



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 313 895**

51 Int. Cl.:
A61K 31/132 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00939866 .0**
96 Fecha de presentación : **14.06.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1233670**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.08.2002**

54 Título: **Donadores de óxido nítrico para inducir neurogénesis.**

30 Prioridad: **14.06.1999 US 138971 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2009

73 Titular/es: **HENRY FORD HEALTH SYSTEM**
1 Ford Place, 4B
Detroit, Michigan 48202-3450, US

72 Inventor/es: **Chopp, Michael y**
Zhang, Rui, Lan

74 Agente: **Arpe Fernández, Manuel**

ES 2 313 895 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

Donadores de óxido nítrico para inducir neurogénesis.

5 Campo técnico

La presente solicitud se refiere a un método y a un compuesto para promover neurogénesis y para coadyuvar a la recuperación con posterioridad a lesiones neurales y neuro-degeneración. Más concretamente, la presente invención se refiere a un método y a un compuesto para promover neurogénesis y plasticidad en el sistema nervioso.

10

Antecedentes de la invención

Se produce un accidente cerebro-vascular cuando se infarta una sección del cerebro, lo que conlleva la muerte del tejido cerebral debida a la interrupción del aporte de sangre al cerebro. Los infartos cerebrales asociados a accidentes cerebro-vasculares agudos provocan una discapacidad neurológica repentina y dramática. El accidente cerebro-vascular es la tercera causa más frecuente de fallecimiento entre la población adulta de los Estados Unidos, y es una de las principales causas de incapacidad.

15

Las intervenciones farmacológicas han tratado de aumentar al máximo el flujo de sangre en las zonas del cerebro afectadas por el accidente cerebro-vascular, las cuales pueden llegar a sobrevivir, pero su eficacia clínica ha demostrado ser difícil de conseguir. Como se indica en la obra de Harrison *Principles of Internal Medicine* (99ª Ed., 1980, p. 1926), “a pesar de las pruebas experimentales de que... [los vasodilatadores cerebrales] aumentan el flujo sanguíneo en el cerebro, medido a través del método del óxido nítrico, no han demostrado ser beneficiosos en estudios detallados de casos de accidente cerebro-vascular en humanos, durante las fases de ataques isquémicos transitorios, trombosis en fase evolutiva, o en el caso de un accidente cerebro-vascular demostrado. Esto es cierto en el caso del ácido nicotínico, la Prisolina, el alcohol, la papaverina y la inhalación de anhídrido carbónico al 5%... En contra de la utilización de estos métodos se sugiere que los vasodilatadores resultan más dañinos que beneficiosos, debido a que al reducir la presión sanguínea sistémica reducen el flujo anastomótico intracraneal, o al dilatar los vasos sanguíneos en las áreas normales del cerebro sustraen sangre del infarto”.

20

25

30

Por lo tanto, sería muy útil desarrollar un compuesto y un método para reducir los efectos del accidente cerebro-vascular, permitiendo que se produzca neurogénesis.

35

Resumen de la invención

De acuerdo con la presente invención, se facilita un método que favorece la neurogénesis mediante la administración de una cantidad terapéutica de un donador de óxido nítrico a un paciente que precise promover neurogénesis. La neurogénesis también se promueve en las zonas no lesionadas del cerebro. También se facilita un compuesto para inducir neurogénesis, que incluye una cantidad efectiva de un donador de óxido nítrico que sea suficiente para promover neurogénesis. También se facilita un compuesto de óxido nítrico para promover neurogénesis. Asimismo, se facilita un método para aumentar la producción de neuronas mediante la administración de una cantidad efectiva de un compuesto donador de óxido nítrico en un punto en el que dicho aumento sea necesario. Se facilita un método para aumentar las funciones neurológicas y cognitivas mediante la administración de una cantidad efectiva de un compuesto donador de óxido nítrico a un paciente.

40

45

Breve descripción de las figuras

50

Se apreciarán más fácilmente otras ventajas de la presente invención y esta se comprenderá mejor haciendo referencia a la siguiente descripción detallada, junto con las figuras adjuntas, en las cuales:

La Figura 1 es una fotografía que muestra los núcleos BrdU-positivos en las áreas seleccionadas;

55

Las Figuras 2A y 2B son gráficos que muestran la cantidad de células BrdU-positivas de la zona subventricular (SVZ);

La Figura 3 es un gráfico que muestra la cantidad de células BrdU-positivas en el cuerpo abollonado;

60

Las Figuras 4A y 4B son gráficos que muestran el porcentaje de distribución de las células BrdU en el cuerpo abollonado;

La Figura 5 es una fotografía que muestra el tamaño de las células BrdU inmunoreactivas en relación con las células granulares en capas granulares;

65

Las Figuras 6A y 6B son gráficos que muestran la cantidad de células BrdU-positivas en la zona subventricular (SVZ);

ES 2 313 895 T3

Las Figuras 7A y 7B son gráficos que muestran la cantidad de células BrdU-positivas en el bulbo olfativo (OB);

Las Figuras 8A y 8B son gráficos que muestran la cantidad de células BrdU-positivas en el cuerpo abollonado;

5 La Figura 9 es un gráfico que muestra un estudio del volumen de una lesión;

La Figura 10 es un gráfico que muestra, expresado como Tiempo/MCAo, los resultados de una prueba de retirada de adhesivo;

10 La Figura 11 es un gráfico que muestra los resultados de un test Rotarod;

La Figura 12 es un gráfico que muestra el resultado del test NSS;

La Figura 13 es un gráfico que muestra el porcentaje en peso;

15

La Figura 14 es un gráfico que muestra los resultados de un test Rotarod;

La Figura 15 es un gráfico que muestra resultados adicionales de un test Rotarod;

20

La Figura 16 es un gráfico que muestra los resultados de un test de footfault; y,

La Figura 17 es un gráfico que muestra los resultados de pruebas adicionales de retirada de adhesivo.

25 **Descripción detallada**

En términos generales, la presente invención facilita un método y un compuesto para promover la neurogénesis. Más concretamente, la presente invención facilita un método y un compuesto para promover la neurogénesis utilizando una cantidad efectiva de un donador de óxido nítrico que promueve neurogénesis. La neurogénesis puede ser necesaria en diversos puntos, incluyendo, sin limitación, el cerebro, el sistema nervioso central, el oído o cualquier otro lugar que contenga neuronas dañadas.

30

Por “donador de óxido nítrico” se entiende un compuesto que sea capaz de donar óxido nítrico o que promueva el aumento de óxido nítrico. Existen familias de compuestos que donan óxido nítrico. Entre dichos compuestos se incluyen los siguientes: DETA-NONOato (El DETANONO, el NONOato o los 1-sustituido diazen-1-ium-1,2-dilatatos son compuestos que contienen el grupo funcional [N(O)NO]-: DEA/NO; SPER/NO; DETA/NO; OXI/NO; SULFI/NO; PAPA/NO; MAHMA/NO y DPTA/NO), PAPA-NONOato, SNAP (S-nitroso-N-acetilpenicilamina), nitroprusido de sodio y nitroglicerina de sodio. Existen compuestos que promueven el aumento de óxido nítrico, tales como los inhibidores de la fosfodiesterasa y la L-arginina.

40

“Promover neurogénesis”, según se utiliza en este documento, significa promover o mejorar el crecimiento neuronal. Esto puede incluir, sin limitación, el crecimiento de nuevas neuronas o la mejora en el crecimiento de las neuronas existentes, así como el crecimiento y la proliferación de células parenquimales y células que promueven la plasticidad del tejido. El término neurogénesis también incluye, sin limitación, la expansión neurítica y dendrítica y la sinaptogénesis.

45

“Aumento”, en la forma utilizada en el presente documento, significa que el crecimiento se promueve o se suprime, según sea necesario en la situación específica. Por lo tanto, si se requiere un crecimiento adicional de las neuronas, la adición de un donador de óxido nítrico aumenta dicho crecimiento. Los donadores de óxido nítrico, o las fuentes de óxido nítrico, preparan el tejido cerebral para compensar los daños provocados por lesiones, neurodegeneración o envejecimiento, mejorando la activación del receptor y promocionando el cambio morfológico celular y la proliferación celular.

50

Función “neurológica” o “cognitiva”, en la forma utilizada en el presente documento, significa que el crecimiento neural del cerebro mejora la capacidad del paciente para pensar, tener actividad funcional u otras. Los seres humanos tratados con óxido nítrico han aumentado la producción de células cerebrales que facilitan una mejora de las funciones cognitivas, de memoria y motrices. Asimismo, los pacientes que padecen enfermedades o lesiones neurológicas, al ser tratados con óxido nítrico han mejorado las funciones cognitivas, de memoria y motrices.

60

La finalidad de la presente invención consiste en fomentar una mejor evolución de las lesiones cerebrales isquémicas, u otras lesiones neuronales, mediante la inducción de neurogénesis y a través de cambios celulares que promueven mejoras funcionales. Los pacientes padecen déficit neurológicos y funcionales con posterioridad al accidente cerebrovascular, a lesiones del SNC y a enfermedades neurodegenerativas. Estos descubrimientos proporcionan un medio para mejorar el mecanismo compensatorio del cerebro a fin de mejorar la funcionalidad con posterioridad a los daños o la degeneración sufridos por el SNC. La inducción de neuronas y los cambios celulares inducidos por la administración de óxido nítrico promoverán las mejoras funcionales tras el accidente cerebrovascular, la lesión, el envejecimiento y la enfermedad degenerativa. Este método también puede aportar beneficios a los pacientes que padezcan otras enfer-

65

medades neurológicas, incluyendo, sin limitación, ALS (Esclerosis Lateral Amiotrófica), MS (Esclerosis Múltiple), y la enfermedad de Huntington.

El óxido nítrico administrado en los momentos propicios con posterioridad a una lesión del SNC promueve la neurogénesis cerebral y es capaz de facilitar la neurogénesis. El mecanismo primario de dicha producción es que el NO activa los receptores de glutamato. Estos receptores de glutamato fomentan la potenciación a largo plazo, por lo que, por consiguiente, inducen la regeneración de las neuronas. Como experimento inicial se utilizó DETA/NO, un compuesto con una larga vida media (-50 horas) y que produce NO. Se identificó un número creciente de nuevas neuronas cuando se administró este compuesto a las 24 horas del inicio del accidente cerebro-vascular (y con posterioridad).

Los datos experimentales incluidos en el presente documento muestran que una intervención farmacológica diseñada para inducir la producción de NO puede promover neurogénesis. Se han utilizado dos compuestos, DETA-NONOato y SNAP; dichos compuestos han conseguido inducir neurogénesis y han mejorado los resultados funcionales tras el accidente cerebro-vascular. El compuesto utilizado probablemente atraviesa la barrera de sangre cerebral. La neurogénesis es el último y el más importante objetivo en la investigación neurológica. El desarrollo de un método de promover la producción de neuronas ofrece la oportunidad de tratar una amplia variedad de enfermedades neurológicas, lesiones del SNC y neurodegeneración. Es posible aumentar la producción de neuronas en la parte no dañada del cerebro, a fin de aumentar su funcionalidad.

El mercado para una clase de fármacos que promueva la producción de neuronas es vasto. Los donadores de óxido nítrico, entre los cuales el DETANONO constituye tan sólo un ejemplo, promueven la neurogénesis. El aumento de la neurogénesis se traduce en un método para aumentar y mejorar las funciones neurológicas, de comportamiento y cognitivas, por razones de edad o con posterioridad a una lesión o enfermedad.

La explicación que antecede proporciona una base para utilización del óxido nítrico para promover neurogénesis. Los métodos utilizados y la utilidad de la presente invención podrán comprobarse mediante los siguientes ejemplos no limitativos y las figuras adjuntas.

Métodos

Métodos generales de la biología molecular: Las técnicas estándar de biología molecular conocidas en la técnica y no descritas específicamente se han seguido en general de acuerdo con Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989), con Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989) así como con Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley & Sons, New York (1988), con Watson y otros, *Recombinant DNA*, Scientific American Books, New York y con Birren y otros (eds) *Genome Analysis: A Laboratory Manual Series*, Vols. 1-4 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998) y con la metodología recogida en las patentes estadounidenses 4666828; 4683202; 4801531; 5192659 y 5272057 y que se ha incorporado al presente documento mediante referencia. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en general de acuerdo con PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications, Academic Press, San Diego, CA (1990). La PCR *in-situ* (Intracelular) puede utilizarse, en combinación con la citometría de flujo, para la detección de células que contengan secuencias específicas de ADN y MARn (Testoni y otros, 1996, *Blood* 87: 3822).

Métodos generales de inmunología: Los métodos inmunológicos estándar conocidos en la técnica y no descritos específicamente se han seguido en general de acuerdo con Stites y otros (eds), *Basic and Clinical Immunology* (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994) y Mishell and Shiigi (eds), *Selected Methods in Cellular Immunology*, W. H. Freeman and Co., New York (1980).

Terapia

El compuesto de la presente invención se administra y dosifica de acuerdo con la buena práctica médica, teniendo en cuenta las condiciones clínicas del paciente individual, el lugar y método de administración, la programación de la administración, la edad del paciente, su sexo, peso corporal y otros factores conocidos por los médicos. La "cantidad efectiva" desde un punto de vista farmacológico para los fines expuestos en el presente documento será determinada entonces en virtud de dichas consideraciones, de acuerdo con la técnica conocida. La cantidad deberá ser efectiva para lograr una mejora, incluyendo sin limitación la mejora de la tasa de supervivencia o una recuperación más rápida, o una mejora o desaparición de los síntomas y otros indicadores seleccionados como medidas adecuadas por las personas versadas en la materia.

En el método de la presente invención, el compuesto de la presente invención puede administrarse de diversas formas. Cabe señalar que puede administrarse como compuesto o como una sal farmacológicamente aceptable, y puede administrarse solo o como ingrediente activo, en combinación con portadores, disolventes, adyuvantes y vehículos farmacológicamente aceptables. Los compuestos pueden administrarse por vía oral, subcutánea o parenteral, incluyendo la administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal e intranasal, así como las técnicas intratecal y de infusión. También resultan útiles implantes de los compuestos. El paciente a tratar es un animal de sangre

caliente, concretamente de la clase de los mamíferos, incluyendo el hombre. Los portadores, disolventes, adyuvantes y vehículos farmacológicamente aceptables, así como los portadores de implantes se refieren en general a rellenos, disolventes o materiales de encapsulado inertes, no tóxicos, sólidos o líquidos, que no reaccionan con los ingredientes activos de la invención.

5 Cabe señalar que los seres humanos reciben por lo general tratamiento durante un período más prolongado que los ratones u otros animales experimentales ejemplificados en este documento, y la duración del tratamiento es proporcional a la duración del proceso de la enfermedad y a la eficacia del fármaco. Las dosis pueden ser dosis aisladas o múltiples dosis a lo largo de un período de varios días, pero se prefieren las dosis aisladas.

10 Las dosis pueden ser dosis aisladas o múltiples dosis a lo largo de un período de varios días. Por lo general, la duración del tratamiento es proporcional a la duración del proceso de la enfermedad y a la eficacia del fármaco, así como a la especie a la que pertenece el paciente sometido a tratamiento.

15 Cuando se administra el compuesto de la presente invención por vía parenteral, por lo general se formulará en forma de dosis unitaria inyectable (solución, suspensión, emulsión). Las formulaciones farmacológicamente adecuadas para su inyección incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para su reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión, que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propileno glicol, polietileno glicol líquido y similares),
20 mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales.

Puede mantenerse el grado de fluidez adecuado, por ejemplo, mediante la utilización de un revestimiento como la lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario, en el caso de las dispersiones, y utilizando surfactantes. También pueden utilizarse como disolventes de los compuestos otros vehículos no acuosos, tales como aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de girasol o aceite de cacahuete, y ésteres, como el isopropil miristato. Además, pueden incorporarse diversos aditivos que mejoran la estabilidad, esterilidad e isotonicidad de los compuestos, incluyendo conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y soluciones tampón. La prevención de la acción de los microorganismos puede conseguirse mediante diversos agentes antifúngicos y antibacterianos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. En muchos casos resulta deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares. La absorción prolongada del formato inyectable farmacéutico puede conseguirse mediante la utilización de agentes retardantes de la absorción, tales como el monoestearato de aluminio y la gelatina. No obstante, de acuerdo con la presente invención, cualquier vehículo, disolvente o aditivo utilizado debería ser compatible con los compuestos.

35 Las soluciones inyectables estériles pueden elaborarse mediante incorporación de los compuestos utilizados para la realización práctica de la presente invención, con la cantidad necesaria del disolvente adecuado, y varios de los otros ingredientes, en la medida deseada.

40 Una formulación farmacológica de la presente invención se puede administrar al paciente en una formulación que contenga cualquier portador compatible, como diversos vehículos, adyuvantes, aditivos y disolventes; o los compuestos utilizados en la presente invención pueden administrarse por vía parenteral al paciente, en forma de implantes subcutáneos de liberación lenta o de sistemas de dosificación programada, como anticuerpos monoclonales, dosificación sectorizada, soluciones iontoforéticas, matrices poliméricas, liposomas y microesferas. Entre los ejemplos de sistemas de dosificación útiles para la presente invención pueden citarse las patentes norteamericanas: 5225182; 5169383; 5167616; 4959217; 4925678; 4487603; 4486194; 4447233; 4447224; 4439196; y 4475196. Las personas versadas en la materia también conocen perfectamente otros muchos de dichos implantes, sistemas de dosificación y módulos.

50 Una formulación farmacológica del compuesto utilizado en la presente invención puede administrarse al paciente por vía oral. También se puede recurrir a los métodos convencionales, como la administración de los compuestos en píldoras, suspensiones, soluciones, emulsiones, cápsulas, polvo, jarabe y similares. Se prefieren las técnicas conocidas que lo administran por vía oral o intravenosa y conservan la actividad biológica.

55 En una realización, el compuesto de la presente invención puede administrarse inicialmente mediante inyección intravenosa, para mantener los niveles sanguíneos en un nivel adecuado. Los niveles del paciente se mantienen posteriormente mediante un formato de dosificación por vía oral, aunque pueden utilizarse otras formas de administración, en función de las condiciones del paciente y de acuerdo con lo indicado anteriormente. La cantidad a administrar variará en función del paciente sometido a tratamiento, desde unos 100 mg/kg de peso corporal hasta 100 mg/kg de peso corporal por día, situándose preferiblemente entre 10 mg/kg y 10 mg/kg por día.

Ejemplos

65 Ejemplo 1

Se ha desarrollado un método farmacológico para promover la neurogénesis cerebral. Una serie de ratas Wistar macho se sometieron a una oclusión de la arteria cerebral media (MCA) mediante la colocación intraarterial de un

ES 2 313 895 T3

coágulo en el origen de la MCA derecha. Se administró a los animales (iv/ip) compuestos donadores de óxido nítrico (DETANONO) tras la inducción del accidente cerebro-vascular, a las 24 y a las 48 horas (Grupo 1), o a las 24 horas, seguido de una inyección diaria (ip) de un compuesto donador de NO (Grupo 2). Se inyectó diariamente (ip) BrdU, un análogo de la timidina que identifica la formación de nuevas células, a lo largo de un período de 14 días desde el inicio de la isquemia. La identificación del tipo de célula se determinó mediante el etiquetado de la inmunorreactividad de proteínas celulares específicas. De este modo, las neuronas se identificaron mediante la expresión de NeuN, MAP2 y los astrocitos formados por GFAP. Se realizaron mediciones de neurogénesis en áreas específicas del cerebro, de la zona subventricular y del cuerpo abollonado.

Resultados: Los datos mostraron un importante aumento del número de células BrdU positivas en las ratas tratadas con DETANONO, en comparación con las encontradas en el grupo no tratado. En el caso del Grupo 2, los resultados fueron los siguientes: zona subventricular: 2748 ± 326 frente a 1653 ± 91.4 , cuerpo abollonado: capa celular granulada, 135 ± 18.9 frente a 37.3 ± 3.6 ; 53.7 ± 6.3 frente a 34.9 ± 2.8 , hilus, 43.8 ± 10.2 frente a 10.1 ± 2.4 . En el caso del Grupo 1, se detectó un aumento significativo en el número de Células BrdU de la capa celular granulada, 89.5 ± 12 frente a 37.3 ± 3.6 en ratas tratadas frente a ratas no tratadas, respectivamente. La inmensa mayoría de las células de nueva formación (> 90%) del cuerpo abollonado eran neuronas. En otras áreas del cerebro, las células de nueva formación tenían un fenotipo astrocítico y glial.

Tratamiento del cerebro no isquémico con DETANONO: Las ratas que no fueron sometidas a ningún tratamiento quirúrgico fueron tratadas con DETANONO. El fármaco se administró en una única dosis (iv 0,12 mg). Se inyectó diariamente BrdU durante 14 días con posterioridad al tratamiento. Una población (Grupo 3) de ratas se sacrificó el último día de la inyección de BrdU. Otra población (Grupo 4) se sacrificó cuatro semanas después de la última inyección de BrdU. Los animales a los que no se les había administrado DETA-NONO fueron sometidos a una administración de BrdU con el mismo protocolo que en el caso de las ratas tratadas con DETA-NONO (Grupo 5).

Los resultados del Grupo 3 frente a los del Grupo 5 fueron los siguientes: En las zonas subventriculares, los resultados fueron, respectivamente, 2952 ± 102.6 frente a 1432.6 ± 104.6 ; 2725.3 ± 115.5 frente a 1655.2 ± 102.9 en el cuerpo abollonado (capa celular granulada) 73.7 ± 8.11 frente a 39.9 ± 7.26 . En el Grupo 4, comparado con el Grupo 5, los resultados en la zona subventricular fueron los siguientes: 456.5 ± 42.3 frente a 214.6 ± 67.9 ; 518.4 ± 67.2 frente a 233.1 ± 49.2 , respectivamente; en el cuerpo abollonado (hilus) 7.71 ± 89 frente a 3.23 ± 1.22 , respectivamente. Las ratas tratadas con DETANONO mostraron un importante aumento de células de nueva formación en ambos puntos temporales, comparado con las ratas no sometidas a tratamiento. El aumento de células de nueva formación fue evidente en el área subventricular y en el hipocampo. Las células BrdU reactivas se etiquetaron por partida doble con marcadores neuronales NeuN y MAP2, y un marcador astrocítico, GFAP. Las células de nueva formación presentaban proteínas neuronales o astrocíticas.

La figura 1 muestra la técnica inmunohistoquímica de doble etiquetado en el hipocampo para la BrdU y los marcadores neuronales, NeuN y MAP2, y la BrdU con el marcador astrocítico y GFAP en ratas tratadas con DETANONO y sometidas a accidentes cerebro-vasculares. Las células presentaron inmunoreactividad a ambos marcadores, lo que indica el fenotipo neuronal y astrocítico de las células de nueva formación. Se calcula que más de un 90% de las células de nueva formación del hipocampo tienen el fenotipo neuronal.

Estos datos indican que la administración de un donador de NO promueve neurogénesis en el cerebro isquémico. Este método es aplicable a muchas formas de patologías y lesiones del SNC. Además, el NO también promueve neurogénesis en cerebros adultos “normales”.

La finalidad de la presente invención consiste en fomentar un resultado más favorable de las lesiones cerebrales isquémicas, induciendo neurogénesis. Los pacientes sufren déficit neurológicos y funcionales tras el accidente cerebro-vascular, lesiones del SNC y enfermedades neurodegenerativas. Estos descubrimientos proporcionan un medio de mejorar el mecanismo compensatorio del cerebro, a fin de mejorar la funcionalidad tras los daños o la degeneración del SNC. La inducción de neuronas fomentará una mejora funcional tras el accidente cerebro-vascular.

El óxido nítrico administrado en el momento oportuno tras la lesión del SNC promueve neurogénesis cerebral y puede facilitar la neurogénesis. El mecanismo de dicha producción consiste en que el NO activa los receptores de glutamato. Dichos receptores de glutamato promueven la potenciación a largo plazo, y posteriormente, inducen la regeneración de las neuronas. Como experimento inicial, se utilizó DETA/NO, un compuesto con un promedio de vida prolongado (-50 horas) y que produce NO. Se identificó un creciente número de neuronas cuando se administró este compuesto a las 24 del inicio del accidente cerebro-vascular y con posterioridad.

Los datos experimentales incluidos en este documento muestran que una intervención farmacológica diseñada para inducir la producción de NO puede promover neurogénesis. El compuesto utilizado atraviesa probablemente la barrera de sangre cerebral. La neurogénesis es uno de los objetivos fundamentales de la investigación neurocientífica. El desarrollo de una forma de promover la producción de neuronas permite la posibilidad de tratar una amplia variedad de enfermedades neurológicas, lesiones del SNC y neurodegeneración. Es posible aumentar la producción de neuronas en la parte no dañada del cerebro, para ampliar su funcionalidad.

ES 2 313 895 T3

Un tipo de fármacos que promueva la formación de neuronas tiene un amplio mercado. Los donadores de óxido nítrico, de los cuales el DETANONO constituye tan sólo un ejemplo, promueve neurogénesis. El aumento de la neurogénesis se traduce en un método para aumentar y mejorar las funciones neurológica, comportamental y cognitiva, perjudicadas por el envejecimiento o tras una lesión o enfermedad.

Previamente no existían aplicaciones de donadores de NO, ni de este fármaco específico, para la inducción de neurogénesis tras el accidente cerebro-vascular.

El cerebro de los roedores adultos es capaz de generar células madre neuronales en la zona subventricular (SVZ) y en el cuerpo abollonado del hipocampo a lo largo de la vida del animal. No obstante, no se conocen signos que regulen la proliferación y la diferenciación de células madre. El óxido nítrico (NO) actúa como mensajero químico en los sistemas biológicos y sirve como neurotransmisor en el cerebro. En el estudio actual, se han indagado los efectos del NO sobre la proliferación de células madre neuronales en la SVZ y en el cuerpo abollonado de ratas adultas.

Se realizaron dos experimentos. En el primer experimento, se examinaron los efectos del NO sobre la proliferación de células madre neuronales en la SVZ y el cuerpo abollonado de ratas adultas no isquémicas. En el segundo ejemplo se examinaron los efectos del NO sobre la proliferación de células madre neuronales en la SVZ y en el cuerpo abollonado de ratas adultas isquémicas.

Para este estudio se utilizaron machos de ratas Wistar con un peso de 300 a 350 g (Charles River Breeding Company, Wilmington, MA). El DETA-NONOato, un donador de NO con un promedio de vida de 20 horas en condiciones fisiológicas se adquirió a ALEXIS Biochemical Corporation. La Bromo-deoxi-uridina (BrdU), el análogo de la timidina utilizado como etiquetado mitótico, se adquirió a Sigma Chemical. Se adquirió un anticuerpo monoclonal de ratón contra la BrdU a Boehringer Mannheim.

Las ratas Wistar (n=28) con un peso de 300 a 350 g se anestesiaron con halotano (1-3,5% en una mezcla formada por un 70% de N₂O y un 30% de O₂) utilizando unas mascarilla facial. La temperatura rectal se mantuvo en 37±1°C a lo largo del procedimiento quirúrgico, utilizando un sistema de agua caliente regulado por retroalimentación. La arteria y la vena femoral derechas se canularon mediante un catéter PE-50 para mantener la supervisión continua de la presión sanguínea y medir los gases de la sangre (pH, pO₂, pCO₂) y para administrar el fármaco, respectivamente. Se inyectó en las ratas DETA-NONOato, tanto por vía intravenosa como intraperitoneal.

Tratamiento con DETANONO: las ratas se dividieron de manera aleatoria en cuatro grupos. A las ratas del Grupo 1 (un solo Rx), se les inyectó por vía intravenosa cuatro dosis en bolo de DETANONO (0,1 mg/kg cada una) cada quince minutos (una dosis total de 0,4 mg/kg). A las ratas del Grupo 2 (dos grupos Rx), se les inyectó por vía intravenosa cuatro dosis en bolo de DETANONO (0,1 mg/kg cada una) cada quince minutos (una dosis total de 0,4 mg/kg) y las ratas fueron sometidas a un segundo tratamiento al cabo de 24 horas. A las ratas del Grupo 3 (siete grupos Rx), se les inyectó por vía intravenosa cuatro dosis en bolo de DETANONO (0,1 mg/kg cada una) cada quince minutos del primer día del experimento, inyectándose a las ratas una dosis en bolo por vía intraperitoneal de DETANONO (0,4 mg/kg) diariamente durante siete días consecutivos adicionales. Las ratas del Grupo 4 (control) recibieron únicamente una solución salina (una sola dosis).

Se administró a las ratas una inyección intraperitoneal de BrdU (50 mg/kg) durante el primer día del tratamiento con DETANONO e inyecciones intraperitoneales diarias BrdU durante catorce días consecutivos. Para determinar si la proliferación y la diferenciación de las células en la SVZ y el cuerpo abollonado de las ratas adultas se había visto afectado por el NO, se sacrificó una serie de ratas al cabo de catorce días (n=3-5 por grupo) y de 42 días (n=3-5 por grupo) tras la primera dosis de tratamiento a base de DETANONO, respectivamente. Se realizó a las ratas una perfusión transcardiaca con paraformaldehído al 4% en una solución tampón de 100 mM de fosfato, con un pH de 7,4. Se extirparon los cerebros, fijándose con formaldehído al 4%.

Para la inmunotinción con BrdU, en primer lugar se desnaturalizó el ADN incubando secciones del cerebro (6 µm) en formamida 2X SSC al 50% a 65°C durante 2 horas, y posteriormente, en HCl 2N a 37°C durante 30 minutos. A continuación, las secciones se lavaron con una solución tampón TRIS, tratándose con H₂O₂ al 1% para bloquear la peroxidasa endógena. Las secciones se incubaron con un anticuerpo primario anti-BrdU (1: 100) a temperatura ambiente durante una hora y posteriormente se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado (1:200, Vector, Burlingame, CA) durante una hora. Se detectó el producto de la reacción utilizando 3'3'-diaminobenzidina-tetrahidrocloruro (DAB, Sigma).

Las secciones de BrdU inmunotintada se digitalizaron objetivamente a 40x (Olympus BX40) mediante el sistema de análisis de imagen por ordenador MCID (Imaging Research, St. Catharines, Canadá). El recuento de los núcleos inmunoreactivos de BrdU se llevó a cabo en un monitor de ordenador, para mejorar la visualización, y en un plano focal, para evitar el exceso de muestreo. Las estructuras se muestrearon mediante la selección de áreas predeterminadas de cada sección (RMS y OB) o mediante el análisis de estructuras completas de cada sección (cuerpo abollonado y SVZ).

Se seleccionó cada 40ª sección coronal de cada rata para un total de siete secciones entre AP + 10,6 mm, genu corpus callosum, y AP+ 8. 74 mm - cruce de la comisura anterior (Paxinos y Watson, 1986). Se efectuó el recuento de los

núcleos BrdU inmunorreactivos-positivos en la pared lateral del ventrículo. Todos los núcleos BrdU inmunorreactivos-positivos de estas áreas se presentan como el número de células BrdU inmunorreactivas/mm². Se obtuvo la densidad media de las siete secciones a fin de obtener un valor medio de densidad para cada animal.

5 Se seleccionó cada 20ª sección de cada rata para un total de seis secciones procedentes de la serie sagital del OB/córtex frontal. Como se describe en la figura 1, se analizaron en cada sección dos áreas predeterminadas (100 X 100, μm) del RMS y cuatro áreas (300 X 300 μm) de la capa celular granulosa (GCL) del OB. Todos los núcleos BrdU positivos de estas áreas seleccionadas se presentan como el número de células/mm². Se obtuvo el promedio de la densidad de BrdU para las seis secciones a fin de obtener un valor medio de densidad para cada animal.

10 Se seleccionó cada 50ª sección de cada rata para un total de ocho secciones entre AP +5,86 mm y AP +2,96 mm incluyendo el hilus, la zona subgranular (SGZ), y la primera, segunda y tercera capas celulares granulares (GCL) interiores. La SGZ, definida como una zona con una anchura de dos células a lo largo del borde de la GCL y del hilus siempre se combinó con la GCL para la cuantificación. Todos los núcleos BrdU inmunorreactivos de estas zonas se presentaron como el número de células BrdU inmunorreactivas/mm². Se obtuvo la densidad media de las ocho secciones para obtener un valor medio de densidad para cada animal.

Resultados

20 Las ratas sometidas a tratamiento de DEANONO mostraron un importante aumento ($p < 0,05$) en el número de células BrdU inmunorreactivas en la SVZ en comparación con las ratas sometidas a un tratamiento a base de solución salina al cabo de catorce días y de 42 días después del tratamiento (figura 2a). Las ratas que recibieron siete dosis de DETANONO presentaron el número más alto de células BrdU inmunorreactivas en comparación con las ratas que habían recibido una y dos dosis de DETANONO a los catorce días del tratamiento. Se observó una importante diferencia en el número de células BrdU inmunorreactivas entre una dosis y siete dosis de DETANONO (figura 2b), lo que sugiere que el aumento de las células BrdU inmunorreactivas está en función de la dosis. Aunque el número de células BrdU inmunorreactivas disminuyó 42 días después del tratamiento, en comparación con el número de células presentes a los 14 días, el número de células BrdU inmunorreactivas siguió siendo significativamente mayor, en comparación con los animales de control sometidos a solución salina (figura 2a).

35 El número de células BrdU inmunorreactivas no aumentó significativamente en el RMS de las ratas tratadas con DETANONO a los catorce y los 42 días después del tratamiento (tabla 1). No obstante, se detectó un aumento significativo en el número de células BrdU inmunorreactivas del OB a los 42 días, tras un único tratamiento con DETANONO y a los catorce días y a los 42 días tras dos y siete series de tratamientos con DETANONO, en comparación con el grupo de control (tabla 1), lo que sugiere un aumento de la migración de las células madre de la SVZ.

40 Un único tratamiento a base de DETANONO no aumentó significativamente el número de células BrdU inmunorreactivas del cuerpo abollonado a los catorce días y a los 42 días del tratamiento (figura 3). Por el contrario, las ratas tratadas con dos y siete series de DETANONO mostraron un aumento significativo ($p < 0,01$) en el número de células BrdU inmunorreactivas del cuerpo abollonado a los catorce y a los 42 días del tratamiento, en comparación con el grupo de control (figura 3). El porcentaje de distribución de células BrdU inmunorreactivas en el cuerpo abollonado mostró que el tratamiento con DETANONO disminuye de forma importante el porcentaje de células BrdU inmunorreactivas del área subgranular y aumenta significativamente en las capas granulares a los 42 días después del tratamiento, en comparación con el grupo de control (figuras 4a y 4b), lo que indica que el NO fomenta la migración de las células BrdU inmunorreactivas. Las células BrdU inmunorreactivas eran ovales y redondeadas, y tenían el mismo tamaño o un tamaño inferior al de los núcleos de las células granulares de las capas granulares (figura 5).

55 Los datos muestran que el tratamiento con DETANONO en las ratas adultas no sólo aumenta la proliferación de células madre en la SVZ y en el cuerpo abollonado, sino que también prolonga la supervivencia de las células madre proliferadas. Algunas células BrdU inmunorreactivas presentan características morfológicas de las células granulares del cuerpo abollonado. De este modo, los datos sugieren que el NO mejora la neurogénesis en el cerebro de ratas adultas.

60 Basándose en los datos anteriores, se realizó un segundo experimento para explorar los efectos del NO en un cerebro isquémico con embolia cerebral focal. Todos los procedimientos fueron los mismos que en el primer experimento, a excepción de los siguientes procedimientos.

Una serie de ratas Wistar macho ($n=30$) con un peso de 300 a 350 g se sometieron a una oclusión de la arteria cerebral media (MCA). La MCA se ocluyó mediante la inserción de un émbolo en el origen de la MCA. En pocas palabras, un coágulo homólogo intacto, rico en fibrina, de 24 horas, (aproximadamente 1 μl) en el origen de la MCA mediante un catéter PE-50 modificado de 15 mm. El protocolo experimental consistió en cuatro grupos. En el grupo I (grupo de control), las ratas se sometieron a una oclusión de la MCA y recibieron cuatro dosis en bolo consecutivas de solución salina (0,52 ml cada una, cada quince minutos) 24 horas con posterioridad a la isquemia. Las ratas del Grupo II (condición previa DETNO/NO) recibieron cuatro dosis en bolo consecutivas por vía intravenosa de DETANONO

ES 2 313 895 T3

(0,1 mg/kg cada una, cada quince minutos, con una dosis total de 0,4 mg/kg) 24 horas antes de la embolización. Los animales del Grupo III (DETANONO grupo de dos series), recibieron dosis en bolo consecutivas por vía intravenosa de DETANONO (0,1 mg/kg cada una, cada quince minutos y una dosis total de 0,4 mg/kg) a las 24 y 48 horas después de la oclusión. Los animales del Grupo IV (DETANONO grupo de siete series), recibieron cuatro dosis en bolo consecutivas de DETANONO (0,1 mg/kg cada una, cada quince minutos y una dosis total de 0,4 mg/kg) a las 24 horas de la embolización. Posteriormente, se les inyectó diariamente a las ratas por vía intraperitoneal DETA/NO a razón de 0,4 mg/kg durante seis días consecutivos.

La oclusión embólica de la MCA tuvo como resultado un importante aumento ($p < 0,05$) del número de células BrdU inmunoreactivas en la SVZ ipsilateral y el OB a los catorce días de la oclusión de la MCA, en comparación con las ratas no isquémicas (tabla 2). El número de células BrdU reactivas disminuyó 42 días después de la oclusión de la MCA, demostrando que la isquemia cerebral focal fomenta estados transitorios de aumentos de la proliferación de células madre en la SVZ ipsilateral (tabla 2). La oclusión de la MCA no afectó a la proliferación de las células madre en la SVZ contralateral y en el OB, así como en ambos cuerpos abollonados (tabla 2).

Se detectó un aumento significativo ($p < 0,05$) en el número de células BrdU inmunoreactivas en la SVZ contralateral a los 14 días de la oclusión de la MCA y en ambas SVZs a los 42 días de la oclusión de la MCA en el grupo condicionado previamente, en comparación con el grupo de oclusión de la MCA no sometido a tratamiento (figuras 6A, 6B). Las ratas de dos grupos de dosificación experimentaron un aumento significativo del número de células BrdU inmunoreactivas en la SVZ ipsilateral a los 14 días, y también experimentaron un importante aumento en el número de células BrdU inmunoreactivas en ambos SVZ a los 42 días de la oclusión de la MCA (figuras 6A, 6B). Las ratas tratadas siete series de inyección de DETANONO mostraron importantes aumentos del número de células BrdU inmunoreactivas en la SVZ contralateral e ipsilateral a los 14 y 42 días de la oclusión de la MCA.

Se detectaron aumentos significativos en el número de células BrdU inmunoreactivas en el OB de las ratas isquémicas tratadas con DETANONO a los 14 y 42 días con posterioridad a la oclusión de la MCA (figuras 7A, 7B).

Las ratas isquémicas tratadas con DETANONO mostraron importantes aumentos en el número de células BrdU inmunoreactivas en el cuerpo abollonado a los 14 y 42 días con posterioridad a la oclusión de la MCA en comparación con el grupo de oclusión de la MCA (figuras 8A, 8B).

Las ratas isquémicas tratadas con DETANONO no mostraron una reducción significativa del volumen de lesión isquémica (figura 9).

Estos datos demuestran que la oclusión embólica de la MCA por sí sola aumenta la proliferación de células madre en la SVZ ipsilateral. Muchas células nacidas en la SVZ emigran a lo largo del RMS hacia el OB, donde se diferencian en neuronas. De este modo, el aumento del número de células BrdU inmunoreactivas en el OB ipsilateral sugieren un aumento de la migración de las células madre de la SVZ ipsilateral. Estos datos también sugieren que los síntomas que indican que el aumento de la proliferación de células madre son transitorios y locales tras la oclusión de la MCA. No obstante, el importante aumento de la proliferación de células madre se mantuvo al menos durante 42 días con posterioridad a la oclusión de la MCA cuando las ratas isquémicas se sometieron a un tratamiento con DETANONO. El aumento de la proliferación de células madre está inducido por el NO, ya que los aumentos del número de células BrdU inmunoreactivas no sólo afectó a ambas SVZ sino también al cuerpo abollonado. Sin embargo, existen diferencias en diversas células BrdU entre las ratas no isquémicas tratadas con DETANONO y las ratas isquémicas tratadas con DETANONO. Las ratas isquémicas tratadas con DETANONO tenían un número absoluto de células BrdU inmunoreactivas en el cuerpo abollonado a los 14 y 42 días de la oclusión de la MCA más alto que el correspondiente a las ratas no isquémicas tratadas con DETANONO, lo que sugiere que el NO puede amplificar las señales generadas por la isquemia a fin de aumentar la proliferación de células madre. Por lo tanto, los datos indican que la isquemia cerebral focal produce una proliferación transitoria de células madre y que el NO mejora la proliferación de células madre en el cerebro isquémico.

Ejemplo 2

La administración de un compuesto donador de óxido nítrico (DETA/NO) a ratas normales e isquémicas promueve neurogénesis en cerebros isquémicos y no isquémicos. Desde entonces se han llevado a cabo experimentos de adición para someter a prueba la hipótesis de que la neurogénesis inducida por el DETA/NO promueve una mejora funcional con posterioridad al accidente cerebro-vascular; se adjuntan los datos. Se administró a los animales (iv/ip) DETA/NO a razón de un día (Grupo 1) o de siete días (Grupo 2) tras la inducción del accidente cerebro-vascular, seguido por una inyección diaria (ip) de DETA/NO a lo largo de un período de siete días. Se administró (iv) otro compuesto donador de NO (SNAP) a ratas isquémicas uno y dos días después del accidente cerebro-vascular (Grupo 3). Se utilizaron ratas jóvenes (3 meses) en los Grupos 1 y 2. Se utilizaron ratas de mediana edad (10 a 12 meses) en el Grupo 3. Se midió una batería de pruebas funcionales neurológicas desde dos días a cuarenta y dos días tras el accidente cerebro-vascular. Dichas pruebas incluían 1) marcador de gravedad neurológica (NSS) que mide las funciones motrices, sensoriales y reflejas y que es similar al test de neglect contralateral descrito en seres humanos. Cuanto mayor sea la puntuación, más grave será la lesión; 2) El test de Rotarod mide la coordinación y el equilibrio motriz de los miembros delanteros y posteriores. Los datos se presentan expresados como un porcentaje de los valores de base; 3) El test de Footfault

5 mide la coordinación motriz de los miembros anteriores y posteriores. Cuanto más elevado sea el número, más grave será la lesión; 4) El test de retirada de adhesivo mide la discapacidad sensomotriz. Los datos se presentan expresados en tiempo (segundos). Cuanto más prolongado sea el período de tiempo, más grave será la lesión; 5) el peso del cuerpo del animal.

10 *Resultados*

Grupo 1: Se detectaron mejoras significativas de las funciones motrices y sensomotrices (figura 10, Test de Rotarod, figura 11, Test de retirada de adhesivo, figura 12, Test NSS) y en el peso corporal del animal en las ratas tratadas con DETA/NO en comparación con las ratas de control.

Grupo 2: Se detectó una mejora de la función neurológica únicamente en el test de Rotarod a los 28 y 42 días del accidente cerebro-vascular (figura 14) en comparación con los animales de control.

Grupo 3: Los animales tratados con SNAP mostraron importantes mejoras en las funciones motrices y sensomotrices (figura 15, Test de Rotarod, figura 16, test de footfault, y figura 17, Test de retirada de adhesivo) en comparación con los animales de control.

20 *Conclusiones*

Estos datos indican que 1) la administración de DETANONO a ratas isquémicas mejora la recuperación de la funcionalidad neurológica, y que estas mejoras pueden lograrse incluso cuando el DETANONO se administra a los siete días del accidente cerebro-vascular; 2) además del DETANONO, la administración de SNAP a ratas isquémicas también mejora las funciones neurológicas, lo que sugiere que la administración de compuestos donadores de NO puede mejorar la recuperación funcional; y 3) la administración de SNAP a ratas de mediana edad es efectiva para promover la recuperación funcional, lo que es muy importante y clínicamente relevante, debido a que la mayoría de los pacientes de accidentes cerebro-vasculares son de mediana edad o mayores. Estos datos, junto con los datos anteriores que demuestran que los donadores de NO promueven la neurogénesis, sugieren que los compuestos donadores de NO mejoran la recuperación funcional neurológica con posterioridad a un accidente cerebro-vascular a través de la promoción de la neurogénesis en cerebros isquémicos.

En esta solicitud se hace referencia a diversas publicaciones, incluyendo patentes estadounidenses, mediante su autor y año de publicación, y en el caso de las patentes, mediante el número de referencia. Más adelante se cita la referencia completa de las publicaciones.

La invención se ha descrito en forma ilustrativa, y debe entenderse que la terminología utilizada pretende tener un carácter descriptivo y no limitativo.

Obviamente, son posibles muchas modificaciones y variaciones de la presente invención, a la luz de cuanto antecede. Por lo tanto, debe entenderse que dentro del ámbito de la invención descrita, esta puede llevarse a la práctica en otra forma distinta de la específicamente descrita.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 313 895 T3

TABLA 1

Densidad de nuevas células en el cerebro

Área	Solución salina	DETA UNA VEZ	NO DOS VECES	DETA 7 VECES	NO X
Flujo migratorio rostral (BrdU 50mg/kg ip diario X 14 d)					
1 día tras la última inyección de BrdU (14d) Lado derecho	869.2 ± 98.25	950,25 ± 99.55	991 ± 98.25	1169.4 ± 218,85	
1 día tras la última inyección de BrdU (14d) Lado izquierdo	841.9 ± 230,4	998.55 ± 59.7	1070,85 ± 160,1	1312.5 ± 265	
4 semanas tras la última inyección de BrdU Lado Derecho	21.85 ± 6.55	22.5 ± 5.95	32.9 ± 8.15	45 ± 11.35	
4 semanas tras la última inyección de BrdU Lado izquierdo	21.2 ± 5.2	26.25 ± 6.9	37.835.15	47.5 ± 15.6	
Bulbo olfativo (BrdU 50mg/kg ip diaria X 14 d)					
1 día tras la última inyección de BrdU (14d) Ipsilateral	45.15 ± 7.4	41.4 ± 5.55	91.65 ± 12.35*	106.25 ± 17.7**	
1 día tras la última inyección de BrdU (14d) Contralateral	31.55 ± 8.45	39.75 ± 6.2	99.6 ± 10,5**	116.5 ± 16.45**	
4 semanas tras la última inyección de BrdU (42d) Ipsilateral	12.95 ± 2.6	75.65 ± 10,85**	85 ± 15.95**	84.4 ± 7.1**	
4 semanas tras la última inyección de BrdU (42d) Contralateral	9.95 ± 2.85	80 ± 12.3**	98.4 ± 19.95**	100,85 ± 19**	
Las densidades de nuevas células se presentan como la media de células BrdU positivas por mm ² ±SEM. Los valores difieren del grupo tratado con solución salina, *p <0,05, **p < 0,01.					

ES 2 313 895 T3

TABLA 2

Densidad de nuevas células en el cerebro

Área	Sólo isquemia	Sin isquemia
Zona subventricular (BrdU 50mg/kg ip diario X 14 d)		
1 día tras la última inyección de BrdU(14d) Lado derecho	3237.77 ± 179.14**	2301.64 ± 171.37
1 día tras la última inyección de BrdU(14d) Lado izquierdo	2361.49 ± 156.55	2094.06 ± 229.20
4 semanas tras la última inyección de BrdULado derecho	272.96 ± 32.66	222.07 ± 21.81
4 semanas tras la última inyección de BrdULado izquierdo	206.16 ± <13.00	191.86 ± 15.88
Flujo migratorio rostral (BrdU 50mg/kg ip diario X 14 d)		
1 día tras la última inyección de BrdU(14d) Lado derecho	1185 ± 197.65	869.2 ± 98.25
1 día tras la última inyección de BrdU(14d) Lado izquierdo	1008.75 ± 137.1	841.9 ± 230,4
4 semanas tras la última inyección de BrdULado derecho	38.15 ± 20,65	21.85 ± 6.55
4 semanas tras la última inyección de BrdU Lado izquierdo	18.75 ± 7.2	21.2 ± 5.2
Bulbo olfativo (BrdU 50mg/kg ip diario X 14 d)		
1 día tras la última inyección de BrdU(14d) Lado derecho	90,7 ± 8.6**	45.15 ± 7.4
1 día tras la última inyección de BrdU(14d) Lado izquierdo	48.45 ± 5.9	31.55 ± 8.45
4 semanas tras la última inyección de BrdU(42d) Lado derecho	11.4 ± 1.45	12.95 ± 2.6
4 semanas tras la última inyección de BrdU(42d) Lado izquierdo	8.85 ± 0,95	9.95 ± 2.85
Cuerpo abollonado (BrdU 50mg/kg ip diario X 14 d)		
1 día tras la última inyección de BrdU(14d) Lado derecho	55.11 ± 4.06	61.31 ± 4.49
1 día tras la última inyección de BrdU(14d) Lado izquierdo	57.00 ± 3.99	64.44 ± 4.13
4 semanas tras la última inyección de BrdU(42d) Lado derecho	30,20 ± 4.81	36.99 ± 2.73
4 semanas tras la última inyección de BrdU(42d) Lado izquierdo	29.80 ± 4.32	40,33 ± 3.72
Las densidades de nuevas células se presentan como la media de células BrdU positivas por mm ² ±SEM. Los valores difieren del grupo no isquémico, *p <0,05, **p < 0,01.		

Referencias

- Burke and Olson**, "Preparation of Clone Libraries in Yeast Artificial Chromosome Vectors" en *Methods in Enzymology*, Vol. 194, "Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology", eds. C. Guthrie and G. Fink, *Academic Press, Inc.*, Cap. 17, pp. 251-270 (1991).
- Capecchi**, "Altering the genome by homologous recombination" *Science* 244: 1288-1292 (1989).
- Davies et al.**, "Targeted alterations in yeast artificial chromosomes for interspecies gene transfer", *Nucleic Acids Research*, Vol. 20, N° 11, pp. 2693-2698 (1992).
- Dickinson et al.**, "High frequency gene targeting using insertional vectors", *Human Molecular Genetics*, Vol. 2, N° 8, pp. 1299-1302 (1993).
- Duff and Lincoln**, "Insertion of a pathogenic mutation into a yeast artificial chromosome containing the human APP gene and expression in ES cells", *Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders*, 1995.
- Huxley et al.**, "The human HPRT gene on a yeast artificial chromosome is functional when transferred to mouse cells by cell fusion", *Genomics*, 9: 742-750 (1991).
- Jakobovits et al.**, "Germ-line transmission and expression of a human-derived yeast artificial chromosome", *Nature*, Vol. 362, pp. 255-261 (1993).
- Lamb et al.**, "Introduction and expression of the 400 kilobase precursor amyloid protein gene in transgenic mice", *Nature Genetics*, Vol. 5, pp. 22-29 (1993).
- Pearson and Choi**, Expression of the human b-amyloid precursor protein gene from a yeast artificial chromosome in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993. 90: 10578-82.
- Rothstein**, "Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast" en *Methods in Enzymology*, Vol. 194, "Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology", eds. C. Guthrie and G. Fink, *Academic Press, Inc.*, Cap. 19, pp. 281-301 (1991).
- Schedl et al.**, "A yeast artificial chromosome covering the tyrosinase gene confers copy number-dependent expression in transgenic mice", *Nature*, Vol. 362, pp. 258-261 (1993).
- Strauss et al.**, "Germ line transmission of a yeast artificial chromosome spanning the murine $\alpha_1(I)$ collagen locus", *Science*, Vol. 259, pp. 1904-1907 (1993).
- Gilboa, E, Eglitis, MA, Kantoff, PW, Anderson, WF**: Transfer and expression of cloned genes using retroviral vectors. *BioTechniques* 4 (6): 504-512, 1986.
- Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC**: Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*, *Bio/Technology* 11: 905-910, 1993 Culver, 1998. Site-Directed recombination for repair of mutations in the human ADA gene. (Abstract) *Antisense DNA & RNA based therapeutics*, February, 1998, Coronado, CA.
- Huston et al**, 1991 "Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins" en *Methods in Enzymology* (JJ Langone, ed.; *Academic Press*, New York, NY) 203: 46-88.
- Johnson and Bird**, 1991 "Construction of single-chain Fvb derivatives of monoclonal antibodies and their production in *Escherichia coli*" en *Methods in Enzymology* (JJ Langone, ed.; *Academic Press*, New York, NY) 203: 88-99.
- Memmaugh and Memmaugh**, 1995 "An overview of phage-displayed recombinant antibodies" en *Molecular Methods In Plant Pathology* (RP Singh and US Singh, eds.; *CRC Press Inc.*, Boca Ratón, FL) pp. 359-365.

Referencias citadas en la descripción

- La lista de referencias citada por el solicitante lo es solamente para utilidad del lector, no formando parte de los documentos de patente europeos. Aún cuando las referencias han sido cuidadosamente recopiladas, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citado en la descripción

- US 4666828 A [0017]
- US 5192659 A [0017]
- 5 • US 4683202 A [0017]
- US 5272057 A [0017]
- US 4801531 A [0017]

Bibliografía no referida a patentes citada en la descripción

- 10 • Harrison's Principles of Internal Medicine. 1980, 1926 [0003]
- **SAMBROOK** *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989 [0017]
- 15 • **AUSUBEL** *et al.* Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley and Sons* [0017]
- **PERBAL**. A Practical Guide to Molecular Cloning. *John Wiley & Sons*, 1988 [0017]
- 20 • **WATSON** *et al.* Recombinant DNA. *Scientific American Books*, 1998 [0017]
- Genome Analysis: A Laboratory Manual Series. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1998, vol. 1-4 [0017]
- PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications. *Academic Press*, 1990 [0017]
- 25 • **TESTONI** *et al.* *Blood*, 1996, vol. 87, 3822 [0017]
- Basic and Clinical Immunology. *Appleton & Lange*, 1994 [0018]
- 30 • Selected Methods in Cellular Immunology. *W.H. Freeman and Co*, 1980 [0018]
- **BURKE; OLSON**. Preparation of Clone Libraries in Yeast Artificial-Chromosome Vectors. *Methods in Enzymology*, vol. 194 [0071]
- 35 • Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. *Academic Press, Inc*, 1991, 251-270 [0071]
- **CAPECCHI**. Altering the genome by homologous recombination. *Science*, 1989, vol. 244, 1288-1292 [0071]
- 40 • **DAVIES** *et al.* Targeted alterations in yeast artificial chromosomes for interspecies gene transfer. *Nucleic Acids Research*, 1992, vol. 20 (11), 2693-2698 [0071]
- **DICKINSON** *et al.* High frequency gene targeting using insertional vectors. *Human Molecular Genetics*, 1993, vol. 2 (8), 1299-1302 [0071]
- 45 • **DUFF; LINCOLN**. Insertion of a pathogenic mutation into a yeast artificial chromosome containing the human APP gene and expression in ES cells. *Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders* 1995 [0071]
- **HUXLEY** *et al.* The human HPRT gene on a yeast artificial chromosome is functional when transferred to mouse cells by cell fusion. *Genomics*, 1991, vol. 9, 742-750 [0071]
- 50 • **JAKOBOVITS** *et al.* Germ-line transmission and expression of a human-derived yeast artificial chromosome. *Nature*, 1993, vol. 362, 255-261 [0071]
- **LAMB** *et al.* Introduction and expression of the 400 kilobase precursor amyloid protein gene in transgenic mice. *Nature Genetics*, 1993, vol. 5, 22-29 [0071]
- 55 • **PEARSON; CHOI**. Expression of the human b-amyloid precursor protein gene from a yeast artificial chromosome in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 10578-82 [0071]
- 60 • **ROTHSTEIN**. Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. *Methods in Enzymology*, vol. 194 [0071]
- Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. *Academic Press, Inc*, 1991, 281-301 [0071]
- 65 • **SCHEDL** *et al.* A yeast artificial chromosome covering the tyrosinase gene confers copy number-dependent expression in transgenic mice. *Nature*, 1993, vol. 362, 258-261 [0071]

ES 2 313 895 T3

• **STRAUSS** *et al.* Germ line transmission of a yeast artificial chromosome spanning the murine $\alpha 1$ (I) collagen locus. *Science*, 1993, vol. 259, 1904-1907 [0071]

5 • **GILBOA**, E; **EGLITIS**, MA; **KANTOFF**, PW; **ANDERSON**, WF. Transfer and expression of cloned genes using retroviral vectors. *BioTechniques*, 1986, vol. 4 (6), 504-512 [0071]

• **CREGG JM**; **VEDVICK TS**; **RASCHKE WC**. Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*, 1993, vol. 11, 905-910 [0071]

10 • **CULVER**. Site-Directed recombination for repair of mutations in the human ADA gene. *Antisense DNA & RNA based therapeutics*, February 1998 [0071]

• Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. **HUSTON** *et al.* *Methods in Enzymology*. *Academic Press*, 1991, vol. 203, 46-88 [0071]

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Método de fabricación de un medicamento para el tratamiento de los pacientes que han sufrido daños neurológicos causados por accidente cerebro-vascular isquémico, en el que dicho medicamento incluye una cantidad farmacológicamente efectiva de un donador de óxido nítrico para su administración a un paciente respectivo, al comienzo del accidente cerebro-vascular isquémico o en las 24 horas siguientes, de forma que el donador de óxido nítrico active los receptores de glutamato y aumente el crecimiento neuronal en dicho paciente.

10 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho donador de óxido nítrico es un DETA-NONOato, PAPA-NONOato, S-nitroso-N-acetilpenicilamina, nitroprusido de sodio, nitroglicerina de sodio, L-arginina o un inhibidor de la fosfodiesterasa.

15 3. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho donador de óxido nítrico está formulado para su administración por vía inyectable.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

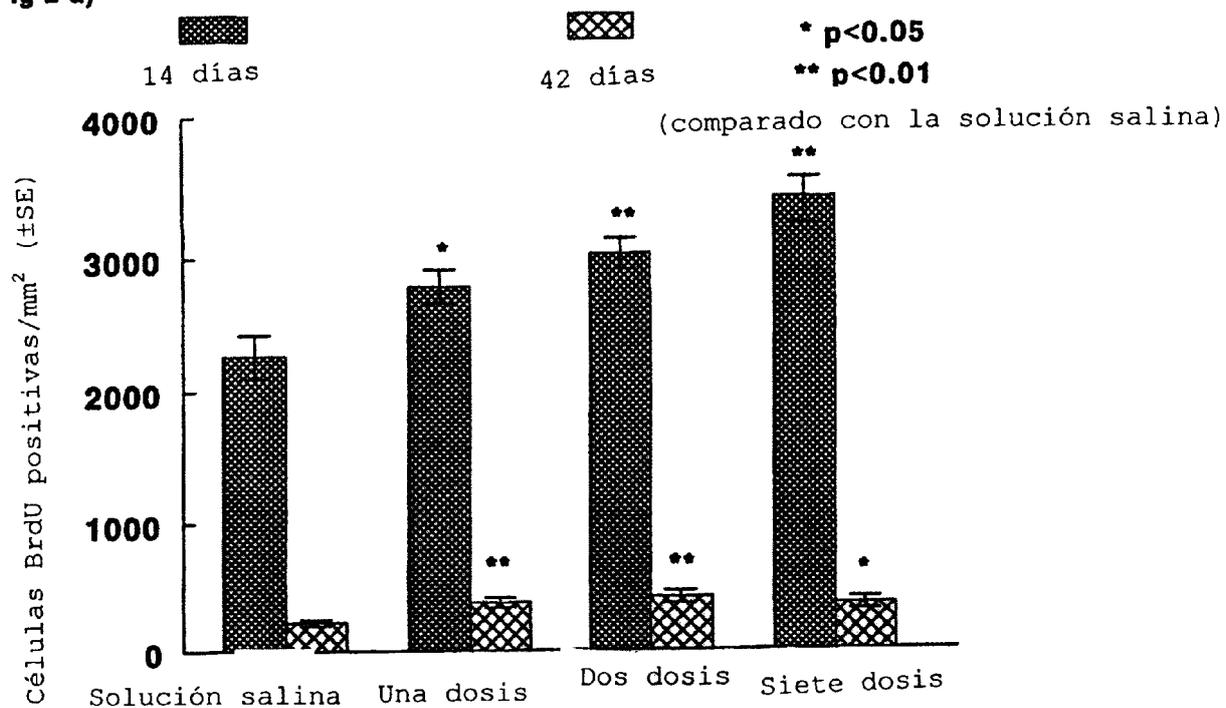


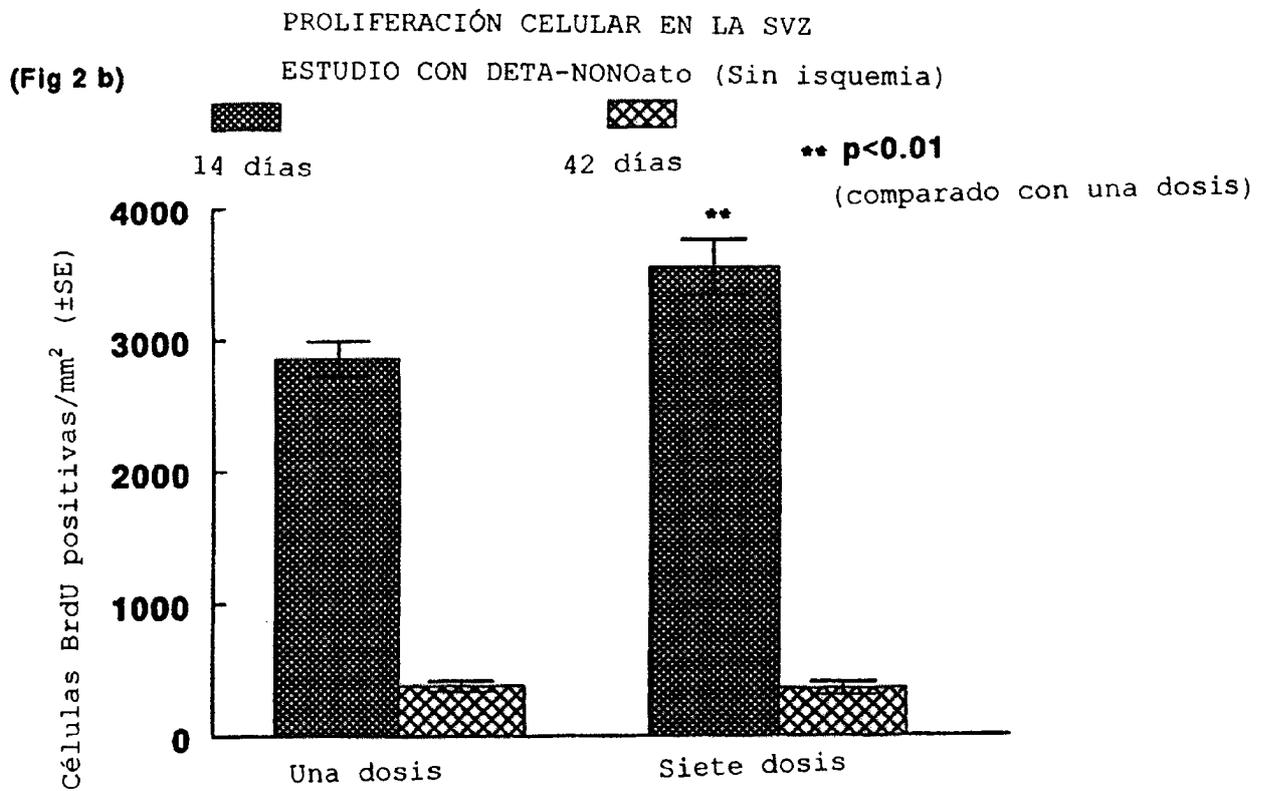
fig 1

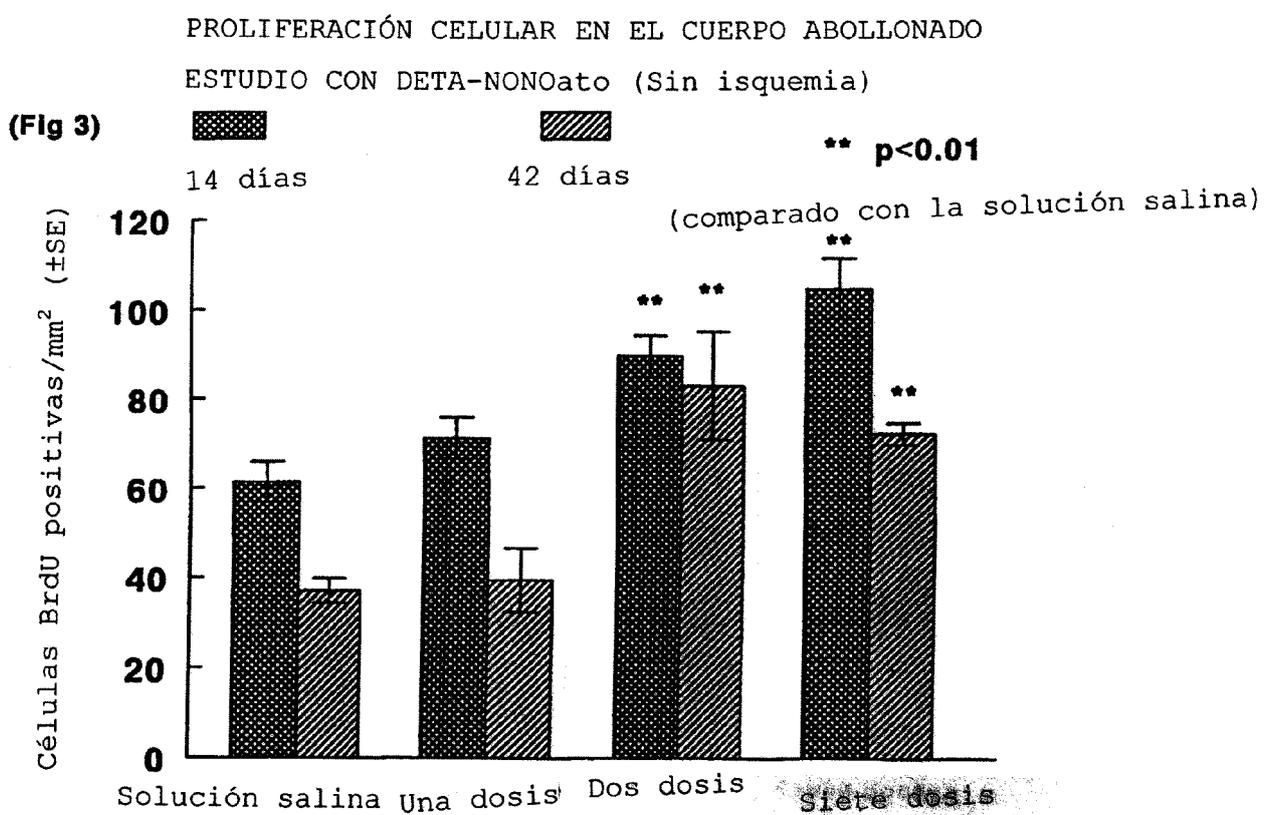
PROLIFERACIÓN CELULAR EN SVZ

ESTUDIO DETA-NONOato (Sin isquemia)

(Fig 2 a)







PROLIFERACIÓN CELULAR EN EL CUERPO ABOLLONADO
14 DÍAS

(Fig 4a)

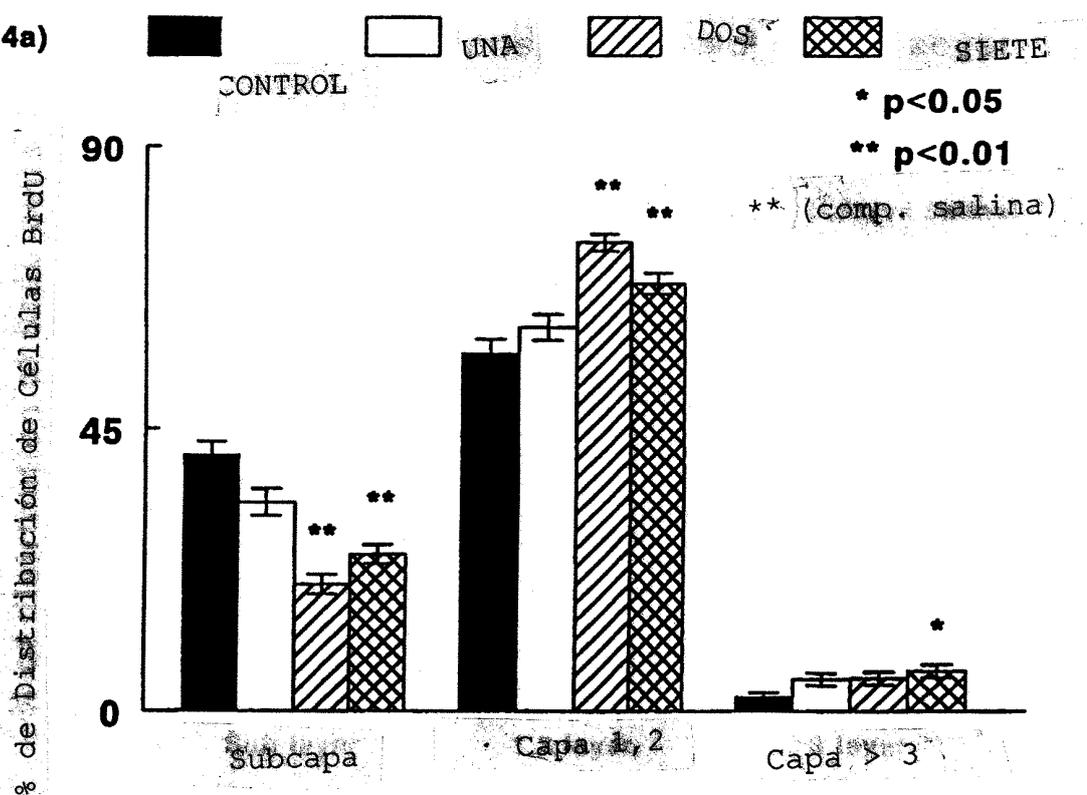
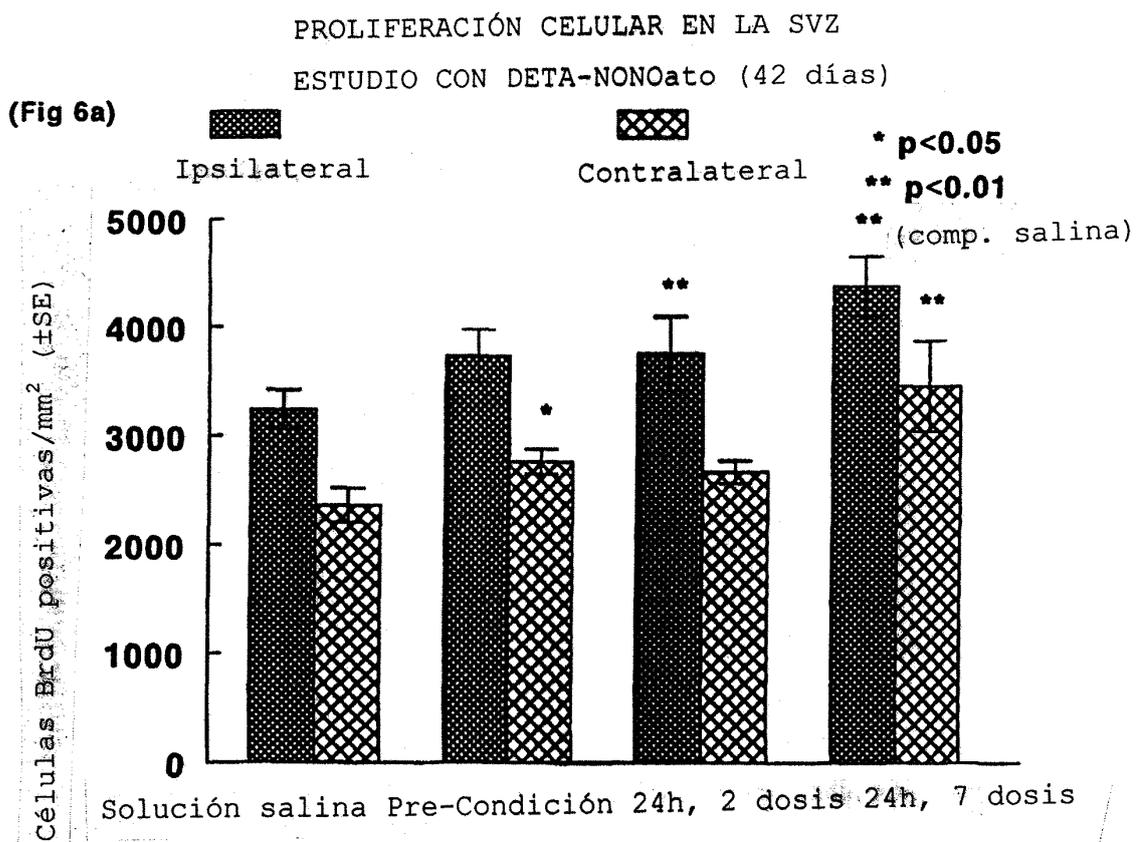
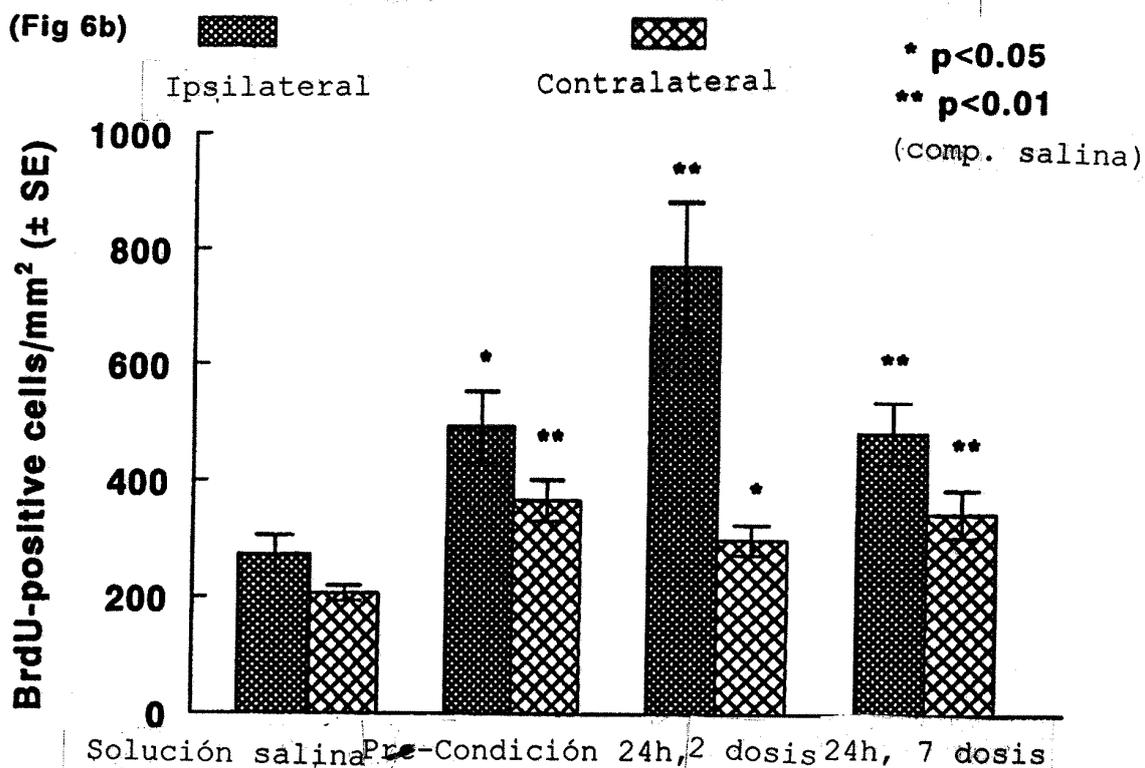


Fig 5



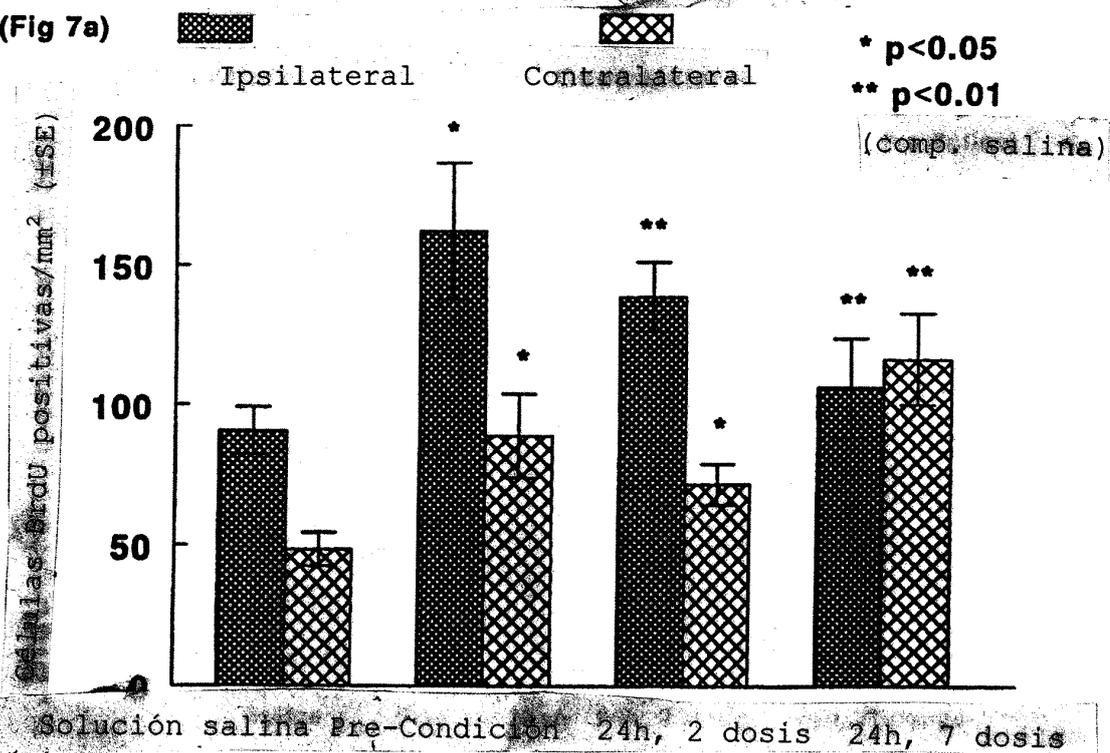


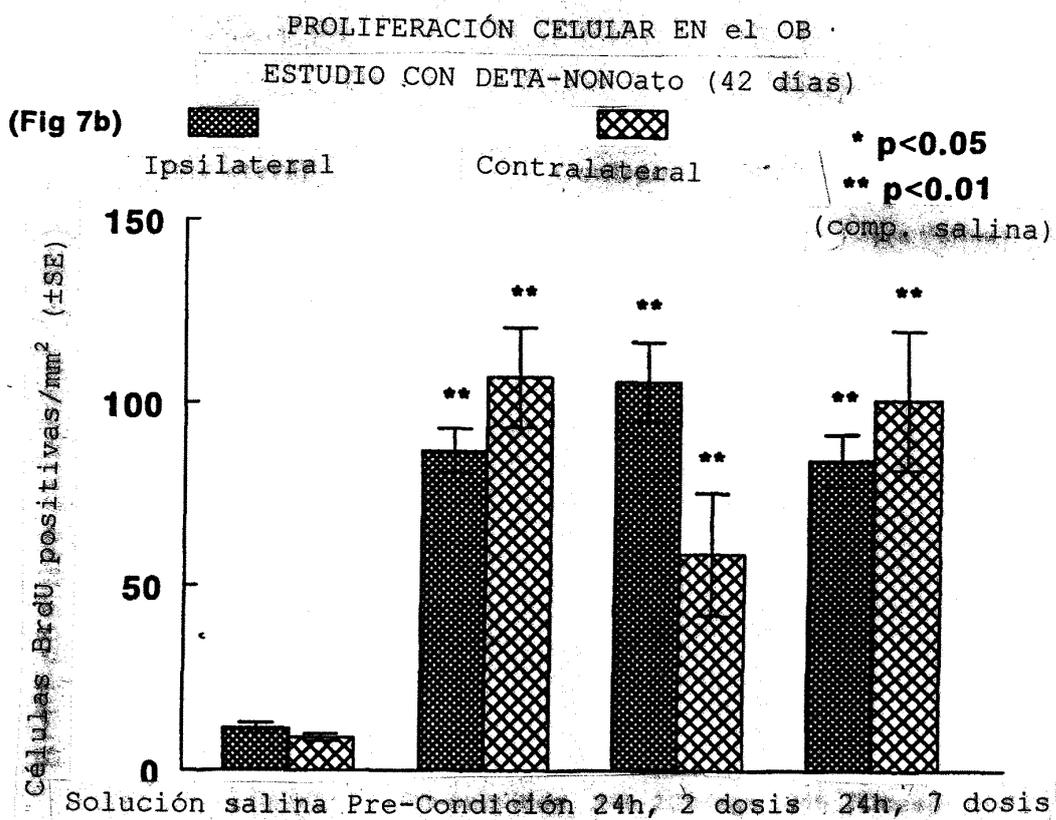
PROLIFERACIÓN CELULAR EN LA SVZ
ESTUDIO CON DETA-NONOato (42 días)

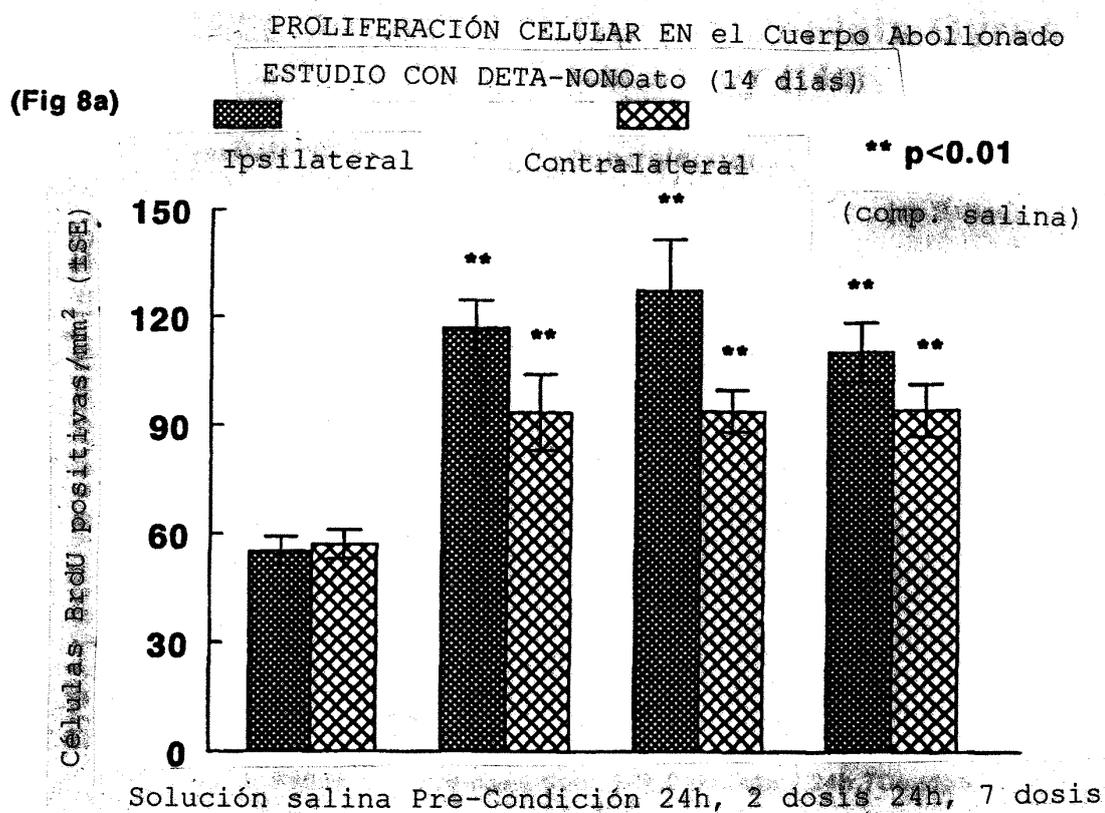


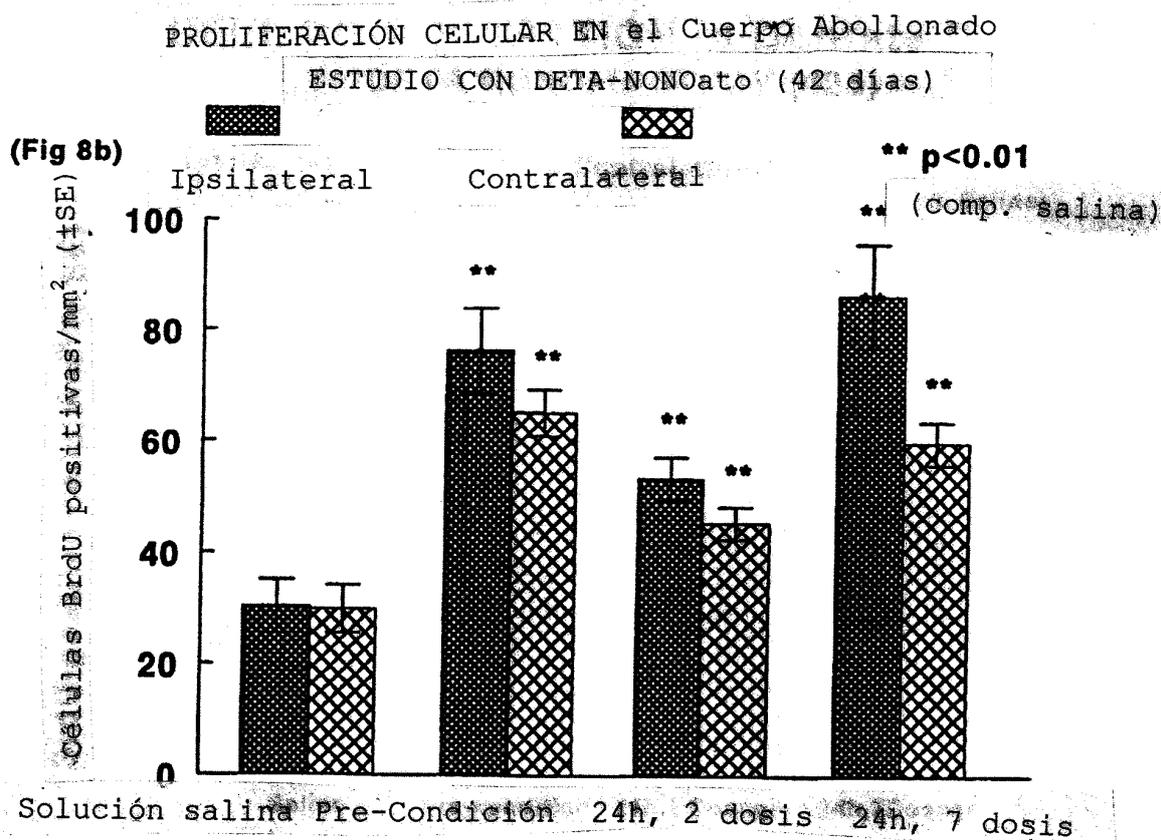
PROLIFERACIÓN CELULAR EN el OB
ESTUDIO CON DETA-NONOATO (14 días)

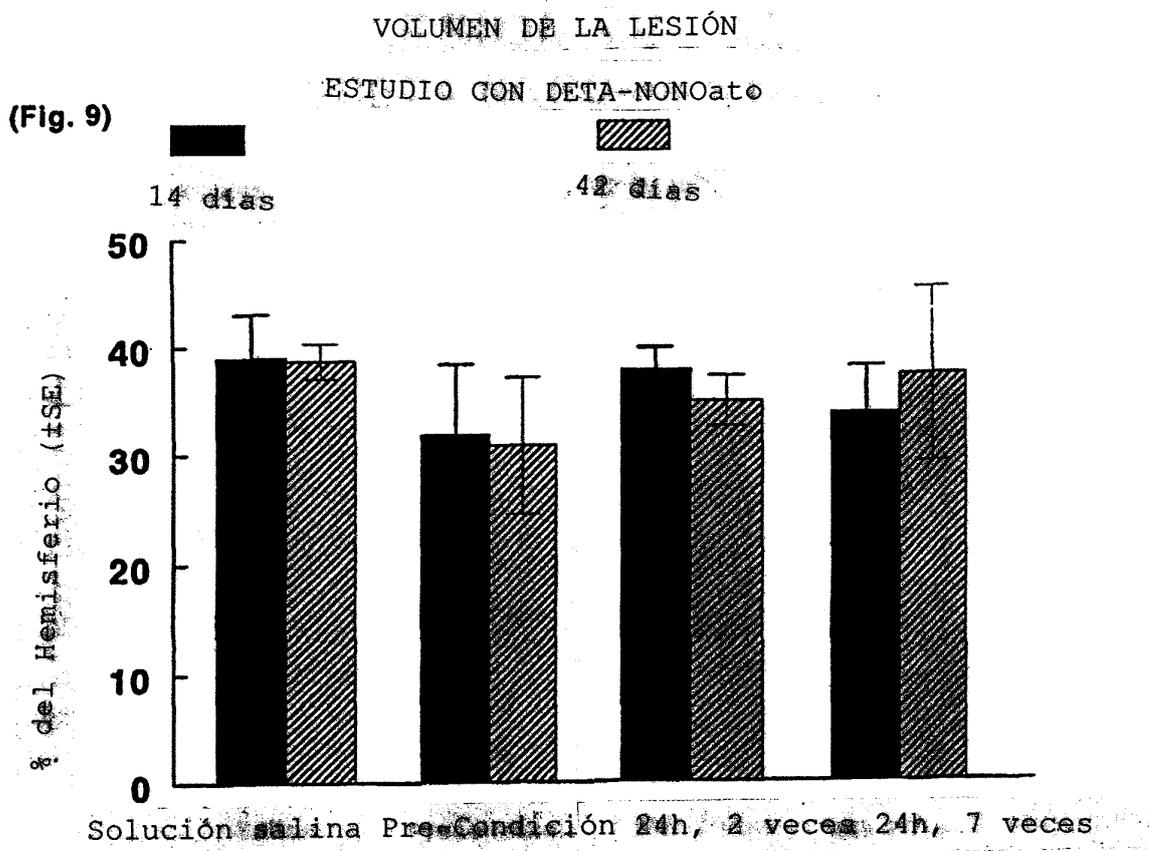
(Fig 7a)











TEST RETIRADA ADHESIVO

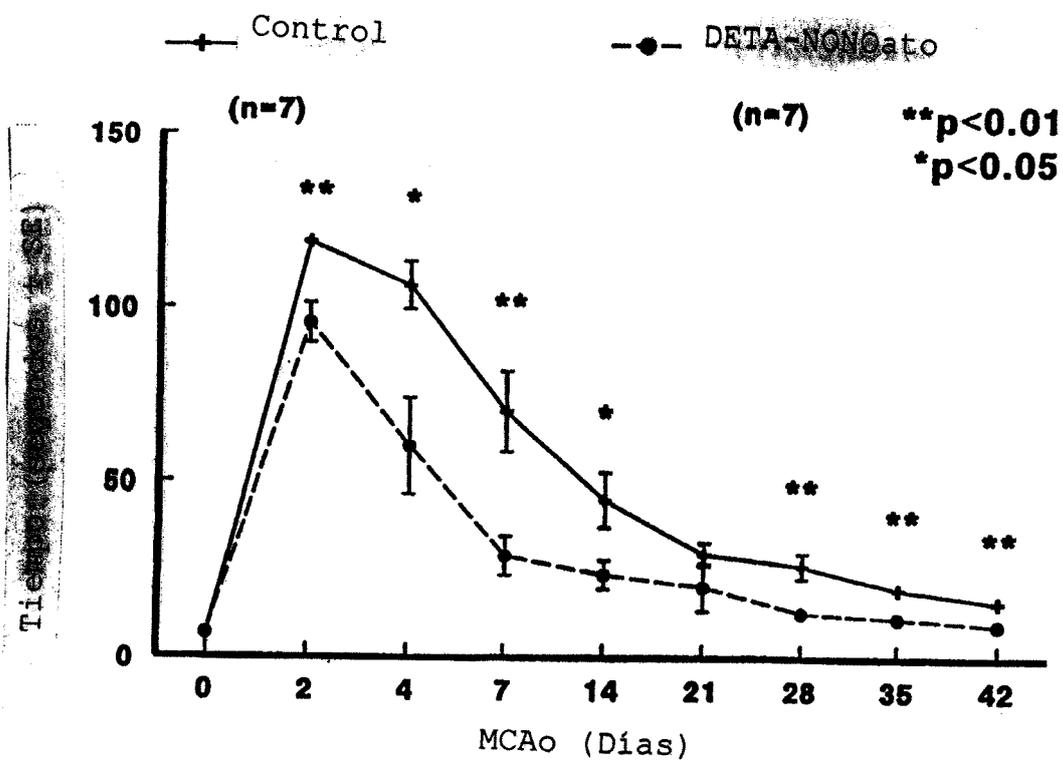


Fig 10

TEST DE ROTAROD

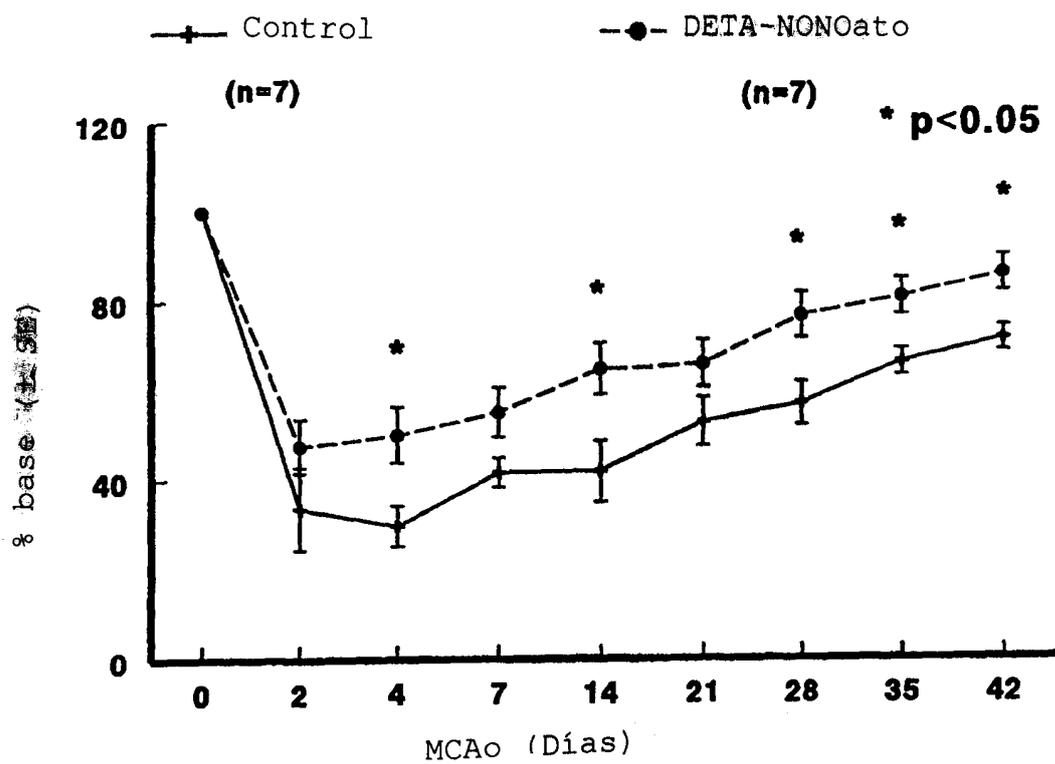


Fig 11

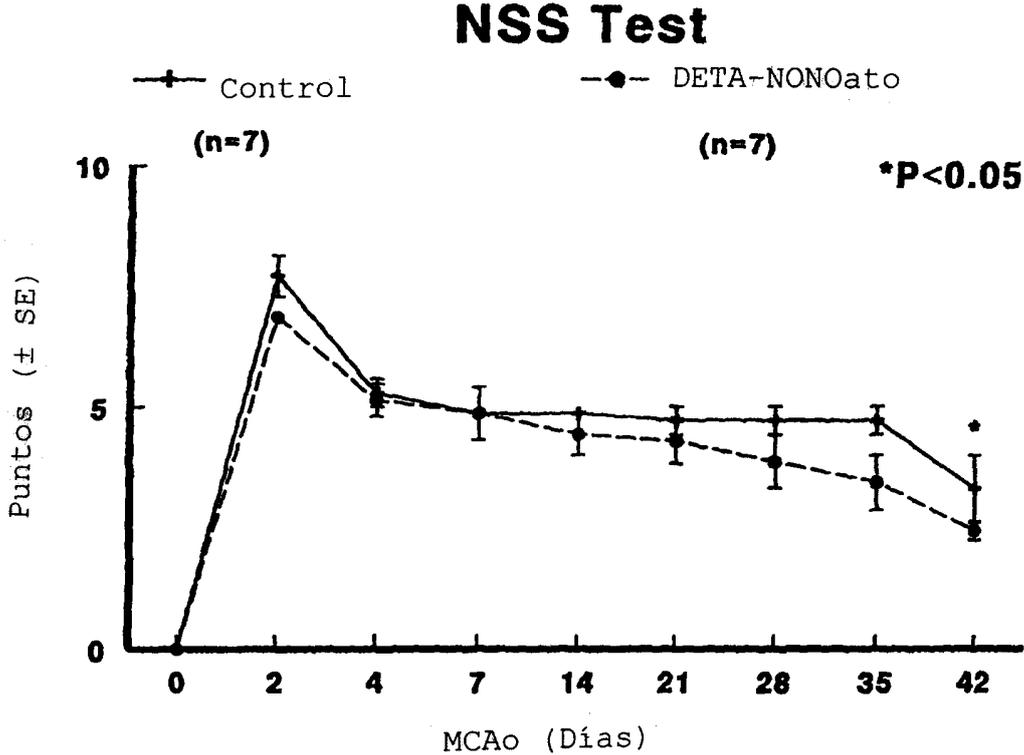
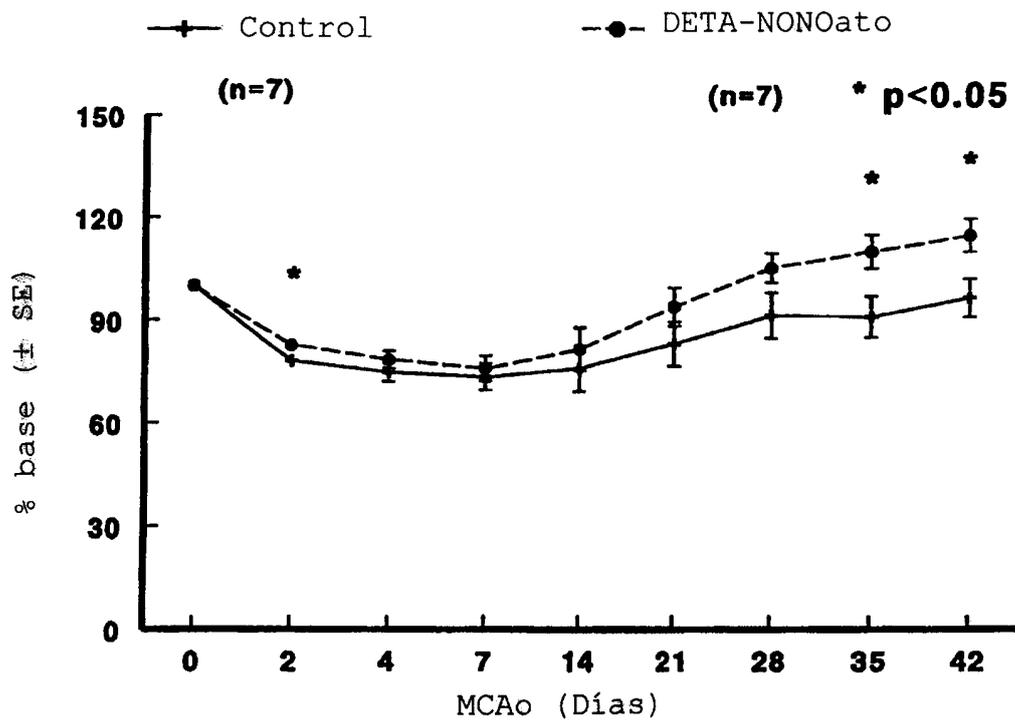


Fig 12

% EN PESO



F. 5 13

Test de ROTAROD

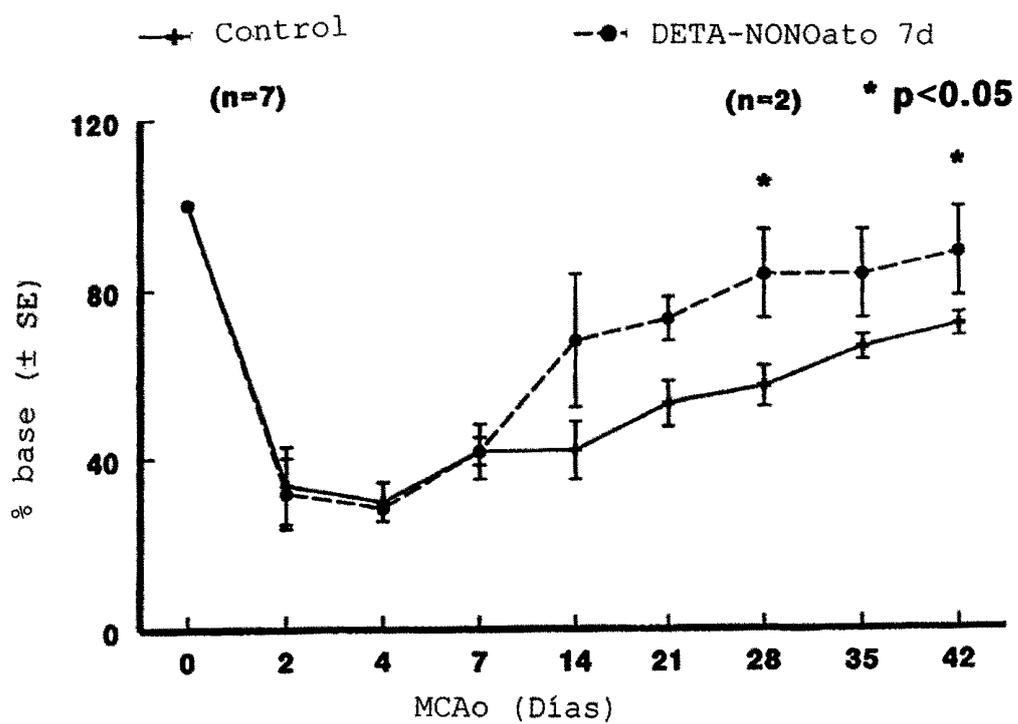


Fig 14

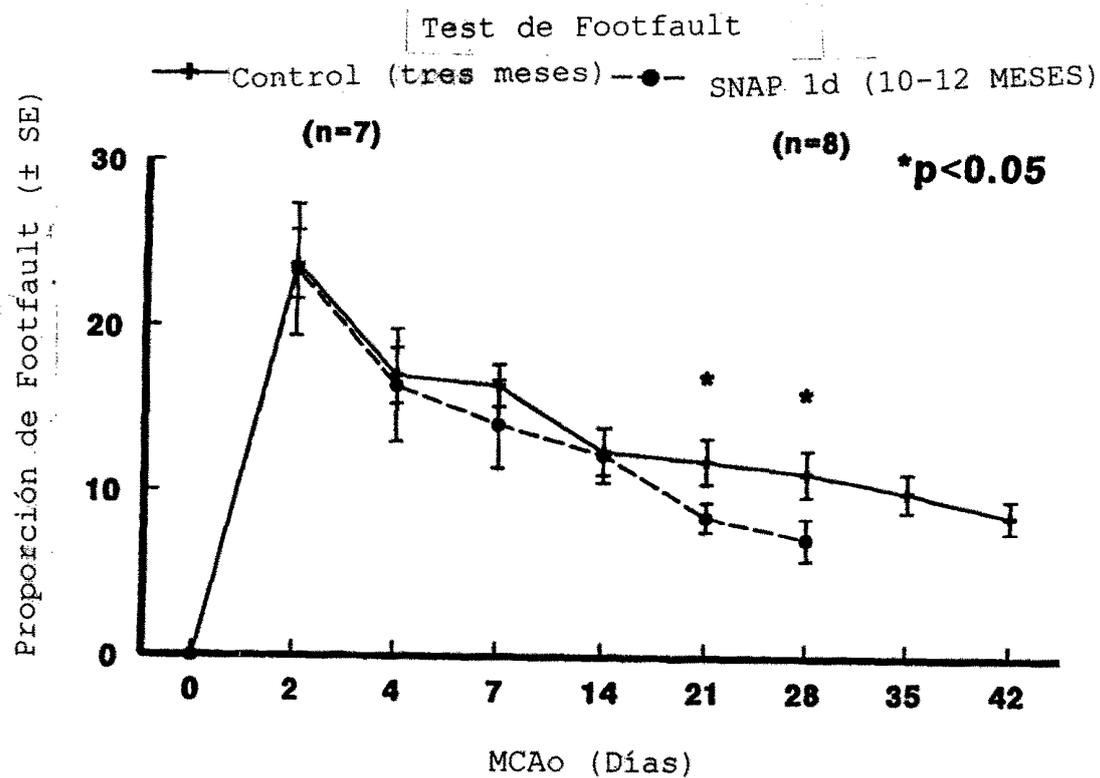


Fig 14

