

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 169**

51 Int. Cl.:
C12N 5/0797 (2010.01)
A61K 38/22 (2006.01)
A61K 38/27 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02759966 .1**
96 Fecha de presentación: **30.08.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1430114**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.06.2004**

54 Título: **Aumento del número de células madre neurales inducido por prolactina y uso terapéutico del mismo**

30 Prioridad:
14.09.2001 US 322514 P
07.06.2002 US 386404 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.06.2012

73 Titular/es:
Stem Cell Therapeutics Inc.
Bow Valley Square III 255 5th Avenue SW Suite
500
Calgary, AB T2P 3G6, CA

72 Inventor/es:
WEISS, Samuel y
SHINGO, Tetsuro

74 Agente/Representante:
Zea Checa, Bernabé

ES 2 383 169 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

Aumento del número de células madre neurales inducido por prolactina y uso terapéutico del mismo

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a métodos para aumentar el número de células madre neurales, neurogénesis o el número de neuronas olfativas mediante el uso de prolactina, así como a métodos para tratar o aliviar enfermedades o afecciones neurodegenerativas.

REFERENCIAS

Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. Nº 2002 0098178 A1.

Patente de EE.UU. Nº 5.023.252.

10 Patente de EE.UU. Nº 5.128.242.

Patente de EE.UU. Nº 5.198.542.

Patente de EE.UU. Nº 5.208.320.

Patente de EE.UU. Nº 5.268.164.

Patente de EE.UU. Nº 5.326.860.

15 Patente de EE.UU. Nº 5.506.107.

Patente de EE.UU. Nº 5.506.206.

Patente de EE.UU. Nº 5.527.527.

Patente de EE.UU. Nº 5.547.935.

Patente de EE.UU. Nº 5.614.184.

20 Patente de EE.UU. Nº 5.623.050.

Patente de EE.UU. Nº 5.686.416.

Patente de EE.UU. Nº 5.723.115.

Patente de EE.UU. Nº 5.750.376.

Patente de EE.UU. Nº 5.773.569.

25 Patente de EE.UU. Nº 5.801.147.

Patente de EE.UU. Nº 5.833.988.

Patente de EE.UU. Nº 5.837.460.

Patente de EE.UU. Nº 5.851.832.

Patente de EE.UU. Nº 5.885.574.

30 Patente de EE.UU. Nº 5.955.346.

Patente de EE.UU. Nº 5.977.307.

Patente de EE.UU. Nº 5.980.885.

Patente de EE.UU. Nº 6.015.555.

Patente de EE.UU. Nº 6.048.971.

35 Patente de EE.UU. Nº 6.191.106.

Patente de EE.UU. Nº 6.242.563.

Patente de EE.UU. Nº 6.329.508.

Patente de EE.UU. Nº 6.333.031.

Patente de EE.UU. Nº 6.413.952.

Patente de EE.UU. Nº 6.429.186.

Solicitud de Patente Internacional WO 96 40231.

5 Solicitud de Patente Internacional WO 97 48729.

Bemichtein, S. y col., S179D-human PRL, a pseudophosphorylated human PRL analog, is an agonist and not an antagonist. *Endocrinology* 142(9): 3950-3963 (2001).

DeVito, W.J. y col., "Prolactin induced expression of interleukin-1 alpha, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor alpha in cultured astrocytes", *J. Cell Biochem.* 57: 290-298 (1995).

10 Fernandez-Pol, J.A. Epidermal growth factor receptor of A431 cells. Characterization of a monoclonal anti-receptor antibody noncompetitive agonist of epidermal growth factor action. *J. Biol. Chem.* 260(8): 5003-5011 (1985).

Freeman, M.E. y col., "Prolactin: structure, function and regulation of secretion", *Physiol. Rev.* 80: 1523-1631 (2000).

Johnson, D.L. y col. Erythropoietin mimetic peptides and the future. *Nephrol. Dial. Transplant.* 15(9): 1274-1277 (2000).

15 Kaushansky, K. Hematopoietic growth factor mimetics. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 938: 131-138 (2001).

Kolb, B. y col. Nerve growth factor treatment prevents dendritic atrophy and promotes recovery of function after cortical injury. *Neuroscience* 76(4): 1139-1151 (1997).

Lim, D.A. y col., "Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis", *Neuron* 28: 713-726 (2000).

20 Livnah, O. y col. Functional mimicry of a protein hormone by a peptide agonist: the EPO receptor complex at 2.8 Å. *Science* 273(5274): 464-471 (1996).

Mode, A. y col. The human growth hormone (hGH) antagonist G120RhGH does not antagonize GH in the rat, but has paradoxical agonist activity, probably via the prolactin receptor. *Endocrinology* 137(2): 447-454 (1996).

25 Moro, O. y col. Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. *J. Biol. Chem.* 272(2): 966-70 (1997).

Rocheftort, C. y col. Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J. Neurosci.* 22(7): 2679-2689 (2002).

Shingo, T. y col. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J. Neurosci.* 21(24): 9733-9743 (2001).

30 Wrighton, N.C. y col. Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. *Science* 273(5274): 458-464 (1996).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En los últimos años la enfermedad neurodegenerativa se ha convertido en una preocupación importante debido a la expansión de población de edad avanzada, que es la de mayor riesgo en estos trastornos. Las enfermedades neurodegenerativas incluyen las enfermedades que han sido relacionadas con la degeneración de células neurales en localizaciones concretas del sistema nervioso central (SNC), que conduce a la incapacidad de dichas células para llevar a cabo su función original. Estas enfermedades incluyen la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple (EM), la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Parkinson. Adicionalmente, probablemente el área más extendida de disfunción del SNC (con respecto al número de personas afectadas) no se caracteriza por una pérdida de células neurales, sino más bien por un funcionamiento anormal de las células neurales existentes. Esto puede ser debido a la activación inapropiada de neuronas, o a la síntesis, liberación y procesamiento anormal de neurotransmisores. Dichas disfunciones pueden ser el resultado de trastornos bien estudiados y caracterizados tal como la depresión y la epilepsia, o de trastornos menos comprendidos como la neurosis y la psicosis. Además, las lesiones cerebrales a menudo dan como resultado la pérdida de células neurales, el funcionamiento inapropiado de la región cerebral afectada y las consiguientes anomalías en el comportamiento.

Por consiguiente, es deseable suministrar células neurales al cerebro para compensar las neuronas degeneradas o perdidas con el objetivo de tratar enfermedades o afecciones neurodegenerativas. Una estrategia para dicho fin es el

trasplante de células neurales al cerebro del paciente. Esta estrategia requiere una fuente de grandes cantidades de células neurales, preferiblemente procedentes del mismo individuo o de un individuo estrechamente relacionado de tal modo que se puedan minimizar los rechazos hospedante-injerto o injerto-hospedante. Puesto que no es práctico extraer una gran cantidad de neuronas o células gliales de una persona para trasplantárselas a otra, se necesita un método para cultivar una cantidad grande de neuronas o células gliales para que esta estrategia tenga éxito.

Otra opción es inducir la producción de células neurales *in situ* para compensar las células perdidas o degeneradas. Esta estrategia requiere un conocimiento amplio sobre si es posible producir células neurales en cerebros, particularmente en cerebros adultos, y cómo.

El desarrollo de técnicas para el aislamiento y el cultivo *in vitro* de células madre neurales multipotentes (por ejemplo, véanse las Patentes de EE.UU. Nº 5.750.376, 5.980.885, 5.851.832) han ampliado significativamente el panorama para ambas estrategias. Se descubrió que se pueden usar cerebros fetales para aislar y cultivar células madre neurales multipotentes *in vitro*. Además, en contraposición a la antigua creencia de que las células de cerebros adultos no son capaces de replicarse o regenerar células cerebrales, se ha descubierto que las células madre neurales también pueden ser aisladas a partir de cerebros de mamíferos adultos. Dichas células madre, tanto de cerebros fetales como adultos, son capaces de auto-replicarse. Las células progenie pueden proliferar o diferenciarse nuevamente en cualquier célula del linaje de células neurales, que incluye neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Por lo tanto, estos descubrimientos no solo proporcionan una fuente de células neurales que pueden ser usadas en trasplantes, sino que también demuestran la presencia de células madre neurales multipotentes en el cerebro adulto y la posibilidad de producir neuronas o células gliales a partir de dichas células madre *in situ*.

Es por tanto deseable desarrollar métodos para producir eficientemente células madre neurales para dos fines: para obtener más células madre y de ahí células neurales que pueden ser utilizadas en terapias de trasplante, y para identificar métodos que pueden ser utilizados para producir más células madre *in situ*.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se define en las reivindicaciones. Se puede usar en un método para aumentar el número de células madre neurales usando prolactina. El método puede llevarse a la práctica *in vivo* para obtener más células madre neurales *in situ*, que a su vez pueden producir más neuronas o células gliales para compensar las células neurales perdidas o disfuncionales. El método también puede llevarse a la práctica *in vitro* para producir un número elevado de células madre neurales en cultivo. Las células madre cultivadas pueden usarse, por ejemplo, para tratamientos de trasplante en pacientes o animales que padecen, o que sospecha que tienen, enfermedades o afecciones neurodegenerativas.

Por consiguiente, un aspecto de la presente invención proporciona prolactina para su uso en el método de aumento del número de células madre neurales, que comprende proporcionar una cantidad efectiva de una prolactina a al menos una célula madre neural bajo condiciones que den como resultado un aumento del número de células madre neurales. La célula madre neural puede estar localizada en el cerebro de un mamífero, en particular en la zona subventricular del cerebro del mamífero. Preferiblemente, la prolactina se administra al ventrículo del cerebro. Aunque se puede someter a este método a mamíferos de todas las edades, es preferible que el mamífero no sea un embrión. Más preferiblemente, el mamífero es un adulto.

El mamífero puede padecer, o puede sospecharse que tiene, una enfermedad o afección neurodegenerativa. La enfermedad o afección puede ser una lesión cerebral, tal como apoplejía o una lesión causada por una cirugía cerebral. La enfermedad o afección puede ser envejecimiento, que está asociado a una reducción significativa del número de células madre neurales. La enfermedad o afección también puede ser una enfermedad neurodegenerativa, particularmente enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica o enfermedad de Parkinson.

Alternativamente, la célula madre neural puede estar en un cultivo *in vitro*.

Tanto si la prolactina se usa *in vivo* como *in vitro*, se pueden aplicar otros factores en combinación con la prolactina, tales como eritropoietina, AMP cíclico, polipéptido de activación de adenilato ciclase pituitaria (PACAP, del inglés "pituitary adenylate cyclase activating polypeptide"), serotonina, proteína morfogenética del hueso (BMP, del inglés "bone morphogenetic protein"), factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés "epidermal growth factor"), factor de crecimiento transformante alfa (TGF, del inglés "transforming growth factor"), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, del inglés "fibroblast growth factor"), estrógeno, hormona del crecimiento, factor de crecimiento tipo insulina 1 y/o factor neurotrófico ciliar (CNTF, del inglés "ciliary neurotrophic factor"). La prolactina puede ser cualquier análogo o variante de prolactina que sea capaz de inducir un aumento del número de células madre. Preferiblemente, la prolactina es una prolactina de mamífero, lo más preferiblemente una prolactina humana.

La presente invención proporciona en un aspecto el uso de prolactina en un método de tratamiento o alivio de una enfermedad o afección neurodegenerativa en un mamífero, que comprende proporcionar una cantidad efectiva de una prolactina al cerebro del mamífero. La enfermedad o afección puede ser una lesión cerebral, tal como apoplejía

o una lesión provocada por una cirugía cerebral. La enfermedad o afección puede ser envejecimiento, que está asociado a una reducción significativa del número de células madre neurales. La enfermedad o afección también puede ser una enfermedad neurodegenerativa, particularmente enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica o enfermedad de Parkinson.

- 5 El mamífero puede recibir opcionalmente un trasplante de células madre neurales y/o de progenie de célula madre neural. El trasplante puede llevarse a cabo antes, después o al mismo tiempo que el mamífero recibe la prolactina. Preferiblemente, el mamífero recibe el trasplante antes o simultáneamente a la prolactina.

10 El mamífero puede recibir opcionalmente al menos un factor adicional, tal como eritropoietina, AMP cíclico, polipéptido que activa adenilato ciclasa pituitaria (PACAP), serotonina, proteína morfogenética de hueso (BMP), factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento transformante alfa (TGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), estrógeno, hormona del crecimiento, factor de crecimiento tipo insulina 1 y/o factor neurotrófico ciliar (CNTF).

15 La prolactina y/o el factor adicional se pueden proporcionar mediante cualquier método establecido en la técnica. Por ejemplo, se pueden administrar intravascularmente, intratecalmente, intravenosamente, intramuscularmente, subcutáneamente, intraperitonealmente, tópicamente, oralmente, rectalmente, vaginalmente, nasalmente, por inhalación o al cerebro. La administración se lleva a cabo preferiblemente de forma sistémica, particularmente mediante administración subcutánea. La prolactina o el factor adicional también se pueden proporcionar mediante administración al mamífero de una cantidad efectiva de un agente que pueda aumentar la cantidad de prolactina endógena o del factor adicional en el mamífero. Por ejemplo, el nivel de prolactina en un animal puede incrementarse usando un péptido de liberación de prolactina.

20 Cuando la prolactina o cualquier factor adicional no se administran directamente al cerebro, se puede incluir opcionalmente un permeabilizador de barrera hematoencefálica para facilitar la entrada al cerebro. Los permeabilizadores de barrera hematoencefálica son conocidos en la técnica e incluyen, a modo de ejemplo, bradikina y los agonistas de bradikina descritos en las Patentes de EE.UU. N° 5.686.416, 5.506.206 y 5.268.164 (tales como NH₂-arginina-prolina-hidroxipropilprolina-glicina-tienilalanina-serina-prolina-4-Me-tirosina-(CH₂NH)-arginina-COOH). Alternativamente, los factores se pueden conjugar con los anticuerpos de receptor de transferrina tal como se describe en las Patentes de EE.UU. N° 6.329.508, 6.015.555, 5.833.988 ó 5.527.527. Los factores también se pueden administrar como una proteína de fusión que comprende el factor y un ligando que es reactivo con un receptor de célula endotelial capilar de cerebro, tal como el receptor de transferrina (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.977.307).

30 Otro aspecto de la presente invención proporciona prolactina para su uso en un método para potenciar la formación de neuronas a partir de células madre neurales, que comprende proporcionar una prolactina a al menos una célula madre neural bajo condiciones que den como resultado un aumento de la formación de neuronas a partir de dicha célula madre neural. Además se proporciona un método para aumentar la formación de nuevas neuronas en el bulbo olfativo de un mamífero, que comprende proporcionar una cantidad efectiva de una prolactina al mamífero. También se proporcionan composiciones y composiciones farmacéuticas que comprenden una prolactina y al menos un factor adicional.

35 Otros aspectos de la presente invención proporcionan composiciones y composiciones farmacéuticas útiles en la presente invención, que comprenden una prolactina y opcionalmente un factor adicional. Las composiciones o composiciones farmacéuticas comprenden preferiblemente prolactina y eritropoietina, prolactina y EGF, o prolactina y PACAP.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Transcurso con el tiempo de la proliferación en SVZ y número de SNC en ratones hembra preñadas.

* significativamente diferente de vírgenes de edad avanzada usadas para comparar, $p < 0,05$.

45 ** $p < 0,01$.

N.D.: no determinado.

Figura 2. Efectos de la infusión de prolactina. PRL: prolactina; VEH: vehículo; PRP: péptido de liberación de PRL; 2W: 2 semanas; 4W: 4 semanas. * $p < 0,05$.

50 (A) La infusión de prolactina aumentó las células marcadas con BrdU en SVZ de cerebro anterior por vía tanto subcutánea como intracerebroventricular.

(B) La infusión de prolactina aumentó las neuronas periglomerular nuevas en el bulbo olfativo dos semanas (2W) y 4 semanas (4W) tras inyecciones Brdu.

(C) La infusión de prolactina aumentó células marcadas con BrdU en SVZ de cerebro anterior tanto en

animales macho como en animales hembra. En hembras no ovariectomizadas y en machos, las infusiones intracerebroventriculares de prolactina (PRL) y de péptido de liberación de PRL (PRP) estimularon la proliferación en SVZ.

5 **Figura 3.** La prolactina potenció el efecto de EGF para aumentar neuroesferas. En presencia de EGF, la prolactina (PRL) indujo un aumento dependiente de la dosis en la proliferación de células madre neurales (CMNs), y en su auto-renovación. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

10 **Figura 4.** La prolactina dobló el número de neuronas producidas mediante células madre neurales. Se dejó que neuroesferas cultivadas en presencia de EGF solo o de EGF más prolactina 30 nM (PRL) se diferenciaron en medio basal, y el porcentaje de neuronas en neuroesferas cultivadas en EGF más prolactina fue el doble del de las neuroesferas cultivadas solo en EGF.

* $p < 0,05$.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones y cualquier información que no entre dentro de las reivindicaciones se proporciona únicamente a modo informativo.

15 La presente invención proporciona el uso de prolactina para aumentar el número de células madre neurales. El método puede llevarse a la práctica *in vivo* para obtener más células madre neurales *in situ*, que a su vez pueden producir más neuronas o células gliales para compensar las células neurales perdidas o disfuncionales. El método también puede llevarse a la práctica *in vitro* para producir un número elevado de células madre neurales en cultivo. Las células madre cultivadas se pueden usar, por ejemplo, para el tratamiento de trasplante de pacientes o animales que padecen, o que se sospecha que tienen, enfermedades o afecciones neurodegenerativas.

20 Antes de describir la invención con más detalle, los términos usados en esta solicitud se definen tal como se presenta a continuación, a menos que se indique lo contrario.

Definiciones

25 Una "célula madre neural" es una célula madre del linaje de células neurales. Una célula madre es una célula que es capaz de reproducirse a sí misma. En otras palabras, las células hijas que resultan de las divisiones de la célula madre incluyen células madre. Las células madre neurales son capaces de diferenciarse finalmente en todos los tipos de células del linaje de células neurales, que incluye neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (los astrocitos y los oligodendrocitos se denominan colectivamente glía o células gliales). Por tanto, las células madre neurales mencionadas en la presente memoria son células madre neurales multipotentes.

30 Una "neuroesfera" es un grupo de células derivadas de una única célula madre neural como resultado de una expansión clonal. Una "neuroesfera primaria" se refiere a las neuroesferas generadas mediante uso de placas como cultivos primarios de tejido cerebral que contienen células madre neurales. El método para cultivar células madre neurales para formar neuroesferas ha sido descrito, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. Nº 5.750.376. Una "neuroesfera secundaria" se refiere a las neuroesferas generadas mediante disociación de neuroesferas primarias y permitiendo que las células individuales disociadas formen nuevamente neuroesferas.

35 Un polipéptido que comparte una "similitud de secuencia sustancial" con un factor nativo es idéntico en al menos un 30% respecto al factor nativo a nivel de aminoácidos. El polipéptido preferiblemente es idéntico en al menos un 40%, más preferiblemente en al menos un 60%, aún más preferiblemente en al menos un 70%, y lo más preferiblemente en al menos un 80% respecto al factor nativo a nivel de aminoácidos.

40 La expresión "porcentaje de identidad" o "% de identidad" de un análogo o variante respecto a un factor nativo se refiere al porcentaje de secuencia de aminoácidos del factor nativo que también se da en el análogo o variante cuando se alinean ambas secuencias. El porcentaje de identidad se puede determinar empleando cualquier método o algoritmo establecido en la técnica, tal como LALIGN o BLAST.

45 Un polipéptido posee una "actividad biológica" de un factor nativo si es capaz de unirse al receptor correspondiente al factor nativo o de ser reconocido por un anticuerpo policlonal activado contra el factor nativo. Preferiblemente, el polipéptido es capaz de unirse específicamente al receptor correspondiente al factor nativo en un ensayo de unión de receptor.

Un "agonista funcional" de un factor nativo es un compuesto que se une y que activa el receptor del factor nativo, aunque no comparte necesariamente una similitud de secuencia sustancial con el factor nativo.

50 El término "prolactina" se usa para un polipéptido que (1) comparte una similitud de secuencia sustancial con una prolactina de mamífero nativa, preferiblemente la prolactina humana nativa; y (2) posee una actividad biológica de la prolactina de mamífero nativa. La prolactina humana nativa es un polipéptido de 199 aminoácidos sintetizado principalmente en la glándula pituitaria. Por tanto, el término "prolactina" abarca análogos de prolactina que son

mutantes de eliminación, inserción o sustitución de la prolactina nativa. Además, el término “prolactina” abarca las prolactinas de otras especies y las variantes naturales de las mismas.

Un “EGF” significa un EGF nativo o cualquier análogo o variante de EGF que comparte una similitud de secuencia de aminoácidos sustancial con un EGF nativo, así como al menos una actividad biológica con el EGF nativo, tal como la unión al receptor de EGF. Particularmente incluido como EGF está el EGF nativo de cualquier especie, el TGF o el EGF recombinante modificado. Los ejemplos específicos incluyen, aunque sin limitación, el EGF recombinante modificado que tiene una eliminación de los dos aminoácidos C-terminales y una sustitución de un aminoácido neutro en la posición 51 (particularmente EGF51 gln51; Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N° 20020098178A1), la muteína de EGF (EGF-X₁₆) en la que el residuo His de la posición 16 es reemplazado por un aminoácido neutro o ácido (Patente de EE.UU. N° 6.191.106), el mutante de eliminación del aminoácido 52 de EGF que carece del residuo amino terminal del EGF nativo (EGF-D), el mutante de eliminación de EGF en el que el residuo N-terminal así como los dos residuos C-terminales (Arg-Leu) son eliminados (EGF-B), el EGF-D en el que el residuo Met de la posición 21 es oxidado (EGF-C), el EGF-B en el que el residuo Met de la posición 21 está oxidado (EGF-A), el factor de crecimiento de tipo EGF de unión a heparina (HB-EGF), betacelulina, anfiregulina, neuregulina o una proteína de fusión que comprende cualquiera de los anteriores. Otros análogos o variantes de EGF útiles son descritos en la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N° 20020098178A1 y en las Patentes de EE.UU. N° 6.191.106 y 5.547.935.

Además, un “EGF” también puede ser un agonista funcional de un receptor de EGF de mamífero nativo. Por ejemplo, el agonista funcional puede ser una secuencia de aminoácidos descrita en la Patente de EE.UU. N° 6.333.031 para el receptor EGF, o un anticuerpo que presente actividades de agonista para el receptor de EGF (Fernandez-Pol, 1985 y Patente de EE.UU. N° 5.723.115).

Un “PACAP” significa un PACAP nativo o cualquier análogo o variante de PACAP que comparta una similitud de secuencia de aminoácidos sustancial con un PACAP nativo, así como al menos una actividad biológica con el PACAP nativo, tal como la unión del receptor de PACAP. Los análogos y variantes de PACAP útiles incluyen, aunque sin limitación, las variantes de 38 aminoácidos y de 27 aminoácidos del PACAP (PACAP38 y PACAP27, respectivamente), y los análogos y variantes descritos en, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N° 5.128.242, 5.198.542, 5.208.320, 5.326.860, 5.623.050, 5.801.147 y 6.242.563.

Adicionalmente, un “PACAP” también puede ser un agonista funcional de un receptor de PACAP de mamífero nativo. Por ejemplo, el agonista funcional puede ser maxadilano, un polipéptido que actúa como agonista específico del receptor de tipo 1 de PACAP (Moro y col., 1997).

Una “eritropoietina (EPO)” significa una EPO nativa o cualquier análogo o variante de EPO que comparta una similitud de secuencia de aminoácidos sustancial con una EPO nativa, así como al menos una actividad biológica con la EPO nativa, tal como la unión al receptor de EPO. Los análogos y variantes de la eritropoietina se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. N° 6.048.971 y 5.614.184.

Además, una “EPO” puede ser un agonista funcional de un receptor de EPO de mamífero nativo. Por ejemplo, el agonista funcional puede ser EMP1 (péptido mimético de EPO 1, Johnson y col., 2000); uno de los péptidos miméticos cortos de EPO tal como se describe en Wrighton y col., 1996 y en la Patente de EE.UU. N° 5.773.569; cualquier mimético de EPO molecular pequeño tal como se describe en Kaushansky, 2001; un anticuerpo que active el receptor de EPO tal como se describe en la Patente de EE.UU. N° 5.885.574, el documento WO 96/40231, el WO 97/48729, en Fernandez-Pol, 1985 o en la Patente de EE.UU. N° 5.723.115; una secuencia de aminoácidos activante, tal como se describe en la Patente de EE.UU. N° 6.333.031 para el receptor de EPO; un ligando de receptor acomplejado a metal con actividades de agonista para el receptor de EPO (Patente de EE.UU. N° 6.413.952), o un ligando para el receptor de EPO tal como se describe en las Patentes de EE.UU. 5.506.107 y 5.837.460.

Un “agente inductor de prolactina” es una sustancia que, cuando se administra a un animal, es capaz de aumentar la cantidad de prolactina en el animal. Por ejemplo, un péptido que libera prolactina estimula la secreción de prolactina.

“Potenciar” la formación de un tipo celular significa aumentar el número del tipo celular. Así, se puede usar un factor para potenciar la formación de neuronas si el número de neuronas en presencia del factor es mayor que el número de neuronas en ausencia del factor. El número de neuronas en ausencia del factor puede ser cero o más.

Una “enfermedad o afección neurodegenerativa” es una enfermedad o afección médica asociada a la pérdida o a la disfunción de neuronas. Los ejemplos de enfermedades o afecciones neurodegenerativas incluyen enfermedades neurodegenerativas, lesiones cerebrales o disfunciones del SNC. Las enfermedades neurodegenerativas incluyen, por ejemplo la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple (EM), la degeneración macular, el glaucoma, la retinopatía diabética, la neuropatía periférica, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Parkinson. Las lesiones cerebrales incluyen, por ejemplo, apoplejía (por ejemplo, apoplejía hemorrágica, apoplejía isquémica focal o apoplejía isquémica global) y lesiones cerebrales traumáticas (por ejemplo, lesiones provocadas por una cirugía cerebral o por un accidente físico). Las disfunciones del SNC incluyen, por ejemplo, la depresión, la epilepsia, la neurosis y la psicosis.

“Tratar o aliviar” significa la reducción o la eliminación completa de los síntomas de una enfermedad o afección médica.

Un mamífero “sospechoso de tener una enfermedad o afección neurodegenerativa” es un mamífero al que no se ha diagnosticado oficialmente una enfermedad o afección neurodegenerativa pero que muestra un síntoma de la enfermedad o afección neurodegenerativa, es susceptible a la enfermedad o afección neurodegenerativa debido a su historial familiar o a una predisposición genética, o ha tenido previamente la enfermedad o afección neurodegenerativa y está sometido a un riesgo de recurrencia.

“Trasplantar” una composición a un mamífero se refiere a introducir la composición en el organismo del mamífero mediante cualquier método establecido en la técnica. La composición que se está introduciendo es el “trasplantado”, y el mamífero es el “receptor”. El trasplantado y el receptor pueden ser sinérgicos, alogeneicos o xenogeneicos. Preferiblemente, el trasplante es un trasplante autólogo.

Una “cantidad efectiva” es una cantidad de un agente terapéutico que es suficiente para alcanzar el propósito pretendido. Por ejemplo, una cantidad efectiva de una prolactina para aumentar el número de células madre neurales es una cantidad suficiente, *in vivo* o *in vitro* según sea el caso, para dar como resultado un incremento del número de células madre neurales. Una cantidad efectiva de una prolactina para tratar o aliviar una enfermedad o afección neurodegenerativa es una cantidad de prolactina que es suficiente para reducir o eliminar los síntomas de la enfermedad o afección neurodegenerativa. La cantidad efectiva de un agente terapéutico dado variará con factores tales como la naturaleza del agente, la ruta de administración, el tamaño y la especie del animal que va a recibir el agente terapéutico, y el propósito de la administración. La cantidad efectiva para cada caso individual puede ser determinada por el especialista según los métodos establecidos en la técnica.

Métodos

En un intento de determinar los efectos de los cambios hormonales/fisiológicos asociados al embarazo sobre el cerebro, descubrimos que el número de células madre neurales (CMNs) aumenta durante el embarazo siguiendo un modelo de dos oleadas. Así, el número de CMN aumentó de forma detectable en el día 7 de gestación, alcanzó un máximo del 40% de aumento en el día 14 de gestación y volvió a la línea base en el momento del nacimiento. Sorprendentemente, después del nacimiento se produjo un segundo aumento, durante la primera semana post-natal. El número de células en proliferación en la zona subventricular en la que se localizan principalmente las células madre neurales también aumentó durante el embarazo siguiendo un modelo de dos oleadas: se dobló en el día 7 de gestación, volvió a la línea base en el día 14 de gestación, seguido de un segundo incremento en el momento del nacimiento (Ejemplo 1).

Este modelo de dos oleadas es similar al modelo de los niveles de prolactina durante el mismo periodo de tiempo. Las concentraciones de prolactina fueron elevadas durante la primera mitad del embarazo, a continuación disminuyeron hasta el final del embarazo, momento en el que volvieron a subir, presumiblemente debido a su papel en la lactancia y los comportamientos maternos (revisado en Freeman y col., 2000). Por lo tanto, investigamos los efectos de la prolactina sobre el número de células madre neurales *in vivo* e *in vitro* (Ejemplos 2 y 4). Descubrimos que la prolactina es capaz de inducir la proliferación en la zona subventricular *in vivo* y de aumentar el número de células madre neurales *in vitro*.

En mamíferos, las células madre neurales adultas de la zona subventricular del cerebro anterior dan lugar a interneuronas olfativas mediante la formación de progenitores neuronales que migran a lo largo de la corriente migratoria rostral hasta el bulbo olfativo. Por tanto, también investigamos si el embarazo o el aumento inducido de prolactina en células madre neurales dan como resultado la formación de interneuronas olfativas. De hecho, el número de nuevas interneuronas olfativas en ratones preñados es significativamente superior al de sus contrapartidas vírgenes. Además, después de cada una de las dos oleadas de aumento de células madre neurales, se produce un incremento de interneuronas olfativas. De forma similar, las infusiones de prolactina también condujeron a un aumento significativo del número de nuevas interneuronas olfativas (Ejemplo 3).

El efecto de la prolactina y del embarazo sobre la neurogénesis (aproximadamente un 100% de aumento) es superior al de la proliferación de células madre (aproximadamente del 40-60%). Por lo tanto, quisimos determinar si la prolactina es capaz de promocionar la diferenciación de células madre neurales a neuronas. Para este fin, se cultivaron neuroesferas en presencia de EGF o de EGF más prolactina, y se contabilizó el número de neuronas (Ejemplo 5). Los resultados indican que las neuroesferas generadas en presencia de EGF y prolactina produjeron dos veces más neuronas que las generadas en presencia de EGF solo. Por consiguiente, además de incrementar la proliferación de células madre neurales y la producción de nuevas neuronas olfativas, la prolactina también potencia la formación de neuronas a partir de células madre neurales.

Los efectos de la prolactina sobre las células madre neurales pueden ejercerse directa o indirectamente. *In vivo*, se ha publicado previamente que los receptores de prolactina residen en el plexo coroide de los ventrículos laterales del cerebro anterior. Puesto que el plexo coroide secreta factores de crecimiento que regulan la proliferación de células madre neurales, tales como factor de crecimiento transformante alfa (TGF), la prolactina puede estimular el plexo coroide para secretar TGF, induciendo con ello que las células madre neurales proliferen. Descubrimos que los

receptores de prolactina también son expresados en la esquina dorsolateral de la SVZ, de donde los progenitores neuronales parten para su migración a lo largo de la corriente migratoria rostral hasta el bulbo olfativo. Por lo tanto, la prolactina también puede actuar sobre las células madre neurales directamente. También se descubrió que las células madre neurales cultivadas presentan receptores de prolactina.

5 Por consiguiente, la presente invención proporciona para el uso en el método de aumentar el número de células madre neurales tanto *in vivo* como *in vitro*. Cuando se usa para aumentar el número de células madre neurales *in vivo*, este método dará como resultado un mayor conjunto de células madre neurales en el cerebro. Este mayor conjunto de células madre neurales puede generar posteriormente más células neurales, particularmente neuronas o células gliales, de lo que lo haría una población de células madre sin prolactina. Las células neurales, a su vez, pueden compensar las células neurales perdidas o degeneradas que están asociadas a enfermedades o afecciones neurodegenerativas, incluyendo lesiones del sistema nervioso.

10 La prolactina también se puede usar para aumentar el número de células madre neurales *in vitro*. Las células madre resultantes se pueden usar para producir más neuronas y/o células gliales *in vitro*, o se pueden usar en procedimientos de trasplante en humanos o animales que padecen enfermedades o afecciones neurodegenerativas. Es preferible que se trasplanten células madre neurales producidas de acuerdo con la presente invención, más que neuronas o células gliales. Una vez que las células madre son trasplantadas, se pueden administrar factores de crecimiento y/o diferenciación *in vivo* para aumentar aún más el número de células madre, o para potenciar de forma selectiva la formación de neuronas o la formación de células gliales. Por ejemplo, hemos descubierto que la eritropoietina induce la producción selectiva de neuronas sobre células gliales. El AMP cíclico y los factores que potencian el mecanismo cAMP, tales como el polipéptido activante de adenilato ciclasa pituitario (PACAP) y la serotonina, también son buenos candidatos para promover de forma selectiva la producción de neuronas. Por otro lado, se ha publicado que la proteína morfogenética de hueso (BMP) inhibe la producción de neuronas y potencia la producción glial mediante células de SVZ adultas (Lim y col., 2000). Los factores que pueden aumentar el número de células madre neurales incluyen, aunque sin limitación, prolactina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante alfa (TGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), estrógeno, hormona del crecimiento, factor de crecimiento tipo insulina 1 y factor neurotrófico ciliar (CNTF).

La presente invención proporciona además el uso en métodos para aumentar la formación de neuronas a partir de células madre neurales *in vitro* o *in vivo*, así como métodos para potenciar la producción de nuevas neuronas olfativas.

30 El aumento de células madre neurales, neuronas o interneuronas olfativas es preferiblemente de al menos aproximadamente un 10%, más preferiblemente de al menos aproximadamente un 20%, incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente un 30%, aún más preferiblemente de al menos aproximadamente un 40%, aún más preferiblemente de al menos aproximadamente un 50% e incluso aún más preferiblemente de al menos aproximadamente un 60%. Lo más preferiblemente, el aumento es de al menos aproximadamente un 80%.

35 La presente invención también proporciona el uso en un método para el tratamiento o el alivio de una enfermedad o afección neurodegenerativa en un animal, particularmente en un mamífero. Esto se puede lograr, por ejemplo, administrando una cantidad efectiva de una prolactina al cerebro del mamífero, o trasplantando al mamífero células madre neurales, células progenitoras derivadas de células madre neurales, neuronas y/o células gliales producidas de acuerdo a la presente invención. Preferiblemente, se trasplantan células madre neurales. Además del trasplante, se puede proporcionar también prolactina y/o factores adicionales al receptor del trasplante, particularmente de forma concurrente o posteriormente al trasplante.

40 Una afección neurodegenerativa particularmente interesante es el envejecimiento. Hemos descubierto que el número de células madre neurales en la zona subventricular se ve reducido significativamente en ratones de edad avanzada. Por consiguiente, será de particular interés aliviar los problemas asociados al envejecimiento mediante el incremento del número de células madre neurales con prolactina.

45 Por ejemplo, la célula madre neural de la zona subventricular es la fuente de las neuronas olfativas, y la disfunción olfativa es habitual en las enfermedades neurodegenerativas del cerebro anterior, tal como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington. La alteración de la migración neuronal hacia el bulbo olfativo conduce a déficits en la discriminación olfativa, y doblar las nuevas interneuronas olfativas potencia una nueva memoria del olor (Rocheffort y col., 2002). Por lo tanto, se puede usar la prolactina para potenciar la discriminación olfativa o la memoria olfativa, así como las funciones fisiológicas que se asocian al olfato y a la discriminación olfativa, tal como el apareamiento, el reconocimiento de retoños y el olfateo. Adicionalmente, cualquier otro método que dé como resultado un aumento del número de células madre neurales, particularmente en SVZ, conducirá a una elevada formación de nuevas neuronas olfativas, potenciando con ello las funciones olfativas.

55 Otra aplicación particularmente importante de la presente invención es en el uso para el tratamiento y/o alivio de lesiones cerebrales, tales como la apoplejía. Tal como se muestra en el Ejemplo 6, la prolactina aumentó la neurogénesis en el cerebro de animales que padecieron una apoplejía inducida químicamente. Además, dichos animales también mostraron una mejoría significativa en un síntoma relacionado con las capacidades motoras, lo que demuestra el efecto de la prolactina en el tratamiento de lesiones cerebrales. Cuando se combina la prolactina

con eritropoietina en este tratamiento, los animales recuperaron completamente el comportamiento, y las cavidades del córtex motor, que fue resultado de la lesión, también se vieron rellenas completa o parcialmente con células y tejidos.

5 Por lo tanto, la prolactina se puede usar para tratar o aliviar enfermedades o afecciones neurodegenerativas, particularmente lesiones cerebrales, y más particularmente apoplejía. Preferiblemente, la prolactina, y/o cualquier otro método para aumentar las células madre neurales, se puede usar en conjunción con un factor adicional que potencie la neurogénesis y/o la formación glial. La prolactina y la eritropoietina es una combinación particularmente preferida en la presente invención. Además, la prolactina y el EGF, así como la prolactina y el PACAP, también son realizaciones preferidas.

10 **Composiciones**

La presente invención proporciona composiciones que comprenden una prolactina y al menos un factor adicional. El factor adicional es capaz de aumentar el número de células madre neurales o de potenciar la diferenciación de células madre neurales hacia neuronas o células gliales. El factor adicional es preferiblemente eritropoietina, EGF y/o PACAP.

15 La prolactina es una hormona polipeptídica inicialmente denominada por su actividad para promover la lactancia. Sin embargo, ahora se sabe que la prolactina tiene más de 300 actividades biológicas diferentes no representadas por su nombre (Freeman y col., 2000). Además, aunque se ha pensado desde hace mucho que la prolactina se sintetiza y se secreta a partir de células especializadas (los lactótrofos) de la glándula pituitaria anterior únicamente, existe una evidencia creciente que sugiere que otros órganos y tejidos del organismo también pueden fabricar prolactina.

20 El cerebro está entre los órganos que se indicado como contenedores, y probablemente sintetizadores, de prolactina. La inmunorreactividad de la prolactina se descubrió por vez primera en terminales de axones hipotalámicos, y posteriormente se descubrió en el telencefalon del córtex cerebral, el hipocampo, la amígdala, el septum, el putamen caudato, la raíz cerebral, el cerebelo, la médula espinal, el plexo coroide y los órganos circumventriculares. Los efectos conocidos de la prolactina sobre el sistema nervioso central (SNC) incluyen acciones o comportamiento maternal, comportamiento sexual, comportamiento de cortejo, comportamiento de alimentación, ciclo de sueño, la velocidad de activación de neuronas hipotalámicas, y el metabolismo de neurotransmisores y neuropéptidos. También se descubrió que la prolactina induce la proliferación de astrocitos, así como la expresión de TGF astrocítico (DeVito y col., 1995). Sin embargo, esta es la primera vez que se descubre que la prolactina tiene un impacto sobre las células madre neurales.

30 En el genoma humano, un único gen codifica prolactina. El gen de la prolactina, encontrado en el cromosoma 6, tiene un tamaño de 10 kb y contiene 5 exones y 4 intrones. La transcripción del gen de prolactina está regulada por dos regiones promotoras independientes. La región proximal de 5 kb dirige la expresión específica de pituitaria, mientras que una región promotora más en dirección 5' es la responsable de la expresión extrapituitaria. El gen codifica para una prohormona de prolactina de 227 aminoácidos, que es procesada en la prolactina humana madura de 199 aminoácidos.

Aunque la forma principal de la prolactina obtenida en la glándula pituitaria tiene un peso molecular de 23 kDa, se han caracterizado variantes de prolactina en muchos mamíferos, incluyendo humanos. Las variantes de prolactina pueden ser el resultado de una eliminación de intrones alternativa (en inglés "splicing") del transcrito primario, de una ruptura proteolítica y de otras modificaciones post-traducción. Una variante de prolactina de 137 aminoácidos ha sido descrita en la pituitaria anterior, que probablemente es un producto de una eliminación de intrones alternativa. Se han caracterizado una variedad de productos proteolíticos de prolactina, particularmente las variantes de prolactina de 14, 16 y 22 kDa, todas las cuales parecen ser fragmentos de prolactina truncados en el extremo C. Otras modificaciones post-traducción publicadas para la prolactina incluyen la dimerización, la polimerización, la fosforilación, la glicosilación, la sulfatación y la desamidación.

45 El término prolactina tal como se usa en la presente invención incluye cualquier análogo o variante de prolactina según se define en la reivindicación 1 que sea capaz de aumentar el número de células madre neurales. Un análogo o variante de prolactina es un polipéptido que contiene al menos un 30% de secuencia de aminoácidos de la prolactina humana nativa, y que posee una actividad biológica de prolactina. Preferiblemente, la actividad biológica de prolactina es la capacidad para unirse a receptores de prolactina. Aunque se han aislado varias isoformas del receptor de prolactina, por ejemplo las formas larga, intermedia y corta en ratas, las isoformas comparten el mismo dominio extracelular que se une a la prolactina. Por lo tanto, se puede usar cualquier isoforma de receptor para determinar la actividad de unión de prolactina. Específicamente incluidas como prolactinas están las variantes de prolactina naturales, las proteínas relacionados con prolactina, los lactógenos placentales, la prolactina humana S179D (Bemichtein y col., 2001), las prolactinas procedentes de diversas especies de mamíferos, que incluyen aunque sin limitación, humanos, otros primates, rata, ratón, oveja, cerdo y ganado, y los mutantes de prolactina descritos en las Patentes de EE.UU. N° 6.429.186 y 5.955.346.

De forma similar, cualquier compuesto o factores adicionales que son útiles en la presente invención incluyen sus análogos y variantes que comparten una similitud sustancial y al menos una actividad biológica con los compuestos

o factores nativos. Por ejemplo, el EGF se puede usar en conjunción con prolactina en la presente invención. Además del EGF nativo, también se puede usar un análogo o variante de EGF, que debería compartir una similitud de secuencia de aminoácidos sustancial con respecto al EGF nativo, así como al menos una actividad biológica con respecto al EGF nativo, tal como la unión a receptor de EGF. Particularmente incluido como EGF está el EGF de cualquier especie, el TGF, o el EGF recombinante modificado. Los ejemplos específicos incluyen, aunque sin limitación, el EGF recombinante modificado que tiene una eliminación de los dos aminoácidos C-terminales y una sustitución de aminoácido neutro en la posición 51 (particularmente EGF51Gln51; Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N° 20020098178A1), la muteína de EGF (EGF-X₁₆) en la que el residuo His de la posición 16 es reemplazado por un aminoácido neutro o ácido (Patente de EE.UU. N° 6.191.106), el mutante de eliminación del aminoácido 52 del EGF que carece del residuo amino terminal del EGF nativo (EGF-D), el mutante de eliminación de EGF en el que el residuo N-terminal así como los dos residuos C-terminales (Arg-Leu) han sido eliminados (EGF-B), el EGF-D en el que el residuo Met de la posición 21 está oxidado (EGF-C), el EGF-B en el que el residuo Met de la posición 21 está oxidado (EGF-A), el factor de crecimiento de tipo EGF de unión a heparina (HB-EGF9, la betacelulina, la anfiregulina, la neuregulina o una proteína de fusión que comprenda cualquiera de las anteriores. Otros análogos o variantes de EGF útiles se describen en la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N°20020098178A1 y en las Patentes de EE.UU. N° 6.191.106 y 5.547.935. Como ejemplo adicional, también se puede usar PACAP en conjunción con prolactina. Los análogos y variantes de PACAP útiles incluyen, aunque sin limitación, las variantes de 38 aminoácidos y de 27 aminoácidos del PACAP (PACAP38 y PACAP27, respectivamente), y los análogos y variantes descritos en, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N° 5.128.242, 5.198.542, 5.208.320, 5.326.860, 5.623.050, 5.801.147 y 6.242.563.

Los análogos y variantes de la eritropoietina se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. N° 6.048.971 y 5.614.184.

En la presente invención también se contemplan los agonistas funcionales de la prolactina o factores adicionales útiles en la presente invención. Estos agonistas funcionales se unen y activan al receptor del factor nativo, aunque no comparten necesariamente una similitud de secuencia sustancial con el factor nativo. Por ejemplo, el maxadilano es un polipéptido que actúa como agonista específico del receptor de PACAP de tipo 1 (Moro y col., 1997).

Los agonistas funcionales de EPO han sido estudiados extensamente. El EMP1 (péptido mimético 1 de EPO) es uno de los miméticos de EPO descritos en Johnson y col., 2000. Los péptidos miméticos de EPO cortos se describen, por ejemplo, en Wrighton y col, 1996 y en la Patente de EE.UU. N° 5.773.569. Los miméticos de EPO moleculares pequeños se describen, por ejemplo, en Kaushansky, 2001. Los anticuerpos que activan el receptor de EPO se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N° 5.885.574; en el documento WO 96/40231 y en el WO 97/48729).

Los anticuerpos que tienen actividades de agonista para el receptor de EGF se describen, por ejemplo, en Fernandez-Pol, 1985, y en la Patente de EE.UU. N° 5.723.115. Adicionalmente, las secuencias de aminoácidos activantes también se describen en la Patente de EE.UU. N° 6.333.031 para el receptor de EPO, el receptor de EGF, el receptor de prolactina y muchos otros receptores de la superficie celular; ligandos de receptor de complejo metálico con actividades de agonista para los receptores de prolactina y de EPO se pueden encontrar en la Patente de EE.UU. N° 6.413.952. Otros métodos para identificar y preparar ligandos para receptores, por ejemplo, receptores de EPO y de prolactina, se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. N° 5.506.107 y 5.837.460.

Debería destacarse que la cantidad efectiva de cada análogo, variante o agonista funcional puede ser diferente de la del factor o compuesto nativo, y la cantidad efectiva en cada caso puede ser determinada por un especialista en la técnica según la descripción de la presente memoria. Preferiblemente en la presente invención se usan los factores nativos, o los análogos y variantes que comparten una similitud de secuencia sustancial con los factores nativos.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas, que comprenden una prolactina, un factor adicional tal como se ha descrito anteriormente, y un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar a través de cualquier ruta conocida en la técnica, tal como parenteralmente, intratecalmente, intravascularmente, intravenosamente, intramuscularmente, transdermalmente, intradermalmente, subcutáneamente, intranasalmente, tópicamente, oralmente, rectalmente, vaginalmente, pulmonarmente o intraperitonealmente. Preferiblemente, la composición se administra al sistema nervioso central mediante inyección o infusión. Más preferiblemente se administra a un ventrículo del cerebro, particularmente el ventrículo lateral. Alternativamente, la composición es administrada preferiblemente mediante rutas sistémicas, tales como administración subcutánea. Por ejemplo, hemos descubierto que la prolactina, la hormona del crecimiento, el IGF-1, el PACAP y la EPO se pueden administrar de forma efectiva mediante administración subcutánea para modular el número de células madre neurales en la zona subventricular.

Cuando la composición no se administra directamente al cerebro, y los factores de la composición no atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica, se puede incluir opcionalmente un permeabilizante de barrera hematoencefálica para facilitar la entrada al cerebro. Los permeabilizantes de barrera hematoencefálica son conocidos en la técnica e incluyen, a modo de ejemplo, bradikinina y los agonistas de bradikinina descritos en las Patentes de EE.UU. N° 5.686.416, 5.506.206 y 5.268.164 (tales como NH₂-arginina-prolina-hidroxipropilprolina-

glicina-tienilalanina-serina-prolina-4-Me-tirosina-(CH₂NH)-arginina-COOH). Alternativamente, los factores se pueden conjugar con los anticuerpos de receptor de transferrina tal como se describe en las Patentes de EE.UU. N° 6.329.508, 6.015.555, 5.833.988 ó 5.527.527. Los factores también se pueden administrar como una proteína de fusión que comprende el factor y un ligando que es reactivo con un receptor de célula endotelial capilar de cerebro, tal como el receptor de transferrina (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.977.307).

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar mezclando los agentes terapéuticos deseados con un vehículo apropiado adecuado para la ruta de administración pretendida. En la fabricación de las composiciones farmacéuticas de esta invención, los agentes terapéuticos normalmente se mezclan con un excipiente, se diluyen con un excipiente o se encierran dentro de dicho vehículo que puede adoptar la forma de una cápsula, sobre, papel u otro contenedor. Cuando el excipiente farmacéuticamente aceptable actúa como diluyente, puede ser un material sólido, semi-sólido o líquido, que actúa como vehículo, portador o medio para el agente terapéutico. Por tanto, las composiciones pueden estar en la forma de comprimidos, píldoras, polvos, grageas, sobres, elixires, suspensiones, emulsiones, disoluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), ungüentos que contengan, por ejemplo, hasta un 10% en peso de los agentes terapéuticos, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, disoluciones inyectables estériles, y polvos empaquetados estériles.

Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen fluido espinal cerebral artificial, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua esterilizada, jarabe y metil celulosa. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente: agentes lubricantes tales como talco, estearato magnésico y aceite mineral; agentes humectantes; agentes de emulsión y de suspensión; agentes conservantes tales como metil y propilhidroxibenzoatos; agentes edulcorantes y agentes aromatizantes. Las composiciones de la invención se pueden formular de tal modo que proporcionen una liberación rápida, sostenida o retardada de los agentes terapéuticos después de la administración al paciente mediante el empleo de procedimientos conocidos en la técnica.

Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, el agente terapéutico se mezcla con un excipiente farmacéutico para formar una composición de pre-formulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención. Cuando se dice que estas composiciones de pre-formulación son homogéneas, se pretende indicar que los agentes terapéuticos están dispersados uniformemente por toda la composición de tal modo que la composición puede ser sub-dividida fácilmente en formas de dosis unitarias igualmente efectivas, tal como comprimidos, píldoras y cápsulas.

Los comprimidos o píldoras de la presente invención pueden recubrirse o componerse para proporcionar una forma de dosis que aporte la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender un componente de dosis interior y un componente de dosis exterior, estando el último en la forma de un envoltorio alrededor del primero. Los dos componentes se pueden separar con una capa entérica que sirva para evitar la desintegración en el estómago y permita que el componente interior pase intacto hasta el duodeno, o que tenga una liberación retardada. Se puede usar una variedad de materiales para dichas capas o recubrimientos entéricos, tales como materiales que incluyen una serie de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con dichos materiales como shellac, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Las formas líquidas en las que las nuevas composiciones de la presente invención pueden incorporarse para la administración oral o por inyección incluyen disoluciones acuosas, jarabes adecuadamente aromatizados, suspensiones acuosas u oleaginosas y emulsiones aromatizadas con aceites comestibles tales como aceite de maíz, aceite de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares.

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen disoluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados tales como los descritos en la presente memoria. Las composiciones se administran por vía oral o nasal respiratoria para conseguir un efecto local o sistémico. Las composiciones en disolventes preferiblemente farmacéuticamente aceptables pueden ser nebulizadas mediante el uso de gases inertes. Las disoluciones nebulizadas pueden ser inhaladas directamente desde el dispositivo nebulizador o el dispositivo nebulizador puede unirse a una mascarilla facial, o a una máquina de respiración de presión positiva intermitente. Las composiciones en disolución, suspensión o polvo pueden administrarse, preferiblemente oral o nasalmente, a partir de dispositivos que suministra la formulación de un modo apropiado.

Otra formulación empleada en los métodos de la presente invención emplea dispositivos de administración transdermal ("parches"). Dichos parches transdermales pueden usarse para proporcionar una infusión continua o discontinua del agente terapéutico de la presente invención en cantidades controladas. La construcción y uso de parches transdermales para la administración de agentes farmacéuticos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.023.252. Dichos parches pueden construirse para una administración de agentes farmacéuticos que sea pulsátil continua o por demanda.

Otras formulaciones adecuadas para su uso en la presente invención pueden encontrarse en *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar esta invención y no deben ser considerados en modo alguno como limitaciones del alcance de la presente invención que se define en las reivindicaciones.

5 Ejemplos

En los siguientes ejemplos, las siguientes abreviaturas tienen los siguientes significados. Las abreviaturas no definidas tienen sus significados aceptados generalmente.

	°C	= grado Celsius
	hr	= hora
10	min	= minuto
	μM	= micromolar
	mM	= milimolar
	M	= molar
	mL	= mililitro
15	μL	= microlitro
	mg	= miligramo
	μg	= microgramo
	FBS	= suero fetal bovino
	PBS	= disolución salina tamponada de fosfato
20	DMEM	= medio de Eagle modificado de Dulbecco
	α-MEM	= medio de Eagle α-modificado
	EGF	= factor de crecimiento epidermal
	CMN	= célula madre neural
	SVZ	= zona subventricular
25	PACAP	= polipéptido activante de adenilato ciclasa pituitaria
	cAMP	= AMP cíclico
	BMP	= proteína morfogenética de hueso
	CSF	= fluido espinal cerebral

Materiales y métodos

30 *Cultivo de células madre neurales*

Los protocolos para el cultivo de células madre neurales se describen en detalle en la Patente de EE.UU. Nº 5.750.376 o en Shingo y col., 2001. En resumen, se prepararon células madre neurales a partir de eminencias gangliónicas laterales y mediales E14. Las células madre neurales adultas se prepararon a partir de la zona subventricular de ratones adultos. El tejido se cultivó en medio basal que contiene 20 ng/mL de EGF, u otros factores de crecimiento según se indique en cada caso, para formar neuroesferas. La composición del medio basal es la siguiente: DMEM/F12 (1:1); glucosa (0,6%); glutamina (2 mM); bicarbonato sódico (3 mM); HEPES (5 mM); insulina (25 μg/mL); transferrina (100 μg/mL); progesterona (20 nM); putrescina (60 μM) y cloruro de selenio (30 nM).

Siete días después, las neuroesferas (neuroesferas primarias) fueron pasadas mediante disociación mecánica y re-sembradas como células individuales (pasaje 1). Para las neuroesferas secundarias, las células individuales fueron cultivadas durante siete días para formar neuroesferas secundarias.

Animales de ensayo para el estudio de apoplejía

Se obtuvieron ratas Long-Evans macho adultas (250-350 g) de Charles River Breeding Farms (Laval, Quebec, Canadá) y se adaptaron a la colonia durante dos semanas antes de cualquier tratamiento. Una semana antes de la cirugía, se suministró a las ratas un ensayo de línea base sobre el ensayo de inhibición de miembros anteriores.

Lesión focal isquémica e infusión

5 Los animales para el estudio de apoplejía recibieron una desvascularización unilateral del córtex sensorimotor. Usando anestesia de isoflurano, se practicaron incisiones cutáneas y se retrajo la piel, la fascia sobreyacente se eliminó del cráneo. Se practicó una apertura en el cráneo en las siguientes coordenadas, teniendo cuidado de no dañar la dura: AP +4,0 a -2,0; L 1,5 a 4 8 (la cresta parasagital; Kolb y col., 1997). Se cortó la dura y retrajo de la apertura del cráneo. Un trozo de algodón empapado en salino esterilizado se frotó suavemente a lo largo de la pía expuesta y se retiraron los vasos. A continuación se taladró un agujero en el hemisferio contralateral para proporcionar una apertura para la cánula unida a la minibomba osmótica a AP -0,5; L 1,5. Se colocó una minibomba osmótica bajo la piel entre los hombros y se conectó un tubo bajo la piel hasta la cánula, que se unió al cráneo mediante cemento de secado rápido. Una vez que se había logrado la hemostasis, se suturó el cuero cabelludo con una sutura estéril 5-0. Se administró a los animales una única inyección de Banamina (un analgésico) y fueron devueltos a su jaula. Los animales de simulacro recibieron sólo anestesia, la apertura ósea y una incisión y sutura en la piel.

Seis días después se evaluaron los animales usando el ensayo de comportamiento y al siguiente día los animales volvieron a ser anestesiados y se sustituyó la minibomba por otra segunda que contenía las disoluciones apropiadas. Los animales de simulacro sólo fueron anestesiados. Los animales fueron evaluados de nuevo a los 7, 14 y 28 días para obtener medidas de comportamiento en las semanas 1, 2, 3, 4 y 6.

Ensayo de inhibición de miembros anteriores

Se ha demostrado que este ensayo constituye una medida sensible de la integridad funcional de regiones del neocórtex anterior. En ratas normales, la natación se consigue mediante propulsión con los miembros delanteros. Los miembros anteriores son inhibidos normalmente como consecuencia de cualquier apoplejía y permanecen inmóviles y juntos bajo el cuello del animal. La inhibición de los miembros anteriores se determinó mediante filmación de los animales mientras nadaban. Los animales fueron introducidos en un extremo de un acuario (30 ancho x 901 x 43 alto en cm) lleno hasta una profundidad de 25 cm con agua a temperatura ambiente (~25°C) y fueron filmados nadando hacia una plataforma visible de 9,5 cm cuadrados. Dicha plataforma se proyecta 2 cm por encima de la superficie del agua y se posiciona en el extremo opuesto del acuario. La puntuación de inhibición se realizó contando el número de brazadas, si se producía alguna, realizadas con cada miembro anterior en tres repeticiones nadando a lo largo de la longitud del acuario. Cada repetición se consideró puntuable sólo si el animal no tocaba los lados del acuario durante el ensayo de natación.

Análisis anatómico cerebral

A la conclusión de la semana 6 los animales fueron administrados con una sobredosis de Eutanol y se sometieron a perfusión intracardialmente con salino al 0,9% y paraformadehído al 4% en ácido pícrico. Los cerebros fueron crioprottegidos y cortados sobre un Vibratomo a 40 micras. Se mantuvieron cinco conjuntos de secciones cada 400 micras. Dos conjuntos fueron teñidos, uno con violeta de cresilo y otro con doblecortina. El resto de conjuntos fueron recuperados. La tinción con violeta de cresilo se llevó a cabo sobre los portaobjetos mientras que el de doblecortina se realizó como un procedimiento inmunohistoquímico sobre secciones de flotación libre. La tinción con violeta de cresilo permite la determinación de la extensión de la lesión mientras que las tinciones de doblecortina permiten la determinación de una proteína asociada a microtúbulo que están presente en células progenitoras neuronales en migración.

EJEMPLO 1. Incremento del número de células madre neurales durante el embarazo

Se determinó el número de células madre neurales en el cerebro anterior de ratones CD1 adultos preñados (de 6-8 semanas de edad) y en ratones vírgenes de igual edad con el objetivo de investigar el efecto del embarazo. Se extrajeron las zonas subventriculares enteras de los cerebros anteriores (ambos hemisferios) de ratones hembra adultos a diferentes tiempos de embarazo, se diseccionaron, se disociaron enzimáticamente y se llevaron a placa en un medio de cultivo definido en presencia de factor de crecimiento epidermal, tal como se describe en la Patente de EE.UU. Nº 5.750.376. Se permitió que estas células se desarrollaran para formar neuroesferas primarias. De siete a diez días después se contabilizó el número de neuroesferas, cada una de las cuales deriva clónicamente de una única célula madre individual.

En experimentos paralelos, también se determinó el número de células en proliferación en las zonas subventriculares de ratones durante el embarazo. Los ratones fueron marcados con bromodesoxiuridina (BrdU), y las secciones de zona subventricular fueron sometidas a inmunoensayos con anticuerpos específicos de BrdU.

55 Los resultados de ambas medidas se muestran en la Figura 1. En el cerebro anterior de ratones embarazados, el número de CMN aumentó temporalmente: primero se detectó en el día 7 de la gestación, alcanzando un máximo en el día 14 de gestación (incremento del 40%) y volvió a la línea base en el momento del nacimiento.

Sorprendentemente, después del nacimiento se produjo un segundo aumento, durante la primera semana post-natal. El número de células inmunorreactivas a BrdU también aumentó durante el embarazo de un modo similar, precediendo a los incrementos del número de CMN: un aumento del 65% en el día 7 de gestación y vuelta a la línea base en el día 14 de gestación. En el nacimiento se observó un segundo incremento de células inmunorreactivas a BrdU (35%). Por lo tanto, tanto el número de CMN como la proliferación en la zona subventricular aumentan en dos oleadas durante el embarazo y/o el periodo post-natal.

EJEMPLO 2. Efecto de la prolactina *in vivo*

El modelo de dos oleadas para el incremento del número de CMN durante el embarazo y/o el periodo post-natal descrito en el Ejemplo 1 es similar a la evolución de los niveles de prolactina en el mismo periodo de tiempo. Las concentraciones de prolactina son elevadas durante la primera mitad del embarazo, a continuación disminuyen hasta el final del embarazo, momento en el que vuelven a elevarse, presumiblemente debido a su papel en los comportamientos de lactancia y maternidad (revisado en Freeman y col., 2000). Aunque la prolactina se identificó inicialmente como una hormona reproductiva, con el tiempo se ha hecho evidente que sus funciones son muy diversas. Los efectos de la prolactina sobre el sistema nervioso central (SNC) incluyen acciones sobre el comportamiento maternal, el comportamiento sexual, el comportamiento de cortejo, el comportamiento de alimentación, el ciclo del sueño, la velocidad de activación de neuronas hipotálamicas y el metabolismo de neurotransmisores y neuropéptidos.

Para determinar si la prolactina es capaz de aumentar el número de CMN, realizamos una infusión de prolactina en ratones ovariectomizados de 6-8 semanas de edad tanto subcutáneamente (SC, 8 µg/día durante seis días) como intracerebroventricularmente (ICV, 0,8 µg/día durante seis días). Se infundió BrdU al mismo tiempo en el cerebro para determinar la actividad proliferativa en el cerebro. 6 días después, se determinó el número de células inmunorreactivas a BrdU con anticuerpos específicos de BrdU. Los resultados muestran que la infusión de prolactina aumentó las células marcadas con BrdU en la SVZ de cerebro anterior a través de ambas rutas (un aumento del 53% para SC y del 61% para ICV; Figura 2A). Por tanto, la prolactina puede estimular la proliferación celular en la zona subventricular, una localización principal de CMN en ratones adultos.

Además comparamos la respuesta a prolactina en animales hembra y macho, y los resultados se muestra en la Figura 2C. La infusión de prolactina (0,8 µg/día durante seis días) o de péptido liberador de prolactina (9 pg/día durante seis días) en los ventrículos laterales incrementó la proliferación en la SVZ del cerebro anterior en ratones macho de 6-8 semanas de edad en un 57% y en un 38%, respectivamente. Estos incrementos fueron comparables, aunque en una menor extensión, a los observados en hembras no ovariectomizadas de la misma edad (74% y 56%, respectivamente). Por tanto, la prolactina puede estimular la proliferación de células madre neurales tanto en animales hembra como en animales macho.

EJEMPLO 3. Los efectos del embarazo y la prolactina sobre las neuronas olfativas

Puesto que las células madre neurales de la SVZ son la fuente de la neurogénesis activa en el bulbo olfativo, investigamos si los efectos del embarazo y la prolactina sobre las células madre neurales también se reflejaba en la neurogénesis olfativa. Se inyectó bromodesoxiuridina (BrdU) a ratones CD1 de 6-8 semanas de edad vírgenes o preñados para marcar células mitóticas como en el Ejemplo 1 en el día 7 de gestación o en el día 7 de post-parto. Cuatro días después de la inyección de BrdU, se contabilizó el número de células marcadas con BrdU en diversas partes del cerebro. Los ratones preñados que fueron inyectados en el día 7 de gestación presentaron significativamente más células marcadas con BrdU en las capas celulares granular y periglomerular dopaminérgica del bulbo olfativo que sus contrapartidas vírgenes. Estos resultados son consistentes con la observación de que el embarazo aumenta las células madre neurales en la zona subventricular, que se sabe que forman células progenitoras neuronales que migran al bulbo olfativo.

Puesto que la capa periglomerular dopaminérgica del bulbo olfativo representa una población neuronal homogénea, a continuación nos centramos en dicha capa y contabilizamos el número de neuronas periglomerulares inmunorreactivas con tirosina hidroxilasa marcadas con BrdU. De dos a cuatro semanas después de las inyecciones de BrdU, los ratones preñados marcados tanto en día 7 de gestación como en el día 7 de post-parto presentaron un 50-100% más de neuronas periglomerulares nuevas que los controles vírgenes. Por tanto, cada una de las dos oleadas de proliferación de células madre neurales en la SVZ, en las etapas de gestación y de post-parto, respectivamente, da como resultado una duplicación de la formación de nuevas interneuronas de bulbo olfativo.

También determinamos si la neurogénesis en el bulbo olfativo observada en ratones preñados también era estimulada por la prolactina. Se sometió a infusión a ratones adultos con prolactina como se ha descrito en el Ejemplo 2, y se determinó el número de nuevas interneuronas olfativas. Los resultados muestran que el número de nuevas interneuronas olfativas se duplicaba cuatro semanas después de la infusión de prolactina (Figura 2B), lo que indica que las infusiones de prolactina tienen el mismo efecto sobre la neurogénesis que el embarazo, y que la prolactina es el factor materno para controlar dicho proceso fisiológico.

EJEMPLO 4. Efecto de la prolactina *in vitro*

Para determinar el efecto de la prolactina sobre células madre neurales cultivadas, se prepararon cultivos de células madre primarias como se describe en el apartado de Materiales y métodos. Las células fueron incubadas durante 7 días en presencia de EGF solo, o de EGF más prolactina, además de medio basal. Se contabilizó el número de neuroesferas resultantes (neuroesferas primarias) y las neuroesferas fueron disociadas para permitir la formación de neuroesferas secundarias. Aunque la prolactina sola no aumentó significativamente el número de neuroesferas *in vitro* (datos no mostrados), los resultados indican que la prolactina es capaz de potenciar el efecto del EGF para incrementar las neuroesferas (Figura 3). Además, la capacidad de las neuroesferas primarias para generar neuroesferas secundarias también se vio incrementada en un 25% en presencia de prolactina (Figura 3). Esta es la primera vez que se demuestra que la prolactina actúa sobre las células madre neurales.

EJEMPLO 5. La prolactina potencia la diferenciación neuronal

Las neuroesferas fueron cultivadas, tal como se ha descrito en el Ejemplo 4, en presencia de EGF solo o de EGF más prolactina 30 nM. Siete días después, se permitió que las neuroesferas se diferenciaron en medio basal solo, se determinó el número de neuronas mediante inmunotinción para tubulina, se contabilizó y se expresó como porcentaje de células totales. Tal como se muestra en la Figura 4, el porcentaje de neuronas fue el doble cuando se incluyó la prolactina para cultivar las neuroesferas. Por tanto, la prolactina es capaz de potenciar la formación de neuronas a partir de células madre neurales.

EJEMPLO 6. El efecto de la prolactina en un modelo de apoplejía

Con el objetivo de determinar el efecto de la administración de prolactina en animales que padecen una lesión cerebral, se introdujeron lesiones isquémicas focales en los cerebros de ratas como modelo de apoplejía. Como resultado de la lesión cerebral, los animales presentaron lesiones en el córtex motor y se comportaron de forma anómala en el ensayo de inhibición de miembros anteriores, que es una medida sensible de la integridad funcional de regiones del neocórtex anterior. A continuación los animales recibieron diversos factores de ensayo y se determinaron los efectos de estos factores en el ensayo de inhibición de miembros anteriores y la anatomía cerebral. Como controles, un grupo simulado de control recibió una simulación de lesión cerebral y no recibió factores de ensayo, y un grupo de control de vehículo recibió la lesión cerebral e infusiones de fluido espinal cerebral (CSF) artificial. Los tratamientos que recibió cada grupo se resumen a continuación:

Grupo	Lesión cerebral	Primera infusión (días 1-7)	Segunda infusión (días 8-14)
1	Simulada	Ninguna	Ninguna
2	Sí	CSF	CSF
3	Sí	Prolactina	CSF
4	Sí	Prolactina	Eritropoietina (EPO)

El esquema y el procedimiento para la lesión cerebral, la infusión y el ensayo de comportamiento y el análisis anatómico se describen en Materiales y métodos.

Antes de la lesión cerebral, todas las ratas inhibieron las zarpas delanteras en el ensayo de inhibición de miembros anteriores, lo que es de esperar en ratas normales. Tras la lesión, todos los grupos isquémicos (Grupos 2-4) fallaron en la inhibición de la zarpa delantera contralateral, pero continuaron inhibiendo la zarpa delantera ipsilateral. Tras la infusión de los factores de ensayo, los dos grupos de prolactina (Grupos 3 y 4) mostraron una mayor inhibición de zarpa delantera. De hecho, al final de la última semana (4 semanas después de finalizar las infusiones), el grupo de prolactina más EPO (Grupo 4) era indistinguible de los controles. Por lo tanto, la prolactina, y particularmente la combinación de prolactina con EPO, dio como resultado la recuperación de un síntoma representativo de la apoplejía.

Anatómicamente, el grupo de prolactina mostró un elevado grado de tinción con doblecortina en el cerebro, lo que indica que la prolactina indujo una neurogénesis extensa. Las ratas del grupo de prolactina más EPO presentaron una zona subventricular expandida, lo que indica un aumento celular significativo en esta área. Adicionalmente, aparecieron muchas células positivas con doblecortina en el área lesionada, en la materia blanca y en el ventrículo lateral. Se podía observar una corriente de células positivas con doblecortina entre la zona subventricular y el área lesionada. Puesto que la doblecortina es un marcador de células progenitoras neuronales en migración, estos resultados indican que las células madre neurales dieron lugar a la formación de células progenitoras neuronales con el tratamiento, y las células progenitoras migraron hacia el área lesionada. El nuevo crecimiento en el área lesionada fue tan extenso que las cavidades creadas por la lesión isquémica fueron rellenadas completa o

parcialmente en la mayoría de las ratas de este grupo. Por tanto, estos resultados anatómicos apoyan firmemente el estudio de comportamiento sobre que la prolactina, o la combinación de prolactina y EPO, pueden usarse para tratar lesiones cerebrales tales como la apoplejía.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.-** El uso de prolactina en el que la prolactina es un polipéptido que es idéntico en al menos un 30% a la prolactina nativa de un mamífero a nivel de aminoácido y que posee una actividad biológica de la prolactina nativa del mamífero, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o el alivio de una enfermedad o afección neurodegenerativa en un mamífero a través del aumento del número de células madre neurales o de potenciar la formación de neuronas a partir de células madre neurales.
- 10 **2.-** Un método *in vitro* para aumentar un número de células madre neurales que comprende proporcionar una cantidad efectiva de una prolactina en combinación con factor de crecimiento epidermal (EGF) a al menos una célula madre neural en condiciones que den lugar a un incremento del número de células madre neurales o a una mayor formación de neuronas a partir de dichas células madre neurales, en donde la prolactina es un polipéptido que es idéntico en al menos un 30% respecto a la prolactina nativa del mamífero a nivel de aminoácidos y posee una actividad biológica de la prolactina nativa del mamífero.
- 15 **3.-** El uso de la reivindicación 1, en el que dicha célula madre neural se localiza en el cerebro de un mamífero.
- 4.-** El uso de la reivindicación 1, en el que el mamífero es un mamífero adulto.
- 5.-** El uso de la reivindicación 1 para aumentar el número de células madre en la zona subventricular.
- 6.-** El uso de la reivindicación 1, en el que la enfermedad o afección neurodegenerativa es una enfermedad neurodegenerativa, una lesión cerebral o una disfunción del SNC.
- 20 **7.-** El uso de la reivindicación 6, en el que la enfermedad o afección neurodegenerativa se selecciona entre enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple (EM), degeneración macular, glaucoma, retinopatía diabética, neuropatía periférica, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, apoplejía, apoplejía hemorrágica, apoplejía isquémica focal o apoplejía isquémica global, y lesión cerebral traumática.
- 8.-** El uso de la reivindicación 6, en el que la lesión cerebral es una apoplejía o una lesión cerebral traumática.
- 9.-** El uso de la reivindicación 6, en el que la enfermedad neurodegenerativa es esclerosis múltiple.
- 25 **10.-**El uso de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 para un mamífero que ha recibido un trasplante de células madre neurales y/o de progenie de células madre neurales antes de, o concurrentemente con, la prolactina.
- 30 **11.-**El uso de la reivindicación 1 para uso en conjunción con al menos un factor adicional seleccionado del grupo que consiste en eritropoietina, AMP cíclico, polipéptido activante de adenilato ciclasa pituitaria (PACAP), serotonina, proteína morfogenética de hueso (BMP), factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento transformante alfa (TGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), estrógeno, hormona del crecimiento, factor de crecimiento de tipo insulina 1 y factor neurotrófico ciliar (CNTF).
- 12.-**El uso de la reivindicación 11, en el que el factor adicional es eritropoietina o PACAP.
- 35 **13.-**El uso de la reivindicación 1, en el que la prolactina se proporciona en una forma para ser administrada intravascularmente, intratecalmente, intravenosamente, intramuscularmente, subcutáneamente, intraperitonealmente, tópicamente, oralmente, rectalmente, vaginalmente, nasalmente, mediante inhalación o al cerebro.
- 14.-**El uso de la reivindicación 1, en el que la prolactina se proporciona en una forma que va a ser administrada subcutáneamente.
- 40 **15.-**La prolactina, en el que la prolactina es un polipéptido que es idéntico en al menos un 30% a la prolactina nativa del mamífero a nivel de aminoácidos y posee una actividad biológica de la prolactina nativa del mamífero, para su uso en el tratamiento o alivio de una enfermedad o afección neurodegenerativa en un mamífero a través del incremento del número de células madre neurales o de potenciar la formación de neuronas a partir de las células madre neurales.
- 45 **16.-**El uso de prolactina, en el que la prolactina es un polipéptido que es idéntico en al menos un 30% a la prolactina nativa del mamífero a nivel de aminoácidos y posee una actividad biológica de la prolactina nativa del mamífero, para la preparación de una composición farmacéutica para tratar o aliviar una enfermedad o afección neurodegenerativa en un mamífero a través del incremento de la formación de nuevas neuronas en el bulbo olfativo de un mamífero.

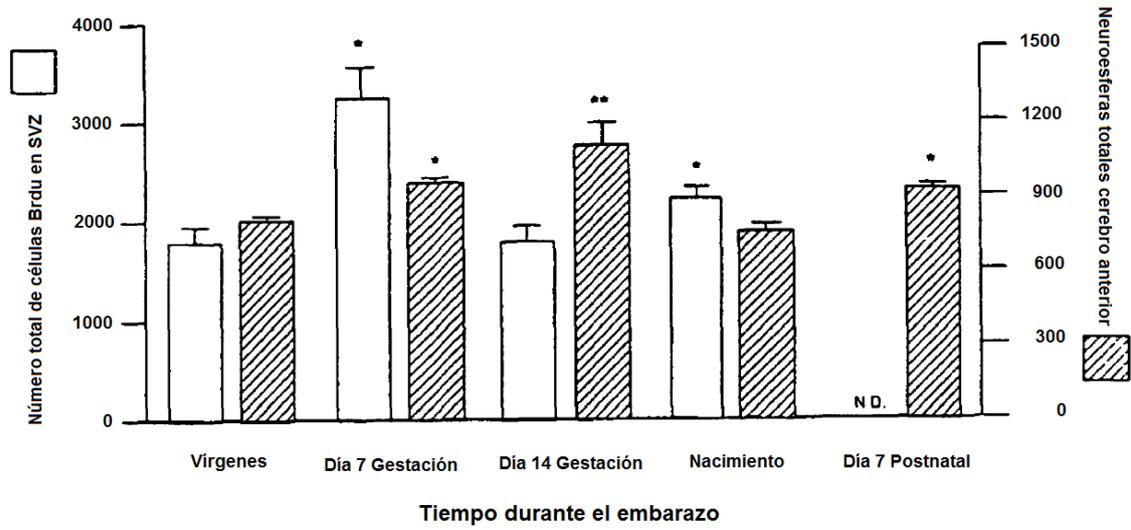


FIGURA 1

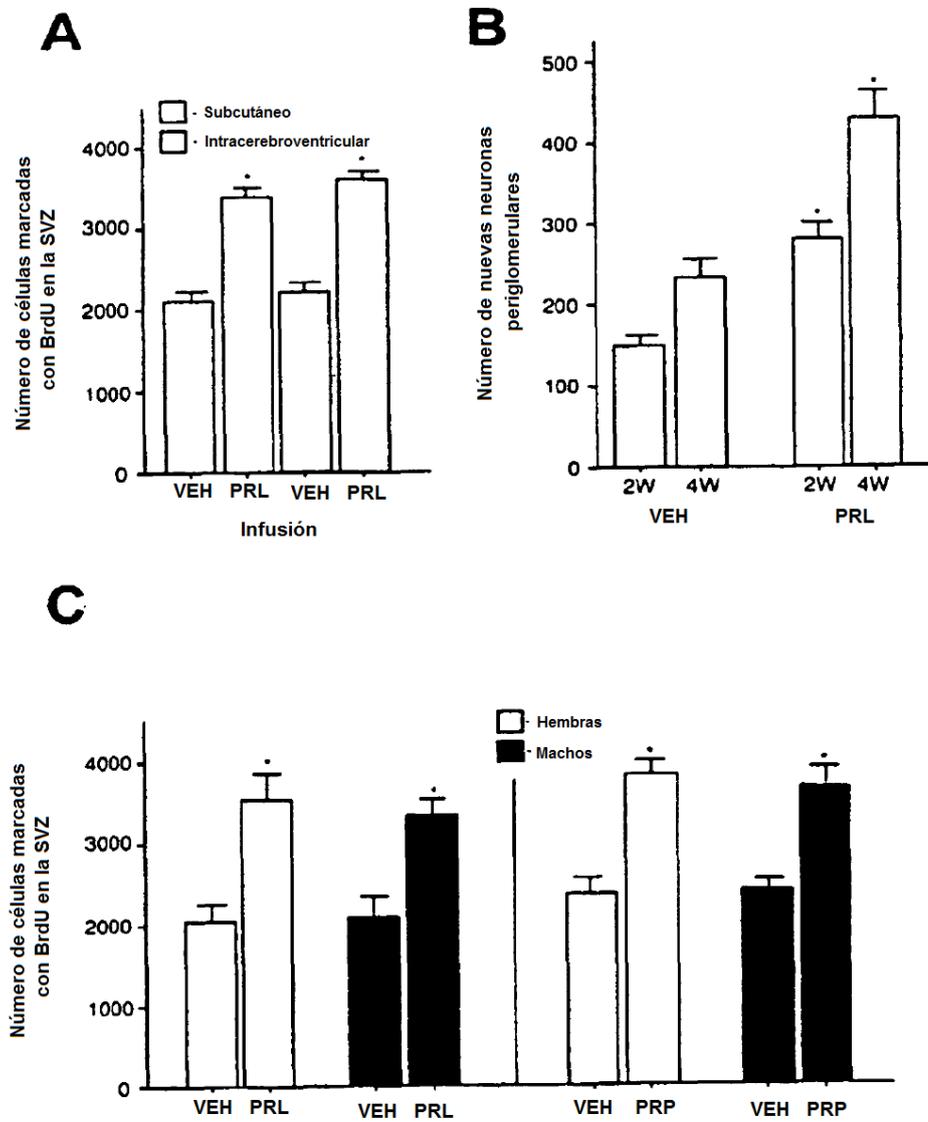


FIGURA 2

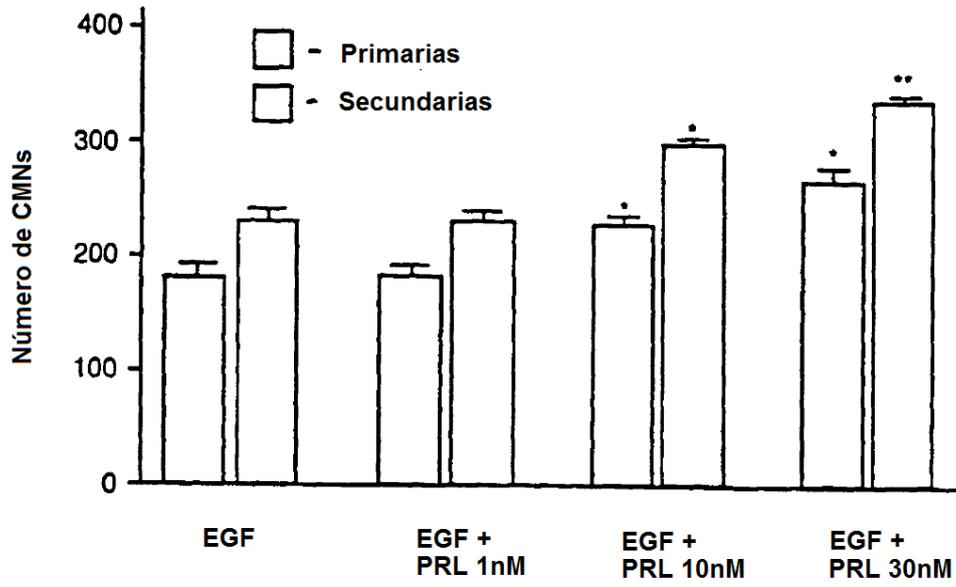


FIGURA 3

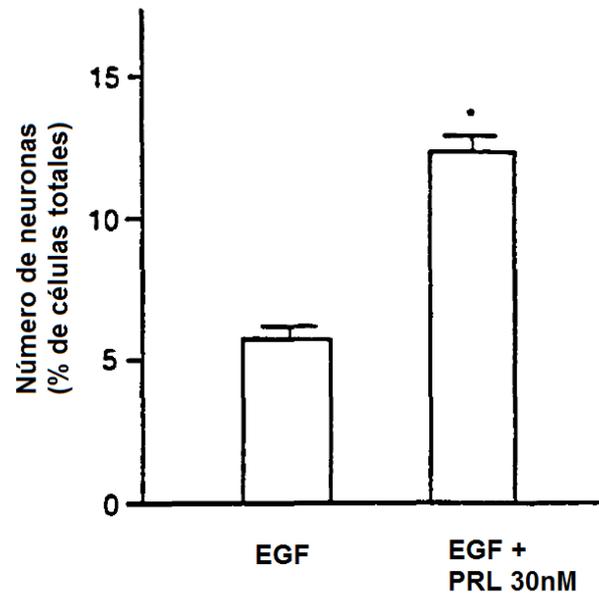


FIGURA 4

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

5

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 20020098178 A1 [0002] [0031] [0063]
- US 5023252 A [0002] [0078]
- US 5128242 A [0002] [0033] [0063]
- US 5198542 A [0002] [0033] [0063]
- US 5208320 A [0002] [0033] [0063]
- US 5268164 A [0002] [0017] [0071]
- US 5326860 A [0002] [0033] [0063]
- US 5506107 A [0002] [0035] [0067]
- US 5506206 A [0002] [0017] [0071]
- US 5527527 A [0002] [0017] [0071]
- US 5547935 A [0002] [0031] [0063]
- US 5614184 A [0002] [0034] [0064]
- US 5623050 A [0002] [0033] [0063]
- US 5686416 A [0002] [0017] [0071]
- US 5723115 A [0002] [0032] [0035] [0067]
- US 5750376 A [0002] [0006] [0025] [0082] [0089]
- US 5773569 A [0002] [0035] [0066]
- US 5801147 A [0002] [0033] [0063]
- US 5833988 A [0002] [0017] [0071]
- US 5837460 A [0002] [0035] [0067]
- US 5851832 A [0002] [0006]
- US 5885574 A [0002] [0035] [0066]
- US 5955346 A [0002] [0062]
- US 5977307 A [0002] [0017] [0071]
- US 5980885 A [0002] [0006]
- US 6015555 A [0002] [0017] [0071]
- US 6048971 A [0002] [0034] [0064]
- US 6191106 B [0002] [0031] [0063]
- US 6242563 B [0002] [0033] [0063]
- US 6329508 B [0002] [0017] [0071]
- US 6333031 B [0002] [0032] [0035] [0067]
- US 6413952 B [0002] [0035] [0067]
- US 6429186 B [0002] [0062]
- WO 9640231 A [0002] [0035] [0066]
- WO 9748729 A [0002] [0035] [0066]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **BEMICHTEIN, S. et al.** S179D-human PRL, a pseudophosphorylated human PRL analog, is an agonist and not an antagonist. *Endocrinology*, 2001, vol. 142 (9), 3950-3963 [0002]
- **DEVITO, W.J. et al.** Prolactin induced expression of interleukin-1 alpha, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-alpha in cultured astrocytes. *J. Cell Biochem.*, vol. 57, 290-298 [0002]
- **FERNANDEZ-POL, J.A.** Epidermal growth factor receptor of A431 cells. Characterization of a monoclonal anti-receptor antibody noncompetitive agonist of epidermal growth factor action. *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260 (8), 5003-5011 [0002]
- **FREEMAN, M.E. et al.** Prolactin: structure, function and regulation of secretion. *Physiol. Rev.*, 2000, vol. 80, 1523-1631 [0002]
- **JOHNSON, D.L. et al.** Erythropoietin mimetic peptides and the future. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2000, vol. 15 (9), 1274-1277 [0002]
- **KAUSHANSKY, K.** Hematopoietic growth factor mimetics. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2001, vol. 938, 131-138 [0002]
- **KOLB, B. et al.** Nerve growth factor treatment prevents dendritic atrophy and promotes recovery of function after cortical injury. *Neuroscience*, 1997, vol. 76 (4), 1139-1151 [0002]
- **LIM, D.A. et al.** Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*, 2000, vol. 28, 713-726 [0002]
- **LIVNAH, O. et al.** Functional mimicry of a protein hormone by a peptide agonist: the EPO receptor complex at 2.8 Å. *Science*, 1996, vol. 273 (5274), 464-471 [0002]
- **MODE, A. et al.** The human growth hormone (hGH) antagonist G120RhGH does not antagonize GH in the rat, but has paradoxical agonist activity, probably via the prolactin receptor. *Endocrinology*, 1996, vol. 137 (2), 447-454 [0002]
- **MORO, O. et al.** Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272 (2), 966-70 [0002]
- **ROCHFORD, C. et al.** Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J. Neurosci.*, 2002, vol. 22 (7), 2679-2689 [0002]
- **SHINGO, T. et al.** Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J. Neurosci.*, 2001, vol. 21 (24), 9733-9743 [0002]
- **WRIGHTON, N.C. et al.** Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. *Science*, 1996, vol. 273 (5274), 458-464 [0002]