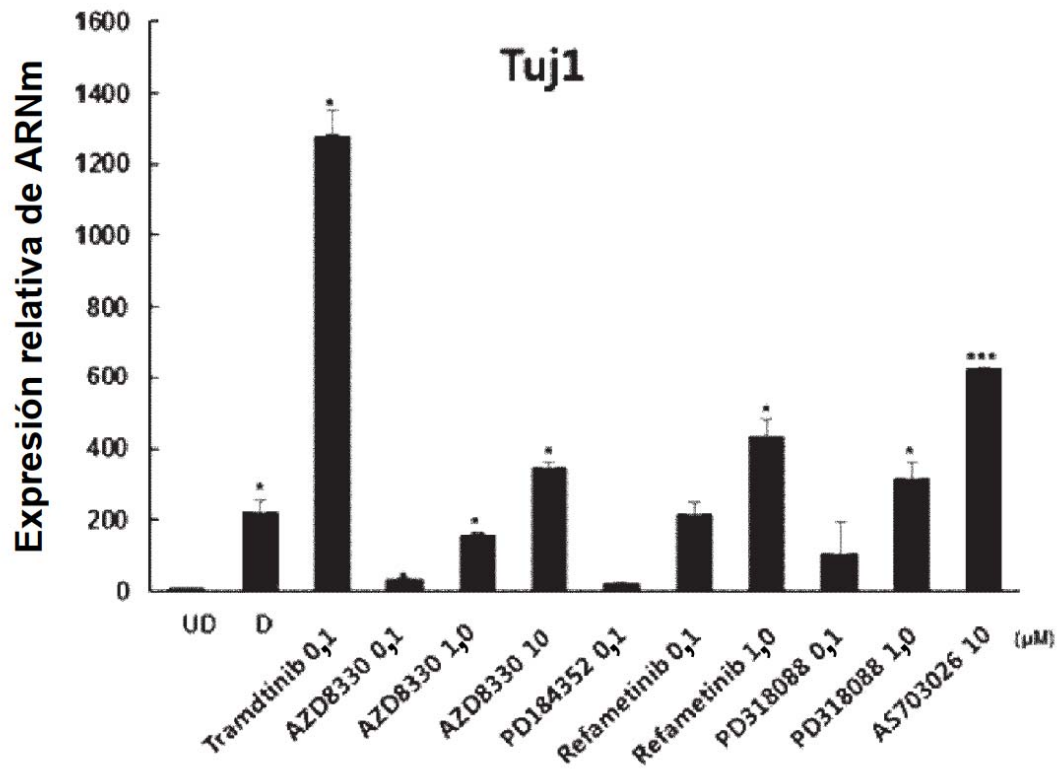


Figura 10b

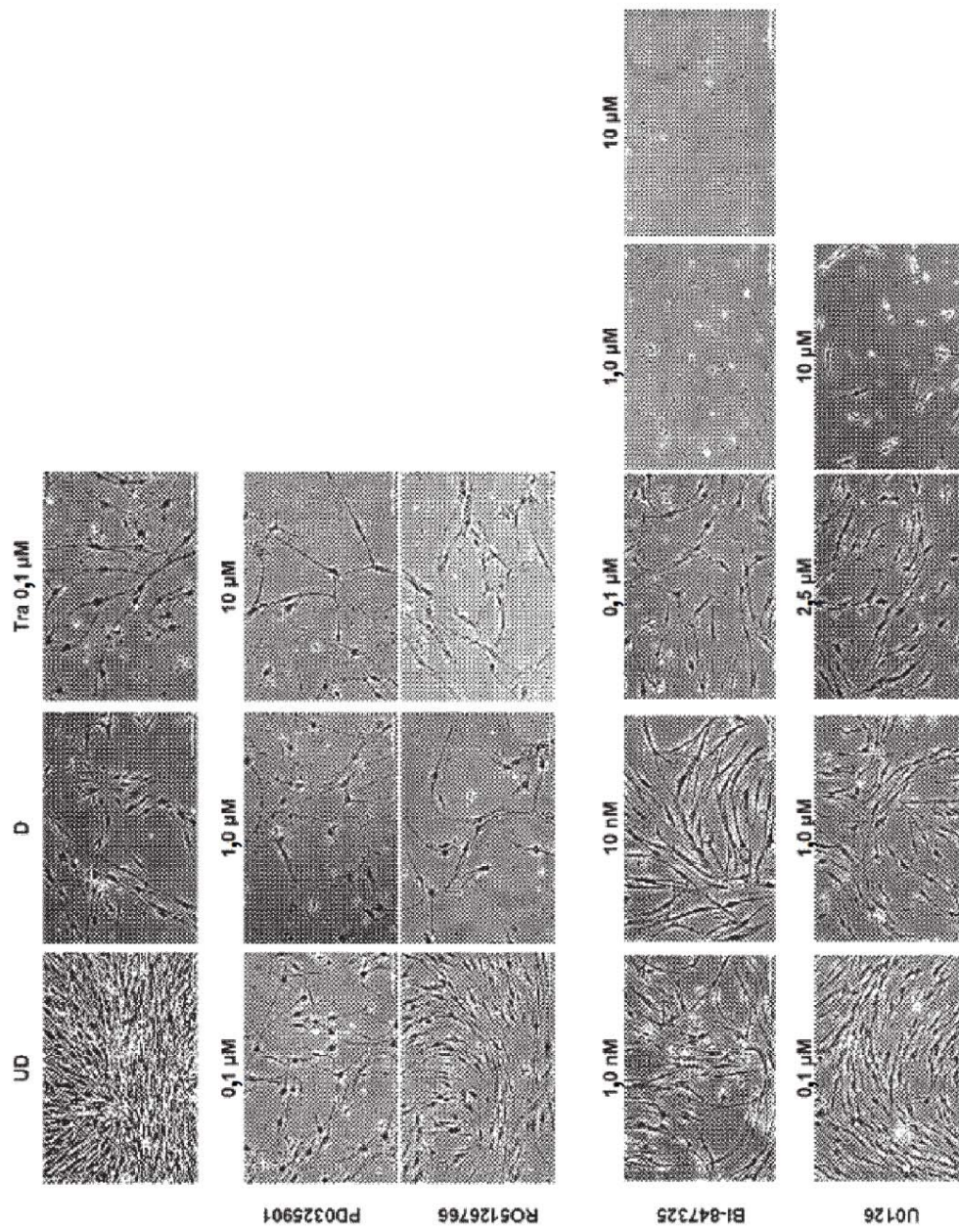


Figura 10c

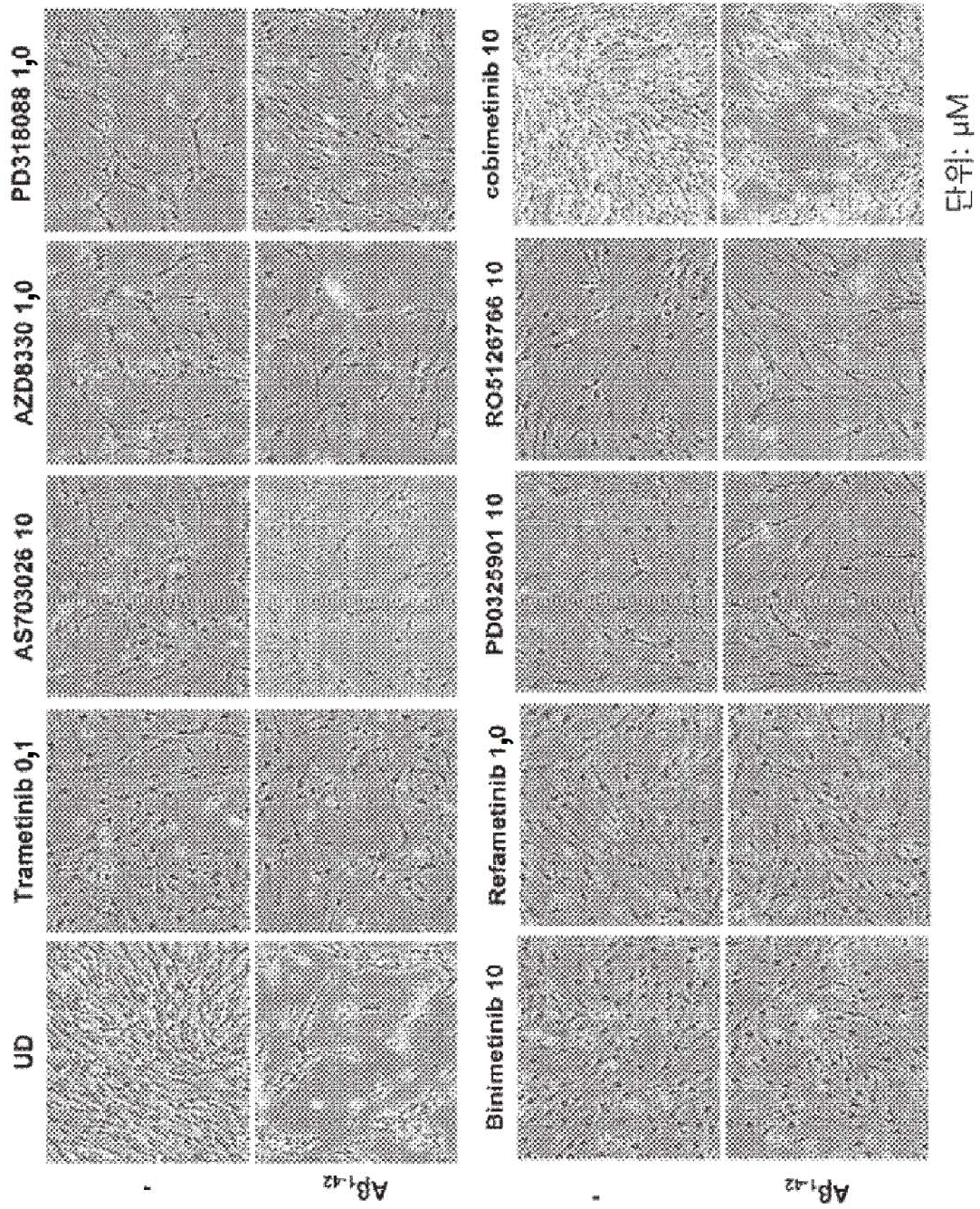


Figura 11

[Neurona de córtex somatosensorial\_Capa V]

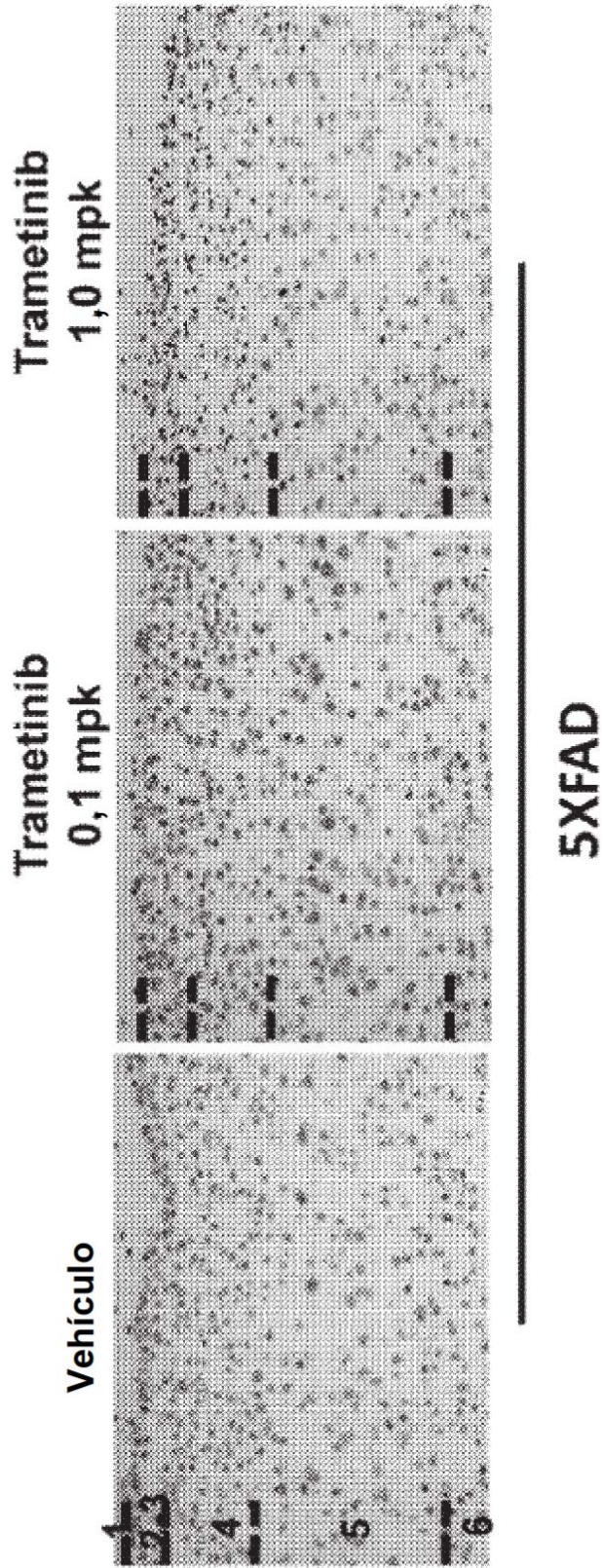


Figura 12a

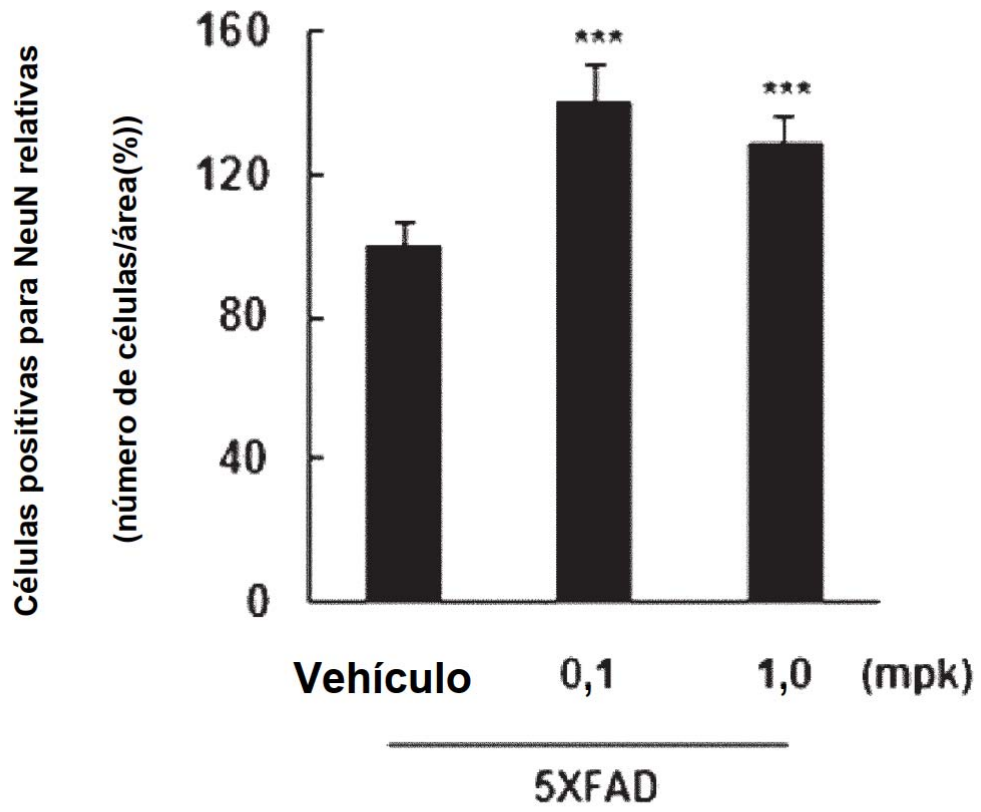


Figura 12b

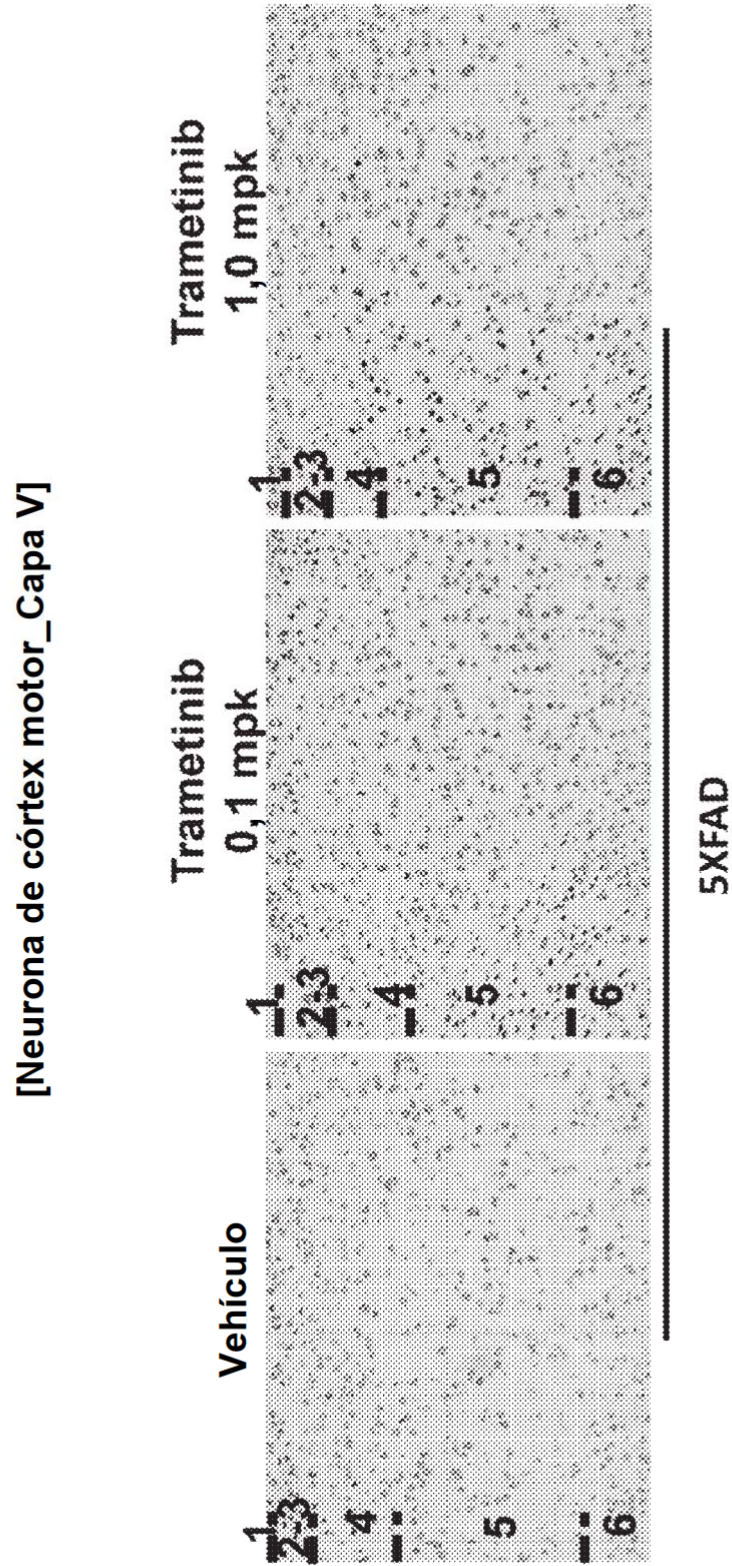


Figura 13a

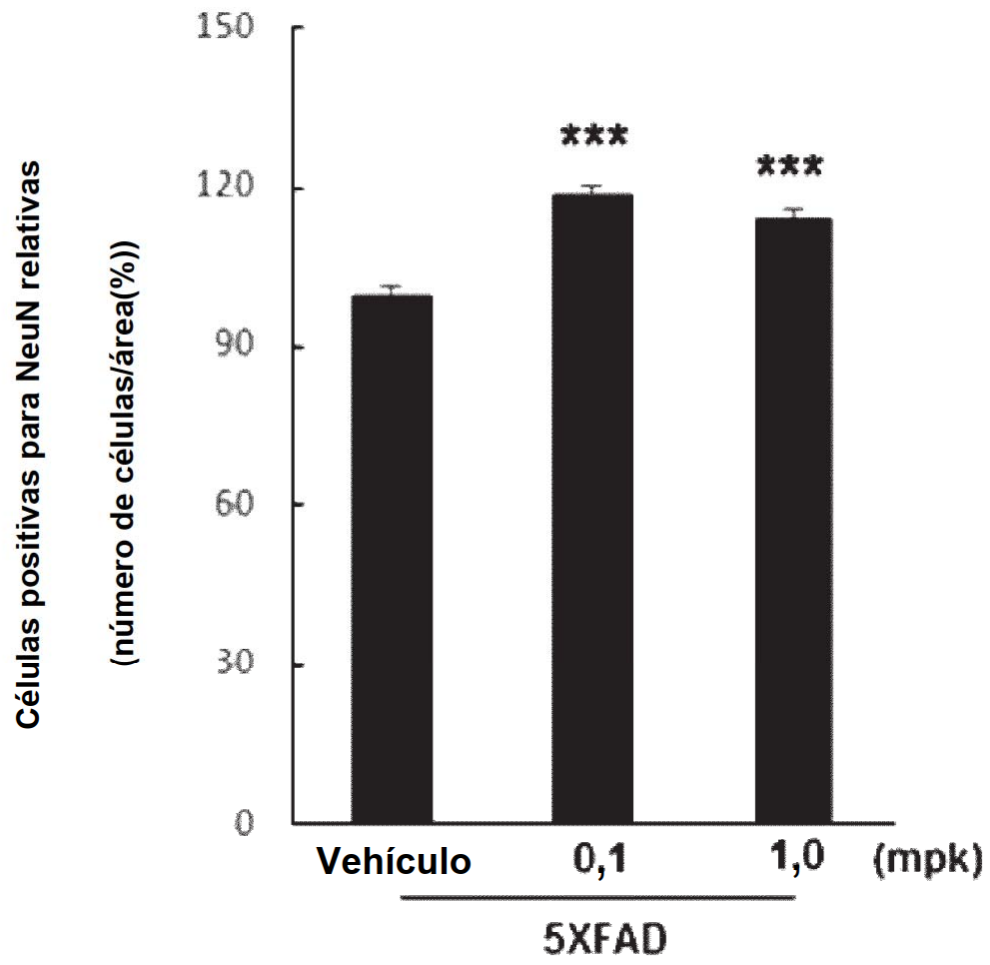


Figura 13b



[Neurona de hipocampo\_subículo]

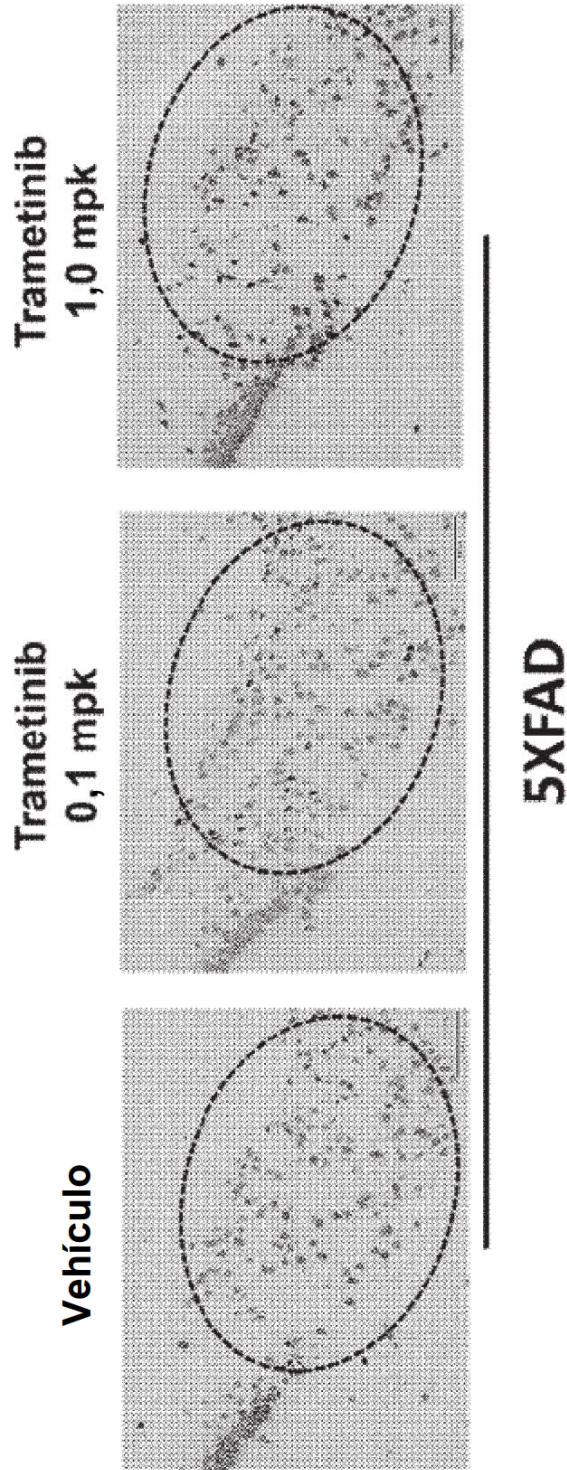


Figura 14a

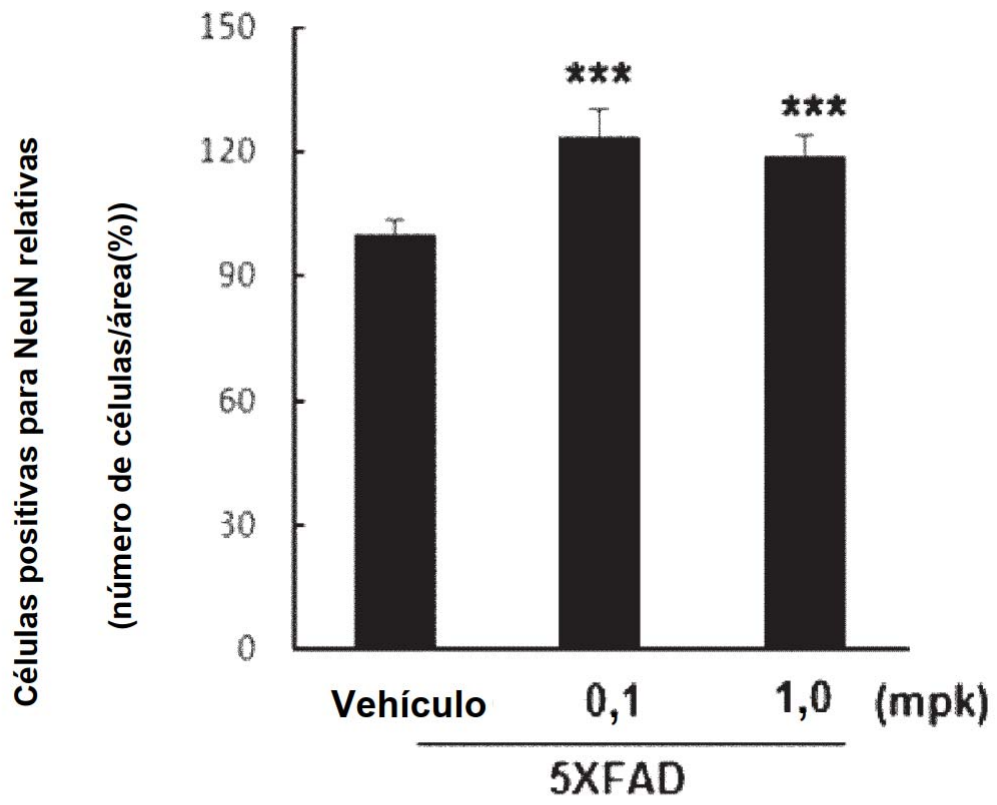


Figura 14b

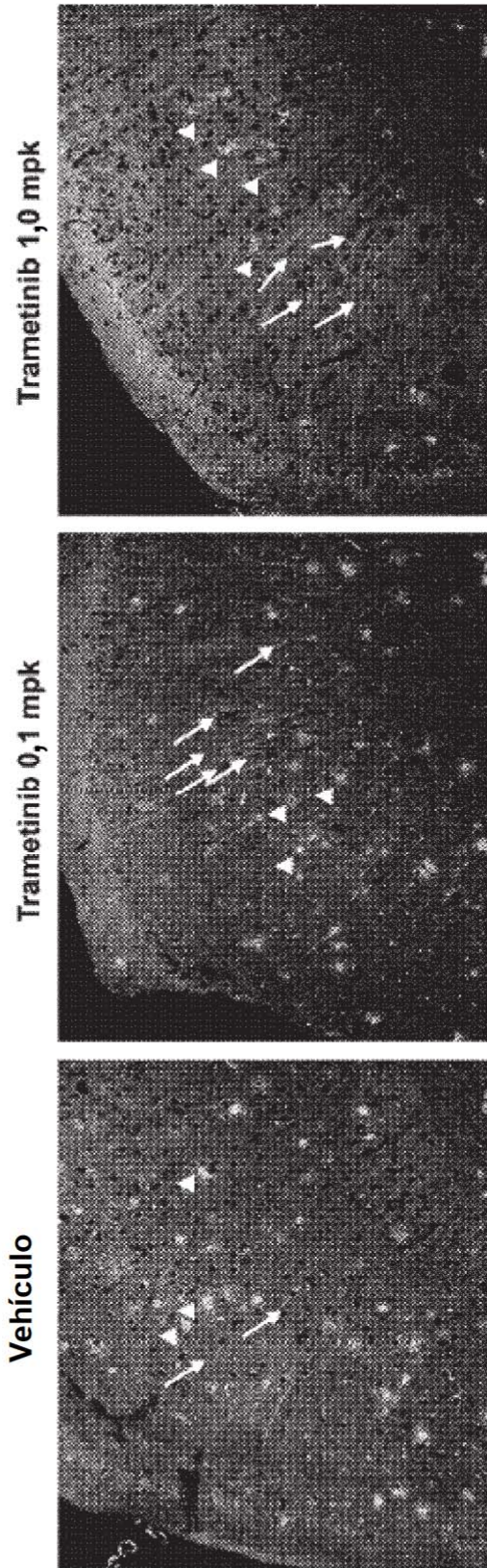


Figura 15

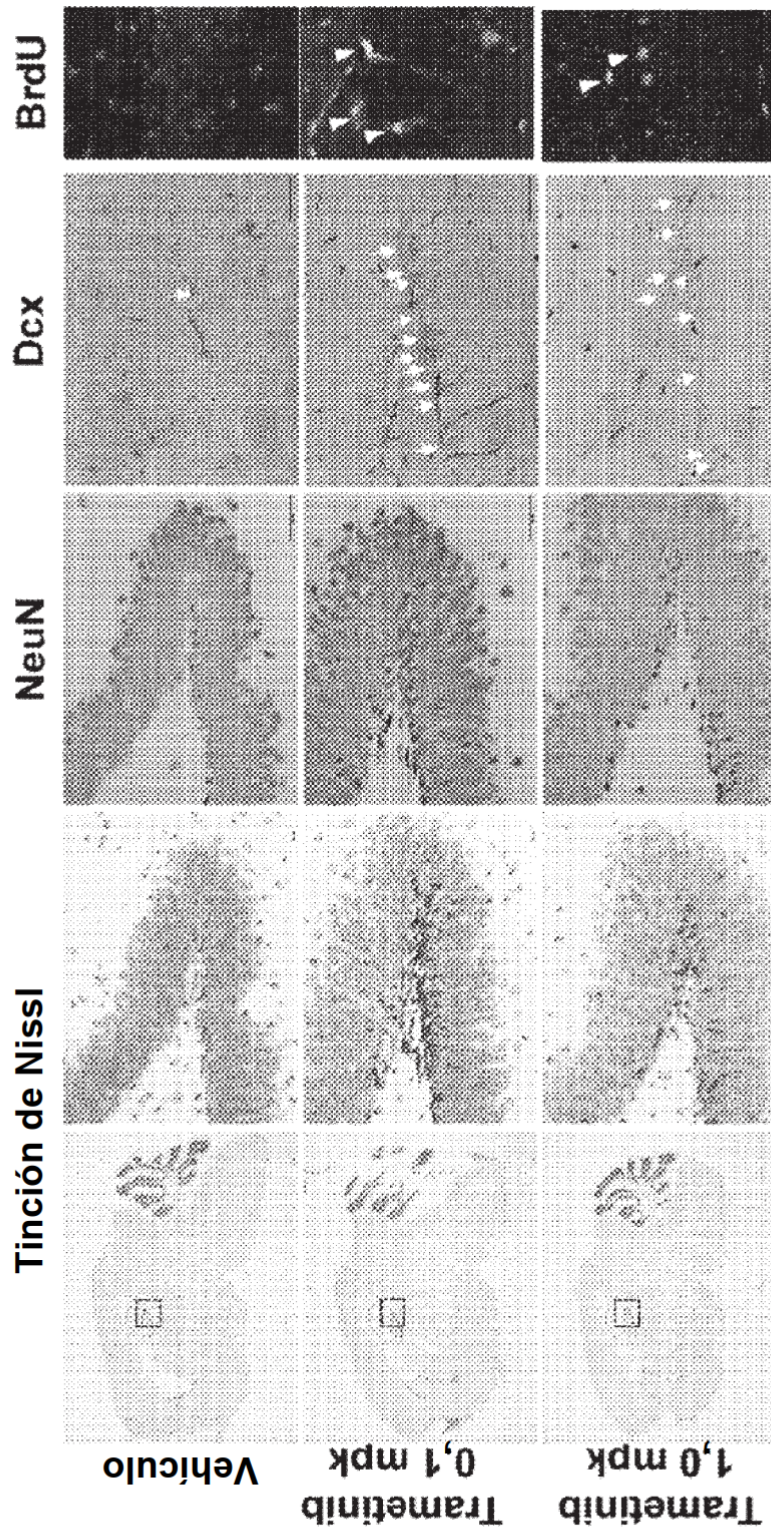


Figura 16a

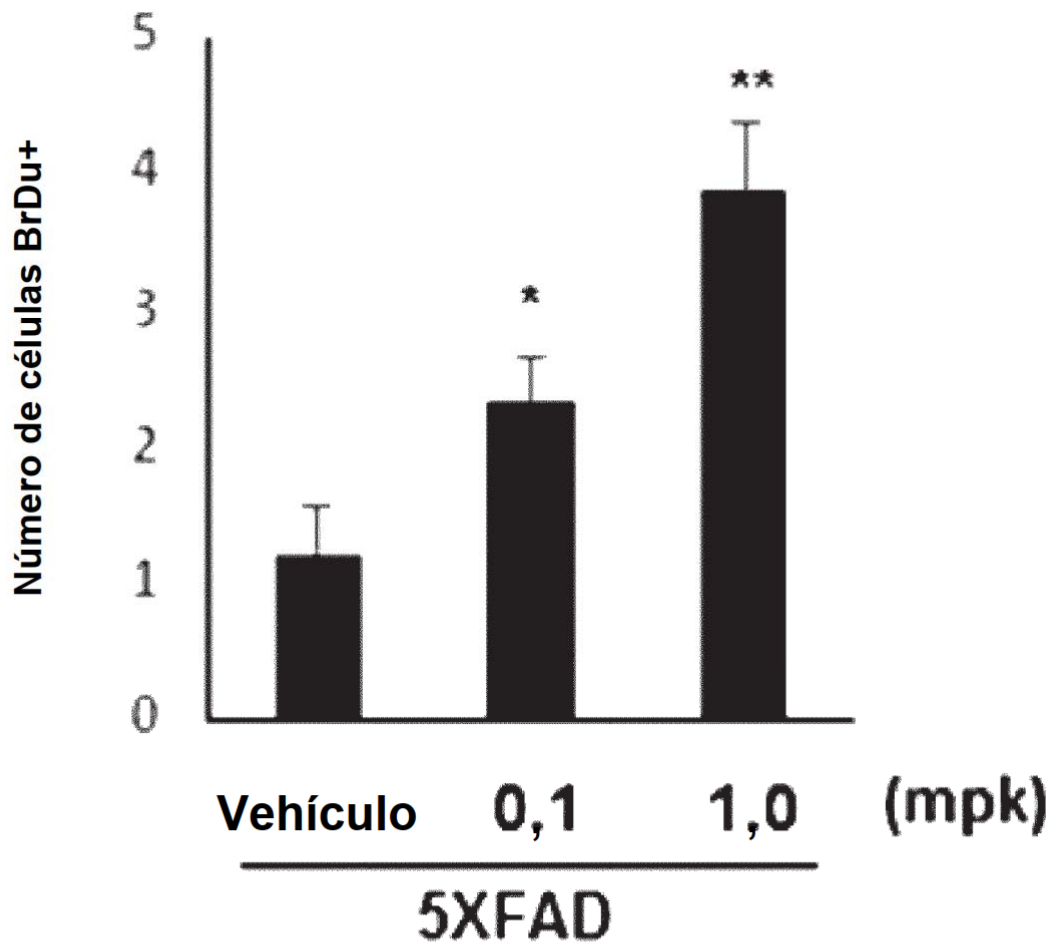


Figura 16b

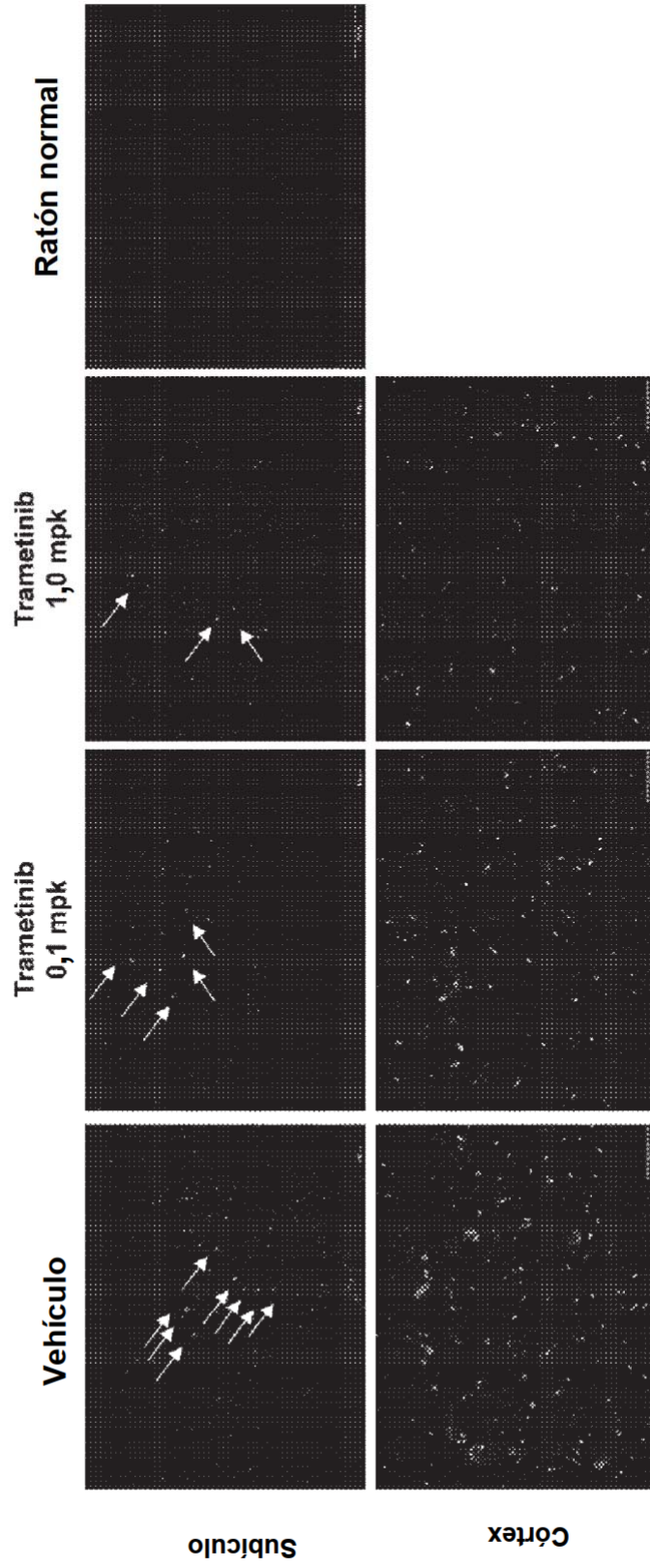


Figura 17

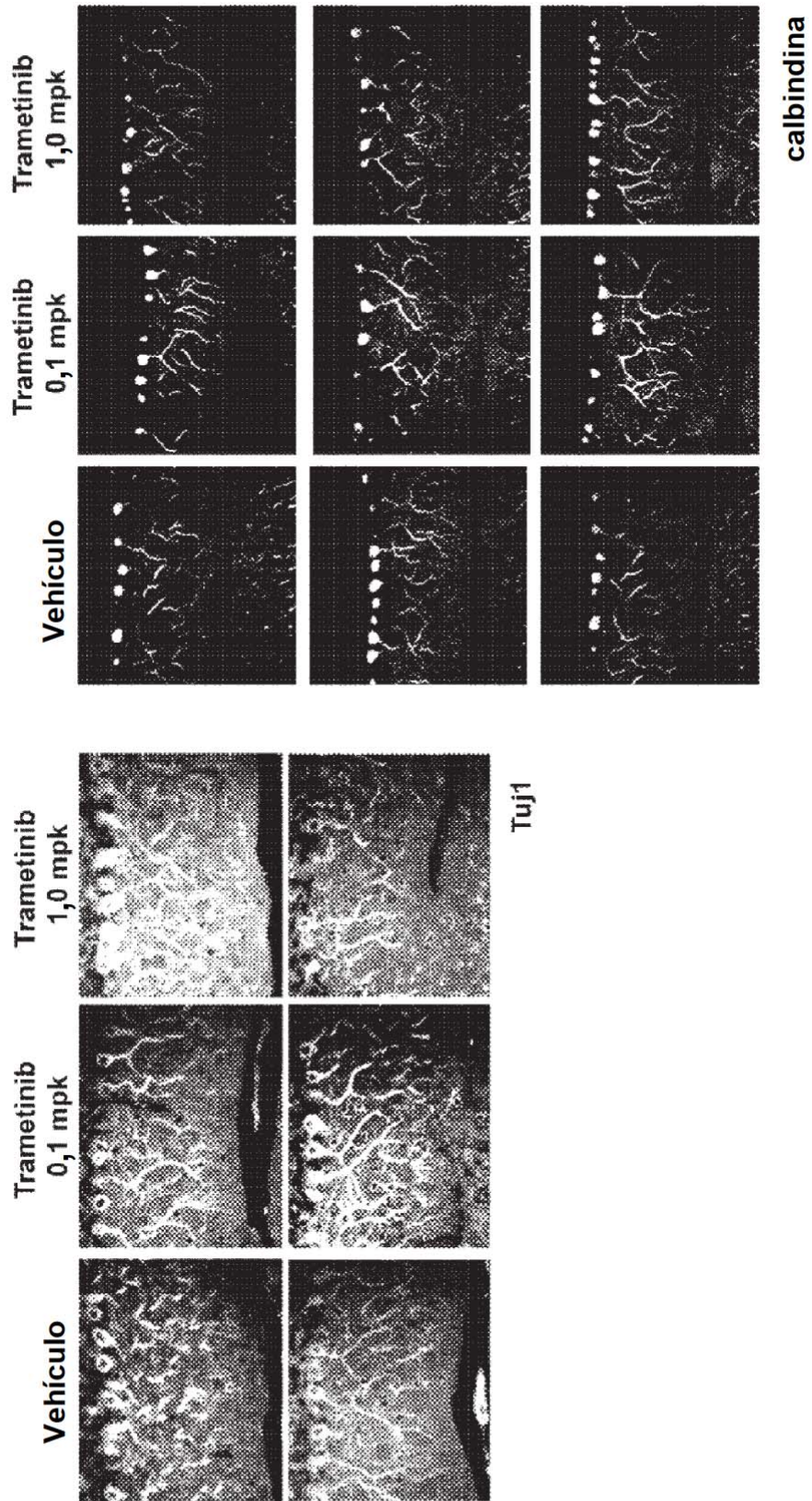


Figura 18

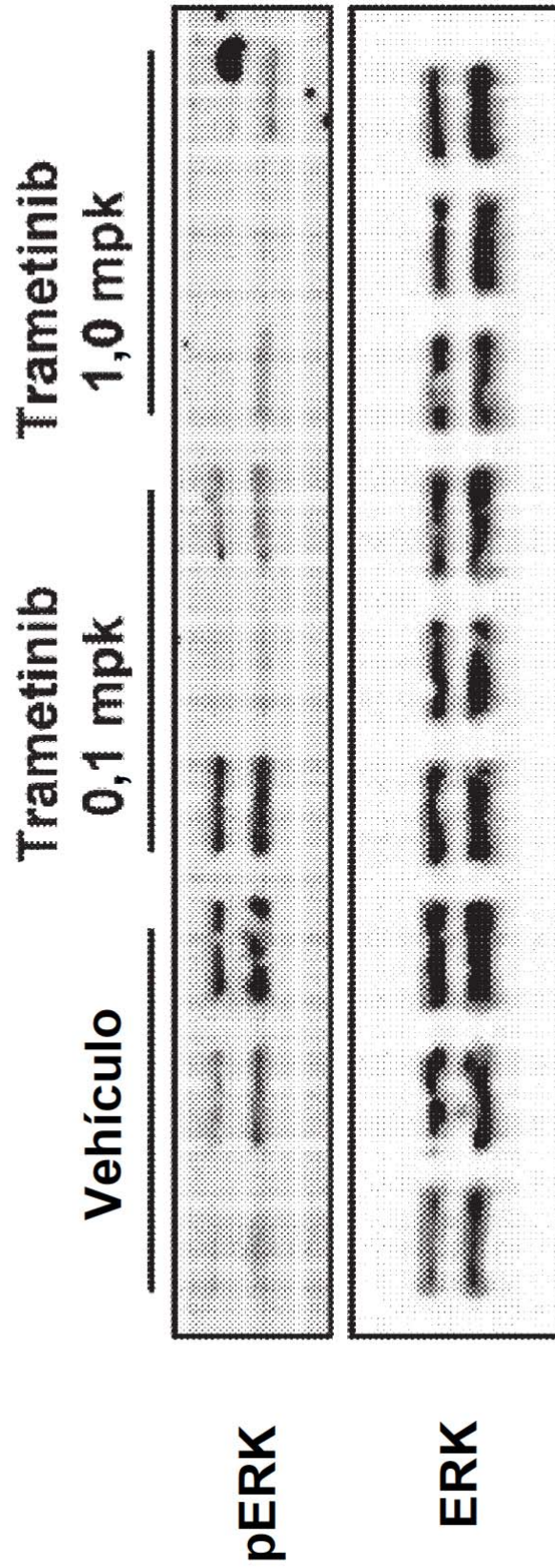


Figura 19a



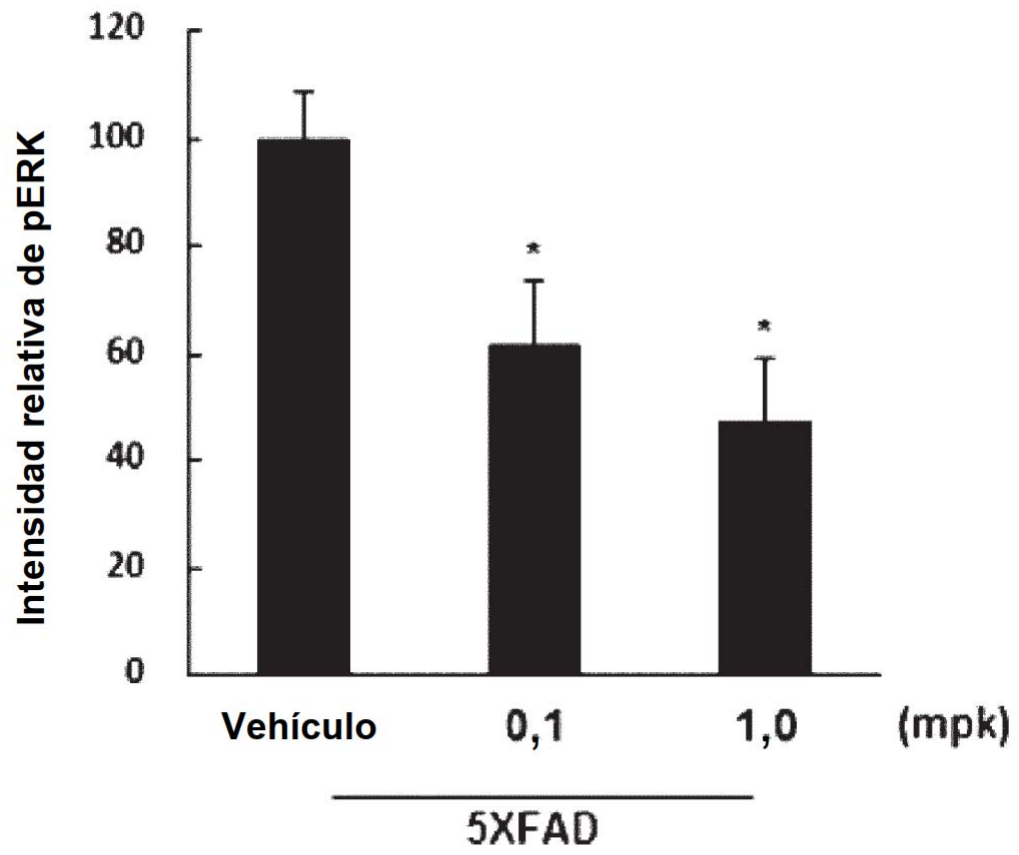


Figura 19b

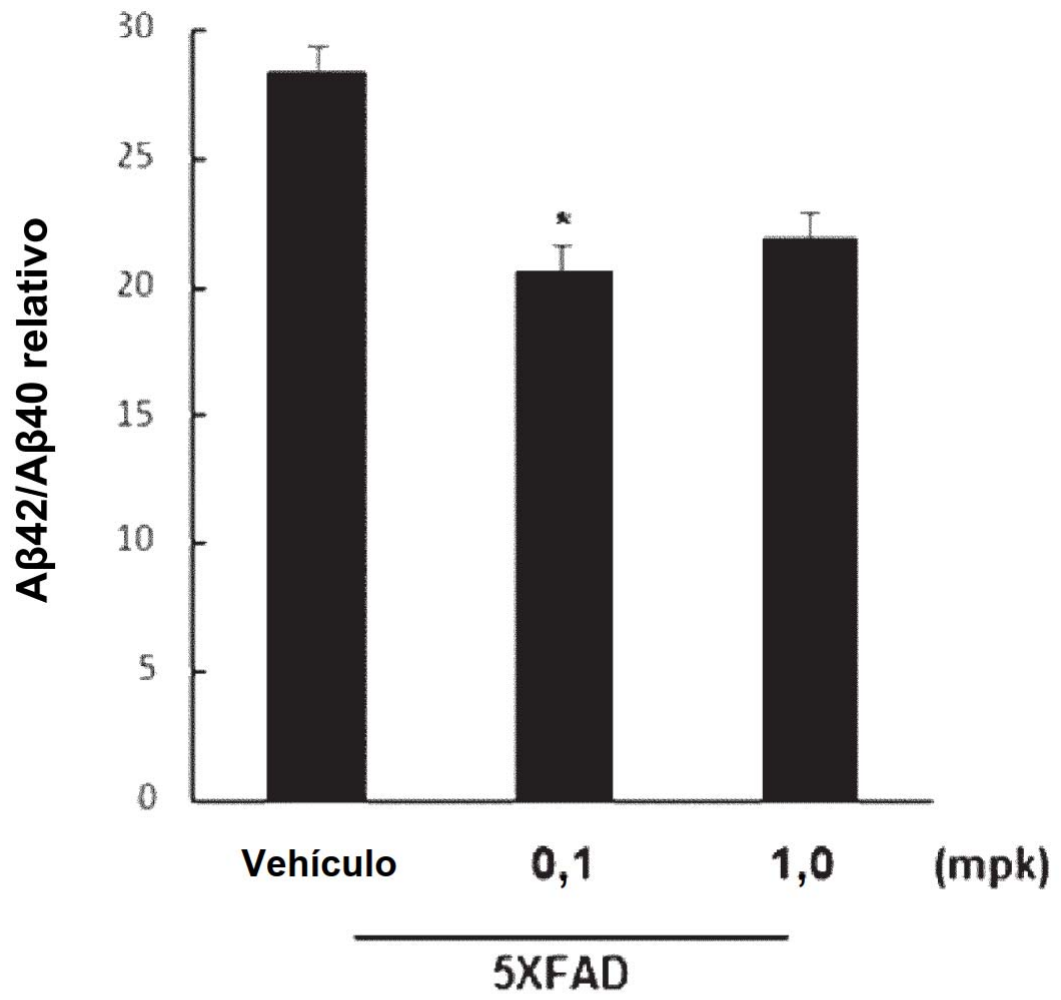


Figura 20