

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 282**

51 Int. Cl.:

A61K 38/24 (2006.01)

A61K 35/30 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05706487 .5**

96 Fecha de presentación: **14.02.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1740202**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.01.2007**

54 Título: **Uso de la hormona luteinizante (LH) y de la gonadotropina coriónica (hCG) para la proliferación de células precursoras neurales y la neurogénesis**

30 Prioridad:

13.02.2004 US 544915 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

07.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

07.12.2012

73 Titular/es:

**STEM CELL THERAPEUTICS CORP. (100.0%)
Bow Valley Square III 255 5th Avenue SW Suite
500
Calgary, AB T2P 3G6, CA**

72 Inventor/es:

**WEISS, SAMUEL;
ENWERE, EMEKA;
ANDERSEN, LINDA y
GREGG, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 392 282 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

Uso de la hormona luteinizante (LH) y de la gonadotropina coriónica (hCG) para la proliferación de células precursoras neurales y la neurogénesis.

Solicitud relacionada

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EEUU nº de serie 60/544.915, presentada el 13 de febrero, 2004, bajo 35 U.S.C. §119(e).

Campo técnico

Esta invención se refiere a métodos para aumentar el número de células precursoras neurales y la neurogénesis, así como a composición útiles para ello.

10 **Referencias bibliográficas**

Publicación de solicitud de patente de EEUU nº 20020098178A1.

Patente de EEUU nº 5.023.252.

Patente de EEUU nº 5.128.242.

Patente de EEUU nº 5.198.542.

- 15 Patente de EEUU nº 5.208.320.

Patente de EEUU nº 5.268.164.

Patente de EEUU nº 5.326.860.

Patente de EEUU nº 5.506.107.

Patente de EEUU nº 5.506.206.

- 20 Patente de EEUU nº 5.527.527.

Patente de EEUU nº 5.547.935.

Patente de EEUU nº 5.614.184.

Patente de EEUU nº 5.623.050.

Patente de EEUU nº 5.686.416.

- 25 Patente de EEUU nº 5.723.115.

Patente de EEUU nº 5.750.376.

Patente de EEUU nº 5.773.569.

Patente de EEUU nº 5.801.147.

Patente de EEUU nº 5.833.988.

- 30 Patente de EEUU nº 5.837.460.

Patente de EEUU nº 5.851.832.

Patente de EEUU nº 5.885.574.

Patente de EEUU nº 5.977.307.

Patente de EEUU nº 5.980.885.

- 35 Patente de EEUU nº 6.015.555.

Patente de EEUU nº 6.048.971.

Patente de EEUU nº 6.191.106.

Patente de EEUU nº 6.242.563.

- Patente de EEUU nº 6.329.508.
- Patente de EEUU nº 6.333.031.
- Patente de EEUU nº 6.413.952.
- Documento WO 96/40231.
- 5 Documento WO 97/48729.
- Brown, J. *et al.* (2003), Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis, *Eur. J. Neurosci.*, 17(10):2042-2046.
- Dulac, C. y Torello, A.T. (2003), Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour, *Nature Reviews*, 4:551-562.
- 10 Fernández-Pol, J.A. (1985), 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.
- Fowler, C.D. *et al.* (2002), The effects of social environment on adult neurogenesis in the female prairie vole, *J. Neurobiology*, 51(2):115-128.
- Frisen, J. *et al.* (1998), Central nervous system stem cells in the embryo and adult, *Cell Mol. Life Sci.*, 54(9):935-945.
- 15 Gage, F.H. (2000), Mammalian neural stem cells, *Science*, 287:1433-1438.
- Huhtaniemi, I. *et al.* (2002), Transgenic and knockout mouse models for the study of luteinizing hormone and luteinizing hormone receptor function, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187:49-56.
- Johnson, D.L. *et al.* (2000), Erythropoietin mimetic peptides and the future, *Nephrol. Dial. Transplant.*, 15(9):1274-1277.
- 20 Kaushansky, K. (2001), Hematopoietic growth factor mimetics, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 938:131-138.
- Kempermann, G. y Gage, F.H. (1999), Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal, *Hippocampus*, 9(3):321-332.
- Kiyokawa, Y. *et al.* (2004), Modulatory role of testosterone in alarm pheromone release by male rats, *Hormones and Behavior*, 45:122-127.
- 25 Luskin, M.B. (1993), Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone, *Neuron*, 11(1):173-189.
- Ma, W. *et al.* (1998), Role of the Adrenal Gland and Adrenal-Mediated Chemosignals in Suppression of Estrus in the House Mouse: The Lee-Boot Effect Revisited, *Biology of Reproduction*, 59:1317-1320.
- 30 Menezes, J.R.L. *et al.* (1995), The division of neuronal progenitor cells during migration in the neonatal mammalian forebrain, *Molecular and Cellular Neuroscience*, 6:496-508.
- Mode, A. *et al.* (1996), The human growth hormone (hGH) antagonist G120RhGH does not antagonize GH in the rat, but has a paradoxical agonist activity, probably via the prolactin receptor, *Endocrinology*, 137(2):447-454.
- Moro, O. *et al.* (1997), Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist, *J. Biol. Chem.*, 272(2):966-970.
- 35 Morrison, S.J. *et al.* (1997), Regulatory mechanism in stem cell biology, *Cell*, 88:287-298.
- Morshead, C.M. y van der Kooy, D. (1992), Postmitotic death is the fate of constitutively proliferating cells in the subependymal layer of the adult mouse brain, *Neurosci.*, 2(1):249-256.
- Nilsson, M. *et al.* (1999), Enriched environment increased neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory, *Journal of Neurobiology*, 39(4):569-578.
- 40 Peretto, P. *et al.* (1999), The subependymal layer in rodents: A site of structural plasticity and cell migration in the adult mammalian brain, *Brain Research Bulletin*, 49(4):221-243.
- Rao, M.S. (1999), Multipotent and restricted precursors in the central nervous system, *The Anatomical Record (New Anat.)*, 257:137-148.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Filadelfia, PA, 17ª edición (1985).

Reynolds, B.A. y Weiss, S. (1992), Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous systems, *Science*, 255(5052):1707-1710.

Reynolds, J.N. *et al.* (1992), Ethanol modulation of GABA receptor-activated Cl-currents in neurons of the chick, rat and mouse central nervous system, *Eur. J. Pharmacol.*, 224(2-3):173-181.

- 5 Rochefort, C. *et al.* (2002), Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory, *The Journal of Neuroscience*, 22(7):2679-2689.

Rodríguez-Pena, A. (1999), Oligodendrocyte development and thyroid hormone, *J. Neurobiol.*, 40(4):497-512.

Shingo, T. *et al.* (2003), Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin, *Science*, 299:117-120.

- 10 Tanapat, P. *et al.* (1999), Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat, *J. Neurosci.*, 19(14):5792-5801.

Weiss, S. *et al.* (1996), Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain?, *Trends Neuroscience*, 19:387-393.

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

- 15 Zhang, F.P. *et al.* (2001), Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice, *Mol. Endocrinol.*, 15(1):172-183.

Zhang, J. *et al.* (2001), Scent, social status, and reproductive condition in rat-like hamsters (*Cricetulus triton*), *Physiology & Behavior*, 74:415-420.

Antecedentes de la invención

- 20 En años recientes, las enfermedades neurodegenerativas se han convertido en un problema importante debido a la creciente población anciana que es la que presenta mayor riesgo de padecer estos trastornos.

Las enfermedades neurodegenerativas incluyen las enfermedades que se han relacionado con la degeneración de células neurales en emplazamientos concretos del sistema nervioso central (SNC), que conduce a la incapacidad de estas células para realizar su función prevista. Estas enfermedades incluyen enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, y enfermedad de Parkinson. Además, probablemente el ámbito mayor de disfunción del SNC (con respecto al número de personas afectadas) no se caracteriza por la pérdida de células neuronales, sino por un funcionamiento anómalo de las células neurales existentes. Esto puede ser debido a una activación inapropiada de las neuronas, o la síntesis, la liberación y el procesamiento anómalos de neurotransmisores. Estas disfunciones pueden ser el resultado de trastornos bien estudiados y caracterizados, tales como la depresión y la epilepsia, o de trastornos menos comprendidos, tales como la neurosis y la psicosis. Además, a menudo las lesiones cerebrales producen la pérdida de células neurales, el funcionamiento inapropiado de la región cerebral afectada, y posteriores anomalías de comportamiento.

- 35 Por consiguiente, resulta deseable suministrar células neurales al cerebro para compensar las neuronas degeneradas o perdidas para tratar enfermedades o trastornos neurodegenerativos. Una estrategia para esto es transplantar células neurales al cerebro del paciente. Esta estrategia requiere una fuente de grandes cantidades de células neurales, preferiblemente del mismo individuo o de un individuo con parentesco cercano, de modo que puedan minimizarse los rechazos del receptor al injerto o del injerto al receptor. Puesto que no resulta práctico eliminar una gran cantidad de neuronas o células gliales de una persona para ser transplantadas a otra, es necesario un método para cultivar una gran cantidad de células neurales para que esta estrategia tenga éxito.

- 40 Otra estrategia es inducir la producción de células neurales *in situ* para compensar las células perdidas o degeneradas. Esta estrategia requiere un conocimiento exhaustivo sobre si es posible producir células neurales en cerebros, en particular cerebros adultos, y de qué manera.

El desarrollo de técnicas para el aislamiento y el cultivo *in vitro* de células precursoras neurales multipotentes (por ejemplo, véanse las patentes de EEUU nº 5.750.376; 5.980.885; 5.851.832) aumentan significativamente las perspectivas para ambas estrategias. Se descubrió que pueden utilizarse cerebros fetales para aislar y cultivar células progenitoras neurales multipotentes *in vitro*. Además, en contraste con la creencia mantenida durante largo tiempo de que las células cerebrales de adulto no son capaces de replicar o regenerar células cerebrales, se ha descubierto que las células precursoras neurales también pueden aislarse a partir de cerebros de mamíferos adultos. Estas células precursoras, tanto de cerebro fetal como de cerebro adulto, son capaces de autorreplicarse.

- 50 Las células de la progenie de nuevo pueden proliferar o diferenciarse en cualquier célula del linaje de células neurales, incluyendo neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Por tanto, estos descubrimientos no sólo proporcionan una fuente de células neurales que puede utilizarse en trasplantes, sino que también demuestran la presencia de células precursoras neurales multipotentes en el cerebro adulto y la posibilidad de producir neuronas o células

gliales a partir de estas células precursoras *in situ*.

Por tanto, resulta deseable desarrollar métodos para producir de modo eficaz células precursoras neurales para dos objetivos: para obtener más células precursoras y, por tanto, células neurales que puedan utilizarse en terapias de trasplantes, y para identificar métodos que puedan utilizarse para producir más células precursoras *in situ*.

5

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un método, según se define en las reivindicaciones, para aumentar el número de células precursoras neurales utilizando una feromona, una hormona luteinizante (LH) o la gonadotropina coriónica humana (hCG). El método puede practicarse *in vivo* para obtener más células precursoras neurales *in situ* que, a su vez, pueden producir más neuronas o células gliales para compensar las células neurales perdidas o disfuncionales.

10 El método también puede practicarse *in vitro* para producir un gran número de células precursoras neurales en cultivo. Las células precursoras cultivadas pueden utilizarse, por ejemplo, para un tratamiento de trasplante de pacientes o animales que padecen o que se sospecha que padezcan enfermedades o trastornos neurodegenerativos.

15 Por consiguiente, un aspecto de la presente invención proporciona un método para aumentar el número de células precursoras neurales, que comprende proporcionar una cantidad eficaz de una feromona, una LH o hCG al menos a una célula precursora neural bajo condiciones que produzcan un aumento en el número de células precursoras neurales. La célula precursora neural puede localizarse en el cerebro de un mamífero, en particular en la zona subventricular del cerebro del mamífero. Como alternativa, la célula precursora neural puede localizarse en el hipocampo del mamífero. Aunque pueden someterse a este método mamíferos de todas las edades, se prefiere que
20 el mamífero no sea un embrión. Más preferiblemente, el mamífero es adulto.

El mamífero puede padecer o puede sospecharse que padezca una enfermedad o un trastorno neurodegenerativo. La enfermedad o el trastorno puede ser una lesión en la médula espinal o una lesión cerebral, tal como ictus o una lesión provocada por cirugía. La enfermedad o el trastorno puede ser el envejecimiento, que se asocia con una reducción significativa en el número de células precursoras neurales. La enfermedad o el trastorno también puede
25 ser una enfermedad neurodegenerativa, en particular la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica, o la enfermedad de Parkinson.

Como alternativa, la célula precursora neural puede estar en un cultivo *in vitro*. Cuando se practica *in vitro*, resulta preferible utilizar LH o hCG en lugar de feromonas.

30 La feromona puede ser cualquier feromona que sea capaz de aumentar el número de células precursoras neurales en el mamífero. En la técnica se han establecido ensayos para determinar si una sustancia es capaz de aumentar el número de células precursoras neurales y se describen en la presente (por ejemplo, véanse los ejemplos 1 y 3). La feromona se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en 2-sec-butil-4,5-dihidrotiazol (SBT), 2,3-deshidro-exo-brevicomina (DHB), alfa- y beta-farnesenos, 6-hidroxi-6-metil-3-heptatona, 2-heptanona, trans-5-hepten-2-ona, trans-4-hepten-2-ona, acetato de n-pentilo, acetato de cis-2-penten-1-ilo, 2,5-dimetilpirazina, propionato de dodecilo,
35 y acetato de (Z)-7-dodecen-1-ilo.

Tanto si la feromona, la LH o la hCG se utiliza *in vivo* o *in vitro*, otros agentes pueden aplicarse en combinación, tales como la hormona estimulante del folículo (FSH), la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), la prolactina, el péptido liberador de prolactina (PRP), la eritropoyetina, el AMP cíclico, el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP), la serotonina, la proteína morfogénica ósea (BMP), el factor del crecimiento epidérmico (EGF), el factor del crecimiento transformante-alfa (TGFalfa), el factor del crecimiento transformante-beta (TGFbeta), el factor del crecimiento de fibroblastos (FGF), el estrógeno, la hormona del crecimiento, la hormona liberadora de la hormona del crecimiento, los factores del crecimiento de tipo insulínico, el factor inhibidor de leucemia, el factor neurotrófico ciliar (CNTF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la hormona tiroidea, la hormona estimulante de la hormona tiroidea, el erizo sónico (SHH) y/o el factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). La LH o hCG puede ser cualquier análogo o variante de LH o hCG que tenga la actividad de la LH o hCG nativa.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para tratar o mejorar una enfermedad o un trastorno neurodegenerativo en un mamífero, que comprende proporcionar una cantidad eficaz de una feromona, LH o hCG al cerebro del mamífero. La enfermedad o el trastorno puede ser una lesión del SNC, tal como ictus o una lesión provocada por cirugía en el cerebro/médula espinal. La enfermedad o el trastorno puede ser el envejecimiento, que está asociado con una reducción significativa en el número de células precursoras neurales. La enfermedad o el trastorno también puede ser una enfermedad neurodegenerativa, en particular la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica, o la enfermedad de Parkinson.

55 El mamífero puede recibir opcionalmente un trasplante de células precursoras neurales y/o de la progenie de células precursoras neurales. El trasplante puede realizarse antes, después o al mismo tiempo que el mamífero recibe al feromona, LH o hCG. Preferiblemente, el mamífero recibe el trasplante antes o al mismo tiempo que la feromona, LH o hCG.

El mamífero puede recibir opcionalmente al menos otro agente, tal como eritropoyetina, AMP cíclico, polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP), serotonina, proteína morfogénica ósea (BMP), factor del crecimiento epidérmico (EGF), factor del crecimiento transformante-alfa (TGFalfa), factor del crecimiento de fibroblastos (FGF), estrógeno, hormona del crecimiento, factor del crecimiento de tipo insulínico-1 y/o factor neurotrófico ciliar (CNTF).

La feromona, LH/hCG y/o el otro agente pueden ser proporcionados mediante cualquier método establecido en la técnica. Por ejemplo, pueden administrarse por vía intravascular, intratecal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, tópica, oral, rectal, vaginal, nasal, mediante inhalación o en el cerebro. La administración se realiza preferiblemente de modo sistémico, en particular mediante una administración subcutánea. La feromona, LH/hCG o el otro agente también pueden ser proporcionados administrando al mamífero una cantidad eficaz de un agente que pueda aumentar la cantidad endógena de feromona, LH/hCG y/o el otro agente en el mamífero. Por ejemplo, el nivel de LH en un animal también puede aumentar utilizando GnRH.

Cuando la feromona, LH/hCG o el otro agente no se administran directamente al cerebro, puede incluirse opcionalmente un permeabilizante de la barrera hematoencefálica para facilitar la entrada en el cerebro. Los permeabilizantes de la barrera hematoencefálica son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, bradiquinina y los agonistas de bradiquinina descritos en las patentes de EEUU nº 5.686.416; 5.506.206 y 5.268.164 (tales como NH₂-arginina-prolina-hidroxipropilina-glicina-tienilalanina-serina-prolina-4-Me-tirosina.psi.(-CH₂NH)-arginina-COOH). Como alternativa, las moléculas que se van a administrar pueden conjugarse con anticuerpos del receptor de transferrina tal como se describe en las patentes de EEUU nº 6.329.508; 6.015.555; 5.833.988; o 5.527.527. Las moléculas también pueden administrarse como una proteína de fusión que comprenda la molécula y un ligando que sea reactivo con un receptor de células endoteliales capilares cerebrales, tal como el receptor de transferrina (véase, por ejemplo, la patente de EEUU nº 5.977.307).

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para potenciar la formación de neuronas a partir de células precursoras neurales, que comprende proporcionar una feromona, LH o hCG al menos a una célula precursora neural bajo condiciones que den como resultado la potenciación de la formación de neuronas a partir de dicha célula precursora neural. También se proporciona un método para aumentar la formación de nuevas neuronas en el bulbo olfatorio de un mamífero, que comprende proporcionar una cantidad eficaz de una feromona, LH o hCG al mamífero. También se proporcionan composiciones y composiciones farmacéuticas que comprenden u una feromona, LH o hCG, y al menos otro agente.

También se proporcionan composiciones celulares preparadas según la presente invención. En particular, se proporcionan cultivos de células precursoras neurales que se han expuesto a LH/hCG. Estos cultivos tienen niveles mayores de células precursoras neurales y/o neuronas, y pueden utilizarse, por ejemplo, para un trasplante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Los efectos de olores masculinos sobre la proliferación de células precursoras neurales en la SVZ (zona subventricular) de ratones hembra después de una exposición de 2, 7 o 14 días. 2D, 7D y 14D indican una exposición de 2, 7 y 14 días, respectivamente. F-M, ratones hembra expuestas a olores masculinos; F-F, ratones hembra expuestas a olores femeninos. Los datos brutos se muestran en la parte superior de cada panel.

(A) muestra los efectos del número de células BrdU-positivas en la SVZ.

(B) muestra los efectos del número de células Ki67-positivas en la SVZ.

(C) muestra la comparación de crías de la misma camada y crías de distintas camadas.

Figura 2. Los efectos de olores femeninos sobre la proliferación de células precursoras neurales en la SVZ de ratones macho después de una exposición de 2, 7 o 14 días. 2D, 7D y 14D indican una exposición de 2, 7 y 14 días, respectivamente. M-F, ratones macho expuestos a olores femeninos; M-M, ratones macho expuestos a olores masculinos. Los datos brutos se muestran en la parte superior de cada panel.

(A) muestra los efectos del número de células BrdU-positivas en la SVZ.

(B) muestra los efectos del número de células Ki67-positivas en la SVZ.

(C) muestra la comparación de crías de la misma camada y crías de distintas camadas.

Figura 3. Los efectos de olores masculinos sobre la proliferación de células precursoras neurales en el hipocampo de ratones hembra después de una exposición de 2, 7 o 14 días. 2D, 7D y 14D indican una exposición de 2, 7 y 14 días, respectivamente. F-M, ratones hembra expuestas a olores masculinos; F-F, ratones hembra expuestas a olores femeninos. Los datos brutos se muestran en la parte superior de cada panel.

Figura 4. Los efectos de olores masculinos sobre la neurogénesis en ratones hembra después de una exposición de 2, 7 o 14 días. 2D, 7D y 14D indican una exposición de 2, 7 y 14 días, respectivamente. F-M, ratones hembra

expuestas a olores masculinos; F-F, ratones hembra expuestas a olores femeninos. DCX, doblecortina. Los datos brutos se muestran en la parte superior de cada panel.

5 **Figura 5.** Los efectos de olores femeninos sobre la neurogénesis en ratones macho después de una exposición de 2, 7 o 14 días. 2D, 7D y 14D indican una exposición de 2, 7 y 14 días, respectivamente. M-F, ratones macho expuestos a olores femeninos; M-M, ratones macho expuestos a olores masculinos. DCX, doblecortina. Los datos brutos se muestran en la parte superior de cada panel.

10 **Figura 6.** El ensayo TUNEL (marcaje de mella terminal de dUTP mediado por desoxinucleotidiltransferasa terminal). Ratones hembra se expusieron a olores masculinos (F-M) o a olores femeninos (F-F) durante 7 días, y se determinó el número de células que sufrieron una muerte celular programada mediante el ensayo TUNEL. (A) y (B) muestran los recuentos de células apoptóticas en la SVZ y el bulbo olfatorio, respectivamente.

Figura 7. Los efectos de LH sobre el número de células BrdU-positivas en la SVZ en ratones hembra. (A) y (B) muestran los efectos de LH después de una infusión de 2 días (A) o de una infusión de 6 días (B) de LH, respectivamente. VEH, vehículo.

15 **Figura 8.** Los efectos de LH sobre el número de células BrdU-positivas en la SVZ en ratones macho después de una infusión de 2 días. VEH, vehículo.

20 **Figura 9.** Los efectos de receptores de LH sobre la proliferación de células precursoras neurales inducida por feromonas en ratones hembra. (A) y (B) muestran los efectos de la inactivación de los receptores de LH en la SVZ (A) y el hipocampo (B), respectivamente. (-/-): inactivación del receptor de LH. (+/+): tipo salvaje. Línea de base: ratones expuestos a jaulas sin olor. Hembra-Hembra: ratones hembra expuestos a olores femeninos. Hembra-Macho: ratones hembra expuestos a olores masculinos. $P^* < 0,05$; ensayo posthoc LSD.

25 **Figura 10.** Los efectos de receptores de LH sobre la proliferación de células precursoras neurales inducida por feromonas en ratones macho. (A) y (B) muestran los efectos de la inactivación de los receptores de LH en la SVZ (A) y el hipocampo (B), respectivamente. (-/-): inactivación del receptor de LH. (+/+): tipo salvaje. Línea de base: ratones expuestos a jaulas sin olor. Macho-Hembra: ratones macho expuestos a olores femeninos. Macho-Macho: ratones macho expuestos a olores masculinos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30 La presente invención proporciona un método para aumentar el número de células precursoras neurales o la neurogénesis utilizando una feromona, una hormona luteinizante (LH) o la gonadotropina coriónica humana (hCG). El método puede practicarse *in vivo* para obtener más células precursoras neurales *in situ* que, a su vez, producen más neuronas o células gliales para compensar las células neurales perdidas o degeneradas. El método también puede practicarse *in vitro* para producir un gran número de células precursoras neurales en cultivo. Las células precursoras cultivadas pueden utilizarse, por ejemplo, para un tratamiento de trasplante de pacientes o animales que padecen o que se sospecha que padecen enfermedades o trastornos neurodegenerativos.

35 Antes de describir la invención con más detalle, se definen como sigue los términos y las expresiones utilizados en esta solicitud, a menos que se indique lo contrario.

Definiciones

40 Una "célula precursora neural" es una célula precursora del linaje de células neurales. Una célula precursora es una célula que es capaz de reproducirse a sí misma. En otras palabras, las células hijas que surgen de las divisiones de las células precursoras incluyen células precursoras. Las células precursoras neurales son capaces de diferenciarse en último término en todos los tipos celulares del linaje de células neurales, incluyendo neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (los astrocitos y los oligodendrocitos se denominan en conjunto glía o células gliales). Así, las células precursoras neurales indicadas en la presente son células precursoras neurales multipotentes.

45 Una "neuroesfera" o "esfera" es un grupo de células derivada de una única célula precursora neural como resultado de la expansión clónica. Una "neuroesfera primaria" se refiere a una neuroesfera generada cultivando, como cultivo primario, tejido cerebral que contiene células precursoras neurales. El método para cultivar células precursoras neurales para formar neuroesferas se ha descrito, por ejemplo, en la patente de EEUU nº 5.750.376. Una "neuroesfera secundaria" se refiere a una neuroesfera generada disociando neuroesferas primarias y permitiendo que las células disociadas individuales formen de nuevo neuroesferas.

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

La expresión "porcentaje de coincidencia" o "% de coincidencia" de un análogo o variante con un factor nativo se

refiere al porcentaje de la secuencia de aminoácidos en el factor nativo que también se encuentra en el análogo o variante cuando se alinean dos secuencias. El porcentaje de coincidencia puede determinarse mediante cualquier método o algoritmo establecido en la técnica, tal como LALIGN o BLAST.

5 Un polipéptido posee una "actividad biológica" de un factor nativo si es capaz de unirse al receptor para el factor nativo o de ser reconocido por un anticuerpo policlonal generado contra el factor nativo. Preferiblemente, el polipéptido es capaz de unirse de modo específico con el receptor para el factor nativo en un ensayo de unión al receptor.

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

10 Una "LH" es una proteína que (1) comprende un polipéptido que comparte una similitud de secuencia sustancial con una LH de mamífero nativa, preferiblemente la LH humana nativa; y (2) posee una actividad biológica de la LH de mamífero nativa. La LH de mamífero nativa es una gonadotropina segregada por el lóbulo anterior de la pituitaria. La LH es un heterodímero que consiste en subunidades alfa y beta unidas de modo no covalente. La subunidad alfa es común a LH, FSH y hCG, y la subunidad beta es específica para cada hormona. La LH útil en la presente invención
15 puede tener la subunidad alfa nativa, compartiendo la subunidad beta una similitud de secuencia sustancial con una LH de mamífero nativa. Como alternativa, la LH puede tener la subunidad beta nativa, compartiendo la subunidad alfa una similitud de secuencia sustancial con una LH de mamífero nativa. La LH también puede presentar unas subunidades alfa y beta que comparten una similitud de secuencia sustancial con una correspondiente subunidad nativa. Así, el término "LH" incluye análogos de LH que comprenden un mutante de delección, de inserción o de
20 sustitución de una subunidad de LH nativa. Además, el término "LH" incluye las LH de otras especies y sus variantes naturales. Además, una "LH" también puede ser un agonista funcional de un receptor de LH de mamífero nativo.

Una "hCG" es una proteína que (1) comprende un polipéptido que comparte una similitud de secuencia sustancial con la hCG nativa; y (2) posee una actividad biológica de la hCG nativa. La hCG nativa es un heterodímero que
25 consiste en subunidades alfa y beta unidas de modo no covalente. La subunidad alfa es común a LH, FSH y hCG, y la subunidad beta es específica para cada hormona. Sin embargo, las subunidades beta de hCG y LH comparten una similitud de secuencia del 85%. La hCG útil en la presente invención puede tener la subunidad alfa nativa, compartiendo la subunidad beta una similitud de secuencia sustancial con la hCG nativa. Como alternativa, la hCG
30 puede tener la subunidad beta nativa, compartiendo la subunidad alfa una similitud de secuencia sustancial con la hCG nativa. La hCG también puede presentar unas subunidades alfa y beta que comparten una similitud de secuencia sustancial con la correspondiente subunidad nativa. Así, el término "hCG" incluye análogos de hCG que comprenden un mutante de delección, de inserción o de sustitución de una subunidad de hCG nativa. Además, el término "hCG" incluye las hCG equivalentes de otras especies y sus variantes naturales. Además, una "hCG" también puede ser un agonista funcional de un receptor de hCG/LH de mamífero nativo.

35 Una "prolactina" es 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. Así, el término "prolactina" incluye análogos de prolactina que son los mutantes de delección, de inserción o de sustitución de la prolactina nativa. Además, el término "prolactina" incluye las prolactinas de otras especies y sus variantes naturales.

40 Además, una "prolactina" también puede ser un agonista funcional de un receptor de prolactina de mamífero nativo. Por ejemplo, el agonista funcional puede ser una secuencia de aminoácidos activante descrita en la patente de EEUU nº 6.333.031 para el receptor de prolactina; un ligando de receptor complejado con un metal con actividades
45 agonistas para el receptor de prolactina (patente de EEUU nº 6.413.952); G120RhGH, que es un análogo de la hormona del crecimiento humana pero actúa como agonista de prolactina (Mode *et al.*, 1996); o un ligando para el receptor de prolactina según se describe en las patentes de EEUU nº 5.506.107 y 5.837.460.

Un "EGF" significa un EGF nativo o cualquier análogo o variante de EGF que comparta 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. Se incluye en particular un EGF que es el EGF nativo de cualquier especie, TGF-
50 alfa, o EGF modificado recombinante. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan al EGF modificado recombinante que tiene una delección de los dos aminoácidos C-terminales, y una sustitución de un aminoácido neutro en la posición 51 (en particular EGF51 gln51; publicación de solicitud de patente de EEUU nº 20020098178A1), la muteína de EGF (EGF-X.sub.6) en la que el resto His en la posición 16 está sustituido por un aminoácido neutro o ácido (patente de EEUU nº 6.191.106), el mutante de delección de 52 aminoácidos de EGF que carece del resto amino terminal del EGF nativo (EGF-D), el mutante de delección de EGF en el que el resto N-
55 terminal, así como los dos restos C-terminales (Arg-Leu) están delecionados (EGF-B), el EGF-D en el que el resto Met en la posición 21 está oxidado (EGF-C), el EGF-B en el que el resto Met en la posición 21 está oxidado (EGF-A), el factor del crecimiento de tipo EGF de unión a la heparina (HB-EGF), betacelulina, anfirregulina, neurregulina, o una proteína de fusión que comprende cualquiera de los anteriores. Otros análogos o variantes de EGF útiles se describen en la publicación de solicitud de patente de EEUU nº 20020098178A1, y en las patentes de EEUU nº
60 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 activante descrita en la patente de EEUU nº 6.333.031 para el receptor de EGF, o un anticuerpo que tiene actividades agonistas para el receptor de EGF (Fernández-Pol, 1985; y patente de EEUU nº 5.723.115).

- 5 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 al receptor de PACAP. Los análogos y variantes de PACAP útiles incluyen, sin limitarse a los variantes de 38 aminoácidos y de 27 aminoácidos de PACAP (PACAP38 y PACAP27, respectivamente), y los análogos y variantes descritos, por ejemplo, en las patentes de EEUU nº 5.128.242; 10 5.198.542; 5.208.320; 5.326.860; 5.623.050; 5.801.147; y 6.242.563.

Además, 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 un agonista específico del receptor de tipo 1 de PACAP (Moro *et al.*, 1997).

- 15 Una “eritropoyetina (EPO)” significa una EPO nativa o cualquier análogo o variante de PACAP 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. Se describen análogos y variantes de eritropoyetina, por ejemplo, en las patentes de EEUU nº 6.048.971 y 5.614.184.

- Además, una “EPO” también puede ser un agonista funcional de un receptor de EPO de mamífero nativo. Por ejemplo, el agonista funcional puede ser EMP1 (péptido mimético 1 de EPO, Johnson *et al.*, 2000); uno de los 20 miméticos de péptidos cortos de EPO según se describe en Wrighton *et al.*, 1996, y patente de EEUU nº 5.773.569; cualquier mimético de EPO de molécula pequeña, según se describe en Kaushansky, 2001; un anticuerpo que activa el receptor de EPO, según se describe en la patente de EEUU nº 5.885.574, el documento WO 96/40231, el documento WO 97/48729, Fernández-Pol, 1985, o la patente de EEUU nº 5.723.115; una secuencia de aminoácidos 25 activante, según se describe en la patente de EEUU nº 6.333.031, para el receptor de EPO; un ligando del receptor complejo con un metal con actividades agonistas por el receptor de EPO (patente de EEUU nº 6.413.952), o un ligando para el receptor de EPO según se describe en las patentes de EEUU nº 5.506.107 y 5.837.460.

Un “agente inductor de LH/hCG” es una sustancia que, cuando se administra a un animal, es capaz de aumentar la cantidad de LH o hCG en el animal. Por ejemplo, la hormona liberadora de LH (LHRH) estimula la secreción de LH.

- 30 Una “feromona” es una sustancia que actúa como una señal para otro animal de la misma especie, normalmente del género opuesto. Una feromona de mamífero puede ser una proteína de molécula pequeña. Preferiblemente, la feromona se selecciona del grupo que consiste en 2-sec-butil-4,5-dihidrotiazol (SBT), 2,3-deshidro-exo-brevicomina (DHB), alfa- y beta-farnesenos, 6-hidroxi-6-metil-3-heptatona, 2-heptanona, trans-5-hepten-2-ona, trans-4-hepten-2-ona, acetato de n-pentilo, acetato de cis-2-penten-1-ilo, 2,5-dimetilpirazina, propionato de dodecilo, y acetato de (Z)-7-dodecen-1-ilo (véase, por ejemplo, Dulac *et al.*, 2003).

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

- Una “enfermedad o trastorno neurodegenerativo” es una enfermedad o un trastorno médico asociado con la pérdida o la disfunción de las neuronas. Los ejemplos de enfermedades o trastornos neurodegenerativos incluyen 40 enfermedades neurodegenerativas, lesiones del SNC o disfunciones del SNC. Las enfermedades neurodegenerativas incluyen, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, degeneración macular, glaucoma, retinopatía diabética, neuropatía periférica, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, y enfermedad de Parkinson. Las lesiones del SNC incluyen, por ejemplo, ictus (por ejemplo, ictus hemorrágico, ictus isquémico focal, o ictus isquémico global) y lesiones cerebrales o de la médula espinal traumáticas (por ejemplo, lesiones provocadas 45 por accidentes físicos o cirugía cerebral o de la médula espinal). Las disfunciones del SNC incluyen, por ejemplo, depresión, epilepsia, neurosis y psicosis.

“Tratar o mejorar” significa la reducción o la eliminación completa de los síntomas de una enfermedad o un trastorno médico.

- 50 Un mamífero “sospechoso de padecer una enfermedad o trastorno neurodegenerativo” es un mamífero al que no se le ha diagnosticado oficialmente la enfermedad o el trastorno neurodegenerativo, pero que muestra un síntoma de la enfermedad o del trastorno neurodegenerativo, es susceptible de padecer la enfermedad o el trastorno neurodegenerativo debido a una historia familiar o predisposición genética, o ha padecido previamente la enfermedad o el trastorno neurodegenerativo y está en riesgo de recurrencia.

- 55 “Transplantar” una composición en un mamífero se refiere a introducir la composición en el cuerpo del mamífero mediante cualquier método establecido en la técnica. La composición que se introduce es el “transplante”, y el mamífero es el “receptor”. El transplante y el receptor pueden ser singeneicos, alogeneicos o xenogeneicos. Preferiblemente, el transplante es un transplante autólogo.

Una "cantidad eficaz" es una cantidad de un agente terapéutico suficiente para lograr el objetivo propuesto. Por ejemplo, una cantidad eficaz de una LH o hCG para aumentar el número de células precursoras neurales es una cantidad suficiente, *in vivo* o *in vitro*, según sea el caso, para producir un aumento en el número de células precursoras neurales. Una cantidad eficaz de una LH o hCG para tratar o mejorar una enfermedad o un trastorno neurodegenerativo es una cantidad de la LH/hCG suficiente para reducir o eliminar los síntomas de la enfermedad o el trastorno neurodegenerativo. La cantidad eficaz de un agente terapéutico concreto variará según factores, tales como la naturaleza del agente, la vía de administración, el tamaño y la especie del animal que recibe el agente terapéutico, y el objetivo de la administración. La cantidad eficaz en cada caso individual puede ser determinada de forma empírica por los expertos en la técnica según métodos establecidos en la técnica.

10 Métodos

Las células precursoras neurales se localizan en dos regiones del cerebro del mamífero adulto (Reynolds y Weiss, 1992): el giro dentado del hipocampo, y la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales (Luskin, 1993; Menezes *et al.*, 1995; Frisen *et al.*, 1998; Peretto *et al.*, 1999; Gage, 2000; Rochefort *et al.*, 2002). Las células precursoras neurales siguen dos vías mitóticas que contribuyen a su crecimiento y proliferación. La primera vía mitótica es en la que las células precursoras neurales se dividen de forma simétrica como un medio de regeneración y autorrenovación. La segunda división mitótica es asimétrica, y produce una célula precursora neural hija y una célula progenitora. En último término es la célula progenitora la que asume un destino determinado como uno de los tipos celulares del sistema nervioso central. Por ejemplo, en el caso de la neurogénesis, es la célula progenitora neuronal la que produce una neurona (Weiss *et al.*, 1996; Morrison y Shah, 1997; Peretto *et al.*, 1999; Rao, 1999).

Las progenitoras neuronales del hipocampo residen en el giro dentado y tienen la capacidad de proliferar y migrar hacia la capa de células granulares para diferenciarse en células granulares (Nilsson *et al.*, 1999; Gage, 2000; Rochefort *et al.*, 2002). En la SVZ, las células precursoras neurales y las progenitoras proliferan, después las progenitoras siguen un camino migratorio, conocido como la corriente migratoria rostral ("rostral migratory stream", RMS), por la que llegan al bulbo olfatorio (BO) para convertirse en interneuronas (Luskin, 1993; Menezes *et al.*, 1995; Rao, 1999; Rochefort *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que un entorno olfatorio enriquecido, creado con nuevos olores, aumenta la neurogénesis en el bulbo olfatorio y mejora la memoria olfatoria (Rochefort *et al.*, 2002). Aunque las interneuronas del bulbo olfatorio se derivan de las células precursoras neurales en la SVZ, la exposición a un entorno olfatorio enriquecido no produce ningún efecto sobre la proliferación celular en la SVZ (Rochefort *et al.*, 2002). Sin embargo, tal como se describe en la presente invención, los inventores han observado los sorprendentes efectos de olores masculinos y femeninos sobre el género opuesto en la proliferación de células precursoras neurales y la neurogénesis.

Para determinar el impacto de los olores masculinos o femeninos, ratones adultos fueron expuestos a los olores del género opuesto durante 2 días, 7 días o 14 días. Un grupo control fue expuesto a los olores del mismo género durante el mismo periodo de tiempo. Los ratones entonces recibieron BrdU para marcar las células proliferantes, y se identificaron las localizaciones de las células BrdU-positivas mediante estudios inmunohistoquímicos (ejemplo 1). Tal como se muestra en la figura 1A, las células proliferantes en la SVZ de ratones hembra permanecieron al mismo nivel después de ser expuestas a olores femeninos durante 2, 7 o 14 días. Sin embargo, en el grupo de las hembras expuestas a olores masculinos, las células proliferantes en la SVZ cambiaron a lo largo del tiempo: aumentaron significativamente después de 7 días y disminuyeron significativamente después de 14 días. Una exposición de 2 días no producía ningún efecto. Se observó el mismo patrón cuando se utilizó Ki67 para marcar las células proliferantes (figura 1B), lo cual indica que el cambio en las células BrdU-positivas refleja un cambio en el nivel de proliferación.

Los olores femeninos también afectaron a la proliferación en el cerebro de ratones macho, pero con un patrón temporal diferente. Cuando los machos fueron expuestos a los olores femeninos durante 2 días, se produjo un aumento súbito en el número de células BrdU-positivas (figura 2A) o de células Ki67-positivas (figura 2B). Sin embargo, después de una exposición de 7 o 14 días, el número de células recién proliferadas disminuyó hasta el nivel control.

De manera sorprendente, las células precursoras neurales en el hipocampo también respondieron a olores específicos de género. De nuevo, la exposición durante dos días a olores masculinos no produjo efectos significativos sobre los ratones hembra, pero una exposición de 7 días produjo un aumento significativo en la proliferación en el hipocampo (figura 3). Después de una exposición durante 14 días, los niveles de células proliferantes fueron significativamente más bajos en hembras expuestas a olores masculinos cuando se comparan con las hembras que habían sido expuestas a olores femeninos. Por lo que saben los inventores, esta es la primera vez que se ha demostrado que un estímulo distinto a los factores del crecimiento (por ejemplo, EGF más FGF) ejerce los mismos efectos sobre las células precursoras neurales en la SVZ y en el hipocampo. Habitualmente los efectos son opuestos. Por ejemplo, la prolactina afecta a la SVZ pero no al hipocampo (Shingo *et al.*, 2003); el estrógeno estimula la proliferación en el hipocampo pero no en la SVZ (Tanapat *et al.*, 1999); un entorno enriquecido y actividades físicas estimulan la neurogénesis en el hipocampo, pero no la neurogénesis en la SVZ (Brown *et al.*, 2003).

La neurogénesis también fue potenciada tras la exposición a los olores del género opuesto (ejemplo 2). Así, se tiñeron secciones de tejidos de los animales descritos anteriormente para la doblecortina, una proteína citoplásmica expresada en células progenitoras neuronales, para determinar el grado de neurogénesis en los ratones descritos anteriormente. Como en el caso de las células proliferantes, los ratones hembra tenían significativamente más células doblecortina-positivas después de 7 días de exposición a olores masculinos (figura 4), mientras que los ratones macho tenían significativamente más células doblecortina-positivas después de 2 días de exposición a olores femeninos (figura 5).

Para determinar si las feromonas del género opuesto también influyen en la supervivencia de células neurales, se realizó el ensayo TUNEL. Los resultados indican que no se observa una diferencia significativa en la SVZ (figura 6A) o el bulbo olfatorio (figura 6B) de ratones hembra después de 7 días de exposición a olores masculinos.

Se sabe que las feromonas masculinas aumentan los niveles de hormona luteinizante (LH) y disminuyen los niveles de prolactina, mientras que las feromonas femeninas está asociadas con un aumento en la prolactina (Dulac *et al.*, 2003). Para intentar investigar la forma en que las feromonas potencian la proliferación de células precursoras neuronales y la neurogénesis en el género opuesto, los animales se infundieron con LH. Los resultados demuestran que la LH aumenta significativamente la proliferación en la SVZ de ratones hembra (figuras 7A y 7B) y macho (figura 8). De manera coherente con estos resultados, la LH también es capaz de aumentar la autorrenovación de las células precursoras neuronales en cultivo (ejemplo 3).

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para aumentar el número de células precursoras neuronales *in vivo* o *in vitro* utilizando una feromona y/o LH. Se espera que la gonadotropina coriónica humana (hCG) tenga el mismo efecto que la LH, puesto que hCG es un análogo de LH y comparte el mismo receptor con la LH. Cuando se utiliza para aumentar el número de células precursoras neuronales *in vivo*, este método producirá una mayor agrupación de células precursoras neuronales en el cerebro. Esta agrupación mayor de células precursoras neuronales posteriormente puede generar más células neuronales, en particular neuronas o células gliales, que una población de células precursoras sin feromona ni LH/hCG. Las células neuronales, a su vez, pueden compensar las células neuronales perdidas o degeneradas que están asociadas con enfermedades y trastornos neurodegenerativos, incluyendo lesiones del sistema nervioso.

También puede utilizarse LH/hCG u otros factores inducidos por feromonas para aumentar el número de células precursoras neuronales *in vitro*. Las células precursoras resultantes pueden utilizarse para producir más neuronas y/o células gliales *in vitro*, o utilizarse en procedimientos de trasplante en seres humanos o animales que padecen enfermedades o trastornos neurodegenerativos. Es preferible que las células precursoras neuronales producidas según la invención sean transplantadas, en lugar de transplantar neuronas o células gliales. Tras haber transplantado células precursoras neuronales pueden administrarse agentes del crecimiento y/o de diferenciación *in vivo* para aumentar aún más el número de células precursoras, o para potenciar selectivamente la formación de neuronas o la formación de células gliales. Estos otros agentes también pueden utilizarse de modo similar *in vitro* con LH o hCG, o administrarse *in vivo* en combinación con una feromona/LH/hCG.

Los ejemplos de agentes de diferenciación incluyen, pero no se limitan a los siguientes:

1. Eritropoyetina (Epo): Se ha demostrado que la Epo potencia el compromiso de las células precursoras neuronales con el linaje de células neuronales y que esto puede utilizarse para tratar modelos de ictus de ratón y de rata.

2. Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF): El BDNF es un factor de supervivencia y agente de diferenciación conocido que estimula el linaje neuronal.

3. Factor del crecimiento transformante-beta y proteínas morfogénicas óseas (BMP): Los BMP son agentes de diferenciación que estimulan el linaje neuronal y la generación de fenotipos neuronales específicos (por ejemplo, interneuronas sensoriales en la médula espinal).

4. Hormona tiroidea (TH, incluyendo ambas formas T3 y T4): Se sabe que la TH es un agente de diferenciación que estimula la maduración y la generación de oligodendrocitos. Véase, por ejemplo, Rodríguez-Pena, 1999.

5. Hormona estimulante del tiroides (TSH) y hormona liberadora de la hormona tiroidea (TRH): TSH/TRH estimulan la liberación de TH desde la pituitaria anterior, dando como resultado mayores niveles de TH en la circulación. Este agente puede utilizarse en combinación con una feromona/LH/hCG para estimular la oligodendroglíogenesis a partir de las células precursoras neuronales.

6. Erizo sónico (SHH): El SHH es un morfógeno que modela el SNC que se está formando durante el desarrollo y, en diferentes concentraciones, estimula la generación de tipos específicos de neuronas (por ejemplo, motoneuronas en la médula espinal) y oligodendrocitos. Este agente puede utilizarse en combinación con feromonas/LH/hCG para estimular la neurogénesis y/o la oligodendroglíogenesis a partir de las células precursoras neuronales.

7. Factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF): El PDGF estimula la generación y la diferenciación de oligodendrocitos a partir de las células precursoras neurales. Este agente puede utilizarse en combinación con feromonas/LH/hCG para estimular la oligodendroglíogenesis a partir de las células precursoras neurales.

5 8. El AMP cíclico y los agentes que potencian la vía del AMPc, tales como el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP) y la serotonina, también son buenos candidatos para estimular de modo selectivo la producción de neuronas.

Los agentes que pueden aumentar el número de células precursoras neurales incluye, pero no se limitan a los siguientes:

10 9. La hormona estimulante del folículo (FSH) actúa en concierto con la LH; se sabe que induce la expresión del receptor de LH y por tanto puede potenciar los efectos de la señalización de LH.

10. La hormona del crecimiento (GH) puede estimular la proliferación de las células precursoras neurales.

15 11. Los factores del crecimiento insulínicos (IGF) son somatomedinas que son liberadas por muchos tejidos en respuesta a la GH y median en muchos de los efectos estimulantes del crecimiento de la GH. IGF-1 estimula la proliferación de las células precursoras neurales.

12. La hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH) se segrega desde el hipotálamo e induce la liberación de GH desde la pituitaria anterior, produciendo unos mayores niveles de GH en la circulación.

20 13. La prolactina (PRL) se segrega desde la pituitaria anterior y se sabe que estimula la proliferación de las células precursoras neurales. La PRL y las feromonas/LH/hCG pueden utilizarse en combinación para maximizar la proliferación de las células precursoras neurales.

25 14. El péptido liberador de prolactina (PRP) activa la liberación de prolactina y puede utilizarse en combinación con feromonas/LH/hCG para maximizar la proliferación de las células precursoras neurales.

15. El factor del crecimiento de fibroblastos es un agente mitógeno conocido para las células precursoras neurales.

16. Se sabe que el estrógeno estimula la proliferación de las células precursoras neurales en el hipocampo.

30 17. Se sabe que la serotonina estimula la proliferación de las células precursoras neurales en el hipocampo.

18. El factor del crecimiento epidérmico es un agente mitógeno conocido para las células precursoras neurales.

35 19. El factor del crecimiento transformante-alfa (TGFalfa) es un agente mitogénico conocido para las células precursoras neurales.

20. La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) activa la liberación de LH y puede utilizarse en combinación o en lugar de las feromonas/LH/hCG para aumentar los niveles en circulación de la LH y potenciar la proliferación de las células precursoras neurales.

40 21. Factor neurotrófico ciliar y factor inhibidor de leucemia: Ambos agentes y otros señalizan a través de la subunidad gp130. Se ha demostrado que esta vía de señalización estimula la autorrenovación de las células precursoras neurales, expandiendo con ello la población de las células precursoras neurales del cerebro. Estos agentes pueden utilizarse en combinación con feromonas/LH/hCG para estimular la proliferación de las células precursoras neurales y aumentar el tamaño de la población de las células precursoras neurales dentro del SNC.

45 La presente invención también proporciona métodos para aumentar la formación de neuronas a partir de células precursoras neurales *in vitro* o *in vivo*. En particular, se proporcionan métodos para potenciar la producción de nuevas neuronas olfatorias.

50 El aumento en células precursoras neurales o neuronas es preferiblemente de al menos aproximadamente 10%, más preferiblemente de al menos aproximadamente 20%, aún más preferiblemente de al menos aproximadamente 30%, aún más preferiblemente de al menos aproximadamente 40%, aún más preferiblemente de al menos aproximadamente 50%, y aún más preferiblemente de al menos aproximadamente 60%. Lo más preferiblemente, el aumento es de al menos aproximadamente 80%.

La presente invención también proporciona un método para tratar o mejorar una enfermedad o trastorno neurodegenerativo en un animal, en particular un mamífero. Esto puede lograrse, por ejemplo, administrando una cantidad eficaz de una LH y/o hCG al mamífero, o transplantando al mamífero células precursoras neurales, células progenitoras derivadas de células precursoras neurales, neuronas y/o células gliales producidas según la presente invención. Preferiblemente, se transplantan células precursoras neurales. Además del trasplante, también pueden proporcionarse LH/hCG y/u otros agentes al receptor del trasplante, en particular al mismo tiempo o después del trasplante.

Un trastorno neurodegenerativo particularmente interesante es el envejecimiento. Los inventores han descubierto que el número de células precursoras neurales en la zona subventricular es significativamente reducido en ratones ancianos. Por consiguiente, será de particular interés mejorar problemas asociados con el envejecimiento aumentando el número de células precursoras neurales con feromonas/LH/hCG.

Por ejemplo, las células precursoras neurales en la zona subventricular son la fuente de neuronas olfatorias, y la disfunción olfatoria es una característica de enfermedades neurodegenerativas del cerebro anterior, tales como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington. La alteración de la migración neuronal hacia el bulbo olfatorio conduce a déficits en la discriminación olfatoria, y si se duplican las nuevas interneuronas olfatorias se potencia la creación de nueva memoria olfatoria (Rocheffort *et al.*, 2002). Por tanto, pueden utilizarse las feromonas/LH/hCG para potenciar la discriminación olfatoria o la memoria olfatoria, así como las funciones fisiológicas asociadas con el olfato y la discriminación olfatoria, tales como el apareamiento, el reconocimiento y la cría de la descendencia.

Otra aplicación particularmente importante de la presente invención es el tratamiento y/o la mejoría de lesiones del SNC, tales como ictus.

Composiciones

La presente invención proporciona composiciones que comprenden una feromona, LH o hCG, y opcionalmente al menos otro agente. El otro agente es capaz de aumentar el número de células precursoras neurales o de potenciar la diferenciación de células precursoras neurales en neuronas o células gliales, según se describió anteriormente. El otro agente se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en la hormona estimulante del folículo (FSH), la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), la prolactina, el péptido liberador de prolactina (PRP), la eritropoyetina, el AMP cíclico, el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP), la serotonina, la proteína morfogénica ósea (BMP), el factor del crecimiento epidérmico (EGF), el factor del crecimiento transformante-alfa (TGFalfa), el factor del crecimiento transformante-beta (TGFbeta), el factor del crecimiento de fibroblastos (FGF), el estrógeno, la hormona del crecimiento, la hormona liberadora de la hormona del crecimiento, los factores del crecimiento de tipo insulínico, el factor inhibidor de leucemia, el factor neurotrófico ciliar (CNTF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la hormona tiroidea, la hormona estimulante de la hormona tiroidea, el erizo sónico (SHH) y/o el factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Lo más preferiblemente, se añaden eritropoyetina, prolactina, EGF y/o PACAP.

La feromona puede ser cualquier feromona que sea capaz de aumentar el número de células precursoras neurales en el mamífero. Los ensayos para determinar si una sustancia es capaz de aumentar el número de células precursoras neurales están establecidos en la técnica y se describen en la presente (por ejemplo, véanse los ejemplos 1 y 3). La feromona se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en 2-sec-butil-4,5-dihidrotiazol (SBT), 2,3-deshidro-exo-brevicomina (DHB), alfa- y beta-farnesenos, 6-hidroxi-6-metil-3-heptanona, 2-heptanona, trans-5-hepten-2-ona, trans-4-hepten-2-ona, acetato de n-pentilo, acetato de cis-2-penten-1-ilo, 2,5-dimetilpirazina, propionato de dodecilo, y acetato de (Z)-7-dodecen-1-ilo (véase, por ejemplo, Dulac *et al.*, 2003).

La LH/hCG útil en la presente invención incluye cualquier análogo o variante de LH o hCG que sea capaz de aumentar el número de células precursoras neurales. Un análogo o variante de LH/hCG comprende una proteína que contiene aproximadamente 30% de la secuencia de aminoácidos de al menos una subunidad de la LH o hCG nativa humana, y que posee una actividad biológica de la LH o hCG nativas. Preferiblemente, la actividad biológica de LH o hCG es la capacidad para unirse a receptores de LH/hCG. Se incluyen específicamente como LH/hCG los variantes de LH/hCG naturales; las LH/hCG de diversas especies de mamífero que incluyen, pero no se limitan a seres humanos, otros primates, rata, ratón, oveja, cerdo y ganado vacuno; y los análogos que se emplean habitualmente listados en la siguiente tabla 1. Puede utilizarse GnRH o uno de sus análogos en lugar o además de LH/hCG.

Tabla 1. Análogos habituales de GnRH, LH y hCG

Agonistas de GnRH/LHRH

Agonista de GnRH, leuprorelina (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NH₂)

Buserelina: otro agonista de LHRH

Serofeno: una medicación recetada que inicia la liberación de GnRH

LH

Luveris[®] (*lutropina alfa*): hormona luteinizante pura (LH humana recombinante)

hCG

Ovidrel[®]/*Ovitrelle*[®]1 (*coriogonadotropina alfa*): gonadotropina coriónica recombinante (r-hCG)

Pregnyl[®]: es una preparación inyectable muy purificada de gonadotropina coriónica humana obtenida a partir de la orina de mujeres embarazadas. Pregnyl se ha utilizado en todo el mundo desde 1932.

NOVAREL[™] (gonadotropina coriónica para inyección, USP)

Profasi: gonadotropina coriónica humana (hCG). Profasi se administra por vía intramuscular

De manera similar, cualquier compuesto o agente adicional que sea útil en la presente invención incluye sus análogos y variantes que compartan una similitud sustancial y al menos una actividad biológica con los compuestos o agentes nativos. Por ejemplo, puede utilizarse EGF junto con LH/hCG en la presente invención. Además del EGF nativo también puede utilizarse un análogo o variante de EGF, que comparta una similitud de secuencia de aminoácidos sustancial con el EGF nativo, así como al menos una actividad biológica con el EGF nativo, tal como la unión al receptor de EGF. Se incluye particularmente como EGF el EGF nativo de cualquier especie, TGF α , o EGF modificado recombinante. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a EGF modificado recombinante que tiene una delección de los dos aminoácidos C-terminales y una sustitución de un aminoácido neutro en la posición 51 (en particular EGF51gln51; publicación de solicitud de patente de EEUU n^o 20020098178A1), la muteína de EGF (EGF-X₁₆) en la que el resto His en la posición 16 se reemplaza por un aminoácido neutro o ácido (patente de EEUU n^o 6.191.106), el mutante de delección de 52 aminoácidos de EGF que carece del resto amino-terminal del EGF nativo (EGF-D), el mutante de delección de EGF en el que el resto N-terminal, así como los dos restos C-terminales (Arg-Leu) están delecionados (EGF-B), el EGF-D en el que el resto Met en la posición 21 está oxidado (EGF-C), el EGF-B en el que el resto Met en la posición 21 está oxidado (EGF-A), el factor del crecimiento de tipo EGF de unión a la heparina (HB-EGF), betacelulina, anfirregulina, neurregulina, o una proteína de fusión que comprende cualquiera de los anteriores. Otros análogos o variantes de EGF útiles se describen en la publicación de solicitud de patente de EEUU n^o 20020098178A1, y en las patentes de EEUU n^o 6.191.106 y 5.547.935.

Como otro ejemplo, PACAP también puede utilizarse junto con LH/hCG. Los análogos y variantes de PACAP útiles incluyen, sin limitarse a los variantes de 38 aminoácidos y de 27 aminoácidos de PACAP (PACAP38 y PACAP27, respectivamente), y los análogos y variantes descritos, por ejemplo, en las patentes de EEUU n^o 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 eritropoyetina se describen, por ejemplo, en las patentes de EEUU n^o 6.048.971 y 5.614.184.

También se contemplan en la presente invención los agonistas funcionales de LH/hCG u otros agentes útiles en la presente invención. Estos agonistas funcionales se unen y activan el receptor del agente nativo, aunque no comparten necesariamente una similitud de secuencia sustancial con el agente nativo. Por ejemplo, el maxadilano es un polipéptido que actúa como un agonista específico del receptor de tipo 1 de PACAP (Moro *et al.*, 1997).

Los agonistas funcionales de EPO se han estudiado a fondo. El EMP1 (péptido mimético 1 de EPO) es uno de los miméticos de EPO descritos en Johnson *et al.*, 2000. Se describen miméticos de EPO de péptidos cortos por ejemplo en Wrighton *et al.*, 1996, y la patente de EEUU n^o 5.773.569. Se describen miméticos de EPO de molécula pequeña por ejemplo en Kaushansky, 2001. Se describen anticuerpos que activan el receptor de EPO por ejemplo en la patente de EEUU n^o 5.885.574; los documentos WO 96/40231 y WO 97/48729.

Se han descrito anticuerpos que tienen actividades agonistas por el receptor de EGF, por ejemplo en Fernández-Pol, 1985, y la patente de EEUU n^o 5.723.115. Además, también se describen secuencias de aminoácidos activantes en la patente de EEUU n^o 6.333.031 para el receptor de EPO, el receptor de EGF, el receptor de prolactina y muchos otros receptores de la superficie celular; pueden encontrarse ligandos de receptores complejados con metales con actividades agonistas para la prolactina y receptores de EPO en la patente de EEUU n^o 6.413.952. Otros métodos

para identificar y preparar ligandos para receptores, por ejemplo, receptores de EPO y prolactina, se describen, por ejemplo, en las patentes de EEUU nº 5.506.107 y 5.837.460.

En la siguiente tabla 2 también pueden encontrarse análogos utilizados habitualmente de ciertos otros agentes:

Tabla 2. Análogos habituales de otros agentes

FSH

Folitropina beta; Follistim/Puregon®, hormona estimulante del folículo (FSH) recombinante, gonadotropina pura muy utilizada para tratar la infertilidad; lanzada por Organon en 1996

GONAL-f™ (folitropina alfa), hormona estimulante del folículo humana recombinante que es equivalente en su estructura a la FSH humana natural en el cuerpo

BRAVELLE™ (urofolitropina para inyección, purificada); FSH derivada de humanos (Hfsh) muy purificada, la única FSH derivada de humanos aprobada para inyección subcutánea (SC) e intramuscular (IM)

PRP (péptido liberador de prolactina)

hPRP, Ser-Arg-Thr-His-Arg-His-Ser-Met-Glu-Ile-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Ser-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH₂

LIF

Emfilermin (r-LIF), fallo en la implantación del embrión; aún en estudios clínicos (NO HA SIDO APROBADO)

EPO

NeoRecormon, eritropoyetina beta, Roche

Epoetina omega, Baxter International Inc.; características fisicoquímicas diferentes de otras eritropoyetinas o EPO (alfa y beta); actualmente aprobado para su venta en 15 países fuera de EEUU y Europa Occidental

Darbopoyetina

TH

Armour Thyroid, fármaco de sustitución de la hormona tiroidea desecada natural, Forest Pharmaceuticals

Cytomel, liotironina sodio sintética (T3), King Pharmaceuticals

Levothroid, levotiroxina sintética, Forest Pharmaceuticals (en la actualidad no aprobado por FDA, diciembre 2003)

Levoxyl, levotiroxina sintética, King Pharmaceuticals

Nature-thorid y Westthroid, fármaco de sustitución de la hormona tiroidea desecada natural, Western Research Laboratories

Synthroid, levotiroxina sintética, Abbott Laboratories

Thyrolar, liotrix sintético, una combinación de L-triyodotironina (T3) y levotiroxina sodio (T4)

Unithroid, levotiroxina sintética, Jerome Stevens Pharmaceuticals

TSH

Thyrogen, una hormona estimulante del tiroides (TSH) sintética para su uso en pacientes con cáncer de tiroides, Genzyme Pharmaceuticals, en la actualidad aprobada por FDA

TRH (hormona liberadora de hormona tiroidea)

pGlu-His-Pro amida

THYREL® TRH (protirelina)

- 5 Debe advertirse que la cantidad eficaz de cada análogo, variante o agonista funcional puede ser diferente de la del compuesto o agente nativo, y que la cantidad eficaz en cada caso puede ser determinada por los expertos en la técnica según la presente descripción. Preferiblemente, en la presente invención se utilizan los agentes nativos, o los análogos y variantes que comparten una similitud de secuencia sustancial con los agentes nativos.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas, que comprenden una LH/hCG, otro agente según se describió anteriormente, y un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse a través de cualquier vía conocida en la técnica, tal como por vía parenteral, intratecal, intravascular, intravenosa, intramuscular, transdérmica, intradérmica, subcutánea, intranasal, tópica, oral, rectal, vaginal, pulmonar, o intraperitoneal. Por ejemplo, en el ejemplo 6 se demuestra que la inyección intramuscular es una vía eficaz para administrar hCG para que ejerza su función en el cerebro. Preferiblemente, la composición se administra al sistema nervioso central mediante inyección o infusión. Más preferiblemente, se administra en un ventrículo del cerebro, en particular en el ventrículo lateral. Como alternativa, la composición se administra preferiblemente mediante vías sistémicas, tales como administración subcutánea. Por ejemplo, se ha descubierto que la prolactina, la hormona del crecimiento, IGF-1, PACAP y EPO pueden administrarse con eficacia mediante la administración subcutánea para modular el número de células precursoras neurales en la zona subventricular.

10 Cuando la composición no se administra directamente al cerebro, y las moléculas en la composición no atraviesan con facilidad la barrera hematoencefálica, puede incluirse opcionalmente un permeabilizante de la barrera hematoencefálica para facilitar la entrada en el cerebro. Los permeabilizantes de la barrera hematoencefálica son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, bradiquinina y los agonistas de bradiquinina descritos en las patentes de EEUU n° 5.686.416; 5.506.206; y 5.268.164 (tal como NH₂-arginina-prolina-hidroxi-prolina-glicina-tienilalanina-serina-prolina-4-Me-tirosina.psi.(CH₂NH)-arginina-COOH). Como alternativa, las moléculas pueden conjugarse a anticuerpos del receptor de transferrina según se describe en las patentes de EEUU n° 6.329.508; 6.015.555; 5.833.988; o 5.527.527. Las moléculas también pueden administrarse como una proteína de fusión que comprende la molécula y un ligando que es reactivo con un receptor de células endoteliales capilares cerebrales, tal como el receptor de transferrina (véase, por ejemplo, la patente de EEUU n° 5.977.307).

15 Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse mezclando los agentes terapéuticos deseados con un vehículo apropiado adecuado para la vía prevista de administración. Cuando se prepara la composición farmacéutica de esta invención, los agentes terapéuticos habitualmente se mezclan con un excipiente, son diluidos por un excipiente, o están encerrados dentro de dicho vehículo que puede estar en forma de una cápsula, sobre, papel u otro recipiente. Cuando el excipiente farmacéuticamente aceptable actúa como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido, que actúa como vehículo, portador o medio para el agente terapéutico. Por tanto, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, pastillas, sobres, trociscos, elixires, suspensiones, emulsiones, disoluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), ungüentos que contienen, por ejemplo, hasta 10% en peso de los agentes terapéuticos, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, disoluciones inyectables estériles, y polvos envasados estériles.

20 Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen fluido espinal cerebral artificial, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábica, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua estéril, jarabe, y metilcelulosa. Las formulaciones también pueden incluir agentes lubricantes, tales como talco, estearato de magnesio, y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulgentes y suspensores; agentes conservantes, tales como metil- y propilhidroxibenzoatos; agentes edulcorantes; y agentes aromatizantes. Las composiciones de la invención pueden formularse para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retrasada de los agentes terapéuticos después de la administración al paciente empleando procedimientos conocidos en la técnica.

25 Para preparar composiciones sólidas, tales como comprimidos, el agente terapéutico se mezcla con un excipiente farmacéutico para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención. Cuando se indica que estas composiciones de preformulación son homogéneas, esto significa que los agentes terapéuticos están dispersados uniformemente a través de la composición de modo que la composición puede subdividirse con facilidad en formas de dosificación unitaria igualmente eficaces, tales como comprimidos, píldoras y cápsulas.

30 Los comprimidos o píldoras de la presente invención pueden revestirse o componerse de otra forma para proporcionar una forma de dosificación que tenga la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender un componente de dosificación interna y de dosificación externa, estando este último en forma de una envuelta sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que actúa para resistir a la disgregación en el estómago y permite que el componente interno pase intacto hacia el duodeno o que se retrase su liberación. Puede utilizarse una diversidad de materiales para estos revestimientos o capas entéricas, incluyendo dichos materiales una serie de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico, y acetato de celulosa.

35 Las formas líquidas en las que pueden incorporarse las nuevas composiciones de la presente invención para la administración oral o mediante inyección incluyen disoluciones acuosas, jarabes aromatizados de forma apropiada, suspensiones acuosas u oleosas, y emulsiones aromatizadas con aceites comestibles, tales como aceite de maíz, aceite de semilla 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 orgánicos o acuosos farmacéuticamente aceptables o sus mezclas, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados según se describe en la presente. Las composiciones se administran mediante la vía respiratoria nasal u oral para un efecto local o sistémico. Las composiciones, preferiblemente en disolventes farmacéuticamente aceptables, pueden nebulizarse mediante el uso de gases inertes. Las disoluciones nebulizadas pueden ser inhaladas directamente desde el dispositivo de nebulización, o el dispositivo de nebulización puede fijarse a una mascarilla facial de tipo tienda o a una máquina respiratoria de presión positiva intermitente. Pueden administrarse composiciones en disolución, suspensión o polvo, preferiblemente por vía oral o nasal, a partir de dispositivos que administran la formulación de una manera apropiada.

Otra formulación empleada en los métodos de la presente invención emplea dispositivos de administración transdérmica ("parches"). Estos parches transdérmicos pueden utilizarse para proporcionar una infusión continua o discontinua del agente terapéutico de la presente invención en cantidades controladas. La construcción y el uso de parches transdérmicos para la administración de agentes farmacéuticos es muy conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EEUU nº 5.023.252.. Estos parches pueden construirse para una administración continua, pulsátil o a petición de los agentes farmacéuticos.

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

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar la invención y no deben considerarse de ninguna manera limitante del alcance de la presente invención.

EJEMPLOS

En los siguientes ejemplos, las siguientes abreviaturas tienen los siguientes significados. Las abreviaturas no definidas tienen su significado generalmente aceptado.

TUNEL = marcaje de mella terminal de dUTP mediado por desoxinucleotidiltransferasa terminal

°C = grados Celsius

hr = hora

min = minuto

μM = micromolar

M = molar

ml = mililitro

μl = microlitro

mg = miligramo

μg = microgramo

FBS = suero bovino fetal

PBS = disolución salina tamponada con fosfato

DMEM = medio de Eagle modificado de Dulbecco

MEM = medio de Eagle modificado

EGF = factor del crecimiento epidérmico

CPN = célula precursora neural

SVZ = zona subventricular

PACAP = polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria

AMPC = AMP cíclico

BMP = proteína morfogénica ósea

FCE = fluido cerebroespinal

Materiales y métodos

Ratones hembra expuestos al olor de ratones macho

Ratones (CD1, 10 semanas de edad) fueron expuestos continuamente al olor del género opuesto o del mismo género durante dos semanas. Un componente de interacción social no fue parte de este estudio. En su lugar, los ratones sólo fueron expuestos a los olores del género opuesto. Esto resultó necesario para controlar las confusiones que surgirían si se hiciese de otro modo. Por ejemplo, si los machos se colocasen junto con las hembras, esto permitiría a los animales aparearse. El estudio de Fowley sobre ratones de campo (2002) ha demostrado un aumento en la neurogénesis de ratones de campo hembra embarazadas, y aún más significativamente, el estudio de Shingo *et al.* (2003) demostró que el embarazo y el apareamiento por sí solos pueden producir un aumento en la neurogénesis. Por tanto, si se observase un efecto neurogénico sería imposible concluir que había sido mediado sólo por la exposición al olor.

Con esto en mente, se estableció un protocolo de exposición continua de dos semanas para realizar este estudio, en el que la duración del intervalo de tiempo se eligió para tomar en cuenta la naturaleza variable de la proliferación de células neuronales en diferentes condiciones ambientales. Esto también asegura que un incremento en la proliferación de células progenitoras neuronales no fuese pasado por alto, porque estudios previos del comportamiento han demostrado que los aumentos en las células progenitoras neuronales varían de un periodo de un día a un periodo de dos semanas (Kempermann y Gage, 1999; Fowler *et al.*, 2002).

Brevemente, ratones macho se colocan en una jaula limpia durante dos días. Los ratones macho entonces se retiraron de la jaula con olores masculinos, y los ratones hembra se alojaron en la jaula durante un periodo de tiempo deseado.

Un total de 18 ratones hembra (CD-1, 10 semanas de edad) se escogieron primero para someterse a una exposición continua a olor de ratón macho (CD-1, 10 semanas de edad) o hembra. De los 18, 3 fueron asignados aleatoriamente para ser expuestos durante 2 días a olor masculino. Otros 3 participaron en la exposición al olor masculino durante 7 días, y otros 3 a la condición de exposición al olor masculino durante 14 días. De manera similar, otros 3 fueron asignados aleatoriamente para someterse a 2 días de olor femenino. Otros 3 se eligieron para que participasen en la condición de exposición al olor femenino durante 7 días, y los 3 restantes se colocaron en la condición de exposición al olor femenino durante 14 días.

Así, en la primera etapa, 9 ratones macho se colocaron en jaulas limpias durante 2 días. Después de que los machos dejaran su olor en las jaulas durante dos días, estos se trasladaron a una nueva jaula limpia. Después las hembras se trasladaron a la jaula con el olor masculino durante 2 días para someterse al olor del género opuesto. Para las hembras asignadas a la exposición de 2 días, el intervalo de tiempo se completó, pero las asignadas a las exposiciones de 7 y 14 días tuvieron que repetir la secuencia, fundamentalmente siendo trasladadas a una nueva jaula con el olor de los mismos machos, para completar el intervalo de tiempo.

Para comparar los efectos que la exposición de las hembras al olor del género opuesto en un intervalo de tiempo pueda tener sobre la neurogénesis, el resto de los 9 ratones hembra seleccionados anteriormente también se sometieron al olor continuo de un género, pero del mismo género, con el mismo esquema que el indicado anteriormente.

Cuando llegó la fecha final del intervalo de tiempo de un grupo se administraron inyecciones de BrdU a los ratones para marcar las células proliferantes en la SVZ. Se realizaron posteriores análisis inmunohistoquímicos y se indican a continuación.

Inmunohistoquímica

Para examinar el número de células progenitoras en la SVZ después del tratamiento se utilizaron inyecciones de bromodesoxiuridina (BrdU) para marcar estas células. Los animales recibieron inyecciones de BrdU (120 mg/kg, i.p., disuelta en NaOH al 0,007% en tampón fosfato) cada 2 horas durante un periodo de 10 horas. Cada inyección de BrdU marca sólo a las células proliferantes en la fase S, y el objetivo de tener una serie de inyecciones de BrdU es asegurarse de la disponibilidad continua de BrdU para su incorporación completa (Morshead y van der Kooy, 1992).

Los animales se sacrificaron mediante sobredosis de anestésico y se perfusionaron transcárdialmente con paraformaldehído al 4% en PBS, pH 7,2. Los cerebros se postfijaron en la misma disolución de paraformaldehído durante la noche a 4 °C, y se crioprotegieron durante 24 horas en sacarosa al 20% en PBS. Los cerebros entonces se introdujeron en el compuesto Tissue Tek O.C.T. (Sakura Finetek, Torrance, CA) antes de ser criocortados en secciones a 14 µm.

Los anticuerpos utilizados para la tinción fueron anti-BrdU de rata y anti-DCX de cobaya.

Las secciones se postfijaron con acetona durante 30 segundos a temperatura ambiente y se lavaron con PBS. Para la tinción con BrdU, el tejido se trató con HCl 1 M durante 22 minutos a 60 °C para desnaturalizar el ADN celular. Entonces las secciones se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente en anticuerpo primario (anti-BrdU de

rata, 1:50) diluido en PBS-T al 0,3% que contenía NGS al 10%, se lavó con PBS, y después se incubó con anticuerpos secundarios antirrata de cabra conjugados con biotina (1:200) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de enjuagar con ddH₂O, las secciones se montaron con Fluorosave, debido a que la tinción se visualiza con CY3-estreptavodina, y se visualizaron con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot.

- 5 Para la tinción de DCX, las secciones se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente con anticuerpo primario (anti-DCX de cabra, 1:500) diluido en PBS-T al 0,3% que contiene NGS al 10%, se lavó con PBS, y después se incubó con anticuerpo secundario con biotina anti-cabra de burro durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de enjuagar, se realizó un procedimiento de amplificación lavando los portaobjetos con PBS e incubando con CY3-estreptavodina y Hoechst durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de enjuagar con ddH₂O las secciones se montaron con Fluorosave y se visualizaron con un Zeiss Axiophot.

Cuantificación de los resultados de la inmunohistoquímica

BrdU en la SVZ: Se recogió una serie de una en diez secciones coronales (14 µm) desde la punta rostral del ventrículo lateral hasta el aspecto más caudal de los ventrículos (un total de 10 secciones). Las células BrdU-positivas entonces se contaron en la capa ependimaria-subependimaria definitiva.

- 15 DCX en la esquina dorsolateral de la SVZ: Se realizó una serie de una en diez secciones coronales (14 µm) desde la punta rostral del ventrículo lateral hasta 980 µm caudal de los ventrículos (un total de 10 secciones). Las células DCX-positivas entonces se contaron en la esquina dorsolateral.

Ratones macho expuestos al olor de ratones hembra

- 20 Para determinar si el olor del género opuesto tiene algún efecto sobre los ratones macho se utilizó la misma metodología para exponer continuamente ratones macho al olor de ratones hembra. Se utilizó un intervalo de tiempo idéntico de 2 días, 7 días, y 14 días de exposición al olor de ratones hembra, así como una exposición de 2 días, 7 días, y 14 días de exposición al olor de ratones macho como comparación. Los componentes inmunohistoquímicos y de cuantificación también fueron idénticos al diseño para las hembras.

Cultivo de células precursoras neurales y factores del crecimiento

- 25 La generación y la diferenciación de esferas del cerebro anterior embrionario y de adulto se realizó como se describió previamente con pequeñas modificaciones (Reynolds y Weiss, 1992; Reynolds *et al.*, 1992). Brevemente, se retiraron los complejos estriado-palidales de embriones de ratón en E14 y se introdujeron en PBS que contenía glucosa al 0,6%, penicilina (50 U/ml), y estreptomina (50 U/ml; ambos de Life Technologies, Gaithersburg, MD) y después se trasladaron al medio de cultivo convencional compuesto por DMEM-F12 (1:1), glucosa (al 0,6%), glutamina (2 mM), bicarbonato de sodio (3 mM), tampón HEPES (5 mM), insulina (25 µg/ml), transferrina (100 µg/ml), progesterona (20 nM), putrescina (60 µM), y cloruro de selenio (30 nM) (todos de Sigma, St. Louis, MO, excepto la glutamina que es de Life Technologies). Para los cultivos de células precursoras neurales de adulto, se diseccionaron las porciones mediana y lateral de la capa subependimaria del ventrículo lateral del cerebro de adulto, de ambos hemisferios, se reunieron, después se cortaron en fragmentos de 1 mm², y se trasladaron al medio de cultivo convencional que contenía tripsina 1,33 mg/ml, hialuronidasa 0,67 mg/ml, y ácido quinurénico 0,2 mg/ml (todos del Sigma). Después de 30 min a 37 °C, el tejido se trasladó al medio de cultivo convencional que contenía inhibidor de tripsina 0,7 mg/ml (Roche Diagnostics, Laval, Quebec, Canadá). Los trozos de tejido se disociaron de modo mecánico con micropipetas. Las células se sembraron a diversas densidades en el medio de cultivo convencional, que también contenía EGF (humano recombinante 20 ng/ml; Peprotech, Rocky Hill, NJ). Las células se cultivaron durante 7 días *in vitro* (DIV) y formaron agrupaciones de células flotantes (esferas). Todos los ratones de los experimentos de cultivo se sacrificaron mediante dislocación cervical.

Implantación de las bombas osmóticas e infusión del factor del crecimiento

- 45 Dieciséis ratones CD-1 de 8 semanas (Charles-River, Laval, Quebec, Canadá) se anestesiaron con pentobarbital sodio (120 mg/kg, i.p.) y se implantaron con bombas osmóticas (Alzet 1007D; Alza, Palo Alto, CA). Las cánulas se localizaron en el ventrículo lateral derecho (anteroposterior +0,2 mm, lateral +0,8 mm al bregma, y dorsoventral 2,5 mm por debajo de la dura con el cráneo nivelado entre lambda y bregma). Se disolvió LH (LH humana derivada de la pituitaria 33 µg/ml; the National Hormone and Peptide Program, University of California Los Ángeles, CA, EEUU) en disolución salina al 0,9% que contenía albúmina de suero de ratón 1 mg/ml (Sigma). Cada animal se infundió durante 6 días con vehículo solo o con LH a un caudal de 0,5 µl/hr, dando como resultado una administración de 400 ng/d de LH.

El ensayo TUNEL

Se realizó un marcaje TUNEL utilizando el kit de muerte celular *in situ* de ROCHE (nº de catálogo 1 684 795) según las instrucciones del fabricante para su uso con tejido congelado.

EJEMPLO 1**LOS OLORES DEL GÉNERO OPUESTO ESTIMULAN LA PROLIFERACIÓN**

5 Para determinar el impacto de los olores masculino o femenino, ratones adultos fueron expuestos a los olores del género opuesto durante 2 días, 7 días o 14 días. Un grupo control fue expuesto a los olores del mismo género durante el mismo periodo de tiempo. Los ratones entonces recibieron BrdU para marcar las células proliferantes, y se identificaron las localizaciones de las células BrdU-positivas mediante estudios inmunohistoquímicos. Los ratones hembra o macho también se expusieron a jaulas sin olor control en experimentos paralelos durante 7 días (hembras) o 2 días (machos), y estos animales no se diferenciaban de los animales expuestos a los olores del mismo sexo (los datos no se muestran).

10 Tal como se muestra en la figura 1A, las células proliferantes en la SVZ de ratones hembra permanecieron al mismo nivel después de ser expuestas a olores femeninos durante 2, 7 o 14 días. Sin embargo, en el grupo de hembras expuestas al olor masculino, las células proliferantes en la SVZ cambiaron con el tiempo: aumentaron significativamente después de 7 días y disminuyeron significativamente después de 14 días. Una exposición de 2 días no produjo ningún efecto significativo. Se observó el mismo patrón cuando se utilizó Ki67 para marcar las células proliferantes (figura 1B), lo cual indica que el cambio en las células BrdU-positivas refleja un cambio en el nivel de proliferación, en lugar de una captación preferida de BrdU.

15 Los ratones macho y hembra utilizados en los anteriores experimentos fueron de la misma camada o previamente se habían trasladado juntos. Por tanto, habían sido expuestos a los olores de cada uno antes de realizar los experimentos. Para excluir la posibilidad de que este efecto fuera específico de las crías de la misma camada o de animales que habían sido preexpuestos al olor de interés, se emplearon ratones de diferentes camadas que no habían estado previamente juntos para repetir los experimentos. Se observaron efectos similares tanto si los ratones pertenecían o no a la misma camada (figura 1C), lo cual indica que los efectos del olor masculino no se limitan a camadas concretas ni a la preexposición del olor.

20 Los olores femeninos también afectan a la proliferación en cerebros de ratones macho, pero con un patrón temporal diferente. Cuando los machos se expusieron a los olores femeninos durante 2 días, se produjo un aumento brusco en el número de células BrdU-positivas (figura 2A) o células Ki67-positivas (figura 2B). Sin embargo, después de una exposición de 7 días o de 14 días, el número de nuevas células proliferadas disminuyó hasta el nivel control. Al igual que con los ratones hembra, pueden observarse los efectos de los olores femeninos cuando se emplean diferentes camadas (figura 2C).

25 De manera sorprendente, las células precursoras neurales en el hipocampo también responden a olores específicos de género. De nuevo, la exposición durante dos días a olores masculinos no produjo efectos significativos sobre ratones hembra, pero la exposición durante 7 días produjo un aumento significativo en la proliferación en el hipocampo (figura 3). Después de una exposición durante 14 días, los niveles de células proliferantes eran significativamente menores en hembras expuestas a olores masculinos cuando se comparan con las hembras que estuvieron expuestas a olores femeninos. Por lo que saben los inventores, esta es la primera vez que se ha demostrado que un estímulo distinto a los factores del crecimiento (por ejemplo, EGF más FGF) ejerce los mismos efectos sobre las células precursoras neurales en la SVZ y en el hipocampo.

30 Como control adicional, ratones hembra fueron expuestas a olores de ratones macho castrados durante 7 días. Los resultados demuestran que el número de células marcadas con BrdU en la SVZ o en el hipocampo no aumentó en estas hembras, comparado con las hembras que habían sido expuestas a olores masculinos fingidos. Los olores masculinos fingidos son jaulas con olor de ratones macho que se habían sometido a una cirugía de castración fingida. Las hembras expuestas a los olores de estos machos castrados fingidos mostraron una neurogénesis inducida por feromonas sexuales, pero las hembras expuestas a los olores de los machos castrados no mostraron un aumento en la neurogénesis. De modo similar, ratones macho expuestos a los olores de hembras adrenalectomizadas durante dos días tampoco mostraron un aumento en el número de células marcadas con BrdU en la SVZ o en el hipocampo, comparado con los machos expuestos a olores femeninos fingidos. Se sabe que la castración y la adrenalectomía reducen los niveles de feromonas (Ma *et al.*, 1998; Kiyokawa *et al.*, 2004; Zhang J. *et al.*, 2001). Estos resultados también apoyan la observación de que las feromonas inducen la proliferación de células precursoras neurales en la SVZ y en el hipocampo del género opuesto.

EJEMPLO 2**LOS OLORES DEL GÉNERO OPUESTO ESTIMULAN LA NEUROGÉNESIS PERO NO LA SUPERVIVENCIA CELULAR**

35 La neurogénesis también fue potenciada tras la exposición a los olores del género opuesto. Así, se tiñeron secciones de tejidos del ejemplo 1 para la doblecortina, una proteína citoplásmica expresada en células progenitoras neurales, para determinar el grado de neurogénesis en los ratones descritos anteriormente. Al igual que en el caso de las células proliferantes, los ratones hembra tenían significativamente más células doblecortina-positivas después de una exposición durante 7 días a olores masculinos (figura 4), mientras que los ratones macho tenían

significativamente más células doblecortina-positivas después de una exposición durante 2 días a olores femeninos (figura 5).

5 Para determinar si las feromonas del género opuesto también afectan a la supervivencia de las células neurales se realizó un ensayo TUNEL. Los resultados indican que no puede observarse ninguna diferencia significativa en la SVZ (figura 6A) o en el bulbo olfatorio (figura 6B) de ratones hembra después de una exposición durante 7 días a olores masculinos.

EJEMPLO 3

LOS EFECTOS DE LH *in vivo* E *in vitro*

10 Se sabe que las feromonas masculinas aumentan los niveles de la hormona luteinizante (LH) y disminuyen los niveles de prolactina, mientras que las feromonas femeninas están asociadas con un aumento de prolactina (Dulac *et al.*, 2003). Para intentar investigar el modo en que las feromonas potencian la proliferación de células precursoras neurales y la neurogénesis en el género opuesto, los animales se infundieron con LH según se describe en "Materiales y métodos". En efecto, la LH aumenta la proliferación significativamente en la SVZ de ratones hembra (figuras 7A y 7B) y macho (figura 8).

15 Para confirmar que la LH estimula la proliferación de células precursoras neurales se establecieron cultivos de células precursoras neurales según se describe en "Materiales y métodos". Se disociaron esferas primarias y se cultivaron en presencia de EGF o EGF más LH (30 nM) a densidad limitada para permitir la formación de esferas secundarias. Se contó el número de esferas secundarias y los resultados se indican a continuación:

Células precursoras neurales aisladas a partir de ratones hembra:

| | EGF | EGF + LH |
|------------------|-------|----------|
| Experimento nº 1 | 172,3 | 255,9 |
| Experimento nº 2 | 157,6 | 241,9 |
| Experimento nº 3 | 197,9 | 258,9 |

20

Células precursoras neurales aisladas a partir de ratones macho:

| | EGF | EGF + LH |
|------------------|-------|----------|
| Experimento nº 1 | 144,4 | 168,6 |
| Experimento nº 2 | 225,1 | 275,1 |
| Experimento nº 3 | 168,2 | 195,9 |

25

Así, la LH también es capaz de aumentar la autorrenovación de las células precursoras neurales en cultivo, y es más eficaz sobre las células precursoras neurales aisladas a partir de ratones hembra que las aisladas a partir de ratones macho.

EJEMPLO 4

LOS EFECTOS DE hCG *in vivo* E *in vitro*

30 La hCG tiene la misma actividad que la LH. Cuando se infundieron ratones con una hCG recombinante (coriogonadotropina-alfa; *Ovidrel®/Ovitrelle®1*) o sólo con vehículo según el protocolo descrito en "Materiales y métodos", se descubrió que la hCG aumenta significativamente la proliferación en la SVZ en ratones macho y hembra. Las células proliferantes en el hipocampo también aumentan significativamente en ambos géneros.

La neurogénesis también se evalúa utilizando un marcador de neuronas, doblecortina o NeuN. El número de células doblecortina- o NeuN-positivas en la SVZ o el bulbo olfatorio es significativamente mayor en los ratones infundidos con hCG.

35 Para confirmar que la hCG estimula la proliferación de células precursoras neurales, se establecieron cultivos de células precursoras neurales según se describe en "Materiales y métodos". Se disociaron esferas primarias y se cultivaron en presencia de EGF o EGF más coriogonadotropina-alfa a densidad limitada para permitir la formación de esferas secundarias. Entonces se contó el número de esferas secundarias y los resultados indican que la hCG

aumenta significativamente el número de esferas secundarias tanto si las células precursoras neurales provienen de animales machos como de hembras.

EJEMPLO 5

LOS EFECTOS DE LOS OTROS AGENTES

5 Se incluyó otro agente, la prolactina, en los experimentos descritos en el ejemplo 3 o 4. Por tanto, los ratones se infundieron con:

(1) una combinación de LH y prolactina, o hCG y prolactina;

(2) LH o hCG; o

(3) sólo vehículo (control).

10 Los resultados demuestran que, mientras la LH o la hCG aumentan la proliferación en la SVZ comparado con el grupo control, la adición de prolactina potencia aún más los efectos de la LH o la hCG. De modo similar, cuando se añade la prolactina con LH o hCG en cultivos de células precursoras neurales se potencia la autorrenovación (el número de esferas secundarias a partir de las esferas primarias).

15 De modo similar, se incluye EPO (*NeoRecormon*) con LH o hCG para determinar sus efectos sobre la neurogénesis, y los resultados demuestran que la EPO potencia el número de células doblecortina-positivas frente al nivel que se alcanza sólo con LH o HCG.

20 Aunque los ejemplos descritos anteriormente emplean agentes específicos, debe advertirse que cualquier análogo o variante de LH/hCG, incluyendo los compuestos listados en la tabla 1, pueden utilizarse como LH o hCG. De modo similar, cualquier otro agente que sea capaz de potenciar la neurogénesis y sus análogos/variantes, incluyendo los listados en la tabla 2, pueden utilizarse en el ejemplo 5 en lugar de *NeoRecormon*. La formación de células gliales puede llevarse a cabo utilizando los métodos descritos en la presente y el conocimiento disponible en la técnica.

EJEMPLO 6

ADMINISTRACIÓN INTRAMUSCULAR DE hCG

25 La gonadotropina coriónica humana (hCG) y la hormona luteinizante (LH) son fármacos disponibles en el mercado para un uso humano, comercializados como Pregnyl y Profasi, respectivamente. La máxima dosis segura para cada uno de estos fármacos es de 10.000 unidades USP diarias a través de inyecciones intramusculares. Esto se corresponde con una dosis de aproximadamente 5,0 unidades USP para un ratón de 30 gramos. Para ensayar si esta dosis sería suficiente para inducir la neurogénesis en el cerebro anterior de ratones, los inventores realizaron el siguiente experimento.

30 Ratones CD-1 hembra de seis a ocho semanas recibieron una única inyección intramuscular de 5,0 unidades USP de hCG recombinante (Sigma nº de catálogo C 6322) en un volumen de 0,05 ml (diluido en disolución salina). Ratones control recibieron una única inyección de disolución salina sola. Los ratones entonces recibieron 6 inyecciones de BrdU (120 mg/kg), una cada dos horas, comenzando dos horas después de la inyección de hCG. Los ratones se sacrificaron treinta minutos después de la última inyección de BrdU, se perfusionaron transcardialmente con paraformaldehído al 4%, y el tejido se procesó para ser criocortados en secciones. Los cerebros se cortaron en secciones en serie a 14 micrómetros sobre dos conjuntos de siete portaobjetos cada uno, con 12 secciones en cada portaobjetos. Se contó el número de células BrdU-positivas en la SVZ del cerebro anterior en un portaobjetos para cada uno de los animales control e inyectados con hCG. Los siguientes datos son la media del número de células BrdU+ por sección en los ratones control (sólo disolución salina) e inyectados con hCG, respectivamente.

40 Disolución salina: 163 ± 6 (n = 4)

hCG: 206 ± 13 (n = 4; *p < 0,02; ensayo de la t apareado)

Por tanto, una única inyección de hCG de dosis baja aumenta la proliferación en la SVZ del cerebro anterior en 26%.

EJEMPLO 7

EXPERIMENTOS CON RATONES CON RECEPTORES DE LH INACTIVADOS

45 Para investigar si el receptor de LH media directamente en los efectos de la LH sobre las células precursoras neurales en la SVZ y el hipocampo, los inventores determinaron los niveles de receptores de LH en ambas áreas utilizando análisis inmunohistoquímicos. Los resultados indican que pueden encontrarse receptores de LH en la SVZ y en el hipocampo de ratones macho y hembra, aunque los machos tienen niveles más bajos de receptores de LH comparado con las hembras. Por tanto, la LH probablemente se une directamente a sus receptores en la SVZ y en el hipocampo para activar las funciones biológicas descritas en la presente.

50

Para investigar más a fondo el papel de la LH, se utilizaron ratones con el receptor de LH (LHR) inactivado (“knock-out”, KO) en los experimentos de exposición al olor según se describe en el ejemplo 1. Los ratones han sido descritos previamente en Zhang, F.P. *et al.*, 2001, y Huhtaniemi, *et al.*, 2002. Ratones LHR de tipo salvaje (WT) y KO adultos de ocho a diez semanas se expusieron a los olores del género opuesto durante 2 o 7 días. En el día 2 (machos expuestos al olor femenino) y el día 7 (hembras expuestas al olor masculino) de la exposición, los animales recibieron 6 inyecciones de BrdU (120 mg/kg), una vez cada dos horas. Los ratones entonces se sacrificaron y se perfusionaron transcárdialmente con paraformaldehído al 4%, aproximadamente 30 min después de la última inyección, y el tejido se procesó para ser criocortado en secciones. Los cerebros anteriores de los ratones se criocortaron en serie a 14 micrómetros sobre 7 portaobjetos, con 10 secciones en cada portaobjetos. Entonces un único portaobjetos de cada animal se inmunotizó para BrdU, y se cuantificó el número total de células BrdU-positivas en la SVZ. Los ratones que se expusieron a jaulas sin olor se utilizaron como controles de la línea de base.

Los resultados se muestran en las figuras 9 y 10. Tal como se esperaba, el olor masculino produjo un aumento en la proliferación en la SVZ y en el hipocampo de los ratones de tipo salvaje hembra (+/+) (figuras 9A y 9B). Sin embargo, en los ratones con LHR inactivado (-/-), no se observó aumento en la proliferación en el hipocampo después de la exposición al olor masculino (figura 9B). Estos resultados indican que la señalización del receptor de LH es importante para los efectos de las feromonas masculinas en el hipocampo de ratones hembra. De manera interesante, la falta del receptor de LH no afecta a la proliferación en la SVZ en respuesta a las feromonas masculinas (figura 9A). De manera similar, en ratones macho, la inactivación del receptor de LH no afecta a la proliferación inducida por feromonas femeninas en la SVZ o en el hipocampo (figura 10). Por tanto, aunque la LH es suficiente para inducir la proliferación de células precursoras neurales en la SVZ y en el hipocampo de hembras y machos, existe un factor (o factores) que puede mediar también en las acciones de las feromonas en el SVZ y el hipocampo de machos.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Composición farmacéutica que comprende la gonadotropina coriónica humana (hCG) o una hormona luteinizante (LH) para uso en el tratamiento de una enfermedad o afección neurodegenerativa en un mamífero mediante la potenciación de la neurogénesis, en la que el tratamiento comprende la administración en combinación con eritropoyetina (EPO).
- 2.- La composición de la reivindicación 1 en la que la afección neurodegenerativa es un ictus o una lesión cerebral.
- 3.- La composición de la reivindicación 1 para el uso de la reivindicación 1 mediante la potenciación de la neurogénesis en la zona subventricular o en el hipocampo.
- 4.- La composición de la reivindicación 1 para el uso de la reivindicación 1, en la que el mamífero es un adulto.
- 10 5.- La composición de la reivindicación 1 para el uso de la reivindicación 1 para la administración sistémica.
- 6.- La composición de la reivindicación 1 para el uso de la reivindicación 1 para la administración al cerebro del mamífero.
- 15 7.- Uso de una gonadotropina coriónica humana (hCG) u hormona luteinizante (LH) para la preparación de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad o una afección neurodegenerativa en un mamífero mediante el aumento de las células madre madre neurales en el mamífero o mediante la potenciación de la neurogénesis, en el que la composición farmacéutica es para la administración en combinación con eritropoyetina (EPO).
- 8.- Un método para potenciar la neurogénesis *in vitro*, que comprende poner en contacto al menos una célula madre neural con una cantidad efectiva de una gonadotropina coriónica humana (hCG) o una hormona luteinizante (LH) y eritropoyetina (EPO).
- 20 9.- El método de la reivindicación 8 en el que la célula madre neural se deriva de un mamífero adulto.
- 10.- El método de la reivindicación 8 en el que la célula madre neural se deriva de la zona subventricular o del hipocampo de un mamífero.

Intervalo de tiempo F-F/F-M

| | | | | | |
|------|------|------|------|------|------|
| 2358 | 2870 | 1957 | 2100 | 2316 | 2234 |
| 2682 | 3110 | 1549 | 2807 | 2513 | 2572 |
| 2705 | | 1923 | 2245 | 2476 | 2468 |

| | | | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 2D F-M | 2D F-F | 7D F-M | 7D F-F | 14D F-M | 14D F-F |
| 2641,667 | 2384 | 2990 | 2435 | 1809,667 | 2424,667 |
| 257,8989 | 169,7056 | 226,3832 | 373,4341 | 104,7043 | 173,1165 |
| 148,8985 | 120 | 130,7024 | 215,6023 | 60,45108 | 99,94888 |

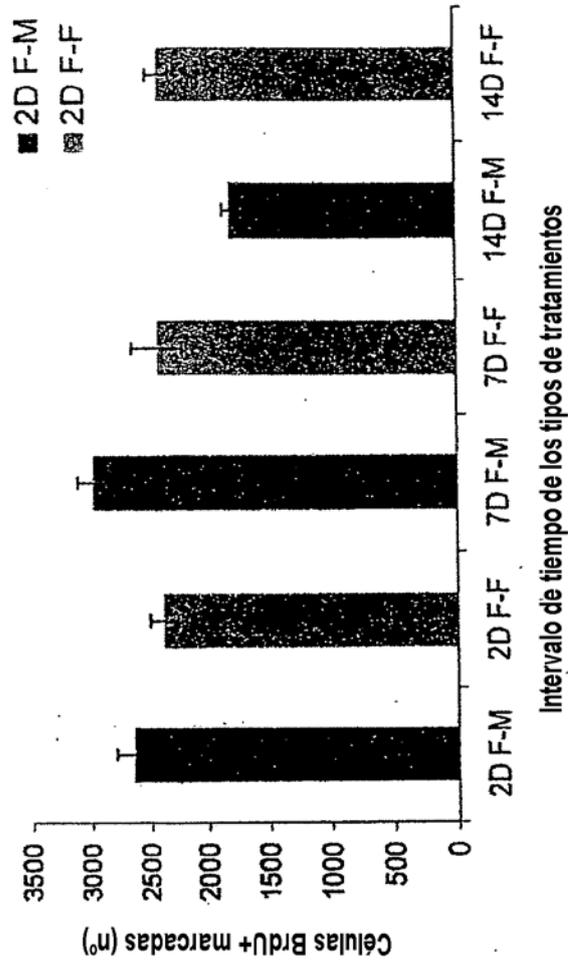


Figura 1A

| 2D F-M | 2D F-F | 7D F-M | 7D F-F | 14D F-M | 14D F-F |
|--------|--------|--------|--------|---------|---------|
| 2017 | 2087 | 2978 | 2129 | 1327 | 2062 |
| 1875 | 1943 | 2962 | 2261 | 1422 | 2100 |
| 1972 | 2273 | | 2197 | 1243 | 2208 |

| 2D F-M | 2D F-F | 7D F-M | 7D F-F | 14D F-M | 14D F-F |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1988 | 2101 | 2970 | 2195,667 | 1330,667 | 2123,333 |
| 25,15949 | 165,4449 | 11,31371 | 66,0101 | 89,55631 | 75,74519 |
| 14,52584 | 95,51963 | 8 | 38,11095 | 51,70536 | 43,7315 |

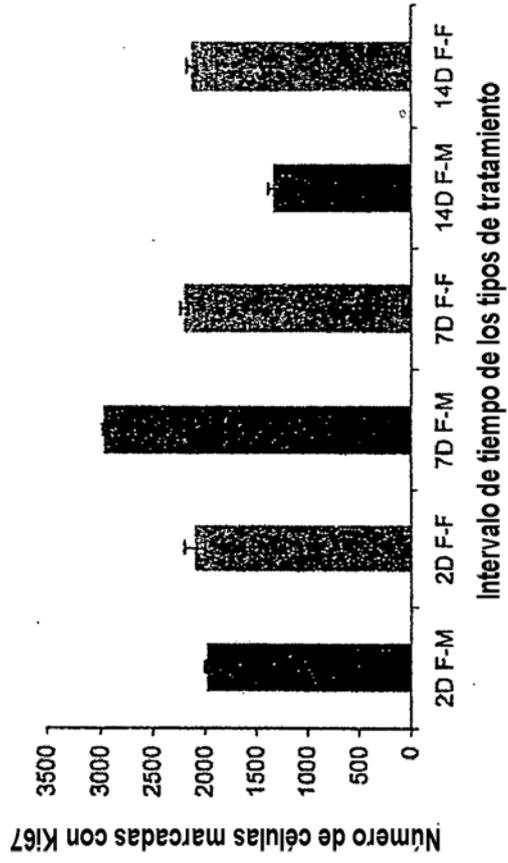


Figura 1B

| 2D Misma camada | 2D Distinta camada | 7D Misma camada | 7D Distinta camada |
|-----------------|--------------------|-----------------|--------------------|
| 2227 | 2355 | 2097 | 2054 |
| 2221 | 2171 | 2276 | 2213 |
| 2278 | 2219 | 2334 | 2001 |

| 2D Misma camada | 2D Distinta camada | 7D Misma camada | 7D Distinta camada |
|-----------------|--------------------|-----------------|--------------------|
| 2242 | 2248,333333 | 2235,666667 | 2089,333333 |
| 31,32091953 | 95,44282756 | 123,5408165 | 110,328298 |
| 18,08314132 | 55,10394219 | 71,32632364 | 63,69807253 |

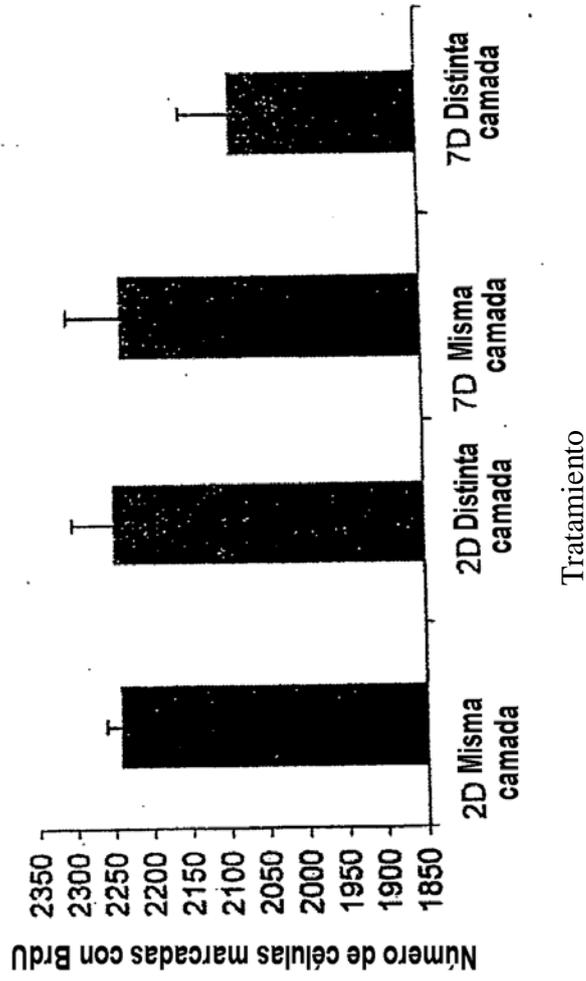
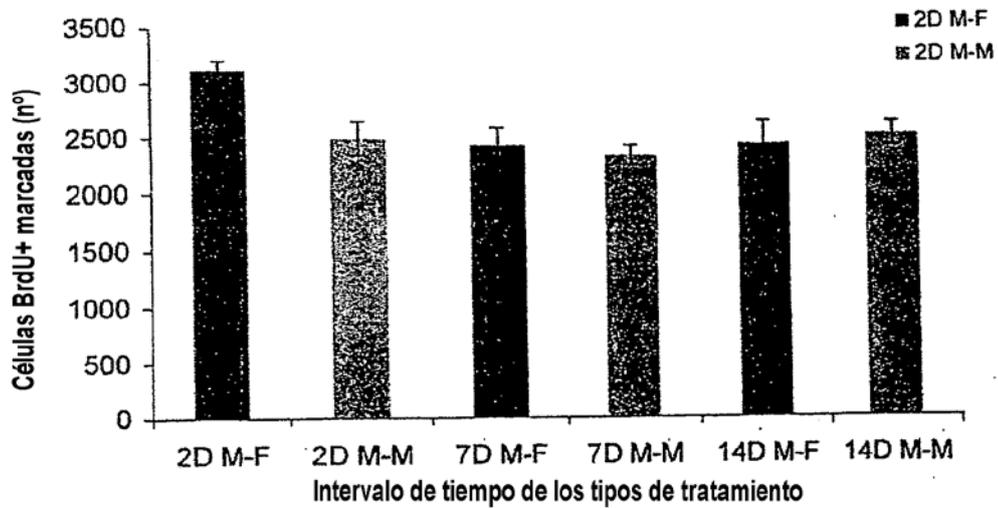


Figura 1C

Intervalo de tiempo M-M/M-F

| | | | | | |
|------|------|------|------|------|------|
| 3039 | 2148 | 2117 | 2450 | 1929 | 2300 |
| 3280 | 2436 | 2536 | 2644 | 2586 | 2574 |
| 3023 | 2672 | 2610 | 2353 | 2445 | 2650 |

| | | | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 2D M-F | 2D M-M | 7D M-F | 7D M-M | 14D M-F | 14D M-M |
| 3114 | 2482,333 | 2418,667 | 2320 | 2421 | 2508 |
| 143,9826 | 262,4297 | 265,859 | 148,1699 | 345,8771 | 184,0978 |
| 83,12841 | 151,5138 | 153,4938 | 85,54596 | 199,6923 | 106,2889 |



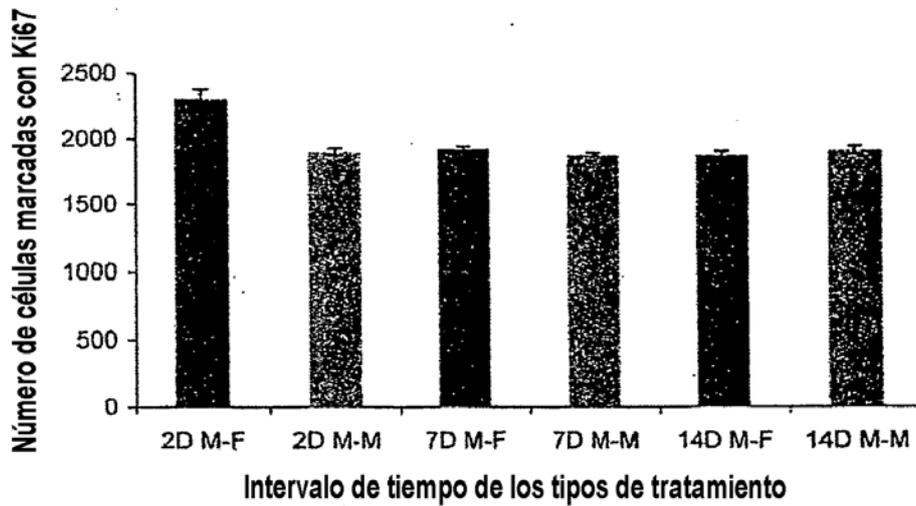
Ensayo de la t: Dos muestras suponiendo distintas varianzas

| | Variable 1 | Variable 2 |
|-----------------|------------|------------|
| Media | 3114 | 2418,667 |
| Varianza | 20731 | 68869,33 |
| Observaciones | 3 | 3 |
| Hipótesis | 0 | |
| df | 3 | |
| Estad. t | 4,023452 | |
| P(T<=t) una-c | 0,013791 | |
| t Crítico una-c | 2,353363 | |
| P(T<=t) dos-c | 0,027583 | |
| t Crítico dos-c | 3,182449 | |

Figura 2A

| | | | | | |
|--------|--------|--------|--------|---------|---------|
| 2D M-F | 2D M-M | 7D M-F | 7D M-M | 14D M-F | 14D M-M |
| 2398 | 1931 | 1950 | 1862 | 1886 | 1958 |
| 2349 | 1842 | 1900 | 1897 | 1899 | 1896 |
| 2170 | 1910 | 1904 | 1850 | 1809 | 1842 |

| | | | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 2D M-F | 2D M-M | 7D M-F | 7D M-M | 14D M-F | 14D M-M |
| 2305,667 | 1894,333 | 1918 | 1869,667 | 1864,667 | 1898,667 |
| 120,0181 | 46,5224 | 27,78489 | 24,41994 | 48,64497 | 58,04596 |
| 69,29246 | 26,85972 | 16,04161 | 14,09886 | 28,08519 | 33,51285 |



Ensayo de la t: Dos muestras suponiendo las mismas varianzas

| | Variable 1 | Variable 2 |
|-----------------|------------|------------|
| Media | 2305,667 | 1894,333 |
| Varianza | 14404,33 | 2164,333 |
| Observaciones | 3 | 3 |
| Hipótesis | 0 | |
| df | 3 | |
| Estad. t | 5,534912 | |
| P(T<=t) una-c | 0,005812 | |
| t Crítico una-c | 2,353363 | |
| P(T<=t) dos-c | 0,011623 | |
| t Crítico dos-c | 3,182449 | |

Figura 2B

| 2D Misma camada | 2D Distinta camada |
|-----------------|--------------------|
| 2120 | 1973 |
| 2274 | 2202 |
| 1965 | 2280 |

| 2D Misma camada | 2D Distinta camada |
|-----------------|--------------------|
| 2119,666667 | 2151,666667 |
| 154,5002697 | 159,5692117 |
| 89,20077229 | 92,12732735 |

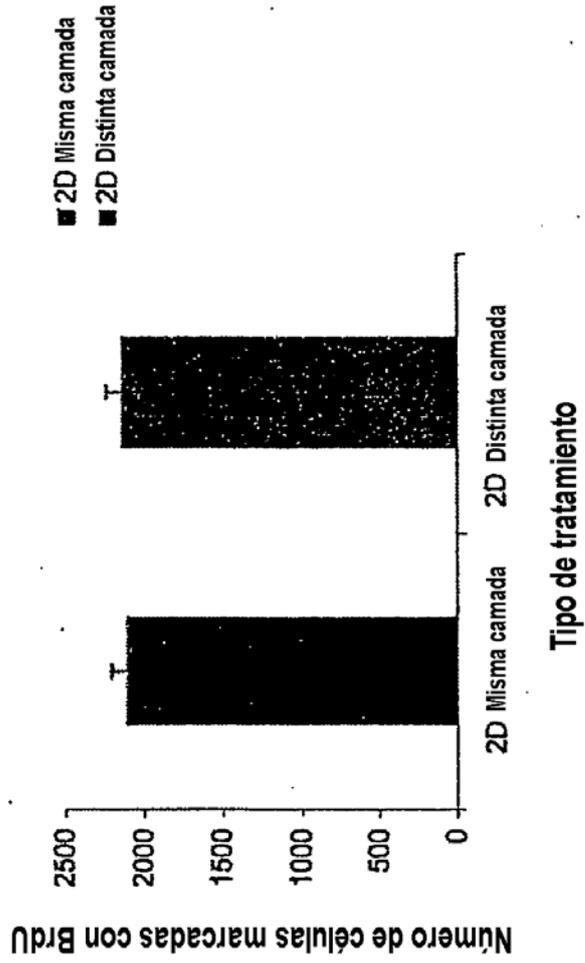


Figura 2C

| 2D F-M | 2D F-F | 7D F-M | 7D F-F | 14D F-M | 14D F-F |
|--------|--------|--------|--------|---------|---------|
| 108 | 146 | 150 | 94 | 197 | 334 |
| 134 | 112 | 181 | 140 | 228 | 390 |
| 107 | 152 | 189 | 120 | 206 | 480 |

| 2D F-M | 2D F-F | 7D F-M | 7D F-F | 14D F-M | 14D F-F |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 116,3333 | 136,6667 | 173,3333 | 118 | 210,3333 | 401,3333 |
| 15,30795 | 21,57159 | 20,59935 | 23,06513 | 15,94783 | 73,65686 |
| 8,838049 | 12,45436 | 11,89304 | 13,31666 | 9,207485 | 42,52581 |

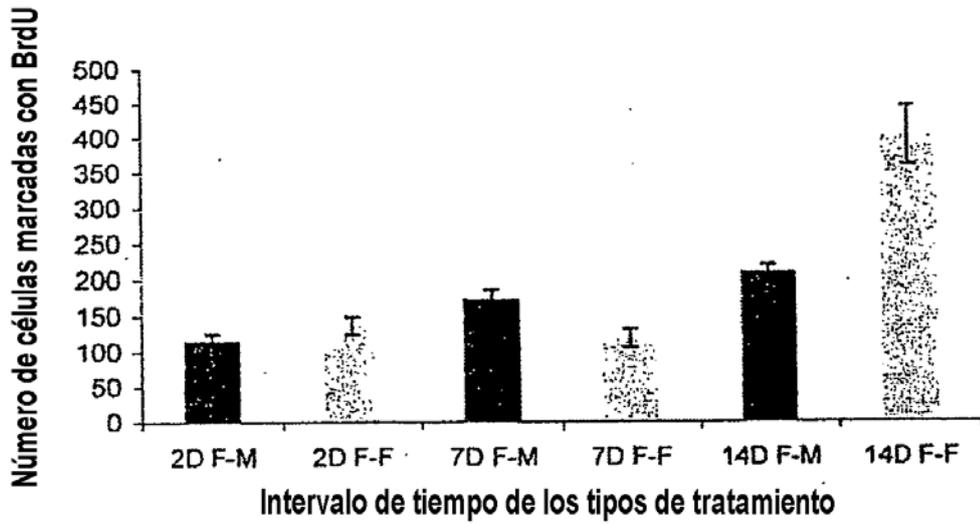


Figura 3

| 2D F-M | 2D F-F | 7D F-M | 7D F-F | 14D F-M | 14D F-F |
|--------|--------|--------|--------|---------|---------|
| 612 | 361 | 806 | 496 | 522 | 584 |
| 554 | 493 | 874 | 695 | 669 | 450 |
| 476 | 553 | | 533 | 543 | 494 |

| 2D F-M | 2D F-F | 7D F-M | 7D F-F | 14D F-M | 14D F-F |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 547,3333 | 469 | 890 | 574,6667 | 578 | 509,3333 |
| 68,24466 | 98,22423 | 22,62742 | 105,8411 | 79,50472 | 68,30325 |
| 39,40107 | 56,70879 | 16 | 61,10737 | 45,90207 | 39,4349 |

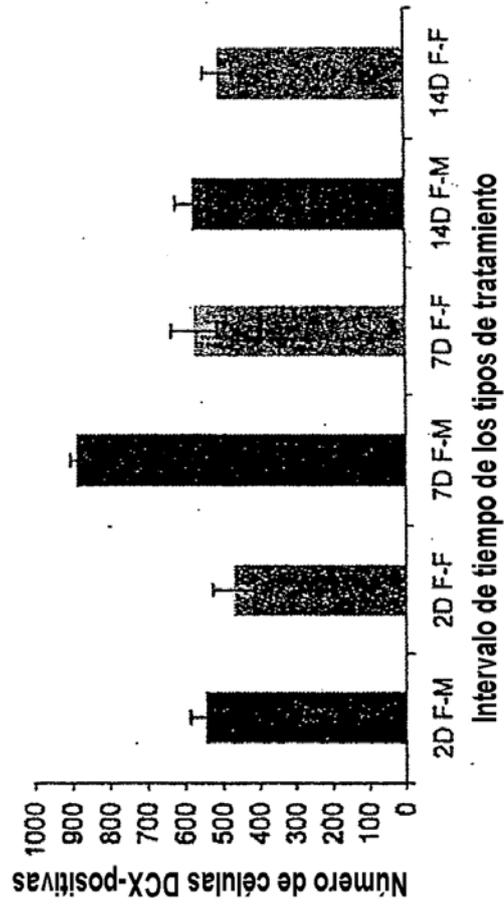
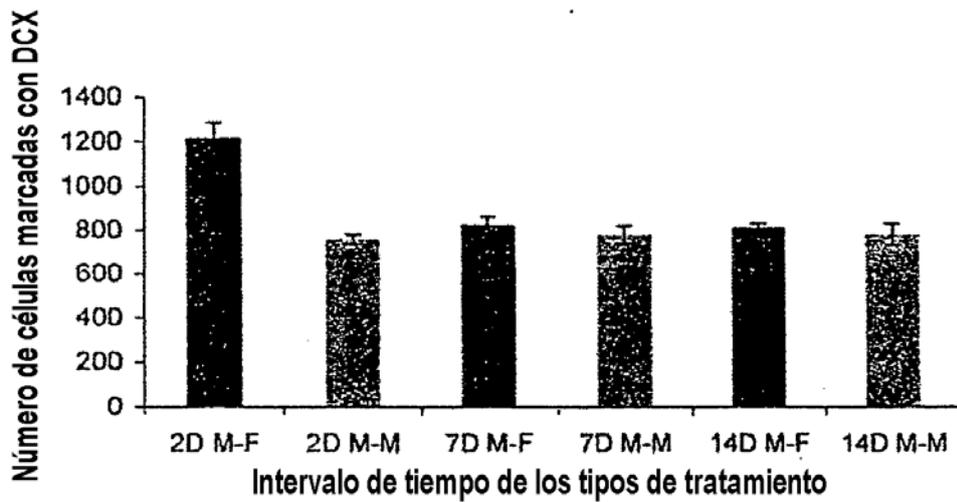


Figura 4

| | | | | | |
|--------|--------|--------|--------|---------|---------|
| 2D M-F | 2D M-M | 7D M-F | 7D M-M | 14D M-F | 14D M-M |
| 1293 | 737 | 890 | 790 | 782 | 738 |
| 1270 | 800 | 812 | 838 | 828 | 876 |
| 1099 | 734 | 778 | 700 | 830 | 720 |

| | | | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 2D M-F | 2D M-M | 7D M-F | 7D M-M | 14D M-F | 14D M-M |
| 1220,667 | 757 | 826,6667 | 776 | 813,3333 | 778 |
| 105,9921 | 37,26929 | 57,42241 | 70,05712 | 27,15388 | 85,34635 |
| 61,19459 | 21,51743 | 33,15284 | 40,4475 | 15,6773 | 49,27474 |

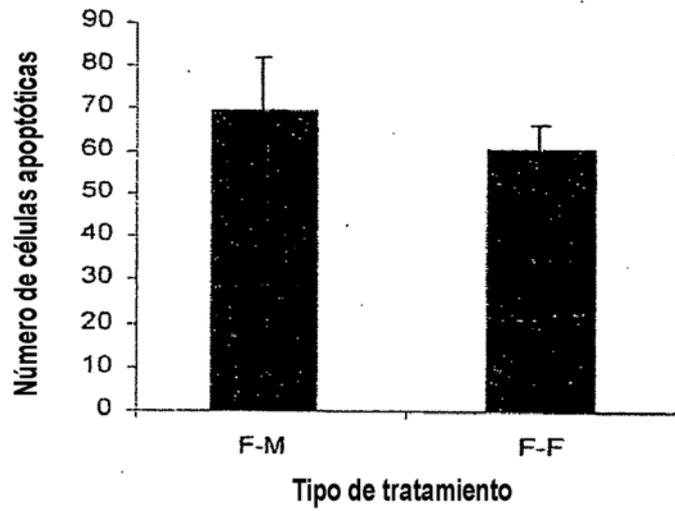


Ensayo de la t: Dos variables asumiendo diferentes varianzas

| | Variable 1 | Variable 2 |
|-----------------|------------|------------|
| Media | 1220,667 | 757 |
| Varianza | 11234,33 | 1389 |
| Observaciones | 3 | 3 |
| Hipótesis | 0 | |
| df | 2 | |
| Estad. t | 7,147917 | |
| P(T<=t) una-c | 0,009508 | |
| t Crítico una-c | 2,919987 | |
| P(T<=t) dos-c | 0,019016 | |
| t Crítico dos-c | 4,302656 | |

Figura 5

A. TUNEL SVZ hembras 7-días



B. TUNEL BO-búsqueda hembras

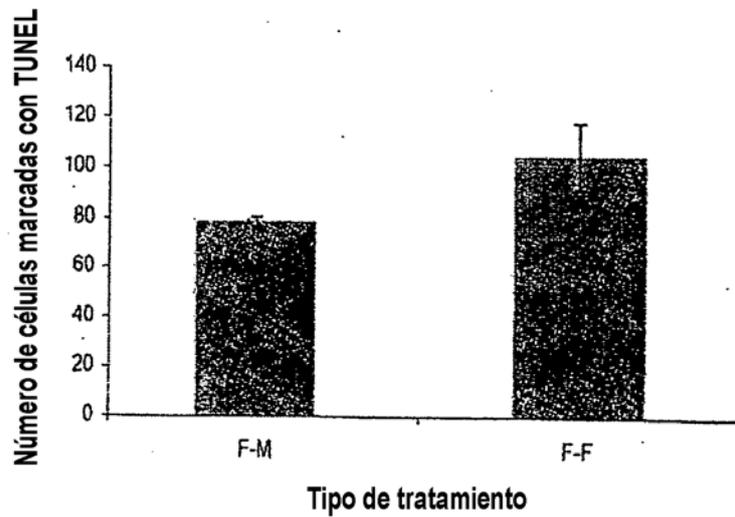
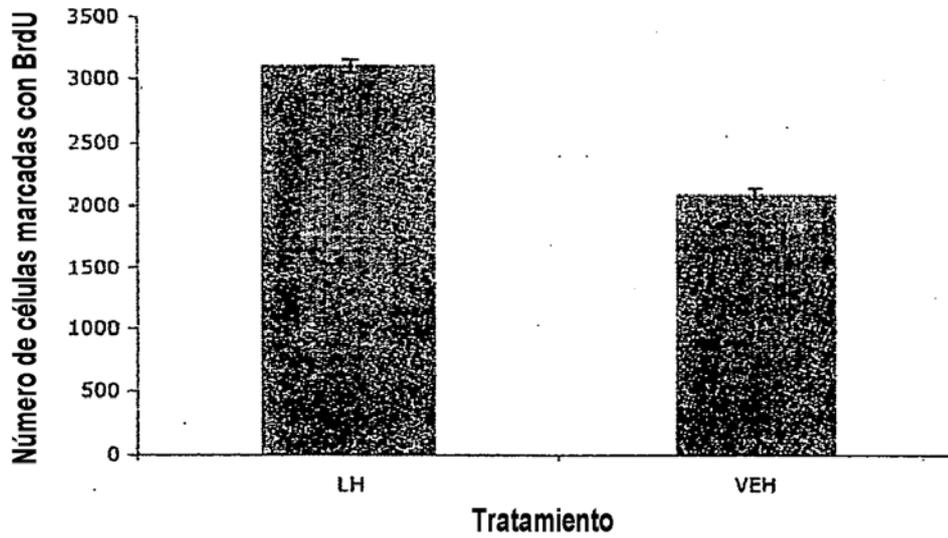


Figura 6

SVZ ICV Hembras 2-días

| LH | VEH |
|------|------|
| 3239 | 1999 |
| 3174 | 2089 |
| 3045 | 2087 |
| 2972 | 2203 |

| LH | VEH |
|------------|------------|
| 3107,5 | 2094,5 |
| 121,079863 | 83,6241592 |
| 60,5399317 | 41,8120796 |



Ensayo de la t: Dos muestras suponiendo diferentes varianzas

| | <i>Variable 1</i> | <i>Variable 2</i> |
|---------------------|-------------------|-------------------|
| Media | 3107,5 | 2094,5 |
| Varianza | 14660,3333 | 6993 |
| Observaciones | 4 | 4 |
| Hipótesis | 0 | |
| df | 5 | |
| Estad. t | 13,7681966 | |
| P(T<=t) una-cola | 1,8141E-05 | |
| t Crítico una-cola | 2,01504918 | |
| P(T<=t) dos-colas | 3,6281E-05 | |
| t Crítico dos-colas | 2,57057764 | |

Figura 7A

SVZ ICV Hembras LH/VEH 6-días

| LH | VEH |
|------|------|
| 3612 | 2458 |
| 3150 | 2150 |
| 3033 | 2299 |
| 2805 | 2332 |

| LH | VEH |
|-------------|-------------|
| 3150 | 2309,75 |
| 339,6851483 | 126,634316 |
| 169,8425742 | 63,31715802 |

Ensayo de la t: Dos variables suponiendo diferentes varianzas

| | Variable 1 | Variable 2 |
|---------------------|-------------|------------|
| Media | 3150 | 2309,75 |
| Varianza | 115386 | 16036,25 |
| Observaciones | 4 | 4 |
| Hipótesis | 0 | |
| df | 4 | |
| Estad. t | 4,635579864 | |
| P(T<=t) una-cola | 0,004883141 | |
| t Crítico una-cola | 2,131846486 | |
| P(T<=t) dos-colas | 0,009766282 | |
| t Crítico dos-colas | 2,776450856 | |

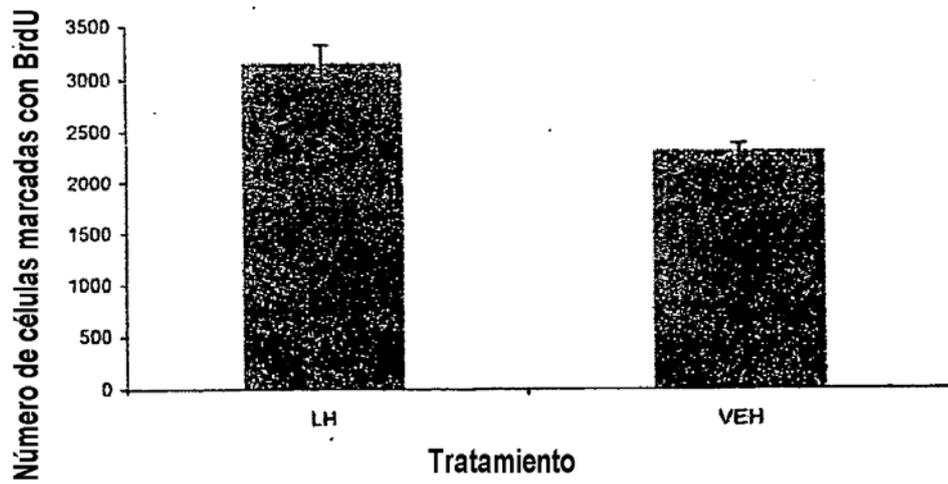


Figura 7B

ICV VEH/LH Machos 2-días

| LH | VEH |
|------|------|
| 3335 | 2073 |
| 2594 | 1997 |
| 2845 | |

| LH | VEH |
|----------|----------|
| 2924,667 | 2035 |
| 376,8691 | 53,74012 |
| 217,5855 | 38 |

Ensayo de la t: Dos variables suponiendo diferentes varianzas

| | <i>Variable 1</i> | <i>Variable 2</i> |
|-----------------|-------------------|-------------------|
| Media | 2924,667 | 2035 |
| Varianza | 142030,3 | 2888 |
| Observaciones | 3 | 2 |
| Hipótesis | 0 | |
| df | 2 | |
| Estad. t | 4,02785 | |
| P(T<=t) una-c | 0,028234 | |
| t Crítica una-c | 2,919987 | |
| P(T<=t) dos-c | 0,056468 | |
| t Crítica dos-c | 4,302656 | |

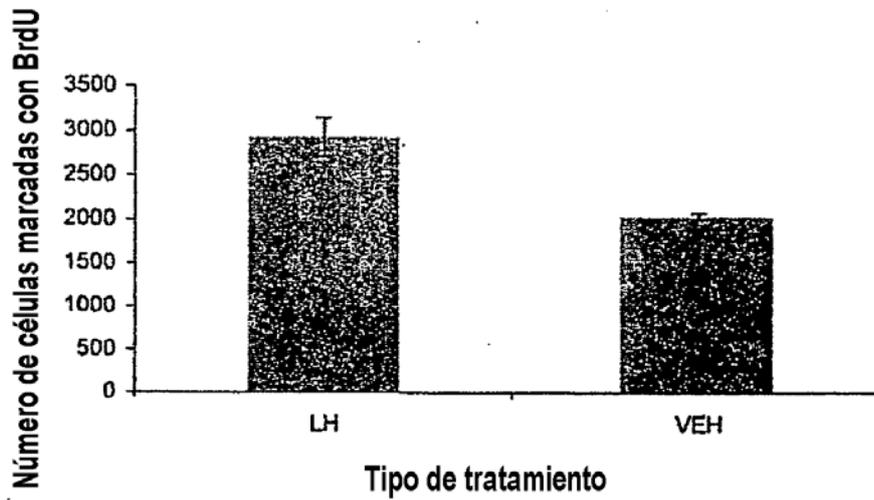
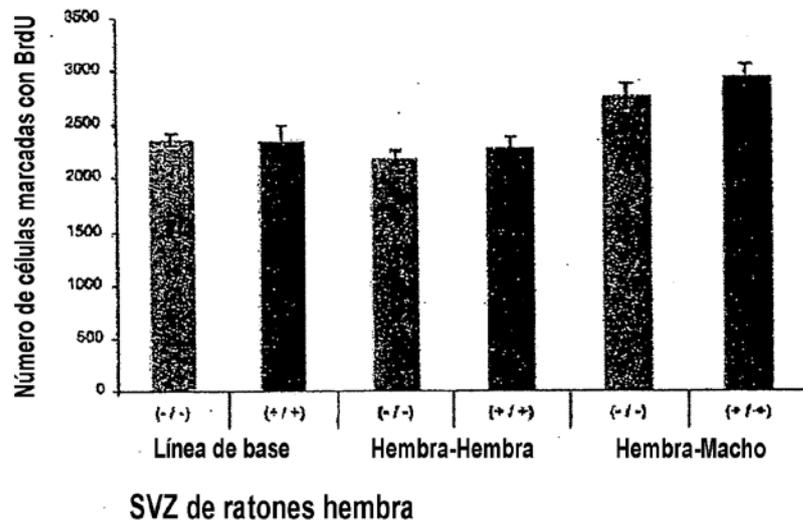


Figura 8

A.



B.

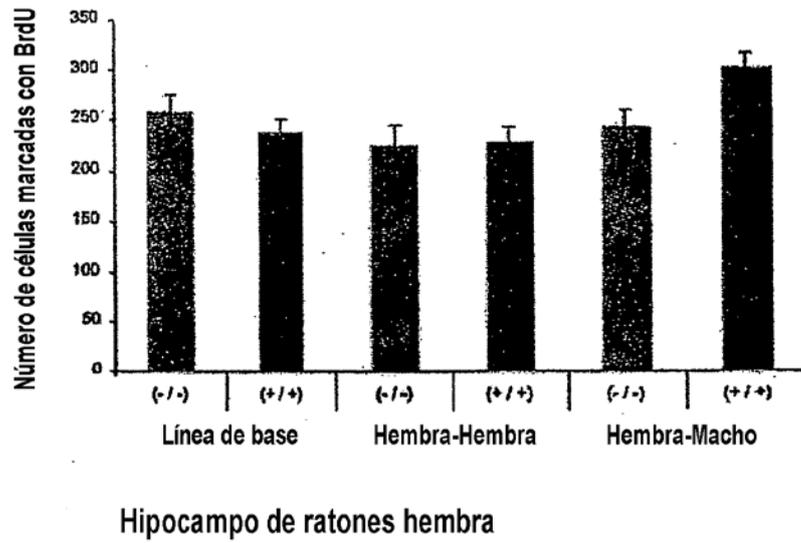
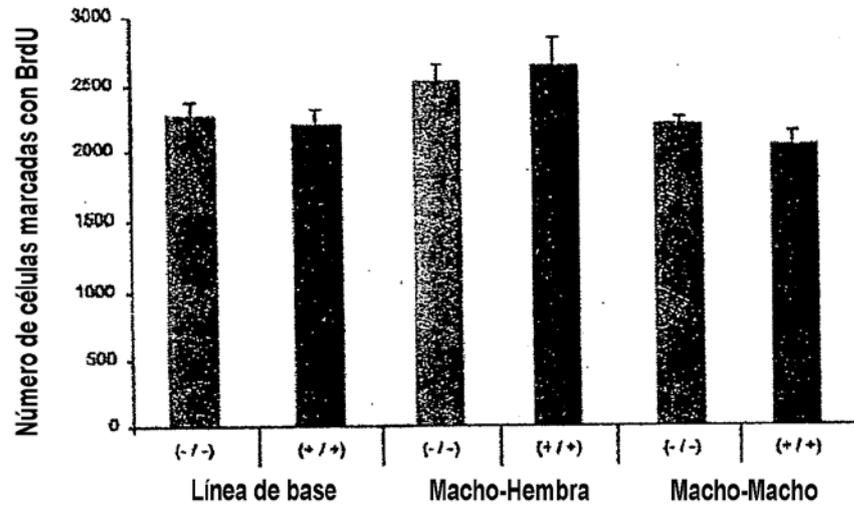


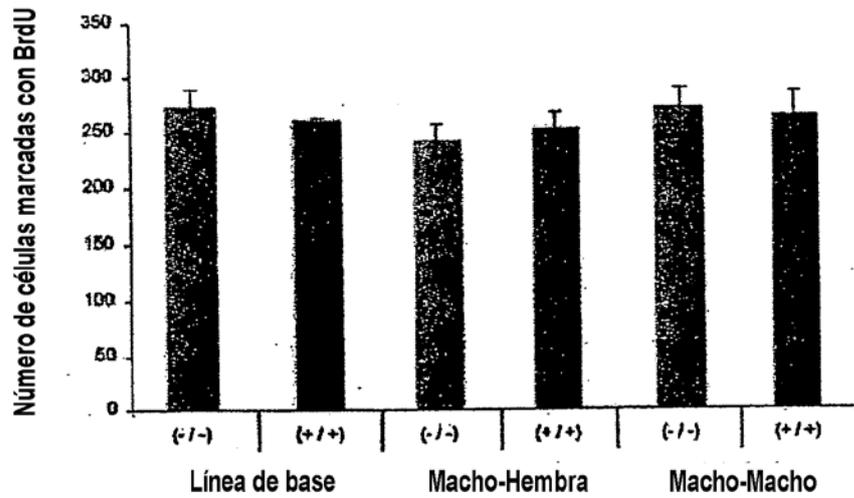
Figura 9

A.



SVZ de ratones macho

B.



Hipocampo de ratones macho

Figura 10

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.

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • US 54491504 P [0001]
- US 20020098178 A [0003]
- US 5023252 A [0004] [0161]
- US 5128242 A [0005] [0110] [0145]
- 15 • US 5198542 A [0006] [0110] [0145]
- US 5208320 A [0007] [0110] [0145]
- US 5268164 A [0008] [0083] [0154]
- US 5326860 A [0009] [0110] [0145]
- 20 • US 5506107 A [0010] [0107] [0113] [0149]
- US 5506206 A [0011] [0083] [0154]
- US 5527527 A [0012]
- US 5547935 A [0013] [0108] [0144]
- US 5614184 A [0014] [0112] [0146]
- 25 • US 5623050 A [0015] [0110] [0145]
- US 5686416 A [0016] [0083] [0154]
- US 5723115 A [0017] [0109] [0113] [0149]
- US 5750376 A [0018] [0071] [0099]
- 30 • US 5773569 A [0019] [0113] [0148]
- US 5801147 A [0020] [0110] [0145]
- US 5833988 A [0021]
- US 5837460 A [0022] [0107] [0113] [0149]
- US 5851832 A [0023] [0071]
- US 5885574 A [0024] [0113] [0148]
- US 5977307 A [0025] [0083] [0154]
- US 5980885 A [0026] [0071]
- US 6015555 A [0027]
- US 6048971 A [0028] [0112] [0146]
- US 6191106 B [0029] [0108] [0144]
- US 6242563 B [0030] [0110] [0145]
- US 6329508 B [0031] [0083] [0154]
- US 6333031 B [0032] [0107] [0109] [0113] [0149]
- US 6413952 B [0033] [0107] [0113] [0149]
- WO 9640231 A [0034] [0113] [0148]
- WO 9748729 A [0035] [0113] [0148]
- US 6015555 B [0083] [0154]
- US 5833988 B [0083] [0154]
- US 5527527 B [0083] [0154]
- US 20020098178 A1 [0108] [0144]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- 35 • **Brown, J. et al.** Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci.*, 2003, vol. 17 (10), 2042-6 [0036]
- **Dulac, C. ; Torello, A.T.** Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Nature Reviews*, 2003, vol. 4, 551-562 [0037]
- 40 • **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 [0038]
- **Fowler, C.D. et al.** The effects of social environment on adult neurogenesis in the female prairie vole. *J. Neurobiology*, 2002, vol. 51 (2), 115-128 [0039]
- 45 • **Frisen J. et al.** Central nervous system stem cells in the embryo and adult. *Cell Mol Life Sci.*, 1998, vol. 54 (9), 935-45 [0040]
- **Gage, F.H.** Mammalian neural stem cells. *Science*, 2000, vol. 287, 1433-1438 [0041]
- **Huhtaniemi, I. et al.** Transgenic and knockout mouse models for the study of luteinizing hormone and luteinizing hormone receptor function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2002, vol. 187, 49-56 [0042]
- **Johnson, D.L. et al.** Erythropoietin mimetic peptides and the future. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2000, vol. 15 (9), 1274-1277 [0043]
- **Kaushansky, K.** Hematopoietic growth factor mimetics. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2001, vol. 938, 131-138 [0044]
- **Kempermann, G. ; Gage, F.H.** Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal. *Hippocampus*, 1999, vol. 9 (3), 321-32 [0045]
- **Kiyokawa, Y. et al.** Modulatory role of testosterone in alarm pheromone release by male rats. *Hormones and Behavior*, 2004, vol. 45, 122-127 [0046]
- **Luskin M.B.** Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron*, 1993, vol. 11 (1), 173-89 [0047]
- **Ma, W. et al.** Role of the Adrenal Gland and Adrenal-Mediated Chemosignals in Suppression of Estrus in the House Mouse: The Lee-Boot Effect Revisited. *Biology of Reproduction*, 1998, vol. 59, 1317-1320 [0048]
- **Menezes, J.R.L. et al.** The division of neuronal progenitor cells during migration in the neonatal mammalian forebrain. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 1995, vol. 6, 496-508 [0049]

- **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 [0050]
- 5 • **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 [0051]
- **Morrison, S.J. et al.** Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*, 1997, vol. 88, 287-298 [0052]
- **Morshead, C.M. ; van der Kooy, D.** Postmitotic death is the fate of constitutively proliferating cells in the subependymal layer of the adult mouse brain. *Neurosci.*, 1992, vol. 2 (1), 249-56 [0053]
- 10 • **Nilsson, M. et al.** Enriched environment increased neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *Journal of Neurobiology*, 1999, vol. 39 (4), 569-578 [0054]
- **Peretto, P. et al.** The subependymal layer in rodents: A site of structural plasticity and cell migration in the adult mammalian brain. *Brain Research Bulletin*, 1999, vol. 49 (4), 221-243 [0055]
- 15 • **Rao, M.S.** Multipotent and restricted precursors in the central nervous system. *The Anatomical Record (New Anat.)*, 1999, vol. 257, 137-148 [0056]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mace Publishing Company, 1985 [0057]
- **Reynolds, B.A. ; Weiss, S.** Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 1992, vol. 255 (5052), 1707-10 [0058]
- **Reynolds, J.N. et al.** Ethanol modulation of GABA receptor-activated Cl-currents in neurons of the chick, rat and mouse central nervous system. *Eur J Pharmacol.*, 1992, vol. 224 (2-3), 173-81 [0059]
- **Rochefort, C. et al.** Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *The Journal of Neuroscience*, 2002, vol. 22 (7), 2679-2689 [0060]
- **Rodriguez-Pena A.** Oligodendrocyte development and thyroid hormone. *J Neurobiol.*, 1999, vol. 40 (4), 497-512 [0061]
- **Shingo, T. et al.** Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science*, 2003, vol. 299, 117-120 [0062]
- **Tanapat P et al.** Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci.*, 1999, vol. 19 (14), 5792-801 [0063]
- **Weiss, S. et al.** Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain?. *Trends Neuroscience*, 1996, vol. 19, 387-393 [0064]
- **Wrighton, N.C. et al.** Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. *Science*, 1996, vol. 273 (5274), 458-464 [0065]
- **Zhang, F.P. et al.** Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol Endocrinol.*, 2001, vol. 15 (1), 172-83 [0066]
- **Zhang, J. et al.** Scent, social status, and reproductive condition in rat-like hamsters (*Cricetulus triton*). *Physiology & Behavior*, 2001, vol. 74, 415-420 [0067]