

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 930 077**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 31/08 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2017 PCT/EP2017/053308**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **24.08.2017 WO17140684**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2017 E 17704039 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2022 EP 3416688**

(54) Título: **Apelina para su uso en el tratamiento de la disfunción cognitiva posoperatoria**

(30) Prioridad:

15.02.2016 EP 16305170

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.12.2022

(73) Titular/es:

INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ PAUL SABATIER TOULOUSE III (33.3%) y
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE TOULOUSE (33.3%)

(72) Inventor/es:

VALET, PHILIPPE;
DRAY, CÉDRIC;
MINVILLE, VINCENT;
FRANCES, BERNARD;
LABASTE, FRANÇOIS y
VINEL, CLAIRE

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 930 077 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Apelina para su uso en el tratamiento de la disfunción cognitiva posoperatoria

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de la disfunción cognitiva posoperatoria. La presente invención se refiere a apelina para su uso en un método de tratamiento de la disfunción cognitiva posoperatoria (DCPO) en un sujeto que lo necesita.

10

Antecedentes

15

La disfunción cognitiva posoperatoria (DCPO) se caracteriza por una disminución persistente del rendimiento cognitivo después de la cirugía y se asocia con una mayor mortalidad en pacientes de edad avanzada. La prevalencia estimada en pacientes mayores de 60 años es del 15-25%, presentando aproximadamente el 10% síntomas 3 meses después de la cirugía. Los factores de riesgo para la DCPO incluyen el envejecimiento, la disfunción cognitiva preoperatoria y la infección perioperatoria. Actualmente no existe ningún tratamiento adecuado. Están acumulándose evidencias congruentes sobre el papel de los procesos inflamatorios que surgen debido al traumatismo quirúrgico y las complicaciones posteriores. El hipocampo parece especialmente vulnerable a la inflamación. La infección periférica y el envejecimiento interactúan para afectar a la consolidación de la memoria hipocámpica y los roedores de edad avanzada son más vulnerables al deterioro cognitivo después de una exposición inmunológica periférica (Barrientos *et al.*, 2006; 2009; 2012). Las respuestas inflamatorias centrales, específicamente los aumentos de citocinas en el hipocampo después de la cirugía, se han informado repetidamente en modelos de DCPO en ratas y ratones (Cao *et al.*, 2010; Cibelli *et al.*, 2010; Fidalgo *et al.*, 2011a, 2011b; Rosczyk *et al.*, 2008; Terrando *et al.*, 2010; Wan *et al.*, 2007, 2010).

20

25

Tal como ya se mencionó, se presenta un contexto proinflamatorio después de la cirugía asociada a la anestesia central. Este mecanismo podría ser en parte responsable de la DCPO al aumentar la inflamación hipocámpica y alterar la plasticidad neuronal. En personas de edad avanzada se ha descrito un contexto proinflamatorio a través de diferentes rutas y podría estar en el origen de muchas patologías asociadas a la edad tales como las enfermedades neurodegenerativas. Durante la cirugía, la fase aguda de la inflamación es contrarrestada por sistemas de protección en niños y adultos. Este sistema protector se ve alterado en pacientes de edad avanzada ya que se ha demostrado que la fase inflamatoria es de larga duración.

30

35

40

En conjunto, estos datos indican que las estrategias antiinflamatorias deben procesarse en pacientes de edad avanzada para reducir el riesgo de desarrollar DCPO. Sin embargo, estos enfoques generalmente no se aconsejan en ancianos debido a la falta de tolerancia de esta población a los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) a nivel renal o intestinal.

45

50

Se da a conocer que la administración intracerebroventricular (i.c.v) de apelina-13 a través de una cánula (que se introdujo en el cerebroventrículo lateral mediante cirugía) mejora el aprendizaje y la consolidación de la memoria en el aprendizaje por evitación pasiva (Telegy Gyula *et al.* Peptide, Elsevier enero de 2013;39:171-4. doi: 10.1016/j.peptides.2012.10.011. Epub del 3 de noviembre de 2012). También se conoce el papel de la apelina-13 en la regulación de la depresión inducida por estrés y el deterioro de la memoria en ratas (Li E *et al.* Eur Neuropsychopharmacol. Marzo de 2016;26(3):420-30. doi: 10.1016/j.euroneuro.2016.01.007. Epub del 28 de enero de 2016). También se da a conocer el uso de un compuesto químico para el tratamiento de la disfunción cognitiva posoperatoria en un sujeto (documento WO2011050095).

55

60

65

La apelina es un péptido sintetizado y secretado por diversos tejidos y recuperado en diferentes especies como un precursor de 77 aminoácidos. Después de la escisión por endopeptidasas, la apelina se encuentra en la circulación en cuatro isoformas principales: apelina-36, apelina-17, apelina-13 y apelina-13 piroglutaminada. La apelina-13 se describe como la isoforma más estable en líquidos biológicos. La apelina se une a APJ, un receptor acoplado a proteína G presente en los mismos tejidos que su ligando endógeno apelina. El complejo apelina/APJ está implicado en la osteogénesis, la inflamación y la neuroprotección. Por ejemplo, el tratamiento *in vitro* con apelina de los osteoblastos MC3T3-E1 muestra un aumento dependiente de la dosis de la proliferación asociado a una disminución de la apoptosis. La apelina también se asocia a procesos inflamatorios. De hecho, incluso si los mecanismos no se comprenden completamente, la producción de apelina aumenta con citocinas proinflamatorias tales como TNFalfa y, por tanto, podría contrarrestar los procesos inflamatorios. Otra propiedad muy interesante de la apelina es su efecto neuroprotector. De hecho, la apelina-13 y la apelina-36 fomentan la supervivencia de neuronas hipocámpicas cultivadas inducidas por la toxicidad del ácido quínico mediada por N-metil-d-aspartato. Otro conjunto de experimentos muestra que en las neuronas NT2.N, la apelina-13 y la apelina-17 aumentan la fosforilación de Raf, AKT y ERK1/2 e inhiben la apoptosis inducida por el VIH. En neuronas hipocámpicas cultivadas, la apelina es significativamente neuroprotectora contra la toxicidad del peróxido de

hidrógeno cuando se asocia con vEGF. En las neuronas corticales, la apelina-13 inhibe la producción de ROS, la despolarización mitocondrial, la liberación de citocromo c de las mitocondrias al citosol, la activación de caspasa-3 y la apoptosis inducida por la privación de suero. Además, la apelina-13 atenúa el aumento inducido por la privación de suero de ERK1/2 fosforilada. La apelina-13 también disminuye la fosforilación de AKT, lo que indica una protección de las neuronas corticales cultivadas contra la neurotoxicidad de NMDA, lo que destaca que los péptidos de apelina pueden ser neuroprotectores contra el daño cerebral por isquemia-reperfusión. En conjunto, estos resultados indican que la apelina no sólo inhibe la apoptosis sino que también antagoniza la excitotoxicidad en las células nerviosas.

10 **Sumario de la invención**

Las referencias a métodos de tratamiento en esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, a las composiciones farmacéuticas y a los medicamentos de la presente invención para uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

- 15 La presente invención se define por las reivindicaciones. En particular, la presente invención se refiere a apelina para su uso en un método de tratamiento de la disfunción cognitiva posoperatoria (DCPO) en un sujeto que lo necesita.
- 20 La siguiente descripción detallada, las figuras y el ejemplo se encuentran dentro del alcance de la presente invención en la medida en que se refieren a apelina como agonista del receptor APJ. El resto del contenido se presenta únicamente con fines de ilustración y comprensión.

Descripción detallada

- 25 Los inventores plantearon la hipótesis de que la apelina podría secretarse potencialmente en respuesta a la inflamación mediada por cirugía y proteger contra las lesiones neuronales asociadas a la DCPO. Para validar esta hipótesis, se trató de manera crónica a ratones jóvenes y de edad avanzada mediante administración por vía i.p. diaria de apelina y se determinó el impacto del tratamiento sobre la memoria, el dolor y el estrés después de la cirugía de fractura de tibia. Además, para evaluar mejor el papel de la apelina durante la DCPO mediada por cirugía tibial, se midieron las consecuencias de la administración de apelina en la modificación del perfil proinflamatorio (TNFalfa, IL6...) en los tejidos.

30 Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un método de tratamiento de la disfunción cognitiva posoperatoria en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista del receptor APJ.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término "disfunción cognitiva postoperatoria" o "DCPO" tiene su significado general en la técnica y se refiere a un deterioro cognitivo experimentado después de la cirugía. La DCPO es un trastorno cognitivo que incluye el deterioro de la memoria, la atención, el aprendizaje y la velocidad de procesamiento de la información. La DCPO puede manifestarse como un síntoma a corto plazo o durar largos períodos de tiempo. En algunas circunstancias, la DCPO puede provocar una alteración permanente de las funciones cognitivas. De hecho, la DCPO se observa habitualmente después de la anestesia. En la técnica se conocen métodos para diagnosticar DCPO en un sujeto. Por ejemplo, puede realizarse una evaluación válida de la función cognitiva preoperatoria y posoperatoria del sujeto para caracterizar la DCPO. Las pruebas neuropsicológicas típicas conocidas por un experto incluyen, pero no se limitan a, pruebas de comprensión verbal, organización perceptual, función ejecutiva (abstracción, resolución de problemas y flexibilidad cognitiva), seguimiento visual, rendimiento del juego, rendimiento psicomotor, velocidad psicomotora, sustitución de símbolos digitales, velocidad de procesamiento, conexión de puntos, fusión del parpadeo, tiempo de reacción simple, tiempo de reacción de elección y precisión perceptiva.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" o "tratar" se refiere tanto al tratamiento profiláctico o preventivo como al tratamiento curativo o modificador de la enfermedad, incluyendo el tratamiento de sujetos con riesgo de contraer la enfermedad o que se sospecha que han contraído la enfermedad, así como sujetos que están enfermos o se les ha diagnosticado que padecen una enfermedad o afección médica, e incluye la supresión de la recaída clínica. El tratamiento puede administrarse a un sujeto que tenga un trastorno médico o que en última instancia pueda adquirir el trastorno, para prevenir, curar, retrasar la aparición de, reducir la gravedad de o mejorar uno o más síntomas de un trastorno o trastorno recurrente, o para prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en ausencia de tal tratamiento. Por "régimen terapéutico" se entiende el patrón de tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, el patrón de dosificación usado durante la terapia. Un régimen terapéutico puede incluir un régimen de inducción y un régimen de mantenimiento. La expresión "régimen de inducción" o "periodo de inducción" se refiere a un régimen terapéutico (o la parte de un régimen terapéutico) que se usa para el tratamiento inicial de una enfermedad. El objetivo general de un régimen de inducción es proporcionar un alto nivel de fármaco a un sujeto durante el periodo inicial de un régimen de tratamiento. Un régimen de inducción puede emplear (en parte o en su totalidad) un "régimen de carga", que puede incluir la administración de una dosis mayor del fármaco que la que emplearía un médico durante un

- régimen de mantenimiento, la administración de un fármaco con más frecuencia de la que administraría un médico durante un régimen de mantenimiento, o ambas. La expresión "régimen de mantenimiento" o "periodo de mantenimiento" se refiere a un régimen terapéutico (o la parte de un régimen terapéutico) que se usa para el mantenimiento de un sujeto durante el tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, para mantener al sujeto en remisión durante largos períodos de tiempo (meses o años). Un régimen de mantenimiento puede emplear terapia continua (por ejemplo, administración de un fármaco a intervalos regulares, por ejemplo, semanal, mensual, anual, etc.) o terapia intermitente (por ejemplo, tratamiento interrumpido, tratamiento intermitente, tratamiento en caso de recaída o tratamiento tras lograr un criterio predeterminado particular [por ejemplo, manifestación de la enfermedad, etc.]).
- 5 10 En particular, el agonista del receptor APJ de la presente divulgación es particularmente adecuado para proteger al sujeto de las lesiones neuronales asociadas a la DCPO.
- 15 En particular, el método de la divulgación se realiza en un sujeto que se determina que tiene riesgo de disfunción cognitiva posoperatoria. En particular, el método de la divulgación se realiza en un sujeto al que se le diagnostica o se indica que tiene un deterioro en la capacidad intelectual.
- 20 En particular, el agonista del receptor APJ de la presente divulgación se administra de manera perioperatoria; es decir, antes de, durante y/o después de la cirugía, y después del alta hospitalaria.
- 25 30 35 40 45 Tal como se usa en el presente documento, el término "cirugía" se refiere a cualquier método o intervención manual u operatorio para el tratamiento o la prevención de enfermedades, lesiones o deformidades. La cirugía incluye métodos o intervenciones realizados mientras un sujeto está bajo anestesia, incluyendo anestesia local o general. La cirugía puede realizarla un médico, cirujano o dentista, generalmente en un hospital u otro centro de atención médica. Los sujetos que se someten a cirugía pueden ser hospitalizados o ambulatorios, por ejemplo, cirugía fuera del sujeto. Para los fines de esta divulgación, la cirugía incluye, pero no se limita a: cirugía abdominal (por ejemplo, cirugía de las vísceras abdominales), cirugía *ex situ* (por ejemplo, cirugía realizada en un órgano que se ha extraído del cuerpo, después de lo cual puede reimplantarse), cardiaca (por ejemplo, cirugía del corazón), cerebral (por ejemplo, cirugía en el cerebro), cineplástica (por ejemplo, cirugía para crear un túnel a través de un músculo adyacente al muñón de una extremidad amputada, para permitir el uso del músculo en la operación de una prótesis), cosmética (por ejemplo, cirugía para mejorar el aspecto de un sujeto mediante restauración, corrección o eliminación plástica de imperfecciones), dentofacial (por ejemplo, cirugía que involucra defectos de la cara y estructuras de la boca), neurológica (por ejemplo, cirugía que involucra el sistema nervioso periférico o central), bucal (por ejemplo, cirugía que involucra defectos de la boca, la mandíbula y estructuras asociadas), ortopédica (por ejemplo, cirugía que trata huesos y estructuras óseas tales como el reemplazo de cadera), pélvica (por ejemplo, cirugía que involucra la pelvis, predominantemente obstétrica y ginecológica), plástica (por ejemplo, cirugía que involucra la restauración, reconstrucción, corrección o mejora en la forma y el aspecto de estructuras corporales defectuosas, dañadas o deformadas por lesión, enfermedad o crecimiento y desarrollo) o rectal (por ejemplo, cirugía del recto), urológica (por ejemplo, cirugía relacionada con el sistema genitourinario, predominantemente en hombres), vascular (por ejemplo, cirugía de los vasos sanguíneos) y cirugía relacionada con la otorrinolaringología (por ejemplo, cirugía de oídos, nariz, garganta o estructuras relacionadas). La cirugía puede ser conservadora (por ejemplo, cirugía para preservar o extirpar con riesgo mínimo órganos, tejidos o extremidades lesionados o enfermos) o radical (por ejemplo, cirugía diseñada para extirpar todas las áreas de enfermedad localmente extensa y zonas adyacentes de drenaje linfático).
- 50 55 60 65 En particular, el agonista del receptor APJ de la presente divulgación se administra de manera concomitante o secuencial con un anestésico al sujeto. En particular, el agonista del receptor APJ y el anestésico se administran, en cualquier orden, en el plazo de un tiempo específico entre sí, por ejemplo, en el plazo de 6 horas uno del otro, en el plazo de 5 horas uno del otro, en el plazo de 4 horas uno del otro, en el plazo de 3 horas uno del otro, en el plazo de 2 horas uno del otro, en el plazo de 1 hora uno del otro, en el plazo de 30 minutos uno del otro, en el plazo de 20 minutos uno del otro, en el plazo de 10 minutos uno del otro, en el plazo de 5 minutos uno del otro, en el plazo de 1 minuto uno del otro o de manera sustancialmente simultánea o concurrente. En particular, el agonista del receptor APJ de la presente divulgación se administra al sujeto antes del anestésico, por ejemplo, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 5 minutos o aproximadamente 1 minuto antes de la administración del anestésico. En particular, el agonista del receptor APJ de la presente divulgación y el anestésico pueden administrarse de manera concurrente.
- Tal como se usa en el presente documento, el término "anestésico" tiene su significado general en la técnica y se refiere a un fármaco que provoca anestesia, por ejemplo, que generalmente se administra para facilitar una cirugía, para aliviar el dolor no quirúrgico o para permitir el diagnóstico de una enfermedad o un trastorno. Los ejemplos no limitativos de anestésicos inhalatorios incluyen éteres tales como dietil éter, metoxipropano, vinil éter, éteres halogenados, por ejemplo, desflurano, enflurano, halotano, isoflurano, metoxiflurano; haloalcanos, tales como cloroformo, halotano, tricloroetileno, ciclopropano, etileno, óxido nitroso, sevoflurano, xenón, isoflurano deuterado (dado a conocer en la patente estadounidense n.º 4.220.644 y la patente estadounidense

n.º 4.262.144), hexafluoro-t-butil-difluorometil éter (dado a conocer en la patente estadounidense n.º 3.949.005), análogos deuterados de metoxiflurano (dados a conocer en la patente estadounidense n.º 4.281.020), sevoflurano deuterado (dado a conocer en la patente estadounidense n.º 5.391.579 y la patente estadounidense n.º 5.789.450) y otros anestésicos inhalatorios dados a conocer en patentes estadounidenses tales como la patente estadounidense n.º 3.931.344, la patente estadounidense n.º 3.932.669, la patente estadounidense n.º 3.981.927, la patente estadounidense n.º 3.980.714, la patente estadounidense n.º 4.346.246, la patente estadounidense n.º 3.932.529, la patente estadounidense n.º 3.932.667, la patente estadounidense n.º 3.954.893, la patente estadounidense n.º 3.987.100, la patente estadounidense n.º 3.987.203, la patente estadounidense n.º 3.995.062. Cualquiera de los anestésicos inhalatorios puede usarse solo o en combinación con otros medicamentos para mantener la anestesia. Por ejemplo, puede usarse óxido nitroso en combinación con otros anestésicos inhalatorios.

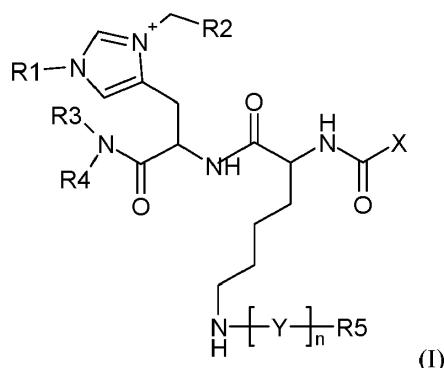
Tal como se usa en el presente documento, el término "receptor APJ" tiene su significado general en la técnica y se refiere al receptor de apelina identificado originalmente por O'Dowd *et al.* (O'Dowd *et al.*, 1993, Gene 136: 355360). APJ es un receptor acoplado a Gi de 7 dominios transmembranarios de 380 residuos cuyo gen está localizado en el brazo largo del cromosoma 11 en seres humanos (secuencia de referencia del NCBI: NP-005152.1, y codificado por la secuencia de referencia del NCBI: NM-005161). Aunque huérfano durante muchos años, el ligando endógeno se aisló y se denominó apelina (Tatemoto *et al.*, Biochem Biophys Res Commun 251, 471-6 (1998)).

Tal como se usa en el presente documento, el término "apelina" tiene su significado general en la técnica e indica una preproteína de 77 residuos (secuencia de referencia del NCBI: NP-0059109.3, y codificada por la secuencia de referencia del NCBI: NM-017413.3), que se procesa en formas biológicamente activas de péptidos de apelina, tales como apelina-36, apelina-17, apelina-16, apelina-13, apelina-12. El péptido maduro de longitud completa, denominado "apelina-36", comprende 36 aminoácidos, pero la isoforma más potente es la forma piroglutamada de un 13mero de apelina (apelina-13), denominado "Pyr-1-apelina-13 o Pyr1-apelina-13". Se describen diferentes formas de apelina, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 6.492.324B1.

Tal como se usa en el presente documento, el término "agonista del receptor APJ" se refiere a cualquier compuesto, natural o no, capaz de fomentar la función del receptor APJ. Los ejemplos de los agonistas del receptor APJ de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos, anticuerpos, aptámeros y moléculas orgánicas pequeñas. Las actividades agonistas de un compuesto de prueba frente al receptor APJ pueden determinarse mediante cualquier método bien conocido en la técnica. Por ejemplo, dado que el agonista de la presente divulgación puede fomentar la función del receptor APJ, el agonista puede seleccionarse usando el agonista natural del receptor APJ (es decir, apelina) y su receptor. Normalmente, el agonista de la presente divulgación puede obtenerse usando el método de selección de la sustancia que fomenta la función del receptor APJ, que comprende comparar (i) el caso en el que la apelina se pone en contacto con el receptor APJ y (ii) el caso en el que un compuesto de prueba se pone en contacto con el receptor APJ. En el método de selección de la presente divulgación, por ejemplo, (a) se miden las cantidades de unión de apelina al receptor APJ (i) cuando la apelina se pone en contacto con el receptor APJ y (ii) cuando la apelina y un compuesto de prueba se ponen en contacto con el receptor APJ; y se comparan los resultados; o (b) se miden actividades de estimulación celular (por ejemplo, las actividades que fomentan la liberación de ácido araquidónico, la liberación de acetilcolina, la liberación de Ca^{2+} intracelular, la producción de AMPc intracelular, la producción de GMPc intracelular, la producción de fosfato de inositol, cambios en el potencial de la membrana celular, la fosforilación de proteínas intracelulares, la activación de c-fos, cambios de pH, etc.) mediados por el receptor APJ (i) cuando la apelina se pone en contacto con el receptor APJ y (ii) cuando un compuesto de prueba se pone en contacto con el receptor APJ; y se comparan los resultados. Normalmente, los compuestos de prueba que proporcionan un mayor fomento o al menos el mismo fomento del receptor APJ que la apelina se seleccionan luego como agonistas del receptor APJ. Los ejemplos específicos del método de selección de la presente divulgación incluyen: (1) un método de selección de la sustancia que fomenta la función del receptor APJ, que comprende medir las cantidades de unión de apelina marcada al receptor APJ cuando la apelina marcada se pone en contacto con el receptor APJ y cuando la apelina marcada y un compuesto de prueba se ponen en contacto con el receptor APJ; y comparar las cantidades; (2) un método de selección de la sustancia que fomenta la función del receptor APJ, que comprende medir las cantidades de unión de apelina marcada a una célula que contiene el receptor APJ o una fracción de membrana de la célula, cuando la apelina marcada se pone en contacto con la célula o fracción de membrana y cuando la apelina marcada y un compuesto de prueba se ponen en contacto con la célula o fracción de membrana, y comparar las cantidades de unión; y (3) un método de selección de la sustancia que fomenta la función del receptor APJ, que comprende medir las cantidades de unión de apelina marcada al receptor APJ expresado en una membrana celular mediante el cultivo de un transformante que tiene un ADN que codifica para el receptor APJ, cuando la apelina marcada se pone en contacto con el receptor APJ y cuando la apelina marcada y un compuesto de prueba se ponen en contacto con el receptor APJ, y se comparan las cantidades de unión. En esos ejemplos, los compuestos de prueba que proporcionan una mayor unión o al menos la misma unión que la apelina se seleccionan luego como agonistas del receptor APJ. Específicamente, un método para determinar si un compuesto es un agonista del receptor APJ se describe en Iturrioz X. *et al.* (Iturrioz X, Alvear-Perez R, De Mota N, Franchet C, Guillier F, Leroux V, Dabire H, Le Jouan M, Chabane H, Gerbier R, Bonnet D, Berdeaux A, Maigret B, Galzi JL, Hibert M, Llorens-Cortes C. Identification and

pharmacological properties of E339-3D6, the first nonpeptidic apelin receptor agonist. FASEB J. mayo de 2010;24(5):1506-17. Epub del 29 de diciembre de 2009). La publicación de solicitud de patente estadounidense n.º US 2005/0112701 también describió un sistema de prueba para la identificación de un ligando para el receptor de angiotensina tipo 1 (receptor APJ) que comprende un receptor APJ. Otro método también se describe en la publicación de patente de estadounidense US 6.492.324.

En particular, el agonista del receptor APJ es una molécula orgánica pequeña. El término "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula de un tamaño comparable a las moléculas orgánicas generalmente usadas en productos farmacéuticos. El término excluye macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Las moléculas orgánicas pequeñas preferidas varían en tamaño hasta aproximadamente 5000 Da, más preferiblemente hasta 2000 Da y lo más preferiblemente hasta aproximadamente 1000 Da. Los ejemplos de moléculas orgánicas pequeñas que son agonistas del receptor APJ incluyen las descritas en la publicación de solicitud de patente europea n.º EP19030052 y en Iturrioz X. et al. (Iturrioz X, Alvear-Perez R, De Mota N, Franchet C, Guillier F, Leroux V, Dabire H, Le Jouan M, Chabane H, Gerbier R, Bonnet D, Berdeaux A, Maigret B, Galzi JL, Hibert M, Llorens-Cortes C. Identification and pharmacological properties of E339-3D6, the first nonpeptidic apelin receptor agonist. FASEB J. mayo de 2010;24(5):1506-17. Epub del 29 de diciembre de 2009). Normalmente, una molécula orgánica pequeña que es un agonista del receptor APJ tiene la fórmula general (I):



20

en la que:

25 R1 es un grupo arilo, alquilarilo, heteroarilo o alquiheteroarilo

R2 es un átomo de hidrógeno o un grupo arilo

30 R3 y R4 representan un átomo de hidrógeno o un grupo heterocicloalquilo siempre que R3 y R4 no puedan representar simultáneamente un hidrógeno y que R3 y R4 puedan formar parte de un grupo heterocicloalquilo

35 R5 representa un grupo seleccionado del grupo que consiste en boc, fmoc, rojo Texas, azul patente V, lisamina y rodamina 101

n es un número entero desde 0 hasta 1

40 Y representa el grupo -CO-(NH)^{n'}-A-NH-:

siendo n' un número entero desde 0 hasta 1

45 siendo A un grupo seleccionado del grupo que consiste en:

-(CH₂)^{n''}-

45 -[(CH₂)₂-O]^{n'''}-(CH₂)₂-

-(CH₂)^m-NH-CO-(CH₂)^{m'}-

-(CH₂)^m-NH-CO-(CH₂)^{m'}-NH-CO-(CH₂)^{m''}-

50 -(CH₂)^m-CO-NH-(CH₂)^{m'}-

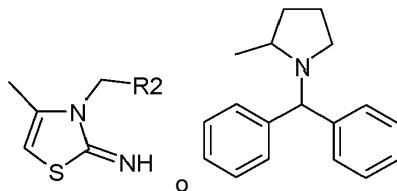
-(CH₂)^m-CO-NH-(CH₂)^{m'}-CO-NH-(CH₂)^{m''}-

representando n'' un número entero desde 1 hasta 20

representando n" un número entero desde 1 hasta 10

representando m, m' y m" independientemente entre sí un número entero desde 1 hasta 15

5 X representa un grupo elegido de la siguiente lista:

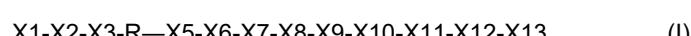


10 En particular, el agonista del receptor APJ consiste en un anticuerpo (el término incluye "porción de anticuerpo"). Tal como se usa en el presente documento, "anticuerpo" incluye tanto anticuerpos que se producen de manera natural como anticuerpos que no se producen de manera natural. Específicamente, "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, y fragmentos monovalentes y divalentes de los mismos. Además, "anticuerpo" incluye anticuerpos químicos, anticuerpos totalmente sintéticos, anticuerpos monocatenarios y fragmentos de los mismos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano o no humano. Un anticuerpo no humano puede humanizarse mediante métodos recombinantes para reducir su inmunogenicidad en seres humanos. Los anticuerpos se preparan según la metodología convencional. Los anticuerpos monoclonales pueden generarse usando el método de Kohler y Milstein (Nature, 256:495, 1975). En particular, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Tal como se usa en el presente documento, "humanizado" describe anticuerpos en los que algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de las regiones CDR se reemplazan por aminoácidos correspondientes derivados de moléculas de inmunoglobulina humana. Los métodos de humanización incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 4.816.567, 5.225.539, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 5.859.205. Las anteriores patentes estadounidenses n.ºs 5.585.089 y 5.693.761 y el documento WO 90/07861 también proponen cuatro posibles criterios que pueden usarse en el diseño de los anticuerpos humanizados. En particular, el anticuerpo es un anticuerpo humano. También pueden prepararse anticuerpos monoclonales totalmente humanos inmunizando ratones transgénicos para grandes porciones de locus de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina humana. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.591.669, 5.598.369, 5.545.806, 5.545.807, 6.150.584 y las referencias citadas en las mismas. También existen métodos *in vitro* para producir anticuerpos humanos. Estos incluyen la tecnología de visualización en fagos (patentes estadounidenses n.ºs 5.565.332 y 5.573.905) y estimulación *in vitro* de células B humanas (patentes estadounidenses n.ºs 5.229.275 y 5.567.610). En particular, el anticuerpo es un anticuerpo de dominio único. El término "anticuerpo de dominio único" (sdAb) o "VHH" se refiere al dominio variable de cadena pesada único de anticuerpos del tipo que puede encontrarse en mamíferos camélidos que carecen naturalmente de cadenas ligeras. Tales VHH también se denominan "Nanobody®". Según la divulgación, el sdAb puede ser particularmente sdAb de llama.

35 En particular, el agonista del receptor APJ es un aptámero. Los aptámeros son una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en cuanto a reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos con la capacidad de reconocer prácticamente cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Tales ligandos pueden aislarse a través de evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias aleatorias. La biblioteca de secuencias aleatorias puede obtenerse mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado químicamente, de una secuencia única.

45 En particular, el agonista del receptor APJ consiste en un polipéptido. En particular, el polipéptido es un polipéptido de apelina. Las secuencias de polipéptidos y ácidos nucleicos de apelina para codificar para tales proteínas son bien conocidas por los expertos en la técnica. Según la divulgación, el término polipéptido de "apelina" se refiere a cualquier polipéptido que comprende el fragmento C-terminal de apelina-13. Por consiguiente, el término abarca la propia apelina o fragmentos de la misma que comprenden los fragmentos de apelina-17 o apelina-36. Otros polipéptidos que pueden usarse como agonistas del receptor APJ incluyen los descritos en los documentos US6.492.324, US7.635.751, US2010221255, US2008182779, WO2013111110, WO2014081702, WO2014099984, WO201501316, WO2015013168 y WO2015013169.

55 En particular, el polipéptido tiene la siguiente fórmula:



en la que:

60 X1 es el extremo N-terminal del polipéptido y o bien está ausente o bien es pE;

- 5 X2 es R o r;
- 5 X3 es P o 4-PhP;
- 5 X5 es L, Cha, D-L, F, Y, Y(Bzl), 3,4-Cl₂-F o Nal;
- 10 X6 es un D-aminoácido, S o A;
- 10 X7 es un D-aminoácido, L, H o Aib; y al menos uno de X6 y X7 es un D-aminoácido o Aib;
- 10 X8 es K, k, Q o E;
- 15 X9 es G o D;
- 15 X10 es P o ácido pipecólico;
- 15 X11 es D-Nle, Nle o D-Nva;
- 20 X12 está ausente, es P o un D-aminoácido;
- 20 X13 es el extremo C-terminal y está ausente, es F o un D-aminoácido; y al menos uno de X11, X12 y X13 es un D-aminoácido;
- 25 en los que:
- 25 Nle es L-norleucina;
- 30 D-Nle es D-norleucina;
- 30 Nal es L-naftilalanina;
- 30 D-Nva es D-norvalina;
- 35 Aib es ácido α -aminoisobutírico;
- 35 Cha es (S)- β -ciclohexilalanina;
- 40 D-Tic es ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico;
- 40 pE es ácido L-piroglutámico;
- 45 3,4-Cl₂-F es (S)-3,4-diclorofenilalanina;
- 45 Y es L-tirosina; y
- 45 Y(Bzl) es L-bencil-tirosina;
- 50 o una amida, un éster o una sal del polipéptido.
- 50 En particular, el polipéptido tiene la siguiente fórmula:
- X1-R-X3-R-L-X6-X7-K-X9-P-X11-X12-X13 (II)
- 55 en la que
- 55 X1 es el extremo N-terminal del polipéptido y está ausente o se selecciona de Q, A y pE;
- 60 X3 es P o X3 se selecciona de C, c, hC y D-hC; en el que la cadena lateral de C, c, hC o D-hC forma un enlace disulfuro con la cadena lateral de X6;
- 60 X6 se selecciona de C, c, hC y D-hC, en el que la cadena lateral de C, c, hC o D-hC forma un enlace disulfuro con la cadena lateral de C, c, hC o D-hC de X3, X9 y X13;
- 65 X7 es H o Aib;

X9 es G o X9 se selecciona de C, c, hC y D-hC, en el que la cadena lateral de C, c, hC o D-hC forma un enlace disulfuro con la cadena lateral de X6;

5 X11 es D-Nle, Nle, M o f;

X12 está ausente o es P, f o a;

10 X13 está ausente, es F, f, a, y o Nal o X13 se selecciona de C, c, hC y D-hC, en el que la cadena lateral de C, c, hC o D-hC forma un enlace disulfuro con la cadena lateral de X6;

10 y en la que sólo uno de X3, X9 y X13 se selecciona de C, c, hC y D-hC;

15 Nle es L-norleucina;

15 D-Nle es D-norleucina;

D-hC es D-homocisteína

20 hC es L-homocisteína;

20 Nal es L-naftalina;

25 Aib es ácido 2-aminoisobutírico;

25 pE es ácido L-piroglutámico;

o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

30 Según la divulgación, los polipéptidos se producen mediante cualquier método convencional de síntesis de péptidos automatizado o mediante expresión recombinante. Los principios generales para diseñar y fabricar proteínas son bien conocidos por los expertos en la técnica.

35 En particular, se contempla que el polipéptido de apelina está modificado para mejorar la eficacia terapéutica. Tal(es) modificación/modificaciones de los compuestos terapéuticos puede(n) usarse para disminuir la toxicidad, aumentar el tiempo de circulación o modificar la biodistribución. Por ejemplo, la toxicidad de compuestos terapéuticos potencialmente importantes puede disminuirse significativamente mediante la combinación con una variedad de vehículos portadores de fármacos que modifican la biodistribución. Por ejemplo, el polietilenglicol (PEG) se ha usado ampliamente como portador de fármacos, dado su alto grado de biocompatibilidad y facilidad de modificación. Se ha demostrado que la unión a diversos fármacos, proteínas y liposomas mejora el tiempo de residencia y disminuye la toxicidad. El PEG puede acoplarse a agentes activos a través de los grupos hidroxilo en los extremos de la cadena y mediante otros métodos químicos; sin embargo, el propio PEG está limitado como máximo a dos agentes activos por molécula.

40 Según la invención, el agonista del receptor APJ es apelina.

45 Según la divulgación, el agonista del receptor APJ de la presente divulgación se administra al sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz. Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad suficiente del principio activo para tratar la enfermedad con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Se entenderá que el uso diario total de los compuestos y las composiciones de la presente divulgación lo decidirá el médico tratante dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel específico de dosis terapéuticamente eficaz para cualquier sujeto particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que está tratándose y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto; el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación con los principios activos; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, está bien dentro de la habilidad en la técnica comenzar las dosis del compuesto a niveles más bajos que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos puede variar en un amplio intervalo de desde 0,01 hasta 1000 mg por adulto al día.

50 Normalmente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del principio activo para el ajuste sintomático de la dosificación al sujeto que va a tratarse. Un medicamento contiene normalmente de desde aproximadamente 0,01 mg hasta aproximadamente 500 mg del principio activo, normalmente desde 1 mg hasta aproximadamente 100 mg del principio activo. Una cantidad eficaz del fármaco normalmente se administra a un nivel de dosificación de desde 0,0002 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal al día, especialmente desde aproximadamente 0,001 mg/kg hasta 7 mg/kg de peso corporal al día.

Normalmente, el agonista del receptor APJ de la presente divulgación se combina con excipientes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones farmacéuticas. El término "farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y a composiciones que no producen reacciones adversas, alérgicas u otras reacciones no deseadas cuando se administran a un mamífero, especialmente a un ser humano, según corresponda. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga, un diluyente, un material de encapsulación o un auxiliar de formulación sólido, semisólido o líquido no tóxico de cualquier tipo. El portador también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sóblico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. En las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación, los principios activos de la divulgación pueden administrarse en forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales. Las formas de administración unitaria adecuadas comprenden formas de administración por vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gelatina, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y formas de administración rectal.

La divulgación se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y los ejemplos.

Figuras

La figura 1 muestra que el dolor y la nocicepción medidos por las técnicas de Von Frey o Hargreave disminuyen significativamente mediante el tratamiento con apelina, tal como se muestra respectivamente en las figuras 1a y 1b.

La figura 2 muestra que el tratamiento diario con apelina aumenta la congelación experimentada en ratones.

La figura 3 muestra que el tratamiento con apelina disminuyó la expresión del ARNm de TNFa en el hematoma y la expresión del ARNm de IL-6 en el hipocampo en ratones con fracturas.

Figura 4: porcentaje de congelación en ratones de edad avanzada. Se realizaron fracturas a ratones C57Bl6/j macho de veinte meses de edad con (fractura de apelina) o sin (fractura de PBS) un tratamiento por vía i.p de apelina (0,5 nmol/kg) antes de y durante 3 días después de la fractura. Despues de 3 días, se analizó la memoria hipocámpica del animal mediante la prueba de condicionamiento del miedo. N=de 6 a 10, * p<0,05 en comparación con el control.

Figura 5: variación de apelina plasmática antes y después de una cirugía de reemplazo de cadera programada. Se extrajo sangre de los pacientes 24 h antes de la cirugía (J-1) o 24 h o 6 días después (J+1 y J+6). La apelina plasmática se midió mediante una prueba de ELISA comercial. En este estudio, los pacientes tienen 60 años o más.

EJEMPLO 1:

Material y métodos

Cirugía

Todos los ratones se anestesiaron con sevoflurano al 2-3%. La anestesia adecuada se comprobó por la ausencia del reflejo de retirada pedal después de pellizcar con fuerza el dedo de la pata. La fractura tibial cerrada se realizó tal como se describió previamente (Minville *et al* 2008). Brevemente, después de la preparación antiséptica de la pata derecha con povidona-yodo, se produjo una fractura cerrada unilateral en la tibia derecha usando un aparato de fracturas especialmente diseñado (guillotina romana). Para la colocación de clavos intramedulares usando una técnica estéril, se realizó percutáneamente un orificio por encima de la tuberosidad tibial con una aguja de 27 G (BD Microlance - 27G ¾ L 19 mm). Luego, la aguja se dirigió directamente al canal medular. Girando la aguja, se escarió el canal hasta 5 mm hasta la articulación del tobillo. El extremo de la aguja se cortó lo más corto posible para que la piel pudiera enrollarse y cubrirlo. No se realizó sutura. Luego se colocó el ratón con la pata sobre el yunque para alinear la guillotina romana con el tercio proximal de la tibia. Se hizo caer un peso de 300 g desde una altura de 9 a 10 cm, fracturándose la diáfisis de la tibia. No se produjo ninguna

respuesta de movimiento a la lesión en estas condiciones.

Administración de fármacos

- 5 La administración de apelina (vía i.p., 0,5 umol/kg, Bachem) se ha realizado 1 hora antes de la fractura y diariamente durante los 15 días consecutivos. Se inyectó el mismo volumen de PBS en ratones de control.

Pruebas de comportamiento

10 Nocicepción mecánica

Los animales se colocaron en jaulas equipadas con un suelo elevado de alambre para la aplicación de filamentos de Von Frey a la pata trasera lesionada. Se observó un periodo de habituación de 15 min. Luego se aplicaron filamentos de Von Frey de tamaño creciente al arco plantar de la pata lesionada, para observar una respuesta al dolor característica (retirada de la pata, triple flexión, lamido de la pata, una asociación de estas diferentes respuestas). Cada filamento se aplicó para doblarse ligeramente durante un periodo de 6 segundos, comenzando con 0,6 g y aumentando hasta la respuesta positiva. La prueba se repitió 3 veces, dejando un periodo de descanso de 5 minutos entre cada prueba. El valor del filamento más bajo aplicado que provocó una respuesta positiva se consideró como el umbral de la nocicepción mecánica. La prueba se repitió los días 1, 5 y 15 después de la fractura.

Nocicepción térmica

25 La nocicepción térmica se evaluó mediante el método de Hargreave. Los animales se colocaron en jaulas individuales provistas de una ventana transparente para permitir la aplicación del estímulo del haz de luz (4×6 mm con la intensidad de la luz que previamente se fijó al 40% de intensidad máxima, para que produzca un calor de 52°C). El haz de luz se aplicó en la pata trasera. Se observó un periodo de habituación de 15 min. Luego se midió la latencia (en segundos) entre el inicio de la aplicación del haz y la respuesta al dolor. Para evitar daños a los tejidos, la estimulación térmica no superó los 20 s. La prueba se repitió 3 veces, respetando un periodo de descanso de 5 min. La latencia más corta registrada se consideró como el umbral para la nocicepción térmica. La prueba se repitió los días 1, 5 y 15 después de la fractura.

Condicionamiento del miedo

35 Para evaluar la memoria a largo plazo y las habilidades de aprendizaje, se usó una prueba de aptitud para el miedo (prueba de condicionamiento del miedo).

40 Durante la sesión de aprendizaje, esta prueba combina un acontecimiento doloroso y angustiante (2 descargas eléctricas cortas de 0,3 mA durante 2 s en las patas) en un contexto ambiental (jaula de piso con rejillas metálicas, lavada varias veces al día con una disolución alcohólica), visual (paredes compuestas de rayas blancas y negras, y patrones de luz blanca en las paredes de la sala) y sonoro (cada descarga es precedida por un sonido de 80 dB durante 20 segundos). La fase de aprendizaje duró 4 minutos y 25 segundos.

45 En el contexto de las sesiones de prueba, realizadas en el tercer día posoperatorio, el animal se reintrodujo en la misma jaula durante 4 minutos. El contexto era el mismo pero sin estimulación sonora ni estímulo doloroso. Si el animal lograba memorizar el hecho de que este contexto está asociado a un acontecimiento doloroso, incurría en una conducta de miedo, congelación, definida como inmovilidad total excepto para los movimientos respiratorios. Un operario que desconocía el trato recibido por cada animal evaluó el tiempo de congelación de cada animal. El enmascaramiento se retiró al final de todas las manipulaciones. Esta dura prueba requiere un correcto funcionamiento del hipocampo, pero también de la amígdala y la corteza. Esta prueba se ha usado para diagnosticar el deterioro cognitivo posoperatorio en modelos animales en varias publicaciones. La prueba se realizó el día 3 después de la fractura.

Recogida de tejidos

55 72 horas después de la fractura, los ratones fueron sacrificados mediante sección carotídea rápida y decapitación. El hipocampo y el hematoma se recogieron rápidamente y se ultracongelaron. Se extrajo sangre durante la sección carotídea, se centrifugó y se ultracongeló el plasma.

60 *Expresión de ARNm de citocinas proinflamatorias*

Los niveles de ARNm de IL-6 y TNFa se midieron mediante la técnica de RT-PCR (véase Dray *et al.* Cell metabolism 2008).

Resultados

El dolor se reduce mediante el tratamiento con apelina.

El dolor y la nocicepción medidos por las técnicas de Von Frey o Hargreave disminuyen significativamente mediante el tratamiento con apelina, tal como se muestra respectivamente en las figuras 1a y 1b.

5

El tratamiento diario con apelina aumenta la congelación experimentada en ratones.

Después de la cirugía, los ratones operados desarrollaron deterioro cognitivo (figura 2). De hecho, cuando se sometieron a prueba en el contexto realizado al tercer día después de la cirugía, los animales operados mostraron una tasa de congelación estadísticamente inferior a la de los animales no operados. Estas manipulaciones han validado una vez más el modelo animal desarrollado por el presente equipo. Los ratones operados que recibieron una inyección diaria de apelina tuvieron una tasa de congelación mayor en comparación con los ratones operados que recibieron inyecciones de solución salina (figura 2). Los ratones no operados tratados con apelina no mostraron cambios en su tasa de congelación.

10

Estado inflamatorio:

El tratamiento con apelina disminuyó la expresión del ARNm de TNFa en el hematoma y del ARNm de IL-6 en el hipocampo en ratones con fracturas. Los ratones con fracturas tratados con apelina presentaron una fuerte disminución de la citocina proinflamatoria TNFa en el hematoma (figura 3a). Asociado a esta disminución, el tratamiento con apelina puede evitar el aumento de IL-6 en el hipocampo de ratones con fracturas (figura 3b).

EJEMPLO 2:

25 Material y métodos

Véase la sección de material y métodos del ejemplo 1.

Resultados

30

La figura 4 muestra que, a pesar de su edad (20 meses), los animales tratados con apelina siguen siendo sensibles al péptido ya que no presentan fallo de memoria hipocámpica después de la fractura. Por otro lado, los animales tratados con PBS muestran una disminución de la congelación en comparación con animales de 3 meses.

35

EJEMPLO 3:

Material y métodos

40 Los pacientes tienen 60 años y mayores, siendo el 56% hombres. No presentan patologías significativas (cáncer, insuficiencia cardíaca...) asociadas a un posible tratamiento. Estos pacientes son programados para cirugía con miras a un reemplazo de cadera.

Resultados

45

La figura 5 muestra una variación de apelina plasmática en respuesta a la cirugía con una disminución de apelina 24 horas después de la cirugía y una normalización de las cantidades de apelina en sangre después de 6 días.

REIVINDICACIONES

1. Apelina para su uso en un método de tratamiento de la disfunción cognitiva posoperatoria (DCPO) en un sujeto que lo necesita.
5
2. Apelina para su uso según la reivindicación 1, en la que se determina que el sujeto tiene riesgo de disfunción cognitiva posoperatoria.
3. Apelina para su uso según la reivindicación 1, en la que al sujeto se le diagnostica o se indica que tiene una alteración en la capacidad intelectual.
10
4. Apelina para su uso según la reivindicación 1, en la que la apelina se administra de manera perioperatoria; es decir, antes de, durante y/o después de la cirugía, y después del alta hospitalaria.
5. Apelina para su uso según la reivindicación 1, en la que la disfunción cognitiva posoperatoria es deterioro cognitivo experimentado después de la cirugía incluyendo cirugía abdominal, cirugía *ex situ*, cirugía cardiaca, cirugía cerebral, cirugía cineplástica, cirugía cosmética, cirugía dentofacial, cirugía neurológica, cirugía bucal, cirugía ortopédica, cirugía pélvica, cirugía plástica, cirugía rectal, cirugía urológica, cirugía vascular y cirugía relacionada con otorrinolaringología.
15
6. Apelina para su uso según la reivindicación 1, en la que la apelina se administra de manera concomitante o secuencial con un anestésico al sujeto.
20
7. Apelina para su uso según la reivindicación 6, en la que el anestésico se selecciona del grupo que consiste en dietil éter, metoxipropano, vinil éter, éteres halogenados, por ejemplo, desflurano, enflurano, halotano, isoflurano, metoxiflurano; haloalcanos, tales como cloroformo, tricloroetileno, ciclopropano, etileno, óxido nitroso, sevoflurano, xenón, isoflurano deuterado, hexafluoro-t-butil-difluorometil éter y análogos deuterados de metoxiflurano, sevoflurano deuterado.
25

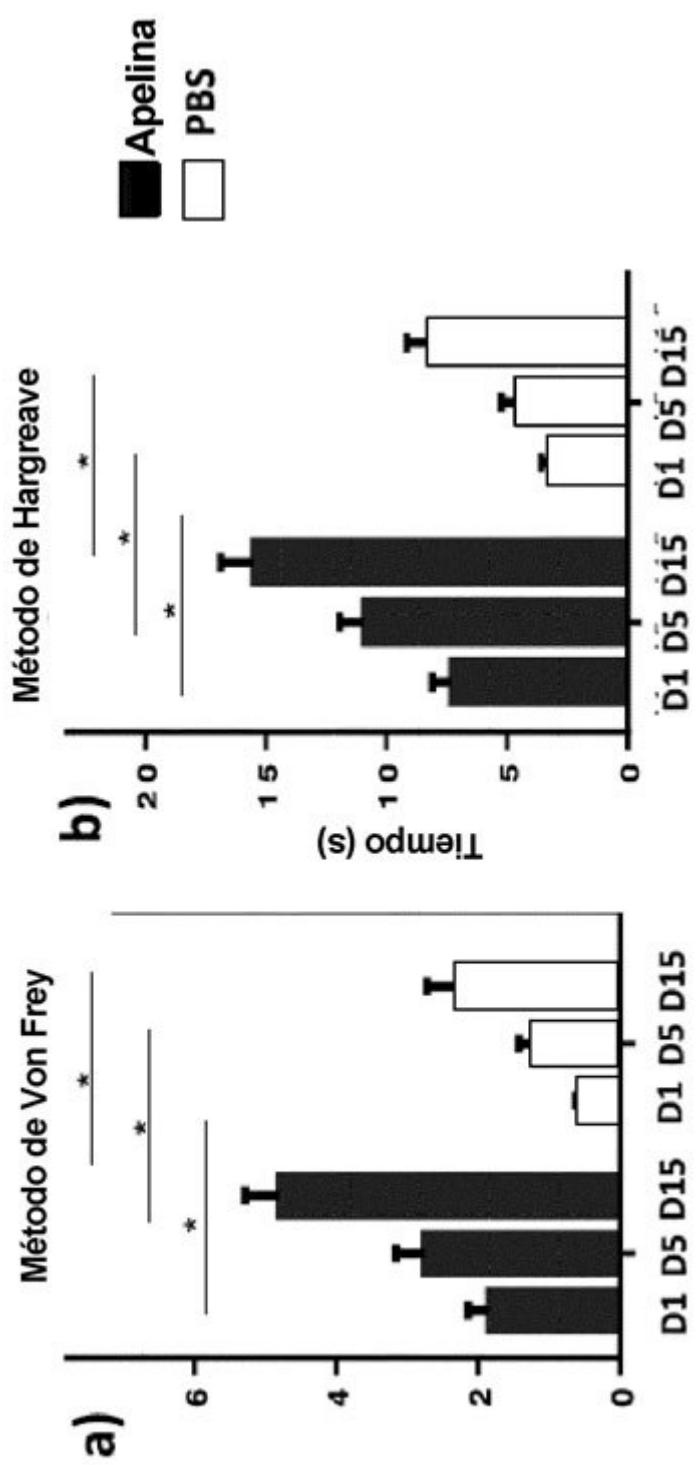


Figura 1

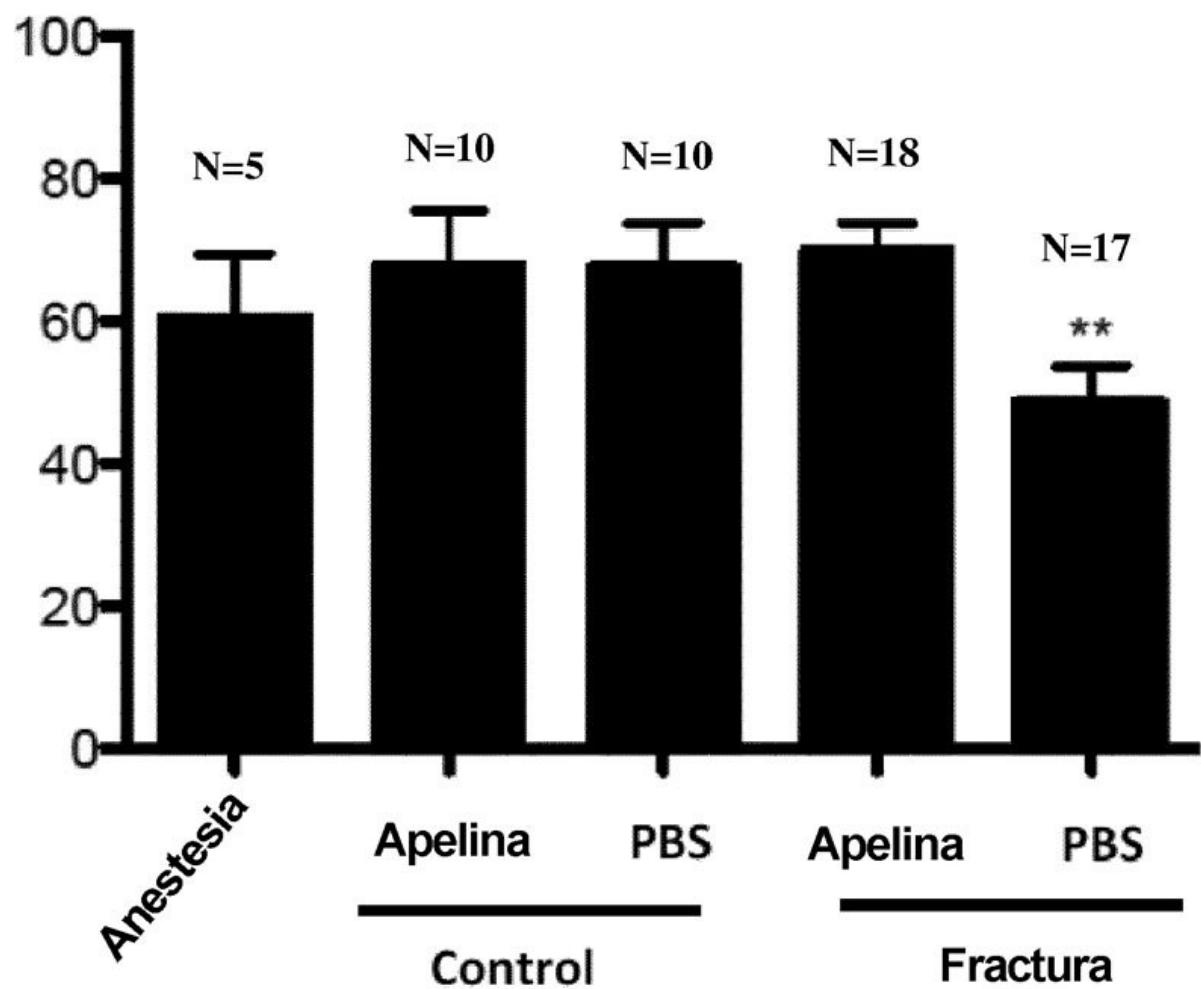


Figura 2

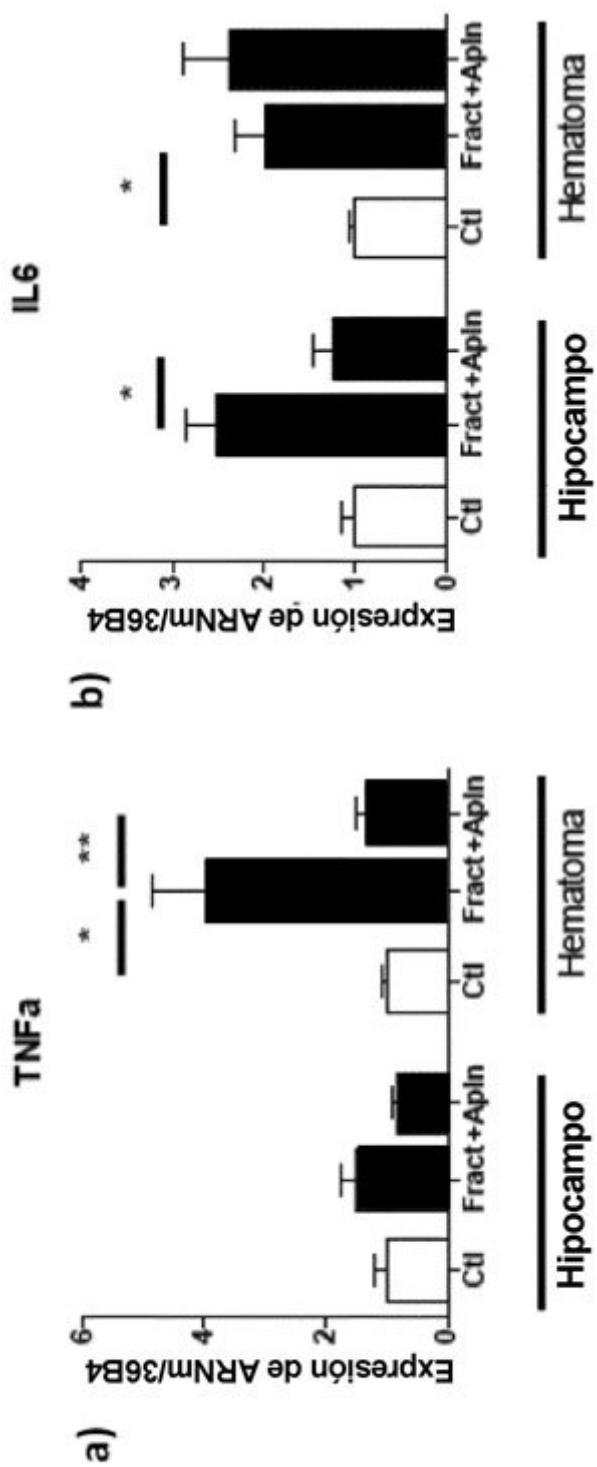


Figura 3

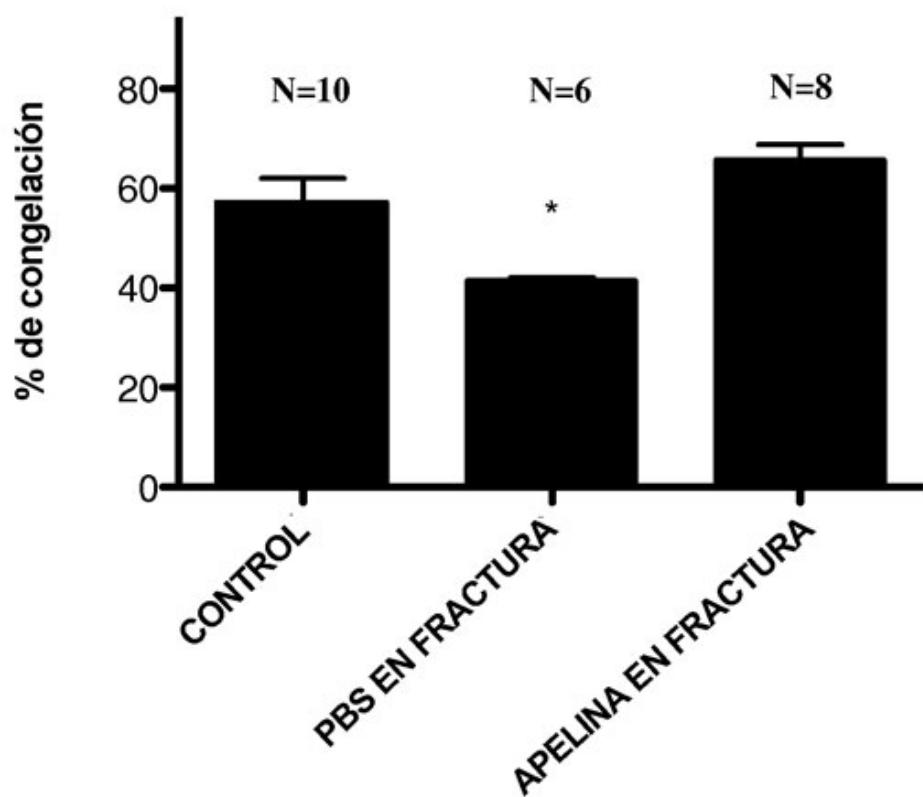


Figura 4

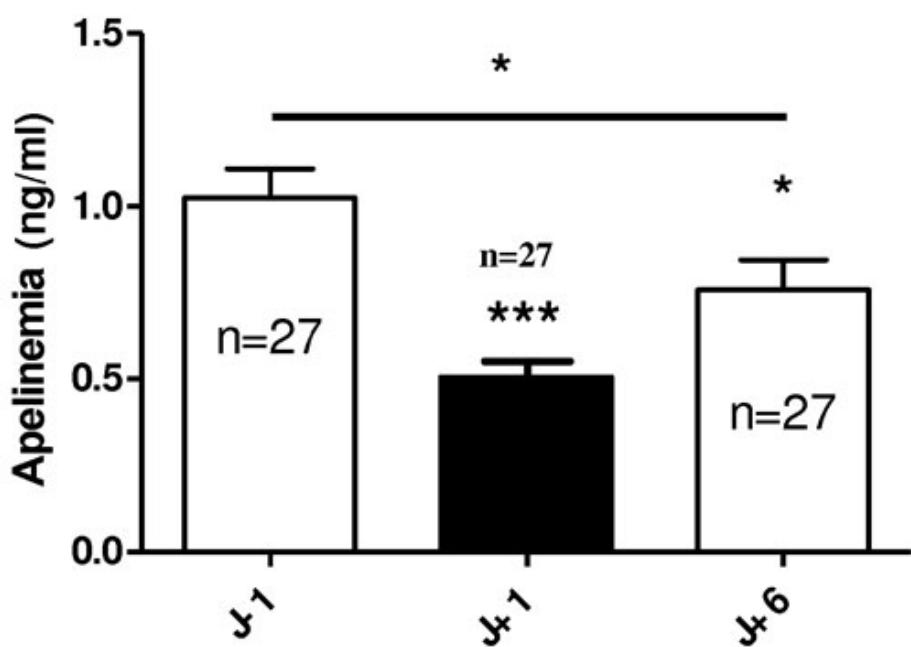


Figura 5