(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 659 092**

(21) Número de solicitud: 201730214

(51) Int. Cl.:

A61K 38/10 (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN B2

(22) Fecha de presentación:

20.02.2017

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

13.03.2018

Fecha de concesión:

22.06.2018

(45) Fecha de publicación de la concesión:

29.06.2018

(73) Titular/es:

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (100.0%)
C/ Cervantes, Nº 2
29071 Málaga (Málaga) ES

(72) Inventor/es:

FLORES BURGESS, Antonio;
MILLÓN PEÑUELA, Carmelo ;
GAGO CALDERÓN, Belén;
NARVÁEZ PELÁEZ, Manuel Alejandro;
NARVÁEZ BUENO, José Ángel;
SANTÍN NÚÑEZ, Luis Javier y
DÍAZ CABIALE, Zaida

(54) Título: **Composición farmaceútica que comprende inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina y galanina (1-15)**

(57) Resumen:

Composición farmacéutica que comprende inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina y galanina (1-15). La presente invención se refiere al uso de galanina (1-15) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para ser utilizado en combinación con un inhibidor de la recaptación de serotonina o cualquier otro compuesto que provoque un aumento significativo de la síntesis de receptores 5HT1A postsinápticos en áreas terminales. En particular, la presente invención se refiere al uso de GAL(1-15) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo útil para aumentar y/o proporcionar un inicio más rápido del efecto terapéutico de un inhibidor de la recaptación de serotonina o cualquier otro compuesto que un aumento significativo de la síntesis de receptores 5HT1A postsinápticos en áreas terminales.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP 11/1986.

ES 2 659 092 B2

Composición farmacéutica que comprende inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina y galanina (1-15)

DESCRIPCIÓN

Campo de la invención

La presente invención se enmarca en el campo de la medicina, en particular a un uso terapéutico de la combinación de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y galanina (1-15) para el tratamiento de la depresión y desordenes relacionados.

Antecedentes de la invención

Los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (en lo sucesivo denominados como ISRS) se han convertido en la principal elección en el tratamiento de la depresión, de ciertas formas de ansiedad y de fobias sociales, debido a su efectividad, buena tolerancia y a que tienen un perfil de seguridad favorable en comparación con los antidepresivos tricíclicos clásicos.

No obstante, estudios clínicos sobre la depresión y desórdenes de ansiedad indican una no respuesta sustancial de los ISRS de hasta un 30%. Un factor a considerar, a menudo descuidado, en el tratamiento con antidepresivos es el cumplimiento del mismo, el cual tiene un profundo efecto en la motivación del paciente para continuar con la farmacoterapia.

En primer lugar, existe el retraso en el efecto terapéutico de los ISRS. A veces los síntomas empeoran incluso durante las primeras semanas de tratamiento. En segundo lugar, la disfunción sexual es un efecto secundario común a todos los ISRS. Sin abordar estos problemas, no es probable que se dé un progreso real en la farmacoterapia de la depresión y los trastornos de ansiedad.

Con el fin de hacer frente a la falta de respuesta, los psiquiatras a veces hacen uso de estrategias de potenciación. La potenciación de la terapia antidepresiva puede lograrse mediante la coadministración de estabilizadores del estado de ánimo tales como carbonato de litio o la triyodotironina o mediante el uso de electrochoque.

En 1993, Artigas y colaboradores describieron una estrategia de potenciación con pindolol en Trends Pharmacol. Sci. 1993, 14, p 262 - 263. La idea de Artigas se basa en experimentos de microdiálisis intracerebral en animales. De hecho, estudios neuroquímicos posteriores basados en la hipótesis de desensibilización de Blier y colaboradores indicaron que el retraso en el efecto terapéutico de los antidepresivos está relacionado con una desensibilización gradual de los autorreceptores 5-HT (Blier et al. J. Psycipharmacol. 1987. 7 suppl. 6, 24S-35S). Un punto clave en su hipótesis es que los efectos de los ISRS en los autorreceptores somatodendríticos controladores de liberación (5-HT1A) limitan la liberación de 5-HT en

las áreas terminales y, por tanto, el efecto de la inhibición de la captación de 5-HT en esas regiones. Esto es apoyado por experimentos de microdiálisis en ratas, mostrando que el aumento de 5-HT extracelular provocado por una sola dosis de un ISRS se incrementa por la coadministración de un antagonista de autorreceptor 5-HT1A (Invernizzi et al. Brain Res, 1992, 584, p 322-324 and Hjorth, S., J. Neurochem, 1993, 60, p 776-779).

El efecto de la administración combinada de un compuesto que inhibe la recaptación de serotonina y un antagonista del receptor 5-HT1A ha sido evaluado en varios estudios (Innis, R. B. et al. Eur. J. Pharmacol. 1987, 143, p. 1095-204 and Gartside, S. E., Br. J. Pharmacol, 1995, 115, p 1064-1070, Blier, P. et al. Trends in Pharmacol. Science 1994, 15, 220). En estos estudios se encontró que los antagonistas del receptor 5-HT1A suprimirían el freno inicial en la neurotransmisión 5-HT inducida por los inhibidores de la recaptación de serotonina y producirían así un impulso inmediato de la transmisión 5-HT y un inicio rápido de la acción terapéutica.

Se han registrado varias solicitudes de patente que cubren el uso de una combinación de un antagonista de 5-HT1A y un inhibidor de la recaptación de serotonina para el tratamiento de la depresión (ver por ejemplo EP-A2-687472 y EP-A2-714663).

Otro enfoque para aumentar el 5-HT terminal sería mediante el bloqueo del autorreceptor 5-HT1B. Los experimentos de microdiálisis en ratas han demostrado, de hecho, que el aumento de 5-HT en hipocampo inducido por el citalopram es potenciado por GMC 2-29, un antagonista experimental del receptor 5-HT1B.

También se han registrado varias solicitudes de patente que cubren la combinación de un ISRS y un antagonista o agonista parcial de 5-HT1B (WO 97/28141, WO 96/03400, EP-A-701819 and WO 99/13877).
Se ha descubierto ahora que, sorprendentemente, un fragmento de galanina (GAL), en particular GAL (1-15), que tiene la fórmula general Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala o GWTLNSAGYLLGPHA, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, es capaz de aumentar y proporcionar un inicio más rápido del efecto terapéutico de los inhibidores de la recaptación de serotonina, en particular de la fluoxetina (FLX).

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere al uso de GAL (1-15) o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en combinación con un inhibidor de la recaptación de serotonina o cualquier otro compuesto que provoque una elevación en el nivel de serotonina extracelular.

En particular, la presente invención se refiere al uso de GAL (1-15), o de una sal farmacéuticamente aceptable de dicho fragmento, útil para aumentar y/o proporcionar un inicio más rápido del efecto

terapéutico de un inhibidor de la recaptación de serotonina o cualquier otro compuesto que provoque una elevación en el nivel de serotonina extracelular.

Más particularmente, la presente invención se refiere al uso anteriormente indicado de GAL (1-15), o de una sal farmacéuticamente aceptable de dicho fragmento, para el tratamiento de la depresión, de trastornos de ansiedad y otros trastornos afectivos, de trastornos alimentarios tales como la bulimia, la anorexia y la obesidad, de fobias, de distimia, del síndrome premenstrual, de trastornos cognitivos, de trastornos de control de impulsos, del trastorno por déficit de atención con hiperactividad y abuso de fármacos, en particular de la depresión, con un inhibidor de la recaptación de serotonina o cualquier otro compuesto que provoque una elevación del nivel de serotonina extracelular.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1. Efectos a nivel de comportamiento de la coadministración de una dosis no efectiva de FLX (2,5mg/Kg) y una dosis subumbral de GAL(1-15) (1nmol) en el test de nado forzada (en ingles, *forced-swimming test* o FST). La FLX se administró por vía subcutánea (sc) 23, 5 y 1 hora antes del test y GAL(1-15) fue inyectado por vía intracerebroventricular (icv) 15 minutos antes del test. Los datos se representan como la media ± EEM del tiempo de inmovilidad, escalada y nado en el FST durante los 5 min del periodo de test (n=8-9 ratas por grupo). *p<0.05 comparado con el resto de grupos, a = p<0.05 comparado con el grupo de control y GAL(1-15)(1nmol) de acuerdo con un test ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

Fig. 2. Efectos a nivel de comportamiento de la coadministración de la dosis efectiva de FLX (10mg/Kg) y GAL(1-15) (1nmol) o GAL (1nmol) en el FST. La FLX se administró por vía sc 23, 5 y 1 hora antes del test. El líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa), el GAL(1-15) y la GAL se administraron por vía icv 15 minutos antes del test. Los datos se representan como la media ± EEM del tiempo de inmovilidad, escalada y nado en el FST durante los 5 min del periodo de test (n=7-8 ratas por grupo). *p<0.05, **p<0.01 comparado con el resto de grupos; #p<0.05 comparado con el grupo control de acuerdo con un test ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

Fig. 3A. Efectos a nivel de comportamiento de la coadministración de la dosis efectiva de FLX (10mg/Kg) y dosis subumbrales de GAL(1-15) (1nmol) en ratas Sprague-Dawley a las cuales también se administró M871 (3nmol), antagonista de GALR2. La FLX o el vehículo (*carrier*) se administraron por vía sc 23, 5 y 1 hora antes del test. El LCRa, el GAL(1-15) y la GAL(1-15)+M871 se administraron por vía icv 15 min antes del test. Los datos se representan como la media ± EEM del tiempo de inmovilidad, escalada y natación en el FST durante

los 5 min del periodo de prueba (n=7-9 ratas por grupo). #p<0.05, ##p<0.01 comparado con FLX10mg(sc)+LCRa(icv) y FLX10mg(sc)+GAL(1-15) 1nmol+M871 3nmol (icv); *p<0.05, **p<0.01 comparado con el grupo control de acuerdo con un test ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

Fig. 3B. Efectos a nivel de comportamiento de la coadministración de la dosis efectiva de FLX (10mg/Kg) y dosis subumbrales de GAL(1-15) (1nmol) en ratas knockdown GALR2 (siGalR2). La FLX o el *carrier* se administraron por vía sc 23, 5 y 1 hora antes del test. El LCRa y el GAL(1-15) se administraron por vía icv 15 min antes del test. Los datos se representan como la media ± EEM del tiempo de inmovilidad, escalada y natación en el FST durante los 5 min del periodo de test (n=7-9 ratas por grupo). #p<0.05, ##p<0.01 comparado con FLX10mg(sc)+LCRa(icv) y con FLX10mg(sc)+GAL(1-15) 1nmol (icv); *p<0.05, **p<0.01 frente al grupo de control de acuerdo con un test ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

Fig. 4. (A) Expresión de proteína GALR1 ocho días después de una inyección única del ARNpi (*siRNA* en inglés) de GALR1 o del *carrier* vehículo en el cerebro de la rata. Los datos se representan como media ± EEM de los porcentajes respecto al valor control (100&) de la densidad óptica (D.O) *p<0.05 según test t-Student . **(B)** Efectos a nivel de comportamiento de la coadministración de la dosis efectiva de FLX (10mg/Kg) y la dosis subumbral de GAL(1-15) (1nmol) en ratas Knocdown GALR1 (siGalR1). La FLX o el *carrier* se administraron por vía sc 23, 5 y 1 hora antes del test. El LCRa y el GAL(1-15) se administraron por vía icv 15 min antes del test. Los datos se representan como la media ± EEM del tiempo de inmovilidad, escalada y natación en el FST durante los 5 min del periodo de prueba (n=7-9 ratas por grupo) *p<0.05 según test t-Student.

Fig. 5. Efectos a nivel de comportamiento de la coadministración de la dosis efectiva de FLX (10mg/Kg) y de Way100635 (6nmol), antagonista de 5-HT1A, y la coadministración de la dosis efectiva de FLX (10mg/Kg) con GAL(1-15) (1nmol) y Way100635 (6nmol) en el FST. La FLX o el *carrier* se administraton por vía sc 23, 5 y 1 hora antes del test. GAL(1-15), Way100635 y GAL(1-15)+Way100635 se administró por vía icv 15 min antes del test. Los datos se representan como la media ± EEM del tiempo de inmovilidad, escalada y natación en el FST durante los 5 min del periodo de prueba (n=5-10 ratas por grupo). *p<0.05, **p<0.01 comparado con el grupo control de acuerdo con un test ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

Fig. 6A. Efectos de la coadministración de FLX (10mg/Kg) y GAL(1-15) (1nmol) en los niveles de ARNm de 5-HT1AR en el hipocampo dorsal (región CA1 y giro dentado –DG-). La FLX se administró 23, 5 y 1,25 horas antes del sacrificio y GAL(1-15) se inyectó 30 min antes del sacrificio. Los valores de densidad óptica (D.O), media ± EEM, están expresados en porcentaje respecto del valor control (100%). *p<0.05 comparado con el resto de grupos. (B) Autorradiogramas representativos del hipocampo dorsal mostrando los niveles de ARNm de 5-HT1AR determinados por *hibridación in situ* en la áreas analizadas.

Fig. 6B. Autorradiogramas representativos del hipocampo dorsal mostrando los niveles de ARNm de 5-HT1AR determinados por *hibridación in situ* en la áreas analizadas.

Fig. 7A. Efectos sobre las características de unión de [3H]-8-OH-DPAT, agonista de 5-HT1AR, en el giro dentado del hipocampo (GD) después de la coadministración de FLX((10mg/Kg) y LCRa o GAL(1-15)(1nmol). La FLX se administró 23, 5 y 1,25 horas antes del sacrificio y GAL(1-15) se inyectó 30 min antes del sacrificio. Los experimentos de saturación se realizaron con 10 concentraciones de [3H]-8- OH-DPAT (0.26-10nM) en secciones coronales del hipocampo. La union no especifica se definió en presencia de 10µM de serotonina. Los valores de Kd y Bmax se muestran como media±EEM (n=6 ratas por grupo), el valor de la Kd(nM) para el grupo de FLX es de 1.2±0.1 y el de Bmax(fmol/mg prot) es de 545±37. *p<0.05; **p<0.01 comparado con el grupo control según test t-Student.

Fig. 7B. Autorradiogramas representativos de secciones de hipocampo de rata con una concentración de radioligando similar a la Kd (1nM) mostrando el incremento de afinidad del agonista 5-HT1AR.

Descripción detallada de la invención

En la presente invención se describe por primera vez como GAL(1-15) mejora los efectos antidepresivos inducidos por FLX en el FST. Estos efectos son específicos ya que GAL carece de efecto. También se obtuvieron indicios de la implicación del complejo GALR1/GALR2 en las acciones mediadas por GAL(1-15) basadas en el uso M871, antagonista específico de GALR2, e inyecciones icv del ARNpi de GALR1 o del ARNpi de GALR2 produciendo una reducción de GALR1 o GALR2, respectivamente.

Es importante destacar la participación de 5HT1AR en las interacciones GAL(1-15)/FLX ya que WAY100635, antagonista 5HT1AR, bloqueó los efectos inducidos por la coadministración de GAL(1-15) y FLX. Además, el mecanismo de las interacciones GAL(1-15)/FLX implicó cambios en el 5HT1AR a nivel de membrana plasmática con cambios también a nivel transcripcional. Por lo tanto, las interacciones GAL(1-

15)/FLX afectaron las características de unión, así como los niveles de ARNm de 5-HT1AR específicamente en el hipocampo dorsal.

El FST se utiliza como una prueba de comportamiento para predecir la eficacia de los tratamientos antidepresivos. El FST es una prueba de comportamiento atractiva para la búsqueda de los fármacos antidepresivos porque es rápida de ejecutar, fiable entre laboratorios, y sensible a los efectos de todas las clases principales de medicamentos antidepresivos. En este ensayo, el principal indicativo de un efecto antidepresivo de un compuesto determinado es una disminución en el comportamiento de la inmovilidad. El registro de los comportamientos activos: natación y escalada proporcionan información adicional sobre el mecanismo de acción que media el efecto antidepresivo. De hecho, los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina disminuyen la inmovilidad y aumentan el comportamiento de la natación.

En la presente invención, la inyección de FLX10mg 23, 5 y 1 hora antes de la prueba de 5 min reduce significativamente la inmovilidad e incrementa el tiempo de natación en el FST. Los resultados obtenidos coinciden con estudios previos y validan el modelo conductual utilizado (Estrada-Camarena, E., Fernandez-Guasti, A., Lopez-Rubalcava, C., 2003. Neuropsychopharmacology 28, 830-838). Además, FLX a la dosis de 2.5mg no produjo ningún efecto, corraborando de nuevo resultados previos de otros autores (Detke, M. J., Wieland, S., Lucki, I., 1995b. Psychopharmacology (Berl) 119, 47-54)

En esta invención, sin embargo, se ha demostrado que la GAL(1-15) mejora significativamente los efectos antidepresivos de la FLX en el FST. Se observó una disminución en la inmovilidad y un aumento de la natación después de la coadministración de la dosis subumbral de GAL(1-15) y FLX. Cuando se administraron por separado, ninguno de estos tratamientos afectaron a los comportamientos analizados en el ensayo, lo que indica que GAL(1-15) y FLX interactúan para provocar las respuestas antidepresivas.

Dado que GAL (1-15) a una dosis efectiva induce un efecto pro-depresivo (Millon, C., Flores-Burgess, A., Narváez, M., Borroto-Escuela, DO, Santin, L., Parrado, C. , Narvaez, JA, Fuxe, K., Diaz-Cabiale, Z., 2015. Int J Neuropsychopharmacol 18), el efecto antidepresivo sólo puede ser debido a la mejora de la acción FLX. Además, se validó la fuerte potenciación inducida por GAL(1-15) sobre la acción antidepresiva de FLX utilizando una dosis efectiva de FLX. Se ha demostrado que GAL(1-15) implica a los receptores GALR1-GALR2 para mejorar el efecto antidepresivo de la FLX en el FST. GALR2 participa en los efectos de GAL(1-15) ya que M871, antagonista GALR2, bloqueó la potenciación de los efectos antidepresivos de la FLX inducida por GAL(1-15). También se bloquearon los efectos de comportamiento de la GAL(1-15) sobre FLX en ratas knockdown GALR1 y GALR2, lo que confirma que los efectos de GAL(1-15) dependen de la existencia de GALR1-GALR2.

Por otra lado, en las ratas knockdown GALR1 y GALR2, la FLX sólo redujo la inmovilidad y el tiempo de natación en el FST, confirmando que el efecto de la FLX no esta afectado por la reducción de los niveles de GALR1 o GALR2.

Además, los resultados con respecto a la presente invención confirman que los efectos de GAL(1-15) a través de complejos GALR1-GALR2 heterorreceptores podrían ser un mecanismo clave en la depresión.

Además, los efectos de GAL(1-15) en las acciones mediadas por FLX en el FST son específicos, ya que GAL no induce efectos. El hecho de que la mejora de la acción antidepresiva de FLX por GAL(1-15) sea bloqueado por WAY100365, antagonista de 5-HT1AR, también indica que 5-HT1AR tiene una participación significativa en esta interacción.

Según varios autores, la administración de WAY100635 junto con una dosis eficaz de FLX, induce la inhibición de la acción de este ISRS (Serres et al., 2000, Estrada-Camarena et al., 2006). Sin embargo, si se administra el antagonista en un momento diferente, como en el presente estudio, se mantiene la actividad de tipo antidepresivo de FLX en el FST (Serres et al., 2000, Estrada-Camarena et al., 2006). Este patrón de inyección en el que WAY100365 no pudo anular la actividad antidepresiva mostrada por FLX por sí sola en el FST, apoya la idea de que GAL(1-15), a través de GALR1/GALR2, puede interaccionar con 5-HT1AR para facilitar la acción de la FLX.

En conclusión, los resultados indican que GAL(1-15) aumenta los efectos antidepresivos inducidos por FLX probablemente actuando sobre el complejo heterorreceptor 5-HT1AR - GALR1 - GALR2. Los resultados abren la posibilidad de utilizar terapéuticamente GAL(1-15) en combinación con FLX como una estrategia novedosa para el tratamiento de la depresión.

La presente invención proporciona así:

La presente invención se refiere al uso de GAL(1-15) o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables para ser usadas en combinación con un inhibidor de la recaptación de serotonina o cualquier otro compuesto que provoque una elevación en el nivel de serotonina extracelular.

En particular, la presente invención se refiere al uso de GAL(1-15), o de una sal farmacéuticamente aceptable útil, para aumentar y/o proporcionar un inicio más rápido del efecto terapéutico de un inhibidor de la recaptación de serotonina o cualquier otro compuesto que provoque una elevación de los niveles de serotonina extracelular.

Más particularmente, la presente invención se refiere al uso anteriormente indicado de GAL(1-15), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el tratamiento de depresión, trastornos de ansiedad y otros trastornos afectivos, trastornos alimentarios tales como bulimia, anorexia y obesidad , fobias, distimia, síndrome premenstrual, trastornos cognitivos, trastornos de control de impulsos, trastorno por déficit de atención con hiperactividad y abuso de fármacos, en particular depresión, con un inhibidor de la recaptación de serotonina o cualquier otro compuesto que provoque elevación del nivel de serotonina extracelular. Más particularmente, la sal farmacéuticamente aceptable de GAL (1-15) es una sal de trifluoroacetato.

Los trastornos de ansiedad mencionados anteriormente incluyen trastorno de ansiedad general, ansiedad de pánico, trastorno obsesivo compulsivo, trastorno de estrés agudo, trastorno de estrés postraumático o trastorno de ansiedad social.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “aumentar” significa mejorar el efecto terapéutico y/o potenciar el efecto terapéutico de un IRS o un compuesto que provoca una elevación en el nivel extracelular de 5-HT.

En una realización adicional, la invención se refiere al uso de GAL(1-15), o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y un compuesto que es un inhibidor de la recaptación de serotonina, o un compuesto que causa una elevación del nivel de serotonina extracelular, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades o trastornos que responden al efecto terapéutico de un inhibidor de la recaptación de serotonina, o cualquier otro compuesto que provoque una elevación del nivel de serotonina extracelular.

Las enfermedades que responden a un inhibidor de la recaptación de serotonina incluyen depresión, trastornos de ansiedad y otros trastornos afectivos, trastornos alimentarios tales como bulimia, anorexia y obesidad, fobias, distimia, síndrome premenstrual, trastornos cognitivos, trastornos de control de impulso, en particular depresión.

El término “trastornos de ansiedad” se ha definido anteriormente.

En una realización de la invención, ésta se refiere al uso de GAL(1-15), o de una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para la preparación de una composición farmacéutica como se ha indicado anteriormente, adaptada para la administración simultánea de los ingredientes activos. En particular, dichas composiciones farmacéuticas pueden contener los ingredientes activos dentro de la misma forma de dosificación unitaria, por ejemplo en la misma cápsula o comprimido. Dichas formas de dosificación unitarias pueden contener los ingredientes activos como una mezcla homogénea o en compartimentos separados de la forma de dosificación unitaria.

En otra realización, la presente invención se refiere al uso de GAL(1-15) o de una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para la preparación de una composición farmacéutica como la anterior, adaptada para la administración secuencial de los ingredientes activos. En particular, dichas composiciones farmacéuticas pueden contener los ingredientes activos en formas de dosificación unitarias individuales (kit farmacéutico), por ejemplo comprimidos o cápsulas individuales que contengan cualquiera de los ingredientes activos. Estas formas de dosificación unitarias individuales pueden estar contenidas en el mismo recipiente o paquete, por ejemplo un *blister*.

La expresión “kit farmacéutico” empleada en el documento significa una composición farmacéutica que contiene cada uno de los ingredientes activos, pero en formas de dosificación unitarias individuales, y pudiendo estar dichos ingredientes activos empaquetados conjuntamente, por ejemplo en un blister, o no,

en cuyo caso la composición resulta del uso combinado de dichos ingredientes activos, entendiéndose por "uso combinado" la administración de los ingredientes activos de forma asociada entre sí pero no necesariamente de forma simultánea.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que incluye GAL(1-15), o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y un compuesto que es un inhibidor de la recaptación de serotonina, o cualquier otro compuesto que provoque una elevación en 5-HT extracelular, y opcionalmente *carriers* o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

La composición farmacéutica de la invención puede ser adaptada para la administración simultánea de los ingredientes activos o para la administración secuencial de los ingredientes activos, como se ha descrito anteriormente, preferiblemente para la administración secuencial de los ingredientes activos como se ilustra en los ejemplos proporcionados en la presente memoria, en particular mediante la administración de un inhibidor de la recaptación de serotonina, tal como la FLX, por vía subcutánea en un momento diferente de la administración de GAL(1-15), que se administra preferiblemente por vía parenteral, tal como una vía intraarterial o intravenosa.

Por último, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de enfermedades o trastornos que responden a un inhibidor de la recaptación de serotonina, o a cualquier otro compuesto que provoca una elevación del nivel de serotonina extracelular, que comprende administrar, a un individuo que lo necesite, GAL(1-15), o una sal farmacéuticamente aceptable, y un inhibidor de la recaptación de serotonina, o un compuesto que provoca una elevación del nivel de serotonina extracelular.

En particular, la presente invención se refiere a un método para aumentar y/o proporcionar un inicio más rápido del efecto terapéutico de un inhibidor de la recaptación de serotonina, o de cualquier otro compuesto que provoque un aumento en la nivel de serotonina extracelular, dicho método implicando administrar GAL(1-15), o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, a un individuo que vaya a ser tratado, o que esté bajo tratamiento, con un inhibidor de la recaptación de serotonina o cualquier otro compuesto que provoque una elevación del nivel de serotonina extracelular. Los individuos susceptibles de beneficiarse del tratamiento con una combinación como la anterior, pueden padecer depresión, trastornos de ansiedad y otros trastornos afectivos, trastornos alimentarios tales como bulimia, anorexia y obesidad, fobias, síndrome premenstrual, distimia, trastornos cognitivos, el trastorno por déficit de atención con hiperactividad, y el abuso de drogas; en particular, depresión.

Como se ha mencionado anteriormente, los trastorno de ansiedad incluyen trastorno de ansiedad general, ansiedad de pánico, trastorno obsesivo compulsivo, trastorno de estrés agudo, trastorno de estrés postraumático o trastorno de ansiedad social.

GAL(1-15) y el inhibidor de la recaptación de serotonina pueden administrarse simultáneamente como se ha descrito anteriormente.

Alternativamente, los ingredientes activos pueden ser administrados secuencialmente, por ejemplo en dos formas de dosificación unitaria individuales, como se ha descrito anteriormente.

GAL(1-15) y sus sales farmacéuticamente aceptables tienen la fórmula general Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala o GWTLNSAGYLLGPHA.

Sorprendentemente, se ha descubierto que la coadministración de GAL(1-15) y un inhibidor de la recaptación de serotonina produce un aumento significativo de la síntesis de receptores 5HT1A postsinápticos en áreas terminales ((con efectos equivalentes a los esperados en caso de un aumento de los niveles de serotonina extracelular) en comparación con la administración únicamente del inhibidor de la recaptación de serotonina. La administración por sí sola de una dosis efectiva de GAL(1-15) causa un efecto prodepresivo.

Como se ha mencionado anteriormente, los inhibidores de la recaptación de serotonina muestran un retraso en el inicio de la acción. Incluso en la respuesta a los ISRS, varias semanas de tratamiento son necesarias para lograr un alivio en los síntomas. GAL(1-15) puede proporcionar un inicio rápido del efecto terapéutico de los inhibidores de la recaptación de serotonina.

El uso de una combinación de GAL(1-15) y un inhibidor de la recaptación de serotonina puede reducir en gran medida la cantidad de inhibidor de la recaptación de serotonina necesaria para tratar la depresión y otros trastornos afectivos, y puede así reducir los efectos secundarios causados por el inhibidor de la recaptación de serotonina. En particular, la combinación de una cantidad reducida de ISR y GAL(1-15) puede reducir el riesgo de disfunción sexual inducida por ISRS y trastornos del sueño.

La coadministración de GAL(1-15) y un inhibidor de la recaptación de serotonina también puede ser útil para el tratamiento de la depresión refractaria, es decir, la depresión que no puede tratarse apropiadamente empleando sólo la administración de un inhibidor de la recaptación de serotonina. Típicamente, GAL(1-15) puede usarse como terapia complementaria para el aumento de la respuesta a ISRS en pacientes en los que no se ha logrado al menos una reducción del 40-60% de los síntomas durante las primeras 6 semanas de tratamiento con un ISRS .

Se han descrito en la literatura muchos antidepresivos con efecto inhibidor de la recaptación de serotonina. Cualquier compuesto farmacológicamente activo que principalmente o parcialmente ejerza su efecto terapéutico a través de la inhibición de la recaptación de serotonina en el sistema nervioso central (SNC), puede beneficiarse del aumento con GAL(1-15).

La siguiente lista contiene una serie de inhibidores de la recaptación de serotonina que pueden beneficiarse de la potenciación con GAL (1-15): Citalopram, escitalopram, FLX, R-FLX, sertralina, paroxetina, fluvoxamina, venlafaxina, duloxetina, dapoxetina, nefazodona, imipramina, imipramina N-óxido, desipramina, pirandamina, dazepinil, nefopam, befuralina, fezolamina, femoxetina, clomipramina, cianoimipramina, litoxetina, Cericlamina, seproxetina, WY 27587, WY 27866, imeldina, ifoxetina, tiflucarbina,

viqualina, milnacipran, bazinaprina, YM 922, S 33005, F 98214-TA, OPC 14523, alaproclato, cianodotepina, trimipramina, quinupramina, dotiepina, amoxapina, nitroxazepina , McN 5652, McN 5707, O1 77, Org 6582, Org 6997, Org 6906, amitriptilina, amitriptilina N-óxido, nortriptilina, CL 255.663, pirlindole, indatralina, LY 113.821, LY 214.281, CGP 6085 A, RU 25.591, napamezol, diclofensina, trazodona, EMD 68.843, BMY 42.569, NS 2389, sercloremina, nitroquipazina, ademetionina, sibutramina y clovoxamina. Los compuestos mencionados anteriormente se pueden usar en forma básica o de una sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable de la misma. Son especialmente preferidas la FLX o una sal de ácida farmacéuticamente aceptable de la misma.

La lista anterior de inhibidores de la recaptación de serotonina y otros compuestos, que causan un aumento en el nivel extracelular de serotonina, no puede ser interpretada como limitante.

Los ISRS que son particularmente preferidos de acuerdo con la presente invención incluyen citalopram, escitalopram, FLX, sertralina, paroxetina, fluvoxamina, venlafaxina, dapoxetina, nefazodona, imipramina, femoxetina y clomipramina. En particular, de nuevo, se prefiere la FLX o una sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable de la misma.

El término “inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRS)” significa un inhibidor de los transportadores de monoamina que tiene un efecto inhibidor más fuerte en el transportador de serotonina que los transportadores de dopamina y noradrenalina.

Los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) están entre los inhibidores de la recaptación de serotonina más preferidos utilizados de acuerdo con la presente invención. Los ISRS particularmente preferidos de acuerdo con la invención son citalopram, escitalopram, FLX, fluvoxamina, sertralina o paroxetina.

Los ingredientes activos de acuerdo con la invención, es decir, GAL(1-15) y el ISRS o un compuesto que provoca un aumento de los niveles de serotonina extracelular, se pueden usar en la forma básica libre o en forma de una sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable de la misma, siendo esta última obtenible por reacción de la forma básica con un ácido apropiado.

El citalopram se usa preferiblemente en forma de hidrobromuro o como base; escitalopram, en forma de oxalato; FLX, sertralina y paroxetina, en forma de hidrocloruro; y fluvoxamina, en forma de maleato.

Como se ha mencionado anteriormente, la combinación de GAL(1-15) con un inhibidor de la recaptación de serotonina muestra inesperadamente un efecto sinérgico sobre el SNC. Como consecuencia, puede ser eficaz la terapia de combinación usando GAL(1-15) y una dosis más bajas del inhibidor de la recaptación de serotonina que las normalmente se usan en monoterapia, y se pueden reducir los efectos secundarios asociados con las cantidades mayores de inhibidor de la recaptación de serotonina usadas en monoterapia o impedirlos por completo.

Además, la terapia de combinación con GAL(1-15) usando una dosis normal de inhibidor de la recaptación de serotonina tiene la ventaja de que se puede obtener un efecto eficaz del SNC en un número de pacientes, a menudo grande, que no responden a la monoterapia convencional con ISRS.

Los inhibidores de la recaptación de serotonina, incluyendo los ISRSs específicamente mencionados anteriormente, difieren tanto en peso molecular como en actividad. Como consecuencia, la cantidad de inhibidor de la recaptación de serotonina usada en la terapia de combinación depende de la naturaleza de dicho inhibidor de la recaptación de serotonina. En una realización de la invención, el inhibidor de la recaptación de serotonina o el compuesto que causa un aumento en el nivel de 5-HT extracelular se administra a dosis menores de las requeridas cuando el compuesto se usa solo. En otra realización, el inhibidor de la recaptación de serotonina o el compuesto que causa un aumento en el nivel de 5-HT extracelular, se administra en dosis normales.

Para preparar las composiciones farmacéuticas de esta invención, se combina una cantidad apropiada del ingrediente o ingredientes activos, en forma de sal o en forma de base, la mezcla se realiza con un *carrier* farmacéuticamente aceptable, que puede adoptar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración. Estas composiciones farmacéuticas se encuentran idealmente en forma de dosificación unitaria adecuada para administración oral, rectal, percutánea o por inyección parenteral. Por ejemplo, al preparar las composiciones en forma de dosificación oral, pueden emplearse cualquiera de los medios farmacéuticos usuales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales tales como suspensiones, jarabes, elixires y soluciones; o *carriers* sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares en el caso de polvos, píldoras, cápsulas y comprimidos. Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso se emplean obviamente *carriers* farmacéuticos sólidos.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Tal como se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la forma de dosificación unitaria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias, conteniendo cada unidad, una cantidad predeterminada de ingrediente activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el *carrier* farmacéutico requerido. Ejemplos de tales formas unitarias de dosificación son comprimidos (incluyendo comprimidos marcados o recubiertos), cápsulas, pastillas, paquetes de polvo, obleas, soluciones o suspensiones inyectables, cucharaditas, cucharadas y similares, y múltiples segregados de los mismos.

El GAL(1-15) puede ser administrada antes, durante o después de la administración del inhibidor de la recaptación de serotonina, preferiblemente después de la administración del inhibidor de la recaptación de serotonina, siempre que el tiempo entre la administración de GAL(1-15) y la administración de el

inhibidor de la recaptación de serotonina es tal que se permite que los ingredientes actúen sinérgicamente en el SNC. Cuando se prevé la administración simultánea de GAL(1-15) y un inhibidor de la recaptación de serotonina, una composición que contiene tanto un inhibidor de la recaptación de serotonina como GAL(1-15) puede ser particularmente conveniente. O GAL(1-15) y el inhibidor de la recaptación de serotonina pueden ser administrados por separado en forma de composiciones adecuadas. Las composiciones se pueden preparar como se ha descrito anteriormente.

La presente invención también comprende productos que contienen GAL(1-15) y un inhibidor de la recaptación de serotonina como una preparación de combinación para uso simultáneo, separado o secuencial en la terapia farmacológica psiquiátrica. Tales productos pueden comprender, por ejemplo, un kit farmacéutico que comprende formas de dosificación unitarias discretas que contienen GAL(1-15) y formas de dosificación unitarias discretas que contienen un inhibidor de la recaptación de serotonina, todas contenidas en el mismo envase, p.e. un *blister*.

La invención antes mencionada se detalla adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes y meramente ilustrativos.

Ejemplos

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Ratas macho Sprague-Dawley obtenidas a CRIFFA, Barcelona (200-250gr), se mantuvieron bajo un ciclo luz/oscuridad de 12h en condiciones controladas de temperatura y humedad (22±2ºC, 55-60%). Los animales tuvieron libre acceso a los *pellets* de comida y al agua del grifo. Las pruebas de comportamiento se realizaron durante la fase de luz del ciclo diario. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética Animal Institucional de la Universidad de Málaga, España.

Ratas Knockdown GALR1 y GALR2.

Para generar ratas knockdown se utilizó un procedimiento ya descrito (Millon et al., 2015). En resumen, durante la cirugía estereotáxica una vez que la cánula se fija, los animales recibieron una inyección icv de 5 µg (0,35 nmol) de Accell Smart pool siRNA (Dharmacon) para el receptor 2 de galanina (GALR2) o para su receptor 1 (GALR1). Los animales tuvieron un periodo de recuperación de 8 días antes de la prueba de comportamiento, que es el tiempo requerido para reducir los niveles de receptores de GAL como ya se ha descrito (Millon et al., 2015).

Evaluación del comportamiento

Los grupos de ratas se evaluaron en el FST. Las dosis, patrones y modos de administración de las sustancias se eligieron en base a trabajos previos (Estrada-Camarena et al., 2003, Kuteeva et al., 2006, Zhang et al., 2004, Yoshiyama et al., 2003).

En el primer conjunto de experimentos, se realizó una curva dosis-respuesta de la FLX. Los grupos de ratas recibieron tres inyecciones sc de FLX a las dosis de 10 mg/Kg o 2.5 mg/Kg, o de *carrier* a las 23, 5 y 1 hora antes de las pruebas, además de una inyección icv de LCRa 15 min antes la prueba.

Se ha demostrado que este patrón de inyección produce efectos de FLX en el FST similares a aquellos por los que produce efectos después de tratamientos crónicos y a aquellas que produce sus efectos clínicos en seres humanos (Detke et al., 1997). Este patrón de inyección se usó en todos los experimentos relacionados con esta invención.

En el segundo grupo de experimentos, para evaluar las interacciones de FLX con GAL(1-15) en el FST, los grupos de ratas recibieron tres inyecciones sc de FLX (2.5 mg/Kg) o FLX (10 mg/Kg) y una Inyección única icv de GAL(1-15) (1nmol) 15 minutos antes de la prueba. También se compararon los efectos entre la coadministración de FLX (10mg/Kg) y GAL(1-15) (1nmol) o GAL (1nmol) en el FST.

En el tercer conjunto de experimentos se determinó la participación de GALR1 y GALR2 en la mediación del efecto de GAL(1-15) sobre la FLX. Los grupos de ratas recibieron tres inyecciones sc de FLX (10mg/kg), una sola inyección icv de GAL(1-15) (1nmol) y de M871 (3nmol), antagonista de GALR2, solos o en combinación. Además, en ratas ARNpi-knockdown GALR1 o GALR2 se coadministró FLX (10mg/Kg) y GAL(1-15) (1nmol) con el fin de analizar la participación de los receptores GALR1 y GALR2 en el efecto mediado por GAL(1-15).

Para estudiar si los efectos de GAL(1-15) sobre la acción de FLX fueron mediados por el receptor 5HT1AR, grupos de ratas recibieron tres inyecciones sc de FLX (10mg/kg), una sola inyección icv de GAL(1-15) (1nmol) y de WAY100635 (6nmol), antagonista de 5HT1AR, solos o en combinación.

Autorradiografía e hibridación in situ

El procedimiento para realizar la autorradiografía del receptor y la hibridación in situ está descrito (Razani et al., 2000, Razani et al., 2001). Las ratas (n=6 por grupo) recibieron las tres inyecciones sc de FLX o de *carrier*, y una sola inyección icv de GAL(1-15) o LCRa y se sacrificaron 30 min después. Se obtuvieron secciones coronales a nivel de hipocampo dorsal y de rafe dorsal (DR).

Autorradiografía cuantitativa

Los experimentos de saturación se realizaron usando [3H]-8-OH-DPAT. Las secciones se preincubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en tampón Tris-HCl 50mM (pH 7,6), que contenía 4mM de

$CaCl_2$, 0,01% de ácido ascórbico y 10mM de pargilina. Las secciones se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente con [3H]-8-OH-DPAT en la misma solución que la anterior. El tiempo de exposición de la película para las secciones fue de 6 semanas.

Hibridación in situ:

Después de la prehibridación, la hibridación se realizó en una cámara húmeda con el tampón de prehibridación durante 2h a 37ºC, las secciones se hibridaron bajo cubreobjetos con sondas de ARN a $1x10^6$ cpm/100µl de la mezcla de hibridación durante 16h a 55ºC. Tras la hibridación, las secciones se enjuagaron 4 veces durante 20min en 1xSSC a 55ºC. Finalmente, las secciones se enjuagaron en agua esterilizada durante 10s, se deshidrataron en alcohol y se secaron al aire. El tiempo de exposición de la película para las secciones fue de 2 semanas

Análisis de imágenes

Las mediciones se realizaron en el Giro Dentado (DG) y en la región CA1 del hipocampo (cuadrado de $0.15mm^2$). La parte ventral del área de la línea media del DR se analizó utilizando un cuadrado como campo de muestra ($0,09mm^2$).

Análisis Estadístico

Los datos se presentan como las medias±EEM y el número de muestras (n) se indica en las leyendas de las figuras. Todos los datos se analizaron utilizando GraphPad PRISM 4.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Para comparar dos condiciones experimentales, se realizó el análisis estadístico del test t-Student no pareado o, en caso contrario, ANOVA seguido por el test de comparaciones múltiples de Newman-Keuls después de la prueba. Las diferencias se consideraron significativas a $P < 0,05$ (*$P<0,05$, **$P<0,01$, ***$P<0,001$). Los datos de los experimentos de saturación se analizaron mediante análisis de regresión no lineal para la determinación de la constante de disociación (Kd) y el número total de sitios de unión agonista (Bmax) usando GraphPad PRISM 4.0.

<u>Ejemplo 1. *Dosis-respuesta de FLX*</u>

Como se describió anteriormente, tres inyecciones sc de FLX 10mg/Kg indujeron efectos similares a los antidepresivos en el FST en ratas (Tabla 1). El ANOVA total de una vía mostró un efecto significativo entre tratamientos en la inmovilidad ($F_{2,20}=4,628$, $p < 0,05$) y natación ($F_{2,20}=7,044$, $p < 0,01$), mientras que no se observó diferencia significativa en la escalada ($F_{2,20}=2,569$, $p=0,102$). FLX (10mg/Kg) redujo la inmovilidad (post hoc, $p < 0.05$) y el tiempo de natación (post hoc, $p < 0.01$) en comparación con los controles y FLX (2.5mg/Kg). Las tres inyecciones de sc FLX (2.5mg/Kg) se consideraron subumbrales en esta prueba ya que

no produjeron efectos antidepresivos en comparación con los controles (Tabla 1).

	Tiempo de Inmovilidad	Tiempo de Nado	Tiempo de Escalada
Control	130±4	84,9±9	66,8±8
FLX 2,5mg/Kg	122,6±10	101,9±10	56,8±9
FLX 10mg/Kg	91±14*	135,6±10[a]	41,3±7

Tabla 1. Efectos sobre el comportamiento de la administración de FLX a dosis de 2.5 ó 10mg/Kg o de LCRa en el FST. La FLX o el *carrier* se administraron sc 23, 5 y 1 hora antes de la prueba. El LCRa se inyectó icv 15 min antes de la prueba en todos los grupos. Los datos representan la media±EEM del tiempo de inmovilidad, escalada y natación en el FST durante el periodo de prueba de 5 min (n=6-9 ratas por grupo). *p<0,05 frente al resto de los grupos; [a]p<0.05 comparado con FLX (2.5mg/Kg) y p<0.01 en comparación con los controles según un ANOVA de una vía seguida del test de comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

Ejemplo 2. GAL(1-15) pero no GAL potencia los efecto antidepresivos de la FLX en el FST

La coadministración de las tres inyecciones sc de la dosis subumbral de FLX (2.5mg/Kg) y una sola inyección icv de GAL(1-15) (1nmol) (Figura 1) indujo efectos antidepresivos, con una disminución significativa en la inmovilidad ($F_{3,27}$= 3,973, p<0,05) en comparación con el resto de los grupos (Figura 1, post hoc, p<0,05). Además, se observó un aumento en la natación ($F_{3,28}$= 4,137, p<0,05) comparado con GAL(1-15) y los controles (Figura 1, post hoc, p<0,05).

La potente mejora de la GAL(1-15) en los efectos antidepresivos mediados por FLX se validó con una dosis efectiva de FLX (10mg/kg). La dosis subumbral de GAL(1-15) (1nmol) mejoró los efectos de tipo antidepresivo mediados por las tres inyecciones sc de FLX (10mg/kg), según un ANOVA de una vía, en la inmovilidad ($F_{3,28}$=10,96, p<0,001) y la natación ($F_{3,28}$=16,46, p<0,001) sin afectar la escalada ($F_{3,27}$=0,7554, p=0,5289) (Fig. 1). La GAL(1-15) vía icv disminuyó significativamente el comportamiento de inmovilidad inducido por las tres inyecciones de la dosis efectiva de FLX (10mg/kg) en un 50% en el FST (Figura 2, post hoc, p <0,05). Además, también se observó un aumento del comportamiento de la natación de alrededor del 40% frente al grupo FLX (10mg/kg) (p<0,01).

La coadministración de tres inyecciones sc de FLX (10mg/Kg) y una sola inyección icv de GAL (1nmol) careció de efecto en la inmovilidad y comportamiento de la natación en comparación con FLX (10mg/kg) en el FST (Figura 2).

Ejemplo 3. Receptores de GAL implicados en la interacción GAL(1-15)-FLX

Se ha probado la participación de la GALR2 en la interacción GAL(1-15)-FLX(10mgkg) con el antagonista selectivo de GALR2 M871 y con un modelo in vivo de ratas knockdown GALR2.

GALR2 participa en esta interacción ya que M871 (3nmol), antagonista de GALR2, bloqueó significativamente la inmovilidad ($F_{3,28}$=10,20, p<0,001, post hoc, p<0,05) y la natación ($F_{3,29}$=15,75, p<0,001; post hoc, p<0,01) inducidos por la coadministración de una única inyección icv de GAL(1-15) y las tres inyecciones sc de FLX(10mg/kg) en el FST (Figura 3A).

M871, antagonista de GALR2, inyectado solo, a la dosis de 3nmol, careció de efectos con respecto a la inmovilidad (141 ± 12 seg) y la natación (68,7 ± 10 seg) en el FST.

Consecuentemente se usaron ratas knockdown GALR2 para confirmar la participación de GALR2 en la interacción entre GAL(1-15) (1nmol) y FLX (10mg/kg) (Figura 3B). Según el ANOVA de una vía se observan efectos significativos del tratamiento utilizado en la inmovilidad ($F_{2,17}$=5.932, p<0.05) y comportamiento de natación ($F_{2,17}$=5.932, p<0.01). Las tres inyecciones sc de FLX (10mg/kg) produjeron efectos de tipo antidepresivo en los animales knockdown GALR2 con una disminución en el tiempo de inmovilidad (Figura 3B, post hoc, p<0,05) y un aumento en el tiempo de natación (Figura 3B, post hoc, p<0,01) en comparación con el grupo control de ratas knockdown GALR2. Por otra parte, la coadministración de las tres inyecciones sc de FLX (10mg/kg) y una única inyección icv de GAL(1-15) en animales knockdown GALR2 no produjo ningún efecto en el tiempo de inmovilidad y natación en comparación con FLX (Figura 3B).

GAL(1-15) (1nmol) inyectada por sí sola carece de efectos en el FST en animales knockdown GALR2 en comparación con el grupo control en la inmovilidad (14,7±3s), natación (81,7±3s) o escalada (60±4s).

También se utilizaron ratas knockdown GALR1 para determinar la participación de GALR1 en el efecto inducido por GAL(1-15) en FLX en el FST. En este modelo se confirmó una reducción en un 30% de la expresión de GALR1 por ensayo inmunoquímico en la región CA1 del hipocampo dorsal (Figura 4-A, t_{14}=2.317, p<0.05) y y en el DG (Figura 4- A, t_{14}=2.359, p<0.05).

En el FST de las ratas knockdown GALR1, las tres inyecciones sc de FLX (10mg/Kg) produjeron efectos antidepresivos con una disminución en el tiempo de inmovilidad (Tabla 2, t_{16}=2,778, p<0,05) y un incremento en el tiempo de natación (Tabla 2; t_{16}=2,041, p<0,05) en comparación con el grupo control de control de ratas knockdown GALR1.

	Tiempo de Inmovilidad (siRNA GALR1)	Tiempo de Nado (siRNA GALR1)	Tiempo de Escalada (siRNA GALR1)
Control	101,5±7	88,8±8	93,2±11
FLX (10mg/Kg)	70,9±8*	107,8±5,8*	92,3±14

Tabla 2 Efectos sobre el comportamiento de la dosis efectiva de FLX (10mg/Kg) en ratas knockdown GALR1 (siGalR1). La FLX y el *carrier* se administraron sc 23, 5 y 1 hora antes de la prueba. El LCRa y GAL(1-15) se inyectaron icv 15 min antes de la prueba. Los datos se representan como la media±EEM de la inmovilidad, escalada y tiempo de natación en el FST durante el periodo de prueba de 5min (n=7-9 ratas por grupo) *p<0,05 de acuerdo con el test de t-Student.

Además, en otros experimentos, la coadministración de las tres inyecciones sc de FLX (10mg/kg) y una única inyección icv de GAL(1-15) (1nmol) en animales knockdown GALR1 no produjo diferencias estadísticamente significativas en comparación con FLX (10mg/kg) en el tiempo de inmovilidad (Figura 4-B, t_{15}=0,121) ni en el tiempo de natación (Figura 4-B; t_{14}=0,319).

Ejemplo 4. Implicación del 5HT1AR en la interacción GAL(1-15)-FLX

Para determinar el papel de 5HT1AR en la interacción entre GAL(1-15) y FLX se utilizó WAY100635, antagonista de 5HT1AR (Figura 5).

5HT1AR participa en esta interacción ya que WAY100635 (6nmol), antagonista de 5HT1AR, bloqueó significativamente la inmovilidad ($F_{3,30}$=4,243, p<0,05, post hoc, p<0,05) y la natación ($F_{3,29}$=16,83, p<0,001; post hoc, p<0,01) inducidos por la coadministración de icv GAL(1-15) y las tres inyecciones de sc FLX (10mg/kg) en el FST (Figura 5).

WAY100635 (6nmol), antagonista de 5HT1AR, inyectado solo modificó el tiempo de inmovilidad (101±12seg) (t_{13}=2,617, p<0,01) y el tiempo de escalada (95±9seg) (t_{13}=2,200, p<0,05) en el FST. Sin embargo, la coadministración de tres inyecciones sc de FLX y una única inyección icv de WAY100635 (6nmol) no indujo ninguna diferencia en comparación con el efecto de FLX solo (Figura 5).

Ejemplo 5. GAL(1-15)+FLX modifica los niveles de ARNm y las caracteristicas de union de 5-HT1AR en el hipocampo dorsal

La coadministración de las tres inyecciones sc de FLX (10mg/kg) y una única inyección icv de GAL(1-15)

(1nmol) produjo un aumento en los niveles de ARNm de 5HT1AR en la región CA1 (Figura 6A, $F_{3,18}$=8.803 , p<0,001, post hoc, p<0,05) y DG (Figura 6A, $F_{3,17}$=5,033, p<0,05, post hoc, p<0,05) del hipocampo dorsal en comparación con el resto de los tratamientos. Este efecto no se observó en el DR (Tabla 3, $F_{3,19}$=0,983, p=0,422).

	Control	GAL(1-15)(1nmol)	FLX (10mg/Kg)	FLX (10mg/Kg) +GAL(1-15)(1nmol)
Niveles de ARN m de 5HT1AR (% respecto control)	100 ± 4	95,7 ± 5	98,2 ± 5	108,3 ± 7

Tabla 3. Efectos de la coadministración de FLX (10mg/kg) y GAL(1-15) (1nmol) sobre los niveles de ARNm de 5-HT1AR en el DR. La FLX o el *carrier* se administraron sc 23, 5 y 1,25 horas antes del sacrificio y la GAL(1-15) o el LCRa se inyectaron icv 30min antes del sacrificio. Los valores de los niveles de ARNm se representan como media±EEM (n=6 por grupo) de los porcentajes respecto de los valores de control (100%) de las medidas de densidad óptica (O.D.). No se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos según el ANOVA de una vía.

Los autorradiogramas representativos ilustran el aumento de los niveles de ARNm de 5HT1AR en ambas áreas, CA1 y DG, después de la coadministración de las tres inyecciones sc de FLX (10mg/kg) y la inyección única icv de GAL(1-15) (1nmol) (Figura 6B) .

En el experimento de autorradiografía, la coadministración de las tres inyecciones de sc FLX (10mg/kg) y una única inyección icv de GAL(1-15) (1nmol) produjo una disminución significativa de la Kd (Figura 5; t_9=2,916 , p<0,01) y la Bmax (Figura 7A, t_9=2,277, p<0,05) del agonista [^{3}H]-8-OH-DPAT en el DG del hipocampo dorsal comparado con FLX (10mg/kg) por separado.

Autoradiogramas representativos a una baja concentración de radioligandos (1nM), ilustran el aumento del marcaje (disminución de los valores de Kd) en el DG 10 minutos después de la coadministración de las tres inyecciones sc de FLX (10mg/Kg) y de la única inyección icv de GAL (1-15) (1nmol) (Figura 7B).

Estos efectos no se observaron en la región CA1 del hipocampo en la Bmax (Tabla 4, t_9=0,9420, p=0,1854) ni en la Kd (Tabla S3; t_9=0,01385, p=0,4946), ni tampoco en el DR en la Bmax (Tabla 4; t_9=0,8648, p=0,2048) o en la Kd (Tabla 4 t_9=0,9941, p=0,173).

	DR		CA1	
	Bmax (fm/mg prot)	Kd (nM)	Bmax (fm/mg prot)	Kd (nM)
FLX (10mg/Kg) +LCRa	4940 ± 1240	14,5 ± 6	483,8±17	1,4±0,2
FLX (10mg/Kg)+ GAL(1-15)(1nmol)	7781 ± 2794	29,1 ± 12	455,2±26	1,4±0,2

Tabla 4. Efectos de la coadministración de FLX (10mg/kg) y GAL(1-15) (1nmol) en las características de unión de [^{3}H]-8-OH-DPAT, agonista de 5-HT1AR en el DR y en la región CA1 del hipocampo. La FLX o el *carrier* se administraton sc 23, 5 y 1,25 horas antes del sacrificio y el GAL(1-15) o el LCRa se inyectaron icv 30min antes del sacrificio. Los experimentos de saturación se realizaron con diez concentraciones de [^{3}H]-8-OH-DPAT (0,26-10 nM) en secciones del DR o en la región CA1 del hipocampo. La unión no específica se definió como la unión en presencia de 10µM de serotonina. Los valores de Kd y Bmax se muestran como media±EEM (n=6 por grupo). No se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos según el test de t-Student.

Reivindicaciones

1. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de depresión, trastornos de ansiedad y trastornos alimentarios seleccionados de la lista que consiste en bulimia, anorexia y obesidad, fobias, distimia, síndrome premenstrual, trastornos cognitivos, trastornos del control de los impulsos, trastorno por déficit de atención e hiperactividad y abuso de drogas; que comprende galanina (1-15) o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho fragmento, y un compuesto, que es un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina.

2. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación anterior caracterizada por que la sal farmacétuicamente aceptable de galanina (1-15) es una sal de trifluoroacetato.

3. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación anterior caracterizada por que el inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina se selecciona de la lista que consiste en citalopram, escitalopram, fluoxetina, fluvoxamina, sertralina y paroxetina o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de estos compuestos.

4. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación anterior caracterizada por que el inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina es fluoxetina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

5. Composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende *carriers* o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

6. Composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada por que los ingredientes activos están contenidos en la misma forma de dosificación unitaria.

7. Composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 caracterizada por que los ingredientes activos están contenidos en formas de dosificación unitarias discretas.

8. Uso de una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de depresión, trastornos de ansiedad y trastornos alimentarios seleccionados de la lista que consiste en bulimia, anorexia y obesidad, fobias, distimia, síndrome premenstrual, trastornos cognitivos, trastornos del control de los impulsos, trastorno por déficit de atención e hiperactividad y abuso de drogas.

9. Uso de una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de de trastornos de ansiedad seleccionados de la lista que consiste en ansiedad de pánico, trastorno obsesivo compulsivo, trastorno de estrés agudo, o trastorno de ansiedad social.

10. Uso de una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la depresión.

11. Uso de una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-10 caracterizado por que la administración del medicamento fabricado comprende la administración simultánea de los ingredientes activos de dicha composición farmacéutica.

12. Uso de una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-10 caracterizado por que la administración del medicamento fabricado comprende la administración secuencial de los ingredientes activos de dicha composición farmacéutica.

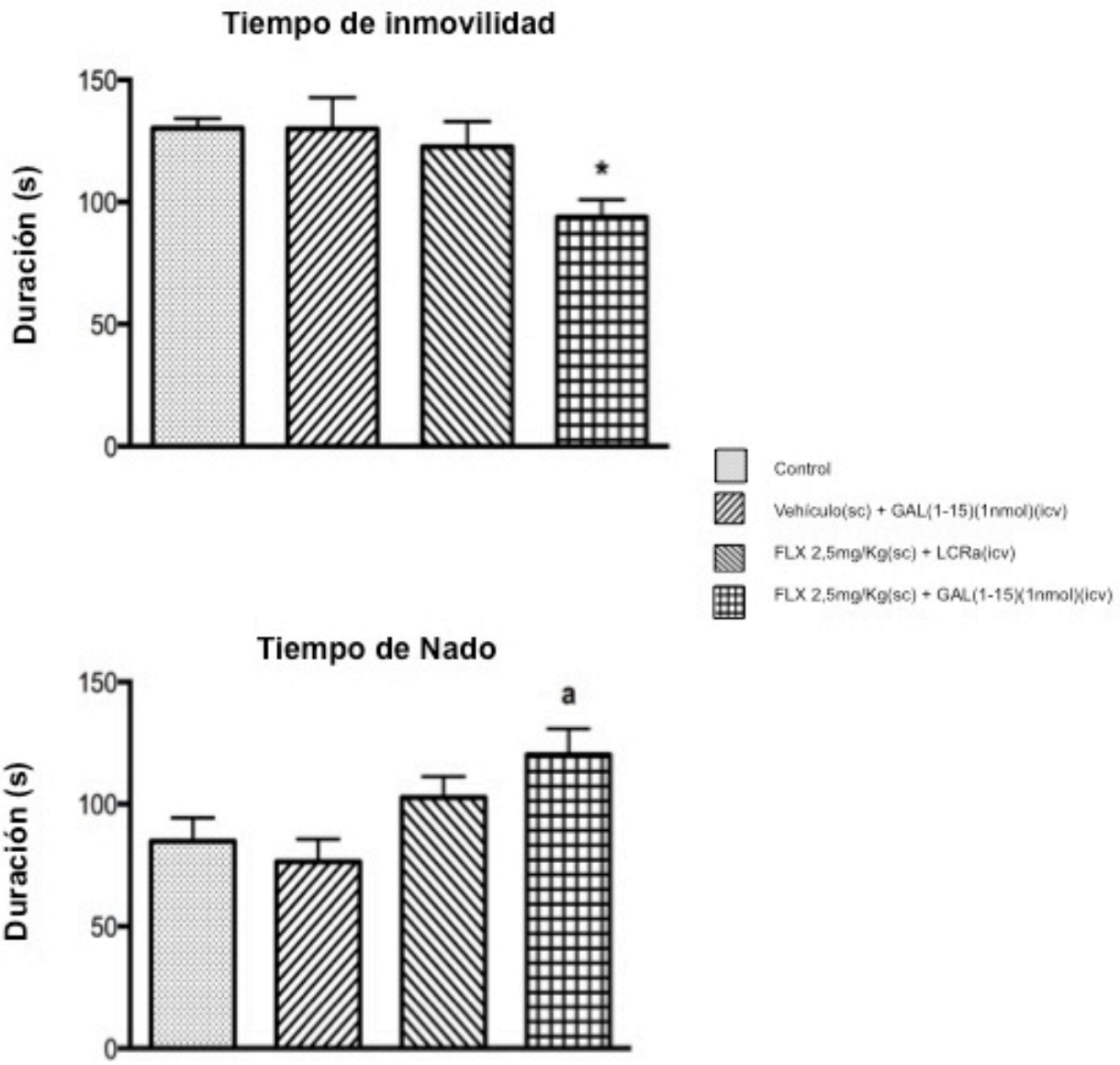
Tiempo de inmovilidad
Duración (s)
150
100
50
0
*
Control
Vehículo(sc) + GAL(1-15)(1nmol)(icv)
FLX 2,5mg/Kg(sc) + LCRa(icv)
FLX 2,5mg/Kg(sc) + GAL(1-15)(1nmol)(icv)
Tiempo de Nado
Duración (s)
150
100
50
0
a

Figura 1

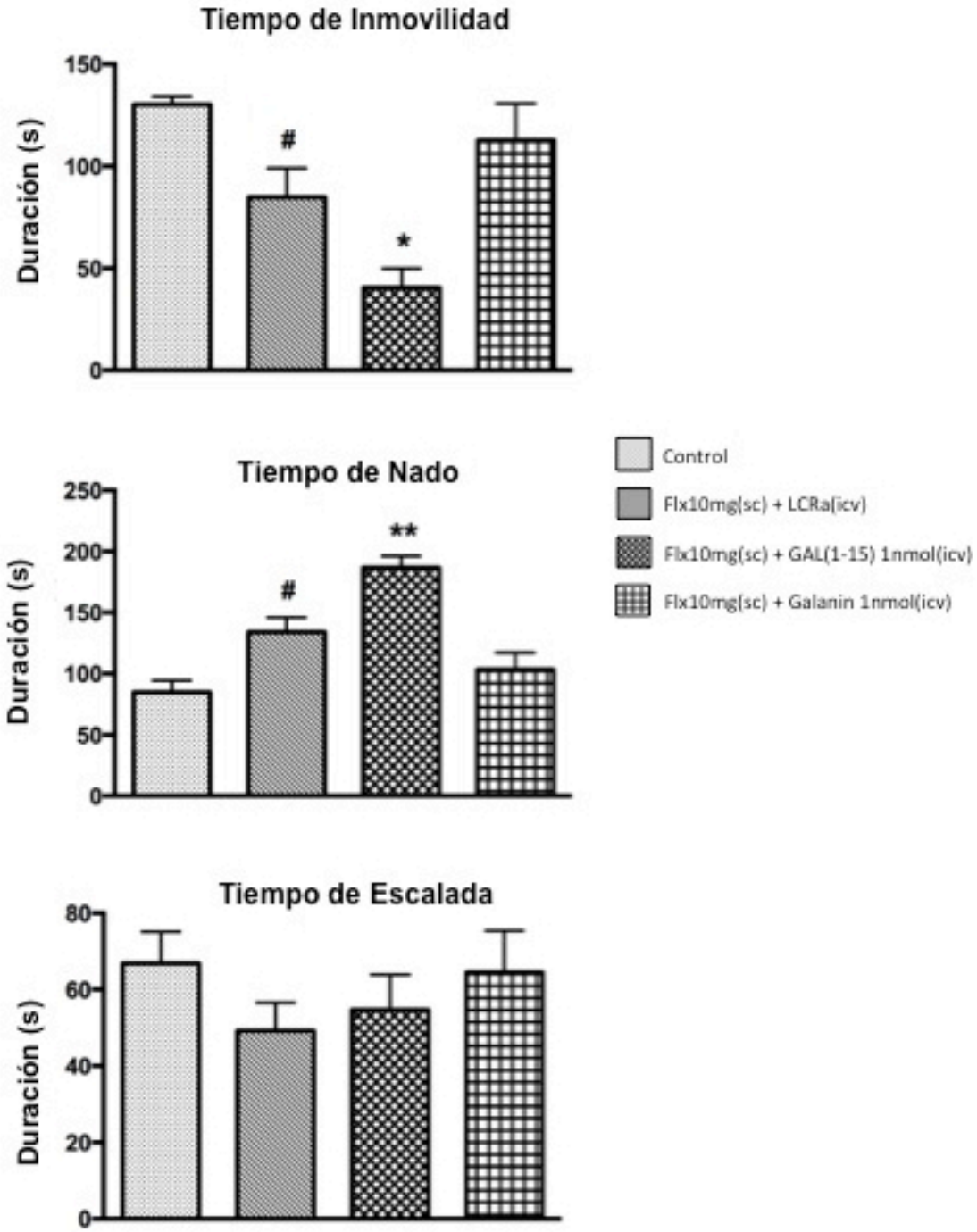
Tiempo de Inmovilidad
Duración (s)
150
100
50
0
#
*
Tiempo de Nado
Duración (s)
250
200
150
100
50
0
#
**
Tiempo de Escalada
Duración (s)
80
60
40
20
0
Control
Flx10mg(sc) + LCRa(icv)
Flx10mg(sc) + GAL(1-15) 1nmol(icv)
Flx10mg(sc) + Galanin 1nmol(icv)

Figura 2

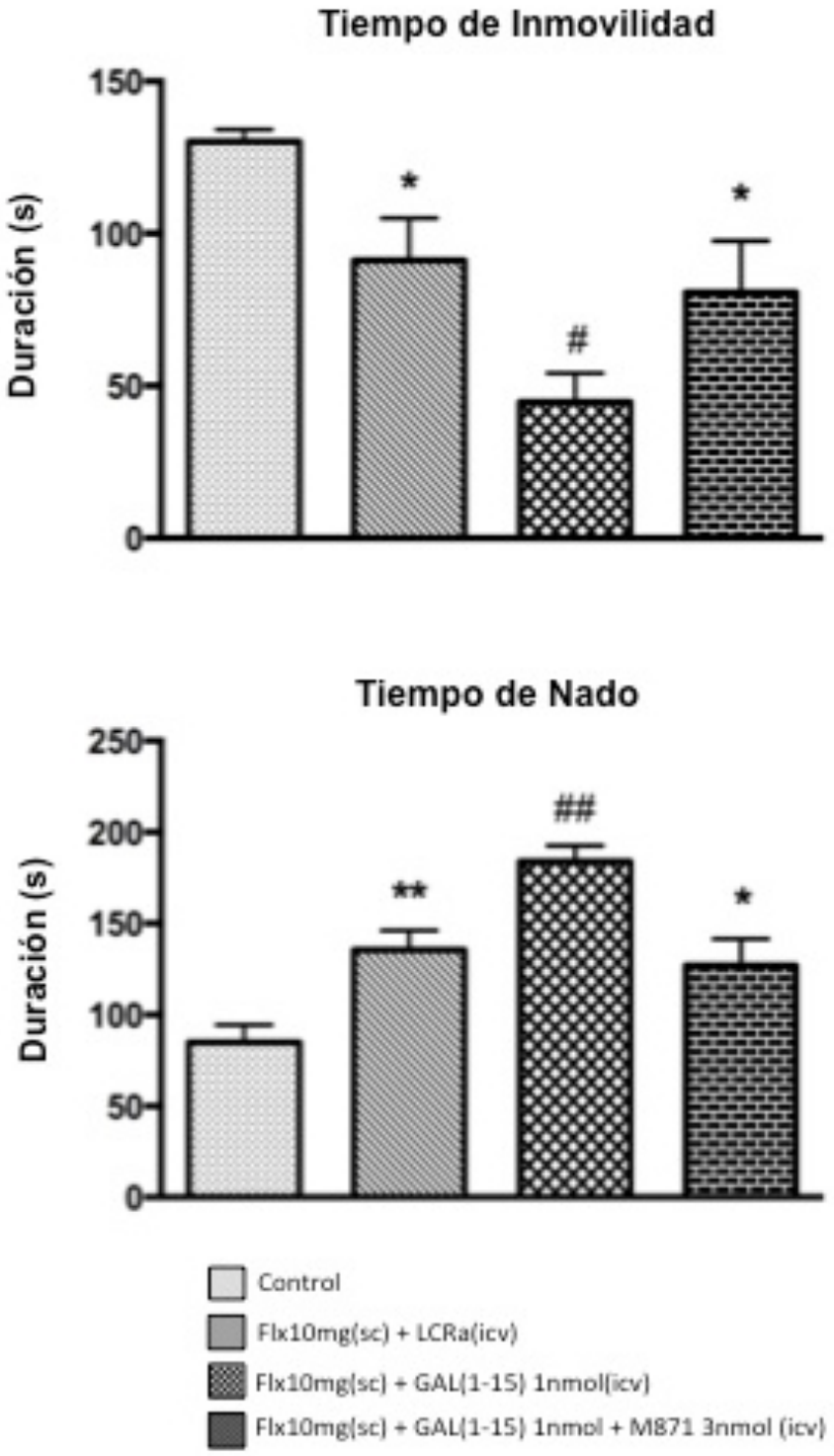
Tiempo de Inmovilidad
Duración (s)
150
100
50
0
*
#
*
Tiempo de Nado
Duración (s)
250
200
150
100
50
0
**
##
*
Control
Flx10mg(sc) + LCRa(icv)
Flx10mg(sc) + GAL(1-15) 1nmol(icv)
Flx10mg(sc) + GAL(1-15) 1nmol + M871 3nmol (icv)

Figura 3A

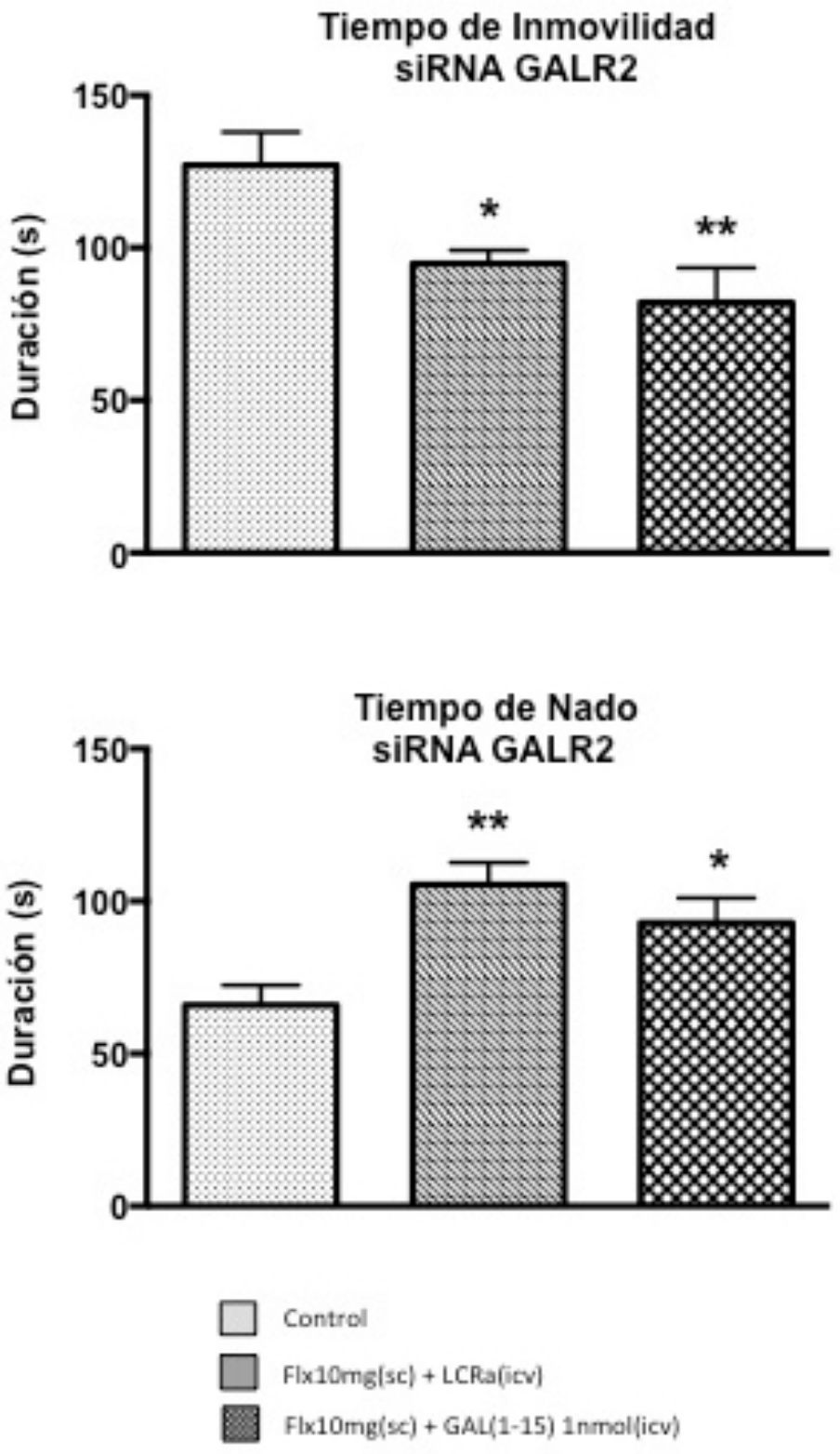
Tiempo de Inmovilidad
siRNA GALR2
Duración (s)
150
100
50
0
*
**
Tiempo de Nado
siRNA GALR2
Duración (s)
150
100
50
0
**
*
Control
Flx10mg(sc) + LCRa(icv)
Flx10mg(sc) + GAL(1-15) 1nmol(icv)

Figura 3B

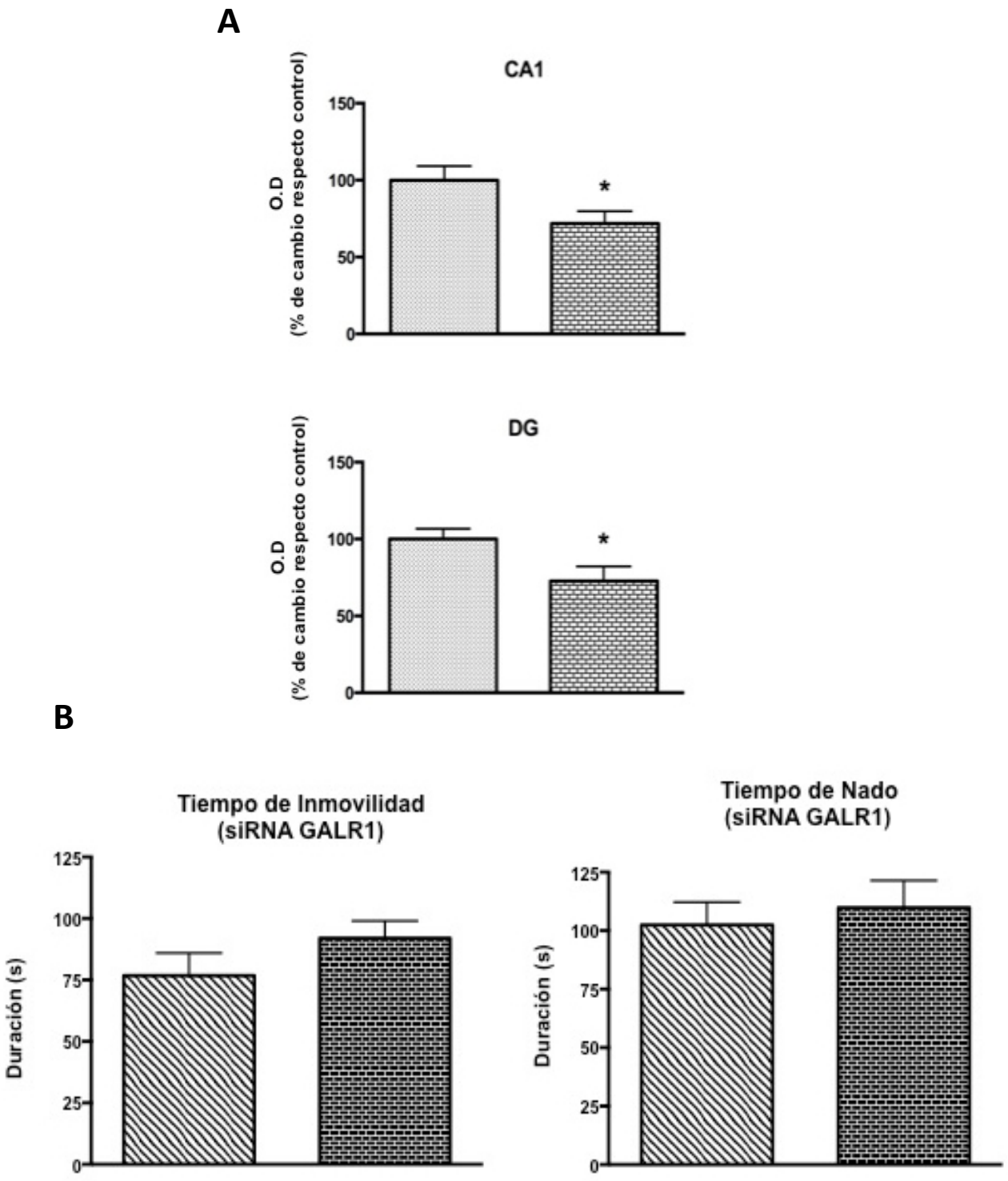
A
CA1
O.D
(% de cambio respecto control)
150
100
50
0
*
DG
O.D
(% de cambio respecto control)
150
100
50
0
*
B
Tiempo de Inmovilidad
(siRNA GALR1)
Duración (s)
125
100
75
50
25
0
Tiempo de Nado
(siRNA GALR1)
Duración (s)
125
100
75
50
25
0

Figura 4

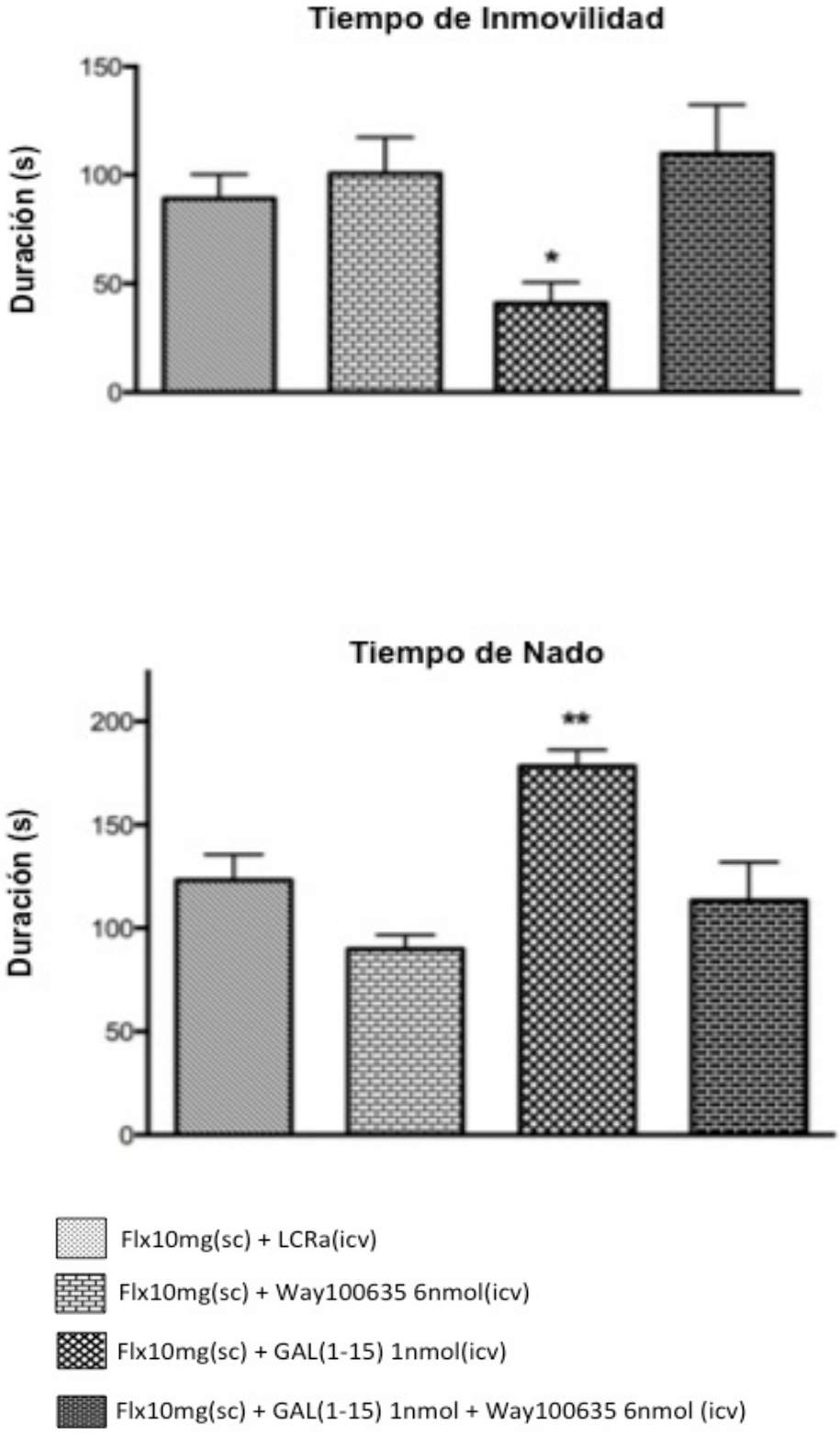
Tiempo de Inmovilidad
Duración (s)
150
100
50
0
*
Tiempo de Nado
Duración (s)
200
150
100
50
0
**
Flx10mg(sc) + LCRa(icv)
Flx10mg(sc) + Way100635 6nmol(icv)
Flx10mg(sc) + GAL(1-15) 1nmol(icv)
Flx10mg(sc) + GAL(1-15) 1nmol + Way100635 6nmol (icv)

Figura 5

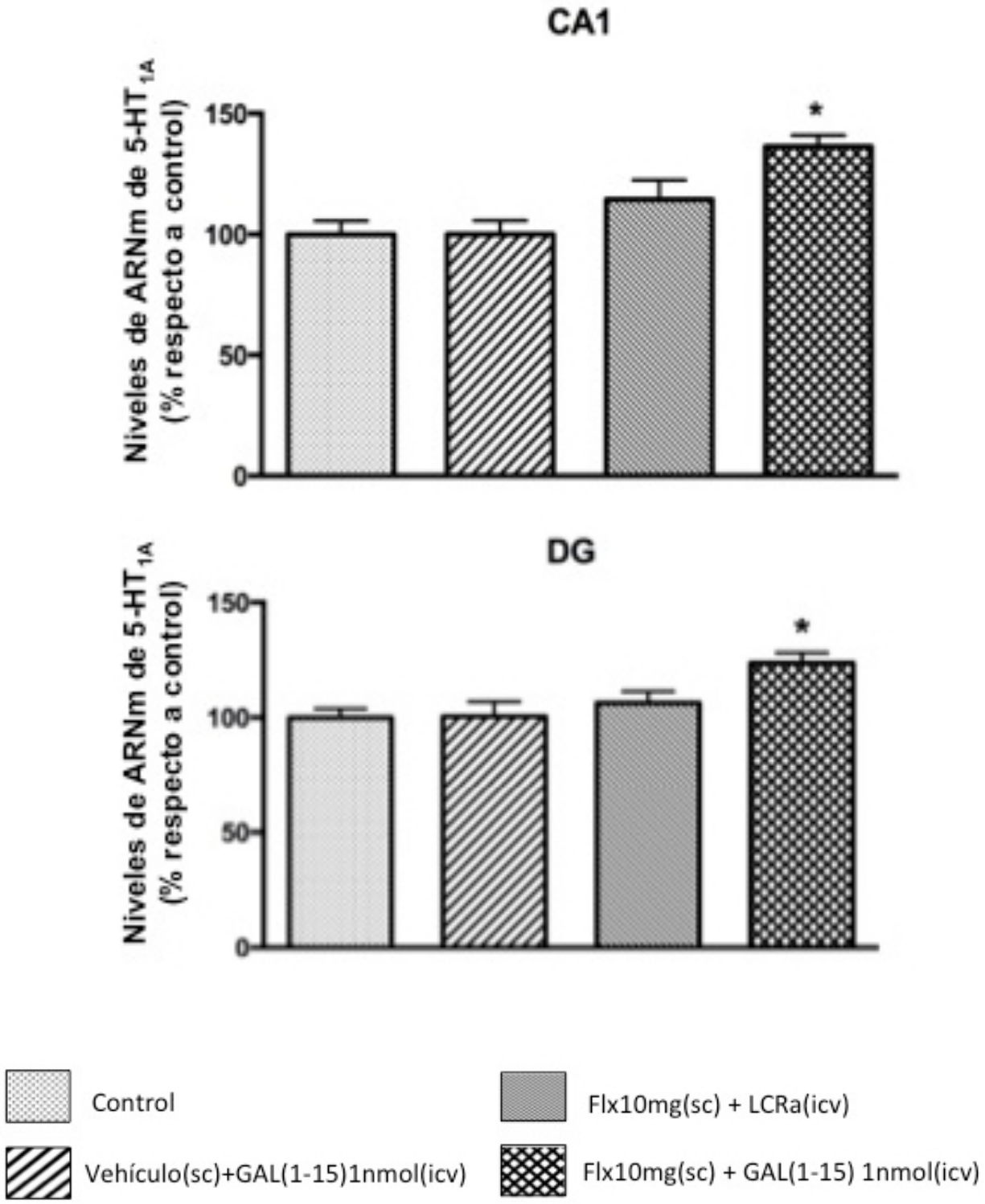
CA1
Niveles de ARNm de 5-HT1A
(% respecto a control)
150
100
50
0
*
DG
Niveles de ARNm de 5-HT1A
(% respecto a control)
150
100
50
0
*
Control
Flx10mg(sc) + LCRa(icv)
Vehículo(sc)+GAL(1-15)1nmol(icv)
Flx10mg(sc) + GAL(1-15) 1nmol(icv)

Figura 6A

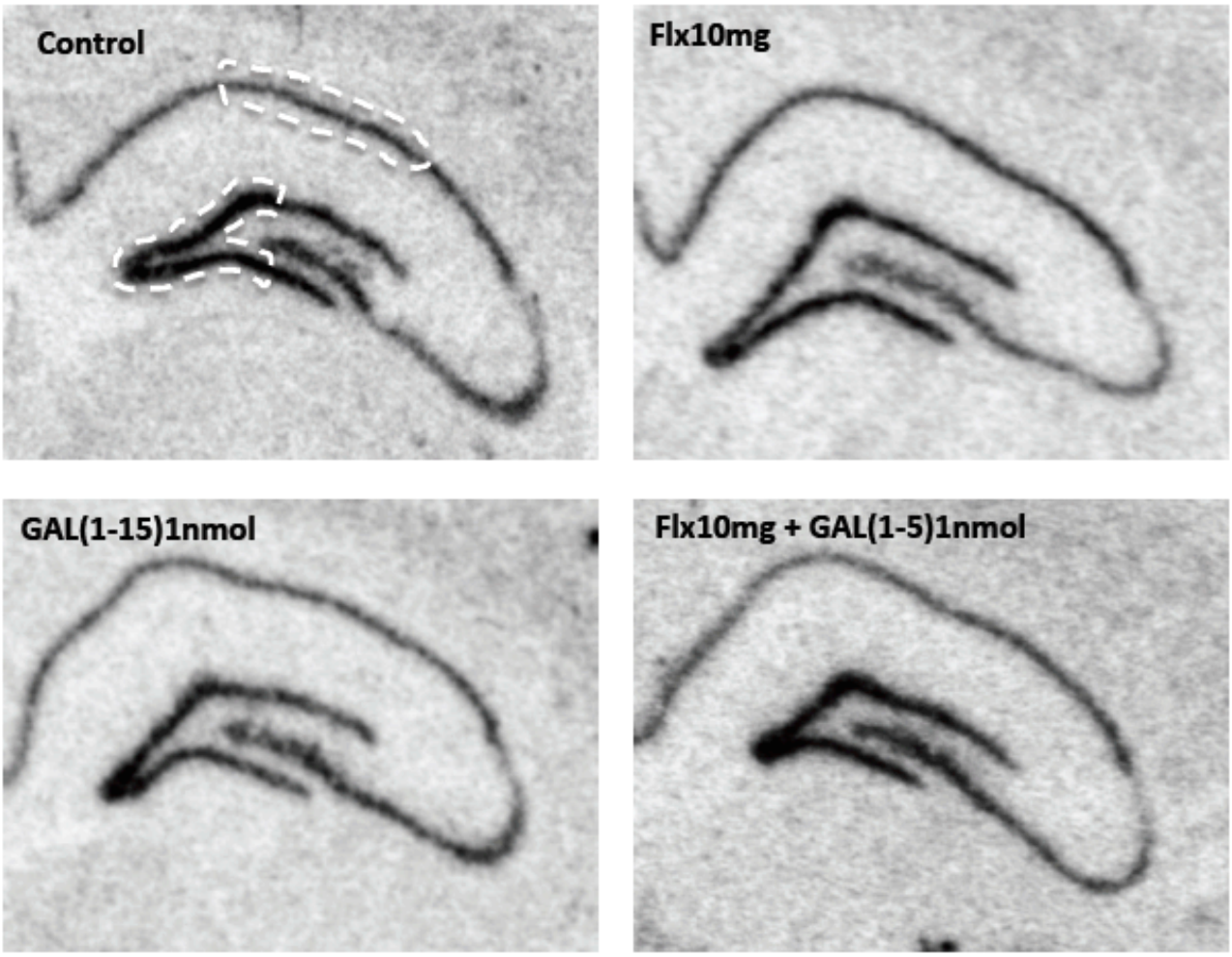

Figura 6B

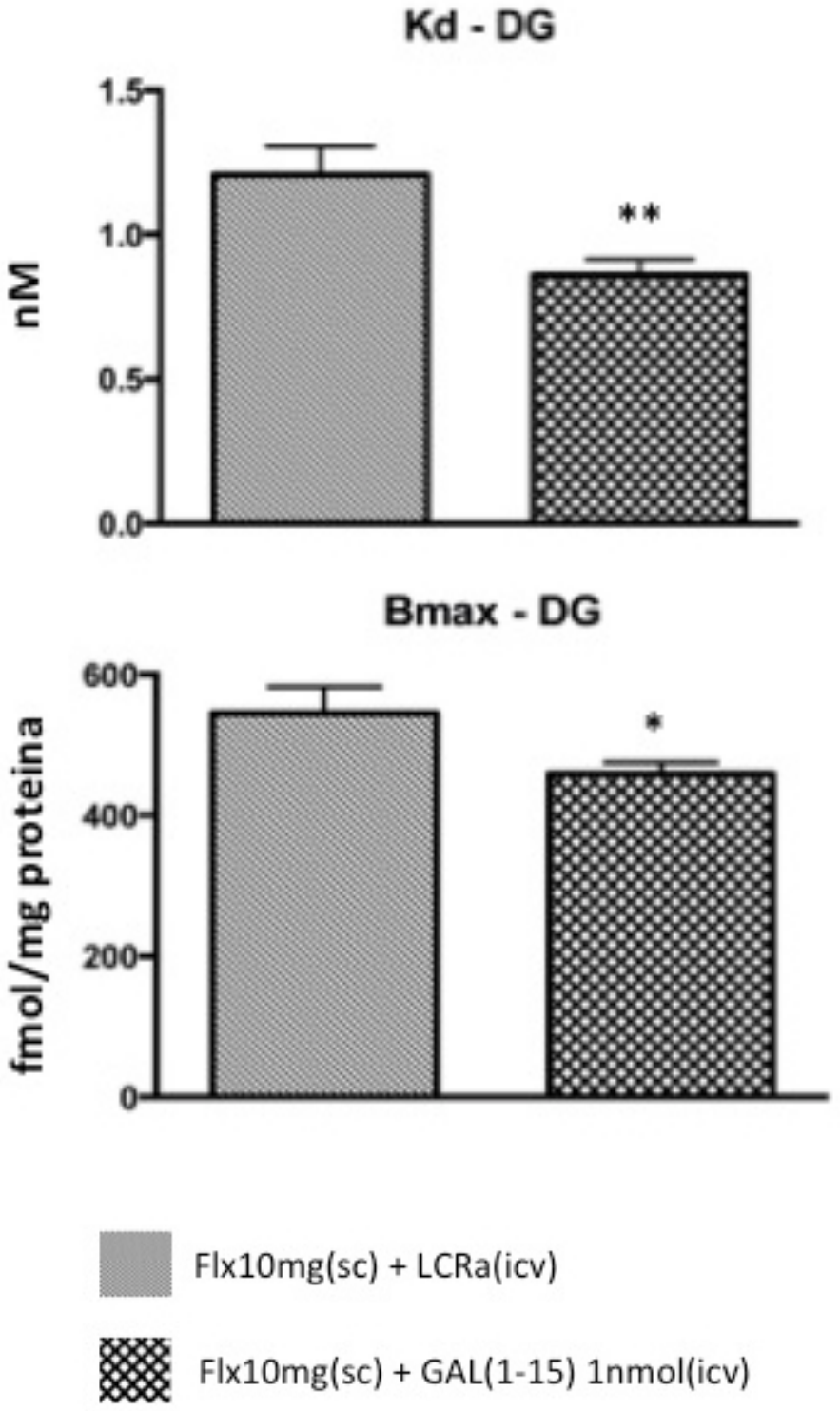
Kd - DG
nM
1.5
1.0
0.5
0.0
**
Bmax - DG
fmol/mg proteina
600
400
200
0
*
Flx10mg(sc) + LCRa(icv)
Flx10mg(sc) + GAL(1-15) 1nmol(icv)

Figura 7A

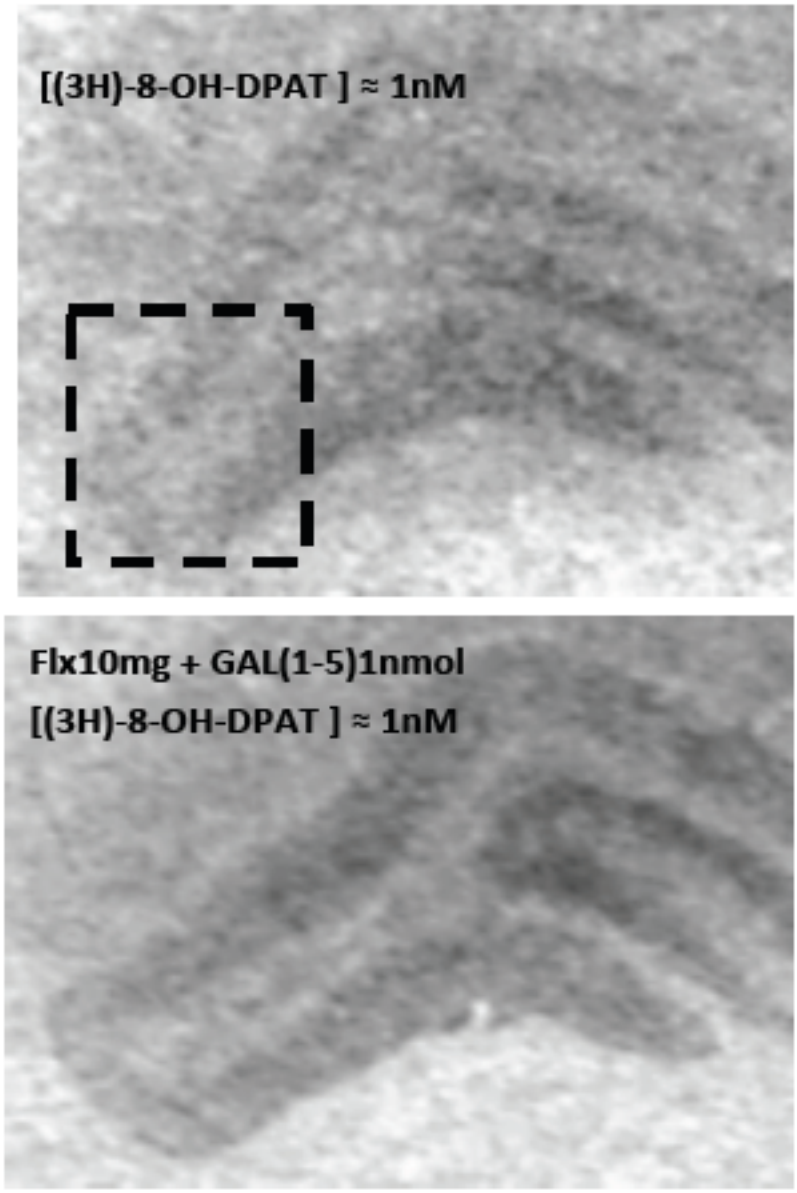

Figura 7B

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201730214

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 20.02.2017

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***A61K38/10*** (2006.01)
A61P25/24 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MILLÓN, C., FLORES-BURGESS, A., NARVAEZ, M. et al. Galanin (1-15) enhances the antidepressant effects of the 5-HT1A receptor agonist 8-OH-DPAT: involvement of the raphe-hippocampal 5-HT neuron system. Brain Structure and Function, (20/01/2016), Vol 221, Nº 9, ISSN 1863-2653, páginas 4491-4504	1-12
A	MILLÓN, C., FLORES-BURGESS, A., NARVAEZ, M. et al The neuropeptides Galanin and Galanin(1-15) in depression-like behaviours Neuropeptides (31/01/2017). Vol 64, pages 39-45	1-12
A	LU, X., BARR, A.M., KINNEY, J.W. et al. A role for galanin in antidepressant actions with a focus on the dorsal raphe nucleus. PNAS (18/01/2005), Vol 102, Nº 3, páginas 874-879	1-12
A	YOSHITAKE, T., REENILA, I., ÖGREN, S.O., et al. Galanin attenuates basal and antidepressant drug-induced increase of extracellular serotonin and noradrenaline levels in the rat hippocampus. Neuroscience Letters (2003), Vol 339, páginas 239-242.	1-12

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	Examinador	Página
28.02.2018	A. Barrios de la Fuente	1/4

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

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,WPIAP,TCM, TXPE, TXPCN,TXPUS, TXPSP,TXPWOEA BIOSIS, MEDLINE, XPESP, XPESP2, NPL, EMBASE, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.02.2018

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-12	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1-12	**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	MILLON, C., FLORES-BURGESS, A., NARVAEZ, M. et al.	20.01.2016
D02	MILLON, C., FLORES-BURGESS, A., NARVAEZ, M. ET AL	31.01.2017
D03	LU, X., BARR, A.M., KINNEY, J.W. et al	18.01.2005
D04	YOSHITAKE, T., REENILA, I., OGREN, S.O., et al	2003

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

D01 divulga un estudio en el que se administra GA1 (1-15) junto con 8-OH-DPTAT, un agonista del receptor de la serotonina 5HT1A, y se valoran sus efectos antidepresivos en ratas en el test de natación forzada. Se concluye que Gal (1-15) mejora los efectos anti-depresivos del agonista de 5HT1AR. Esta acción implicaría la interacción a nivel de receptor, ya que la Gal 1-15 afectaría a las características de unión y a los niveles de RNAm de 5HT1AR, encontrándose este éste receptor formando parte de un complejo de heteroreceptores formado por GALR1-GALR2-5HTA1.

D02 corresponde a una revisión o actualización sobre diferentes investigaciones en relación con Galanina y Gal (1-15) en patologías relacionadas con la depresión.

D03 tiene por objeto un estudio relativo al papel de la galanina y sus receptores en mecanismos antidepresivos. En este estudio se observa como un antagonista del receptor de la Galanina - M40-, bloquea los efectos antidepresivos de la fluoxetina en el test de natación forzada en ratas. Así mismo, se estudia también el efecto de un agonista del receptor de la galanina, observándose efectos anti-depresivos.

D04 divulga un estudio sobre el efecto de la galanina en los niveles extracelulares basales de 5-HT y en los niveles de 5-HT inducidos por citalopram en el hipocampo en ratas. Concluye que galanina atenúa de forma dosis-dependiente el aumento de los niveles de 5-HT producidos por citalopram.

NOVEDAD (ART. 6.1 Ley 11/86)

Ninguno de los documentos citados anticipa una composición farmacéutica que comprenda Gal (1-15) o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho fragmento, así como un inhibidor selectivo de la recaptación de la serotonina, por lo que se considera que la composición objeto de las reivindicaciones 1-7 es nueva, así como el uso de dicha composición.

En conclusión, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-12 es nuevo según el artículo 8.1 de la Ley 11/86.

ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 Ley 11/86)

De la misma forma, se considera que la composición que comprende Gal (1-15) y un inhibidor de la recaptación de la serotonina no se derivan de forma evidente de la información contenida en los documentos citados, ya sea tomados solos o en combinación, por lo que se considera que dicha composición, así como el uso de la misma, implicarían actividad inventiva para el experto en la materia según el artículo 8.1 de la Ley 11/86.