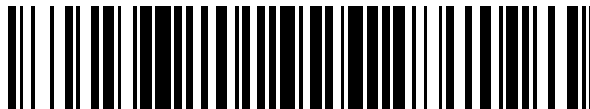


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 165**

21 Número de solicitud: 201500842

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 25/24 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

20.11.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.11.2016

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

24.05.2018

Fecha de concesión:

07.11.2018

45 Fecha de publicación de la concesión:

15.11.2018

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (100.0%)

Avda Cervantes, 2

29071 Málaga (Málaga) ES

72 Inventor/es:

NARVÁEZ PELÁEZ, Manuel;

MILLÓN PEÑUELA, Carmelo;

GAGO CALDERÓN, Belén;

FLORES BURGESS, Antonio;

SANTÍN NÚÑEZ, Luis Javier;

NARVÁEZ BUENO, José Angel y

DÍAZ CABIALE, Zaida

54 Título: **COMBINACIÓN QUE COMPRENDE GALANINA Y (Leu31,Pro34) NPY; USOS Y MÉTODOS**

57 Resumen:

Combinación que comprende galanina y [Leu31,Pro34]NPY; usos y métodos. La invención se refiere a una combinación que comprende galanina y [Leu31,Pro34]NPY. Adicionalmente, la invención refiere usos de dicha combinación y medicamentos que la comprenden, dirigidos a uso terapéutico frente a una enfermedad del sistema nervioso, particularmente depresión.

ES 2 589 165 B2

DESCRIPCIÓN**COMBINACIÓN QUE COMPRENDE GALANINA Y [Leu31,Pro34]NPY; USOS Y METODOS
SECTOR DE LA INVENCION**

5 La invención se refiere en general a combinaciones que comprenden agonistas del receptor 2 de galanina (GALR2), o derivados o fragmentos funcionales de dichos agonistas, y agonistas del receptor Y1 del neuropéptido Y (NPYY1R), o derivados o fragmentos funcionales de los mismos; y su uso terapéutico frente a una enfermedad del sistema nervioso, particularmente depresión, o en la preparación de medicamentos o productos farmacéuticos para terapia frente
10 a dichas enfermedades del sistema nervioso, particularmente depresión.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La formación hipocampal está involucrada de manera crítica en diferentes funciones cerebrales como la memoria espacial, contextual y episódica (Burgess et al. 2002) y en la respuesta al estrés (McEwen y Magarinos 1997); pero también en condiciones neuropsiquiátricas como la depresión (Campbell y Macqueen 2004). Además, recientemente se han descrito diferentes neurotransmisores y sustancias relacionadas con los neurotransmisores que modulan las acciones depresivas en el hipocampo a corto plazo (Hiroaki-Sato et al. 2014; Bettio et al. 2014).
20 Dentro de las subregiones hipocampales, el giro dentado (DG) es una región clave en la regulación de estas funciones y está formado por las capas celulares molecular y granular y por la región polimórfica (o *hilus*) (Amaral et al. 2007). Aunque el DG recibe proyecciones fundamentalmente de la corteza entorinal, la capa polimórfica del DG recibe proyecciones noradrenérgicas del *locus coeruleus* (Blackstad et al. 1967) y serotoninérgicas del núcleo del
25 rafe que contienen células positivas para calbindina-, calretinina-, somatostatina-, y neuropéptido Y (NPY) (Catena-Dell'Osso et al. 2013; Sperk et al. 2007).

Las estrategias novedosas en los desórdenes psiquiátricos están focalizadas en el DG como potencial objetivo cerebral (Hagihara et al. 2013). Los neuropéptidos y sus receptores han
30 recibido especial atención en este área, especialmente el NPY, que es una diana terapéutica en desórdenes emocionales, incluyendo los comportamientos depresivos (Holmes et al. 2003; Kormos y Gaszner 2013).

El neuropéptido Y (NPY) está ampliamente distribuido dentro del sistema nervioso, con altas
35 concentraciones en diferentes regiones corticales y límbicas. En el hipocampo, la mayor población de células inmunorreactivas al NPY se encuentran en la capa polimórfica del DG, siendo todas neuronas GABAérgicas (Kohler et al. 1986; Sperk et al. 2007). Los receptores Y1

e Y2 del neuropéptido NPY (NPYY1R y NPYY2R, respectivamente) están también expresados en el hipocampo, aunque el NPYY1R está distribuido de forma abundante a través de todo el DG (Dumont et al. 1996; Paredes et al. 2003). Además, se ha relacionado directamente el aumento en el NPY y en la expresión de NPYY1R en el DG con el efecto antidepresivo del NPY en ratas, sugiriéndose un papel del sistema NPY-NPYY1R en la pato-fisiología de la depresión (Jimenez-Vasquez et al. 2007; Bjornebekk et al. 2010; Catena-Dell'Osso et al. 2013). Así, la administración intracerebroventricular (icv) de NPY o de [Leu³¹,Pro³⁴]NPY (agonista del NPYY1R) induce un efecto antidepresivo en el test de natación forzada (FST), que se bloquea con la coadministración de un antagonista del NPYY1R (Redrobe et al. 2002; Stogner y Holmes 2000). De esta forma, la potenciación de la transmisión del NPY a través del receptor NPYY1 es uno de los mecanismos subyacentes a los antidepresivos y a las terapias electroconvulsivas (Caberlotto et al. 1999; Madsen et al. 2000). De forma opuesta, modelos genéticos y medioambientales de depresión en ratas muestran un nivel disminución de los niveles de NPY y de NPYY1R en el DG (Mathe et al. 1998; Jimenez-Vasquez et al. 2007).

La galanina (GAL) es también un neuropéptido ampliamente distribuido en el sistema nervioso central (Jacobowitz et al. 2004). Tres receptores de la GAL (GALRs) están involucrados en comportamientos relacionados con la depresión a través de la modulación de los sistemas neuroendocrinos y monoaminérgico, con una acción diferente dependiendo del subtipo de GALR (Fuxe et al. 2012; Wrenn y Holmes 2006). Así, la infusión icv de GAL o la estimulación de GALR1 y/o GALR3 produce un fenotipo tipo-depresión, mientras que la activación de GALR2, que se expresa principalmente en el DG (O'Donnell et al. 1999), induce un comportamiento antidepresivo en el FST (Barr et al. 2006; Kuteeva et al. 2007; Kuteeva et al. 2008; Borroto-Escuela et al. 2014; Millon et al. 2014).

Se ha demostrado que la GAL interacciona con NPYY1R en diferentes regiones incluyendo los núcleos de la amígdala, una región clave en los comportamientos relacionados con el estrés en ratas (Diaz-Cabiale et al., 2011; Narvaez et al., 2014). Se ha descrito como GAL, a través de GALR2, potencia las acciones ansiolíticas mediadas por NPYY1R. Esta interacción facilitadora GALR2/NPYY1R tiene lugar en la amígdala a nivel celular y de receptor involucrando la formación de complejos de heterorreceptores GALR2/NPYY1R (Narvaez et al. 2014). Además, los estudios de señales intracelulares indicaron que GALR2 en el complejo heterorreceptor GALR2/NPYY1R cambia el acoplamiento de Gq a Gi/o en ambos receptores, con lo que ambos operarían a través de Gi/o, produciendo un efecto inhibitorio aditivo en los efectos a través de adenilciclase (Narvaez et al., 2014).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Las interacciones entre GALR2 y NPY1R en el DG se han evaluado mediante autorradiografía cuantitativa e hibridación *in situ*. Además, la presencia de complejos de heterorreceptores GALR2/NPY1R se ha analizado en las subregiones del DG por ensayo de ligazón por proximidad *in situ* (Borrito-Escuela et al. 2013). Se ha encontrado una interacción GALR2/NPY1R a nivel del comportamiento depresivo en el test de natación forzada en ratas. Además se ha encontrado una activación celular específica utilizando inmunohistoquímica en subregiones del DG inducida por la interacción GALR2/NPY1R.

La galanina (GAL) y los agonistas del NPY1R participan en la regulación del comportamiento y ambos péptidos interactúan en diferentes funciones a nivel central. Se ha analizado la interacción entre el receptor 2 de GAL (GALR2) y el receptor Y1 del neuropéptido Y (NPY1R) en el giro dentado (DG) del hipocampo en relación con el comportamiento relacionado con la depresión. Utilizando autorradiografía, hibridación *in situ*, y ligazón por proximidad *in situ* se ha demostrado la interacción entre GALR2 y NPY1R en el DG probablemente involucrando la formación de complejos de heterorreceptores GALR2/NPY1R. Estos complejos se han observado específicamente en las subregiones polimórficas y subgranulares del DG, donde ambos receptores colocalizan. Además, esta interacción GALR2/NPY1R se ha relacionado con un aumento en el efecto antidepresivo mediado por el NPY1R en el test de natación forzada. Poblaciones de células específicas dentro de las subregiones del DG pueden estar involucradas en este efecto a nivel de comportamiento ya que la coactivación entre GALR2 y NPY1R potencia la reducción de c-Fos mediada por NPY1R en la región polimórfica. Estos resultados indican que la interacción entre GALR2/NPY1R puede indicar un mecanismo novedoso en el DG en el comportamiento relacionado con la depresión y puede sentar las bases para el desarrollo de fármacos que actúen sobre los complejos de heterorreceptores GALR2/NPY1R en el DG del hipocampo para el tratamiento de la depresión.

De acuerdo con esto, la presente invención se refiere en general a una combinación que comprende galanina y [Leu31,Pro34]NPY, agonistas del receptor 2 de la galanina (GALR2), y del receptor Y1 del neuropéptido Y (NPY1R), respectivamente.

La invención también se refiere al uso de la combinación anteriormente referida en terapia (incluyendo la prevención o el tratamiento) frente a una enfermedad del sistema nervioso, o en la preparación de medicamentos o de productos farmacéuticos para terapias frente a enfermedades del sistema nervioso. En una realización de la invención, dicha enfermedad del sistema nervioso es depresión.

Adicionalmente, la invención se refiere a los medicamentos o productos farmacéuticos anteriormente referidos, por ejemplo en la forma de una composición farmacéutica que comprenda un *carrier*, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable; y su uso en terapia frente a una enfermedad del sistema nervioso. En una realización de la invención, dicha enfermedad del sistema nervioso es depresión.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10 **Figura 1.** Efectos de la galanina tras su administración icv sobre el ligado de [¹²⁵I]Leu³¹,Pro³⁴PYY, agonista del receptor NPYY1 (NPYY1R), con el receptor NPYY1R en el giro dentado del hipocampo. Gráfica que muestra los valores específicos del ligado [¹²⁵I]Leu³¹,Pro³⁴PYY (25 pM), expresados como media ± SEM (*Standard Error of the Mean*, error estándar de la media). El ligado no específico (en presencia de NPY 1 μM) se sustrajo digitalmente de las medidas. **P* <0,05 versus grupo control conforme a la prueba t de Student (n=6 por grupo). Abreviaturas: aCSF= líquido cefalorraquídeo, que indica los niveles basales de [¹²⁵I]-Leu³¹Pro³⁴PYY. GAL= galanina.

20 **Figura 2.** Efecto de la administración icv de galanina en la expresión de ARNm del receptor NPYY1 (NPYY1R) en el giro dentado del hipocampo. Gráfica que muestra los valores, expresados como media ± SEM, de la densidad óptica del ARNm de NPYY1R (concentración de sonda 2,4 pmol/μl, marcada con ³³P-dATP). ****P* <0,001 versus grupo control conforme a la prueba t de Student (n=6 por grupo). Abreviaturas: aCSF= líquido cefalorraquídeo, que indica los niveles basales de densidad óptica del ARNm del NPYY1R. GAL= galanina.

25 **Figura 3.** Detección de los complejos de heterorreceptores entre el receptor 2 de galanina (GALR2) y el receptor Y1 del NPY (NPYY1R) por ligazón por proximidad (PLA). Los círculos blancos indican regiones PLA positivas principalmente en la capa polimórfica, pero también en la zona subgranular del giro dentado (Bregma -3,1mm). Los círculos negros indican señal negativa de PLA en la capa molecular del giro dentado y en el cuerpo calloso.

30 **Figura 4.** Efecto de la galanina y de [Leu³¹-Pro³⁴]NPY, agonista del receptor Y1 del neuropéptido Y (NPYY1R), en el comportamiento relacionado con la depresión en el test de natación forzada. La potenciación de la galanina de la acción relacionada con el comportamiento depresivo mediada por NPYY1R se bloquea por M871, un antagonista del receptor 2 de galanina (GALR2). Las gráficas muestran los datos, expresados como media ±

SEM, obtenidos en el test de natación forzada: **(a)** tiempo de inmovilidad, **(b)** tiempo dedicado a la natación, **(c)** tiempo dedicado a escalar. ANOVA de un factor seguido del test de comparaciones múltiples Newman-Keuls (n=6-8 animales en cada grupo). En (a): ****P* <0,001 versus el resto de los grupos; ≠ ≠ ≠ *P* <0,001 versus aCSF y GAL+Y1 3 nmol; a*P* <0,001 versus aCSF; ***P* <0,01 versus GAL+Y1 3 nmol. En (b): ≠ ≠ ≠ *P* <0,001 versus aCSF, GAL 3 nmol, GAL+Y1 3 nmol; ****P* <0,001 versus el resto de los grupos. En (c): ****P* <0,001 versus aCSF; **P* <0,05 versus Y1 3 nmol y GAL+Y1+M871 3 nmol. Abreviaturas: GAL = galanina; Y1 = [Leu³¹-Pro³⁴]NPY, agonista del receptor NPY1; GAL+Y1 = coadministración de GAL y [Leu³¹-Pro³⁴]NPY; GAL+Y1+M871 = coadministración de GAL, [Leu³¹-Pro³⁴]NPY y M871, antagonista de GALR2.

Figura 5. Efectos de galanina y del agonista del receptor NPY1 (NPYY1R), solos o en combinación con M871, antagonista del receptor 2 de galanina (GALR2), en la expresión de c-Fos en las capas polimórficas y granulares del giro dentado. **(a-b)** Cuantificación del número total de núcleos c-Fos IR (esto es, c-Fos detectado mediante inmunohistoquímica) dentro de las capas polimórficas y granular. Los datos, expresados como media ± SEM, muestran las diferencias entre los grupos después de la inyección intracerebroventricular de aCSF, GAL, [Leu³¹-Pro³⁴]NPY, o la coadministración de ambos péptidos y M871. **(a)** La coadministración de GAL y [Leu³¹-Pro³⁴]NPY disminuye la expresión de c-Fos comparada con ambos péptidos solos y el grupo aCSF. Además el efecto de la coadministración de GAL y [Leu³¹-Pro³⁴]NPY se bloquea con M871. **P*<0,05 versus aCSF; ≠ *P*<0,05 versus aCSF, Y1 y GAL+Y1+M871; ****P*<0,001 versus Y1 y GAL+Y1+M871; ≠ ≠ ≠ *P*<0,001 versus aCSF y GAL. **(b)** La coadministración de GAL y [Leu³¹-Pro³⁴]NPY aumenta la expresión de c-Fos comparada con ambos péptidos solos y el grupo aCSF. Además el efecto de la coadministración de GAL y [Leu³¹-Pro³⁴]NPY se bloquea con M871. **P*<0,05 versus GAL+Y1 3 nmol; ***P*<0,01 versus GAL, Y1 y GAL+Y1+M871; ****P*<0,001 versus aCSF; ≠ ≠ *P*<0,01 versus Y1 y GAL+Y1+M871. ANOVA de un factor seguido del test de comparaciones múltiples de Newman-Keuls (n=4 en cada grupo). Abreviaturas: aCSF = líquido cefalorraquídeo; GAL = galanina; Y1 = [Leu³¹-Pro³⁴]NPY, agonista del receptor NPY1; GAL + Y1 = coadministración de GAL y [Leu³¹-Pro³⁴]NPY; GAL+Y1+M871= coadministración de GAL, [Leu³¹-Pro³⁴]NPY y el antagonista de GALR2 M871.

MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

A lo largo de esta solicitud se referencian varias publicaciones. Los contenidos de todas estas

publicaciones y de aquellas referenciadas dentro de las mismas se incorporan por referencia en su totalidad en esta solicitud con objeto de describir de la forma más completa el estado de la técnica al que pertenece esta invención. La terminología usada aquí lo es con el objetivo de describir realizaciones específicas únicamente y no se pretende que sea limitante.

5

Materiales y métodos

Animales

10 Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de CRIFFA (Barcelona; 200-250 gr) que tuvieron acceso libre a la comida y al agua. Se mantuvieron bajo las condiciones estándar de ciclos de 12 horas de luz/oscuridad, en temperatura controlada (22 ± 2 °C) y humedad relativa (55-60%). Los procedimientos experimentales se aprobaron por el Comité de Ética de la Universidad de Málaga, de acuerdo con la Directiva Europea (86/609/EEC) y Española (Real Decreto
15 53/2013).

Las descripciones detalladas de la canulaciones intracerebrales y la administración de los péptidos a los animales se proporcionan como información complementaria.

20 Autorradiografía cuantitativa

El procedimiento y las dosis de GAL están basadas en trabajos previos (Diaz-Cabiale et al. 2011; Narvaez et al. 2014). Quince minutos después de las inyecciones icv de aCSF o GAL (3 nmol) (n=6 por grupo) las ratas fueron sacrificadas por decapitación y sus cerebros fueron
25 rápidamente sacados del hueso y congelados a -40 °C en isopentano. Las secciones coronales (14 µm de grosor) se cortaron en un criostato (HM550, Microm International) a niveles de bregma de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (Paxinos G. 1986) (Niveles de Bregma hipocampales DG de -2,12 mm a -4,52 mm) y se montaron en portas gelatinizados. Las secciones se preincubaron durante una hora a temperatura ambiente en un tampón Krebs-
30 Ringer fosfato (KRP) a pH 7,4 y después se incubaron durante 2 h en tampón KRP con 0.1% BSA, 0,05% bacitracina, 25 pM NPYY1R agonista [^{125}I]-[Leu 31 ,Pro 34]PYY (Perkin-Elmer, USA) (Dumont et al. 1996). El ligado no específico se definió como el ligado en presencia de NPY 1 µM. Después de la incubación, las secciones se lavaron cuatro veces (2 min cada vez) en
35 tampón KRP frío, se sumergieron en agua desionizada para quitar las sales, y rápidamente se secaron en una corriente de aire frío. Las secciones se colocaron en casetes de rayos X y se expusieron a *films* Hyperfilms, (Kodak Biomax MR film, Kodak, Rochester, NY) durante 6 días junto con microescalas de ^{125}I (Amersham International) como estándares de referencia.

Los autorradiogramas se analizaron en el DG del hipocampo (0,15 mm² cuadrado) como se ha descrito previamente (Parrado et al. 2007).

5 Hibridación *In situ*

La hibridación *In situ* se llevó a cabo siguiendo protocolos ya descritos (Bjornebekk et al. 2010). Brevemente, 5 horas después de la inyección icv de aCSF o GAL (3 nmol) (n=6 por grupo) las secciones coronales del cerebro (14 µm) se cortaron en criostato y se montaron en portas. El cóctel de hibridación contenía formamida 50%, SSC 4x (SSC 1x, NaCl 0,15 M, citrato sódico 0,015 M, pH 7,0), solución de Denhardt 1x, *Sarcosyl* 1%, Na₃PO₄ 0,02 M, pH 7,0, dextrano sulfato 10%, ditiotreitól 0,06 M y ADN de esperma de salmón 0,1 mg/ml. Se utilizaron sondas de oligonucleótidos específicas para NPYY1R. Las sondas se marcaron con ³³P-dATP (Perkin-Elmer, Boston, MA). La hibridación se realizó durante 18 horas en un cámara húmeda a 42°C. Después de la hibridación, las secciones se lavaron 4 veces 20 min cada vez en SSC 1x a 60°C. Finalmente, las secciones se lavaron durante 10 segundos en agua esterilizada en autoclave, se deshidrataron en alcohol y se secaron al aire. Después, las secciones se expusieron en un *film* (Kodak Biomax MR film, Kodak, Rochester, NY) durante 7 días antes del revelado. Los *films* se escanearon y los valores en densidad óptica se cuantificaron en las diferentes regiones marcadas en el DG.

Ensayo de ligazón por proximidad *in situ*

El ensayo de ligazón por proximidad (PLA) *in situ* se realizó como previamente se ha descrito (Borroto-Escuela et al. 2013; Narvaez et al. 2014). Los animales sin tratar (n=3) se perfundieron con paraformaldehído al 4%, se obtuvieron los cerebros y las secciones a nivel del DG. Las secciones se incubaron con soluciones bloqueantes (suero de cabra 5%) y permeabilizantes (Triton X100 0.3% en PBS) durante 60 minutos cada vez. Anticuerpos primarios dirigidos contra GALR2 y NPYY1R obtenidos mediante diferentes hospedadores (conejo, Alomone Lab, 1:100; y cabra, Santa Cruz Biotechnology INC, CA, 1:200; respectivamente) se incubaron durante 24 horas a 4°C. La detección de la señal PLA se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor (kit de detección Duolink *in situ* PLA; Olink, Suecia) con PLA con o sin sondas para los anticuerpos de conejo o cabra. Las secciones se montaron en portas con un medio de montaje para fluorescencia (Dako) que contiene 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (1:200), que marca los núcleos con color azul. Para los experimentos control se utilizó sólo un anticuerpo primario. Las señales PLA se visualizaron utilizando un microscopio confocal TCS-SL (Leica).

Test de natación forzada

El comportamiento tipo depresión se analizó mediante FST, propuesto originalmente como un modelo de depresión inducido por estrés (Porsolt et al. 1977). De forma importante, la respuesta de inmovilidad en el FST puede prevenirse por diferentes tipos de tratamientos antidepressivos, incluyendo los antidepressivos tricíclicos, los inhibidores de la monoaminoxidasa, SSRIs, e inhibidores de la recaptación de la NA (Petit-Demouliere et al. 2005; Kuteeva et al. 2008).

Los animales se adaptaron a la manipulación y se llevaron a la habitación del experimento (80-90 lux) durante al menos una hora para habituarse antes de la administración icv de los péptidos. Las ratas se situaron individualmente en tanques cilíndricos con una altura de 50 cm y un ancho de 20 cm, que contenían agua ($25\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) con una altura de 30 cm. Los animales fueron obligados a nadar durante un periodo de 15 minutos (pre-test) y 24 horas después fueron sometidos a una sesión de 5 minutos (test) 15 minutos después de la administración de GAL, [Leu³¹,Pro³⁴]NPY (agonista de NPY₁R) y M871 (antagonista de GALR₂), solos o en combinación (n=6-8 animales en cada grupo). Las dosis efectivas para GAL, [Leu³¹,Pro³⁴]NPY y M871 se seleccionaron en base a curvas dosis-respuestas realizadas anteriormente (Diaz-Cabiale et al. 2011; Millon et al. 2014; Narvaez et al. 2014). El tiempo total dedicado a flotar (inmovilidad), nadar, y escalar se registró durante el test de 5 minutos. Se considera que las ratas están inmóviles cuando flotan sin dificultad, realizando sólo aquellos movimientos necesarios para mantener sus cabezas por encima del agua. Se consideró que las ratas estaban en situación de natación cuando activamente nadaban alrededor del cilindro, mientras que se consideró que las ratas estaban en situación de escalada cuando realizaban un movimiento vigoroso en las paredes del cilindro. Después de las sesiones de natación, se sacaron las ratas del tanque, se secaron cuidadosamente en jaulas calentadas y volvieron a las jaulas originales. Los experimentos de comportamiento se realizaron siempre entre las 09:00 y las 14:00 horas.

Inmunohistoquímica c-Fos

Los animales se dividieron en cinco grupo experimentales: (1) aCSF: grupo control; (2) GAL 3 nmol: grupo tratado con galanina 3 nmol; (3) Y1 2,5nmol: grupo que recibió [Leu³¹,Pro³⁴]NPY 2,5 nmol; (4) GAL 3 nmol + Y1 2,5nmol: grupo administrado con ambas sustancias; (5) GAL+Y1+M871 3 nmol: grupo inyectado con GAL, [Leu³¹,Pro³⁴]NPY y M871 3 nmol (n=4 en cada grupo). Todas las dosis están basadas en protocolos publicados previamente (Parrado et al. 2007; Kuteeva et al. 2008; Diaz-Cabiale et al. 2011).

Las ratas anestesiadas con pentobarbital sódico (Mebumal; 100 mg/kg, i.p.) se perfundieron con paraformaldehído al 4% (peso/volumen, Sigma) 90 minutos después de las inyecciones icv y los cerebros se cortaron en secciones coronales y se realizaron inmunohistoquímicas basadas en protocolos previamente publicados (Diaz-Cabiale et al. 2011). El anticuerpo primario, un anticuerpo contra la proteína c-Fos (1:5000, sc-52, Santa Cruz Biotechnology, CA), revelado con DAB + níquel, se utilizó como marcador indirecto de actividad neuronal. El anticuerpo de Calbindina-D28k (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, CA), revelado con DAB, se utilizó para marcar la región granular dado que marca exclusivamente las células hipocampales granulares, aunque hay algunas interneuronas en el *hilus* que son inmunorreactivas a la calbindina (Scharfman et al. 2002). Se utilizaron anticuerpos secundarios específicos biotinilados. Las secciones se montaron en portas de vidrio y las diferentes capas del giro dentado se analizaron utilizando un método de fraccionador óptico basado en un microscopio estereológico (microscopio BX51, Olympus, Dinamarca) ya utilizado previamente (Diaz-Cabiale et al. 2011).

Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media \pm SEM y el número de muestras (n) se indica en la descripción de las figuras. Todos los datos se analizaron utilizando GraphPad PRISM 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Para comparar dos condiciones experimentales, se utilizó el análisis estadístico de la prueba de t de Student sin aparear. En el resto de casos se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) de un factor seguido del test de Newman-Keuls. Las diferencias se consideraron significativas a $p < 0,05$ (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$).

Información complementaria

Canulaciones intracerebrales

Las ratas anestesiadas intraperitonealmente con Equitesina (3,3 ml/Kg) se implantaron con una cánula guía de acero inoxidable con una aguja de calibre 22 (Plastics One In) en el ventrículo lateral derecho con las siguientes coordenadas estereotáxicas i: +1,4 mm lateral, -1 mm posterior a bregma, y 3,6 mm debajo de la superficie del hueso (Paxinos et al. 1985). Después de la cirugía, los animales se ubicaron individualmente y se permitió su recuperación durante 7 días. Este método de canulación y cuidado postquirúrgico ha sido previamente estandarizado

(Diaz-Cabiale et al. 2011; Narvaez et al. 2014).

Administración intracerebroventricular de los péptidos

5 Las ratas canuladas se asignaron arbitrariamente a los diferentes grupos. Los péptidos se prepararon nuevamente para cada administración disolviéndolos en aCSF y se inyectaron en el ventrículo lateral. El volumen total fue de 5 μ l por inyección con un tiempo de infusión de 1 min. La galanina, el [Leu31,Pro34]NPY ($K_i=0,39$ nM para NPY_{Y1R}) y el M871 ($K_i=13,1$ y 420 nM para GALR2 y GALR1 respectivamente) se obtuvieron de Tocris Bioscience (Bristol, UK). El grupo experimental y el tamaño de cada grupo se indican en los diferentes procedimientos. Después de los experimentos, se comprobó el sitio de inyección utilizando secciones obtenidas en criostato (HM550, Microm International). Los procedimientos de las inyecciones intracerebroventriculares (icv) y la preparación del líquido cefalorraquídeo (aCSF) han sido estandarizados previamente en el laboratorio de los inventores (Diaz-Cabiale et al. 2011; 10 Narvaez et al. 2014).

Análisis de las imágenes de la autorradiografía y de la hibridación *in situ*

Los autorradiogramas de los experimentos de autorradiografía y de hibridación *in situ* se analizaron como previamente ya ha sido descrito (Parrado et al. 2007; Razani et al. 2001) utilizando un sistema de análisis de imagen por ordenador. Brevemente, las medidas se realizaron con el sistema ImageJ (NIH, USA) bilateralmente en las distintas regiones marcadas en el DG del hipocampo (0,15 mm²). Se obtuvo una medida por región y rata, ya que se calculó la media de las medidas. Se midieron secciones duplicadas para autorradiografía y triplicadas para la hibridación *in situ* para cada tratamiento. Se utilizaron polímeros prefabricados marcados con ¹²⁵I- (Amersham Microscale, Amersham, Little Chalfont, UK) para convertir los valores grises en femtomol/miligramo de proteína. Las medidas semi-cuantitativas de los autorradiogramas de la hibridación *in situ* se analizaron a partir de los valores de densidad óptica (DO) específica medidos.

30

Análisis estereológico de la inmunohistoquímica c-Fos

Se utilizó un microscopio Olympus BX51 (Olympus, Dinamarca) conectado a un ordenador y a una cámara digital de video JVC. El análisis estereológico, de las muestras positivas para c-Fos se realizó en la región del giro dentado (DG) a nivel rostro-caudal utilizando un fraccionador óptico. Este método combina la disección óptica con un sistema de fraccionador de muestras para excluir los volúmenes divergentes (Gundersen et al. 1988). Utilizar una fase

35

de contraste y la inmunorreactividad de la calbindina de la capa de células granulares permitió delinear el área del DG de cada sección (Paxinos et al., 1985). Las secciones se tomaron cada 150 μm , empezando por la parte ventral del DG (aproximadamente 2,12 mm posterior a Bregma). Se terminó aproximadamente 4,52 mm posterior a Bregma en la parte dorsal del DG.

5 El número de c-Fos IR se cuantificó en al menos cinco secciones representativas a 150 μm por animal (4 ratas por grupo). Utilizando C.A.S.T. Grid (Olympus; Albertslund, Dinamarca) se generó para cada sección una serie aleatoria de muestras con un área conocida (*frame* α). Después de que el objeto fuera contado (ΣQ -) el número total de células positiva se estimó como: $N = \Sigma Q \cdot f_s \cdot f_a \cdot f_h$ (Gundersen et al. 1988), donde f_s es la fracción numérica de la

10 sección utilizada, f_a es la fracción del área y f_h es la fracción linear del grosor de la sección. El coeficiente de error (CE) para cada estimación y animal estuvo entre 0,05 y 0,1. El CE total de cada grupo se encontró entre 0,07 y 0,08. El contaje de las neuronas marcadas comenzó 5 μm por debajo de la superficie y se centró a través de una sección de 20 μm del plano óptico. Se contaron al menos cinco secciones para cada región por animal. El número de *frames* utilizado

15 por animal en el DG fue de 90-110, representando el 20% del volumen total analizado.

Inmunofluorescencia doble

Se emplearon protocolos previamente publicados (Narvaez et al. 2014). Las ratas sin

20 tratamiento ($n=3$) se perfundieron con paraformaldehído al 4%, se obtuvieron los cerebros y secciones a nivel del DG. Se realizó una incubación inicial en soluciones con bloqueantes (suero de cabra 5%) y permeabilizantes (Triton X100 0,3% en PBS) durante 60 minutos cada vez. El anticuerpo primario de conejo antiGALR2 (Alomone Lab, 1:100) se incubó durante 48-

25 72 horas a 4°C y se detectó con un anticuerpo secundario rojo de ratón anti-conejo DyLight 549 (Jackson InmunoResearch Laboratories, 1:100). Las secciones también se incubaron con un anticuerpo anti-NPYY1R de cabra (Santa Cruz Biotechnology INC, EEUU, 1:200) en una forma similar a la descrita, y se detectó en este caso con un anticuerpo secundario verde de ratón anti-cabra DyLight 488 (Jackson Laboratories InmunoResearch, 1:100). Los núcleos se

30 detectaron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (1:200). Las secciones se montaron en portas con un medio de montaje para fluorescencia (Dako) y se visualizaron utilizando un microscopio confocal TCS-SL (Leica).

Inmunomarcaje doble c-Fos/GAD

35 Los protocolos para la inmunohistoquímica doble de c-Fos y glutamato decarboxilasa (GAD) 65/67 han sido descritos previamente (Narvaez et al., 2014). El anticuerpo primario utilizado GAD65/67 se ha validado para detectar neuronas GABAérgicas (1:1000, sc-7513; Santa Cruz

Biotechnology, CA) (Papay, 2006). De hecho, se ha utilizado el GAD 65/67 para marcar neuronas GABAérgicas en el *hilus* y en la zona subgranular (Muller et al. 2001). Se utilizó el cromógeno 3-3´tetrahidrocloruro de diaminobencidina (DAB) (Sigma, España) con el anticuerpo GAD 65/67 para obtener una reacción marrón. La inmunohistoquímica c-Fos (revelada con DAB + níquel) se ha descrito anteriormente en este documento. Las secciones se montaron en portas de cristal y se obtuvieron las microfotografías (microscopio BX51, Olympus, Dinamarca).

Resultados

10 La galanina aumenta el ligado a NPY1R y la expresión de ARNm de NPY1R en el DG

La inyección icv de galanina 3 nmol produce un aumento de un 20% ($t=1,924$, $p<0,05$, $df=10$) en el ligado de [125 I]-[Leu 31 ,Pro 34]PYY a 25 pM (agonista de NPY1R) en el DG (Figura 1) sugiriendo que la galanina aumenta el reconocimiento de NPY1R en este área. El ligado de [125 I]-[Leu 31 ,Pro 34]PYY se observa fundamentalmente en las capas moleculares y granulares.

Además, la galanina modifica no sólo el ligado a NPY1R sino también la expresión de ARNm de NPY1R en la capa granular del DG (Figura 2). Así, 5 horas después de la administración icv de galanina 3 nmol se detecta un aumento de un 31% ($t=5,327$, $p<0,001$, $df=10$) en la expresión de ARNm de NPY1R en la capa granular del DG .

GALR2 y NPY1R forman clústeres PLA positivos en subregiones específicas del DG

Dentro del DG, se encuentran clústeres PLA-positivos específicamente en la capa polimórfica y zona subgranular del DG (Figura 3, círculos blancos). Estos clústeres PLA indican que GALR2 y NPY1R están muy próximos y pueden formar complejos de heterorreceptores GALR2/NPY1R en estas regiones. La especificidad de la señal se confirma por el hecho de que no se observan clústeres PLA ni en la capa molecular del DG, ni en el *corpus callosum*, una zona en la que no existe GALR2 (O'Donnell et al. 1999) (Figura 3, círculos negros).

En la misma dirección de estos resultados, se observa una colocalización abundante de GALR2 y NPY1R específicamente en la capa polimórfica y la zona subgranular del *hilus*.

La galanina potencia el comportamiento antidepresivo mediado por NPY1R

En el FST, las ratas se expusieron al agua durante 15 minutos. Veinticuatro horas más tarde, la inmovilidad, la natación y la escalada se registraron durante una segunda exposición al agua

de 5 minutos para estudiar los comportamientos relacionados con la depresión. La administración icv del agonista de NPYY1R (3 nmol) produce un efecto antidepresivo en el FST, ya que disminuye significativamente la inmovilidad (ANOVA de un factor, $F_{4,30} = 44,81$, $p < 0,001$, test de Newman-Keuls: $p < 0,001$; Figura 4a) y aumentó la natación (ANOVA de un factor, $F_{4,30} = 48,25$, $p < 0,001$, test de Newman-Keuls: $p < 0,001$; Figura 4b). Además, se observa una disminución significativa en la escalada (ANOVA de un factor, $F_{4,30} = 14,42$, $p < 0,001$, test de Newman-Keuls: $p < 0,001$; Figura 4c).

Por el contrario, la icv de galanina (3 nmol) aumenta significativamente el tiempo de inmovilidad (test de Newman-Keuls: $p < 0,001$; Figura 4a) y disminuye el comportamiento de escalada (test de Newman-Keuls: $p < 0,001$; Figura 4c). Estos patrones de comportamiento indican que la galanina produce una respuesta depresiva.

Sin embargo, se observó que la galanina provoca un fuerte aumento de la acción antidepresiva del agonista del NPYY1R tras la coadministración de galanina y dicho agonista de NPYY1R. La inyección icv de ambas sustancias aumenta significativamente la disminución de la inmovilidad (test de Newman-Keuls: $p < 0,001$; Figura 4a) y aumenta la natación (test de Newman-Keuls: $p < 0,001$; Figura 4b) comparada con el agonista de NPYY1R solo. Además, se observa también una potenciación significativa de la disminución de la escalada (test de Newman-Keuls: $p < 0,05$; Figura 4c).

GALR2 está involucrado en esta interacción ya que la presencia de M871 bloquea el aumento de la disminución de la inmovilidad (test de Newman-Keuls: $p < 0,01$; Figura 4a) y de la escalada (test de Newman-Keuls: $p < 0,05$; Figura 4c) así como el aumento en la natación (test de Newman-Keuls: $p < 0,001$; Figura 4b) inducida por la coadministración de galanina y del agonista del NPYY1R en el FST.

M871, solo, a la dosis de 3 nmol, no tiene efectos ni en la inmovilidad ($t=1,398$, $p 0,096$, $df=10$, $media \pm SEM: 86,9 \pm 7$), escalada ($t=0,475$, $p 0,322$, $df=10$, $media \pm SEM: 44,4 \pm 6$) o natación ($t=0,695$, $p 0,251$, $df=10$, $media \pm SEM: 146 \pm 15$) comparada con el control.

Patrón de activación de c-Fos y poblaciones celulares involucradas tras la coadministración de galanina y [Leu³¹,Pro³⁴]NPY en las subregiones del DG

Como se observa en la Figura 5, la inyección icv de [Leu³¹,Pro³⁴]NPY (2,5 nmol) produce una disminución del número de c-Fos IR en la región polimórfica (ANOVA de un factor, $F_{4,15} = 20,81$, $p < 0,001$, test de Newman-Keuls: $p < 0,05$; Figura 5a), mientras que se produce un

aumento de c-Fos IR en la capa granular del DG (ANOVA de un factor, $F_{4,15} = 15,08$, $p < 0,001$, test de Newman-Keuls: $p < 0,01$; Figura 5b). Por otro lado, la galanina (3 nmol) aumenta significativamente el número de c-Fos IR en ambas zonas, la polimórfica (test de Newman-Keuls: $p < 0,05$) y la capa granular del DG (test de Newman-Keuls: $p < 0,01$) (Figura 5a,b). No se observa c-Fos IR en la capa molecular después de la administración de forma aislada de galanina o del agonista del NPY1R.

Sin embargo, la coinyección del agonista del NPY1R y de galanina modifican significativamente el número de c-Fos IR comparado con el efecto de la galanina o del agonista del NPY1R de forma aislada en ambas subregiones del DG. Dentro de la zona polimórfica, la coadministración de galanina y [Leu³¹,Pro³⁴]NPY disminuye significativamente el c-Fos IR comparado con el agonista del NPY1R (test de Newman-Keuls: $p < 0,05$), la galanina (test de Newman-Keuls: $p < 0,001$) y el grupo control (test de Newman-Keuls: $p < 0,001$) (Figura 5a). En esta región, las interneuronas GABA podrían estar involucradas en la interacción dado que c-Fos IR colocaliza con el marcador GABAérgico (GAD65/67) tras la inyección del agonista del NPY1R.

Dentro de la capa granular, la coadministración de galanina y del agonista de NPY1R aumenta significativamente la expresión de c-Fos IR en la capa granular (Figura 5a) comparada con la administración de galanina (test de Newman-Keuls: $p < 0,05$) y de [Leu³¹,Pro³⁴]NPY (test de Newman-Keuls: $p < 0,01$) de forma aislada.

El co-tratamiento con M871 bloquea completamente el efecto de la galanina en ambas regiones, la capa polimórfica y granular del DG (Figura 5a,b), demostrando que el GALR2 está involucrado en las acciones de la galanina.

Discusión

La presente invención demuestra por primera vez la existencia de una interacción entre GALR2 y NPY1R en el DG a nivel de receptor, probablemente involucrando la formación de complejos heterorreceptores GALR2/NPY1R en base al ensayo de ligazón por proximidad. Estos complejos se observan específicamente en las subregiones polimórficas y subgranular del DG, donde la expresión de ambos receptores colocalizan. Además, esta interacción GALR2/NPY1R se asocia a un incremento antidepresivo que involucra una subpoblación específica dentro de las subregiones del DG. Así, la coactivación de GALR2 y NPY1R potencia la reducción de c-Fos IR en la región polimórfica mediada por NPY1R. Esta respuesta puede estar ligada con el aumento de c-Fos IR observada en las células granulares,

y puede dar un mecanismo a nivel de circuitos que explicaría el aumento en la actividad antidepresiva observada tras el co-tratamiento de galanina con [Leu³¹,Pro³⁴]NPY.

5 En experimentos de autorradiografía se observa que la galanina interacciona a nivel de membrana con NPYY1R, ya que la galanina produce un aumento en el ligado de [¹²⁵I]-[Leu³¹,Pro³⁴]PYY en el DG. Esta modificación del ligado del agonista del NPYY1R indica un aumento en la afinidad de NPYY1R en el DG, ya que la concentración de agonista NPYY1R utilizada (25pM) está en el rango del valor de K_d, donde los principales cambios son a nivel de afinidad (Dumont et al. 1996). Este efecto podría estar involucrado en el incremento de actividad antidepresiva observada después del co-tratamiento con galanina y con [Leu³¹,Pro³⁴]NPY en el test de natación forzada a través de un aumento en el reconocimiento y señal del NPYY1R en el complejo heterorreceptor GALR2-NPYY1R. El GALR2 puede también cambiar de señales mediadas por G_q a G_{i/o} en este complejo receptor (Narvaez et al. 2014). Se ha descrito previamente un aumento en el ligado del agonista del NPYY1R en la amígdala inducido por la administración de galanina y a su vez asociado con un aumento del efecto ansiolítico inducido por NPYY1R (Narvaez et al. 2014).

Además, se ha observado que GAL también aumenta la expresión de ARNm del NPYY1R en el DG, efecto que se ha relacionado con los tratamientos antidepresivos. Así, la terapia electroconvulsiva (ECT) en ratas (Madsen et al. 2000) y ECT (Jimenez-Vasquez et al. 2007), y la administración de escitalopram (Bjornebekk et al. 2010) en las ratas Flinders, un modelo genético de depresión, aumenta el ARNm del NPYY1R en el DG, y se correlaciona con el efecto antidepresivo en el test de natación forzada. Con base en estos estudios, el aumento del ARNm del NPYY1R inducido por galanina en el DG puede ser de relevancia para los desórdenes depresivos y su tratamiento.

Los resultados de comportamiento actuales demuestran que la galanina potencia los efectos antidepresivos mediados por el agonista [Leu³¹,Pro³⁴]NPY, disminuyendo la inmovilidad y aumentando la natación en el FST. El fuerte aumento de la natación que se observa puede involucrar cambios en los niveles extracelulares de serotonina. De hecho, se conoce que los SSRIs selectivos producen un aumento en la natación en el FST (Kuteeva et al. 2008). Ya que la galanina modula la transmisión serotoninérgica en el hipocampo (Yoshitake et al. 2014) no se puede excluir que la serotonina pudiera estar involucrada en las acciones antidepresivas mediadas por GAL-[Leu³¹,Pro³⁴]NPY. Además, el GALR2 está involucrado en la interacción GALR/NPYY1R, ya que M871 bloquea la respuesta observada y además el GALR2 se ha propuesto en trabajos previos que medie los efectos antidepresivos de la galanina *in vivo* (Saar et al. 2013; Kuteeva et al. 2008). Los resultados obtenidos tras la administración de galanina y

[Leu³¹,Pro³⁴]NPY de forma independiente coinciden con estudios previos que confirman el papel pro-depresivo de GAL y la acción antidepresiva del agonista del NPYY1R (Redrobe et al. 2002; Kotagale et al. 2013; Kuteeva et al. 2008). Los efectos de comportamiento observados en el FST son independientes de la actividad motora, ya que ni la galanina, ni el agonista del NPYY1R ni su coadministración produjeron alteración motora en diferentes pruebas de comportamiento (Narvaez et al. 2014).

Dado que el hipocampo participa en los comportamientos depresivos en el FST (Hiroaki-Sato et al. 2014; Bettio et al. 2014), nuestros resultados indican la participación específica del DG. Dentro de las subregiones del DG, se observa colocación de GALR2 y NPYY1R y la presencia de complejos de heterorreceptores GALR2/NPYY1R en las capas polimórficas y subgranular, donde ambos receptores se han descrito previamente (Depczynski et al. 1998; Paredes et al. 2003). Los complejos de heterorreceptores GALR2/NPYY1R existen en diferentes regiones, incluyendo la amígdala (Narvaez et al. 2014). Así, la señal integrada del complejo de heterorreceptores GALR2/NPYY1R en el núcleo medial paracapsular de la amígdala potencia los efectos ansiolíticos inducidos por [Leu³¹,Pro³⁴]NPY y se relaciona con una disminución de c-Fos IR a nivel celular. (Narvaez et al. 2014). De forma importante, los complejos de heterorreceptores GALR2/NPYY1R en el DG se correlacionan con una disminución de c-Fos en la capa polimórfica. El mecanismo para esta interacción podría ser que la coactivación de los protómeros de los complejos de heterorreceptores GALR2/NPYY1R cambian el acoplamiento de GALR2 de Gq a Gi/o junto con un aumento de la afinidad de NPYY1R (Narvaez et al. 2014). De esta forma, ambos GALR2 y NPYY1R estarían acoplados a Gi/o y producirían un aumento en la inhibición de la vía AC-PKA-CREB (Narvaez et al. 2014) y la disminución de c-Fos IR observada en el *hilus* después de la coadministración de galanina y del agonista del NPYY1R.

El aumento en el número c-Fos IR observado en la capa de células granulares tras la coadministración de GAL y del agonista de NPYY1R puede estar mediada por la disminución de actividad de las interneuronas GABAérgicas polimórficas en el *hilus*. De hecho, el agonista del NPYY1R produce una inhibición en la neuronas GABAérgicas polimórficas (Paredes et al. 2003), permitiendo una desinhibición y aumento de la expresión de c-Fos en las células granulares del DG (Andrews-Zwilling et al. 2012; Ledri et al. 2012). Sin embargo, no se puede excluir que las proyecciones de las células *mosy* del *hilus* (MCs) a las células granulares estén también involucradas en este efecto, de hecho, los axones de las células *mosy in vivo* producen la excitación de las interneuronas inhibitorias que inhiben la actividad de las células del DG y se ha descrito una correlación inversa a nivel de los perfiles c-Fos IR entre las células MCs y las células granulares (Jinde et al. 2012; Duffy et al. 2013). Además, también podrían

estar involucrados mecanismos indirectos: Por ejemplo la corticosterona induce una disminución diferente de la transcripción de c-fos, fosB y fra-1 en el DG comparada con otras subregiones hipocampales (Hansson y Fuxe 2008).

5 Trabajos previos muestran un aumento en la expresión de c-Fos en las células granulares del DG después de las terapias antidepresivas como la administración aguda de imipramina (Li et al. 2013), reboxetina y la combinación con mirtazapina (Masana et al. 2012) y el ejercicio (Clark et al. 2011). De hecho, el aumento de la actividad de las células granulares en el DG se ha relacionado con la disminución de la inmovilidad en el FST (Jinde et al. 2012; Masana et al. 10 2012). Esta activación específica dentro del DG podría explicar el efecto antidepresivo observado tras la coadministración de GAL y [Leu³¹,Pro³⁴]NPY.

En base a todo lo anteriormente expuesto, se demuestra la existencia de una interacción entre GALR2 y NPYY1R a nivel de receptor involucrando probablemente la formación de complejos 15 de heterorreceptores GALR2/NPYY1R en el DG, específicamente en las subregiones polimórficas y subgranulares. Esta interacción GALR2/NPYY1R se asocia con un aumento en la acción antidepresiva involucrando poblaciones específicas de células dentro de las subregiones del DG. Así, los datos contenidos en el presente documento ofrecen un nuevo mecanismo integrativo anti-depresivo basado en la potenciación de la interacción de GALR2- 20 NPYY1R permitiendo un aumento en la señal mediada por Gi/o y un aumento del reconocimiento del NPYY1R en el DG.

BIBLIOGRAFÍA

- 25 Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P (2007) The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in brain research* 163:3-22. doi:10.1016/S0079-6123(07)63001-5
- Andrews-Zwilling Y, Gillespie AK, Kravitz AV, Nelson AB, Devidze N, Lo I, Yoon SY, Bien-Ly N, Ring K, Zwilling D, Potter GB, Rubenstein JL, Kreitzer AC, Huang Y (2012) Hilar GABAergic interneuron activity controls spatial learning and memory retrieval. *PLoS one* 30 7 (7):e40555. doi:10.1371/journal.pone.0040555
- Barr AM, Kinney JW, Hill MN, Lu X, Biro S, Rebek J, Jr., Bartfai T (2006) A novel, systemically active, selective galanin receptor type-3 ligand exhibits antidepressant-like activity in preclinical tests. *Neuroscience letters* 405 (1-2):111-115. doi:10.1016/j.neulet.2006.06.033
- 35 Bettio LE, Freitas AE, Neis VB, Dos Santos DB, Ribeiro CM, Rosa PB, Farina M, Rodrigues AL (2014) Guanosine prevents behavioral alterations in the forced swimming test and hippocampal oxidative damage induced by acute restraint stress. *Pharmacology,*

biochemistry, and behavior. doi:10.1016/j.pbb.2014.10.002

- Bjornebekk A, Mathe AA, Brene S (2010) The antidepressant effects of running and escitalopram are associated with levels of hippocampal NPY and Y1 receptor but not cell proliferation in a rat model of depression. *Hippocampus* 20 (7):820-828. doi:10.1002/hipo.20683
- 5 Blackstad TW, Fuxe K, Hokfelt T (1967) Noradrenaline nerve terminals in the hippocampal region of the rat and the guinea pig. *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 78 (4):463-473
- Borroto-Escuela DO, Narvaez M, Di Palma M, Calvo F, Rodriguez D, Millon C, Carlsson J, Agnati LF, Garriga P, Diaz-Cabiale Z, Fuxe K (2014) Preferential activation by galanin 1-15 fragment of the GalR1 protomer of a GalR1-GalR2 heteroreceptor complex. *Biochemical and biophysical research communications* 452 (3):347-353. doi:10.1016/j.bbrc.2014.08.061
- 10 Borroto-Escuela DO, Romero-Fernandez W, Garriga P, Ciruela F, Narvaez M, Tarakanov AO, Palkovits M, Agnati LF, Fuxe K (2013) G protein-coupled receptor heterodimerization in the brain. *Methods in enzymology* 521:281-294. doi:10.1016/B978-0-12-391862-8.00015-6
- 15 Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J (2002) The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron* 35 (4):625-641
- 20 Caberlotto L, Jimenez P, Overstreet DH, Hurd YL, Mathe AA, Fuxe K (1999) Alterations in neuropeptide Y levels and Y1 binding sites in the Flinders Sensitive Line rats, a genetic animal model of depression. *Neuroscience letters* 265 (3):191-194
- Campbell S, Macqueen G (2004) The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN* 29 (6):417-426
- 25 Catena-Dell'Osso M, Fagiolini A, Marazziti D, Baroni S, Bellantuono C (2013) Non-monoaminergic targets for the development of antidepressants: focus on neuropeptides. *Mini reviews in medicinal chemistry* 13 (1):2-10
- Clark PJ, Bhattacharya TK, Miller DS, Rhodes JS (2011) Induction of c-Fos, Zif268, and Arc from acute bouts of voluntary wheel running in new and pre-existing adult mouse hippocampal granule neurons. *Neuroscience* 184:16-27. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.03.072
- 30 Depczynski B, Nichol K, Fathi Z, Iismaa T, Shine J, Cunningham A (1998) Distribution and characterization of the cell types expressing GALR2 mRNA in brain and pituitary gland. *Annals of the New York Academy of Sciences* 863:120-128
- 35 Diaz-Cabiale Z, Parrado C, Narvaez M, Puigcerver A, Millon C, Santin L, Fuxe K, Narvaez JA (2011) Galanin receptor/Neuropeptide Y receptor interactions in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Neuropharmacology* 61 (1-2):80-86.

doi:10.1016/j.neuropharm.2011.03.002

- Duffy AM, Schaner MJ, Chin J, Scharfman HE (2013) Expression of c-fos in hilar mossy cells of the dentate gyrus in vivo. *Hippocampus* 23 (8):649-655. doi:10.1002/hipo.22138
- 5 Dumont Y, Fournier A, St-Pierre S, Quirion R (1996) Autoradiographic distribution of [125I]Leu31,Pro34]PYY and [125I]PYY3-36 binding sites in the rat brain evaluated with two newly developed Y1 and Y2 receptor radioligands. *Synapse* 22 (2):139-158. doi:10.1002/(SICI)1098-2396(199602)22:2<139::AID-SYN7>3.0.CO;2-E [pii] 10.1002/(SICI)1098-2396(199602)22:2<139::AID-SYN7>3.0.CO;2-E
- 10 Fuxe K, Borroto-Escuela DO, Romero-Fernandez W, Tarakanov AO, Calvo F, Garriga P, Tena M, Narvaez M, Millon C, Parrado C, Ciruela F, Agnati LF, Narvaez JA, Diaz-Cabiale Z (2012) On the existence and function of galanin receptor heteromers in the central nervous system. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3:127. doi:10.3389/fendo.2012.00127
- Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, et al. (1988) The new stereological tools: disector, 15 fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 96 (10):857&881
- Hagihara H, Takao K, Walton NM, Matsumoto M, Miyakawa T (2013) Immature dentate gyrus: an endophenotype of neuropsychiatric disorders. *Neural plasticity* 2013:318596. 20 doi:10.1155/2013/318596
- Hansson AC, Fuxe K (2008) Time-course of immediate early gene expression in hippocampal subregions of adrenalectomized rats after acute corticosterone challenge. *Brain research* 1215:1-10. doi:10.1016/j.brainres.2008.03.080
- Hiroaki-Sato VA, Sales AJ, Biojone C, Joca SR (2014) Hippocampal nNOS inhibition induces an antidepressant-like effect: involvement of 5HT1A receptors. *Behavioural pharmacology* 25 (3):187-196. doi:10.1097/FBP.0000000000000035 25
- Holmes A, Heilig M, Rupniak NM, Steckler T, Griebel G (2003) Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders. *Trends in pharmacological sciences* 24 (11):580-588. doi:10.1016/j.tips.2003.09.011
- 30 Jacobowitz DM, Kresse A, Skofitsch G (2004) Galanin in the brain: chemoarchitectonics and brain cartography--a historical review. *Peptides* 25 (3):433-464. doi:10.1016/j.peptides.2004.02.015 S0196978104000981 [pii]
- 35 Jimenez-Vasquez PA, Diaz-Cabiale Z, Caberlotto L, Bellido I, Overstreet D, Fuxe K, Mathe AA (2007) Electroconvulsive stimuli selectively affect behavior and neuropeptide Y (NPY) and NPY Y(1) receptor gene expressions in hippocampus and hypothalamus of Flinders Sensitive Line rat model of depression. *European neuropsychopharmacology : the*

- journal of the European College of Neuropsychopharmacology 17 (4):298-308.
doi:10.1016/j.euroneuro.2006.06.011
- 5 Jinde S, Zsiros V, Jiang Z, Nakao K, Pickel J, Kohno K, Belforte JE, Nakazawa K (2012) Hilar mossy cell degeneration causes transient dentate granule cell hyperexcitability and impaired pattern separation. *Neuron* 76 (6):1189-1200. doi:10.1016/j.neuron.2012.10.036
- Kohler C, Eriksson L, Davies S, Chan-Palay V (1986) Neuropeptide Y innervation of the hippocampal region in the rat and monkey brain. *The Journal of comparative neurology* 244 (3):384-400. doi:10.1002/cne.902440310
- 10 Kormos V, Gaszner B (2013) Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: from animals to humans. *Neuropeptides* 47 (6):401-419. doi:10.1016/j.npep.2013.10.014
- Kotagale NR, Paliwal NP, Aglawe MM, Umekar MJ, Taksande BG (2013) Possible involvement of neuropeptide Y Y1 receptors in antidepressant like effect of agmatine in rats. *Peptides* 47:7-11. doi:10.1016/j.peptides.2013.04.018
- 15 Kuteeva E, Wardi T, Hokfelt T, Ogren SO (2007) Galanin enhances and a galanin antagonist attenuates depression-like behaviour in the rat. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 17 (1):64-69. doi:10.1016/j.euroneuro.2006.03.003
- Kuteeva E, Wardi T, Lundstrom L, Sollenberg U, Langel U, Hokfelt T, Ogren SO (2008) Differential role of galanin receptors in the regulation of depression-like behavior and monoamine/stress-related genes at the cell body level. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33 (11):2573-2585. doi:10.1038/sj.npp.1301660
- 20 Ledri M, Nikitidou L, Erdelyi F, Szabo G, Kirik D, Deisseroth K, Kokaia M (2012) Altered profile of basket cell afferent synapses in hyper-excitable dentate gyrus revealed by optogenetic and two-pathway stimulations. *The European journal of neuroscience* 36 (1):1971-1983. doi:10.1111/j.1460-9568.2012.08080.x
- 25 Li B, Suemaru K, Kitamura Y, Gomita Y, Araki H, Cui R (2013) Imipramine-induced c-Fos expression in the medial prefrontal cortex is decreased in the ACTH-treated rats. *Journal of biochemical and molecular toxicology* 27 (11):486-491. doi:10.1002/jbt.21510
- 30 Madsen TM, Greisen MH, Nielsen SM, Bolwig TG, Mikkelsen JD (2000) Electroconvulsive stimuli enhance both neuropeptide Y receptor Y1 and Y2 messenger RNA expression and levels of binding in the rat hippocampus. *Neuroscience* 98 (1):33-39
- Masana M, Castane A, Santana N, Bortolozzi A, Artigas F (2012) Noradrenergic antidepressants increase cortical dopamine: potential use in augmentation strategies. *Neuropharmacology* 63 (4):675-684. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.05.020
- 35 Mathe AA, Jimenez PA, Theodorsson E, Stenfors C (1998) Neuropeptide Y, neurokinin A and

neurotensin in brain regions of Fawn Hooded "depressed", Wistar, and Sprague Dawley rats. Effects of electroconvulsive stimuli. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 22 (3):529-546

- 5 McEwen BS, Magarinos AM (1997) Stress effects on morphology and function of the hippocampus. *Annals of the New York Academy of Sciences* 821:271-284
- Millon C, Flores-Burgess A, Narvaez M, Borroto-Escuela DO, Santin L, Parrado C, Narvaez JA, Fuxe K, Diaz-Cabiale Z (2014) A Role For Galanin N-Terminal Fragment (1-15) In Anxiety- And Depression-Related Behaviours In Rats. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum*. doi:10.1093/ijnp/pyu064
- 10 Muller GJ, Moller A, Johansen FF (2001) Stereological cell counts of GABAergic neurons in rat dentate hilus following transient cerebral ischemia. *Experimental brain research* 141 (3):380&388. doi:10.1007/s002210100879
- Narvaez M, Millon C, Borroto-Escuela D, Flores-Burgess A, Santin L, Parrado C, Gago B, Puigcerver A, Fuxe K, Narvaez JA, Diaz-Cabiale Z (2014) Galanin receptor 2-neuropeptide Y Y1 receptor interactions in the amygdala lead to increased anxiolytic actions. *Brain structure & function*. doi:10.1007/s00429-014-0788-7
- O'Donnell D, Ahmad S, Wahlestedt C, Walker P (1999) Expression of the novel galanin receptor subtype GALR2 in the adult rat CNS: distinct distribution from GALR1. *The Journal of comparative neurology* 409 (3):469-481
- 20 Paredes MF, Greenwood J, Baraban SC (2003) Neuropeptide Y modulates a G protein-coupled inwardly rectifying potassium current in the mouse hippocampus. *Neuroscience letters* 340 (1):9-12
- Parrado C, Diaz-Cabiale Z, Garcia-Coronel M, Agnati LF, Covenas R, Fuxe K, Narvaez JA (2007) Region specific galanin receptor/neuropeptide Y Y1 receptor interactions in the tel- and diencephalon of the rat. Relevance for food consumption. *Neuropharmacology* 52 (2):684-692. doi:10.1016/j.neuropharm.2006.09.010
- 25 Paxinos G, Watson C, Pennisi M, Topple A (1985) Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *Journal of neuroscience methods* 13 (2):139&143
- 30 Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M (2005) Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology* 177 (3):245-255. doi:10.1007/s00213-004-2048-7
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266 (5604):730-732
- 35 Razani H, Diaz&Cabiale Z, Misane I, Wang FH, Fuxe K, Ogren SO (2001) Prolonged effects of intraventricular galanin on a 5&hydroxytryptamine(1A) receptor mediated function in the

- rat. *Neuroscience letters* 299 (1&2):145&149
- Redrobe JP, Dumont Y, Fournier A, Quirion R (2002) The neuropeptide Y (NPY) Y1 receptor subtype mediates NPY-induced antidepressant-like activity in the mouse forced swimming test. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 26 (5):615-624. doi:10.1016/S0893-133X(01)00403-1
- 5 Saar I, Lahe J, Langel K, Runesson J, Webling K, Jarv J, Rytkonen J, Narvanen A, Bartfai T, Kurrikoff K, Langel U (2013) Novel systemically active galanin receptor 2 ligands in depression-like behavior. *Journal of neurochemistry* 127 (1):114-123. doi:10.1111/jnc.12274
- 10 Scharfman HE, Sollas AL, Goodman JH (2002) Spontaneous recurrent seizures after pilocarpine-induced status epilepticus activate calbindin-immunoreactive hilar cells of the rat dentate gyrus. *Neuroscience* 111 (1):71-81
- Sperk G, Hamilton T, Colmers WF (2007) Neuropeptide Y in the dentate gyrus. *Progress in brain research* 163:285-297. doi:10.1016/S0079-6123(07)63017-9
- 15 Stogner KA, Holmes PV (2000) Neuropeptide-Y exerts antidepressant-like effects in the forced swim test in rats. *European journal of pharmacology* 387 (2):R9-10
- Wrenn CC, Holmes A (2006) The role of galanin in modulating stress-related neural pathways. *Drug News Perspect* 19 (8):461-467. doi:1043963 [pii] 10.1358/dnp.2006.19.8.1043963
- 20 Yoshitake S, Kuteeva E, Hokfelt T, Mennicken F, Theodorsson E, Yamaguchi M, Kehr J, Yoshitake T (2014) Correlation between the effects of local and intracerebroventricular infusions of galanin on 5-HT release studied by microdialysis, and distribution of galanin and galanin receptors in prefrontal cortex, ventral hippocampus, amygdala, hypothalamus, and striatum of awake rats. *Synapse* 68 (5):179-193. doi:10.1002/syn.21730
- 25

REIVINDICACIONES

1. Uso de una combinación que comprende galanina y [Leu31,Pro34]NPY para preparar un medicamento destinado al tratamiento terapéutico de la depresión.

5

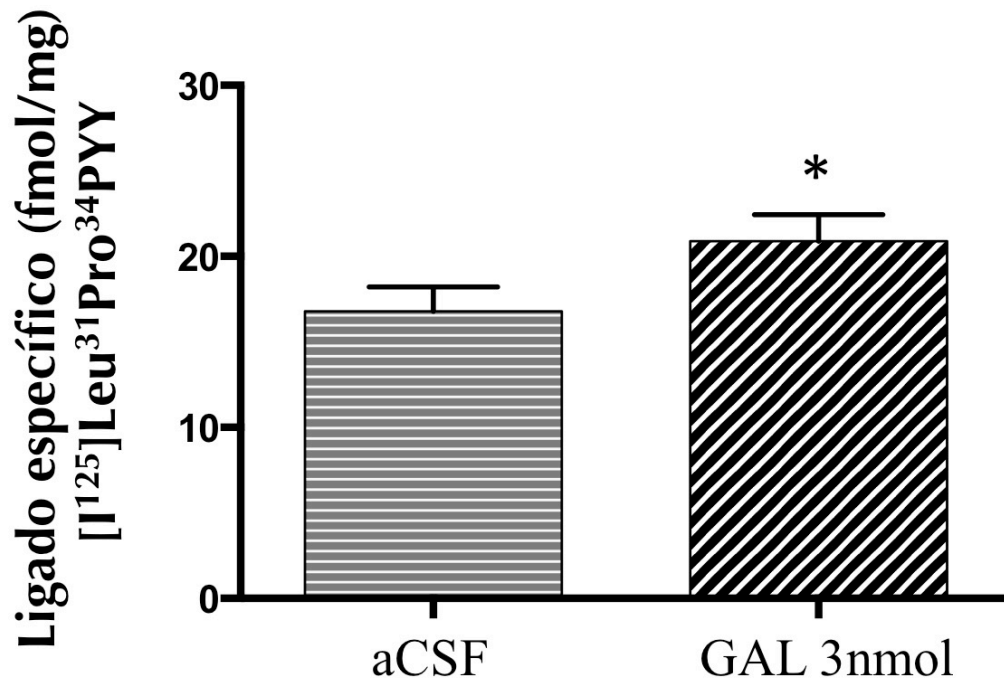


Figura 1

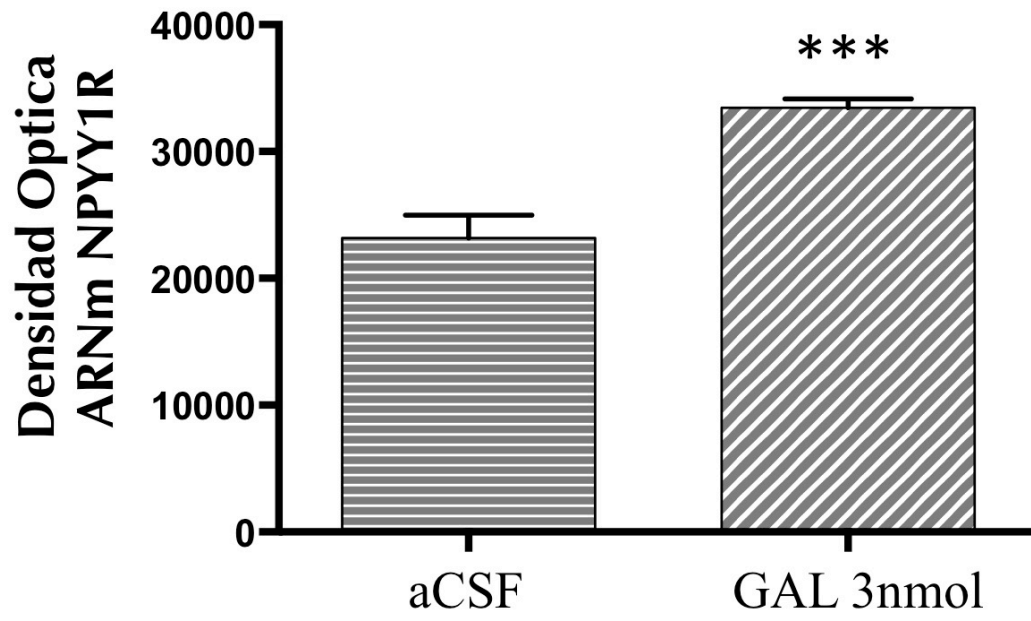


Figura 2

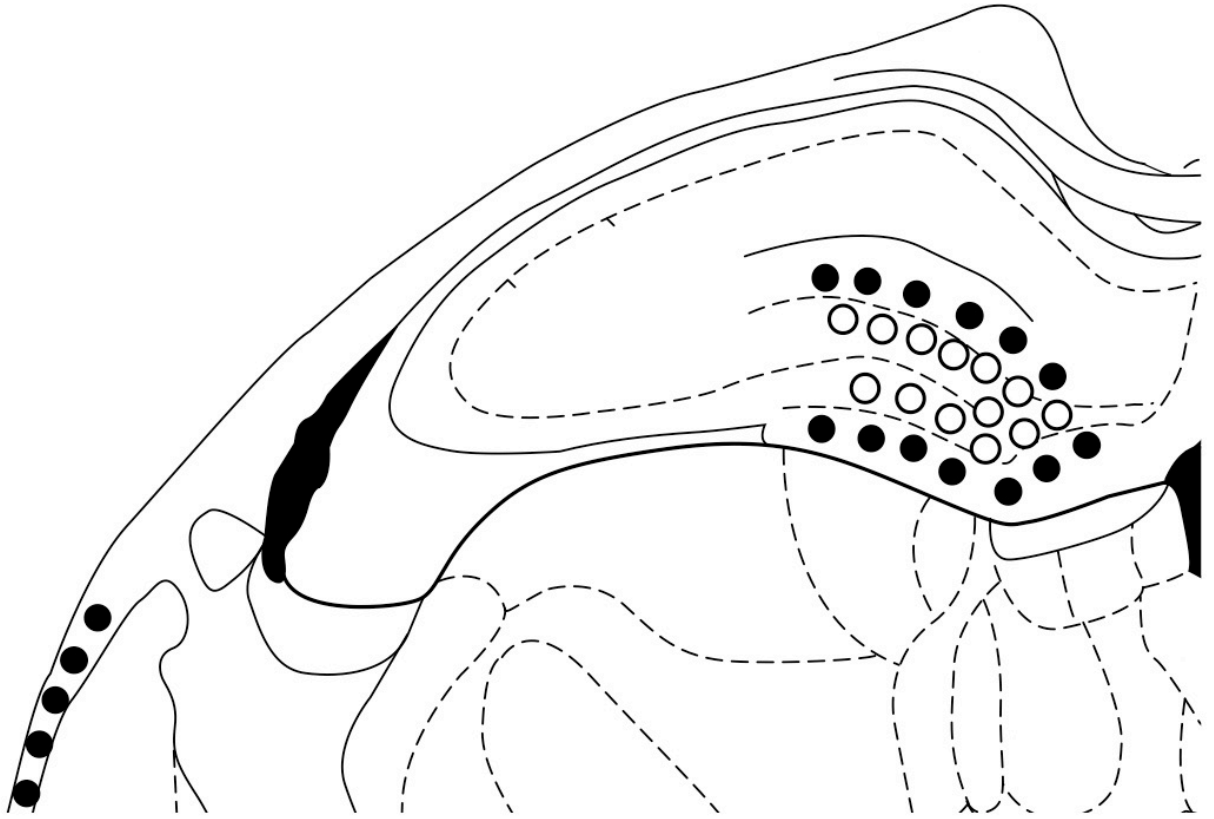


Figura 3

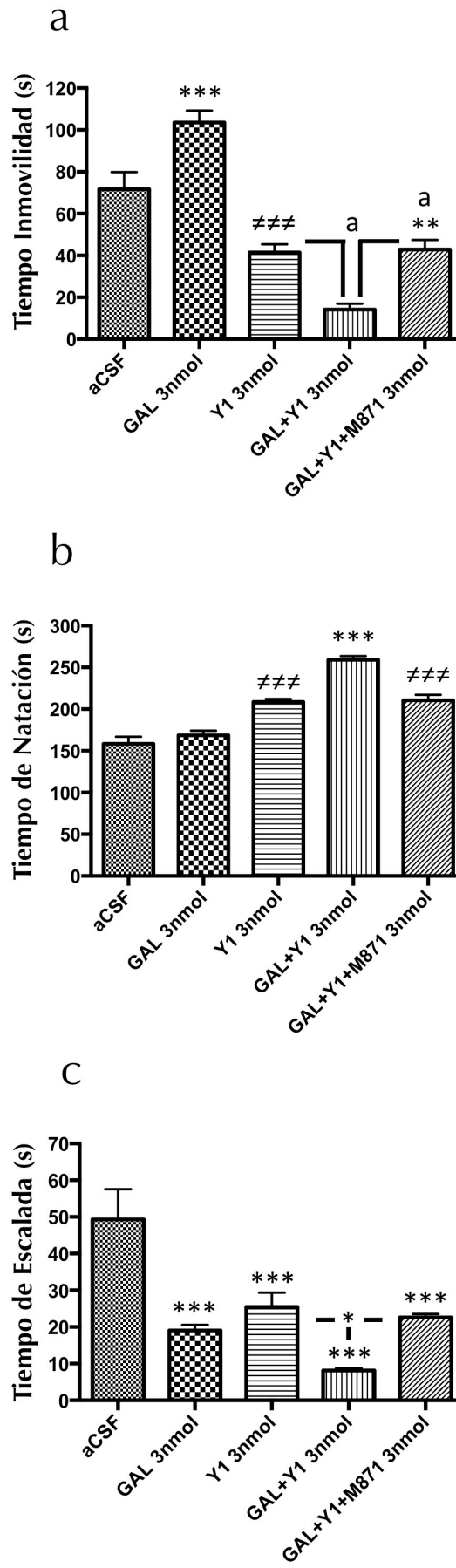
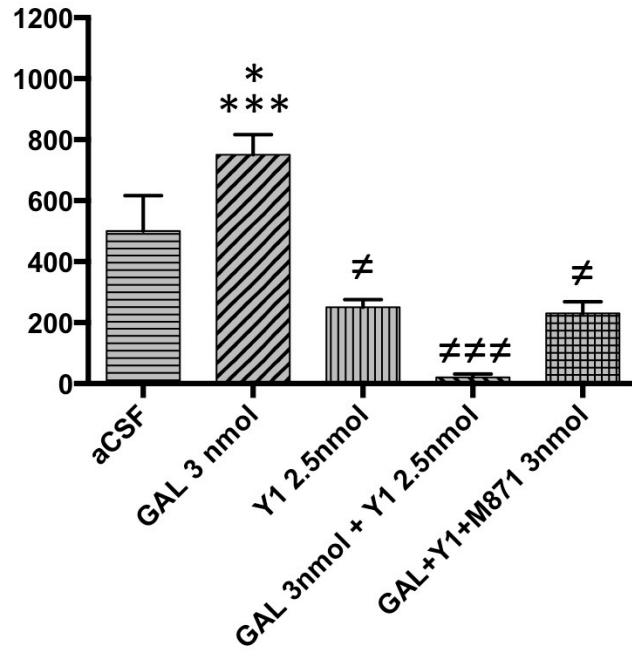


Figura 4

a

Número Total de núcleos c-Fos positivos



b

Número Total de núcleos c-Fos positivos

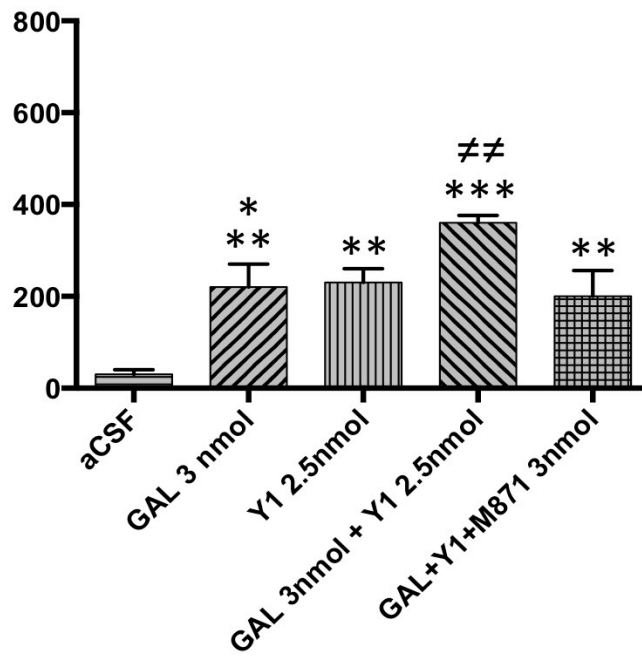


Figura 5



- ②① N.º solicitud: 201500842
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.11.2015
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K38/17** (2006.01)
A61P25/24 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	Díaz-Cabiale Z. et al. Galanin Receptor/Neuropeptide Y Receptor Interactions in the Central Nervous System. Current Protein and Peptide Science. 2014, Vol. 15, páginas 666-672 (todo el documento)	1-3
X	Narviéz M. et al. Galanin/ Neuropeptide Y Y1 receptor interaction at the cellular and receptor level in the amygdala. 18.11.2013, Neuroscience Meeting San Diego (todo el documento)	1-3
X	Díaz-Cabiale Z. et al. Galanin receptor/Neuropeptide Y receptor interactions in the dorsal raphe nucleus of the rat. Neuropharmacology. 2011, Vol. 61, páginas 80-86 (todo el documento)	1-3

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
31.10.2016

Examinador
M. Cumbreño Galindo

Página
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, WPI, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.10.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-3	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-3	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	Díaz-Cabiale Z. et al. Current Protein and Peptide Science. Vol. 15, páginas 666-672	2014
D02	Narváez M. et al. 2013 Neuroscience Meeting San Diego	18.11.2013
D03	Díaz-Cabiale Z. et al. Neuropharmacology. Vol. 61, páginas 80-86	2011

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 una combinación que comprende galanina y [Leu31, Pro34] NPY, así como su uso en la preparación de un medicamento o producto farmacéutico para terapia frente a depresión (reivindicaciones 1 a 3).

D01 expone que GAL y NPY se regulan mutuamente debido a la presencia de receptores de ambos compuestos en diversas áreas del cerebro responsables de la memoria, la ingesta de alimentos o en el estado de ánimo. Detalla el uso combinado de galanina y [Leu31, Pro34] NPY para estudiar tales interacciones y algunos de sus efectos fisiológicos. Menciona que se ha demostrado la interacción entre los receptores GALR y NPY1 en las zonas del cerebro implicadas con el estado de ánimo, que incluye la ansiedad y la depresión, para cuyo estudio se ha utilizado la combinación mencionada.

D02 estudia la relación GAL/Y1 en la amígdala, un lugar clave para el miedo, el estado de ánimo y la motivación. Las ratas recibieron inyecciones intracerebroventriculares de galanina y [Leu31, Pro34] NPY, observándose la interacción entre ambos y, por tanto, su papel en la regulación de los comportamientos emocionales.

D03 evalúa las interacciones entre los receptores Y1 del neuropéptido Y y los receptores de galanina en el núcleo dorsal del rafe mediante la administración icv de galanina y [Leu31, Pro34] NPY, lo cual indica que ambos juegan un papel relevante en la fisiopatología de los trastornos del estado de ánimo como son la depresión y la ansiedad.

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) y Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

En el estado de la técnica es sobradamente conocido el uso de galanina y de los agonistas de NPY1R, como es el caso de [Leu31, Pro34] NPY, como antidepresivos y, así mismo, hay numerosos estudios que detallan las interacciones entre galanina y NPY y sus distintos receptores en diferentes zonas del sistema nervioso y, más específicamente, del cerebro. De hecho, hay numerosos documentos que divulgan la composición objeto de la presente invención y diversos usos de la misma. En concreto, los documentos citados anticipan combinaciones que comprenden galanina y [Leu31, Pro34] NPY, así como su uso en la preparación de un medicamento o producto farmacéutico para terapia frente a depresión. Por consiguiente, las reivindicaciones 1 a 3 carecen de novedad y no presentan actividad inventiva.