

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 370**

21 Número de solicitud: 201130261

51 Int. Cl.:

C07K 14/575 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

28.02.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

12.02.2013

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN HOSPITAL NACIONAL DE
PARAPLÉJICOS PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA
INTEGRACIÓN (FUHNPAIIN) (100.0%)
FINCA LA PERALEDA, S/N
45071 TOLEDO ES**

72 Inventor/es:

**FERNÁNDEZ MARTOS, Carmen María y
RODRÍGUEZ MUÑOZ, Francisco Javier**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **USO DE UN AGONISTA DEL RECEPTOR OBRB PARA EL TRATAMIENTO DE
TRAUMATISMOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y/O DEL DOLOR NEUROPÁTICO.**

57 Resumen:

Uso de un agonista del receptor ObRb para el tratamiento de traumatismos del Sistema Nervioso Central y/o del dolor neuropático.

La presente invención se refiere al uso de un agonista del receptor ObRb o al uso de la leptina o al uso de la secuencia nucleotídica que la codifica, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de traumatismos del Sistema Nervioso Central (SNC) y/o del dolor neuropático, preferiblemente para el tratamiento de la Lesión Medular Espinal (LME). También se refiere al uso de un kit que comprende un agonista del receptor ObRb o la leptina o la secuencia nucleotídica que la codifica, en una forma adecuada para su administración en el tratamiento de traumatismos del Sistema Nervioso Central (SNC) y/o del dolor neuropático.

ES 2 395 370 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de un agonista del receptor ObRb para el tratamiento de traumatismos del Sistema Nervioso Central y/o del dolor neuropático.

5 La presente invención pertenece al campo de la Biomedicina y se refiere al uso de un agonista del receptor ObRb o al uso de la leptina o al uso de la secuencia nucleotídica que la codifica, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de traumatismos del Sistema Nervioso Central (SNC) y/o del dolor neuropático, preferiblemente para el tratamiento de la Lesión Medular Espinal (LME). También se refiere al uso de un kit que comprende un agonista
10 del receptor ObRb o la leptina o la secuencia nucleotídica que la codifica, en una forma adecuada para su administración en el tratamiento de traumatismos del Sistema Nervioso Central (SNC) y/o del dolor neuropático.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 La leptina, el producto del gen ob, es una proteína glicosilada de 16 KDa producida mayoritariamente por el tejido adiposo blanco (Zhang y colaboradores (cols.) 1994. Nature (Lond.) 371:425-432), que fue descubierta en el contexto de sus efectos sobre el control de la alimentación y el balance del gasto energético (Friedman y Halaas 1998 Nature. 22; 395 (6704):763-70).
20 La leptina actúa por unión a sus receptores los cuales son miembros de la familia de receptores de citoquina de clase I. Actualmente han sido identificados 6 tipos de receptores incluyendo la forma larga (LEPRb u ObRb), capaz de transmitir la señal porque contiene una región *Box 2* que permite la
25 activación de la proteína Janus Kinasa 2 (JAK2) y las isoformas cortas (LEPRa y LEPRc-f) que han sido relacionadas con el transporte del ligando en plasma y líquido cefalorraquídeo (LCR), si bien son numerosos los trabajos que ponen de manifiesto el desconocimiento exacto de su función.

30 Aunque inicialmente se pensó que la leptina actuaba solamente sobre ciertos centros hipotalámicos, en la actualidad le ha sido asignada una mayor diversidad de funciones. Así, numerosos estudios han permitido comprobar que

la leptina participa en la regulación de procesos biológicos tales como reproducción, crecimiento, función inmune, tono vascular y probablemente muchos otros aún por determinar. Por otra parte, la leptina se ha asociado con un amplio número de procesos patológicos, entre los que se incluyen cáncer, enfermedades psiquiátricas, hipertensión arterial, diabetes mellitus no insulino dependiente, trastornos reproductivos, insuficiencia placentaria, inmunodeficiencias y osteoartritis.

En cuanto a la leptina como señal promotora de la supervivencia neuronal y del conocimiento, se ha descrito que la leptina puede alterar la función neuronal y sináptica, así como la estructura de áreas del cerebro no implicadas en la homeostasis energética, y es además capaz de influir en la supervivencia y la proliferación neuronal. De esta manera, la leptina está asociada a una mejora en el aprendizaje, en la memoria y en otras formas de conocimiento, así como en la resistencia a lesiones que afecten la capacidad cognitiva. Esto se relaciona con el hecho de que la ausencia de leptina impide el desarrollo de la LTP (del inglés "*long term potentiation*") y la LTD (del inglés "*long term depression*") en neuronas hipocampales CA1. De igual forma, también se relaciona con el hecho de que la leptina aumenta la elevación en el calcio intracelular inducido por NMDA (N-metil D-aspartato) y facilita la transmisión sináptica mediada por el receptor NMDA (Morrison CD, 2009. *Biochim Biophys Acta*.1792 (5):401-8).

En cuanto a los efectos de la leptina en la estructura y la plasticidad neuronal, se ha descrito que la ausencia de leptina reduce la densidad de proyecciones axonales, y que este defecto puede ser corregido mediante el tratamiento con leptina durante un periodo crítico de la vida posnatal. De igual forma, se ha descrito que la leptina es capaz de promover el crecimiento neurítico, así como de aumentar la complejidad del árbol neurítico. En neuronas hipocampales, la leptina puede aumentar la movilidad y la densidad de los filopodios dendríticos, y en neuronas de la corteza cerebral puede estimular la morfogénesis del cono de crecimiento. Por último, la leptina puede influir en el número de sinapsis

tanto inhibitorias como estimuladoras (Morrison CD, 2009. *Biochim Biophys Acta*.1792 (5):401-8).

5 En cuanto a los efectos de la leptina en la supervivencia y la proliferación neuronal, se han descrito los efectos neuroprotectores de la leptina en células no neurales, incluyendo células cancerosas, y la leptina ha demostrado ser capaz de inhibir la muerte celular por apoptosis. En cultivos de neuronas, la leptina atenúa la muerte celular inducida por la retirada de suero o neurotrofinas, aumenta la supervivencia en modelos de isquemia, protege de la
 10 excitotoxicidad glutamatérgica, protege del estrés oxidativo y promueve la proliferación de las células progenitoras del hipocampo. Estos efectos de la leptina *in vitro* se replican en experimentos *in vivo* que demuestran que la leptina atenúa la pérdida de neuronas dopaminérgicas en un modelo químicamente inducido de la enfermedad de Parkinson, que los ratones deficientes en leptina son más sensibles a la oclusión de la arteria cerebral
 15 media pero que el tratamiento con leptina disminuye el volumen del infarto, y que la leptina reduce los síntomas de las lesiones epilépticas. Estos efectos de la leptina parecen deberse a la activación de cascadas de señalización intracelular asociadas a la señalización de factores de crecimiento, incluyendo
 20 la activación de STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), PI3K/Akt (*Phosphatidylinositol 3 kinase*) y MAPK/ERK (*Mitogen-Activated Protein Kinase/ Extracellular signal-Regulated Kinase*) (Morrison CD, 2009. *Biochim Biophys Acta*.1792 (5):401-8).

25 También se ha descrito la relación entre la leptina y la función cognitiva. Existe evidencia directa del efecto del tratamiento con leptina para mejorar la habilidad cognitiva en roedores, que implica especialmente al hipocampo, ya que inyecciones locales de leptina en el hipocampo han demostrado mejorar la retención de recuerdos (Morrison CD, 2009. *Biochim Biophys Acta*.1792
 30 (5):401-8).

En la solicitud de patente US2010210536 se describe el uso terapéutico y profiláctico del fragmento de la leptina 22-56 para el tratamiento del cáncer, las enfermedades autoinmunes, las enfermedades fibróticas, las enfermedades inflamatorias, las enfermedades neurodegenerativas, las enfermedades infecciosas, las enfermedades de pulmón, las de corazón, las enfermedades vasculares y las enfermedades metabólicas. Entre las enfermedades neurodegenerativas, este documento describe la LME, aunque no presente ningún resultado que avale el efecto beneficioso del fragmento de la leptina 22-56 en el tratamiento de la LME.

10

La solicitud de patente WO2008115880 describe el uso de la leptina para el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Parkinson. Los autores de este documento describen la capacidad de la leptina para impedir la pérdida de las neuronas dopaminérgicas que caracteriza la enfermedad de Parkinson, en modelos animales.

15

La patente US6518235 describe el uso de la leptina para el tratamiento o la prevención de déficits cognitivos tales como los asociados a la enfermedad de Alzheimer.

20

Con respecto a la LME, existen numerosos trabajos que proponen el estudio de los niveles de leptina en suero para conocer los niveles de grasa corporal en individuos que han sufrido una LME. Gezici y colaboradores han estudiado los niveles de leptina en el suero de ratas a las 2, 6, 12 y 24 horas después de sufrir una LME cervical o torácica, y encuentran que dichos niveles se elevan después del trauma. Estos autores asocian dicha elevación a la activación del sistema nervioso simpático en respuesta al estrés generado como respuesta al trauma y a la activación de las vías de señalización del dolor originado por causa de la lesión (Gezici y cols, 2009 The Journal of Spinal Cord Medicine. 32 (4): 416:421). Sin embargo, ninguno de estos trabajos demuestra, y ni siquiera insinúa, que la leptina sea útil para e tratamiento de traumatismos del SNC.

30

Incluso, se ha descrito que la leptina contribuye al dolor neuropático en un modelo animal de lesión por constricción del nervio ciático. Lim y colaboradores han descrito que la administración de un antagonista de la leptina en la médula espinal previene y revierte el dolor neuropático en ratas. Estos autores describen que tanto la leptina como su receptor largo se expresan en mayores niveles en el cuerno dorsal de la médula espinal ipsilateral tras la lesión de nervio periférico y que la leptina empeora el dolor neuropático asociado a una lesión en el nervio ciático (Lim y cols, 2009 J Clin Invest. 119(2):295-304).

Minelli y colaboradores describen la capacidad neuroprotectora del dipéptido cíclico endógeno llamado ciclo (His-Pro) en LME. El dipéptido cíclico presenta una importante actividad neuroprotectora en múltiples modelos animales de lesión cerebral traumática y es capaz de atenuar tanto la muerte celular por necrosis como por apoptosis, *in vitro*. Este dipéptido es también neuroprotector en modelos de daño por glutamato, por falta de factores tróficos, por privación de oxígeno y glucosa, y por toxicidad provocada por el beta-amiloide, entre otros (Minelli y cols, 2008 Amino Acids., 35(2):283-9).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al uso de un agonista del receptor ObRb o al uso de la leptina o al uso de la secuencia nucleotídica que la codifica, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de traumatismos del Sistema Nervioso Central (SNC) y/o del dolor neuropático, preferiblemente para el tratamiento de la Lesión Medular Espinal (LME).

Los autores de la presente invención han demostrado que el tratamiento con leptina mejora la recuperación de la función motora en un modelo de lesión medular en rata. Además, han demostrado que el tratamiento con leptina disminuye el dolor neuropático asociado a la lesión.

Los autores de la presente invención han demostrado que el tratamiento con leptina disminuye la activación microglial y preserva la sustancia blanca en el epicentro de la lesión.

5 El tratamiento con leptina de ratas lesionadas por contusión de la médula espinal, activa vías moleculares de supervivencia celular, que son las responsables del efecto neuroprotector de la molécula. Además, la leptina disminuye la inflamación y podría promover remielinización y regeneración de los axones dañados.

10

Actualmente no existe una terapia neuroprotectora eficaz para la LME, por lo que la presente invención aporta un tratamiento que podría mejorar sensiblemente la calidad de vida de las personas afectadas por este tipo de lesiones.

15

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de un agonista del receptor ObRb para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de traumatismos del SNC y/o del dolor neuropático. Preferiblemente, el tratamiento de una LME. Preferiblemente, para el tratamiento del traumatismo craneoencefálico. Preferiblemente, para el tratamiento del dolor neuropático. Más preferiblemente, para el tratamiento del dolor neuropático asociado a una LME. Aún más preferiblemente, para favorecer la recuperación motora tras la LME y/o para disminuir la hiperalgesia y/o la alodinia asociadas a la LME.

20

25

En una realización preferida de la presente invención, la LME es causada por contusión.

30

El término “agonista”, tal y como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier molécula capaz de inducir o promover, directa o indirectamente, la actividad biológica de la leptina o la activación del receptor ObRb de la leptina. La expresión “actividad biológica de la leptina”, tal y como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier actividad que ocurra como resultado

de la unión de la leptina a su receptor ObRb. La activación de dicho receptor ObRb y por tanto las moléculas que pueden considerarse agonistas de ObRb, pueden determinarse mediante ensayos como aquellos descritos en WO 2009/108340.

5

El término “traumatismos”, tal y como se emplea en la presente memoria, se refiere a un daño físico del SNC. El tratamiento de la LME es necesario en las lesiones originadas por un trauma (como una contusión originada por un golpe o una caída, una herida por arma de fuego o arma blanca) o por otro tipo de causas que también pueden ocasionar un daño físico: tumores (como los meningiomas, ependimomas, astrocitomas o metástasis), isquemia (trombosis, aneurismas, arterioesclerosis), malformaciones vasculares, ataxias, esclerosis múltiple o espina bífida, entre otros. El tratamiento de la LME puede ser preventivo, es decir, puede realizarse antes de que se desarrolle la lesión, para evitarla o para minimizar su progresión.

10

15

El dolor neuropático es una patología asociada a lesiones del sistema nervioso tanto central como periférico, en la que la percepción del dolor está alterada. Por un lado ocurre que, estímulos normales son percibidos como dolorosos, lo que se denomina alodinia y, por otro, estímulos dolorosos son percibidos exageradamente, lo que se denomina hiperalgesia. Uno de los síntomas de la LME es el dolor neuropático asociado.

20

En una realización preferida de la presente invención, el agonista del receptor ObRb es la leptina o una variante biológicamente activa de la leptina.

25

La expresión “una variante biológicamente activa”, tal y como se emplea en la presente memoria, se refiere a una molécula con la misma actividad y la misma función que la molécula descrita, que puede presentar ligeras variaciones con respecto a la molécula descrita sin que dichas variaciones aporten ningún efecto técnico añadido a dicha molécula. La variante biológicamente activa de la leptina puede tener una secuencia aminoacídica diferente de la de la leptina,

30

pero siempre tendrá un mínimo % de identidad con la leptina, puesto que se trata de una proteína que puede considerarse leptina, aunque puede ser de una especie animal diferente, o presentar algunas modificaciones postraduccionales.

5

En una realización preferida de la presente invención, la leptina o la variante biológicamente activa de la leptina es una proteína con actividad agonista del receptor ObRb y cuya secuencia aminoacídica comprende una secuencia aminoacídica con al menos un 81% de identidad con SEQ ID NO: 1, preferiblemente al menos un 95% de identidad y más preferiblemente un 99% de identidad. En una realización más preferida de la presente invención, la proteína es SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 1 es la secuencia aminoacídica de la leptina humana que figura en la base de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) con el número de referencia NP_000221.1.

El término “% de identidad” con respecto a un polipéptido o proteína, se refiere al porcentaje de aminoácidos de la secuencia en cuestión que son idénticos a los aminoácidos de la secuencia con la que se compara, después de alinear dichas secuencias y de introducir espacios, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad, sin tener en cuenta las sustituciones conservadoras. El alineamiento puede llevarse a cabo de distintas formas, conocidas por el experto en la materia, como por ejemplo usando las herramientas públicas como son los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Un experto en la materia puede determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo los algoritmos necesarios para alcanzar el máximo alineamiento de las secuencias que se comparan. En el presente documento, el % de identidad se calcula dividiendo el número de aminoácidos que son idénticos después de alinear SEQ ID NO: 1 y la secuencia candidata, entre el número total de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y multiplicando el resultado por 100. En el caso de una secuencia

nucleotídica, el “% de identidad” se calcula de igual manera aunque se comparan nucleótidos.

5 Tabla 1. Porcentajes de identidad entre las secuencias nucleotídicas que codifican para la leptina y las secuencias aminoacídicas de la leptina de distintas especies en comparación con las secuencias de humano.

| especie | proteína | | ADN | |
|-------------------------------|----------------|--------------------------|----------------|--------------------------|
| | % identidad | aminoácidos idénticos | % identidad | nucleótidos idénticos |
| <i>Homo sapiens</i> | 100 | 167/167 | 100 | 504/504 |
| <i>Pan troglodytes</i> | 99 | 166/167 | 99 | 500/504 |
| <i>Macaca mulatta</i> | 90 | 150/167 | 95 | 476/504 |
| <i>Bostaurus</i> | 85 | 141/167 | 88 | 444/504 |
| <i>Equus caballus</i> | 89 | 147/167 | 90 | 455/504 |
| <i>Canis lupus familiaris</i> | 81 | 134/167 | 88 | 444/504 |
| <i>Feliscatus</i> | 85 | 141/167 | 89 | 449/504 |
| <i>Rattusnorvegicus</i> | 83 | 137/167 | 85 | 433/504 |
| <i>Mus musculus</i> | 84 | 139/167 | 84 | 428/504 |

10 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere al uso de una secuencia nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica:

- i) con al menos un 84% de identidad con SEQ ID NO: 2,
- ii) que codifica para una secuencia aminoacídica con al menos un 81% de identidad con SEQ ID NO: 1 y con actividad agonista del receptor ObRb, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de traumatismos del Sistema Nervioso Central (SNC) y/o del dolor neuropático.

15

Preferiblemente, la secuencia nucleotídica comprende SEQ ID NO: 2. Preferiblemente, la secuencia nucleotídica es un vector de expresión.

SEQ ID NO: 2 es la secuencia nucleotídica que codifica para la leptina humana que figura en la base de datos NCBI con el número de referencia NM_000230.2.

5 Un vector es una molécula de ácido nucleico usada para transferir material genético a una célula. Aparte de dicho material genético, un vector también puede contener diferentes elementos funcionales que incluyen elementos de control de la transcripción, como promotores u operadores, regiones o potenciadores de la unión a factores de transcripción, y elementos de control para iniciar y terminar la traducción. Los vectores incluyen, pero no se limitan a: 10 plásmidos, cósmidos, virus, fagos, casetes de expresión recombinantes y transposones. Algunos vectores son capaces de replicarse o dividirse autónomamente una vez que son introducidos en la célula huésped, como los vectores bacterianos con un origen de replicación bacteriano o los vectores episomales de mamíferos. Un vector de expresión es aquel capaz de dirigir la expresión de genes a los que se ha ligado de manera operativa. Un vector de expresión se usa para la traducción y la transcripción de un gen de interés, normalmente controlado por un promotor. Un promotor es una secuencia de nucleótidos que controla la traducción del gen de interés. El promotor está 20 operativamente unido al gen de interés. "Operativamente unido" se refiere a la relación funcional y a la localización de la secuencia del promotor con respecto al gen de interés.

25 Un tercer aspecto de la presente invención se refiere al uso de una composición farmacéutica (en adelante llamada composición de la invención) que comprende un agonista del receptor ObRb para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de traumatismos del Sistema Nervioso Central (SNC) y/o del dolor neuropático.

30 Preferiblemente, la composición farmacéutica comprende al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un “excipiente” es un componente de una composición farmacéutica que no es un compuesto activo sino un diluyente, un vehículo o un relleno, entre otros, que se considera “farmacéuticamente aceptable” cuando es seguro, no es tóxico y no presenta efectos adversos. El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción del compuesto, lo estabiliza o ayuda a la preparación del medicamento en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados aquí.

15

El término excipiente “farmacológicamente aceptable” o “farmacéuticamente aceptable” hace referencia a que el excipiente esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra. Además, el excipiente debe ser farmacéuticamente adecuado, es decir, debe permitir la actividad de los compuestos de la composición farmacéutica, es decir, debe ser compatible con dichos componentes

20

25

El “vehículo” o “portador”, es preferiblemente una sustancia inerte. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea en el medicamento para diluir cualquiera de los componentes de la composición farmacéutica de la presente invención hasta un volumen o peso determinado; o bien que aún sin diluir dichos componentes es capaz de permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

30

En una realización preferida de la presente invención, la composición comprende otro principio activo. Además del requerimiento de la eficacia terapéutica, que puede necesitar el uso de otros agentes terapéuticos, pueden
5 existir razones fundamentales adicionales que obligan o recomiendan en gran medida el uso de una combinación de un compuesto de la invención y otro agente terapéutico. El término "principio activo" es toda materia, cualquiera que sea su origen humano, animal, vegetal, químico o de otro tipo a la que se atribuye una actividad apropiada para constituir un medicamento.

10

En cada caso la forma de presentación del medicamento se adaptará al tipo de administración utilizada. Por ello, la composición de la invención se puede presentar bajo la forma de soluciones o cualquier otra forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente efectiva. La
15 composición farmacéutica de la invención se puede formular en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimido, cápsula, polvo, gránulo, ungüento, solución, supositorio, inyección, inhalante, gel, microesfera o aerosol. Según una realización aún más preferida de la presente invención, la composición farmacéutica se presenta en una forma adaptada a la
20 administración oral o parenteral.

20

La forma adaptada a la administración oral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración oral. Dicha forma adaptada a la administración oral se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, gotas, jarabe,
25 tisana, elixir, suspensión, suspensión extemporánea, vial bebible, comprimido, cápsula, granulado, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco o liofilizado.

25

La forma adaptada a la administración parenteral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración inyectable, es decir, preferiblemente en
30 estado líquido. La administración parenteral se puede llevar a cabo por vía de administración intramuscular, intraarterial, intravenosa, intradérmica,

30

subcutánea o intraósea pero sin limitarse únicamente a estos tipos de vías de administración parenteral.

5 En una realización preferida de la presente invención, la administración del medicamento es parenteral. En una realización preferida de la presente invención, la administración del medicamento es sistémica.

10 Otra posibilidad es que la composición farmacéutica se presente en una forma adaptada a la administración sublingual, nasal, intratecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica o inhalada.

15 Preferiblemente, la administración del medicamento tiene lugar en las primeras 72 horas desde que ocurre la LME. Más preferiblemente, la administración tiene lugar en las primeras 24 horas desde que ocurre la LME.

20 Una realización preferida de la presente invención es el uso del agonista del receptor ObRb según el primer aspecto de la invención o de la composición farmacéutica de la invención, donde se administra una dosis de agonista del receptor ObRb de entre 0,5 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por día. Preferiblemente, la dosis es de entre 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por día.

25 Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un kit que comprende un agonista del receptor ObRb para el tratamiento del traumatismo del SNC y/o del dolor neuropático.

30 Un quinto aspecto de la presente invención se refiere al uso de cualquiera de los kits según el cuarto aspecto de la invención para el tratamiento del traumatismo del SNC y/o del dolor neuropático, preferiblemente para el tratamiento de la LME y/o del dolor neuropático asociado a la LME.

Una realización preferida es el uso de un agonista del receptor ObRb para el tratamiento del dolor neuropático asociado a una LME que se administra por vía parenteral en las primeras 72 horas desde que ocurre la LME.

- 5 Otra realización preferida es el uso de la leptina o una variante biológicamente activa de la leptina para el tratamiento de una LME donde se administra una dosis de leptina de entre 0,5 y 100 µg/kg por día.

10 Otra realización preferida es el uso de una proteína con actividad agonista del receptor ObRb y cuya secuencia aminoacídica comprende una secuencia aminoacídica con un 95% de identidad con SEQ ID NO: 1, para favorecer la recuperación motora tras la LME y/o para disminuir la hiperalgesia y/o la alodinia asociadas a la LME.

15 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se
20 proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 **FIG 1. Muestra que leptina promueve la recuperación motora tras una Lesión Medular Espinal (LME).** La evaluación de la recuperación de la función locomotora tanto de los animales lesionados tratados con vehículo (control) como de los tratados con leptina, se realizó empleando la prueba de campo abierto (*open-field test*) siguiendo la escala de Basso, Beattie y Bresnahan (BBB). **A.** Muestra la media obtenida en la escala BBB a 1, 3, 7, 14, 21 y 28
30 días tras la LME. **B.** Muestra la media obtenida en la sub-escala BBB a 7, 14, 21 y 28 días tras la LME. **C.** Muestra el porcentaje de coordinación motora,

evaluado mediante la escala y subescala BBB a 14, 21 y 28 días tras la LME. Los animales tratados con leptina presentan una coordinación significativamente mejor que aquellos tratados con vehículo. Los datos aparecen representados como medias \pm error estándar de la media (SEM) de 5 12 animales por cada grupo de estudio (n=12) y se analizaron estadísticamente utilizando la prueba t de Student, donde * indica una $p < 0,05$.

FIG 2. Muestra que leptina promueve la recuperación de los potenciales motores evocados tras una LME. Los animales lesionados tratados con 10 vehículo (control) y los tratados con leptina fueron valorados electrofisiológicamente a los 28 días tras la LME. Los resultados de los potenciales motores evocados mejoran significativamente con el tratamiento de leptina a los 28 días tras la LME. **A.** Se representa la media de la amplitud global del pico máximo de los potenciales evocados en microvoltios. **B.** Se 15 representa el área bajo la curva o *modulus* de los potenciales evocados en unidades arbitrarias. Los datos aparecen representados como medias \pm SEM de 12 animales por cada grupo de estudio y se analizaron estadísticamente utilizando la prueba t de Student, donde * indica una $p < 0,0025$.

FIG 3. Muestra que leptina previene el desarrollo del dolor neuropático provocado por la LME. La evaluación del dolor neuropático (hiperalgesia 20 térmica y alodinia) se realizó a los 28 días tras la LME tanto en animales lesionados tratados con vehículo (control) como en los tratados con leptina. Se realizaron ensayos de hiperalgesia ante un estímulo térmico y alodinia ante un 25 estímulo mecánico no doloroso, tanto en animales en situación de pre-LME como en tratados con vehículo o leptina a los 28 días tras la LME. En todos los casos, las pruebas fueron realizadas en la superficie de las patas traseras. **A.** El tratamiento con leptina evita el desarrollo de la hiperalgesia térmica que 30 presentan los animales tratados con vehículo, en los que el tiempo de respuesta al estímulo térmico, representado en segundos, es menor. **B.** El tratamiento con leptina evita el desarrollo de la alodinia que presentan los animales lesionados tratados con vehículo, en los que el umbral de fuerza del

estímulo mecánico, representado en gramos, que genera respuesta, está disminuido. Los datos aparecen representados como medias de los valores obtenidos para 3 determinaciones individuales por cada 12 animales por grupo \pm SEM y se analizaron estadísticamente utilizando la prueba t de Student, donde * indica una $p < 0,05$ tras comparar el grupo de animales en situación pre-LME.

FIG 4. Muestra el efecto neuroprotector de la leptina en la LME. El tratamiento con leptina disminuye la respuesta inflamatoria microglial sin variar la activación astrogliar y aumenta la Sustancia Blanca Preservada (SBP) en el epicentro de la lesión. **A y A'**. Muestra que el tratamiento con leptina disminuye significativamente la activación microglial, tanto a nivel de volumen total (A) como en cada una de las áreas rostro-caudales analizadas (A'). **B y B'**. Este efecto no se observa al analizar la activación astrogliar, donde no se observan diferencias significativas ni a nivel de volumen total (B) ni en ninguna de las áreas rostro-caudales analizadas (B') con respecto de animales control tratados con el vehículo. **C y C'**. Sin embargo, el tratamiento con leptina aumenta el porcentaje de SBP en el epicentro de la lesión, lo que implica la presencia de un mayor número de tractos preservados en éste área. Los valores aparecen representados como medias \pm SEM de 12 determinaciones individuales por cada grupo de estudio. Los datos se analizaron estadísticamente con una prueba t de Student, donde * indica una $p < 0,05$.

FIG 5. La leptina y su receptor largo ObRb aumentan su expresión tras la lesión traumática de la médula espinal. Análisis por RT-qPCR de la expresión de la leptina (**A**) y de su receptor largo ObRb (**B**) a las 6 horas (6h), 24 horas (24h), 3 días (3d), 7 días (7d) y 14 días (14d) tras la LME por contusión moderada. Los datos han sido normalizados a partir de los valores de expresión de los animales control sin lesión a los que se les ha asignado el valor arbitrario de expresión 1. Los valores aparecen representados en unidades relativas como medias \pm SEM de 3 determinaciones individuales por cada grupo de estudio. Los datos se analizaron estadísticamente utilizando la

prueba t de Student donde * indica una $p < 0,05$ comparando los animales control sin LME en cada tiempo analizado.

EJEMPLOS

5

A continuación se ilustra la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la eficacia del uso de la leptina para el tratamiento de la LME y la reducción del dolor neuropático asociado.

10

EJEMPLO 1: MODELO EXPERIMENTAL DE LME Y ENSAYOS DE LA FUNCIÓN MOTORA.

15

El modelo de experimentación animal utilizado fue la rata Wistar macho adulta (300-350 gramos de peso). Los animales fueron divididos en dos grandes bloques experimentales: animales control con inyección intraparénquima del vehículo, y animales inyección intraparénquima de un único bolo de 12 μg de leptina recombinante de rata (Sigma Aldrich). El vehículo empleado siguiendo las instrucciones del fabricante fue 15 mM HCl/ 7,5 mM NaOH (pH 5,2). En ambos grupos experimentales las inyecciones se produjeron transcurridos 5 minutos desde la realización de la contusión moderada (200 KDy de fuerza) sobre la médula espinal a la altura de la vértebra T8, previamente expuesta mediante una laminectomía. Los animales operados sin lesionar se denominan "Sham". Las inyecciones de vehículo o leptina fueron realizadas sobre la línea media de la médula espinal y la dosis de leptina fue distribuida en 3 inyecciones de 2 μl a una concentración de 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en cada punto de inyección, en las zonas, rostral, epicentro de la lesión y caudal, donde la distancia entre los puntos fue de 1 mm. Dentro de cada uno de los bloques experimentales, los animales fueron divididos en diferentes subgrupos correspondientes a los distintos tiempos de sacrificio tras la lesión (24 horas, 7 y 28 días respectivamente).

20

25

30

El número de animales totales empleados en los estudios fue de 54. Para los análisis moleculares (RNA/ proteínas) se utilizaron 3 animales por condición y por tiempo. Para los análisis histopatológicos se utilizaron los 36 animales restantes distribuidos en, 3 animales por condición experimental (tratado con leptina y/ o tratado con el vehículo) se emplearon 24h después de la LME para la realización de los estudios de co-localización del receptor ObRb. El resto de animales, fueron llevados a tiempos más crónicos (7 y 28 días después de la LME) y se emplearon principalmente para análisis histológicos. Los experimentos fueron realizados por duplicado, en periodos de tiempos distintos, manteniéndose la dosis de inyección y el peso de los animales utilizados por bloque experimental.

Evaluación de la función motora: campo abierto

Todos los animales fueron evaluados funcionalmente por el método de doble ciego siguiendo la escala de Basso, Beattie y Bresnahan (BBB) (Basso y cols. 1996. Exp Neurol. 139(2):244-56) en campo abierto a las 24 horas, 3 días, 7 días, 14 días, 21 días y 28 días tras la lesión, con el fin de determinar si el tratamiento con leptina deriva en una mejora significativa en la recuperación de la función motora con respecto del grupo de animales control.

Evaluación de la función motora: potenciales evocados

Los animales tratados con el vehículo (Control) y tratados con leptina (12 animales por grupo) fueron evaluados electrofisiológicamente al final del estudio, 28 días tras la LME. La capacidad de conducción de estímulos nerviosos a través de la lesión se evaluó mediante la estimulación en cerebro y registro de potenciales evocados motores de la extremidad posterior. Para ello, al final del estudio, los animales se anestesiaron con pentobarbital (40 mg/kg) y se colocaron en una manta calefactora con sistema de regulación por sonda a 37° C en posición decúbito prono. La estimulación se realizó mediante la colocación subcutánea de dos electrodos monopares en la calota de cráneo y la parte superior de la nariz, y aplicación de un impulso único de 2 milisegundos de duración y 25 miliamperios de intensidad. El potencial evocado se registró

20 veces para cada uno de los músculos tibial anterior y gastrocnemio aplicando un filtro de entre 10 y 1.000 hercios y una escala temporal de 50 milisegundos, para finalmente determinar en el registro promedio las latencias, el área bajo el registro (modulus) y la amplitud máxima con ayuda del programa Signal (Cambridge Electronic Design).

Evaluación del dolor neuropático

Para evaluar la hiperalgesia térmica en las patas traseras de los animales de estudio se utilizó el aparato de test plantar (Ugo Basile). Todos los animales utilizados en el estudio (tanto control como tratados con leptina) fueron evaluados indistintamente como un único grupo de animales en situación de pre-LME (n=24), con el fin de establecer el valor umbral de referencia del estímulo térmico. Tras la LME y de forma independiente en los animales control y en los tratados con leptina (n=12 para cada grupo) se realizaron las medidas térmicas, que fueron determinadas en la superficie de las patas traseras de los animales, por triplicado, a lo largo de los 3 días anteriores al punto final del estudio (en los días 26, 27 y 28 post-LME). Se consideró dolor neuropático (hiperalgesia térmica) una disminución en la retirada de la pata ante el estímulo mayor a 3 segundos.

Para evaluar la alodinia, se emplearon los filamentos calibrados de Von Frey. Todos los animales utilizados en el estudio (tanto control como tratados con leptina) fueron evaluados indistintamente como un único grupo, en situación de pre-LME (n=24), con el fin de establecer el valor umbral de referencia al estímulo mecánico. Para ello individualmente fueron introducidos en cámaras de plexiglás con enrejado en su parte inferior, se dejaron aclimatar durante 30 minutos y seguidamente se aplicaron los filamentos calibrados de Von Frey en la superficie de ambas patas traseras durante 6 segundos, considerándose como respuesta positiva la retirada de la pata trasera sobre la que se aplica el estímulo. Este mismo procedimiento fue realizado tras la LME en ambos grupos de estudio (animales control y tratados con leptina; n=12/grupo) y las

medidas fueron realizadas por triplicado a lo largo de los 3 días anteriores al punto final del estudio (en los días 26, 27 y 28 post-LME).

5 **EJEMPLO 2: EL TRATAMIENTO CON LEPTINA FAVORECE LA RECUPERACIÓN DE LA FUNCIÓN MOTORA TRAS LA LME.**

10 Previamente a la realización de la lesión, los animales se valoraron funcionalmente para confirmar que todas las ratas empleadas en el estudio presentaban el valor máximo en escala de BBB de 21, lo que indica que presentaban una función motora normal.

15 A las 24 horas tras la lesión, el valor en la escala de BBB en el grupo de animales control (n=14) fue menos de 3, lo que indicó la pérdida casi completa de la función motora. Sin embargo, en el grupo de animales tratados con leptina (n=14) observamos un aumento estadísticamente significativo en el valor de la escala de BBB, lo que muestra una mejora gracias al tratamiento con leptina tan solo tras las primeras 24 horas después de la lesión.

20 Tres días después de la lesión, observamos una mejora en la recuperación de la función motora en el grupo de animales control, aunque en este tiempo el grupo de animales tratados con leptina presentó un valor en escala de BBB significativamente mayor, lo que indica una mayor recuperación de la función motora (Tabla 2, figura 1A).

25 Siete días después de la lesión, en el grupo de animales tratados con leptina observamos una puntuación mayor y estadísticamente significativa que en el grupo de animales control, en el valor de escala de BBB (Tabla 2, figura 1A).

30 Catorce días después de la lesión no se observaron diferencias significativas en el valor de escala de BBB entre ambos grupos experimentales, si bien, tanto a los veintiún como a los veintiocho días tras la lesión, la mejora en la

recuperación motora fue estadísticamente significativamente mayor en el grupo de animales tratados con leptina (Tabla 2, figura 1A).

5 Tabla 2. Puntuación en la escala de BBB y en la subescala de BBB de los grupos animales control y tratados con leptina, y análisis estadístico (*).

| Días tras la lesión | Escala de BBB | | | Subescala de BBB | | |
|---------------------|---------------|---|--------------|------------------|---|--------------|
| | control | * | leptina | control | * | leptina |
| 1 | <3 | * | 4,14 ± 0,77 | | * | |
| 3 | 6,53 ± 0,30 | * | 7,43 ± 0,27 | | * | |
| 7 | 8,58 ± 0,34 | * | 10,17 ± 0,24 | 1,26± 0,30 | * | 3,70 ± 0,60 |
| 14 | 10,96±0,14 | * | 11,21± 0,15 | 7,92 ± 0,99 | * | 10,79 ± 0,88 |
| 21 | 11.09±0,26 | * | 12 ± 0,18 | 10 ± 0,74 | * | 13,86 ± 0,70 |
| 28 | 11,50±0,23 | * | 13,07± 0,30 | 10,28± 0,84 | * | 14,92 ± 0,95 |

* indica que el análisis estadístico de la prueba t de Student revela diferencias significativas entre el grupo control con un valor $p < 0,05$.

10 Finalmente, analizamos en ambos grupos de estudio, los valores de la escala de BBB desglosada o subescala de BBB, y las diferencias estadísticas entre ambos grupos experimentales fueron estadísticamente significativas incluso a catorce días tras la lesión. Así, aunque catorce días tras la lesión los resultados en escala de BBB no fueron significativamente diferentes entre el grupo control
 15 y el grupo tratado con leptina, los resultados de la subescala de BBB entre ambos grupos de animales sí fueron significativamente mejores en los animales tratados con leptina (tabla 2, figura 1B).

20 Veintiún días tras la lesión, los animales tratados con leptina mostraron un valor en subescala de BBB mayor y estadísticamente significativo respecto de los animales control tratados con vehículo (Figura 1B).

Finalmente, en la fase más crónica del estudio, veintiocho días tras la lesión, el grupo de animales tratados con leptina también mostró un valor en la subescala de BBB significativamente mayor al que mostró el grupo control (Figura 1B).

5

Veintiún días tras la lesión, las diferencias en el patrón de locomoción entre ambos grupos de estudio fueron notablemente más acentuadas, teniendo en cuenta que los análisis a este tiempo se centran en la capacidad de los animales de presentar coordinación del movimiento en carrera continua, hecho que implica una importante recuperación de la función motora en el animal tras el trauma (Figura 1C).

10

Es importante enfatizar que el 78% de los animales tratados con leptina presentaron coordinación en el movimiento en carrera continua, frente al 16% en el caso del grupo de animales control (Figura 1C). Veintiocho días tras la lesión, el 93% de los animales tratados con leptina presentaron coordinación en el movimiento en carrera continua, frente al 34% en el caso del grupo de animales control (Figura 1C).

15

20

Veintiocho días tras la lesión se evaluó mediante electrofisiología la capacidad de la médula espinal lesionada de transmitir impulsos nerviosos desde el encéfalo, y la conversión de dichos impulsos en potenciales de acción a nivel de los músculos gastrocnemio y tibial anterior (Figura 2). El promedio de los potenciales evocados motores fue significativamente superior en el grupo tratado con leptina que en el grupo control, tanto para la amplitud de pico máximo como el área bajo la curva o modulus (Figura 2A y B, respectivamente), correlacionando con la mejor función motora observada mediante la prueba de campo abierta en base a la escala BBB. Por tanto, nuestros resultados claramente muestran como el tratamiento con leptina favorece la recuperación de la función motora desde las 24 horas tras la LME y a lo largo de todos los tiempos de estudio analizados.

25

30

Tabla 3. Resultado del análisis de los potenciales evocados motores en los grupos animales control y tratado con leptina, y análisis estadístico (*).

| Grupo | Amplitud del pico máximo | * | Área bajo la curva |
|---------|--------------------------|----|--------------------|
| control | 103 ± 7 | ** | 1,12 ± 0,11 |
| leptina | 184 ± 22 | ** | 1,86 ± 0,17 |

5 ** indica que el análisis estadístico de la prueba t de Student revela diferencias significativas entre el grupo control con un valor $p < 0,05$.

EJEMPLO 3: EL TRATAMIENTO CON LEPTINA PREVIENE EL DESARROLLO DEL DOLOR NEUROPÁTICO TRAS LA LME.

10 Las ratas adultas desarrollan dolor neuropático tras la LME entre las 2 y las 5 semanas posteriores a la lesión. El efecto del tratamiento con leptina sobre el desarrollo de dolor neuropático fue evaluado mediante ensayos de desarrollo de hiperalgesia térmica, es decir, de la respuesta exacerbada ante un estímulo térmico doloroso, y mediante ensayos de los mecanismos de alodinia, es decir,
15 de la respuesta exacerbada ante un estímulo mecánico no doloroso.

Estos ensayos se realizaron en los grupos de animales control y tratados con leptina 28 días tras la LME. Los resultados de ambos ensayos demuestran que el tratamiento con leptina previene del desarrollo de hiperalgesia térmica
20 (Figura 3A) y de mecanismos de alodinia (Figura 3B). En el ensayo de hiperalgesia térmica plantar, el valor umbral en ambos grupos experimentales antes de la lesión ($n=28$) fue de $8,01 \pm 0,36$ segundos.

25 Veintiocho días tras la lesión, la latencia al estímulo térmico en el caso del grupo de animales control disminuyó significativamente en comparación con los valores previos a la lesión (Figura 3A). Sin embargo, en el grupo de animales tratados con leptina no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la latencia al estímulo térmico respecto al valor previo a la lesión (Figura 3A). Por otra parte, el grupo de animales control mostró una

disminución de la alodinia, evaluada como la respuesta nociceptiva mecánica, respecto del valor previo a la LME. Sin embargo, el grupo de animales tratados con leptina no presentó variaciones en esta respuesta respecto del valor previo a la lesión, lo que demuestra que el tratamiento con leptina fue capaz de prevenir el desarrollo de hiperalgesia y alodinia que presentan los animales tratados con vehículo (Figura 3B).

EJEMPLO 4: EL TRATAMIENTO CON LEPTINA DISMINUYE LA RESPUESTA INFLAMATORIA MICROGLIAL Y AUMENTA LA SUSTANCIA BLANCA PRESERVADA (SBP) EN EL EPICENTRO DE LA LESIÓN.

El análisis densitométrico de la astrogliosis y la microglía reactiva así como la Sustancia Blanca Preservada (SBP) en el epicentro de la lesión, fue realizada en animales control y tratados con leptina a los 28 días tras la LME. Para ello y en el caso de ambos grupos experimentales, las secciones de tejido fueron utilizadas para la realización de ensayos inmunohistoquímicos simples, empleando los anticuerpos específicos: rabbit anti-GFAP (Dako) y anti-Iba1 (Dako). Finalmente, las secciones procesadas fueron analizadas con el microscopio “BX61 Motorized Research Microscope” (Olympus) y los análisis densitométricos fueron realizados con el programa informático ImageJ. La cuantificación del área/volumen inmunorreactivo en el total de tejido de médula espinal analizado, así como en cada nivel rostro-caudal, fue realizado empleando 8 secciones de cada animal separadas por 660 μm y conteniendo el epicentro de la lesión. Así mismo, para la visualización de la SBP se empleó la tinción de la eriocromo cianina (ECy). Las imágenes fueron tomadas con el objetivo de 2X, empleando el microscopio “BX61 Motorized Research Microscope” (Olympus) y utilizando el programa Cell A. Igualmente, los análisis densitométricos fueron realizados con el programa informático ImageJ. La cuantificación del área/volumen inmunorreactivo en el total de tejido de médula espinal analizado, así como en cada nivel rostro-caudal, fue realizado empleando 12 secciones de cada animal separadas por 660 μm y conteniendo el epicentro de la lesión. Finalmente, los resultados muestran que el

tratamiento con leptina disminuye significativamente la activación microglial, tanto a nivel de volumen total (Figura 4 **A.**) como en cada una de las áreas rostro-caudales analizadas (Figura 4 **A'**). Este efecto no se observa al analizar la activación astrogliosa donde no se observan diferencias significativas ni a nivel de volumen total (Figura 4 **B.**) ni en ninguna de las áreas rostro-caudales analizadas (Figura 4 **B'**), con respecto de animales control tratados con el vehículo. Sin embargo, el tratamiento con leptina aumenta el %SBP en el epicentro de la lesión, lo que implica a nivel histológico un mayor número de tractos preservados en éste área. (Figura 4 **C.** y **C'**). Los valores aparecen representados como medias \pm SEM de 12 determinaciones individuales por cada grupo de estudio. El análisis estadístico mediante la prueba t de Student muestra diferencias significativas respecto de animales control tratados con el vehículo, * $p < 0.05$.

15 Inmunohistoquímica

Los animales control y los tratados con leptina fueron sacrificados a los 28 días (n= 12) tras la LME mediante anestesia con pentobarbital, perfundidos intracardiácamente con 150 ml de suero salino (SS) heparinizado y con un volumen de 4% de paraformaldehído de 1ml/g de peso del animal. Se disecaron inmediatamente bloques de 2 cm de médula espinal (1cm rostral y un cm caudal respecto al epicentro de la lesión) que fueron post-fijados, criopreservados y almacenados a 4° C, previo a su corte con el criostato para la obtención de criosecciones seriadas de 20 μ m de grosor, las cuales se preservaron a -20° C. Para la evaluación de la astrogliosis y la microglía reactiva, las secciones fueron tratadas 10 minutos con 2% H₂O₂ en 70% metanol a temperatura ambiente (TA). Seguidamente, se trataron durante 1 hora a TA con solución histológica de bloqueo HBB (10% Suero Bovino Fetal (FBS), 0,3% Albúmina Bovina Sérica (BSA), 0,3% Tritón X-100 en tampón Tris salino (TBS) a pH 7,4) y se incubaron toda la noche a 4° C más 1 hora a TA con anti-GFAP hecho en conejo (1:1.000) (Dako) o anti-Iba1 hecho en conejo (1:1.000) (Dako). Tras lavar los restos de anticuerpos primarios, las secciones fueron incubadas con el anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo (Vector)

--

1:500 en HBB. Finalmente, el tejido fue incubado con streptavidina (Perkin Elmer) en dilución 1:500 y el producto de la reacción de la peroxidasa fue visualizado utilizando el kit de revelado Nova Red Kit (Vector). Las secciones fueron finalmente deshidratadas y cubiertas con el medio de montaje DPX (Distireno Plástico Xileno). Para la realización de los análisis densitométricos, las imágenes fueron capturadas empleando un objetivo de 10X utilizando el microscopio BX61 Monitorized Research Microscope (Olympus). Para la cuantificación del área y el volumen inmunorreactivo por densitometría, se utilizó el programa informático ImageJ. Los volúmenes totales de médula espinal y los niveles rostro-caudales evaluados se analizaron en 8 secciones por animal, separadas por 660 µm y conteniendo el epicentro de la lesión.

Para la visualización de la mielina total preservada, las secciones tanto de animales control como tratados con leptina fueron procesadas con ECy. Las imágenes fueron tomadas con el objetivo de 2X, el programa informático Cell A y con el microscopio BX61 Monitorized Research Microscope (Olympus). La SBP fue determinada utilizando el programa informático ImageJ, con el cual se determinó el área teñida con ECy. La cuantificación del volumen y del área de mielina total preservada, en el total de médula espinal o en cada uno de los niveles rostro-caudales analizados, fue realizada en 12 secciones por animal, separadas por 660 µm y conteniendo el epicentro de la lesión.

EJEMPLO 5: LA LEPTINA Y SU RECEPTOR LARGO OBRB AUMENTAN SU EXPRESIÓN TRAS LA LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL.

25 Evaluamos la expresión de la leptina y de su receptor ObRb en tejido de médula espinal de animales control, sin lesionar, y de animales lesionados por contusión moderada (200 KDy). La evaluación de la expresión de ambos genes se realizó mediante la obtención del ARN mensajero (ARNm) del tejido, la obtención del ADN copia (ADNc) correspondiente por retrotranscripción (RT) y la cuantificación relativa por PCR a tiempo real (RT-qPCR) empleando oligonucleóticos cebadores específicos para cada uno de los genes y

empleando la química de SYBRGreen. Se analizaron los ADNc de animales control y lesionados en los diferentes tiempos tras la lesión (6 y 24 horas, 3, 7 y 14 días) con 3 animales por grupo y tiempo.

5 Como muestra la figura 5A, la expresión de la leptina disminuye significativamente 2 veces a las 6 horas tras la lesión, pero aumenta significativamente 1.7 veces a las 24 horas tras la lesión, coincidiendo con el pico de máxima expresión de ObRb. A los 14 días tras la lesión se observa un pronunciado aumento en la expresión del ARNm de la leptina, llegando a
10 alcanzar incluso los niveles de expresión detectados 24 horas tras la lesión (1,4 veces).

Como se puede observar en la figura 5B, el aumento de la expresión del ARNm de ObRb comienza durante las primeras horas tras la LME. A las 6 horas tras
15 la lesión, la expresión de ObRb aumenta significativamente 1,6 veces. Los niveles de ARNm de ObRb alcanzan el máximo a las 24 horas tras la lesión (4,95 veces) y se mantienen elevados hasta los 7 días tras la lesión. A los 14 días tras la lesión no se observan diferencias significativas en la expresión del ARNm del receptor ObRb con respecto de animales control sin lesionar.

20

PCR a tiempo real

Los animales empleados en el estudio (control sin lesionar, 6 y 24 h, 3, 7 y 14 días tras la LME, n=3 por grupo) fueron terminalmente anestesiados con pentobarbital y perfundidos intra-cardíacamente con 150 ml de solución salina heparinizada. Seguidamente, 1 cm de tejido de médula espinal lesionada
25 (conteniendo el epicentro de la lesión) fue utilizado para la extracción del ARN total utilizando RNeasyLipid Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. La síntesis del ADNc fue realizada a partir de 3 µg de ARN total previamente tratados con DNAsa. Las PCR a tiempo real (qPCR)
30 fueron realizadas utilizando el equipo ABI PRISM 7900 Fast Sequence Detection System (AppliedBiosystems) a partir de 10 ng de ADNc, utilizando 20 pmol/ml de los oligonucleótidos específicos y Fast SYBR Green PCR Master

Mix, en un volumen final de 20 μ l, siguiendo las instrucciones del fabricante. Como control endógeno de amplificación utilizamos el ARN ribosómico18S (Fernández y cols. 2009 Metabolism 58:204-211) que fue analizado en pocillos independientes a los genes de interés. Los oligonucleótidos fueron diseñados
5 utilizando el programa informático Primer Express (AppliedBiosystems). Para la amplificación de ObRb se emplearon los oligonucleótidos con secuencias SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 y para la amplificación de leptina se emplearon los oligonucleótidos con secuencias SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6. Finalmente, la
10 cuantificación relativa de cada gen se realizó utilizando el método comparativo de CT.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Uso de la leptina o de una variante biológicamente activa de la leptina para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de traumatismos del Sistema Nervioso Central (SNC) y/o del dolor neuropático.
- 10 2.- Uso de la leptina o de una variante biológicamente activa de la leptina según la reivindicación anterior para el tratamiento de una lesión medular espinal (LME).
- 3.- Uso de la leptina o de una variante biológicamente activa de la leptina según la reivindicación 1 para el tratamiento del traumatismo craneoencefálico.
- 15 4.- Uso de la leptina o de una variante biológicamente activa de la leptina según la reivindicación 1 para el tratamiento del dolor neuropático.
- 20 5.- Uso de la leptina o de una variante biológicamente activa de la leptina según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 4 para el tratamiento del dolor neuropático asociado a una LME.
- 6.- Uso de la leptina o de una variante biológicamente activa de la leptina según la reivindicación anterior para favorecer la recuperación motora tras la LME y/o para disminuir la hiperalgesia y/o la alodinia asociadas a la LME.
- 25 7.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 ó 6, donde la LME es causada por contusión.
- 30 8.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la leptina o la variante biológicamente activa de la leptina es una proteína con actividad agonista del receptor ObRb y cuya secuencia aminoacídica comprende una secuencia aminoacídica con al menos un 81% de identidad con SEQ ID NO: 1.
- 9.- Uso según la reivindicación anterior donde la proteína es SEQ ID NO: 1.

10.- Uso de una secuencia nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica:

i) con al menos un 84% de identidad con SEQ ID NO: 2,

5 ii) que codifica para una secuencia aminoacídica con al menos un 81% de identidad con SEQ ID NO: 1 y con actividad agonista del receptor ObRb, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de traumatismos del Sistema Nervioso Central (SNC) y/o del dolor neuropático.

10 11.- Uso de una secuencia nucleotídica según la reivindicación anterior donde dicha secuencia nucleotídica comprende SEQ ID NO: 2.

12.- Uso de una secuencia nucleotídica según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores donde dicha secuencia nucleotídica es un vector de expresión.

15

13.- Uso de una composición farmacéutica que comprende leptina o una variante biológicamente activa de la leptina para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de traumatismos del Sistema Nervioso Central (SNC) y/o del dolor neuropático.

20

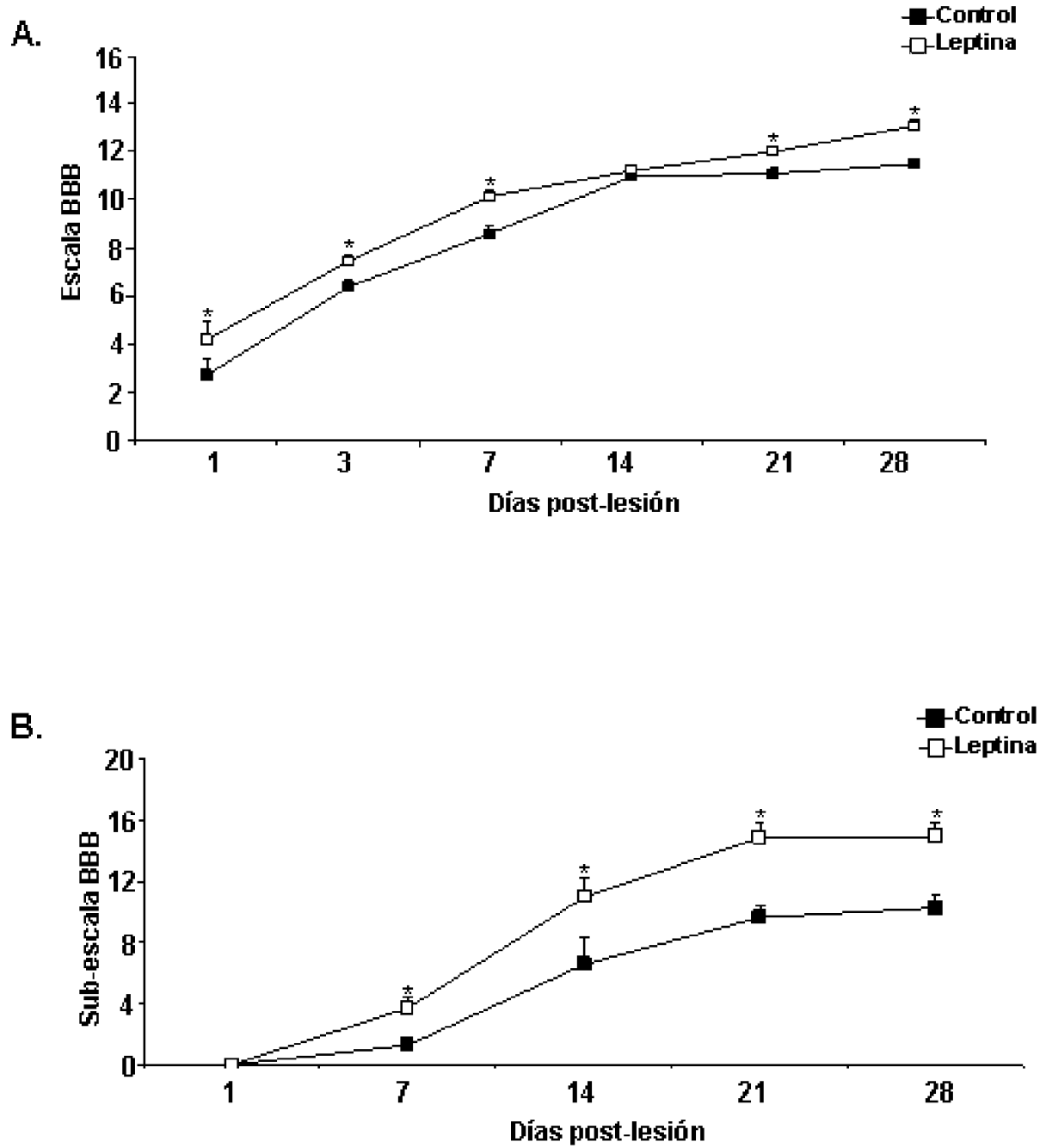
14.- Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación anterior donde la administración del medicamento es parenteral.

25 15.- Uso de la leptina o de una variante biológicamente activa de la leptina según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9 o de la composición farmacéutica según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores donde se administra una dosis de leptina o de una variante biológicamente activa de la leptina de entre 0,5 y 100 µg/kg por día.

30 16.- Uso de la leptina o de una variante biológicamente activa de la leptina según la reivindicación anterior donde la dosis es de entre 1 y 10 µg/kg por día.

17.- Uso de un kit que comprende leptina o una variante biológicamente activa de la leptina para el tratamiento del traumatismo del SNC y/o del dolor neuropático.

FIG. 1



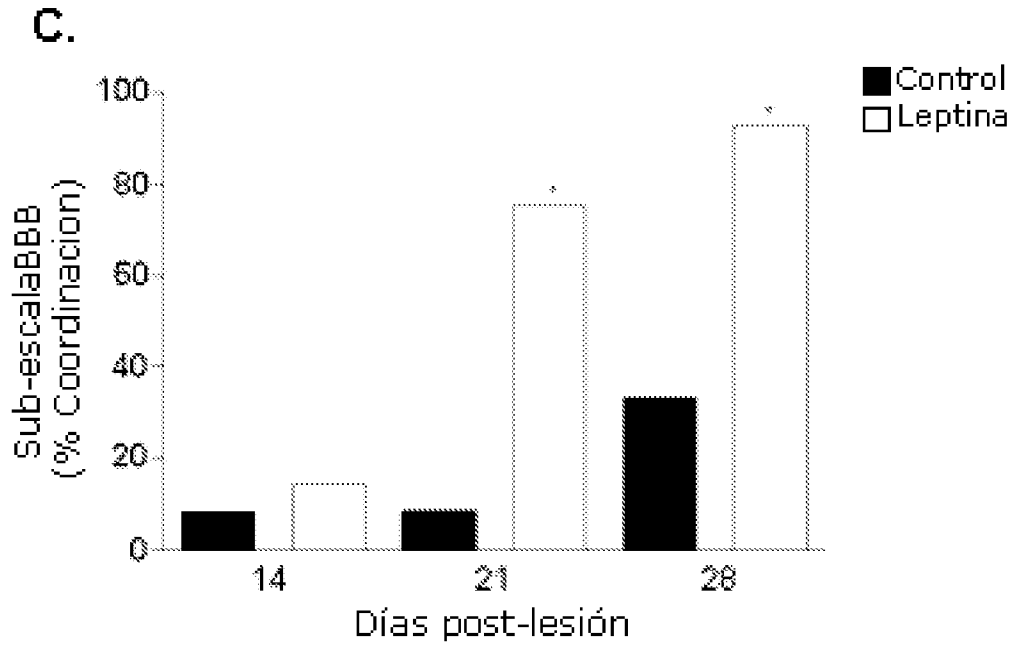


FIG. 2

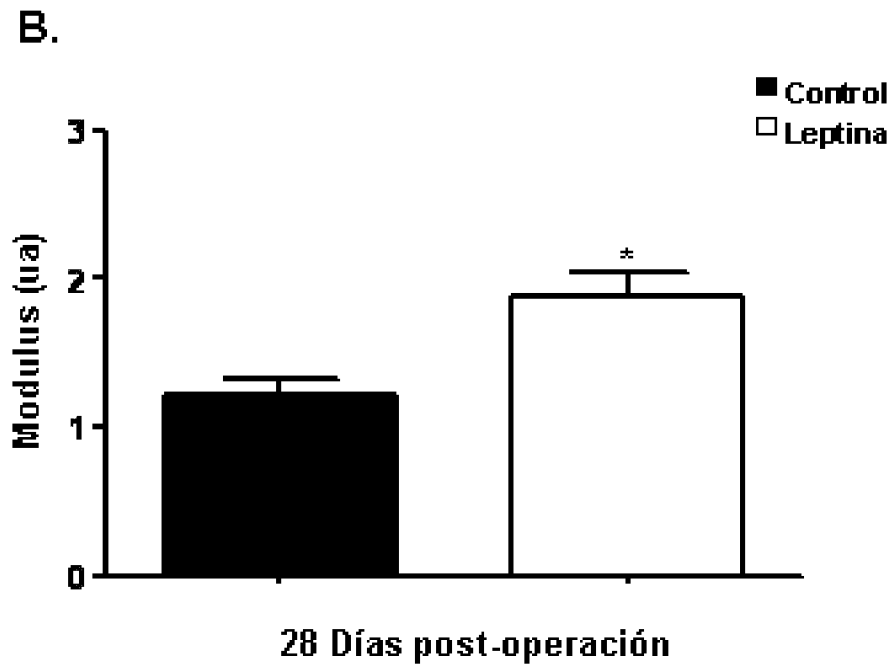
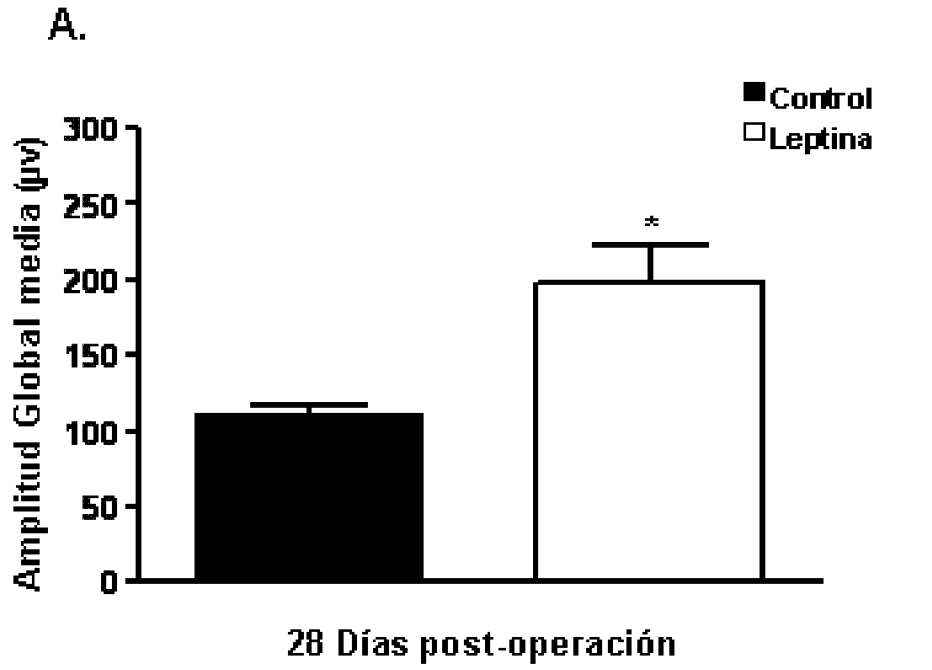
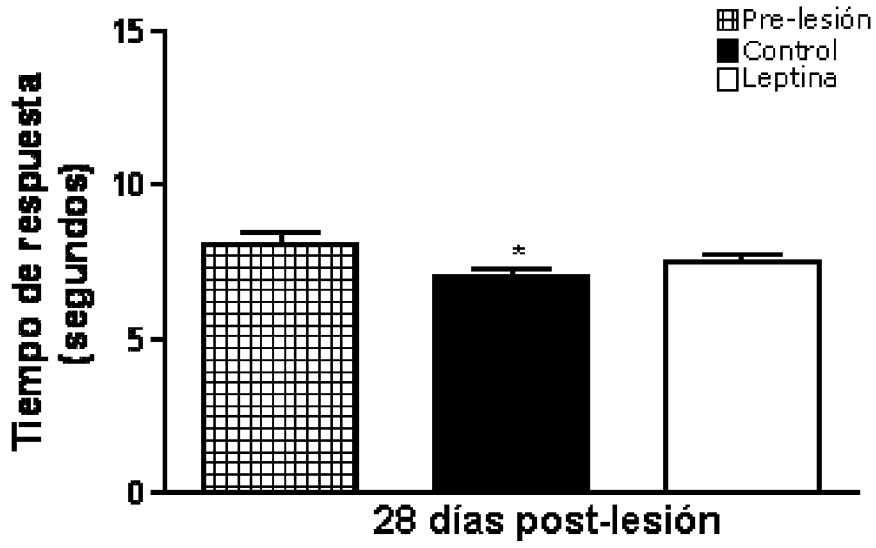


FIG. 3

A



B

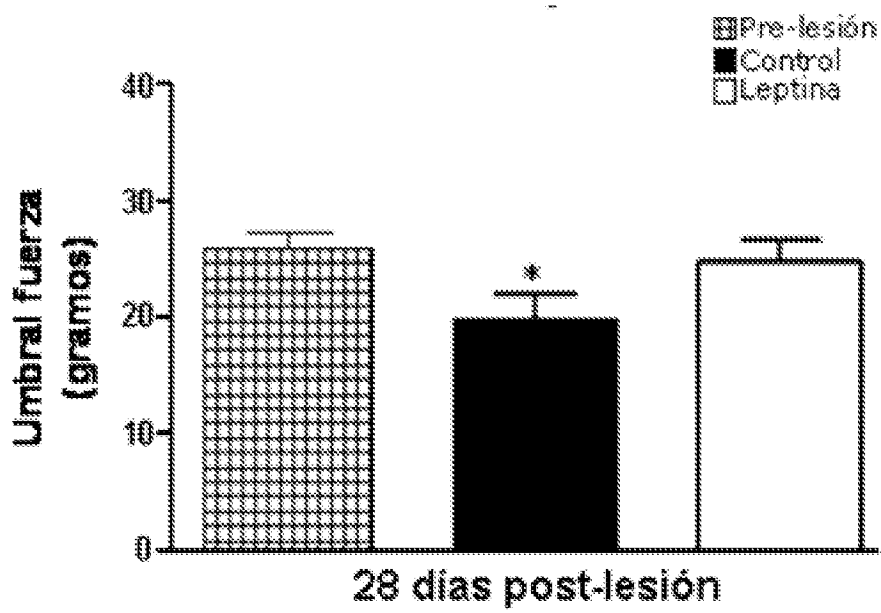


FIG. 4

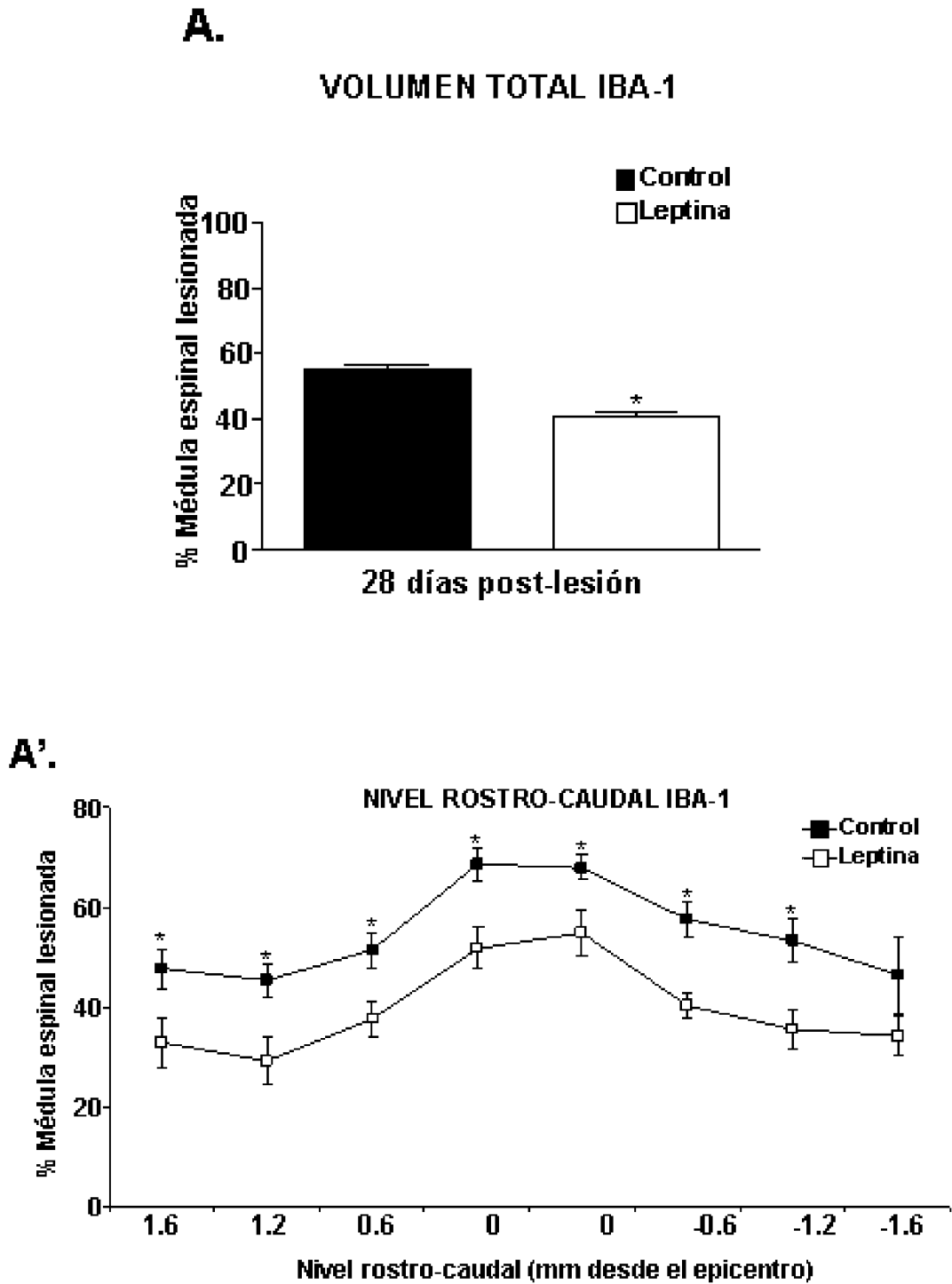


FIG. 4

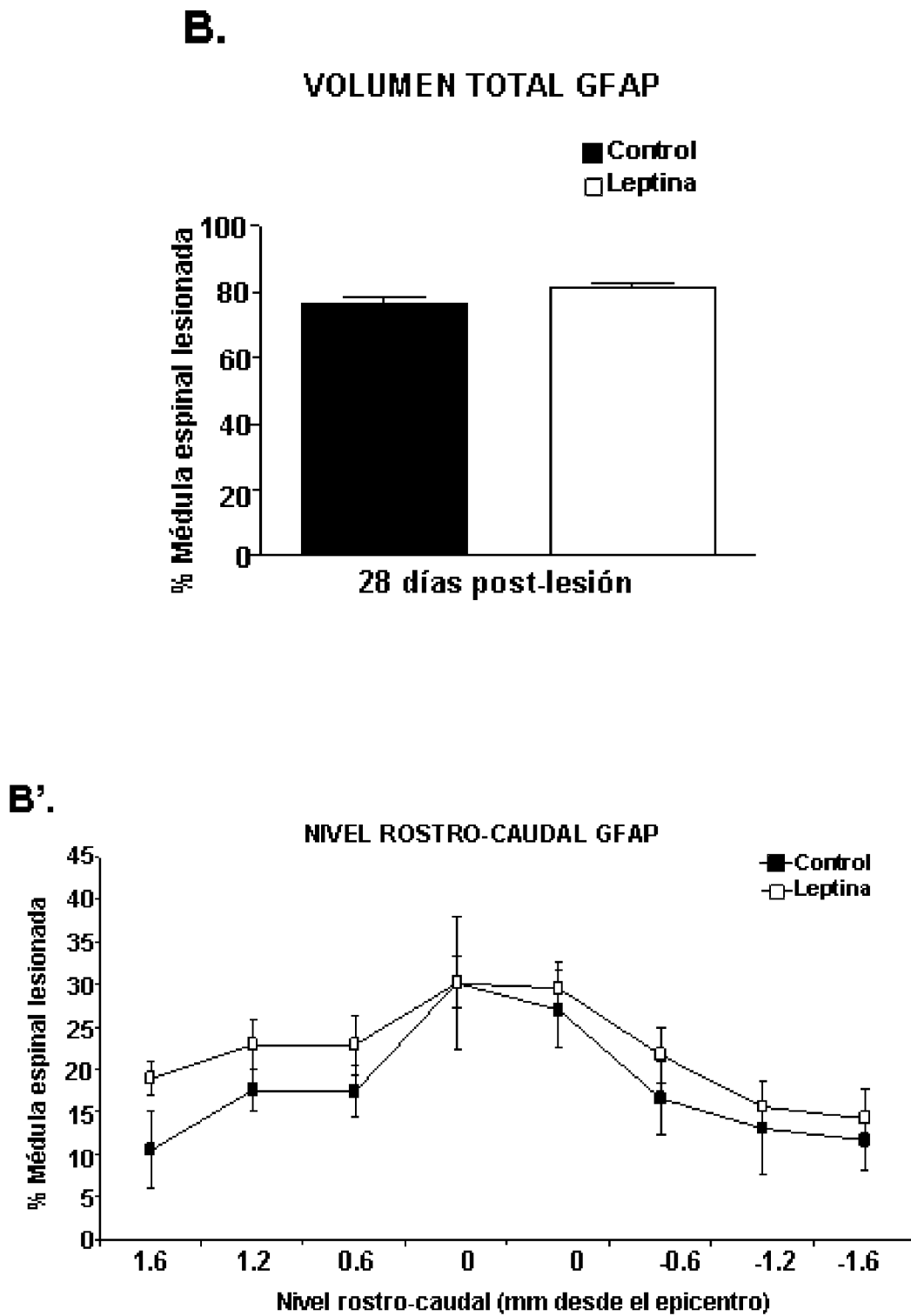


FIG. 4

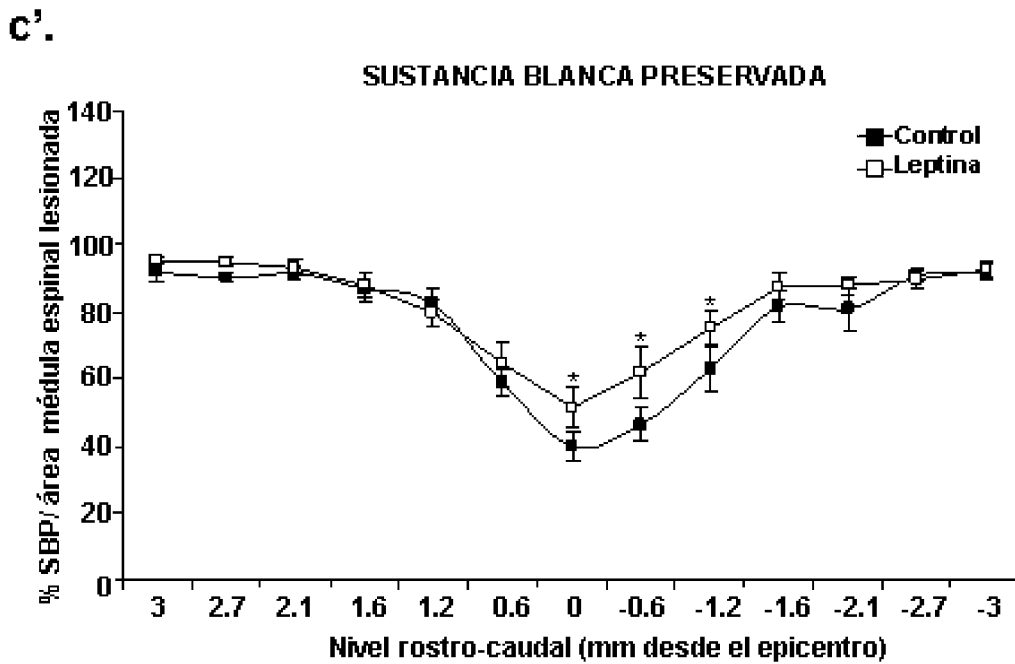
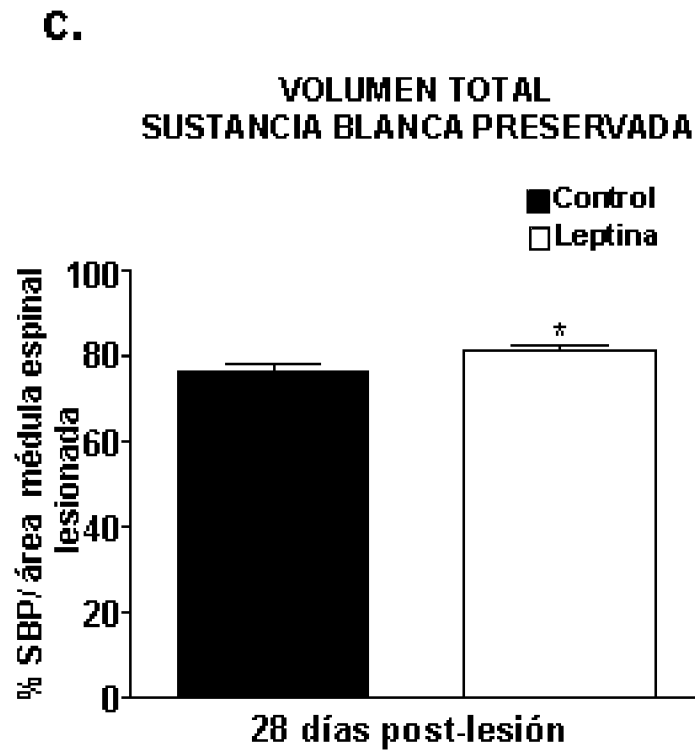
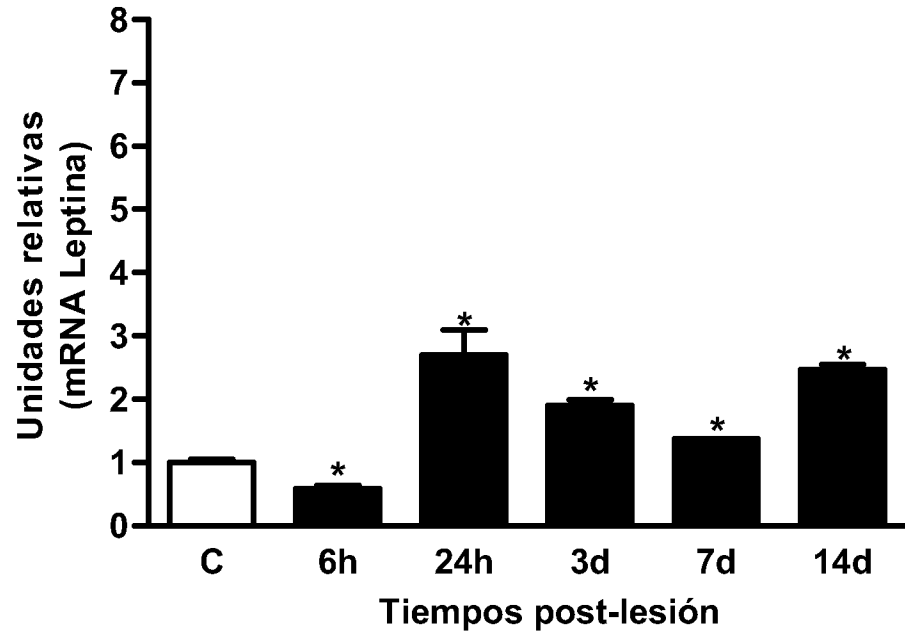
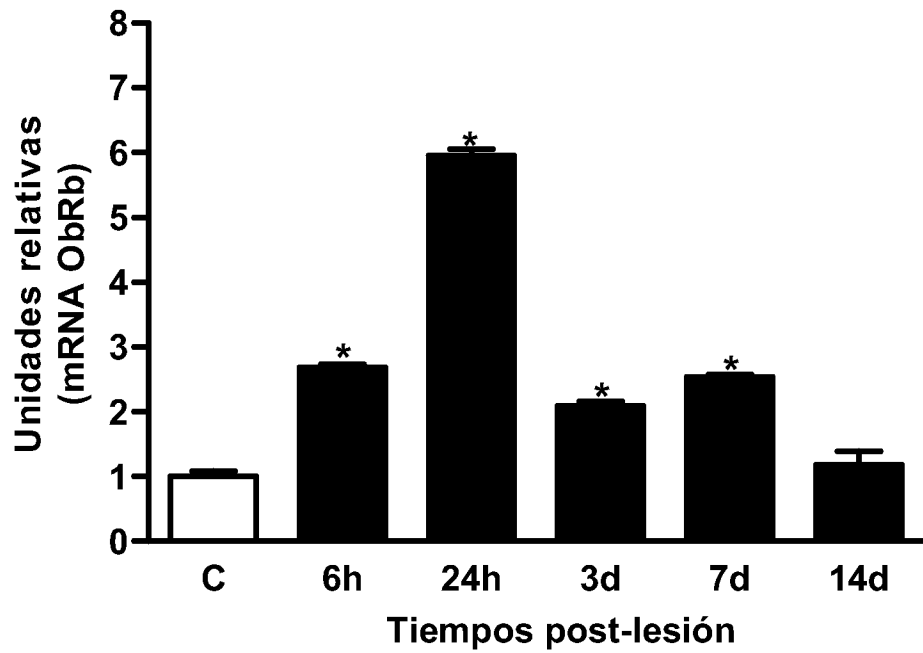


FIG. 5

A.



B.



LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Fundación del Hospital Nacional de Paraplégicos para la Investigación y la Integración
- <120> Uso de un agonista del receptor ObRb para el tratamiento de traumatismos del Sistema Nervioso Central y/o del dolor neuropático.
- <130> ES2145.8
- <160> 6
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 167
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

```

Met His Trp Gly Thr Leu Cys Gly Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu
1          5          10          15

Phe Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys
          20          25          30

Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr
          35          40          45

Gln Ser Val Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro
          50          55          60

Gly Leu His Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala
65          70          75          80

Val Tyr Gln Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln
          85          90          95

Ile Ser Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala
          100          105          110

Phe Ser Lys Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu
          115          120          125

Asp Ser Leu Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val
          130          135          140

Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln
145          150          155          160

Leu Asp Leu Ser Pro Gly Cys
          165
    
```

- <210> 2
- <211> 504

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2
atgcattggg gaaccctgtg cggattcttg tggctttggc cctatctttt ctatgtccaa 60
gctgtgcccc tccaaaaagt ccaagatgac accaaaaccc tcatcaagac aattgtcacc 120
aggatcaatg acatttcaca cacgcagtca gtctcctcca aacagaaagt caccggtttg 180
gacttcattc ctgggctcca ccccatcctg accttatcca agatggacca gacactggca 240
gtctaccaac agatcctcac cagtatgcct tccagaaacg tgatccaaat atccaacgac 300
ctggagaacc tccgggatct tcttcacgtg ctggccttct ctaagagctg ccacttgccc 360
tgggccagtg gcctggagac cttggacagc ctgggggggtg tcctggaagc ttcaggctac 420
tccacagagg tggtgccct gagcaggctg caggggtctc tgcaggacat gctgtggcag 480
ctggacctca gccctgggtg ctga 504

<210> 3
<211> 22
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 3
ctgcacttaa cctggcctat cc 22

<210> 4
<211> 17
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 4
cggtgccgca caaaaca 17

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 5
cttcattccc gggcttca 18

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 6
gccagggtct ggtccatctt 20



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130261

②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.02.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| A | MORRISON C. D. Leptin signaling in brain: a link between nutrition and cognition? Biochimica et Biophysica Acta. 2009, Vol. 1792, páginas 401-408, todo el documento. | 1-17 |
| A | LIM G. et al. Spinal leptin contributes to the pathogenesis of neuropathic pain in rodents. The Journal of Clinical Investigation. 02.2009, Vol. 119, Nº 2, páginas 295-304, todo el documento. | 1-17 |
| A | GEZICI A. R. et al. Serum leptin levels following acute experimental Spinal Cord Injury. J Spinal Cord Med. 08.2009, Vol. 32, Nº 4, páginas 416-421, todo el documento. | 1-17 |
| A | US 7105480 B1 (NICHOLSON) 12.09.2006, todo el documento. | 1-17 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
26.12.2012

Examinador
M. Cumbreño Galindo

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K14/575 (2006.01)

A61K38/22 (2006.01)

A61P25/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.12.2012

Declaración

| | | |
|---|-----------------------|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones 1-17 | SI |
| | Reivindicaciones | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986) | Reivindicaciones 1-17 | SI |
| | Reivindicaciones | NO |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|---|-------------------|
| D01 | MORRISON C. D. Bi ochimica et Bi ophysica Acta. Vol. 179 2, páginas 401-408. | 2009 |
| D02 | LIM G. et al. The Journal of Clinical Investigation. Vol. 119, Nº 2, páginas 295-304. | 02.2009 |
| D03 | GEZICI A. R. et al. J Spinal Cord Med. Vol. 32, Nº 4, páginas 416-421. | 08.2009 |
| D04 | US 7105480 B1 | 12.09.2006 |

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención tiene por objeto el uso de la leptina o de una variante biológicamente activa de la leptina para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos del Sistema Nervioso Central (SNC) y/o del dolor neuropático (reivindicaciones 1 a 17).

D01 revisa los efectos de la leptina en el cerebro tanto a nivel del hipotálamo y de la homeostasis como su relación con el aprendizaje, la memoria y la neuroprotección. Así, la leptina promueve la supervivencia neuronal ejerciendo un efecto en la función sináptica y sobre la estructura, plasticidad, supervivencia y proliferación neuronal.

D02 examina el papel de la leptina en el dolor neuropático utilizando un modelo de rata con lesión en el nervio ciático. Demuestra que, tras la lesión, la leptina contribuye al dolor de modo que la administración espinal de un antagonista de leptina previene y revierte el dolor neuropático.

D03 expone que la activación de la secreción de leptina endógena comienza inmediatamente después de una lesión medular espinal (SCI) produciéndose un descenso entre la 2ª y la 6ª hora. Además, el nivel de la lesión afecta a los niveles de leptina sérica.

D04 divulga el uso de leptina en el tratamiento de la resorción ósea que se produce en osteoporosis o en la enfermedad de Paget.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

En la literatura consultada, constituida por documentos de patentes y por publicaciones científicas, se han encontrado los efectos de la leptina en el cerebro y el uso terapéutico de la leptina en el tratamiento de diferentes enfermedades que afectan al sistema nervioso central. Así mismo, los documentos encontrados exponen que la leptina contribuye al dolor neuropático en un modelo de rata con lesión en el nervio ciático y las variaciones en la secreción de leptina endógena después de una lesión medular espinal. Sin embargo, en los documentos consultados no se ha encontrado el uso específico de la leptina en el tratamiento de la lesión medular espinal y/o el dolor neuropático y, por consiguiente, las reivindicaciones de la 1 a la 17 cumplen con los requisitos de novedad y actividad inventiva.