



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 720**

51 Int. Cl.:

A61K 38/26 (2006.01) **A61K 31/675** (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) **A61K 38/23** (2006.01)
A61K 38/27 (2006.01) **A61K 38/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03772495 .2**

96 Fecha de presentación : **20.11.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1583541**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.10.2005**

54

Título: **Compuestos y métodos para aumentar la neurogénesis.**

30

Prioridad: **20.11.2002 US 427912 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.05.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.05.2011

73

Titular/es: **NEURONOVA AB.**
Fiskartorpsvägen 15 A-D
114 33 Stockholm, SE

72

Inventor/es: **Bertilsson, Göran;**
Erlandsson, Rikard;
Frisen, Jonas;
Haegerstrand, Anders;
Heidrich, Jessica;
Hellström, Kristina;
Häggblad, Johan;
Jansson, Katarina;
Kortesmaa, Jarkko;
Lindquist, Per;
Främme, Hanna;
McGuire, Jacqueline;
Mercer, Alex;
Nyberg, Karl;
Ossoinak, Amina;
Patrone, Cesare;
Rönholm, Harriet;
Zachrisson, Olof y
Wikström, Lilian

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 359 720 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

Compuestos y métodos para aumentar la neurogénesis

SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la prioridad del documento USSN 60/427.912, presentado el 20 de noviembre de 2002.

CAMPO DE LA INVENCION

La invención está dirigida a métodos *in vitro* e *in vivo* de modulación de la neurogénesis. Se describen también agentes novedosos para aumentar los niveles intracelulares de AMPc, Ca²⁺ y para modular la neurogénesis.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Estudios efectuados en los años 60 proporcionaron la primera indicación de que se producían nuevas neuronas en el cerebro del mamífero adulto (Altman y Das, 1965, 1967). Sin embargo, llevó otras tres décadas, y el desarrollo de procedimientos técnicos refinados, rebatir el dogma de que la neurogénesis en mamíferos estaba limitada a la embriogénesis y al periodo perinatal (para revisión, véanse Momma *et al.*, 2000; Kuhn y Svendsen, 1999). Los neurocitoblastos (NSC en inglés) son una fuente de nuevas neuronas en el SNC de mamíferos. Los NSC se localizan en la zona endodivisional y/o subventricular (SVZ en inglés) que reviste el ventrículo lateral (Doetsch *et al.*, 1999; Johansson *et al.*, 1999b) y en la circunvolución dentada de la formación de hipocampo (Gage *et al.*, 1998). Estudios recientes han revelado el potencial de varias localizaciones adicionales de NSC en el SNC de adultos (Palmer *et al.*, 1999). La división asimétrica de los NSC mantiene su número de partida, mientras que genera una población de células precursoras o progenitoras de división rápida (Johansson *et al.*, 1999b). Las células progenitoras responden a una serie de indicadores que imponen la extensión de su proliferación y su destino, tanto en términos de diferenciación como de posición.

25 Los NSC del sistema ventricular en el adulto son probablemente las contrapartidas de los citoblastos de la zona ventricular embrionaria que reviste el tubo neural. La progenie de estas células embrionaria migra afuera formando el SNC en forma de neuronas y neuroglia diferenciadas (Jacobson, 1991). Los NSC subsisten en la pared ventricular lateral (LVW en inglés) del adulto, generando progenitores neuronales que migran a lo largo de la corriente migratoria rostral hasta el bulbo olfativo. Allí se diferencian en células granulares y neuronas periglomerulares (Lois y Álvarez-Buylla, 1993). En el bulbo olfativo ocurre una muerte neuronal sustancial, creando la necesidad de un reemplazo continuo de las neuronas perdidas que se satisface mediante los progenitores migratorios derivados de la LVW (Biebl *et al.*, 2000). Además, hay indicaciones de que las neuronas perdidas de otras regiones cerebrales pueden reemplazarse por progenitores de la LVW que se diferencian en el fenotipo de las neuronas perdidas con proyecciones y sinapsis neuronales adecuadas con el tipo de célula diana correcto (Snyder *et al.*, 1997; Magavi *et al.*, 2000).

35 Se han establecido técnicas de cultivo *in vitro* para identificar las señales externas implicadas en la regulación de la proliferación y diferenciación de NSC (Johansson *et al.*, 1999b; Johansson *et al.*, 1999a). Los mitógenos EGF y FGF básico permiten la multiplicación del cultivo celular de progenitores nerviosos aislados a partir de la pared del ventrículo y el hipocampo (McKay, 1997; Johansson *et al.*, 1999a). Estos progenitores en división permanecen en estado indiferenciado y crecen en grandes clones de células conocidos como neuroesferas. Tras la retirada de los mitógenos y la adición de suero, los progenitores se diferencian en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, que son los tres linajes celulares del cerebro (Doetsch *et al.*, 1999; Johansson *et al.*, 1999b). Pueden añadirse factores de crecimiento específicos para alterar las proporciones de cada tipo celular formado. Por ejemplo, el CNTF actúa dirigiendo los progenitores neuronales a un destino astrocítico (Johe *et al.*, 1996; Rajan y McKay, 1998). La hormona tiroidea, triyodotironina (T3), promueve la diferenciación en oligodendrocitos (Johe *et al.*, 1996), mientras que el PDGF potencia la diferenciación neuronal por células progenitoras (Johe *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1997). Recientemente, se ha mostrado que incluso las neuronas regeneradas adultas se integran en el circuito cerebral existente y contribuyen a mejorar los déficit neurológicos (Nakatomi *et al.*, 2002). De forma interesante, las observaciones han mostrado también que ocurre neurogénesis no solo al nivel del bulbo olfativo y el hipocampo. A este respecto, se ha sugerido por Zhao *et al.* que este proceso puede ocurrir también en la sustancia negra de ratón adulto, abriendo un nuevo campo de investigación para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Zhao *et al.*, 2003).

50 La capacidad de multiplicar los progenitores neuronales y manipular su destino celular tiene enormes implicaciones para terapias de trasplante por enfermedades neurológicas en que se pierden tipos celulares específicos. La enfermedad de Parkinson (EP), por ejemplo, se caracteriza por la degeneración de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra. Los tratamientos de trasplante previos para pacientes con EP han usado tejido fetal tomado del mesencéfalo ventral en el momento en que las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra están experimentando diferenciación terminal (Herman y Abrous, 1994). Estas células se han injertado en el cuerpo estriado donde forman contactos sinápticos con las neuronas estriales hospedadoras, su diana sináptica normal. Esto restaura el recambio y liberación de dopamina a niveles normales con beneficios funcionales significativos para el paciente (Herman y Abrous, 1994) (para revisión, véase Bjorklund y Lindvall, 2000). Sin embargo, el injerto de tejido fetal está limitado por consideraciones éticas y la falta de tejido donante. La

multiplicación y manipulación de NSC adultos puede proporcionar potencialmente una serie de células bien caracterizadas para estrategias basadas en trasplante para enfermedades neurodegenerativas tales como EP. Con este fin, la identificación de los factores y rutas que gobiernan la proliferación y diferenciación de los tipos celulares nerviosos es radicalmente importante.

5 Se ha mostrado en estudios que la infusión intraventricular tanto de EGF como de FGF básico induce la proliferación en la población de células de pared ventricular adulta. En el caso de EGF, se ha observado una extensa migración de progenitores al parénquima estriatal vecino (Craig *et al.*, 1996; Kuhn *et al.*, 1997). El EGF aumenta la diferenciación en linaje neuroglial y reduce la generación de neuronas (Kuhn *et al.*, 1997).
10 Adicionalmente, la infusión intraventricular de BDNF en ratas adultas aumenta el número de neuronas recién generadas en el bulbo olfativo y la corriente migratoria rostral, y en estructuras parenquimáticas incluyendo núcleo estriado, región septal, tálamo e hipotálamo (Pencea *et al.*, 2001). Por tanto, varios estudios han mostrado que puede estimularse la proliferación de progenitores en la SVZ del LVW y que su linaje puede guiarse a destinos neuronales o neurogliales. Sin embargo, el número de factores conocidos por afectar a la neurogénesis *in vivo* es pequeño y sus efectos son adversos o limitados. Por consiguiente, es necesario identificar otros factores que
15 puedan estimular selectivamente la actividad de neurocitoblastos, la proliferación de progenitores nerviosos y afectar a la diferenciación en el fenotipo diana. Dichos factores pueden usarse para la estimulación *in vivo* de la neurogénesis y el cultivo de células para terapia de trasplante.

20 Ca^{2+} y AMPc representan importantes segundos mensajeros intracelulares. Ambos pueden activarse después de varios estímulos externos y se ha mostrado que se activan por varios receptores acoplados con proteína G (GPCR) (Neves *et al.*, 2002). La cascada del AMPc desempeña un papel en la supervivencia y plasticidad neuronal. Las células neuroepiteliales tienen sistemas de movilización de Ca^{2+} que pueden activarse principalmente por el sistema receptor muscarínico durante el desarrollo cerebral.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCIÓN

25 Una realización de la invención está dirigida al menos a un agente que eleva los niveles de AMPc intracelular en tejido nervioso, en el que dicho agente se selecciona del grupo consistente en tirocalcitonina, calcitonina, péptido de tipo glucagón 1 (7-37), exendina 3 y exendina 4 y análogos de péptido de tipo glucagón 1 (7-37), exendina 3 o exendina 4, en el que dicho análogo de péptido de tipo glucagón 1 (7-37), exendina 3 o exendina 4
30 interacciona con un receptor acoplado con proteína G (GPCR) que es el receptor de péptido de tipo glucagón 1, y una combinación de los mismos; o un análogo de AMPc, en el que dicho análogo de AMPc se selecciona del grupo consistente en 8-pCPT-2-O-Me-AMPc, 8-Br-AMPc, Rp-AMPSc, 8-CI-AMPc, dibutilil-AMPc, pCPT-AMPc y monofosfato de 3',5'-N6-monobutililadenosina cíclico, para uso en el aumento de la neurogénesis en el tejido nervioso de un paciente que exhibe un trastorno del sistema nervioso central seleccionado del grupo consistente en trastornos neurodegenerativos, trastornos isquémicos, traumatismos neurológicos y trastornos del aprendizaje y la memoria, en el que el agente aumenta la neurogénesis en el paciente, aumentando así la neurogénesis en el tejido
35 nervioso del paciente, y en el que aumentar la neurogénesis es aumentar la proliferación, diferenciación, migración o supervivencia de un neurocitoblasto adulto en dicho tejido nervioso. En los usos, se administra uno o más agentes moduladores de la neurogénesis al paciente.

40 El agente modulador de la neurogénesis de la invención se selecciona del grupo consistente en tirocalcitonina, calcitonina, péptido de tipo glucagón 1 (7-37), exendina 3 y exendina 4 y análogos de los mismos, y una combinación de los mismos, o un análogo de AMPc, en el que dicho análogo de AMPc se selecciona del grupo consistente en 8-pCPT-2-O-Me-AMPc, 8-Br-AMPc, Rp-AMPSc, 8-CI-AMPc, dibutilil-AMPc, pCPT-AMPc y monofosfato de 3',5'-N6-monobutililadenosina cíclico. Esta divulgación muestra también que pueden usarse como agentes moduladores de la neurogénesis un inhibidor de fosfodiesterasa específica de AMPc, un activador de adenilato ciclasa y un activador de la ribosilación de ADP de una proteína G estimulante. Estos agentes
45 moduladores de la neurogénesis se enumeran en la descripción detallada. Los trastornos que pueden tratarse mediante los métodos de la invención se enumeran también en la sección de descripción detallada e incluyen, al menos, enfermedad de Parkinson y trastornos parkinsonianos, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, síndrome de Shy-Drager, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de cuerpos de Lewy, isquemia de la médula espinal, apoplejía isquémica, infarto cerebral, lesión de la médula espinal y lesión del cerebro y la médula espinal relacionada con cáncer, demencia multiinfarto y demencia geriátrica.

50 El nivel de administración puede ser de al menos 0,001 ng/kg/día, al menos 0,01 ng/kg/día, 0,1 ng/kg/día, al menos 1 ng/kg/día, al menos 5 mg/kg/día, al menos 10 mg/kg/día o al menos 50 mg/kg/día. En una realización preferida, la administración eleva los niveles intracelulares de AMPc al menos un 20% por encima de lo normal. La administración puede conducir a concentraciones del agente en tejido de aproximadamente 0,0001 nM a 50 nM.

La administración puede ser sistémica o directa al SNC de un paciente. Otras vías de administración incluyen la administración oral, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intracerebroventricular, intraparenquimática, intratecal, intracraneal, bucal, mucosa, nasal y rectal, o la administración mediante un sistema de suministro de liposomas.

60 En usos alternativos descritos en la presente memoria, el agente modulador de la neurogénesis eleva los niveles de Ca^{2+} intracelular en una célula de un tejido nervioso del paciente. En dichos usos, el agente modulador de

la neurogénesis puede ser antagonista de receptor de amilina/calcitonina (8-32), ANP (humana), CGRP (8-37), endotelina 1 humana, bovina, canina, de ratón, porcina o de rata, g-MSH, factor de liberación de hormona de crecimiento, MGOP 27, PACAP-38, sarafotoxina S6a, sarafotoxina S6b, sarafotoxina S6c, septida, somatostatina 28, toxina del cólera de *Vibrio cholerae*, angiotensina II (humana sintética), [D-Pen2-5]-encefalina, adrenomedulina, endotelina 1 (humana, porcina) y equivalentes funcionales de los mismos.

Otra realización de la invención está dirigida a un método *in vitro* para aumentar los niveles de AMPc en un neurocitoblasto adulto mediante la administración de una cantidad eficaz de un agente seleccionado del grupo consistente en tirocalcitonina, calcitonina, péptido de tipo glucagón 1 (7-37), exendina 3 y exendina 4, y una combinación de los mismos, a la célula. En esta divulgación, administrar un agente a una célula comprende poner en contacto una célula con un agente. Otros agentes elevadores de AMPc descritos en la presente memoria pueden ser hormona adrenocorticotrópica, endotelina 1 (humana, porcina), MECA, HE-NECA, [Cys3,6, Tyr8, Pro9]-sustancia P, [D-Arg0, Hyp3, Igl5, D-Igl7, Oic8]-bradiginina, adrenomedulina (humana), [Des-Arg9, Leu8]-bradiginina, [Des-Arg9]-bradiginina, [D-Pen2-5]-encefalina, [D-pGlu1, D-Phe2, D-Trp3,6]-LH-RH, adrenomedulina (26-52), adrenomedulina (22-52), neendorfina α , β -MSH, α -MSH, CART (61-102), colecistocinina octapeptídica [CCK(26-33)], DTLET, DDAVP, eledoisina, γ -MSH, neurocinina α , PACAP-38, β -ANP, galanina (1-13)-espantida-amida, M40, [Sar9, Met (0)11]-sustancia P, sarafotoxina S6a, sarafotoxina S6b, sarafotoxina S6c, [Nle8,18, Tyr34]-hormona paratiroidea (1-34)-amida (humana), ACTH (humana), urotensina II (Globy), péptido intestinal vasoactivo (humano, porcino, de rata, norbinaltorfimina, proteína relacionada con el agutí (87-132)-amida (humana) y una combinación de los mismos. La célula puede estar en un paciente, en cuyo caso el uso es para estimular el AMPc intracelular en una célula de un paciente. El método de administración y los niveles de administración pueden ser cualquier método o nivel examinados para agentes moduladores de la neurogénesis en esta divulgación.

Otra realización de la invención está dirigida a un método para inducir la neurogénesis *in vitro*. En el método, se cultiva una población de células nerviosas (que comprende neurocitoblastos adultos). Se administra entonces al menos un agente modulador de la neurogénesis a la célula. Se repite la administración, si es necesario, hasta conseguir el nivel deseado de neurogénesis. En dichos métodos, aumentar la neurogénesis es aumentar la proliferación, diferenciación, migración o supervivencia de dichos neurocitoblastos adultos, y el agente se selecciona del grupo consistente en tirocalcitonina, calcitonina, péptido de tipo glucagón 1 (7-37), exendina 3 y exendina 4 y análogos de péptido de tipo glucagón 1 (7-37), exendina 3 o exendina 4, en el que dicho análogo de péptido de tipo glucagón 1 (7-37), exendina 3 o exendina 4 interacciona con un receptor acoplado con proteína G (GPCR) que es el receptor de péptido de tipo glucagón 1, y una combinación de los mismos; o un análogo de AMPc, en el que dicho análogo de AMPc se selecciona del grupo consistente en 8-pCPT-2-O-Me-AMPc, 8-Br-AMPc, Rp-AMPSc, 8-Cl-AMPc, dibutiril-AMPc, pCPT-AMPc y monofosfato de 3',5'-N6-monobutiriladenosina cíclico. El neurocitoblasto adulto puede cultivarse a partir de tejido tal como corteza, tubérculo olfativo, retina, región septal, eminencia ganglionar lateral, eminencia ganglionar medial, amígdala, hipocampo, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo ventral y dorsal, tronco encefálico, cerebelo y médula espinal.

Esta divulgación muestra también el papel de los receptores acoplados con proteína G (GPCR) y sus ligandos en la biología de citoblastos *in vitro* e *in vivo*. La invención está basada en los datos de expresión (datos de colección de PCR y ADNc) y los datos de proliferación *in vivo*, que muestran que la modulación de los niveles de AMPc o Ca^{2+} intracelulares mediante diversos GPCR puede usarse para influir en la proliferación, migración, diferenciación o supervivencia de neurocitoblastos adultos (aNSC) y su progenie *in vitro*, así como *in situ* en el cerebro intacto. Estos datos indican también a la CREB como un nexo posterior entre los GPCR y la transcripción.

En todos los casos, la célula o tejido nervioso pueden ser de cualquier paciente mamífero adulto tal como rata, ratón, gato, perro, caballo, cerdo, cabra, vaca y en particular ser humano.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURA 1: La fosforilación de CREB después de tratamiento con PACAP y toxina del cólera ocurre de manera reproducible tanto en neurocitoblastos adultos de ratón como humanos, como se muestra por transferencia Western. El panel superior muestra la regulación positiva de la fosforilación de CREB en neurocitoblastos adultos de ratón y ser humano después de tratamiento con PACAP. El panel inferior muestra la regulación positiva de la fosforilación de CREB tanto en neurocitoblastos adultos de ratón como humanos después de tratamiento con toxina del cólera.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los tratamientos tradicionales de enfermedades y lesiones nerviosas se han centrado en la prevención de la muerte neuronal (concretamente, apoptosis o necrosis). En contraposición, esta invención está dirigida a tratamientos terapéuticos novedosos para enfermedades y lesiones neurológicas basados en la inducción de la neurogénesis, en particular, la proliferación de neurocitoblastos adultos. Según la invención, se han identificado agentes moduladores de la neurogénesis clave que inducen la proliferación y/o diferenciación en neurocitoblastos adultos. Dichos agentes moduladores de la neurogénesis son útiles para efectuar la neurogénesis para el tratamiento de enfermedades y lesiones neurológicas. Como se muestra en la presente memoria, los niveles aumentados de AMPc y/o Ca^{2+} desencadenan la proliferación de neurocitoblastos. En algunos casos, esta inducción sigue a la activación de receptores acoplados con proteína G (GPCR). Los datos dados a conocer en la presente memoria indican que puede usarse el aumento de los niveles de AMPc y/o Ca^{2+} intracelular mediante diversos

compuestos (por ejemplo, ligandos de GPCR) para aumentar la proliferación de neurocitoblastos adultos. Además, los datos indican que la progenie de las células inducidas a proliferar por todos los compuestos analizados retenía también su potencial neurogénico completo. Los datos de expresión para los GPCR que se unen a estos ligandos corroboran la importancia de estos dos segundos mensajeros en la promoción de la neurogénesis.

5 “Neurogénesis” se define en la presente memoria como proliferación, diferenciación, migración o supervivencia de una célula nerviosa *in vivo* o *in vitro*. En una realización preferida, la célula nerviosa es un neurocitoblasto adulto. La neurogénesis designa también un aumento neto del número de células o un aumento neto de la supervivencia celular. Como se usa en la presente memoria, “NSC” incluiría, al menos, todos los citoblastos cerebrales, todas las células progenitoras cerebrales y todas las células precursoras cerebrales.

10 Se define un agente modulador de la neurogénesis como un agente o reactivo que puede promover la neurogénesis. Se da a conocer en esta invención una serie de agentes moduladores de la neurogénesis novedosos.

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

Todos los métodos de la invención pueden usarse en mamíferos y células de mamífero. En una realización preferida, todos los métodos de la invención pueden usarse en seres humanos o células humanas.

15 Tejido nervioso incluye, al menos, todos los tejidos del cerebro y del sistema nervioso central.

Los neurobiólogos han usado diversos términos intercambiamente para describir las células indiferenciadas del SNC. Términos tales como “citoblasto”, “célula precursora” y “célula progenitora” se usan comúnmente en la bibliografía científica. Sin embargo, hay diferentes tipos de células indiferenciadas, con características y destinos diferentes. La capacidad de una célula de dividirse sin límite y producir células derivadas que se diferencian terminalmente en neuronas y neuroglia es característica de los citoblastos. Por tanto, el término “citoblasto” (por ejemplo, neurocitoblasto), como se usa en la presente memoria, designa una célula indiferenciada que puede inducirse a proliferar usando los métodos de la presente invención. El citoblasto es capaz de automantenerse, lo que significa que, con cada división celular, una célula derivada será también un citoblasto. La progenie no citoblástica de un citoblasto se denomina células progenitoras. Las células progenitoras generadas a partir de un citoblasto multipotente único son capaces de diferenciarse en neuronas, astrocitos (de tipo I y tipo II) y oligodendrocitos. Por tanto, el citoblasto es multipotente debido a que su progenie tiene múltiples rutas de diferenciación.

El término “célula progenitora” (por ejemplo, célula progenitora nerviosa), como se usa en la presente memoria, designa una célula indiferenciada derivada de un citoblasto, y no es en sí misma un citoblasto. Algunas células progenitoras pueden producir progenie que es capaz de diferenciarse en más de un tipo celular. Por ejemplo, una célula O-2A es una célula progenitora neuroglial que da lugar a oligodendrocitos y astrocitos de tipo II, y por tanto podría denominarse una célula progenitora bipotencial. Un rasgo distintivo de una célula progenitora es que, al contrario que un citoblasto, tiene una capacidad proliferativa limitada y por tanto no exhibe automantenimiento. Está asignada a una ruta de diferenciación particular y eventualmente se diferenciará, en condiciones apropiadas, en neuroglia o neuronas. El término “células precursoras”, como se usa en la presente memoria, designa la progenie de citoblastos, y por tanto incluye tanto células progenitoras como citoblastos derivados.

1. Agentes moduladores de la neurogénesis

Se describen en la presente memoria agentes moduladores de la neurogénesis que modulan los niveles intracelulares de AMPc y/o Ca^{2+} . Como se usa en la presente memoria, el agente modulador de la neurogénesis incluye también cualquier sustancia que sea química y biológicamente capaz de aumentar el AMPc (por ejemplo, aumentando la síntesis o reduciendo la degradación) y/o Ca^{2+} (por ejemplo, aumentando el flujo de entrada o reduciendo el flujo de salida). Estos agentes moduladores de la neurogénesis incluyen péptidos, proteínas, proteínas de fusión, compuestos químicos y moléculas pequeñas. Son ejemplos adicionales de agentes moduladores de la neurogénesis descritos en la presente memoria, por ejemplo, tirocalcitonina, calcitonina, péptido de tipo glucagón 1 (7-37), exendina 3 y exendina 4 y análogos de los mismos, y una combinación de los mismos, o un análogo de AMPc, en el que dicho análogo de AMPc se selecciona del grupo consistente en 8-pCPT-2-O-Me-AMPc, 8-Br-AMPc, Rp-AMPSc, 8-CI-AMPc, dibutilil-AMPc, pCPT-AMPc y monofosfato de 3',5'-N6-monobutililadenosina cíclico, inhibidores de PDE (por ejemplo, PDE específicas de AMPc), activadores de adenilato ciclasa y activadores de la ribosilación de ADP de proteínas G estimulantes.

50 Son análogos de AMPc: 8-pCPT-2-O-Me-AMPc (por ejemplo, monofosfato de 3',5'-8-(4-clorofeniltio)-2'-O-metiladenosina cíclico); 8-Br-AMPc (por ejemplo, monofosfato de 3',5'-8-bromoadenosina cíclico); Rp-AMPSc (por ejemplo, monofosforotioato de 3',5'-Rp-adenosina cíclico); 8-CI-AMPc (por ejemplo, monofosfato de 3',5'-8-cloroadenosina cíclico); butiril-AMPc (por ejemplo, monofosfato de 3',5'-N6,2'-O-dibutililadenosina cíclico); pCPT-AMPc (por ejemplo, monofosfato de 3',5'-8-(4-clorofeniltio)adenosina cíclico) y monofosfato de 3',5'-N6-monobutililadenosina cíclico.

Los inhibidores de PDE ejemplares incluyen: teofilina (por ejemplo, 3,7-dihidro-1,3-dimetil-1*H*-purin-2,6-diona; 2,6-dihidroxi-1,3-dimetilpurina; 1,3-dimetilxantina); cafeína (por ejemplo, 1,3,7-trimetilxantina); quercetina dihidratada (por ejemplo, 2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4*H*-1-benzopiran-4-ona dihidratada; 3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona dihidratada); rolipram (por ejemplo, 4-[3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]-2-pirrolidinona); 4-(3-

5 butoxi-4-metoxibencil)imidazolidin-2-ona; propentofilina (por ejemplo, 3,7-dihidro-3-metil-1-(5-oxohexil)-7-propil-1H-purin-2,6-diona; 3-metil-1-(5-oxohexil)-7-propilxantina); 3-isobutil-1-metilxantina (por ejemplo, 3,7-dihidro-1-metil-3-(2-metilpropil)-1H-purin-2,6-diona; IBMX; 3-isobutil-1-metil-2,6(1H,3H)-purindiona; 1-metil-3-isobutilxantina); 8-metoximetil-3-isobutil-1-metilxantina (por ejemplo, 8-metoximetil-IBMX); enoximona (por ejemplo, 1,3-dihidro-4-metil-5-[4-metiltiobenzoil]-2H-imidazol-2-ona) e hidrocloreto de papaverina (por ejemplo, hidrocloreto de 6,7-dimetoxi-1-veratrilisoquinolina).

10 Otros inhibidores de PDE ejemplares incluyen: cloruro de calmidazolio (por ejemplo, cloruro de 1-[bis-(4-clorofenil)metil]-3-[2,4-dicloro-b-(2,4-diclorobenciloxi)fenetil]imidazolio; cloruro de 1-[bis-(4-clorofenil)metil]-3-[2-(2,4-diclorofenil)-2-(2,4-diclorobenciloxi)etil]-1H-imidazolio); SKF 94836 (por ejemplo, N-ciano-N'-metil-N''-[4-(1,4,5,6-tetrahidro-4-metil-6-oxo-3-piridazinil)fenil]guanidina; siguazodano); fragmento 22-36 del neuropéptido Y (por ejemplo, Ser-Ala-Leu-Arg-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr; aminofilina hidratada (por ejemplo, 3,7-dihidro-1,3-dimetil-1H-purin-2,6-diona combinada con 1,2-etanodiamina (2:1) (teofilina)₂; etilendiamina; complejo de teofilina y hemietilendiamina); buteína (por ejemplo, 1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propen-1-ona; 2',3,4,4'-tetrahidroxicalcona); hidrocloreto de papaverina (por ejemplo, hidrocloreto de 6,7-dimetoxi-1-veratrilisoquinolina); hidrocloreto de etazolato (por ejemplo, hidrocloreto de éster etílico del ácido 1-etil-4-[(1-metiletiliden)hidrazino]-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-5-carboxílico); dihidrocloreto de trifluoperazina (por ejemplo, dihidrocloreto de 10-[3-(4-metil-1-piperazinil)propil]-2-trifluorometilfenotiazina; dihidrocloreto de trifluoperazina) y milrinona (por ejemplo, 1,6-dihidro-2-metil-6-oxo-(3,4'-bipiridin)-5-carbonitrilo).

20 Los estimulantes ejemplares de la ribosilación de ADP incluyen: toxina de pertussis (por ejemplo, pertusígeno de *Bordetella pertussis*; factor de sensibilización a histaminas; IAP; proteína activadora de islotes) y toxina del cólera (por ejemplo, colerígeno de *Vibrio cholerae*, enterotoxina del cólera).

Los activadores ejemplares de adenilato ciclasa incluyen: forskolina.

Los agentes que han mostrado en los experimentos detallados en la presente memoria aumentar los niveles intracelulares de AMPc incluyen

Nombre	Secuencia peptídica	SEC ID N°:
Nor-binaltorfimina	NA	
PACAP-38	His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Lys-Arg-Tyr-Lys-Gln-Arg-Val-Lys-Asn-Lys-NH ₂	SEC ID N° 1
Endotelina 1 humana, porcina	Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp	SEC ID N° 2
Hormona adrenocorticotrópica	Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro	SEC ID N° 3
Hormona estimulante de melanocito α	de Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂	SEC ID N° 4
Hormona estimulante de melanocito γ	de Tyr-Val-Met-Gly-His-Phe-Arg-Trp-Asp-Arg-Phe-Gly	SEC ID N° 5
Neurocinina α	His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂	SEC ID N° 6
Tirocalcitonina de salmón	Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH ₂	SEC ID N° 7
Hormona estimulante de melanocito β (β-MSH) humana	de Ala-Glu-Lys-Lys-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp	SEC ID N° 8
MECA	No peptídica	

ES 2 359 720 T3

HE-NECA, etilcarboxamido	2-hexinil-5- <i>N</i> -	No peptídica	
[Cys3,6, Tyr6, Pro9]-sustancia P (agonista selectivo de neurocinina 1)		Arg-Pro-Cys-Pro-Gln-Cys-Phe-Tyr-Pro-Leu-Met	SEC ID N° 9
[Das-Arg9, (antagonista de B1)	Leu8]-bradicinina	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Leu	SEC ID N° 10
[Das-Arg9]-bradicinina (antagonista de B1)		Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe	SEC ID N° 11
[D-Pen2-5]-encefalina (agonista δ potente)		Tyr-D-Pen-Gly-Phe-D-Pen	SEC ID N° 12
[D-pGlu1, D-Phe2, D-Trp3,6]LH-RH		D-pGlu-D-Phe-D-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	SEC ID N° 13
[Nle8,18, paratiroidea (1-34)-amida (humana)	Tyr34]-hormona	Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Nle-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn- Ser-Nle-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His- Asn-Tyr	SEC ID N° 14
ACTH (humana)		Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys- Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala- Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe	SEC ID N° 15
Adrenomedulina (humana)		Tyr-Arg-Gln-Ser-Met-Asn-Asn-Phe-Gln-Gly-Leu-Arg-Ser-Phe-Gly- Cys-Arg-Phe-Gly-Thr-Cys-Thr-Val-Gln-Lys-Leu-Ala-His-Gln-Ile-Tyr- Gln-Phe-Thr-Asp-Lys-Asp-Lys-Asp-Asn-Val-Ala-Pro-Arg-Ser-Lys-Ile- Ser-Pro-Gln-Gly-Tyr-NH ₂	SEC ID N° 16
Adrenomedulina (22-52) (humana)		Thr-Val-Gln-Lys-Leu-Ala-His-Gln-Ile-Tyr-Gln-Phe-Thr-Asp-Lys-Asp- Lys-Asp-Asn-Val-Ala-Pro-Arg-Ser-Lys-Ile-Ser-Pro-Gln-Gly-Tyr-NH ₂	SEC ID N° 17
Adrenomedulina (26-52) (humana) (antagonista de ADM)		Leu-Ala-His-Gln-Ile-Tyr-Gln-Phe-Thr-Asp-Lys-Asp-Lys-Asp-Asn-Val- Ala-Pro-Arg-Ser-Lys-Ile-Ser-Pro-Gln-Gly-Tyr-NH ₂	SEC ID N° 18
Neoendorfina α (porcina)		Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro-Lys	SEC ID N° 19
ANP β (humana)		Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-Cys-Phe-Gly-Gly-Arg-Met-Asp-Arg-Ile-Gly- Ala-Gln-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr	SEC ID N° 20
Calcitonina (humana)		Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp- Phe-Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala- Pro	SEC ID N° 21
CART (61-102) (humana, de rata)		Lys-Tyr-Gly-Gln-Val-Pro-Met-Cys-Asp-Ala-Gly-Glu-Gln-Cys-Ala-Val- Arg-Lys-Gly-Ala-Arg-Ile-Gly-Lys-Leu-Cys-Asp-Cys-Pro-Arg-Gly-Thr- Ser-Cys-Asn-Ser-Phe-Leu-Leu-Lys-Cys-Leu	SEC ID N° 22
Colecistocitina octapeptídica [CCK(26-33)] (no sulfatada)		Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	SEC ID N° 23
DDAVP (potencia el aprendizaje y la memoria humanos)		Mpr-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-D-Arg-Gly-NH ₂	SEC ID N° 24

DTLET	Tyr-D-Thr-Gly-Phe-Leu-Thr	SEC ID N° 25
Eledoisina	Glu-Pro-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met	SEC ID N° 26
Galanina (1-13)-espantida-amida, M40	Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Pro-Pro-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-NH2	SEC ID N° 27
Péptido de tipo glucagón 1 (7-37) (humano)	His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly	SEC ID N° 28
Exendina 3	His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH2	SEC ID N° 29
Exendina 4	His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH2	SEC ID N° 30
[Sar9, Met(O)11]-sustancia P (agonista altamente selectivo del receptor NK-1)	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Sar-Leu-Met(O2)-NH2	SEC ID N° 31
Sarafotoxina S6a (isotoxina cardiotoxina)	Cys-Ser-Cys-Lys-Asp-Met-Thr-Asp-Lys-Glu-Cys-Leu-Asn-Phe-Cys-His-Gln-Asp-Val-Ile-Trp	SEC ID N° 32
Sarafotoxina S6b (potente actividad constrictora coronaria)	Cys-Ser-Cys-Lys-Asp-Met-Thr-Asp-Lys-Glu-Cys-Leu-Tyr-Phe-Cys-His-Gln-Asp-Val-Ile-Trp	SEC ID N° 33
Sarafotoxina S6c (causa una fuerte vasoconstricción de las vasos coronarios)	Cys-Thr-Cys-Asn-Asp-Met-Thr-Asp-Glu-Glu-Cys-Leu-Asn-Phe-Cys-His-Gln-Asp-Val-Ile-Trp	SEC ID N° 34
Urotensina II (Globy)	Ala-Gly-Thr-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val	SEC ID N° 35
Péptido vasoactivo intestinal (humano, porcino, de rata)	His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH2	SEC ID N° 36
[D-Arg0, Hyp3, Igl5, D-Igl7, Oic8]-bradicinina (antagonista de B1/B2)	D-Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Igl-Ser-D-Igl-Oic-Arg	SEC ID N° 37
Proteína de señalización de agutí (ASP) (87-132)-amida (humana)	Thr-Pro-Leu-Ser-Ala-Pro-Cys-Val-Ala-Thr-Arg-Asn-Ser-Cys-Lys-Pro-Pro-Ala-Pro-Ala-Cys-Cys-Asp-Pro-Cys-Ala-Ser-Cys-Gln-Cys-Arg-Phe-Phe-Arg-Ser-Ala-Cys-Ser-Cys-Arg-Val-Leu-Ser-Leu-Asn-Cys-NH2	SEC ID N° 38
Proteína relacionada con agutí (87-132)-amida (humana)	Arg-Cys-Val-Arg-Leu-His-Glu-Ser-Cys-Leu-Gly-Gln-Gln-Val-Pro-Cys-Cys-Asp-Pro-Cys-Ala-Thr-Cys-Tyr-Cys-Arg-Phe-Phe-Asn-Ala-Phe-Cys-Tyr-Cys-Arg-Lys-Leu-Gly-Thr-Ala-Met-Asn-Pro-Cys-Ser-Arg-Thr-NH2	SEC ID N° 39

Otros agentes que pueden aumentar el AMPc intracelular incluyen metanosulfonato de fenoldopam, hidrocloreuro de dopamina, hidrocloreuro de apomorfina, fosfato de histamina, ACTH, succinato de sumatriptano, prostaglandina F2 α trometamina, prostaglandina E1, prostaglandina I2, iloprost trometamina, prostaglandina E2, misoprostol, sulproston, sal disódica de ATP, pindolol, secretina, cisaprida, metanosulfonato de fentolamina, nemonaprida, clozapina, sertindol, olanzapina, risperidona, sulpirida, levosulprida, clorpromazina, hidrocloreuro de clorpromazina, haloperidol, domperidona, dihidrocloreuro/decanoato/enantato de flufenazina, dihidrocloreuro/decanoato de flufenazina, dihidrocloreuro de flufenazina, ATP (trifosfato de adenosina), sal disódica de ATP (trifosfato de adenosina), ketanserina, tartrato de ketanserina, metergolina, pindolol, hidrocloreuro de prazosina, yohimbina,

5 hidrocloreuro de yohimbina, teofilina, cafeína, teobromina, aminofilina, amrinona, milrinona, naltrexona, naloxona, albuterol, levalbuterol, metaproterenol, terbutalina, pirbuterol, salmeterol, bitolterol, colterol, dobutamina, 8L-arginino-vasopresina, 8-lisino-vasopresina, desmopresina, metildopa, DOPA, rauwolscina, prazosina, fentolamina, quinidina, dapiprazol, loxiglumida, gonadotropina coriónica, folitropina- α , folitropina- β (FSH), menotropina (LH, FSH), oxitocina, antagonistas de somatostatina, RMP-7, inhibidores de ACE (como captopril), misoprostol, latanoprost, PGE1, alprostadil, secretagogos de somatropina (GH, PRL) (MK-677), tabimorelina (NN-703), pamorelina, NNC-26-0323, TRH, cosintropina, corticorelina, glucagón, enteroglucagón, PTH 1-34, cocaína, anfetamina, dextroanfetamina, metanfetamina, fenmetrazina, metilfenidato, dietilpropión, metirosina, reserpina, minoxidilo, sulfasalazina, levamisol y fluoruro de talidomida.

10 Los agentes ejemplares para aumentar los niveles de Ca^{2+} intracelular incluyen los agentes resumidos en la tabla siguiente:

Nombre	Secuencia peptídica	SEC ID N°
PACAP-38	His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Lys-Arg-Tyr-Lys-Gln-Arg-Val-Lys-Asn-Lys-NH ₂	SEC ID N° 1
Toxina del cólera de <i>Vibrio cholerae</i>	No peptídica	
Endotelina 1, humana, porcina	Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp	SEC ID N° 2
Angiotensina II humana sintética	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe	SEC ID N° 40
Hormona estimulante de melanocito γ	Tyr-Val-Met-Gly-His-Phe-Arg-Trp-Asp-Arg-Phe-Gly	SEC ID N° 5
Péptido natriurético auricular humano	Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-Cys-Phe-Gly-Gly-Arg-Met-Asp-Arg-Ile-Gly-Ala-Gln-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr	SEC ID N° 41
[D-Pen2-5]-encefalina (potente agonista delta)	Tyr-D-Pen-Gly-Phe-D-Pen	SEC ID N° 42
Adrenomedulina (humana)	Tyr-Arg-Gln-Ser-Met-Asn-Asn-Phe-Gln-Gly-Leu-Arg-Ser-Phe-Gly-Cys-Arg-Phe-Gly-Thr-Cys-Thr-Val-Gln-Lys-Leu-Ala-His-Gln-Ile-Tyr-Gln-Phe-Thr-Asp-Lys-Asp-Lys-Asp-Asn-Val-Ala-Pro-Arg-Ser-Lys-Ile-Ser-Pro-Gln-Gly-Tyr-NH ₂	SEC ID N° 43
Antagonista de receptor de amilina/calcitonina (8-32) (salmón)	Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro	SEC ID N° 44
CGRP (8-37) (humana) (antagonista selectivo del receptor de CGRP y agonista del receptor de calcitonina)	Val-Thr-His-Arg-Leu-Ala-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-Gly-Val-Val-Lys-Asn-Asn-Phe-Val-Pro-Thr-Asn-Val-Gly-Ser-Lys-Ala-Phe-NH ₂	SEC ID N° 45
MGOP 27	Ser-Asp-Thr-Cys-Trp-Ser-Thr-Thr-Ser-Phe-Gln-Lys-Lys-Thr-Ile-His-Cys-Lys-Trp-Arg-Glu-Lys-Pro-Leu-Met-Leu-Met	SEC ID N° 46
Sarafotoxina S6a (isotoxina cardiotoxina)	Cys-Ser-Cys-Lys-Asp-Met-Thr-Asp-Lys-Glu-Cys-Leu-Asn-Phe-Cys-His-Gln-Asp-Val-Ile-Trp	SEC ID N° 32
Sarafotoxina S6b (potente actividad constrictora coronaria)	Cys-Ser-Cys-Lys-Asp-Met-Thr-Asp-Lys-Glu-Cys-Leu-Tyr-Phe-Cys-His-Gln-Asp-Val-Ile-Trp	SEC ID N° 33
Sarafotoxina S6c (causa una fuerte vasoconstricción de los vasos coronarios)	Cys-Thr-Cys-Asn-Asp-Met-Thr-Asp-Glu-Glu-Cys-Leu-Asn-Phe-Cys-His-Gln-Asp-Val-Ile-Trp	SEC ID N° 34

Septida (péptido receptor selectivo de sustancia P)	pGlu-Phe-Phe-Pro-Leu-Met-NH ₂	SEC ID N° 47
Somatostatina 28	Ser-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys-Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys	SEC ID N° 48
Endotelina 1 (humana, bovina, canina, de ratón, porcina, de rata)	Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp	SEC ID N° 49
Factor de liberación de hormona de crecimiento (humano)	Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-NH ₂	SEC ID N° 50
Amilnamida	Lys-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Ala-Thr-Gln-Arg-Leu-Ala-Asn-Phe-Leu-Val-His-Ser-Ser-Asn-Asn-Phe-Gly-Ala-Ile-Leu-Ser-Ser-Thr-Asn-Val-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr	SEC ID N° 51

Los agentes moduladores de la neurogénesis (también designados como agentes) de esta divulgación son como se enumeran en esta sección. Se entiende que el agente (o agentes) moduladores de la neurogénesis pueden usarse siempre que se especifique agente o agentes moduladores de la neurogénesis en esta memoria descriptiva. El agente modulador de la neurogénesis de la invención se selecciona del grupo de tirocalcitonina, calcitonina, péptido de tipo glucagón 1 (7-37), exendina 3 y exendina 4 y análogos de los mismos, y una combinación de los mismos, o un análogo de AMPc, en el que dicho análogo de AMPc se selecciona del grupo consistente en 8-pCPT-2-O-Me-AMPc, 8-Br-AMPc, Rp-AMPsc, 8-Cl-AMPc, dibutilil-AMPc, pCPT-AMPc y monofosfato de 3',5'-N⁶-monobutililadenosina cíclico. En una realización preferida, el agente modulador de la neurogénesis aumenta o mantiene la cantidad de células positivas de doblecortina o el porcentaje de células positivas de doblecortina en una población celular o tejido nervioso.

2. Producción de agentes moduladores de la neurogénesis

Los agentes moduladores de la neurogénesis pueden producirse usando técnicas conocidas de síntesis química, incluyendo el uso de sintetizadores peptídicos.

En algunas realizaciones de la invención, el agente modulador de la neurogénesis es un péptido o proteína. Los péptidos y proteínas pueden sintetizarse químicamente usando sintetizadores peptídicos disponibles comercialmente. La síntesis química de péptidos y proteínas puede usarse para la incorporación de aminoácidos modificados o no naturales, incluyendo D-aminoácidos y otras moléculas orgánicas pequeñas. El reemplazo de uno o más L-aminoácidos en un péptido o proteína por las correspondientes isoformas de D-aminoácido puede usarse para aumentar la resistencia a la hidrólisis enzimática y para potenciar una o más propiedades de la actividad biológica, concretamente, unión a receptor, potencia funcional o duración de la acción. Véanse, por ejemplo, Doherty *et al.*, 1993. *J. Med. Chem.* 36: 2585-2594; Kirby *et al.*, 1993, *J. Med. Chem.* 36: 3802-3808; Morita *et al.*, 1994, *FEBS Lett.* 353: 84-88; Wang *et al.*, 1993 *Int. J. Pept. Protein Res.* 42: 392-399; Fauchere y Thiunieu, 1992. *Adv. Drug Res.* 23: 127-159.

La introducción de reticulaciones covalentes en una secuencia peptídica o proteica puede limitar conformacional y topográficamente la cadena principal peptídica. Esta estrategia puede usarse para desarrollar análogos peptídicos o proteicos de agentes moduladores de la neurogénesis con potencia, selectividad y estabilidad aumentadas. Se han usado exitosamente una serie de otros métodos para introducir limitaciones conformacionales en secuencias aminoacídicas para mejorar su potencia, selectividad de receptor y semivida biológica. Estos incluyen el uso de (i) C_α-metilaminoácidos (véanse, por ejemplo, Rose *et al.*, *Adv. Protein Chem.* 37: 1-109 (1985); Prasad y Balaram, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 16: 307-348 (1984)); (ii) N_α-metilaminoácidos (véanse, por ejemplo, Aubry *et al.*, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 18: 195-202 (1981); Manavalan y Momany, *Biopolymers*, 19: 1943-1973 (1980)) y (iii) aminoácidos α,β-insaturados (véanse, por ejemplo, Bach y Gierasch, *Biopolymers*, 25: S175-S192 (1986); Singh *et al.*, *Biopolymers*, 26: 819-829 (1987)). Estos y muchos otros análogos aminoacídicos están comercialmente disponibles o pueden prepararse fácilmente. Adicionalmente, el reemplazo del ácido C-terminal por una amida puede usarse para potenciar la solubilidad y excreción de un péptido o proteína.

Como alternativa, puede obtenerse un agente modulador de la neurogénesis mediante métodos bien conocidos en la técnica para la expresión y purificación de péptidos o proteínas recombinantes. Puede generarse una molécula de ADN que codifica el agente modulador de la neurogénesis. La secuencia de ADN es conocida o puede deducirse a partir de la secuencia aminoacídica basada en el uso de codón conocido. Véanse, por ejemplo, Old y Primrose, "Principles of Gene Manipulation" 3^a ed., Blackwell Scientific Publications, 1985; Wada *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 20: 2111-2118 (1992). Preferiblemente, la molécula de ADN incluye secuencias adicionales, por ejemplo, sitios de reconocimiento para enzimas de restricción que faciliten su clonación en un vector de clonación adecuado, tal como un plásmido. Los ácidos nucleicos pueden ser ADN, ARN o una combinación de los mismos. Los ácidos nucleicos que codifican el agente modulador de la neurogénesis pueden obtenerse mediante cualquier método

conocido en la técnica (por ejemplo, mediante amplificación por PCR usando cebadores sintéticos hibridables con los extremos 3' y 5' de la secuencia y/o mediante clonación a partir de un ADNc o colección genómica usando una secuencia oligonucleotídica específica de la secuencia génica dada, o similares). Los ácidos nucleicos pueden generarse también mediante síntesis química.

5 Cualquiera de las metodologías conocidas en la técnica relevante respecto a la inserción de fragmentos de ácido nucleico en un vector puede usarse para construir vectores de expresión que contienen un gen quimérico compuesto por las señales de control transcripcional/traduccionales apropiadas y las secuencias de codificación del agente modulador de la neurogénesis. Las secuencias promotoras/potenciadoras en los vectores de expresión pueden usar secuencias reguladoras de plantas, animales, insectos u hongos, como se proporciona en la invención. Una célula hospedadora puede ser cualquier célula procariótica o eucariótica. Por ejemplo, el péptido puede expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de levadura, insecto, hongos o células de mamífero. Otras células hospedadoras adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica. En una realización, un ácido nucleico que codifica un agente modulador de la neurogénesis se expresa en células de mamífero usando un vector de expresión de mamífero.

15 Los vectores bacterianos ejemplares incluyen, pero sin limitación, plásmidos pUC tales como pUC7, pUC8, pUC9, pUC12, pUC13, pUC18, pUC19, pUC118, pUC119; plásmidos pBR tales como pBR322, pBR325 (Biorad Laboratories, Richmond, CA); pSPORT 1; pT7/T3a-18, pT7/T3a-19; plásmidos pGEM tales como pGEM3Z, pGEM4Z, pGEM-3Zf(±), pGEM-5Zf(±), pGEM-7Zf(±), pGEM-9Zf(±), pGEM-11Zf(±), pGEM-13Zf(±) (Promega, Madison, WI); plásmidos pSP tales como pSP70, pSP71, pSP72, pSP73, pSP64, pSP65, pSP64 poli(A), pAlter-1; plásmidos BLUESCRIPT tales como pBS II SK(±), pBS II KS(±), pCR-Script SK(±), pBS(±) pT7-7, pBS-KS(±) pT7-7A, pBS-SK(±) pTZ18R; pTZ18U; pTZ19R, pT7-1 pTZ19U; pT7-2, y pQE50 (Qiagen, Chatsworth, CA). Las células hospedadoras bacterianas incluyen, pero sin limitación: BMH 71-18 mut S, C600, C600 hf1, DH1, DH5 α, DH5 αF', DM1, HB101, JM83, JM101, JM103, JM105, JM107, JM108, JM109, JM109(DE3), LE392, KW251, MM294, NM522, NM538, NM539, RR1, Y1088, Y1089, Y1090, AG1, JM110, K802, SCS1, SCS110, XL-1 Blue, XL1-Blue MRF' y XLR1-Blue MR. Muchas cepas están comercialmente disponibles (véanse, por ejemplo, ATCC, Rockville, MD; GIBCO BRL, Gaithersburg, MD).

25 Los ejemplos de vectores de mamífero incluyen: pCDM8 (Seed (1987) *Nature* 329: 840; Invitrogen) y pMT2PC (Kaufman *et al.* (1987) *EMBO J.* 6: 187-195), pCMVβ, (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen), pET-3d (Novagen), pProEx-1 (Life Technologies), pFastBac 1 (Life Technologies), pSFV (Life Technologies), pcDNA3, pcDNA4 y pcDNA6 (Invitrogen), pSL301 (Invitrogen), pSE280 (Invitrogen), pSE380 (Invitrogen), pSE420 (Invitrogen), pTrcHis A,B,C (Invitrogen), pRSET A,B,C (Invitrogen), pYES2 (Invitrogen), pAC360 (Invitrogen), pVL1392 y pV11392 (Invitrogen), pZeoSV (Invitrogen), pRc/CMV (Invitrogen), pRc/RSV (Invitrogen), pREP4 (Invitrogen), pREP7 (Invitrogen), pREP8 (Invitrogen), pREP9 (Invitrogen), pREP10 (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pEBVHis (Invitrogen) y lambda-Pop6. Los ejemplos de células hospedadoras eucarióticas que pueden usarse para expresar una proteína de fusión de la invención incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) (por ejemplo, n° de acceso ATCC CCL-61), células embrionarias de ratón NIH Swiss NIH/3T3 (por ejemplo, n° de acceso ATCC CRL-1658) y células de riñón bovino Madin-Darby (MDBK) (n° de acceso ATCC CCL-22). Otros vectores y células hospedadoras resultarán evidentes para un experto en la técnica.

40 Las células hospedadoras pueden usarse para producir (concretamente sobreexpresar) péptido en cultivo, por ejemplo, cultivando la célula hospedadora (en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica el péptido o proteína) en un medio adecuado de tal modo que se produzca el péptido. El método implica adicionalmente el aislamiento del péptido o proteína a partir del medio o de la célula hospedadora. Ausubel *et al.*, (Eds). En: "Current Protocols in Molecular Biology". J. Wiley and Sons, Nueva York, N.Y. 1998.

45 El agente modulador de la neurogénesis expresado biológicamente puede purificarse usando técnicas de purificación conocidas. Un péptido o proteína recombinante "aislado" o "purificado", o una porción biológicamente activa del mismo, significa que dicho péptido o proteína está sustancialmente exento de material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente de célula o tejido del que deriva. La frase "sustancialmente exento de material celular" incluye preparaciones en que el péptido o proteína se separa de los componentes celulares de las células de las que se aísla o se produce recombinantemente. En una realización, la frase "sustancialmente exento de material celular" incluye preparaciones de péptido o proteína que tienen menos de aproximadamente un 30% (en peso seco) de producto distinto del péptido o proteína deseado (también designado en la presente memoria como "proteína contaminante"), más preferiblemente menos de aproximadamente un 20% de proteína contaminante, aún más preferiblemente menos de aproximadamente un 10% de proteína contaminante y lo más preferiblemente menos de aproximadamente un 5% de proteína contaminante. Cuando el péptido o proteína, o porción biológicamente activa del mismo, se produce recombinantemente, también está preferiblemente sustancialmente exento de medio de cultivo, concretamente, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente un 20%, más preferiblemente menos de aproximadamente un 10%, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente un 5% del volumen de la preparación de péptido o proteína.

60 Preferiblemente, el análogo del agente modulador de la neurogénesis es funcionalmente activo. Como se utiliza en la presente memoria, el término "funcionalmente activo" designa una especie que presenta uno o más atributos funcionales conocidos de la neurogénesis.

Los análogos de un agente modulador de la neurogénesis de la invención o restos individuales pueden producirse mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias aminoacídicas pueden modificarse mediante cualquier número de métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1990. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª ed., (Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, N.Y.). Las modificaciones incluyen: glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, ligamiento con una molécula de anticuerpo u otro reactivo celular. Puede utilizarse cualquiera de las numerosas metodologías de modificación química conocidas en la técnica incluyendo escisión química específica con bromuro de cianógeno, tripsina, quimotripsina, papaína, proteasa V8, NaBH₄, acetilación, formilación, oxidación, reducción y síntesis metabólica en presencia de tunicamicina.

Los análogos pueden ser completos o no completos, si dicho análogo contiene un ácido nucleico o aminoácido modificado como se describe a continuación. Los análogos del agente modulador de la neurogénesis incluyen moléculas que comprenden regiones que son sustancialmente homólogas, en diversas realizaciones, de al menos un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o preferiblemente 95% de identidad aminoacídica cuando: (i) se comparan con una secuencia aminoacídica de tamaño idéntico; (ii) se comparan con una secuencia alineada en que el alineamiento se hace mediante un programa informático de homología conocido en la técnica (por ejemplo, el software Wisconsin GCG) o (iii) el ácido nucleico codificante es capaz de hibridar con una secuencia que codifica los péptidos anteriormente mencionados en condiciones rigurosas (preferidas), moderadamente rigurosas o no rigurosas. Véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Nueva York, N.Y., 1993.

3. Proteínas de fusión que comprenden agentes moduladores de la neurogénesis

En diversos aspectos de la invención, los agentes moduladores de la neurogénesis proteicos y peptídicos dados a conocer en la presente memoria pueden expresarse como proteínas de fusión. Como ejemplos no limitantes, las proteínas de fusión pueden incluir uno o más del marcaje poli-His, marcaje c-myc, marcaje E, marcaje S, marcaje FLAG, marcaje Glu-Glu, marcaje HA, marcaje HSV V5, VSV-g, β-galactosidasa, GFP, GST, luciferasa, proteína de unión a maltosa, fosfatasa alcalina, dominio de unión a celulosa, dominio Fc u otras secuencias heterólogas. Un experto en la técnica puede preparar dichas proteínas de fusión usando técnicas de biología molecular bien conocidas. Por ejemplo, pueden usarse metodologías de ADN recombinante convencionales para generar proteínas de fusión útiles en la práctica de la invención.

Según dichos métodos, pueden generarse constructos de fusión, y los ADN resultantes pueden integrarse en vectores de expresión y expresarse, produciendo las proteínas de fusión para uso en la invención. Una célula hospedadora apropiada puede transformarse o transfectarse con el vector de expresión, y utilizarse para la expresión y/o secreción de la proteína diana. Las células hospedadoras preferidas actualmente para uso en la invención incluyen células de hibridoma inmortales, células de mieloma NS/O, células 293, células de ovario de hámster chino, células HELA y células COS. Las células hospedadoras procarióticas pueden modificarse también para comprender vectores para la expresión de proteínas de fusión, tales como pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D. B. y Johnson, K. S. (1988) Gene 67:3140), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ).

Para algunos fines, puede ser deseable incluir una secuencia señal en una proteína de fusión para uso en la invención. Las secuencias señal que pueden usarse con los constructos de expresión para uso en la invención incluyen secuencias señal de cadena ligera de anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo 14.18 (Gillies *et al.* (1989) J. Immunol. Meth. 125:191), secuencias señal de cadena pesada de anticuerpo, por ejemplo, la secuencia señal de cadena pesada de anticuerpo MOPC141 (Sakano *et al.* (1980) Nature 286: 5774) y cualquier otra secuencia señal que sea conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Watson (1984) Nucleic Acids Research 12: 5145). Se proporciona un examen detallado de las secuencias señal peptídicas por von Heijne (1986) Nucleic Acids Research 14: 4683.

Como resultará evidente para un experto en la técnica, la idoneidad de una secuencia señal particular para uso en un vector para secreción puede requerir cierta experimentación rutinaria. Dicha experimentación incluirá determinar la capacidad de la secuencia señal de dirigir la secreción de una proteína de fusión y también la determinación de la configuración óptima, genómica o de ADNc, de la secuencia para usar para conseguir una secreción eficaz de proteínas de fusión. Adicionalmente, un experto en la técnica es capaz de crear un péptido señal sintético siguiendo las normas presentadas por von Heijne, referido anteriormente, y ensayando la eficacia de dicha secuencia señal sintética mediante experimentación rutinaria.

Una proteína de fusión para uso en la invención puede incluir un sitio de escisión proteolítica que proporciona la escisión proteolítica de la proteína de fusión codificada. De este modo, puede separarse el dominio heterólogo (por ejemplo, la proteína GST) de la secuencia peptídica o proteica de interés. Los sitios de escisión proteolítica útiles incluyen secuencias aminoacídicas que son reconocidas por enzimas proteolíticas tales como tripsina, plasmita o enterocinasa K. Son conocidos muchos pares de sitio de escisión/agente de escisión (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.726.044).

Después de la síntesis mediante métodos químicos o biológicos, los péptidos y proteínas para uso en la invención pueden purificarse de modo que estén sustancialmente exentos de precursores químicos u otros productos químicos usando técnicas de purificación estándares. La frase "sustancialmente exento de precursores

químicos u otros productos químicos” incluye preparaciones en que el péptido o proteína se separa de los precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis. En una realización, la frase “sustancialmente exento de precursores químicos u otros productos químicos” incluye preparaciones que tienen menos de aproximadamente un 30% (en peso seco) de precursores químicos u otros productos químicos, más preferiblemente menos de aproximadamente un 20% de precursores químicos u otros productos químicos, aún más preferiblemente menos de aproximadamente un 10% de precursores químicos u otros productos químicos, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente un 5% de precursores químicos u otros productos químicos.

4. Composiciones que comprenden agentes moduladores de la neurogénesis

Se describen también en la presente memoria composiciones farmacéuticas que comprenden un agente modulador de la neurogénesis de la invención. Los agentes moduladores de la neurogénesis de la invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas que pueden usarse como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades neurológicas (trastornos). Estas composiciones se examinan en esta sección. Se entiende que cualquier composición y producto químico examinados en esta sección puede ser un componente de una composición farmacéutica que comprenda uno o más agentes moduladores de la neurogénesis.

Los agentes moduladores de la neurogénesis y agentes coadministrados pueden incorporarse a composiciones farmacéuticas adecuadas para administración. Dichas composiciones comprenden típicamente el agente y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en la presente memoria, “portador farmacéuticamente aceptable” se pretende que incluya todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares compatibles con la administración farmacéutica. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones. Pueden incorporarse también compuestos activos complementarios en las composiciones. Pueden hacerse modificaciones a los agentes que afecten a la solubilidad o excreción del péptido. Pueden sintetizarse también moléculas peptídicas con D-aminoácidos par aumentar la resistencia a la degradación enzimática. En algunos casos, la composición puede coadministrarse con uno o más agentes de solubilización, conservantes y agentes potenciadores de la permeación.

Preferiblemente, la composición farmacéutica se usa para tratar enfermedades mediante la estimulación de la neurogénesis (concretamente, el crecimiento, proliferación, migración, supervivencia y/o diferenciación celular). Para el tratamiento, un uso de la invención comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que incluye un agente de la invención (1) solo en un intervalo de dosificación de 0,001 ng/kg/día a 500 ng/kg/día, preferiblemente en un intervalo de dosificación de 0,05 a 200 ng/kg/día, (2) en combinación con un factor aumentador de la permeabilidad, o (3) en combinación con un agente coadministrado por vía local o sistémica.

Una composición farmacéutica para uso en la invención se formula para ser compatible con su vía de administración pretendida. Los ejemplos de vías de administración incluyen la administración parenteral, por ejemplo intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo por inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Las disoluciones o suspensiones usadas para administración parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril fisiológicamente aceptable tal como agua para inyecciones, disolución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico u bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringuillas desechables o viales multidosis hechos de vidrio o plástico.

Administración oral designa la administración de la formulación por la boca mediante ingestión, o por cualquier otra parte del sistema gastrointestinal incluyendo el esófago o mediante la administración de supositorio. Administración parenteral designa el suministro de una composición, tal como una composición que comprende un agente modulador de la neurogénesis por una vía distinta de mediante el tracto gastrointestinal (por ejemplo, suministro oral). En particular, la administración parenteral puede ser mediante inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular o intramedular (concretamente, intratecal). Administración tópica designa la aplicación de un agente farmacéutico a la superficie externa de la piel o las membranas mucosas (incluyendo las membranas superficiales de la nariz, pulmones y boca), de tal modo que el agente cruce la superficie externa de la piel o membrana mucosa y entre en los tejidos subyacentes. La administración tópica de un agente farmacéutico puede dar como resultado una distribución limitada del agente en la piel y los tejidos circundantes o, cuando el agente se retira del área de tratamiento por la corriente sanguínea, puede dar como resultado una distribución sistémica del agente.

En una forma preferida de administración tópica, el agente promotor de la neurogénesis se suministra mediante suministro transdérmico. Suministro transdérmico designa la difusión de un agente a través de la barrera de la piel. La piel (estrato córneo y epidermis) actúa como barrera y pocos agentes farmacéuticos son capaces de penetrar la piel intacta. En contraposición, la dermis es permeable a muchos solutos y la absorción de fármacos ocurre por tanto más fácilmente a través de piel que se ha escoriado o liberado de otro modo de la epidermis para exponer la dermis. La absorción a través de piel intacta puede potenciarse disponiendo el agente activo en un

vehículo acuoso antes de la aplicación a la piel (un proceso conocido como inunción). La administración tópica pasiva puede consistir en aplicar el agente activo directamente en el sitio de tratamiento en combinación con emolientes o potenciadores de la penetración. Otro método de potenciar el suministro a través de la piel es aumentar la dosificación del agente farmacéutico. La dosificación para administración tópica puede aumentarse hasta diez, cien o mil veces más que las dosificaciones habituales indicadas en otro lugar de esta memoria descriptiva.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones acuosas estériles (cuando son hidrosolubles) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Para administración intravenosa, los portadores fisiológicamente aceptables adecuados incluyen disolución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o disolución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debería ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de la dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol y cloruro de sodio en la composición. Puede causarse la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Los portadores fisiológicamente aceptables pueden ser cualquier portador conocido en el campo como adecuado para aplicación farmacéutica (concretamente, tópica, oral y parenteral). Se describen portadores y formulaciones farmacéuticas adecuados, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences" (19ª ed.) (Genarro, ed. (1995) Mack Publishing Co., Easton, Pa.). Preferiblemente, los portadores farmacéuticos se eligen basándose en el modo de administración pretendido del agente modulador de la neurogénesis. El portador farmacéuticamente aceptable puede incluir, por ejemplo, emolientes, humectantes, espesantes, siliconas y agua. Pueden encontrarse formulaciones adecuadas que incluyen excipientes farmacéuticamente aceptables para introducir el agente modulador de la neurogénesis en la corriente sanguínea por vías distintas de la inyección en "Remington's Pharmaceutical Sciences" (19ª ed.) (Genarro, ed. (1995) Mack Publishing Co., Easton, Pa.).

Los ejemplos específicos de portadores incluyen aceites y ceras de hidrocarburos tales como aceite mineral, vaselina, parafina, ceresina, ozoquerita, cera microcristalina, polietileno y perhidroescualeno; triglicéridos tales como aceite vegetal, grasas animales, aceite de ricino, manteca de cacao, aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de hígado de bacalao, aceite de almendra, aceite de aguacate, aceite de palma, aceite de sésamo, escualeno y maleato de aceite de soja; acetoglicéridos tales como monoglicéridos acetilados; glicéridos etoxilados tales como monoestearato de glicerilo etoxilado; ésteres alquílicos de ácidos grasos tales como laurato de metilo, isopropilo y butilo, laurato de hexilo, laurato de isohexilo, palmitato de isohexilo, palmitato de isopropilo, oleato de decilo, oleato de isodecilo, estearato de hexadecilo, estearato de decilo, isoestearato de isopropilo, adipato de diisopropilo, adipato de diisohexilo, adipato de dihexildecilo, sebacato de diisopropilo, lactato de laurilo, lactato de miristilo y ésteres cetil-lactato de ácido graso; ésteres alquénlicos de ácidos grasos tales como miristato de oleílo, estearato de oleílo y oleato de oleílo; ácidos grasos tales como ácidos pelargónico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, isoesteárico, hidroxiesteárico, oleico, linoleico, ricinoleico, araquídico, behénico y erúxico; alcoholes grasos tales como alcoholes de laurilo, miristilo, cetilo, hexadecilo, estearilo, isoestearilo, hidroxiestearilo, oleílo, ricinoleílo, behenilo, erucilo y 2-octildodecanoílo; éteres de alcohol graso tales como de laurilo, cetilo, estearilo, isoestearilo y oleílo y alcoholes de colesterol que tienen unidos a los mismos de 1 a 50 grupos de óxido de etileno o 1 a 50 grupos de óxido de propileno; éterésteres tales como ésteres de ácidos grasos de alcoholes grasos etoxilados.

Se incluyen también lanolina y los derivados tales como lanolina, aceite de lanolina, cera de lanolina, alcoholes de lanolina, ácidos grasos de lanolina, lanolato de isopropilo, lanolina etoxilada, alcoholes de lanolina etoxilada, colesterol etoxilado, alcoholes de lanolina propoxilada, alcoholes de lanolina acetilada, linoleato de alcoholes de lanolina, ricinoleato de alcoholes de lanolina, acetato de ricinoleato de alcoholes de lanolina, acetato de alcoholésteres etoxilados, productos de hidrogenólisis de la lanolina, lanolina hidrogenada etoxilada, lanolina de sorbitol etoxilado y bases de absorción de lanolina líquidas y semisólidas; los ésteres de alcohol polihidroxílico tales como mono- y diésteres de ácido graso de etilenglicol, mono- y diésteres de ácido graso de dietilenglicol, mono- y diésteres de ácido graso de polietilenglicol (200-6000), mono- y diésteres de ácido graso de polipropilenglicol, monooleato de polipropilenglicol 2000, monoestearato de polipropilenglicol 2000, monoestearato de propilenglicol etoxilado, mono- y diésteres de ácido graso de glicerilo, poliésteres grasos de poliglicerol, monoestearato de glicerilo etoxilado, monoestearato de 1,3-butilenglicol, diestearato de 1,3-butilenglicol, ésteres de ácido graso de polioxietileno, ésteres de ácido graso de sorbitán y ésteres de ácido graso de polioxietileno-sorbitán son ésteres de alcoholes polihidroxílicos satisfactorios.

Se incluyen adicionalmente ceras tales como cera de abeja, espermaceti, miristato de miristilo, estearato de estearilo, polioxietileno-sorbitol, cera de abeja, ceras carnauba y candelilla; fosfolípidos tales como lecitina y derivados;

esteroles tales como colesterol y ésteres de ácido graso de colesterol, amidas tales como amidas de ácido graso, amidas de ácido graso etoxilado y alcanolamidas de ácido graso sólido. Además, el agente modulador de la neurogénesis y el portador farmacéuticamente aceptable pueden incluirse en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, comprimirse en comprimidos o incorporarse directamente a la dieta del individuo. Específicamente, el agente modulador de la neurogénesis puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Cuando se administra el agente modulador de la neurogénesis por vía oral, puede mezclarse con otras formas de alimento y potenciadores del aroma farmacéuticamente aceptables. Cuando el agente modulador de la neurogénesis se administra por vía entérica, puede introducirse en forma de sólido, semisólido, suspensión o emulsión y puede combinarse con cualquier número de aditivos bien conocidos farmacéuticamente aceptables. Son conocidos en la técnica sistemas de suministro de liberación oral prolongada y/o recubrimientos entéricos para formas de dosificación de administración oral, y están también contemplados.

Las composiciones orales incluyen generalmente un diluyente inerte fisiológicamente aceptable o un portador comestible. Pueden incluirse en cápsulas de gelatina o comprimirse en comprimidos. Con fines de administración terapéutica oral, el agente modulador de la neurogénesis de la invención puede incorporarse con excipientes fisiológicos y usarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales pueden prepararse también usando un portador fluido para uso como colutorio, en el que el compuesto en el portador fluido se aplica por vía oral y se gargariza y escupe o se traga. Pueden incluirse agentes aglutinantes y/o materiales coadyuvantes farmacéuticamente compatibles como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; excipientes fisiológicamente aceptables tales como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina o un agente aromatizante tal como menta piperita, salicilato de metilo o aroma de naranja.

Cuando se administra un agente modulador de la neurogénesis para uso en la invención como agente tópico, la composición para uso en la invención puede comprender opcionalmente otros agentes conocidos por tener un efecto cosmético o beneficioso sobre la piel. Dichos agentes incluyen, por ejemplo, antioxidantes, protectores solares, un tampón del pH y una combinación de los mismos. Aunque puede usarse cualquier antioxidante que sea químicamente compatible, los antioxidantes preferidos incluyen aminoácidos tales como glicina, histidina, tirosina y triptófano; imidazoles tales como ácido urocánico; péptidos tales como D,L-carnosina, D-carnosina, L-carnosina y anserina; carotenoides; carotenos tales como α -caroteno, β -caroteno y licopeno; ácido lipoico tal como ácido dihidrolipoico; tioles tales como aurotioglucosa, propiltiouracilo, tioredoxina, glutation, cisteína, cistina y cistamina, tioldipropionato de dilaurilo, tioldipropionato de diestearilo, ácido tioldipropiónico; compuestos de sulfoximina tales como butioninsulfoximinas, homocisteinsulfoximina, butioninsulfonas, penta-, hexa- y heptationinsulfoximina; agentes quelantes de metal tales como α -hidroxiácidos, ácido palmítico, ácido fítico, lactoferrina, EDTA y EGTA; α -hidroxiácidos tales como ácido cítrico, ácido láctico y ácido málico; ácidos grasos insaturados tales como ácido γ -linolénico, ácido linolénico y ácido oleico; ácido fólico; ubiquinona y ubiquinol.

Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles incorporando el agente modulador de la neurogénesis para uso en la invención (por ejemplo, un ácido nucleico, péptido, proteína de fusión, anticuerpo, aficuerpo y similares) en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el agente modulador de la neurogénesis a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado a vacío y liofilización, lo que proporciona un polvo de ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una disolución del mismo esterilizada por filtración anteriormente.

Pueden usarse una serie de sistemas que alteran el suministro de fármacos inyectables para cambiar las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas de los agentes terapéuticos (véase, por ejemplo, K. Reddy, 2000, *Annals of Pharmacotherapy* 34: 915-923). El suministro de fármacos puede modificarse mediante un cambio de formulación (por ejemplo, productos de liberación continua, liposomas) o una adición a la molécula de fármaco (por ejemplo, pegilación). Las ventajas potenciales de estos mecanismos de suministro de fármacos incluyen una duración aumentada o prolongada de la actividad farmacológica, una reducción de los efectos adversos y un cumplimiento y calidad de vida elevados del paciente. Los sistemas de liberación continua inyectables suministran fármacos de modo controlado predeterminado y son particularmente apropiados cuando es importante evitar grandes fluctuaciones en las concentraciones plasmáticas de fármaco. Encapsular un fármaco en un liposoma puede producir una semivida prolongada y una distribución aumentada en tejidos con permeabilidad capilar aumentada (por ejemplo, tumores). La pegilación proporciona un método para la modificación de péptidos o proteínas terapéuticos para minimizar las posibles limitaciones (por ejemplo, estabilidad, semivida, inmunogenicidad) asociadas a estos agentes moduladores de la neurogénesis.

Según la invención, pueden formularse uno o más agentes moduladores de la neurogénesis con lípidos o vehículos lipídicos (por ejemplo, micelas, liposomas, microesferas, protocélulas, protobiontes, liposomas,

coacervados y similares) para permitir la formación de multímeros. De forma similar, los agentes moduladores de la neurogénesis pueden multimerizarse usando pegilación, reticulación, formación de enlaces disulfuro, formación de reticulaciones covalentes, formación de anclas de glucosilfosfatidilinositol (GPI) u otros métodos establecidos. El agente modulador de la neurogénesis multimerizado puede formularse en una composición farmacéutica y usarse para aumentar o potenciar sus efectos.

La administración sistémica puede ser también por medios transmucosos o transdérmicos. Para administración transmucosa o transdérmica, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a pernear. Dichos penetrantes son conocidos en general en la técnica e incluyen, por ejemplo para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa puede lograrse mediante el uso de pulverizadores nasales o supositorios. Para administración por inhalación, los agentes moduladores de la neurogénesis para uso en la invención pueden suministrarse en forma de pulverizador de aerosol a partir de un recipiente o dispensador a presión que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador. Para administración transdérmica, los agentes moduladores de la neurogénesis para uso en la invención pueden formularse en pomadas, bálsamos, geles o cremas como son conocidos en general en la técnica. Los agentes moduladores de la neurogénesis pueden prepararse también en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para suministro rectal.

En una realización, los agentes moduladores de la neurogénesis para uso en la invención se preparan con portadores que protegerán al agente modulador de la neurogénesis frente a una eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables biocompatibles tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido láctico). Los métodos para la preparación de dichas formulaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales pueden obtenerse también comercialmente en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Pueden usarse también suspensiones liposómicas (incluyendo liposomas orientados a células infectadas con anticuerpos monoclonales de antígenos víricos) como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse según métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. n° 4.522.811.

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de dosificación unitaria por la facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria como se usa en la presente memoria designa unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico necesario. Las especificaciones de las formas de dosificación unitaria para uso en la invención está dictadas por y dependen directamente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular a conseguir, y de las limitaciones inherentes en la técnica de la combinación de dicho compuesto activo para el tratamiento de individuos.

En otras realizaciones, el agente modulador de la neurogénesis se administra en una composición que comprende al menos un 90% de agente modulador de la neurogénesis puro. Preferiblemente, el agente modulador de la neurogénesis se formula en un medio que proporciona la máxima estabilidad y los menores efectos secundarios relacionados con la formulación. Además del agente modulador de la neurogénesis, la composición para uso en la invención incluirá típicamente uno o más portadores proteicos, tampones, sales isotónicas y estabilizantes.

Las composiciones que incluyen uno o más agentes moduladores de la neurogénesis de la invención pueden administrarse en cualquier forma convencional, incluyendo en cualquier forma conocida en la técnica que pueda pasar a través de o evitar la barrera hematoencefálica. Los métodos para permitir a factores pasar a través de la barrera hematoencefálica incluyen minimizar el tamaño del factor, proporcionar factores hidrófobos que puedan pasar más fácilmente y conjugar el agente modulador de la neurogénesis proteico u otro agente con una molécula portadora que tenga un coeficiente de permeabilidad sustancial a través de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.670.477).

En algunos casos, el agente modulador de la neurogénesis puede administrarse mediante un procedimiento quirúrgico implantando un catéter acoplado con un dispositivo de bombeo. El dispositivo de bombeo puede implantarse también o situarse de forma extracorpórea. La administración del agente modulador de la neurogénesis puede ser en pulsos intermitentes o como infusión continua. Los dispositivos para inyección en zonas discretas del cerebro son conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 6.042.579, 5.832.932 y 4.692.147).

5. Método para reducir un síntoma de un trastorno administrando agentes moduladores de la neurogénesis

Una realización de la invención está dirigida a un método para reducir un síntoma de un trastorno en un paciente administrando un agente modulador de la neurogénesis de la invención al paciente. En ese uso, se administran directamente uno o más agentes moduladores de la neurogénesis al animal, lo que inducirá una proliferación y/o diferenciación adicional de un tejido nervioso adulto de dicho animal. Dichos usos *in vivo* permiten el reemplazo endógeno en trastornos causados por células perdidas debido a lesión o enfermedad. Esto obviará la necesidad de trasplante de células ajenas a un paciente.

Un agente modulador de la neurogénesis para uso en la invención puede administrarse por vía sistémica a un paciente. En una realización preferida, el agente modulador de la neurogénesis se administra por vía local en cualquier lugar implicado en la patología del trastorno del SNC, concretamente, cualquier lugar deficiente en células nerviosas como causa de la enfermedad. Por ejemplo, el agente modulador de la neurogénesis puede administrarse por vía local al ventrículo cerebral, sustancia negra, cuerpo estriado, locus cerúleo, núcleo basal de Meynert, núcleo pedunculopontino, corteza cerebral y médula espinal. Preferiblemente, un trastorno del sistema nervioso central incluye trastornos neurodegenerativos, trastornos isquémicos, traumatismos neurológicos y trastornos del aprendizaje y la memoria.

La administración de factores de crecimiento puede realizarse mediante cualquier método, incluyendo cánula de inyección, transfeción de células con vectores que expresan hormona de crecimiento, inyección, aparatos de liberación retardada que pueden administrar sustancias en el sitio deseado y similares. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante cualquier método, incluyendo cánula de inyección, inyección, administración oral, aparatos de liberación retardada y similares. Puede usarse cualquier factor de crecimiento, particularmente EGF, TGF- α , FGF-1, FGF-2 y NGF. Los factores de crecimiento pueden administrarse de cualquier manera conocida en la técnica en que los factores pasen a través de o eviten la barrera hematoencefálica. Los métodos para permitir a los factores pasar a través de la barrera hematoencefálica incluyen minimizar el tamaño del factor, o proporcionar factores hidrófobos que puedan pasar a través más fácilmente.

El uso de la invención aprovecha el hecho de que los citoblastos estén localizados en los tejidos que revisten los ventrículos de cerebros maduros. La neurogénesis puede inducirse administrando un agente modulador de la neurogénesis de la invención directamente en estos sitios, evitando por tanto una administración sistémica innecesaria y los posibles efectos secundarios. Puede ser deseable implantar un dispositivo que administre la composición al ventrículo y, por tanto, a los neurocitoblastos. Por ejemplo, puede usarse una cánula ligada a una bomba osmótica para suministrar la composición. Como alternativa, la composición puede inyectarse directamente en los ventrículos. Las células pueden migrar a regiones que se han dañado como resultado de lesión o enfermedad. Además, la estrecha proximidad de los ventrículos a muchas regiones cerebrales permitiría la difusión de un agente neurológico secretado por las células (por ejemplo, citoblastos o su progenie).

La invención proporciona agentes para uso en la inducción de neurogénesis *in vivo* o *in vitro*, que pueden usarse para tratar diversas enfermedades y trastornos del SNC como se describe con detalle en la presente memoria. El término "tratar" en sus diversas formas gramaticales con relación a la presente invención designa prevenir, curar, revertir, atenuar, aliviar, mejorar, minimizar, suprimir o detener los efectos nocivos de un trastorno neurológico, la progresión del trastorno, el agente causante del trastorno (por ejemplo, bacterias o virus), la lesión, el traumatismo u otra condición anormal. Los síntomas de trastornos neurológicos incluyen tensión, movimientos anormales, comportamiento anormal, tics, hiperactividad, combatividad, hostilidad, negativismo, defectos de memoria, defectos sensitivos, defectos cognitivos, alucinaciones, delirios agudos, poco cuidado personal y a veces retraimiento y reclusión.

Los síntomas de movimiento anormal incluyen una amplia variedad de síntomas que pueden estar en el intervalo desde movimientos inconscientes que interfieren muy poco con la calidad de vida a movimientos bastante graves e incapacitantes. Los ejemplos de síntomas que se observan asociados a trastornos neurológicos incluyen protrusiones linguales involuntarias, movimientos linguales de tipo serpentino, movimientos repetitivos de los dedos de pies y manos, temblores de las extremidades o secciones del cuerpo entero, tics, rigidez muscular, lentitud de movimientos, espasmos faciales, contracciones agudas de diversos músculos, particularmente del cuello y el hombro que pueden conducir eventualmente a una contracción muscular dolorosa y prolongada, inquietud, incomodidad e incapacidad de permanecer quieto. Los síntomas de comportamiento anormal, algunos de los cuales son de naturaleza motora, incluyen irritabilidad, mal control de los impulsos, distraibilidad, agresividad y comportamientos estereotípicos que se observan comúnmente con deficiencias mentales tales como balancearse, saltar, correr, girar y despegarse.

Cualquiera de los usos de la invención puede usarse para aliviar un síntoma de una enfermedad o trastorno neurológico tal como enfermedad de Parkinson (parálisis agitante), incluyendo enfermedad de Parkinson primaria, parkinsonismo secundario y parkinsonismo postencefálico; trastornos del movimiento inducidos por fármacos, incluyendo parkinsonismo, distonia aguda, discinesia tardía y síndrome neuroléptico maligno; enfermedad de Huntington (corea de Huntington, corea progresiva crónica, corea hereditaria); delirio (estado de confusión aguda); demencia; enfermedad de Alzheimer; demencias no de Alzheimer, incluyendo demencia con cuerpos de Lewy, demencia vascular, demencia de Binswanger (encefalopatía arterioesclerótica subcortical), demencia pugilística, hidrocefalia de presión normal, parálisis general progresiva, demencia frontotemporal, demencia multiinfarto y demencia por SIDA; deterioro de memoria asociado a la edad (DMAE); amnesias tales como amnesias retrógrada, anterógrada, global, específica de modalidad, transitoria, estable y progresiva, y amnesias postraumáticas, y enfermedad de Korsakoff.

Otras enfermedades y trastornos incluyen hipotensión ortostática idiopática, síndrome de Shy-Drager, parálisis supranuclear progresiva (síndrome de Steele-Richardson-Olszewski); lesiones estructurales del cerebelo, tales como las asociadas a infartos, hemorragias o tumores; degeneraciones espinocerebelosas tales como las asociadas a ataxia de Friedreich, abetalipoproteinemia (por ejemplo, síndrome de Bassen-Komzweig, deficiencia de vitamina E), enfermedad de Refsum (enfermedad de almacenamiento de ácido fitánico), ataxias cerebelares, atrofia

de sistemas múltiples (atrofia olivopontocerebelosa), ataxia-telangiectasia y trastornos multisistémicos mitocondriales; encefalomiелitis diseminada aguda (encefalomiелitis postinfecciosa); adrenoleucodistrofia y adrenomiелoneuropatía; atrofia óptica hereditaria de Leber; mielopatía asociada al HTLV y esclerosis múltiple; trastornos neuronales motores tales como esclerosis lateral amiotrófica, parálisis bulbar progresiva, atrofia muscular progresiva, esclerosis lateral primaria y parálisis pseudobulbar progresiva, y atrofia muscular espinal de tipo I (enfermedad de Werdnig-Hoffmann), atrofia muscular espinal de tipo II (intermedia), atrofia muscular espinal de tipo III (enfermedad de Wohlfart-Kugelberg-Welander) y atrofia muscular espinal de tipo IV.

Enfermedades y trastornos adicionales incluyen trastornos del plexo tales como plexopatía y neuritis braquial aguda (amiotrofia neurálgica); neuropatías periféricas tales como mononeuropatías, mononeuropatías múltiples y polineuropatías, incluyendo parálisis del nervio cubital, síndrome del túnel carpiano, parálisis del nervio peroneo, parálisis del nervio radial, síndrome de Guillain-Barre (parálisis ascendente de Landry; polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria aguda), polineuropatía crónica recidivante, neuropatía motora y sensitiva hereditaria, por ejemplo, de tipos I y II (enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, atrofia muscular peronea) y de tipo III (neuropatía intersticial hipertrófica, enfermedad de Dejerine-Sottas); trastornos de transmisión neuromuscular tales como miastenia grave; trastornos neurooftalmológicos tales como síndrome de Homer, oftalmoplejia internuclear, parálisis de la mirada y síndrome de Parinaud; parálisis de nervio craneal, neuralgia del trigémino (tic doloroso); parálisis de Bell y neuralgia glossofaríngea; lesión del sistema nervioso inducida por radiación; neuropatía inducida por quimioterapia (por ejemplo, encefalopatía); neuropatía por taxol; neuropatía por vincristina; neuropatía diabética; neuropatías neurovegetativas; polineuropatías y mononeuropatías y síndromes isquémicos tales como ataques isquémicos transitorios, síndrome del robo coronario de la subclavia, episodios de caída, apoplejía, apoplejía isquémica, apoplejía hemorrágica e infarto cerebral.

Para el tratamiento de enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y otros trastornos neurológicos que afectan principalmente al prosencéfalo, se suministrarían uno o más de los agentes moduladores de la neurogénesis dados a conocer, con o sin factores de crecimiento u otros agentes neurológicos, a los ventrículos del prosencéfalo para efectuar la modificación o manipulación *in vivo* de las células. Por ejemplo, la enfermedad de Parkinson es el resultado de niveles bajos de dopamina en el cerebro, particularmente el cuerpo estriado. Sería ventajoso inducir a los citoblastos inactivos propios del paciente a empezar a dividirse *in vivo*, elevando localmente por tanto los niveles de dopamina. Los usos y composiciones para uso en la presente invención proporcionan una alternativa al uso de fármacos y al controvertido uso de grandes cantidades de tejido embrionario para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Las células de dopamina pueden generarse en el cuerpo estriado mediante la administración de una composición que comprende factores de crecimiento al ventrículo lateral.

Para el tratamiento de EM y otros trastornos desmielinizantes o hipomielinizantes, y para el tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica u otras enfermedades neuronales motoras, se suministrarían uno o más de los agentes moduladores de la neurogénesis dados a conocer, con o sin factores de crecimiento u otros agentes neurológicos, al canal central. Además de tratar el tejido del SNC inmediatamente circundante del ventrículo, puede administrarse fácilmente un vector vírico, ADN, factor de crecimiento u otro agente neurológico a la cisterna lumbar para circulación por todo el SNC. Puede usarse la infusión de EGF o factores de crecimiento similares con los agentes moduladores de la neurogénesis de la invención para potenciar la proliferación, migración y diferenciación de neurocitoblastos y células progenitoras *in vivo* (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.851.832). En una realización preferida, se administran conjunta o secuencialmente EGF y FGF.

La barrera hematoencefálica puede evitarse mediante la transfección *in vivo* de células con vectores de expresión que contienen genes que codifican factores de crecimiento, de modo que las células mismas produzcan el factor. Está dentro del alcance de la presente invención cualquier modificación genética útil de las células. Por ejemplo, además de la modificación genética de las células para expresar factores de crecimiento, las células pueden modificarse para expresar otros tipos de agente neurológicos tales como neurotransmisores. Preferiblemente, la modificación genética se efectúa mediante infección de las células que revisten las regiones ventriculares con retrovirus recombinante o transfección usando métodos conocidos en la técnica, incluyendo transfección con CaPO₄, transfección con DEAE-dextrano, transfección con polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, lipofección y similares (véase Maniatis *et al.*, supra). Puede usarse cualquier método de modificación genética, conocido ahora o desarrollado más tarde. Con la transfección de ADN directa, las células podrían modificarse mediante bombardeo de partículas, suministro mediado por receptor y liposomas catiónicos. Cuando se usan constructos génicos quiméricos, contendrán en general promotores víricos, por ejemplo, repetición terminal larga retrovírica (LTR), de virus de simio 40 (SV40), de citomegalovirus (CMV); o específicos de células de mamífero tales como los de TH, DBH, feniletanolamina *N*-metiltransferasa, ChAT, GFAP, NSE, las proteínas NF (NF-L, NF-M, NF-H y similares) que dirijan la expresión de los genes estructurales que codifican la proteína deseada.

Los usos de la invención pueden usarse para tratar cualquier mamífero adulto, incluyendo seres humanos, vacas, caballos, perros, ovejas y gatos. Preferiblemente, los usos de la invención se usan para tratar seres humanos. En un aspecto, la invención proporciona un tratamiento regenerativo para trastornos neurológicos mediante la estimulación de neurocitoblastos adultos a crecer, proliferar, migrar, sobrevivir y/o diferenciarse para

reemplazar las células nerviosas que se han perdido o destruido. La estimulación *in vivo* de dichos citoblastos puede lograrse mediante la administración local de un agente modulador de la neurogénesis de la invención a las células en una formulación apropiada. Al aumentar la neurogénesis, las células dañadas o faltantes pueden reemplazarse para potenciar la función sanguínea.

5 Son conocidos por los expertos en esta técnica métodos para preparar formas de dosificación del agente modulador de la neurogénesis, o resultarán evidentes. La determinación de una cantidad eficaz de agente modulador de la neurogénesis para administrar está dentro de las habilidades del experto en la técnica y será rutinaria para esos expertos en la técnica. La cantidad de agente modulador de la neurogénesis para administrar dependerá del tamaño exacto y afección del paciente, pero será de al menos 0,1 ng/kg/día, al menos 1 ng/kg/día, al menos 5 ng/kg/día, al menos 20 ng/kg/día, al menos 100 ng/kg/día, al menos 0,5 µg/kg/día, al menos 2 µg/kg/día, al menos 5 µg/kg/día, al menos 50 µg/kg/día, al menos 500 µg/kg/día, al menos 1 mg/kg/día, al menos 5 mg/kg/día o al menos 10 mg ng/kg/día en un volumen de 0,001 a 10 ml. En otro método de dosificación, el modulador puede administrarse de modo que un tejido diana consiga una concentración de modulador de 0,0001 nM a 50 nM, 0,001 nM a 50 nM, 0,01 nM a 50 nM, 0,1 nM a 50 nM, 0,1 nM a 100 nM, o al menos 1 nM, al menos 50 nM, o al menos 100 nM. Las dosificaciones preferidas incluyen la administración subcutánea de al menos 10 mg dos veces por semana o al menos 25 mg dos veces por semana; la administración subcutánea de al menos 0,04 mg/kg/semana, al menos 0,08 mg/kg/semana, al menos 0,24 mg/kg/semana, al menos 36 mg/kg/semana o al menos 48 mg/kg/semana; la administración subcutánea de al menos 22 µg dos veces por semana o 44 µg dos veces por semana; o la administración intravenosa de al menos 3-10 mg/kg una vez al mes. Son intervalos de dosificación particularmente preferidos de 0,04 mg/kg a 4 mg/kg y de 0,05 mg/kg a 5 mg/kg. Estas dosificaciones pueden aumentarse 10×, 100× o 1000× en aplicaciones transdérmicas o tópicas.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso en la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el fin pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad eficaz para estimular óptimamente la proliferación de citoblastos adultos. Se apreciará que el contenido unitario de ingrediente o ingredientes activos contenidos en una dosis individual de cada forma de dosificación no tiene que constituir por sí mismo una cantidad eficaz, puesto que la cantidad eficaz necesaria puede alcanzarse mediante la administración de una pluralidad de unidades de dosificación (tales como cápsulas o comprimidos o combinaciones de los mismos). Además, se entiende que, a algunos niveles de dosificación, una cantidad eficaz puede no mostrar efectos medibles hasta después de una semana, un mes, tres meses o seis meses de uso. Adicionalmente, se entiende que una cantidad eficaz puede reducir la velocidad de deterioro natural que aparece con la edad, pero no revertir el deterioro que ya ha ocurrido. La determinación de las cantidades eficaces está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la vista de la descripción detallada proporcionada en la presente memoria. El nivel de dosis específico para cualquier usuario particular dependerá de una variedad de factores, incluyendo la actividad del agente modulador de la neurogénesis específico, la edad, el nivel de actividad física, la salud general y la gravedad del trastorno.

Una dosis terapéuticamente eficaz designa también la cantidad necesaria para conseguir el efecto deseado sin efectos secundarios indeseados o intolerables. La toxicidad y eficacia terapéutica de un agente modulador de la neurogénesis de la invención pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o animales experimentales. Usando métodos estándares, puede determinarse la dosificación que muestra eficacia en aproximadamente un 50% de la población de ensayo, la DE_{50} . La eficacia puede ser cualquier signo de proliferación de citoblasto adulto. De forma similar, puede determinarse la dosificación que produce un efecto secundario indeseable en un 50% de la población, la DS_{50} . Los efectos secundarios indeseables incluyen muerte, heridas, exantemas, enrojecimiento anormal y similares. La relación de dosis entre efectos secundarios y efectos terapéuticos puede expresarse como un índice terapéutico y puede expresarse como una relación entre DS_{50}/DE_{50} . Se prefieren agentes moduladores de la neurogénesis con altos índices terapéuticos, concretamente, agentes moduladores de la neurogénesis que sean eficaces a baja dosificación y que no tengan efectos secundarios indeseables hasta dosis muy altas. Un índice terapéutico preferido es mayor de aproximadamente 3, más preferiblemente, el índice terapéutico es mayor de 10, lo más preferiblemente el índice terapéutico es mayor de 25, tal como, por ejemplo, mayor de 50. Además, son más preferidos los agentes moduladores de la neurogénesis que no tienen efectos secundarios a ningún nivel de dosificación. Finalmente, son los más preferidos los agentes moduladores de la neurogénesis que son eficaces a bajas dosificaciones y que no tienen efectos secundarios a ningún nivel de dosis. La formulación, vía de administración y dosificación exactas pueden elegirse dependiendo del efecto deseado y pueden realizarse por los expertos en la técnica.

Los intervalos de dosificación pueden determinarse mediante ensayo experimental. Deberían administrarse uno o más agentes moduladores de la neurogénesis para uso en la invención usando un régimen que mantenga la proliferación de citoblastos adultos aproximadamente a un 10% por encima de lo normal, aproximadamente un 20% por encima de lo normal, aproximadamente un 50% por encima de lo normal, tal como un 100% por encima de lo normal, preferiblemente aproximadamente un 200% por encima de lo normal, más preferiblemente aproximadamente un 300% por encima de lo normal y lo más preferiblemente aproximadamente un 500% por encima de lo normal. En una realización preferida, la composición farmacéutica para uso en la invención puede comprender un agente modulador de la neurogénesis de la invención a una concentración de entre aproximadamente un 0,001% y aproximadamente un 10%, preferiblemente entre aproximadamente un 0,01% y

aproximadamente un 3% tal como, por ejemplo, aproximadamente un 1% en peso.

Es otro método de administración adecuado proporcionar un agente modulador de la neurogénesis de la invención mediante un implante o una estirpe celular capaz de expresar un agente modulador de la neurogénesis (por ejemplo, agente modulador de la neurogénesis peptídico) de modo que el implante o estirpe celular pueda proporcionar el agente modulador de la neurogénesis a una célula del SNC.

En una realización preferida de la invención, el agente modulador de la neurogénesis de la invención induce la neurogénesis en la región de la pared ventricular lateral del cerebro. En una realización más preferida, el agente modulador de la neurogénesis induce la neurogénesis en la pared ventricular lateral pero no en el hipocampo.

Los métodos de la invención pueden usarse para detectar agentes endógenos en neurocitoblastos adultos que pueden identificarse usando técnicas de PCR-TI o hibridación *in situ*. En particular, pueden identificarse los genes que están regulados positivamente o regulados negativamente en estas células en presencia de uno o más agentes moduladores de la neurogénesis de la invención. La regulación de dichos genes puede indicar que están implicados en la mediación de rutas de transducción de señal en la regulación de la función neurogénica. Además, al conocer los niveles de expresión de estos genes, y analizando las variaciones de secuencia genética o aminoacídica de estos genes o productos génicos, puede ser posible diagnosticar la enfermedad o determinar el papel de los citoblastos en la enfermedad. Dicho análisis proporcionará información importante para usar tratamientos de la enfermedad basados en células.

6. Método para la reducción de un síntoma de un trastorno mediante la administración de células tratadas con agentes moduladores de la neurogénesis

Recogida de células e inducción de la neurogénesis:

Otra realización de la invención está dirigida a un método para inducir a citoblastos adultos a experimentar neurogénesis *in vitro*—para generar grandes números de células nerviosas capaces de diferenciación en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. La inducción de la proliferación y diferenciación de citoblastos puede realizarse cultivando las células en suspensión o sobre un sustrato sobre el que puedan adherirse. Las células inducidas pueden usarse para tratamiento terapéutico. Por ejemplo, la terapia puede implicar, al menos, (1) proliferación y diferenciación de células nerviosas *in vitro*, y entonces trasplante, (2) proliferación de células nerviosas *in vitro*, trasplante y entonces proliferación y diferenciación adicionales *in vivo*, (3) proliferación *in vitro*, trasplante y diferenciación *in vivo*, y (4) proliferación y diferenciación *in vivo*. Por tanto, la invención proporciona un medio para generar grandes números de células para trasplante en el tejido nervioso de un hospedador para tratar enfermedades neurodegenerativas y traumatismos neurológicos, para métodos no quirúrgicos de tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y traumatismos neurológicos y para aplicaciones de análisis de fármacos.

Puede usarse la progenie de citoblastos para trasplante en un hospedador heterólogo, autólogo o xenogénico. Los citoblastos multipotentes pueden obtenerse a partir de tejido nervioso embrionario, postnatal, juvenil o adulto, u otros tejidos. Los citoblastos heterólogos humanos pueden derivar de tejido fetal después de aborto provocado o de un donante de órganos postnatal, juvenil o adulto. El tejido autólogo puede obtenerse mediante biopsia, o a partir de pacientes que experimenten cirugía (por ejemplo, neurocirugía) en que se retira tejido, por ejemplo, durante cirugía por epilepsia, lobulectomías temporales e hipocampectomías. Los citoblastos se han aislado de una variedad de regiones ventriculares del SNC adulto y han proliferado *in vitro* usando los métodos detallados en la presente memoria. En diversas realizaciones de la invención, el tejido puede obtenerse de cualquier animal, incluyendo insectos, peces, reptiles, aves, anfibios, mamíferos y similares. La fuente preferida de tejido (por ejemplo, tejido nervioso) es de mamíferos, preferiblemente roedores y primates, y lo más preferiblemente de ratones y seres humanos.

En el caso de un animal donante heterólogo, el animal puede sacrificarse y retirarse el tejido nervioso y la zona específica de interés usando un procedimiento estéril. Las zonas de interés particular incluyen cualquier zona de la que puedan obtenerse neurocitoblastos adultos que sirvan para restaurar la función de una zona degenerada del sistema nervioso del hospedador, particularmente del SNC del hospedador. Las zonas adecuadas incluyen corteza cerebral, cerebelo, mesencéfalo, tronco encefálico, médula espinal y tejido ventricular, y zonas del SNC que incluyen el cuerpo carotídeo y la médula suprarrenal. Las zonas preferidas incluyen regiones en los ganglios basales, preferiblemente el cuerpo estriado que consiste en núcleo caudado y putamen, o diversos grupos celulares tales como el globo pálido, núcleo subtalámico y núcleo basal que se encuentra que están degenerados en pacientes con enfermedad de Alzheimer, o la parte compacta de la sustancia negra que se encuentra que está degenerada en pacientes con enfermedad de Parkinson. Se obtiene tejido nervioso particularmente preferido a partir de tejido ventricular, que se encuentra revistiendo ventrículos del SNC e incluye los subepéndimos. El término "ventrículo" designa cualquier cavidad o pasaje dentro del SCN a través del cual fluya líquido cefalorraquídeo. Por tanto, el término no solo engloba los ventrículos lateral, tercero y cuarto, sino que engloba también el canal central, el acueducto cerebral y otras cavidades del SNC.

Pueden obtenerse células a partir de tejido de donante (por ejemplo, tejido nervioso) mediante la disociación de células individuales de la matriz extracelular conectiva del tejido. El tejido de una región nerviosa particular se retira del cerebro usando un procedimiento estéril, y las células se disocian usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo tratamiento con enzimas tales como tripsina, colagenasa y similares, o usando

métodos físicos de disociación tales como con un instrumento romo. La disociación de células fetales puede llevarse a cabo en medio de cultivo de tejido, mientras que es un medio preferido para la disociación de células juveniles y adultas el líquido cefalorraquídeo artificial bajo en Ca^{2+} (LCRa). El LCRa normal contiene NaCl 124 mM, KCl 5 mM, MgCl_2 1,3 mM, CaCl_2 2 mM, NaHCO_3 26 mM y D-glucosa 10 mM. El LCRa bajo en Ca^{2+} contiene los mismos ingredientes excepto por MgCl_2 a una concentración 3,2 mM y CaCl_2 a una concentración 0,1 mM. Se centrifugan las células disociadas a baja velocidad, entre 200 y 2000 rpm, habitualmente entre 400 y 800 rpm, y se resuspenden entonces en medio de cultivo. Las células pueden cultivarse en suspensión o sobre un sustrato fijo. Sin embargo, los sustratos tienden a inducir la diferenciación de la progenie de neurocitoblastos. Por tanto, se prefieren cultivos en suspensión si se desean grandes números de progenie de neurocitoblastos indiferenciados. Se siembran las suspensiones celulares en cualquier recipiente capaz de sustentar células, particularmente matraces de cultivo, placas de cultivo o botellas rotativas, y más particularmente en matraces de cultivo pequeños tales como matraces de cultivo de 25 cm^2 . Se resuspenden las células cultivadas en suspensión aproximadamente a 5×10^4 a 2×10^1 células/ml, preferiblemente 1×10^5 células/ml. Se siembran las células sembradas sobre un sustrato fijo aproximadamente a $2-3 \times 10^3$ células/ cm^2 , preferiblemente $2,5 \times 10^3$ células/ cm^2 .

Las células nerviosas disociadas pueden disponerse en cualquier medio de cultivo conocido capaz de apoyar el crecimiento celular, incluyendo HEM, DMEM, RPMI, F-12 y similares, que contienen complementos que son necesarios para el metabolismo celular tales como glutamina y otros aminoácidos, vitaminas, minerales y proteínas útiles tales como transferrina y similares. Los métodos para cultivar células nerviosas son conocidos. Véanse las patentes de EE.UU. n° 5.980.885, 5.851.832, 5.753.506, 5.750.376, 5.654.183, 5.589.376, 5.981.165 y 5.411.883. Es una realización preferida para la proliferación de citoblastos usar un medio de cultivo definido exento de suero (por ejemplo, medio completo), ya que el suero tiende a inducir la diferenciación y contiene componentes desconocidos (concretamente, no está definido). Se prefiere también un medio de cultivo definido si las células se van a usar con fines de trasplante. Es un medio de cultivo particularmente preferido un medio de cultivo definido que comprende una mezcla de DMEM, F12 y una mezcla definida de hormonas y sal. Las condiciones de cultivo deberían ser cercanas a las condiciones fisiológicas. El pH del medio de cultivo debería ser cercano al pH fisiológico, preferiblemente entre pH 6-8, más preferiblemente entre aproximadamente pH 7 a 7,8, siendo más preferido el pH 7,4. Las temperaturas fisiológicas están en el intervalo entre aproximadamente 30 y 40°C. Se cultivan preferiblemente las células a temperaturas entre aproximadamente 32 y aproximadamente 38°C, y más preferiblemente entre aproximadamente 35 y aproximadamente 37°C.

El medio de cultivo se complementa con al menos un agente modulador de la neurogénesis de la invención. El número de progenie de neurocitoblastos proliferados *in vitro* a partir del SNC de mamífero puede aumentarse o mantenerse drásticamente poniendo el cultivo celular en contacto con un factor modulador de la neurogénesis de la invención. Esta capacidad de potenciar la proliferación de citoblastos es inestimable cuando los citoblastos se van a recoger para trasplante posterior de vuelta a un paciente, haciendo por tanto la cirugía inicial 1) menos traumática porque tendría que retirarse menos tejido, 2) más eficaz porque proliferaría *in vitro* un mayor rendimiento de citoblastos por cirugía y 3) más segura debido a la ocasión reducida de mutación y transformación neoplásica con un tiempo de cultivo reducido. Opcionalmente, los citoblastos del paciente, una vez han proliferado *in vitro*, podrían modificarse genéticamente *in vitro* también usando las técnicas descritas a continuación. La modificación genética *in vitro* puede ser más deseable en ciertas circunstancias que las técnicas de modificación genética *in vivo* cuando se requiere más control sobre la infección con el material genético.

Después de la proliferación, la progenie de citoblastos puede crioconservarse hasta que sea necesario mediante cualquier método conocido en la técnica. En una realización preferida de la invención, las células derivan de la región de la pared ventricular lateral del cerebro. En otra realización preferida de la invención, las células derivan del SNC, pero no del hipocampo.

45 Diferenciación celular:

Se incluyen en la invención métodos de uso de los agentes moduladores de la neurogénesis dados a conocer para aumentar o mantener la proliferación de citoblastos adultos *in vitro* y obtener grandes números de células diferenciadas. La diferenciación de las células puede inducirse mediante cualquier método conocido en la técnica. En un método preferido, se induce la diferenciación poniendo en contacto la célula con un agente modulador de la neurogénesis de la invención que activa la cascada de eventos biológicos que conduce a crecimiento y diferenciación. Como se da a conocer en esta invención, estos eventos incluyen la elevación del AMPc y Ca^{2+} intracelulares.

La diferenciación celular puede monitorizarse usando anticuerpos de antígenos específicos de neuronas, astrocitos u oligodendrocitos, que pueden determinarse mediante técnicas de inmunocitoquímica bien conocidas en la técnica. Son conocidos muchos marcadores específicos neuronales. En particular, los marcadores celulares de neuronas incluyen NSE, NF, β -tub, MAP-2; y para neuroglia, GFAP (u identificador de astrocitos), galactocerebrósido (GalC) (un identificador glulopídico de mielina de oligodendrocitos) y similares.

La diferenciación puede monitorizarse también mediante histoquímica de hibridación *in situ*, que puede efectuarse también usando sondas de ADNc o ARN específicas de ARNm de neurotransmisores peptídicos o enzimas sintetizadoras de neurotransmisores. Estas técnicas pueden combinarse con métodos inmunocitoquímicos para potenciar la identificación de fenotipos específicos. Si es necesario, pueden efectuarse análisis adicionales

mediante procedimientos de transferencia Western y Northern.

Un método preferido para la identificación de neuronas usa la inmunocitoquímica para detectar inmunorreactividad por NSE, NF, NeuN y la proteína específica de neuronas tau-1. Debido a que estos marcadores son altamente fiables, seguirán siendo útiles para la identificación primaria de neuronas, sin embargo, las neuronas pueden identificarse también basándose en su fenotipo neurotransmisor específico como se describe anteriormente. Los astrocitos de tipo I, que son neuroglíocitos diferenciados que tienen una morfología plana de tipo protoplasmático/fibroblástico, se identifican preferiblemente por su inmunorreactividad por GFAP pero no A2B5. Los astrocitos de tipo II, que son neuroglíocitos diferenciados que presentan una morfología estrellada en procesamiento, se identifican preferiblemente usando inmunocitoquímica por su fenotipo GFAP(+), o fenotipo A2B5(+)

10 **Administración de células tratadas con un método de la invención:**

Después de la multiplicación y neurogénesis *in vitro* usando un método de la invención (véase la sección de ejemplos para una descripción detallada de estos métodos), las células pueden administrarse a cualquier animal con síntomas neurológicos anormales o neurodegenerativos obtenidos de cualquier manera, incluyendo aquellos obtenidos como resultado de lesiones mecánicas, químicas o electrolíticas, como resultado de la aspiración experimental de zonas nerviosas, o como resultado de procesos de envejecimiento. Se obtienen lesiones particularmente preferibles en modelos animales no humanos con 6-hidroxi dopamina (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), ácido iboténico y similares.

Los métodos de la presente invención permiten el uso de citoblastos adultos que son xenogénicos del hospedador. Los métodos de la invención se aplican a estas células (como se muestra en los ejemplos) para multiplicar el número o porcentaje total de neurocitoblastos en cultivo antes del uso. Puesto que el SNC es un sitio con cierto inmunoprivilegio, la respuesta inmunitaria es significativamente menor a los xenoinjertos que en otros lugares del cuerpo. Sin embargo, en general, para que los xenoinjertos sean exitosos, se prefiere emplear algún método de reducción o eliminación de la respuesta inmunitaria en el tejido implantado. Por tanto, a menudo los receptores se someterán a inmunosupresión, mediante el uso de fármacos inmunosupresores tales como ciclosporina o mediante estrategias de inmunosupresión que emplean inmunosupresores aplicados localmente. La inmunosupresión se da a conocer por Gruber, *Transplantation* 54:1-11 (1992). Rossini, patente de EE.UU. n° 5.026.365, da a conocer métodos de encapsulación adecuados para inmunosupresión local.

Como alternativa al empleo de técnicas de inmunosupresión, pueden aplicarse métodos de sustitución génica o inactivación génica usando recombinación homóloga en citoblastos embrionarios, enseñados por Smithies *et al.* (*Nature* 317: 230-234 (1985), y extendidos a sustitución génica o inactivación génica en estirpes celulares (H. Zheng *et al.*, *PNAS*, 88: 8067-8071 (1991)), en células precursoras para la eliminación de genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Las células que carecen de expresión del MHC permitirían el injerto de poblaciones de células nerviosas enriquecidas a través de las barreras de histocompatibilidad alogénica, y quizá incluso xenogénica, sin necesidad de inmunosupresión del receptor. Se dan a conocer también por Gruber (supra) revisiones y citas generales para el uso de los métodos recombinantes para reducir la antigenicidad de células donantes. Se dan a conocer por Faustman, documento WO 92/04033 (1992), enfoques ejemplares para la reducción de la inmunogenicidad de trasplantes mediante modificación de superficie. Como alternativa, puede reducirse la inmunogenicidad del injerto preparando células precursoras a partir de un animal transgénico que tiene antígenos de MHC alterados o eliminados.

El injerto de células preparadas a partir de tejido que es alogénico del receptor empleará lo más a menudo tipaje de tejido en un esfuerzo por ajustar lo más estrechamente el tipo de histocompatibilidad del receptor. La edad de la célula donante así como la edad del receptor han demostrado ser factores importantes en la mejora de la probabilidad de supervivencia del injerto neuronal. La eficacia del injerto se reduce al aumentar la edad de las células donantes. Además, los injertos se aceptan más fácilmente por receptores más jóvenes en comparación con receptores mayores. Es probable que estos dos factores sean tan importantes para la supervivencia de injerto neuroglíocítico como para la supervivencia de injerto neuronal. En algunos casos, puede ser posible preparar células a partir del sistema nervioso propio del receptor (por ejemplo, en el caso de biopsias de extirpación de tumor, etc.). En dichos casos, pueden generarse células a partir de tejido disociado y hacerse proliferar *in vitro* usando los métodos descritos anteriormente. Tras la multiplicación adecuada de los números de células, pueden recogerse las células, modificarse genéticamente si es necesario y prepararse para inyección directa en el SNC del receptor.

El trasplante puede realizarse de forma bilateral o, en el caso de un paciente que padezca enfermedad de Parkinson, contralateral al lado más afectado. La cirugía se efectúa de manera en que puedan localizarse regiones cerebrales particulares, tales como con relación a las suturas craneales, particularmente con una guía estereotáxica. Las células se suministran por toda la zona nerviosa afectada, en particular los ganglios basales y preferiblemente el núcleo caudado y putamen, el núcleo basal o la sustancia negra. Las células se administran a la región particular usando cualquier método que mantenga la integridad de las zonas circundantes del cerebro, preferiblemente mediante cánula de inyección. Se prefieren los métodos de inyección ejemplificados por los usados por Duncan *et al.* *J. Neurocytology*, 17: 351-361 (1988) y aumentados de escala y modificados para uso en seres humanos. Pueden emplearse también para la inyección de células precursoras nerviosas los métodos enseñados por Gage *et al.*, supra, para la inyección de suspensiones celulares tales como fibroblastos en el SNC. Pueden encontrarse enfoques y métodos adicionales en "Neural Grafting in the Mammalian CNS" (1985) Bjorklund y Stenevi, eds.

Aunque los fragmentos de tejido sólido y suspensiones celulares de tejido nervioso son inmunogénicos en conjunto, podría ser posible que los tipos celulares individuales en el injerto fueran por sí mismas inmunogénicas en menor medida. Por ejemplo, Bartlett *et al.* (Prog. Brain Res. 82: 153-160 (1990)) han anulado el rechazo de aloinjerto nervioso preseleccionando una subpoblación de células neuroepiteliales embrionarias para injerto mediante el uso de separación por inmunoperlas basándose en la expresión de MHC. Por tanto, se proporciona otro enfoque para reducir las posibilidades de rechazo de aloinjertos y xenoinjertos por el receptor sin el uso de técnicas de inmunosupresión.

Cuando se administran las células a la región nerviosa particular, forman preferiblemente un injerto nervioso, en el que las células neuronales forman conexiones neuronales o sinápticas con neuronas vecinas, y mantienen el contacto con los neuroglíocitos transplantados o existentes, que pueden formar vainas de mielina alrededor de los axones de las neuronas y proporcionar una influencia trófica para las neuronas. Ya que estas células transplantadas forman conexiones, reestablecen las redes neuronales que se han dañado debido a enfermedad y envejecimiento.

La supervivencia del injerto en el hospedador vivo puede examinarse usando diversos análisis no invasivos tales como análisis de tomografía axial computerizada (análisis TAC), resonancia magnética nuclear o formación de imágenes por resonancia magnética (RMN o IRM) o, más preferiblemente, tomografía por emisión de positrones (TEP). El examen post-mortem de la supervivencia del injerto puede realizarse extirpando el tejido nervioso y examinando macroscópicamente la región afectada, o más preferiblemente, usando microscopía. Las células pueden teñirse con cualquier tinte visible en condiciones de microscopía óptica o electrónica, más particularmente con tintes que sean específicos de neuronas y neuroglia. Son particularmente útiles los anticuerpos monoclonales que identifican marcadores de superficie de células neuronales tales como el anticuerpo M6, que identifica neuronas de ratón. Los más preferibles son anticuerpos que identifican algún neurotransmisor, particularmente los dirigidos a GABA, TH, ChAT y sustancia P, y enzimas implicadas en la síntesis de neurotransmisores, en particular GAD. Las células transplantadas pueden identificarse también antes de la incorporación de tintes trazadores tales como microesferas marcadas con rodamina o fluoresceína, azul rápido, bisbenzamida o marcadores histoquímicos introducidos por retrovirus tales como el gen lac Z, que produce β -galactosidasa.

La integración funcional del injerto en el tejido nervioso del paciente puede valorarse examinando la eficacia de los injertos en la restauración de diversas funciones incluyendo, pero sin limitación, ensayos de funciones endocrina, motora, cognitiva y sensitiva. Los ensayos motores que pueden usarse incluyen aquellos que cuantifican el movimiento rotacional procedente del lado degenerado del cerebro, y aquellos que cuantifican la lentitud del movimiento, equilibrio, coordinación, acinesia o falta de movimiento, rigidez y temblores. Los ensayos cognitivos incluyen diversos ensayos de capacidad de efectuar tareas diarias, así como diversos ensayos de memoria, incluyendo rendimiento en laberinto.

Pueden producirse y transplantarse citoblastos adultos usando los procedimientos anteriores para tratar enfermedades desmielinizantes como se describe con detalle en la presente memoria. Las enfermedades desmielinizantes adultas para las que las células producidas mediante los métodos de la presente invención pueden proporcionar tratamiento incluyen encefalomiелitis perivenosa diseminada, EM (de tipos Charcot y Marburg), neuromielitis óptica, esclerosis concéntrica, encefalomiелitis diseminada aguda, postencefalomiелitis, encefalomiелitis postvacunal, leucoencefalopatía hemorrágica aguda, leucoencefalopatía multifocal progresiva, polineuritis idiopática, neuropatía diftérica, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, neuromielitis óptica, esclerosis cerebral difusa, mielinosi central pontina, leucodistrofia espongiiforme y leucodistrofia (de tipo Alexander).

Las zonas de desmielinización en seres humanos están asociadas generalmente con estructuras de tipo placa. Las placas pueden visualizarse mediante formación de imágenes por resonancia magnética. Las placas accesibles son la zona diana para inyección de progenie de neurocitoblastos preparados mediante el método de la invención. Se usan métodos neuroquirúrgicos estereotácticos estándar para inyectar suspensiones celulares tanto en el cerebro como en la médula ósea. Generalmente, las células pueden obtenerse a partir de cualquiera de las fuentes examinadas anteriormente. Sin embargo, en el caso de enfermedades desmielinizantes con una base genética que afecte directamente a la capacidad de la célula formadora de mielina de mielinizar axones, el tejido alogénico sería una fuente preferida de células, ya que el tejido autólogo (concretamente, las células del receptor) no sería generalmente útil a menos que las células se hayan modificado de algún modo para asegurar que la lesión no continuará (por ejemplo, modificando genéticamente las células para curar la lesión de desmielinización).

Pueden inyectarse oligodendrocitos derivados de células proliferadas y diferenciadas *in vitro* en las zonas diana desmielinizadas en el receptor. Pueden inyectarse también cantidades apropiadas de astrocitos de tipo I. Los astrocitos son conocidos por segregar PDGF, que promueve la migración y división celular de oligodendrocitos (véanse, por ejemplo, Nobel *et al.*, Nature 333: 560-652 (1988); Richardson *et al.*, Cell, 53:309-319 (1988)).

Un tratamiento preferido de enfermedad desmielinizante usa células indiferenciadas (por ejemplo, citoblastos o células progenitoras). Las neuroesferas crecidas usando un método de la invención pueden disociarse, obteniendo células individuales que se disponen entonces en medio de inyección y se inyectan directamente en la región diana desmielinizada. Las células se diferencian *in vivo*. Los astrocitos pueden promover la remielinización en diversos paradigmas. Por lo tanto, en casos en que la proliferación de oligodendrocitos sea importante, puede ser útil la capacidad de las células precursoras de dar lugar a astrocitos de tipo I. En otras situaciones, puede aplicarse

por vía tópica PDGF durante el trasplante, así como con dosis repetidas al sitio del implante después de ello.

Puede usarse cualquier método adecuado para el implante de células cerca de las dianas desmielinizadas de modo que las células puedan asociarse con los axones desmielinizados. Los neuroglíocitos son móviles y se sabe que migran a, a lo largo de y a través de sus dianas neuronales, permitiendo por tanto el espaciamento de las inyecciones. La remielinización mediante inyección de células es una terapia útil en una amplia serie de afecciones desmielinizantes. Debería tenerse en cuenta también que, en algunas circunstancias, la remielinización por células no dará como resultado una remielinización permanente, y que se requerirán inyecciones o cirugías repetidas. Dichos enfoques terapéuticos ofrecen ventajas frente a dejar la afección sin tratar y pueden salvar la vida del receptor.

Todos los usos de esta divulgación implican la administración del agente modulador de la neurogénesis de la invención. La administración puede usar vías conocidas, incluyendo aquellas descritas en la presente memoria. Como ejemplos no limitantes, pueden administrarse uno o más agentes moduladores de la neurogénesis por vía oral o por inyección. El término inyección, en toda esta solicitud, engloba todas las formas de inyección conocidas en la técnica y al menos los métodos de inyección más comúnmente descritos tales como inyección subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intracerebroventricular, intraparenquimática, intratecal e intracraneal. Cuando la administración es por medios distintos de inyección, se contemplan todos los medios conocidos, incluyendo administración a través de la mucosa bucal, nasal o rectal. Los sistemas de suministro conocidos comúnmente incluyen la administración por fusión de péptidos para potenciar la captación o mediante sistemas de suministro de micelas o liposomas.

Los usos de la invención pueden ensayarse en modelos animales de enfermedades neurológicas. Existen muchos de dichos modelos. Por ejemplo, se enumeran en Alan A. Boulton, Glen B. Baker, Roger F. Butterworth "Animal Models of Neurological Disease" Humana Press (1992) y Alan A. Boulton, Glen B. Baker, Roger F. Butterworth "Animal Models of Neurological Disease II" Blackwell Publishing (2000). También pueden adquirirse modelos de ratón para las siguientes enfermedades en un suministrador comercial tal como Jackson Laboratory: enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), síndrome de Angelman, defectos astrocíticos, defectos de ataxia (movimiento), defectos de comportamiento y aprendizaje, defectos cerebelares, defectos de canal y transportador, defectos de ritmos circadianos, defectos corticales, epilepsia, síndrome de retraso mental por cromosoma X frágil, enfermedad de Huntington, defectos metabólicos, defectos de mielinización, defectos del tubo neural, neurodegeneración, defectos del desarrollo neuronal, defectos neuromusculares, cepa de la "Neuroscience Mutagenesis Facility", defectos de receptor de neurotransmisor y vesícula sináptica, defectos del factor neurotrófico, enfermedad de Parkinson, defectos de receptor, respuesta a catecolaminas, temblor, defectos de temblor y defectos vestibulares y de audición (véase, por ejemplo, http://jaxmice.jax.org/jaxmicedb/html/sbmodel_13.shtml; se enumeran más de 100 cepas de modelos en ratón de enfermedades neurológicas en http://jaxmice.jax.org/jaxmicedb/html/model_13.shtml). Los modelos en rata de enfermedades neurológicas son numerosos y pueden encontrarse, por ejemplo, en revisiones recientes (por ejemplo, Cenci, Whishaw y Schallert, *Nat. Rev. Neurosci.* julio de 2002; 3(7): 574-9). Un experto en la técnica, leyendo esta divulgación, sería capaz de usar los resultados de esta divulgación para diseñar modelos de ensayo animales para determinar la eficacia *in vivo*. Véase también el Ejemplo 13.

Los modelos animales de enfermedades neurológicas incluyen, al menos las siguientes cepas de ratón:

129-Akp2^{tm1Sor}, 129-Col4a3^{tm1Dec}, 129-Cstb^{tm1Rm}, 129-Edn3^{tm1Ywa}, 129-Fyn^{tm1Sor}, 129-Shh^{tm2Amc}, 129/Sv-Csk^{tm1Sor}, 129/Sv-Kcne1^{tm1Sh}, 129/Sv-Nog^{tm1Amc}, 129P1/ReJ, 129P1/ReJ-Lama2^{dy}, 129P3/J, 129P3/JEMs, 129P4-Cg-Axin^{Fu4}, 129P4/RrRk, 129S-Adprt1^{tm1Zqw}, 129S-Sst^{tm1Ute}, 129S1-Hprt^{tm1(crc)Mnn}, 129S1/Sv-p⁺Tyr⁺Kit^{S1-J/+}, 129S1/SvImJ, 129S4/SvJae-Ntf5^{tm1Nbm}, 129S6-Cln3^{tm1Nbm}, 129S6/SvEvTac-Atm^{tm1Awb}, 129X1/SvJ, 129X1/SvJ-Prll^{tm1Cnp}, ABP.EL-(D2Mit132-D2Mit103)/Frk, ABP.EL-(D2Mit133-D2Mit30)/Frk, ABP.EL-(D2Mit422-D2Mit21)/Frk, ABP.EL-E12^e, ABP/Le, AK.B6-Cln3^{tmnd/+}, ALR/LtJ, ALS/LtJ, B10.PA-Pldr^{pa}H3^{pa}a^l/Sn, B6xB10.A-H2^aH2-T18^a/SgSnJ-Lmx1a^{dr-7J}, B6xB10.Q-H2^q/SgJ-het^{q/+}, B6xB6CBCaA^{w-j}/A-Myo5a^{lr}Gnb5^{dlr}, B6xBALB/cBy-cla, B6xBALB/cByJ-Grid2^{Lc-J/+}, B6xBALB/cByJ-Lpin1^{ld/+}, B6xBALB/cByJ-mceph/+, B6xC57BLKS-mLepr^{db}Myo15^{sh2-J}, B6xSTOCK Tyr^{c-ch}Bmp5^{se}+1/Myo6^{sv}, B6xSTOCKapHps5^{ru2}Ednr^s, B6xSTOCKhet, B6xSTOCKrb, B6-Pax3^{sp}.Cg-N, B6.129-Tg(Pcp2-cre)2Mpin, B6.129-Abcd1^{tm1Kan}, B6.129-Adra2c^{tm1Gsb}, B6.129-Apoe^{tm1Unc}Ldlr^{tm1Her}, B6.129-Ascl1^{tm1And}, B6.129-Blmh^{tm1Geh}, B6.129-Calb1^{tm1Mpin}, B6.129-Dll1^{tm1Gos}, B6.129-Gabrb^{tm1Geh}, B6.129-Gria2^{tm1Rod}, B6.129-Grm4^{tm1Hpn}, B6.129-Grm5^{tm1Rod}, B6.129-Hdh^{tm3Mem}, B6.129-Hdh^{tm4Mem}, B6.129-Hdh^{tm5Mem}, B6.129-Htr2c^{tm1Jul}, B6.129-Idua^{tm1Clk}, B6.129-Kif3a^{tm1Gsn}, B6.129-Penk-rs^{tm1Pig}, B6.129-Psen1^{tm1Shn}, B6.129P1-Lama2^{dy}, B6.129P2(C)-MeCP2^{tm1TBrd}, B6.129P2-Apob^{tm1Unc}, B6.129P2-Apoe^{tm1Unc}, B6.129P2-Camk2a^{tm1Sva}, B6.129P2-Fmr1^{tm1Cgr}, B6.129P2-Hprt^{tm1D3}, B6.129P2-Ncam1^{tm1Cgn}, B6.129P2-Prll^{tm1Cnp}, B6.129P2-Psap^{tm1Suz}, B6.129S-Kns2^{tm1Gsn}, B6.129S1-Cnca^{tm1Ngai}, B6.129S1-Grik2^{tm1Sh}, B6.129S1-Mapk10^{tm1Iiv}, B6.129S1-Thrb^{tm1Df}, B6.129S2-Adra2a^{tm1LeI}, B6.129S2-Crh^{tm1Moj}, B6.129S2-Drd2^{tm1Low}, B6.129S2-En1^{tm1Aij}, B6.129S2-Ntrk2^{tm1Bbd}, B6.129S2-Pomc1^{tm1Low}, B6.129S3-Twist1^{Pde}, B6.129S4-Bdnf^{tm1Jae}, B6.129S4-Cdk5^{tm1Lht}, B6.129S4-Cdk5^{tm1Kul}, B6.129S4-Drd1a^{tm1Jcd}, B6.129S4-Drd3^{tm1Dac}, B6.129S4-Hdh^{tm1Mem}, B6.129S4-Hqs^{tm1Sor}, B6.129S4-Nqf^{tm1Jae}, B6.129S4-Nos1^{tm1Plh}, B6.129S4-Ntf3^{tm1Jae}, B6.129S4-Ntf3^{tm2Jae}, B6.129S4-Pdyn^{tm1Ute}, B6.129S4-Trpv1^{tm1Jul}, B6.129S4-Ttpa^{tm1Far}, B6.129S4-shrm^{Gt(ROSA)53Sor}, B6.129S6-Crebbp^{tm1Dfl}, B6.129S6-Nf1^{tm1Tcr}, B6.129S7-Akp2^{tm1Sor}, B6.129S7-Aplp2^{tm1Dbo}, B6.129S7-App^{tm1Dbo}, B6.129S7-Chrna3^{tm1Bay}, B6.129S7-Chrna7^{tm1Bay}, B6.129S7-Nqf^{tm1Gen}J, B6.129S7-Per2^{tm1Brd}, B6.129S7-Sod2^{tm1Lab}, B6.129S7-Twist1^{tm1Bhr}, B6.129X-Cxcr4^{tm1Qma}, B6.129X1-Brs3^{tm1Jib}, B6.129X1-Fos^{tm1Pa}, B6.129X1-Grpr^{tm1Jib}, B6.A-/+, B6.B10Sn-Spnb4^{av-Ind}, B6.BKS1ghmbp2^{tmnd-2J}, B6.BKS-Pcdh15^{av-J}, B6.BR-Agtpp1^{pcd}, B6.C-H38^c/By-Kit^{w-56J}

5 B6.C-H7^b/ByKit^{W-50J}, B6.C3Pde6b^{rd1}Hps4^{le}/++-Lmx1a^{dr-8J}/+, B6.C3-Kit^{W-44J}, B6.C3-pi/+, B6.C3-stu, B6.CAST-ahl^r, B6.CE-Galc^{twi}, B6.Cg-Tg(BAC54)36Jt, B6.Cg-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J, B6.Cg-TgN(SOD1)2Gur, B6.Cg-TgN(SOD1-G93A)^{dl}1Gur, B6.Cg-TgN(tetFosb)4468Nes, B6.Cg-Atp7a^{Mo-blo}, B6.Cg-Atp7a^{Mo-pew2J}, B6.Cg-Atp7a^{Mo-to}, B6.Cg-Cln6^{ncll}, B6.Cg-Fbn1^{1sk}+/+Pldn^{pa}, B6.Cg-Glrb^{spa}, B6.Cg-Kit^{Sl}Ca, B6.Cg-Kit^{W-24J}, B6.Cg-Kit^{W-25J}, B6.Cg-Mitf^{Mi-wh}, B6.Cg-Mitf^{Mi-wh}/Mitf^{Mi-wh}, B6.Cg-Mitf^{Mi-wh}/Mitf^{Mi-wh}, B6.Cg-Myo7a^{sh1-8J}, B6.Cg-Os+/+Cacna1a^{tg-la}, B6.Cg-Otop1^{tt}, B6.Cg-Pldn^{pa}, B6.Cg-Pmp22^{Tr-J}Re/+++, B6.Cg-Rora^{sg}+/+/+Myo5a^dBmp5^{se}, B6.Cg-Rora^{sg}/+, B6.Cg-T^{2J}+/+Qk, B6.Cg-Usp14^{ax-J}, B6.Cg-enr^{Tg(MpbReg)36Pop}, B6.Cg-wiTyrrp1^d/+++, B6.D2-Cacna1a^{tg}, B6.D2-Car2ⁿ, B6.D2-Kit^{Sl-d}/+, B6.D2-Kit^{W-45J}, B6.D2-Kit^{W-73J}, B6.D2-Pmp22^{Tr-J}, B6.D2-ingls/J y B6.KB2-Cln8^{mmnd}MsrJ. Otros modelos animales incluyen cepas que contienen las mismas mutaciones que las cepas descritas anteriormente pero en un trasfondo genético diferente.

10 En otro ejemplo, los agentes moduladores de la neurogénesis de esta divulgación pueden ensayarse en los siguientes modelos animales de enfermedad/trastorno/traumatismo del SNC para demostrar la recuperación. Los modelos de epilepsia incluyen al menos convulsiones inducidas por electrochoque (Billington A *et al.*, Neuroreport 27 de noviembre de 2000; 11(17): 3817-22), pentilentetrazol (Gamaniel K *et al.*, Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids febrero de 1989; 35(2): 63-8) o convulsiones inducidas por ácido caínico (Riban V *et al.*, Neuroscience 2002; 112(1):101-11). Los modelos de psicosis/esquizofrenia incluyen, al menos, estereotipia/locomoción inducido por anfetamina (Borison R L y Diamond B I, Biol. Psychiatry abril de 1978; 13(2): 217-25), estereotipias inducidas por MK-801 (Tiedtke *et al.*, J. Neural Transm. Gen. Sect. 1990; 81(3): 173-82), inducidas por MAM (metilazoximetanol) (Fiore M *et al.*, Neuropharmacology junio de 1999; 38(6): 857-69; Talamini L M *et al.*, Brain Res. 13 de noviembre de 1999; 847(1): 105-20) o el modelo tambaleante (Ballmaier M *et al.*, Eur. J. Neurosci. abril de 2002; 15(17): 1197-205). Los modelos de enfermedad de Parkinson incluyen, al menos, la degeneración inducida por MPTP (Schmidt y Ferger, J. Neural Transm. 2001; 108(11): 1263-82) y 6-OH dopamina (O'Dell y Marshall, Neuroreport 4 de noviembre de 1996; 7(15-17): 2457-61). Los modelos de enfermedad de Alzheimer incluyen, al menos, el modelo de lesión de fimbria-trígono cerebral (Krugel *et al.*, Int. J. Dev. Neurosci. junio de 2001; 19(3): 263-77), el modelo de lesión de preencéfalo basal (Moyse E *et al.*, Brain Res. 2 de abril de 1993; 607(1-2): 154-60). Los modelos de apoplejía incluyen, al menos, isquemia focal (Schwartz D A *et al.*, Brain Res. Mol. Brain Res. 30 de mayo de 2002; 101(1-2): 12-22); isquemia global (oclusión de 2 o 4 vasos) (Roof R L *et al.*, Stroke noviembre de 2001; 32(11): 2648-57; Yagita Y *et al.*, Stroke agosto de 2001; 32(8): 1890-6). Los modelos de esclerosis múltiple incluyen, al menos, encefalomielitis autoinmunitaria experimental inducida por glucoproteína en oligodendrocito de mielina (Slavin. A *et al.*, Autoimmunity 1998; 28(2): 109-20). Los modelos de esclerosis lateral amiotrófica incluyen al menos, el modelo de ratón pmn (Kennel P *et al.*, J. Neurol. Sci. 1 de noviembre de 2000; 180(1-2): 55-61). Los modelos de ansiedad incluyen, al menos, la prueba del laberinto elevado en cruz (Holmes A *et al.*, Behav. Neurosci. octubre de 2001; 115(5): 1129-44), la prueba de enterramiento de canicas (Broekkamp *et al.*, Eur. J. Pharmacol. 31 de julio de 1986; 126(3): 223-9) y la prueba de campo abierto (Pelleymounter *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. julio de 2002; 302(1): 145-52). Los modelos de depresión incluyen, al menos, la prueba de la indefensión aprendida, la prueba del nado forzado (Shirayama Y *et al.*, J. Neurosci. 15 de abril de 2002; 22(8): 3251-61), y la bulbectomía (O'Connor *et al.*, Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 1988; 12(1): 41-51). El modelo de aprendizaje/memoria incluye, al menos, la prueba del laberinto acuático de Morris (Schenk F y Morris R G, Exp. Brain. Res. 1985; 58(1): 11-28). Los modelos de enfermedad de Huntington incluyen, al menos, inyección de ácido quinolínico (Marco S *et al.*, J. Neurobiol. marzo de 2002; 50(4): 323-32), y la transgénesis/activación génica (revisado en Menalled L B y Chesselet M F, Trends Pharmacol. Sci. enero de 2002; 23(1): 32-9). Los modelos de animal envejecido incluyen, al menos, el uso de animales ancianos tales como ratones ancianos y ratas ancianas.

45 Los GPCR enumerados o designados en esta solicitud son útiles como marcadores para poblaciones específicas de citoblastos/progenitores adultos, en particular aNSC/progenitores, o pueden servir para diagnóstico. Los compuestos farmacológicamente activos (incluyendo agentes para la inactivación génica del ARNm) que interaccionan con estos GPCR o su correspondiente ARNm pueden modular la proliferación, diferenciación, supervivencia o migración de citoblastos/progenitores adultos y servir como terapia para trastornos degenerativos o psiquiátricos/neurológicos, traumatismo o lesión. Pueden usarse *in vitro* como marcadores para seleccionar los tipos celulares deseados para trasplante. Los compuestos o receptores designados en esta solicitud son herramientas útiles en el descubrimiento de nuevos fármacos y terapias relacionados con la proliferación, diferenciación, supervivencia y migración de citoblastos.

Ejemplos

55 A menos que se observe otra cosa, todos los experimentos se efectuaron usando técnicas de biología molecular estándares y que se describen también en la solicitud de EE.UU. en tramitación junto con la presente de n° de serie 10/429.062, presentada el 2 de mayo de 2003.

EJEMPLO 1: Reactivos

60 Los productos químicos para la disociación de tejido incluían tripsina, hialuronidasa y ADNasa (todas adquiridas en SIGMA). El medio (DMEM con glucosa 4,5 mg/ml y DMEM/F12), complemento de B27 y tripsina/EDTA se adquirieron en GIBCO. Todo el material plástico se adquirió en CorningCostar. El EGF para cultivos celulares se adquirió en BD Biosciences, y el kit ATP-SL se adquirió en BioThema.

Para las sustancias de ensayo, la colección se adquirió en Phoenix Pharmaceuticals Inc, EE.UU., variedad Pack Peptide Library (nº L-001). Los compuestos adquiridos en Sigma-Aldrich incluían forskolina (nº F6886), rolipram (nº R6520), n-6,2-o-dibutiriladenosina (nº D0260), toxina del cólera (nº C8052), MECA (nº A024), HE-NECA (nº H8034), norbinaltorfimina (nº N1771) y hormona adrenocorticotrópica (nº A0298).

5 EJEMPLO 2: Cultivos de neuroesferas de ratón

Se disoció enzimáticamente la pared lateral anterior del ventrículo lateral de ratones de 5-6 semanas de edad con hialuronidasa 0,8 mg/ml y tripsina 0,5 mg/ml en DMEM que contenía glucosa 4,5 mg/ml y 80 unidades/ml de ADNasa a 37°C durante 20 minutos. Se trituraron suavemente las células y se mezclaron con medio Neurosphere (DMEM/F12, complemento de B27, HEPES 12,5 mM, pH 7,4), 100 unidades/ml de penicilina y estreptomina 100 µg/ml. Después de pasar a través de un colador de 70 µm, se sedimentaron las células a 200 x g durante 4 minutos. Se retiró posteriormente el sobrenadante y se resuspendieron las células en medio Neurosphere complementado con EGF 3 nM. Se sembraron las células en placas de cultivo y se incubaron a 37°C. Las neuroesferas estaban listas para dividirse aproximadamente 7 días después de la siembra.

Para dividir cultivos de neuroesferas, se recogieron las neuroesferas mediante centrifugación a 200 x g durante 4 minutos. Se resuspendieron las neuroesferas en 0,5 ml de tripsina/EDTA en HBSS (1x), se incubaron a 37°C durante 2 minutos y se trituraron suavemente para ayudar a la disociación. Después de una incubación de otros 3 minutos a 37°C y trituración, se sedimentaron las células a 220 x g durante 4 minutos. Se resuspendieron las células en medio Neurosphere recién preparado complementado con EGF 3 nM y bFGF 1 nM. Se sembraron las células y se incubaron a 37°C.

20 EJEMPLO 3: Ensayo de ATP

Para determinar la proliferación, se dividieron las neuroesferas y se sembraron en medio Neurosphere como células individuales en placas de 96 pocillos, a 10.000 células/pocillo. Se efectuó el siguiente experimento en conjuntos de cuatro experimentos paralelos (concretamente, efectuados por cuadruplicado) de tal modo que las células puedan usarse para diferentes ensayos. Se añadieron las sustancias para ensayar y se incubaron las células a 37°C durante 4 días. Se lisaron las células con 0,1% de Triton-X100 en tampón Tris-EDTA. Se midió el ATP intracelular usando un kit ATP-SL según las instrucciones del fabricante (BioThema, Suecia). Se mostró que el ATP intracelular se correlaciona con el número de células. Para cada experimento, se examinaron visualmente en los pocillos los signos de neurogénesis y se contaron para confirmar los resultados del ensayo. Los resultados eran reproducibles y estadísticamente significativos.

30 EJEMPLO 4: Método de detección de AMPc

Para ensayar las elevaciones de los niveles de AMPc, se usó el kit de ensayo de luminiscencia de AMP cíclico HitHunter EFC (DiscoverRx, EE.UU.), adquirido en Applied Biosystems. Se disociaron las células como se describe anteriormente. Se sembraron entonces las células en forma de cultivo de neuroesferas no adherentes a 30.000 células/pocillo para permitir medidas reproducibles de los niveles de AMPc. Se dejaron reposar las células durante 2 horas antes de la adición de las sustancias de ensayo. Después del periodo de reposo, se añadió IBMX (3-isobutil-1-metilxantina, Sigma) 1 mM a cada pocillo y se incubó durante 10 minutos a 37°C, según las instrucciones del fabricante. Se incubaron las sustancias de ensayo durante 20 minutos a 37°C, antes de lisar las células, y se midió el AMPc. Se ensayó cada sustancia a 3 dosis (100, 10 o 1 nM), ensayando cada dosis por cuadruplicado. Se midió el AMPc según las instrucciones del kit, y se representaron los resultados como pmol/pocillo. Se usó la prueba de t de Student para calcular la significancia.

EJEMPLO 5: Medida del Ca²⁺ usando el sistema informador del elemento de respuesta NFAT

Se determinaron las elevaciones de los niveles de Ca²⁺ usando un constructo vectorial que codificaba el elemento de respuesta factor nuclear de linfocitos T activados (NFAT) acoplado con un informador de luciferasa. Se ha informado previamente que el NFAT estaba regulado de manera dependiente del Ca²⁺ (Rao *et al.*, 1997). Se detectó la señal de luciferasa con el kit Steady-Glo (Promega). Después de disociar las células (como se describe anteriormente), se centrifugaron 4-6×10⁶ células a 250 x g durante 4 minutos. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 100 µl de Nucleofector™ Solution (Amaya GmbH) y 10 µg de ADN del vector NFAT-Luc por 10⁶ células. Se transfirió la suspensión a una cubeta y se sometió a electroporación. Se sembraron las células transfectadas a 50.000 células/pocillo en forma de cultivos de neuroesferas no adherentes. Se dejaron reposar las células durante una noche antes de poner en contacto con las sustancias de ensayo. Se ensayó cada sustancia a 3-4 dosis (100, 15 o 1,5, 0,15 nM), ensayándose cada dosis por cuadruplicado. Se midió la luciferasa según las instrucciones del fabricante a las 18-24 horas después de la inducción. Se representaron los resultados como inducción en veces en comparación con el control no tratado. Se usó la prueba de t de Student para comparar con el control no tratado.

EJEMPLO 6: Colecciones de ADNc y análisis de expresión

Para la colección de ADNc de LVW, se aisló ARN del ventrículo lateral anterior de ratones adultos (C57 negros). Se generó una colección de ADNc cebada con oligo-dT usando procedimientos estándares (PCR-TI Superscript One-Step con Platinum Taq, Invitrogen), y se sometió entonces a análisis de secuencia (9000 secuencias). Para la colección de ADNc de neuroesferas, se aisló ARN de neuroesferas de segunda generación derivadas de la pared del ventrículo lateral anterior de ratones adultos (C57 negros) y se multiplicó usando los factores de crecimiento EGF y FGF2. Se generó una colección de ADNc normalizado cebada con oligo-dT usando procedimientos estándares (PCR-TI Superscript One-Step con Platinum Taq, Invitrogen), y se sometió entonces a análisis de secuencia (125000 secuencias).

10 Cultivos de neurocitoblastos humanos adultos (aHNSC)

Se tomó una biopsia de la pared lateral anterior del ventrículo lateral de un paciente humano adulto y se disoció enzimáticamente con PDD (papaína 2,5 U/ml; dispasa 1 U/ml; ADNasa I 250 U/ml) en DMEM que contenía glucosa 4,5 mg/ml y a 37°C durante 20 min. Se trituraron suavemente las células y se mezclaron con tres volúmenes de DMEM/F12 y 10% de suero fetal bovino (FBS). Se sedimentaron las células a 250 × g durante 5 min. Se retiró posteriormente el sobrenadante y se resuspendieron las células en DMEM F12 con 10% de FBS, se sembraron en placas de cultivo recubiertas con fibronectina y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Se inició al día siguiente la multiplicación del cultivo mediante cambio del medio a un medio de cultivo de aHNSC (DMEM/F12; BIT 5 9500; EGF 20 ng/ml; FGF2 20 ng/ml). Se dividieron los aHNSC usando tripsina y EDTA en condiciones estándares. Se añadió posteriormente FBS para inhibir la reacción y se recogieron las células por centrifugación a 250 × g durante 5 min. Se resembraron los aHNSC en un medio de cultivo de aHNSC.

PCR-TI

Se recogieron los cultivos de aHNSC y se extrajo el ARN total con un kit RNeasy mini (Qiagen) según el manual.

Se diseñaron y sintetizaron los pares de cebadores para los siguientes genes (véase la tabla siguiente), para identificar su presencia en los aHNSC.

Nombre del gen	Número de acceso a GenBank	Cebadores
ADORA2A	NM_000675	5'-CAATGTGCTGGTGTGCTGG (SEC ID NO:52) 3'-TAGACACCCAGCATGAGCAG(SEC ID NO:53)
EDNRA	NM_001957	5'-CAGGATCATTACCAGAAC(SEC ID NO:54) 3'-GACGCTGCTTAAGATGTTC(SEC ID NO:55)
CALCRL	NM_005795	5'-AGAGCCTAAGTTGCCAAAGG(SEC ID NO:56) 3'-GAATCAGCACAAATTCAATG(SEC ID NO:57)
MC1R	NM_002386	5'-GAACCGGAACCTGCACTC(SEC ID NO:58) 3'-TGCCCAGCAGGATGGTGAG(SEC ID NO:59)
MC5R	NM_005913	5'-GAGAACATCTTGGTCATAGG(SEC ID NO:60) 3'-AGCATTAAAGTGAGATGAAG(SEC ID NO:61)
VIPR1	NM_004624	5'-GCTACACCATGGCTACGG(SEC ID NO:62) 3'-GACTGCTGCTACTCTTCCTG(SEC ID NO:63)
VIPR2	NM_003382	5'-GATGTCTCTTGCAACAGGAAG(SEC ID NO:64) 3'-GCAAACACCATGTAGTGGAC(SEC ID NO:65)
SSTR1	NM_001049	5'-GGGAACTCTATGGTCATCTACGTGA(SEC ID NO:66) 3'-GAAATGTGTACAACACGAAGCCC(SEC ID NO:67)
SSTR2	NM_001050	5'-GGCAACACACTTGTCATTTATGTCA(SEC ID NO:68) 3'-AGGTAGCAAAGACAGATGATGGTGA(SEC ID NO:69)
ADCYAP1R1	NM_001118	5'-TACTTTGATGACACAGGCTGCT(SEC ID NO:70) 3'-AGTACAGCCACCACAAAGCCCT(SEC ID NO:71)

Se efectuó una PCR-TI (Life Technologies) de una etapa con los cebadores para detectar el ARNm de los genes de interés.

Como control positivo, se usaron cebadores del gen Flt-1. El gen Flt-1 es conocido por expresarse en aHNSC.

30 Como control negativo, se usaron cebadores del gen Flt-1 y se añadió enzima Taq sola para asegurar que el material no tenía contaminación genómica.

Se procesaron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1,5% que contenía bromuro de etidio. Se cortaron las bandas del tamaño correcto y se limpiaron con el kit de extracción de gel de Qiagen. Para aumentar la

cantidad de material para secuenciación, se amplificaron las bandas de nuevo con sus correspondientes cebadores y después de ello se secuenciaron para confirmar su identidad.

EJEMPLO 7: Ensayos de fosforilación de CREB

5 Brevemente, se dividieron NSC en una suspensión de células individuales como se describe anteriormente. Se sembró la suspensión en placas de 6 pocillos recubiertas con poli-D-lisina a una densidad de 10^6 células/pocillo. Se incubaron las células en medio suplementado con 1% de suero fetal de ternero (FBS) y se dejaron adherir durante una noche. A la mañana siguiente, se reemplazó cuidadosamente el medio por DMEM/F12 reciente y se añadió PACAP 100 nM o toxina del cólera 100 nM al medio. Se determinó la fosforilación de CREB en los puntos temporales a 15 minutos y 4 horas después del tratamiento con PACAP, y en los puntos temporales a 15 minutos, 4
10 horas, 6 horas y 8 horas después del tratamiento con toxina del cólera. Se recogieron los lisados celulares y se efectuaron análisis de transferencia Western siguiendo procedimientos estándares (Patrone *et al.*, 1999). Se utilizó el anticuerpo específico anti-fosfo-CREB (dilución 1:1000; Upstate Biotechnology).

EJEMPLO 8: Análisis de citometría de flujo

15 Se dividieron las células en suspensiones de células individuales como se describe anteriormente. Se sembraron las células en placas de 6 pocillos recubiertas con poli-D-lisina a una densidad de 10^6 células/pocillo. Después de esto, se añadió FBS al 1% al medio y se dejaron adherir las células durante una noche. A la mañana siguiente, se reemplazó cuidadosamente el medio por DMEM/F12 reciente y se añadió la sustancia de ensayo a la concentración final predeterminada. Se cultivaron las células durante 4 días en presencia de la sustancia. Se efectuó un cambio de medio completo a mitad del periodo de incubación. Se recogieron las células mediante incubación con tripsina/EDTA durante 5 minutos a 37°C y aclarado suave con una pipeta de 1000 µl. Se aclararon las células y se centrifugaron con 500 µl de medio a 250 x g durante 4 minutos.

20 Después de esto, se transfirieron 2×10^5 células a tubos de minicentrífuga y se sedimentaron. Se resuspendió cuidadosamente el sedimento en 50 µl de tampón de fijación (Caltag) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA). A continuación, se añadieron 450 µl de PBS al tubo. Se centrifugaron las células a 200 x g durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 100 µl de tampón de permeabilización (Caltag) y se añadió anticuerpo primario (doblecortina 1:200, Santa Cruz) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las células como anteriormente y se resuspendieron en anticuerpo secundario diluido en 100 µl de PBS (IgG anti-cabra conjugado con FITC, 1:500, Vector Laboratories). Se incubaron las células en la oscuridad durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de ello, se lavaron las células como
30 anteriormente, se resuspendieron en 100 µl de PBS y se transfirieron a tubos adecuados para análisis por FACS.

35 Para el análisis por FACS, se analizaron las células en un FACSCalibur (Becton Dickinson). Se excitaron las señales de fluorescencia de las células individuales mediante un láser iónico de argón a 488 nm y se recogieron las emisiones de fluorescencia resultantes de cada célula usando filtros de paso de banda ajustados a 530 ± 30 . Se usó software de adquisición y análisis Cell Quest Pro para recoger las intensidades de señal, así como las propiedades de dispersión directa y lateral de las células. Se usó también el software para establecer los parámetros de selección electrónica lógica diseñados para diferenciar entre células vivas frente a muertas, así como entre células positivas y negativas. Se analizaron un total de 10.000 células por muestra.

EJEMPLO 9: Los niveles de AMPc se correlacionan con la proliferación de neurocitoblastos

40 El fin de esta investigación era determinar si AMPc y Ca^{2+} son reguladores importantes de la proliferación de neurocitoblastos adultos. Los experimentos analizaron un gran número de sustancias de ensayo, la mayoría de las cuales regulaban AMPc y/o Ca^{2+} mediante GPCR. Los resultados de estos experimentos indicaron que 1) los niveles de AMPc se correlacionaban con la proliferación de neurocitoblastos de ratón; 2) la estimulación de Ca^{2+} intracelular se correlacionaba con la proliferación de neurocitoblastos de ratón y 3) los neurocitoblastos de ratón retienen su potencial de diferenciarse en cualquier célula neuronal (fenotipo); 4) los neurocitoblastos de ratón y ser humano adultos mostraron respuestas similares reproducibles ante la estimulación de AMPc.
45

Para determinar si las rutas del AMPc causan proliferación, se estimularon neurocitoblastos adultos *in vitro* mediante incubación con un conjunto diverso de activadores de AMPc celular (Tabla 1, columna 1). Los resultados de estos estudios demuestran claramente que la inducción de AMPc en neurocitoblastos adultos conduce a la proliferación celular (Tabla 1, columnas 2-6). Se indujeron citoblastos adultos de ratón crecidos *in vitro* a proliferar después del tratamiento con varios compuestos pertenecientes a una colección química de ligandos de GPCR (Ejemplo 1, Tabla 2, columna 1). Se midieron los niveles de AMPc 15 minutos después de los diferentes tratamientos (Tabla 2, columnas 5-6). Se midieron los niveles de ATP, una medida del número de células, después de 4 días de tratamiento, Tabla 2, columnas 3-4). Los resultados indican una clara correlación entre la proliferación (niveles de ATP) y la inducción de AMPc en todas las sustancias analizadas. Se muestran en la Tabla 3, columnas 1-3, los GPCR de los ligandos enumerados en las Tablas 1 y 2. Se obtuvieron los datos de expresión de GPCR a partir de neuroesferas de ratón y de colecciones de ADNc de ventrículo lateral (Tabla 3, columnas 4-5).
50
55

Tabla 1: La proliferación (niveles de ATP) y los niveles de AMPc están estrechamente correlacionados en neurocitoblastos adultos de ratón

Sustancia	Conc. (nmolar)	ATP (nmol de ATP/pocillo)	Inducción de ATP en veces	AMPc (pmol/pocillo)	Inducción de AMPc en veces
Vehículo		9,3 ± 0,6	1,0	0,02 ± 0,01	
Forscolina	1000	10,4 ± 2,4	1,1	0,07 ± 0,01	3,1**
Rolipram	100	10,4 ± 0,4	1,1*	0,09 ± 0,03	3,8*
N-6,2-O-dibutiriladenosina	100	13,9 ± 1,1	1,5**	0,10 ± 0,01	4,5***
Toxina del cólera	100	12,9 ± 1,6	1,4*	0,07 ± 0,01	3,1*** (10 nM)

La Tabla 1 muestra los niveles de ATP, que reflejan el número de células, y los niveles de AMPc después del tratamiento de neurocitoblastos adultos con activadores químicos de AMPc. Se añadieron sustancias de ensayo a cultivos de citoblastos adultos de ratón a las dosis indicadas y, después de 15 minutos, se midieron los niveles de AMPc. Se midieron los niveles de ATP después de 4 días en cultivo. Se determinó la inducción en veces mediante comparación con células tratadas con vehículo. Se representaron los datos como el valor medio ± DE de ensayos por cuadruplicado en un experimento típico. Se calcularon los valores representativos basándose en dos experimentos separados. *P < 0,05; **P < 0,005; ***P < 0,001 (prueba de t de Student). n.s. = no significativo.

Tabla 2: Ligandos de GPCR que estimulan la proliferación (niveles de ATP) y la activación de AMPc en neurocitoblastos adultos de ratón. Cada uno de estos agentes es un agente modulador de la neurogénesis

Sustancia	Conc. (nM)	ATP (nmol de ATP/pocillo)	Inducción de ATP en veces	AMPc (pmol/pocillo)	Inducción de AMPc en veces
Vehículo		16,4 ± 1,3		2,23 ± 0,52	
Hormona adrenocorticotrópica	10	18,6 ± 1,0	1,1*	6,36 ± 2,58	2,8* (100 nM)
Vehículo		16,4 ± 1,3		1,84 ± 0,53	
Endotelina 1 (humana, porcina)	10	41,7 ± 7,2	2,5*	3,64 ± 1,13	2,0*
Vehículo		4,5 ± 0,6		1,84 ± 0,53	
MECA	100	7,4 ± 0,7	1,6**	3,89 ± 1,00	2,1*
HE-NECA	1000	8,2 ± 1,1	1,8**	3,32 ± 0,28	1,8*** (10 nM)
Vehículo		8,6 ± 1,4		0,13 ± 0,02	
[Cys3,6,Tyr8, Pro9]-sustancia P	100	11,2 ± 0,4	1,3**	0,29 ± 10	2,2*
Vehículo		8,6 ± 1,4		0,13 ± 0,02	
[D-Arg0, Hyp3, Igl5, D-Igl7, Oic8]-bradiginina	100	13,1 ± 2,1	1,5*	0,17 ± 0,02	1,3* (10 nM)
Vehículo		10,3 ± 0,6		0,06 ± 0,01	
Adrenomedulina (humana)	100	11,6 ± 0,8	1,1*	0,15 ± 0,3	2,5**
Vehículo		8,8 ± 0,9		0,03 ± 0,01	
[Des-Arg9, Leu8]-bradiginina	10	9,8 ± 0,4	1,1*	0,09 ± 0,02	2,6* (1 nM)
[Des-Arg9]-bradiginina	1	10,4 ± 1,0	1,2*	0,06 ± 0,01	1,7***
[D-Pen2-5]-encefalina	10	10,7 ± 0,9	1,2**	0,06 ± 0,01	1,7*
[D-pGlu1, D-Phe2, D-Trp3,6]-LH-RH	100	11,1 ± 0,4	1,3***	0,07 ± 0,02	2,0* (1 nM)
Vehículo		7,8 ± 2,0		0,21 ± 0,08	
Adrenomedulina (26-52)	1	11,4 ± 0,7	1,5**	0,33 ± 0,07	1,6*
Adrenomedulina (22-52)	100	12,3 ± 1,1	1,6**	0,34 ± 0,07	1,6*

Neoendorfina α	100	13,8 \pm 2,1	1,8**	0,36 \pm 0,09	1,7* (1 nM)
Vehículo		10,3 \pm 2,2		0,17 \pm 0,04	
β -MSH	100	13,6 \pm 1,6	1,3*	0,23 \pm 0,02	1,3** (10 nM)
Vehículo		7,8 \pm 2,0		2,23 \pm 0,52	
α -MSH	100	14,7 \pm 3,5	1,9***	5,82 \pm 0,86	2,6** (100 nM)
Vehículo		7,1 \pm 0,5		0,17 \pm 0,04	
Tirocalcitonina (de salmón)	1	9,2 \pm 0,7	1,3*	0,63 \pm 0,23	3,8* (1 nM)
Vehículo		7,1 \pm 0,5		0,10 \pm 0,02	
Calcitonina (humana)	100	9,9 \pm 1,6	1,4*	0,35 \pm 0,15	3,3*
CART (61-102)	100	8,3 \pm 0,4	1,2**	0,13 \pm 0,02	1,2* (10 nM)
Vehículo		8,8 \pm 0,9		0,09 \pm 0,03	
Colecistocinina octapeptídica [CCK(26-33)]	10	9,8 \pm 0,4	1,1*	0,27 \pm 0,06	3,1** (100 nM)
Vehículo		7,6 \pm 1,0		0,14 \pm 0,02	
DTLET	10	9,2 \pm 0,9	1,2*	0,20 \pm 0,02	1,4* (100 nM)
Vehículo		7,6 \pm 1,0		0,14 \pm 0,02	
DDAVP	100	11,5 \pm 1,4	1,5*	0,27 \pm 0,02	1,9*** (10 nM)
Vehículo		8,5 \pm 1,5		0,84 \pm 0,11	
Eledoisina	100	10,4 \pm 1,1	1,2*	1,0 \pm 0,06	1,2* (1 nM)
Vehículo		6,3 \pm 0,2		0,57 \pm 0,14	
γ -MSH	10	7,4 \pm 0,5	1,2*	0,96 \pm 0,18	1,7* (100 nM)
Vehículo		8,7 \pm 1,5		0,05 \pm 0,06	
Neurocinina α	100	11,0 \pm 1,4	1,3*	0,11 \pm 0,03	2,3* (10 nM)
Vehículo		9,4 \pm 1,4		0,03 \pm 0,01	
PACAP-38	100	26,9 \pm 3,7	2,9**	0,13 \pm 0,03	4,2**
Vehículo		10,3 \pm 2,2		0,17 \pm 0,04	
β -ANP	100	13,6 \pm 2,1	1,3*	0,70 \pm 0,04	4,2***
Vehículo		6,3 \pm 0,2		0,57 \pm 0,14	
Galanina (1-13)-espantida-amida, M40	100	7,10 \pm 0,5	1,1*	0,82 \pm 0,08	1,4** (1 nM)
Vehículo		12,5 \pm 1,8		0,07 \pm 0,06	
[Sar9, Met(0)11]-sustancia P	100	39,7 \pm 2,1	3,2***	0,16 \pm 0,05	2,2*
Vehículo		12,5 \pm 1,8		0,30 \pm 0,08	
Sarafotoxina S6a	10	43,3 \pm 4,5	3,5***	0,41 \pm 0,06	1,4*
Vehículo		15,2 \pm 3,2		0,07 \pm 0,06	
Sarafotoxina S6b	100	43,0 \pm 7,8	2,8**	0,43 \pm 0,22	6,0*
Sarafotoxina S6c	10	39,9 \pm 6,6	2,6**	0,21 \pm 0,03	3,0**
Vehículo		13,5 \pm 1,9		0,06 \pm 0,01	
[Nle8, 18, Tyr34]-hormona paratiroidea humana	1000	23,5 \pm 2,7	1,7**	0,16 \pm 0,05	2,6* (10 nM)

ACTH (humana)	1000	15,7 ± 1,3	1,2*	0,11 ± 0,02	1,8** (100 nM)
Péptido de tipo glucagón 1 (7-37) (humano)	1000	18,3 ± 1,4	1,3**	0,08 ± 0,01	1,4* (100 nM)
Vehículo		12,3 ± 1,1		0,14 ± 0,05	
Exendina 3	100	14,2 ± 1,0	1,2*	0,21 ± 0,03	1,5* (10 nM)
Vehículo		12,3 ± 1,1		0,30 ± 0,08	
Exendina 4	1000	16,0 ± 2,0	1,3*	0,49 ± 0,04	1,6*** (10 nM)
Vehículo		12,3 ± 1,1		0,20 ± 0,07	
Urotensina II (Globy)	100	14,3 ± 1,1	1,2*	0,50 ± 0,15	2,6* (10 nM)
Péptido vasoactivo intestinal (humano, porcino, de rata)	1000	20,6 ± 1,2	1,7***	0,39 ± 0,12	2,0* (100 nM)
Vehículo		13,4 ± 1,8		0,97 ± 0,46	
Norbinaltorfimina	0,1	19,4 ± 3,2	1,4*	6,10 ± 3,72	6,3** (0,01 nM)
Vehículo		7,8 ± 2,0		0,21 ± 0,08	
Proteína relacionada con agutí (87-132)-amida (humana)	10	11,2 ± 1,7	1,4*	0,5 ± 0,20	2,4*

La Tabla 2 muestra los niveles de ATP, que reflejan el número de células, y los niveles de AMPc. Se añadieron sustancias de ensayo a cultivos de citoblastos adultos de ratón a las dosis indicadas. Después de 4 días, se ensayaron los valores de ATP y AMPc. Se determinó la inducción en veces en comparación con las células tratadas con vehículo. Se representaron los datos como valor medio ± DE de ensayos por cuadruplicado en un experimento típico. Los valores representativos estaban basados en dos experimentos separados. *P < 0,05; **P < 0,005; ***P < 0,001 (prueba de t de Student). n.s. = no significativo. ^asignificativo a menos concentración.

5

Tabla 3: Análisis de expresión de posibles dianas de los ligandos de GPCR enumerados en la Tabla 2

Nombre oficial	Símbolo LocusLink en ratón	Símbolo Locus Link humano	Expresión en neuroesfera de ratón	Expresión en pared ventricular lateral de ratón	Expresión en neuroesfera humana
Receptor de adenosina A2a	Adora2a	ADORA2A	Sí	Sí	n.d.
Receptor de adenosina A2b	Adora2b	ADORA2B	Sí	Sí	Sí
Receptor de adenosina A3	Adora3	ADORA3	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor 1 de polipéptido activador de adenilato ciclasa 1	Adcyap1r1	ADCYAP1R1	Sí	Sí	Sí
Receptor de adrenomedulina	Adm.	ADMR	n.d.	n.d.	Sí
Receptor 2 de arginina y vasopresina	Avpr2	AVPR2	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor beta 1 de bradicinina	Bdkrb1	BDKRB1	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor beta 2 de bradicinina	Bdkrb2	BDKRB2	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor de calcitonina	Calcr	CALCR	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor de tipo receptor de calcitonina	Calcl	CALCRL	n.d.	n.d.	Sí
Receptor A de colecistocinina	Cckar	CCKAR	n.d.	n.d.	Sí

Receptor B de colecistocinina	Cckbr	CCKBR	n.d.	n.d.	Sí
Receptor de endotelina de tipo A	Ednra	EDNRA	Sí	Sí	Sí
Receptor de endotelina de tipo B	Ednrb	ENDRB	Sí	Sí	n.d.
Receptor 1 de galanina	Galr1	GALR1	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor 2 de galanina	Galr2	GALR2	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor 3 de galanina	Galr3	GALR3	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor de péptido 1 de tipo glucagón	Glp1r	GLP1R	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor de hormona liberadora de gonadotropina	Gnrhr	GNRHR	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor 1 de melanocortina	Mc1r	MC1R	n.d.	n.d.	Sí
Receptor 2 de melanocortina	Mc2r	MC2R	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor 3 de melanocortina	Mc3r	MC3R	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor 4 de melanocortina	Mc4r	MC4R	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor 5 de melanocortina	Mc5r	MC5R	n.d.	n.d.	Sí
Receptor 1 de péptido natriurético	Npr1	NPR1	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor 2 de péptido natriurético	Npr2	NPR2	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor 3 de péptido natriurético	Npr3	NPR3	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor opiáceo delta 1	Oprd1	OPRD1	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor opiáceo kappa 1	Oprk1	OPRK1	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor 1 de taquicinina	Tacr1	TACR1	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor 2 de taquicinina	Tacr2	TACR2	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor 3 de taquicinina	Tacr3	TACR3	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor 1 de péptido vasoactivo intestinal	Vipr1	VIPR1	Sí	Sí	Sí
Receptor 2 de péptido vasoactivo intestinal	Vipr2	VIPR2	Sí	Sí	Sí
Receptor 14 acoplado con proteína G	Gpr14	GPR14	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor 1 de hormona paratiroidea	Pthr1	PTHR1	n.d.	n.d.	n.d.

La Tabla 3 muestra que se encontró que los GPCR se expresaban en cultivos de citoblastos adultos de ratón y/o humanos. Se determinó la expresión génica en células o tejido de ratón mediante análisis de la colección de ADNc, y de la expresión humana usando PCR-TI.

Se ensayó la estimulación de la neurogénesis de una serie de compuestos que no se habían identificado anteriormente como potenciadores del AMPc intracelular. Se usó este ensayo para determinar: 1) si había compuestos adicionales que pudieran estimular la neurogénesis mediante cualquier mecanismo; y 2) si había compuestos adicionales que pudieran estimular la neurogénesis aumentando el AMPc intracelular. Sorprendentemente, se encontró que varios de estos compuestos estimulaban la neurogénesis aunque no fueran conocidos anteriormente por aumentar los niveles de AMPc intracelular. Los compuestos analizados incluían: (Des-Arg9, Leu8)-bradicinina, (Des-Arg9)-bradicinina, neoendorfina α , CART (61-102), DTLET, eledoisina, urotensina II, [Nle8,18, Tyr34]-hormona paratiroidea (1-34)-amida y [Cys3,6, Tyr8, Pro9]-sustancia P (véase la Tabla 2). La revisión de la bibliografía mostró que estas propiedades (de elevación del AMPc intracelular e inducción de la neurogénesis) no eran conocidas anteriormente.

Se repitieron los experimentos con examen visual en los pocillos de signos de neurogénesis para confirmar los resultados del ensayo previo. Los resultados eran reproducibles. El análisis visual confirmó los hallazgos anteriores y no reveló nada que contradijera los hallazgos anteriores.

EJEMPLO 10: Los niveles de Ca^{2+} se correlacionan con la proliferación de neurocitoblastos

Para mostrar que la proliferación tras un aumento del Ca^{2+} intracelular en respuesta a ligandos de GPCR está regulada positivamente en citoblastos adultos de ratón *in vitro*, se trataron las células con una serie de sustancias de ensayo (Tabla 4, columna 1). Se midió el Ca^{2+} mediante la regulación del factor nuclear del gen de linfocitos T activados (NFAT; ejemplo 5). Los resultados mostraron una clara correlación entre los niveles de ATP (Tabla 4, columnas 3-4) y la regulación positiva de NFAT (Tabla 4, columnas 5-6). Esto indica que los niveles de Ca^{2+} están fuertemente correlacionados con la proliferación de neurocitoblastos. Se encontró que los GPCR que desencadenan Ca^{2+} por los ligandos analizados (Tabla 5, columnas 1-3) estaban presentes en las dos colecciones de ADNc analizadas (Ejemplo 6; Tabla 5, columnas 4-5). La Tablas 3 y 5 (columnas 6) indican los GPCR que se identificaron en material citoblástico humano usando análisis de PCR-TI. Esto corrobora los hallazgos en citoblastos adultos de ratón, sugiriendo que la activación del Ca^{2+} puede ser también importante para desencadenar la proliferación mediada por GPCR en citoblastos humanos.

Tabla 4: Ligandos de GPCR que regulan el informador NFAT-luciferasa (Ca^{2+}) y el ATP (proliferación). Cada uno de estos agentes es un agente modulador de la neurogénesis

Sustancia	Conc. (nmolar)	ATP (nmol de ATP/pocillo)	Inducción de ATP en veces	Unidades de NFAT-luciferasa	Inducción de NFAT en veces
Vehículo		9,8 ± 2,1		42,9 ± 7,4	
Antagonista de receptor de amilina/calcitonina (8-32)	100	15,0 ± 2,2	1,5*	57,3 ± 5,4	1,3*** (0,15 nM)
Vehículo		9,8 ± 1,6		42,9 ± 7,4	
ANP (humana)	10	12,7 ± 1,0	1,3*	65,9 ± 8,9	1,5* (1,5 nM)
Vehículo		8,8 ± 0,9		21,1 ± 4,1	
CGRP (8-37)	100	10,4 ± 0,5	1,2***	28,3 ± 1,1	1,3*** (a 15 nM)
Vehículo		4,5 ± 0,6		3,4 ± 0,8	
Endotelina 1 (humana, bovina, canina, de ratón, porcina, de rata)	10	14,4 ± 2,4	3,2*	8,3 ± 2,5	2,4* (0,15 nM)
Vehículo		6,3 ± 0,2		2,4 ± 1,4	
γ -MSH	10	7,4 ± 0,5	1,2*	4,8 ± 1,5	2,0* (1,5 nM)
Vehículo		7,5 ± 0,6		2,4 ± 1,4	
Factor de liberación de hormona de crecimiento	10	12,6 ± 0,9	1,7*	4,5 ± 0,6	1,9** (15 nM)
Vehículo		8,2 ± 0,8		2,4 ± 1,4	

MGOP 27	100	10,2 ± 1,2	1,2*	4,0 ± 0,4	1,7* (1,5 nM)
Vehículo		9,4 ± 1,4		3,5 ± 0,9	
PACAP-38	10	22,0 ± 0,9	2,3***	6,2 ± 1,6	1,7*
Vehículo		12,5 ± 1,8		1,9 ± 0,5	
Sarafotoxina S6a	1	38,9 ± 3,2	3,1***	6,3 ± 2,4	3,4*
Vehículo		15,2 ± 3,2		1,9 ± 0,5	
Sarafotoxina S6b	100	43,0 ± 7,8	2,8**	13,4 ± 7,0	7,2*
Sarafotoxina S6c	1	41,6 ± 4,8	2,7***	8,3 ± 2,0	4,4*
Septida	100	25,1 ± 3,1	1,7*	3,7 ± 0,9	2,0*
Vehículo		14,0 ± 1,8		1,9 ± 0,5	
Somatostatina 28	10	17,1 ± 1,5	1,2*	3,0 ± 0,4	1,6* (100 nM)
Vehículo		9,3 ± 0,06		8,2 ± 0,7	
Toxina del cólera de <i>Vibrio cholerae</i>	100	12,9 ± 1,6	1,4*	11,6 ± 1,0	1,4**
Vehículo		9,8 ± 2,1		5,6 ± 0,5	
Angiotensina II (humana sintética)		11,7 ± 0,6	1,2*	12,0 ± 3,7	2,1*
Vehículo		8,8 ± 0,9		5,6 ± 0,5	
[D-Pen2-5]-encefalina	10	10,7 ± 0,9	1,2*	10,3 ± 2,1	1,8* (100 nM)
Vehículo		10,3 ± 0,6		5,6 ± 0,5	
Adrenomedulina	100	11,6 ± 0,8	1,1*	12,4 ± 0,9	2,2***
Vehículo		28,1 ± 5,3		8,2 ± 0,7	
Endotelina 1 (humana, porcina)	10	35,3 ± 3,7	1,3*	13,3 ± 1,3	1,6**

Tabla 4: Se transfectaron transitoriamente neurocitoblastos adultos de ratón con el constructo de NFAT-luciferasa y se indujeron con sustancias de ensayo a las dosis indicadas. Se analizaron las células 24 horas después de la inducción. Se analizaron la actividad NFAT-luciferasa y ATP. Se determinó la inducción en veces mediante comparación con células tratadas con vehículo. Se representaron los datos como valor medio ± DE de pruebas por cuadruplicado en un experimento típico. Los valores representativos estaban basados en dos experimentos separados. *P < 0,05; **P < 0,005; ***P < 0,001 (prueba de t de Student). n.s. = no significativo. ^asignificativo a menor concentración.

5

Tabla 5: Análisis de expresión de dianas de los ligandos de GPCR enumerados en la Tabla 4

Nombre oficial	Símbolo LocusLink en ratón	Símbolo Locus Link humano	Expresión en neuroesfera de ratón	Expresión en pared ventricular lateral de ratón	Expresión en neuroesfera humana
Receptor 1 de polipéptido activador de adenilato ciclasa	Adcyap1r1	ADCYAP1R1	Sí	Sí	Sí
Receptor de angiotensina 1b	Agtr1b	AGTR1B	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor de angiotensina II de tipo 2	Agtr2	AGTR2	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor de calcitonina	Calcr	CALCR	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor de tipo de receptor	Calcl	CALCRL	n.d.	n.d.	Sí

calcitonina					
Receptor de endotelina de tipo A	Ednra	EDNRA	Sí	Sí	Sí
Receptor de endotelina de tipo B	Ednrb	ENDRB	Sí	Sí	n.d.
Receptor de hormona liberadora de hormona de crecimiento	Ghrhr	GHRHR	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor 1 de melanocortina	Mc1r	MC1R	n.d.	n.d.	Sí
Receptor 3 de melanocortina	Mc3r	MC3R	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor 4 de melanocortina	Mc4r	MC4R	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor 5 de melanocortina	Mc5r	MC5R	n.d.	n.d.	Sí
Receptor 1 de péptido natriurético	Npr1	NPR1	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor 2 de péptido natriurético	Npr2	NPR2	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor 3 de péptido natriurético	Npr3	NPR3	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor opiáceo delta 1	Oprd1	OPRD1	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor 1 de somatostatina	Sstr1	SSTR1	Sí	Sí	Sí
Receptor 2 de somatostatina	Sstr2	SSTR2	Sí	Sí	Sí
Receptor 3 de somatostatina	Sstr3	SSTR3	Sí	Sí	n.d.
Receptor 4 de somatostatina	Sstr4	SSTR4	Sí	Sí	n.d.
Receptor 5 de somatostatina	Sstr5	SSTR5	Sí	Sí	n.d.
Receptor 1 de taquicinina	Tacr1	TACR1	n.d.	n.d.	n.d.
Receptor 1 de péptido vasoactivo intestinal	Vipr1	VIPR1	Sí	Sí	Sí
Receptor 2 de péptido vasoactivo intestinal	Vipr2	VIPR2	Sí	Sí	Sí

EJEMPLO 11: Respuestas de citoblastos humanos y de ratón a la estimulación de AMPc

Los experimentos descritos anteriormente sugieren que ocurre la inducción intracelular de AMPc en neurocitoblastos adultos humanos proliferativos. Para investigar adicionalmente la relevancia de estos hallazgos, se estudió la ruta del AMPc en sistemas humanos y de ratón. Puesto que la fosforilación de CREB es un efector posterior bien conocido en la ruta de activación del AMPc (Lonze y Ginty, 2002), se investigó el estado de fosforilación de este factor de transcripción en experimentos de evolución temporal. Se utilizaron dos activadores de AMPc, PACAP y toxina del cólera (Ejemplo 7). Se añadieron PACAP y toxina del cólera a neurocitoblastos adultos humanos y de ratón. El análisis de transferencia Western mostró una regulación positiva similar en neurocitoblastos de ratón que en humanos (FIG. 1). Los resultados demuestran claramente que el patrón de fosforilación de CREB en

ambos sistemas es sensible a PACAP y toxina del cólera de manera reproducible (FIG. 1). Esto sugiere que los citoblastos de ratón y humanos responden de modos similares después de la inducción celular de AMPc. Los GPCR para los que los ligandos mostraron ser proliferativos en aNSC de ratón estaban presentes también en aNSC humanos (Tabla 3, columna 6).

5 EJEMPLO 12: Los neurocitoblastos adultos retienen su potencial neuronal después de estímulos proliferativos de GPCR

10 Para entender si los neurocitoblastos proliferativos retenían su potencial neuronal después del tratamiento con ligando de GPCR, se efectuaron análisis para determinar la expresión del marcador neuronal temprano doblecortina. Se trataron neurocitoblastos con varios ligandos de GPCR durante 4 días. Se efectuó un análisis de citometría de flujo en las células con un anticuerpo contra el marcador neuronal temprano doblecortina. Como se muestra en la Tabla 6, todas las células tratadas con ligando de GPCR seguían expresando doblecortina después de 4 días en cultivo (véase también el Ejemplo 8). Esto indicaba que los NSC adultos tratados con ligando seguían siendo capaces de diferenciarse en un fenotipo neuronal.

15 **Tabla 6: Los neurocitoblastos adultos retienen su potencial neuronal después de proliferación con ligandos de GPCR**

Sustancia	Concentración	% de células positivas de doblecortina	Inducción en veces
EGF/FGF	3 nM/1 nM	2,63 ± 1,86	1
Forscolina	10 µM	6,3	2,5
Toxina del cólera de <i>Vibrio cholerae</i>	100 nM	6,7	2,6
Endotelina I humana porcina	10 nM	5,0	2,0
PACAP-38	100 nM	5,2	2,0
Hormona estimulante de [D-Trp7, Ala8, D-Phe10]-α-melanocito F:6-11/GHRP	100 nM	5,3	2,1
Neurocinina α	100 nM	4,6	1,8
Tirocalcitonina de salmón	100 nM	3,9	1,5
MECA	10 µM	2,2	0,9
[Des-Arg9]-bradicinina	100 nM	4,5	1,8
Eledoisina	100 nM	4,3	1,7
Hormona estimulante de melanocito γ	100 nM	4,1	1,6
[D-Pen2-5]-encefalina	100 nM	3,3	1,3
Neoendorfina α (porcina)	100 nM	4,0	1,6
DTLET	100 nM	4,1	1,6
[D-Arg0, Hyp3, Igl5, D-Igl7, Oic8]-bradicinina	100 nM	3,6	1,4
Adrenomedulina (humana)	100 nM	4,2	1,6
Adrenomedulina (22-52) (humana)	100 nM	2,0	0,8
Proteína relacionada con agutí (87-132)-amida (humana)	100 nM	2,4	0,9
Angiotensina II (humana)	100 nM	3,1	1,2
Hormona estimulante de melanocito β	100 nM	4,1	1,6
CART (61-102) (humana, de rata)	100 nM	4,7	1,8
Octapéptido de colecistocinina [CCK(26-33)] (no sulfatado)	100 nM	3,2	1,3
DDAVP (potencia el aprendizaje y memoria humanos)	100 nM	4,6	1,8
Sarafotoxina S6a (isotoxina cardiotoxina)	100 nM	3,2	1,3

Tabla 6: Las células proliferadas por ligandos de GPCR mantuvieron o aumentaron su potencial de madurar hasta un fenotipo neuronal.

La suma de estos resultados y los estudios anteriores sobre PACAP (véanse, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. n° de serie 60/377.734, presentada el 3 de mayo de 2002; la solicitud de patente de EE.UU. n° de serie 06/393.264, presentada el 2 de julio de 2002; la solicitud de patente de EE.UU. n° de serie 10/429.062, presentada el 2 de mayo de 2003; Mercer *et al.*, *J. Neurosci. Res.*, manuscrito en prensa) indican que los compuestos (por ejemplo, ligandos naturales, entidades químicas pequeñas, proteínas de afinidad, etc.) que aumentan los niveles de AMPc o Ca^{2+} pueden estimular la proliferación de neurocitoblastos adultos *in vitro* e *in vivo*. En algunos casos, esta estimulación puede estar mediada por GPCR. Además, la elevación de AMPc solo (concretamente, de manera independiente de GPCR) puede desencadenar un aumento de la proliferación de neurocitoblastos. Este aumento se ha observado con diversos activadores de AMPc, incluyendo 1) derivados de AMPc tales como N-6,2-O-dibutiriladenosina; 2) inhibidores de AMPc fosfodiesterasas tales como 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) y rolipram; 3) activadores de adenilato ciclasa tales como forskolina y 4) compuestos que elevan la ribosilación por ADP de la subunidad α de la proteína G estimulante (G) tales como toxina del cólera. La toxina del cólera y compuestos relacionados se cree que actúan reduciendo la actividad GTPasa y activando la subunidad α . Esto conduce a un aumento de la actividad adenilato ciclasa, dando como resultado niveles aumentados de AMPc. Adicionalmente, como se muestra en la presente memoria, varios ligandos que actúan mediante GPCR y aumentan el contenido de Ca^{2+} intracelular son también eficaces en la promoción de la neurogénesis, incluyendo la proliferación celular.

Estos experimentos muestran que la activación de AMPc o Ca^{2+} puede usarse en enfoques terapéuticos para modular la proliferación, diferenciación, supervivencia o migración de neurocitoblastos/células progenitoras adultos en diferentes condiciones fisiológicas o patológicas. Los diversos compuestos (por ejemplo, ligandos de GPCR) descritos en la presente memoria pueden exhibir diferentes especificidades celulares y perfiles de destino, lo que los hace adecuados para diferentes condiciones fisiológicas y patológicas. De forma importante, los neurocitoblastos adultos retenían su potencial neuronal después de tratamiento con ligando de GPCR. La suma de estos hallazgos indica un amplio intervalo de compuestos terapéuticos para estimular la neurogénesis mediante la elevación intracelular de AMPc y/o Ca^{2+} .

EJEMPLO 13: Proliferación de células progenitoras

Se administra por vía intraperitoneal un agente modulador de la neurogénesis a animales de ensayo adultos (n= 12) a diversas concentraciones de 0,01 a 100 mg/kg. Se administra solución salina como control negativo. Empezando dos horas después de la administración del agente modulador de la neurogénesis, se inyectaron a los animales cuatro inyecciones intraperitoneales de bromodesoxiuridina (BrdU; 50 mg/kg cada una) a intervalos de tres horas. Se perfundieron los animales después de 1, 2 o 3 días o después de 1, 2, 3 o 4 semanas después de la administración del agente modulador de la neurogénesis. Para animales estudiados durante más de un día, se administró BrdU por minibomba.

En la perfusión, se perfundieron los animales por vía transcardiaca con 50 ml de disolución salina tamponada con fosfato (PBS) enfriada con hielo y después 100 ml de 4% de paraformaldehído en PBS. Se fijan los cerebros después de la extirpación con 4% de paraformaldehído en PBS durante 24 horas a 4°C durante al menos 3 días antes de seccionar. Se preparan las secciones usando un microtomo de congelación y almacenando en crioprotector a -20°C antes de inmunotinción para BrdU.

Se inmunotiñen las secciones para BrdU con anticuerpo anti-BrdU de ratón acoplado con IgG de cabra anti-ratón biotinilada. Se aplica complejo de avidina-biotina-peroxidasa de rábano picante (HRP) a las secciones y se visualiza la inmunorreactividad haciendo reaccionar diaminobencidina con el HRP. Se usan técnicas estándares para estimar el número total de células positivas de BrdU en cada sección y en cada región del cerebro.

Se efectúan el análisis y la cuantificación de las regiones cerebrales proliferativas, las corrientes migratorias y las zonas de relevancia clínica (algunas, pero no todas, estas zonas se ejemplifican a continuación). Se efectúan estos análisis con DAB (diaminobencidina) o visualización de fluorescencia usando uno o varios de los siguientes anticuerpos: como marcadores neuronales NeuN, Tuj1, anti-tirosina hidroxilasa, anti-MAP-2, etc.; como marcadores neurogliales anti-GFAP, anti-S100, etc.; como marcadores de oligodendrocitos anti-GalC, anti-PLP, etc. Para la visualización de BrdU: anti-BrdU. La cuantificación se efectuará en todas las zonas del cerebro usando una cuantificación estereológica. En particular, las siguientes regiones son de interés particular: circunvolución dentada del hipocampo dorsal, CA1/álveus del hipocampo dorsal, bulbo olfativo (OB), zona subventricular (SVZ) y cuerpo estriado. Se efectuará la cuantificación de la doble tinción con microscopía confocal para cada estructura (por ejemplo., OB, DG, CA1/álveus, SVZ, pared a estriado), comprobando la BrdU+ para doble tinción con los marcadores de linaje

Son conocidos por el experto en la técnica otros detalles experimentales no enumerados aquí y pueden encontrarse, por ejemplo, en Pencea V *et al.*, *J. Neurosci.* 1 de septiembre (2001), 21(17): 6706-17.

Se efectúa el experimento con animales de tipo silvestre así como un modelo animal de enfermedad neurológica. Dichos modelos se enumeran en la sección de examen detallado. Es un animal preferido el ratón.

A lo largo de esta memoria descriptiva, se citan diversas patentes, solicitudes publicadas, secuencias de ADN y proteína de GenBank y referencias científicas para describir el estado y contenido de la técnica.

REFERENCIAS

- 5 • Altman J, Das G (1965) "Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats". J. Comp. Neurol. 124: 319-335.
- Altman J, Das G (1967) "Postnatal neurogenesis in the guinea-pig". Nature 214: 1098-1101.
- Biebl M, Cooper C M, Winkler J, Kuhn H G (2000) "Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain". Neurosci. Lett. 291: 17-20.
- 10 • Craig C G, Tropepe V, Morshead C M, Reynolds B A, Weiss S, van der Kooy D (1996) "In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain". J. Neurosci. 16: 2649-2658.
- Doetsch F, Caille I, Lim D A, García-Verdugo J M, Álvarez-Buylla A (1999) "Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain". Cell 97: 703-716.
- 15 • Gage F H, Kempermann G, Palmer T D, Peterson D A, Ray J (1998) "Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus". J. Neurobiol. 36: 249-266.
- Herman J P, Arous N D (1994) "Dopaminergic neural grafts after fifteen years: results and perspectives". Prog. Neurobiol. 44: 1-35.
- Jacobson M (1991) "Histogenesis and morphogenesis of cortical structures. In: *Developmental Neurobiology*", pág. 401-451: Plenum Press, Nueva York.
- 20 • Johansson C B, Svensson M, Wallstedt L, Janson A M, Frisen J (1999a) "Neural stem cells in the adult human brain". Exp. Cell. Res. 253: 733-736.
- Johansson C B, Momma S, Clarke D L, Risling M, Lendahl U, Frisen J (1999b) "Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system". Cell 96: 25-34.
- 25 • Johe K K, Hazel T G, Muller T, Dugich-Djordjevic M M, McKay R D (1996) "Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system". Genes Dev. 10: 3129-3140.
- Kuhn H G, Winkler J, Kempermann G, Thai L J, Gage F H (1997) "Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain". J. Neurosci. 17: 5820-5829.
- Lois C, Álvarez-Buylla A (1993) "Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia". Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 90: 2074-2077.
- 30 • Lonze B E, Ginty D D (2002) "Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system". Neuron 35: 605-623.
- Magavi S S, Leavitt B R, Macklis J D (2000) Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice [see comments]. Nature 405: 951-955.
- McKay R (1997) "Stem cells in the central nervous system". Science 276: 66-71.
- 35 • Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M (2002) "Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors". Cell 110: 429-441.
- Neves S R, Ram P T, Iyengar R (2002) "G protein pathways". Science 296: 1636-1639.
- 40 • Palmer T D, Markakis E A, Willhoite A R, Safar F, Gage F H (1999) "Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS". J. Neurosci. 19: 8487-8497.
- Patrone C, Andersson S, Korhonen L, Lindholm D (1999) "Estrogen receptor-dependent regulation of sensory neuron survival in developing dorsal root ganglion". Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 96: 10905-10910.
- 45 • Pencea V, Bingaman K D, Wiegand S J, Luskin M B (2001) "Infusion of Brain-Derived Neurotrophic Factor into the Lateral Ventricle of the Adult Rat Leads to New Neurons in the Parenchyma of the Striatum, Septum, Thalamus, and Hypothalamus". J. Neurosci. 21: 6706-6717.
- Rajan P, McKay R D (1998) "Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS". J. Neurosci. 18: 3620-3629.
- Rao A, Luo C, Hogan P G (1997) "Transcription factors of the NFAT family: regulation and function". Annu.

Rev. Immunol. 15: 707-747.

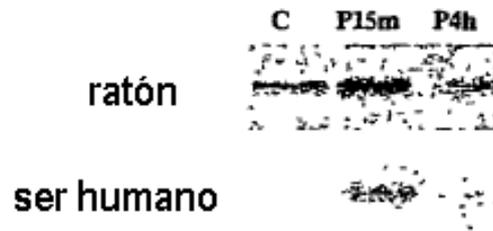
- Snyder E Y, Yoon C, Flax J D, Macklis J D (1997) "Multipotent neural precursors can differentiate toward replacement of neurons undergoing targeted apoptotic degeneration in adult mouse neocortex". Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 94: 11663-11668.
 - 5• Williams B P, Park J K, Alberta J A, Muhlebach S G, Hwang G Y, Roberts T M, Stiles C D (1997) "A PDGF-regulated immediate early gene response initiates neuronal differentiation in ventricular zone progenitor cells". Neuron 18: 553-562.
 - Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy R M, Johansson C B, Brismar H, Shupliakov O, Frisen J, Janson A M (2003) "Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra". Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 100: 7925-7930.
- 10

REIVINDICACIONES

1. Al menos un agente que eleva los niveles de AMPc intracelular en tejido nervioso, en el que dicho agente se selecciona del grupo consistente en tirocalcitonina, calcitonina, péptido de tipo glucagón 1 (7-37), exendina 3 y exendina 4 y análogos de péptido de tipo glucagón 1 (7-37), exendina 3 o exendina 4, en el que dicho análogo de péptido de tipo glucagón 1 (7-37), exendina 3 o exendina 4 interacciona con un receptor acoplado con proteína G (GPCR) que es el receptor de péptido de tipo glucagón 1, y una combinación de los mismos; o un análogo de AMPc, en el que dicho análogo de AMPc se selecciona del grupo consistente en 8-pCPT-2-O-Me-AMPc, 8-Br-AMPc, Rp-AMPSc, 8-CI-AMPc, dibutilil-AMPc, pCPT-AMPc y monofosfato de 3',5'-N6-monobutiladenosina cíclico, para uso en el aumento de la neurogénesis en un tejido nervioso de un paciente que exhibe un trastorno del sistema nervioso central seleccionado del grupo consistente en trastornos neurodegenerativos, trastornos isquémicos, traumatismos neurológicos y trastornos del aprendizaje y la memoria, en el que el agente aumenta la neurogénesis en el paciente, aumentando por tanto la neurogénesis en el tejido nervioso del paciente, y en el que aumentar la neurogénesis es aumentar la proliferación, diferenciación, migración o supervivencia de un neurocitoblasto adulto en dicho tejido nervioso.
2. El agente de la reivindicación 1, en el que el trastorno del sistema nervioso central se caracteriza por al menos un síntoma seleccionado del grupo consistente en tensión, movimientos anormales, comportamiento anormal, tics, hiperactividad, combatividad, hostilidad, negativismo, defectos de memoria, defectos sensitivos, defectos cognitivos, alucinaciones, delirios agudos, poco cuidado personal, retraimiento y reclusión.
3. El agente de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el trastorno del sistema nervioso central se selecciona del grupo consistente en enfermedad de Parkinson y trastornos parkinsonianos, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, síndrome de Shy-Drager, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad con cuerpos de Lewy, isquemia de la médula espinal, apoplejía isquémica, infarto cerebral, lesión de la médula espinal y lesión del cerebro y la médula espinal relacionada con cáncer, demencia multiinfarto, demencia geriátrica y defectos cognitivos.
4. El agente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el agente se administra al sistema nervioso central del paciente.
5. El agente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el agente se administra por una vía seleccionada del grupo consistente en administración oral, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intracerebroventricular, intraparenquimática, intratecal, intracraneal, bucal, mucosa, nasal y rectal.
6. El agente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el agente se administra mediante un sistema de suministro de liposomas.
7. El agente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho aumento de la neurogénesis se efectúa mediante la activación de un receptor de GPCR en dicho tejido nervioso, en el que dicho receptor de GPCR se selecciona del grupo consistente en receptor de calcitonina, receptor de tipo receptor de calcitonina y receptor de péptido 1 de tipo glucagón.
8. Un método *in vitro* para aumentar o estimular los niveles intracelulares de AMPc en un neurocitoblasto adulto, que comprende poner en contacto dicha célula con una cantidad eficaz de un agente seleccionado del grupo consistente en tirocalcitonina, calcitonina, péptido 1 de tipo glucagón (7-37), exendina 3 y exendina 4, y una combinación de los mismos, con lo que aumenta el nivel intracelular de AMPc en dichas células, y en el que aumenta la proliferación, diferenciación, migración o supervivencia de dicho neurocitoblasto adulto.
9. Un método para aumentar la neurogénesis *in vitro* que comprende las etapas de:
- cultivar una población de células nerviosas que comprende neurocitoblastos adultos,
 - añadir a las células cultivadas al menos un agente aumentador de la neurogénesis,
 - en caso necesario, repetir la etapa b) hasta conseguir el nivel deseado de neurogénesis,
- en el que aumentar la neurogénesis es aumentar la proliferación, diferenciación, migración o supervivencia de dichos neurocitoblastos adultos, y adicionalmente en el que dicho agente aumentador de la neurogénesis es como se define en la reivindicación 1.
10. El método de la reivindicación 9, en el que el citoblasto adulto se aísla a partir de tejido seleccionado del grupo consistente en corteza, tubérculo olfativo, retina, región septal, eminencia ganglionar lateral, eminencia ganglionar medial, amígdala, hipocampo, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo ventral y dorsal, tronco encefálico, cerebelo y médula espinal.
11. El método de la reivindicación 9 o 10, en el que el citoblasto adulto se aísla a partir de un mamífero.
12. El método de la reivindicación 11, en el que el mamífero es un ser humano.

13. Uso de al menos un agente que eleva los niveles de AMPc intracelular en el tejido nervioso, en el que dicho agente es como se define en la reivindicación 1, en la fabricación de una composición para aumentar la neurogénesis en el tejido nervioso de un paciente que exhibe un trastorno del sistema nervioso central seleccionado del grupo consistente en trastornos neurodegenerativos, trastornos isquémicos, traumatismos neurológicos y trastornos del aprendizaje y la memoria, en el que el agente aumenta la neurogénesis en el paciente, aumentando por tanto la neurogénesis en el tejido nervioso del paciente, y en el que aumentar la neurogénesis es aumentar la proliferación, diferenciación, migración o supervivencia de un neurocitoblasto adulto en dicho tejido nervioso.

A. PACAP



B. Toxina del cólera

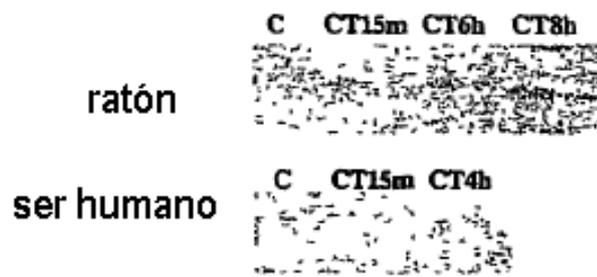


FIG. 1