



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 351 492**

⑫ Número de solicitud: 200930223

⑤① Int. Cl.:
C07K 14/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫② Fecha de presentación: **28.05.2009**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **07.02.2011**

⑫③ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
07.02.2011

⑦① Solicitante/s: **Universidad de Málaga**
c/ Severo Ochoa, 4 (PTA)
29590 Campanillas, Málaga, ES

⑦② Inventor/es: **Zafaruddin, Khan**

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Uso de la proteína RGS-14 para potenciar la memoria.**

⑤⑦ Resumen:

Uso de la proteína RGS-14 para potenciar la memoria.
La administración de la proteína RGS-14, también conocida como regulador de la proteína-G señalizadora 14, en cerebro provoca un incremento de la memoria en el reconocimiento de objetos en ratones. Así, la proteína RGS-14 es útil para la fabricación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o preventivo de desórdenes de la memoria en un mamífero así como de enfermedades asociadas a estos desórdenes, tales como enfermedades neurológicas, enfermedades neurodegenerativas, desórdenes del desarrollo o el envejecimiento.

ES 2 351 492 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de la proteína RGS-14 para potenciar la memoria.

5 Sector de la técnica

La invención está relacionada con el campo de la medicina, en particular con la neurología, y especialmente con un compuesto de naturaleza proteica para la fabricación de medicamentos para el tratamiento terapéutico y/o preventivo de desórdenes cognitivos y de la memoria.

Estado de la técnica

La memoria es la función cerebral resultado de las conexiones sinápticas entre neuronas mediante la cual el ser humano puede registrar, codificar, consolidar, almacenar, recuperar y evocar información y experiencias pasadas. Esta información pasada, según el alcance temporal con el que se corresponda, se clasifica convencionalmente, en memoria a corto plazo (consecuencia de la simple excitación de la sinapsis para reforzarla o sensibilizarla transitoriamente) y memoria a largo plazo (consecuencia de un reforzamiento permanente de la sinapsis gracias a la activación de ciertos genes y a la síntesis de las proteínas correspondientes).

La memoria a corto plazo es el lugar donde se almacena la información nueva; es un proceso de retención y almacenamiento con capacidad y duración de varios segundos. Supone el uso de la información (verbal o visual) durante un breve periodo de tiempo (20 ó 30 segundos) y esta información sólo se consolida si se transfiere a la memoria a largo plazo. La memoria a corto plazo y la memoria de trabajo (operativa) son términos que se solapan en ciertos aspectos. La memoria de trabajo es la capacidad para retener la información al mismo tiempo que se trabaja con ella.

La memoria a largo plazo es un almacén al que se hace referencia cuando comúnmente hablamos de memoria en general. Es en donde se almacenan recuerdos vividos, conocimiento acerca del mundo, imágenes, conceptos, estrategias de actuación, etc. Dispone de capacidad desconocida y contiene información de distinta naturaleza. Se considera como la base de datos en la que se inserta la información a través de la memoria operativa, para poder posteriormente hacer uso de ella.

Los desórdenes de la memoria pueden manifestarse por la incapacidad de aprender nueva información y/o por la incapacidad de recordar información aprendida anteriormente. La pérdida de memoria es el primer síntoma de la demencia y puede ser también un síntoma que se pone de manifiesto en distintas enfermedades neurológicas, psiquiátricas y neurodegenerativas, en desórdenes del desarrollo y también durante el envejecimiento. El número de pacientes con desórdenes de memoria se ha incrementado significativamente en las últimas décadas y el elevado coste del tratamiento y el deterioro de la calidad de vida se han convertido en un enorme problema social. La población anciana es otro frente en el que este desorden aparece como el principal factor que afecta a su calidad de vida y los hace más dependientes. La revista Medical Reports estima que, hacia el 2015, el número de estos pacientes se duplicará debido al incremento de la población anciana.

Los fallos en la memoria pueden surgir a cualquier edad, pero son más frecuentes medida que el sujeto avanza en edad. En torno a los 65 años de edad, un gran número de personas comienza a presentar problemas de memoria, y no les da importancia pensando que son consecuencia inevitable del proceso natural de envejecimiento. Pero a veces pueden ser los primeros avisos de patologías serias como la depresión, la enfermedad de Alzheimer u otros tipos de demencia. En el Deterioro Cognitivo Ligerero (DCL), los fallos de memoria se sitúan entre lo que podríamos llamar normal para una persona mayor y una demencia (p. ej. enfermedad de Alzheimer). Estudios recientes calculan que un 20% de personas mayores de 75 años sufren DCL. Un 15% de los pacientes con DCL se convertirán en demencias transcurrido un año desde el diagnóstico de DCL y este porcentaje se incrementa a un 50% a los 5 años.

Algunos de los tratamientos aprobados para la pérdida de memoria son la tacrina, el hidrocloreto de donepecilo, la galantamina, y la rivastigmina, que actúan inhibiendo la colinesterasa. Otros agentes potencialmente útiles incluyen los antagonistas del receptor NMDA como la memantina, antagonistas del receptor muscarínico MI, estatinas como la lovastatina o la pravastatina, el aripipazol, la fenserina, o la risperidona. Además, se administra la fluoxetina para la depresión, el trastorno obsesivo-compulsivo y la bulimia nerviosa. El clorhidrato de metilfenidato se prescribe en el tratamiento de la narcolepsia, la depresión en los ancianos, la demencia senil, Alzheimer, la fibromialgia, el síndrome de la fatiga crónica, la impaciencia de los miembros, dolores secundarios en los cánceres, síncope, traumatismos craneales, shocks post-anestésicos y en la hiperactividad infantil con o sin déficit de atención. Sin embargo, no existe un tratamiento que sea específico contra la pérdida de memoria y que además no tenga efectos secundarios.

Por lo tanto, es deseable proporcionar nuevos métodos y productos para la Prevención y el tratamiento de la pérdida de la memoria y de las enfermedades asociadas a ella.

Descripción detallada de la invención

Los inventores han encontrado que la administración de la proteína RGS-14, también conocida como regulador de la proteína-G señalizadora 14, en cerebro provoca un incremento de la memoria en el reconocimiento de objetos en ratones. Los resultados que se indican más adelante, demuestran que la proteína RGS-14 es útil para tratar o prevenir desórdenes cognitivos y de la memoria en un mamífero, incluido el hombre.

Los inventores han utilizado el test de memoria de reconocimiento de objetos (ORM) para ensayar el aprendizaje y memoria en ratones. En estos tests, se presentaron a las ratas dos objetos idénticos durante 3 minutos en un “campo abierto” y tras esto, se analizó por cuánto tiempo podrían retener en la memoria la información de esos objetos. Durante la sesión de prueba de ORM, uno de los dos objetos se sustituía por un nuevo objeto y se medía el tiempo de exploración para ambos objetos. Hay cierta discusión sobre las áreas del cerebro relacionadas con la adquisición y consolidación de la ORM. Algunos estudios recientes argumentan que la ORM es un fenómeno multifásico en el que el córtex perirrinal está involucrado en la familiarización del objeto, mientras que el hipocampo participa tanto en la formación de una relación entre los objetos y las señales espaciales, como en la consolidación de la información adquirida.

A partir de los experimentos, se observa que la sobreexpresión de la proteína RGS-14 en cerebro de ratas promueve la conversión de la memoria a corto plazo para ORM, que normalmente llega hasta 45 minutos, en una memoria a largo plazo, que se mantiene tras varios meses. Por lo tanto, RGS-14 potencia la memoria tanto a corto plazo como a largo plazo. Además, la sobreexpresión de RGS-14 también potencia la memoria espacial en ratas.

Además de en ratas, el efecto de RGS-14 en la memoria también se observó en ratón y en mono. Existe una gran similitud entre especies en cómo se procesa la memoria y en las estructuras cerebrales entre mono y hombre, por lo que los resultados de funcionalidad de RGS-14 en ratón, rata y mono serían extrapolables a la especie humana.

Un aspecto de la invención se refiere al uso de la proteína RGS-14 para la fabricación de un medicamento para potenciar la memoria en un mamífero, incluido un humano. En relación a lo anterior, la invención también se refiere al uso de la proteína RGS-14 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de desórdenes cognitivos y de la memoria en un mamífero, incluido un humano. La invención puede alternativamente formularse como un método para el tratamiento terapéutico y/o preventivo de un mamífero incluyendo el hombre, de desórdenes cognitivos y de la memoria, comprendiendo la administración a dicho mamífero, de una cantidad efectiva de la proteína RGS-14.

La proteína RGS-14 es un miembro de la familia de reguladores de la proteína-G señalizadora. Esta proteína posee un dominio conservado RGS; un dominio GoLoco; un dominio de unión a Rap1/2; y otras regiones con funciones no conocidas. La proteína atenúa la actividad señalizadora de las proteínas-G por su unión, a través de su dominio GoLoco, a tipos específicos de subunidades activadas alfa G unidas a GTP. Actuando como una proteína activadora GTPasa (GAP), la proteína aumenta la tasa de conversión de GTP a GDP. Esta hidrólisis permite que las subunidades alfa G se unan a heterodímeros de subunidades G beta/gamma, formando heterotrímeros de proteína-G inactiva, terminando así la señal. La proteína RGS-14 está asociada con los microtúbulos y se sabe que es un importante factor en la mitosis. Aunque la expresión de la proteína RGS-14 se ha observado en el cerebro adulto (cfr. M.F. López-Aranda *et al* “Localization of the GoLoco motif carrier regulator of G-protein signalling 12 and 14 proteins in monkey and rat brain”, Eur J Neurosci 2006, vol. 23, pp. 2971), se conoce muy poco acerca de su papel en las funciones cerebrales.

En realizaciones particulares de la invención, la memoria es la memoria visual, la memoria espacial, la memoria episódica (pasajera) o la memoria de procesamiento de la información visual. En una realización más particular, la memoria es la memoria visual, que es la memoria relacionada con la información de un objeto, una escena o un evento.

En otra realización particular, la memoria es la memoria espacial, que es la memoria sobre la información de un objeto en un sitio o posición determinados. En otra realización particular, la memoria es la memoria a corto plazo; y en otra realización de la invención la memoria es la memoria a largo plazo.

El concepto de cognición hace referencia a la facultad de los seres de procesar información a partir de la percepción, el conocimiento adquirido y características subjetivas que permiten valorar y considerar ciertos aspectos en detrimento de otros. Los desórdenes cognitivos más claros son la amnesia, la demencia y el delirio. Otros incluyen desórdenes relacionados con la ansiedad como las fobias, el pánico, el trastorno obsesivo-compulsivo, la ansiedad generalizada y el estrés post-traumático. Los desórdenes como la depresión, la esquizofrenia o el trastorno bipolar también son desórdenes cognitivos.

Los desórdenes cognitivos y de la memoria pueden manifestarse por la incapacidad de aprender nueva información y/o por la incapacidad de recordar información aprendida anteriormente. Las alteraciones de la memoria se suelen dividir en aquellas cuantitativas y cualitativas. Entre las alteraciones cuantitativas, la amnesia es la ausencia de recuerdos de un período determinado de la vida. El sujeto suele ser consciente de que son recuerdos que existieron pero que se han perdido. Puede ser parcial o total. La hipomnesia es la disminución de la capacidad de la memoria debido a una dificultad tanto en la fijación como en la evocación. Se observa en personas psiquiátricamente normales con preocupaciones profundas que acaparan la atención, así como en pacientes con neurosis. La hipermnnesia es el aumento o

hiperactividad de la memoria, frecuente en pacientes maníacos o delirantes, pero se presenta en sujetos con entrenamiento especial de la memoria. La dismnesia es una alteración cuantitativa que traduce siempre en una disminución de la memoria, imposibilita evocar un recuerdo en un momento dado y evoca otros en forma borrosa o poco nítida.

5 Las alteraciones cualitativas se agrupan bajo la denominación de paramnesias, es decir, los falsos reconocimientos o recuerdos inexactos que no se ajustan a la realidad. Los principales son el fenómeno de lo ya visto; el fenómeno de lo nunca visto y la ilusión de la memoria.

10 La proteína RGS-14 puede ser administrada a un mamífero, preferiblemente un humano. El propósito de la administración del producto RGS-14 puede ser preventivo (para evitar o retrasar el desarrollo de los desórdenes cognitivos y de la memoria) y/o terapéuticos (para tratar los desórdenes cognitivos y de la memoria o las enfermedades asociadas a ellos una vez se han desarrollado).

15 Los desórdenes cognitivos y de la memoria pueden estar asociados con un gran número de enfermedades neurológicas, neurodegenerativas y con desórdenes del desarrollo. Entre las enfermedades relacionadas encontramos el deterioro cognitivo ligero; la amnesia; demencia; la enfermedad de Alzheimer; demencias vasculares; la demencia relacionada con el SIDA; la enfermedad de Huntington; la hidrocefalia; la depresión; la demencia por cuerpos de Lewis; la enfermedad de Pick; el síndrome de Creutzfeldt-Jakob; la enfermedad de Parkinson; la esclerosis lateral amiotrófica; la degeneración frontotemporal; el infarto o un daño cerebral; el retraso mental; o el síndrome de Down.

20 La RGS-14 puede ser útil en estas enfermedades así como en la pérdida de memoria debida a desórdenes neuropsiquiátricos como la esquizofrenia, la epilepsia, el autismo, el desorden de déficit de atención, la hiperactividad infantil con déficit de atención, enfermedades relacionadas con la ansiedad, desórdenes alimenticios, desórdenes por drogas de abuso, trastornos de personalidad y otras enfermedades mentales.

25 En otra realización particular, los desórdenes cognitivos y de la memoria están asociados al envejecimiento.

La proteína RGS-14 puede ser administrada a un mamífero, preferiblemente un humano, para incrementar la capacidad de su memoria normal.

30 En una realización particular de la invención, la proteína RGS-14 se administra en forma de un ácido nucleico que codifica para la proteína. En los ejemplos, la administración se realiza en la capa 6 del área V2 del cerebro mediante un lentivirus que tiene integrado la secuencia de nucleótidos de RGS-14, que una vez en el cerebro se expresa. Sin embargo, la invención contempla que la administración de la proteína se haga mediante la sobreexpresión de la proteína a partir de su secuencia de nucleótidos así como también manipulando la expresión de la proteína endógena para que aumente su cantidad en el tejido cerebral (mediante gene targeting y terapia celular). También se contemplan otras formas de administración siempre con el fin de aumentar la cantidad de RGS-14 en cerebro, tales como la administración oral o inyección local de la proteína o de la secuencia que la codifica.

40 La secuencia de aminoácidos completa de la proteína RGS-14 es la que se indica en el GenBank con número de acceso AY987041 ó NP_006471.

La invención se relaciona también con el uso de un fragmento de la proteína RGS-14 para potenciar la memoria. Fragmentos que podrían usarse son los que comprenden los dominios RGB, RGS o GoLoco.

45 Se entiende que la proteína RS-14 se administra en una forma farmacéuticamente aceptable. Los expertos en la materia pueden probar la dosis apropiada usando procedimientos estándares. Se entiende que la dosis debe ser una cantidad efectiva de la proteína RGS-14 para que produzca una mejora en la memoria del individuo tratado. La proteína RGS-14 puede administrarse sola o en una composición con transportadores o excipientes farmacéuticamente aceptables. El experto en la materia adaptará la composición dependiendo del modo particular de administración. Las composiciones pueden comprender la proteína RGS-14 como único agente, o bien acompañarla de otros agentes.

55 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos aquí usados tienen el mismo significado a los comúnmente entendidos por una persona experta en el campo de la invención. Métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos pueden ser usados en la práctica de la presente invención. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

60

Descripción de los dibujos

65 La Fig. 1 muestra la respuesta comportamental de los animales en tareas de ORM. En el experimento de la Fig. 1A, cuando se mostraba un objeto durante 3 minutos, las ratas normales podían mantener la información del objeto en su memoria durante 30 y 45 minutos (min) pero no podían mantenerla durante 60 minutos. En la Fig. 1B se muestra cómo la inyección de lentivirus RGS14 dentro de la capa 6 del área V2 incrementó la capacidad de ORM del animal de manera que no sólo rebasaban el límite de 45 minutos, sino que eran capaces de mantener la misma información

del objeto durante más de 24 semanas, “d” significa día y “w”, semana. La Fig. 1C muestra cómo la capacidad de los animales inyectados con RGS-14 para convertir la memoria 45 minutos en memoria a largo plazo se mantenía después de 14 meses tras la inyección, cuando se presentaba un nuevo estímulo visual. Se representa en el eje de las x los meses después de la inyección. La Fig. 1D muestra cómo los animales normales eran capaces de retener información de dos objetos diferentes (obj) pero no podían hacerlo cuando se les mostraba 4 objetos. Los animales inyectados con RGS-14 fueron capaces de mantener en su memoria, información de 6 objetos distintos. En todas las figuras, el tiempo de exploración (ET, s) corresponde a un “objeto viejo” (barra blanca) y un “objeto nuevo” (barra negra), excepto en la Fig. 1D donde los valores proceden de múltiples “objetos viejos” como se indica en la figura y un “objeto nuevo”. Los valores se han presentado como una media + SEM obtenida de un número (n) de animales indicados bajo las barras. * indica un tiempo de exploración significativamente más alto para el “nuevo objeto” ($p < 0.05$).

La Fig. 2 muestra la localización de la proteína RGS-14 en animales inyectados con lentivirus RGS-14. (A): Tinción con violeta de cresilo del área V2. (B): Una sección coronal del cerebro muestra la localización de la proteína RGS-14 como fluorescencia verde en la capa 6 de la corteza visual V2. (C y D): Los dibujos muestran la localización de la proteína RGS-14 (*) en el sitio de inyección, obtenidos del análisis de secciones seriadas coronales (C) y sagitales (D). El área V2 está delimitada por finas líneas dentro de la corteza cerebral en ambos (C y D). La distribución de las capas corticales desde la capa 1 (I) hasta la capa 6 (VI) se muestran en (A). CC es cuerpo calloso; Hp es hipocampo. La barra de escala en A y B son 125 μm .

La Fig. 3 muestra los resultados de la inyección de Ox7-SAP en la capa 6 y la determinación de ORM. (A) Una visión normal de la capa 6 (VI) de la corteza visual V2 teñida con violeta de cresilo. Fig. 3B: La inyección de Ox7-SAP (Ox7) dentro de la capa 6 del área V2 provocó la pérdida de la mayoría de la población neuronal de esta capa. Fig. 3C: La respuesta comportamental de los animales inyectados en la corteza visual V2 con Ox7-SAP en tareas de ORM, mostró una pérdida completa de la memoria visual normal de 45 minutos. De forma similar, cuando los animales inyectados con RGS-14 con un incremento en el ORM confirmado como se muestra en la Fig. 1, se trataron con Ox7-SAP, el efecto mediado por la proteína RGS-14 quedó eliminado. Fig. 3D: La inyección de Ox7-SAP dentro de la misma capa de la corteza parietal, en un área adyacente a la corteza visual V2, no produjo ningún efecto en la memoria normal. Además, al contrario de lo que ocurría para la corteza visual V2, RGS-14 no tenía efecto en ORM en este área. ET significa tiempo de exploración, “objeto viejo” está representado por una barra blanca y “objeto nuevo” con una barra negra. Los valores están presentados como una media \pm SEM, obtenido de 5-8 animales en cada caso. * muestra un tiempo de exploración significativamente más alto para el nuevo objeto ($p < 0.05$).

La Fig. 4 muestra que la inyección del vehículo (control v), de solución salina (control s) y de RGS-12, una proteína que pertenece a la misma familia que la proteína RGS-14, dentro de la capa 6 del área V2 del cerebro de rata, no produjo ningún efecto y los niveles de ORM eran similares a las ratas normales no inyectadas (normal). Los cuatro grupos no fueron capaces de mantener la información del objeto durante 60 minutos. Estos resultados indican que el incremento de memoria es específico de la inyección de RGS 14. Los valores son la media \pm SEM de 5-16 animales en cada grupo. ET es tiempo de exploración, “objeto viejo” está representado por una barra blanca y “objeto nuevo” con una barra negra.

Fig. 5. Durante la sesión inicial de exploración de los dos objetos idénticos, el grupo de animales inyectados con RGS-14 mostró, en general, una media más alta en cuanto al tiempo de exploración se refiere (18.62 ± 1.47 segundos; $n=15$) que los que tenían el vehículo control (16.09 ± 0.81 s; $n=16$). Sin embargo, la diferencia entre ambos grupos no fue significativa.

La Fig. 6. La inyección de RGS-14 dentro de las capas 2 y 3 de la corteza visual (Ctx), dorsal al sitio diana de inyección; el giro dentado (DG); y el CAI del hipocampo, ventral al sitio diana de inyección, no provocó ningún efecto. Los valores son medias \pm SEM de 5-8 animales en cada grupo. ET es tiempo de exploración, “objeto viejo” está representado por una barra blanca y “objeto nuevo” con una barra negra.

Modos de realización de la invención

Ensayos de memoria de reconocimiento de objetos (“Object recognition memory”, ORM)

Se realizaron tareas de ORM en animales para evaluar el estado de la memoria visual. En estas tareas, a las ratas se les presentaron dos objetos idénticos durante 3 minutos en un “campo abierto” y tras esto, se analizó por cuánto tiempo podían retener en la memoria la información de esos objetos. Durante la sesión de prueba de ORM, uno de los dos objetos se sustituía por un nuevo objeto y se medía el tiempo de exploración para ambos objetos.

Preparación de lentivirus: El cDNA de RGS-14 humano (GenBank, número de acceso AY987041) se insertó en el vector pLenti6/Ubc/V5-DEST Gateway y se produjeron lentivirus de RGS14 de acuerdo con los protocolos de ViraPower™ Lentiviral Expression Systems de Invitrogen.

Animales: Se colocaron ratas Wistar Han (Charles River, Francia) en cajas eurostandard type III H ($42.5 \times 26.6 \times 18.5$ cm³), en una habitación de temperatura regulada ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) en ciclos de luz/oscuridad de 12 h. El agua y la comida estuvieron disponibles *ad libitum*. Se aclimataron los animales a la habitación durante al menos una semana antes de empezar los experimentos, los cuales tuvieron lugar durante la fase de luz.

Inyección de lentivirus: Se anestesiaron ratas de entre 290 y 320 g con ketamina (75 mg/kg, i.p.) y medetomidina (0.5 mg/kg) y se colocaron en un marco estereotáxico de acuerdo con las coordenadas obtenidas del atlas Steriotaxic Coordinates of Rat Brain de G. Paxinos y C. Watson (4ª edición). Las coordenadas de inyección dentro de la capa 6 del área V2 de la corteza visual fueron AP -4.3, ML +2.1, DV -1.9 y de la corteza parietal fueron AP -4.3, ML +3.6, DV -2.1. Se inyectó un volumen total de inyección de 2 μ l de lentivirus RGS-14 de un stock cuyo título era de 3.4×10^6 TU/ml, tanto unilateralmente como bilateralmente a través de una cánula de acero inoxidable de 30 gauge (Heraeus). A las ratas se les concedió un período de recuperación de 8 días antes de las pruebas de comportamiento.

Ensayos de ORM: Antes del test, las ratas se manipularon durante 8 minutos diariamente durante 5 días consecutivos y los dos siguientes días se habituaron en un “campo abierto” (100 x 100 x 50 cm) durante 12 minutos. El día del experimento y durante las sesiones de exploración, las ratas se colocaron en el mismo “campo abierto” con 2 objetos idénticos y se les permitió explorarlas libremente durante 3 minutos. Tras una demora de 30 minutos o más, los animales fueron testados para el ORM con un objeto presentado previamente y un objeto nuevo. El tiempo de exploración se tomó tanto durante la exploración como durante las sesiones de ensayar la ORM, para los animales control y los animales con RGS-14. Respecto al test de la capacidad de carga de memoria, que es la capacidad de los animales para mantener la información de múltiples objetos en el cerebro, se colocaron varios objetos de forma similar a como se indica en la Fig. 1 en el campo abierto durante las sesiones de exploración de 3 minutos y se reemplazó un objeto por uno nuevo durante la sesión del test de memoria para el mismo tiempo. En el test de la capacidad de carga de memoria, no se pudieron estudiar más de 6 objetos debido al espacio limitado del campo abierto.

Estadística: La significación estadística entre el tiempo de exploración del objeto antiguo y el objeto nuevo, tanto de los animales control como de los inyectados con RGS-14 fue analizada con la t de Student usando el programa SigmaStat (SPSS, Inc.). Los valores de p menores de 0.05 fueron considerados significativos.

Tras el test de memoria, con una demora de 30, 45 y 60 minutos, se observó que los animales normales eran capaces de retener la información de un objeto durante 30 y 45 minutos y, sin embargo, no eran capaces de retener esa información tras 60 minutos (Fig. 1A). Este límite en la memoria de un animal normal se define aquí como memoria ORM a corto plazo o ORM normal, y sobrepasar el límite de la ORM normal es considerado como un incremento en la memoria. Con la aplicación de esta estrategia, se inyectaron animales normales con lentivirus de RGS-14 en la capa 6 del área V2 del cerebro de rata tres semanas antes de realizar el test de nivel de ORM. Se observó que la sobreexpresión de la proteína RGS-14 en la capa 6, provocaba un gran incremento de la memoria ORM respecto a la normal (Fig. 1B). Al contrario de lo que ocurría en los animales normales, donde la ORM llegaba hasta 45 minutos, un estímulo visual de la misma duración de tiempo en los animales con RGS-14 daba lugar a una memoria ORM a largo plazo que llegaba hasta varios meses (Fig. 1B). La inyección de lentivirus de RGS-12, una proteína que pertenece a la misma familia que RGS-14, solución salina o vehículo del lentivirus, dentro de la misma área, mostró que no provocaban cambios en los niveles de ORM y su comportamiento era similar a los animales no inyectados (Fig. 4). Además, la media del tiempo de exploración durante los primeros 3 minutos de la sesión de exploración de los dos objetos idénticos no fue significativamente diferente entre los animales inyectados con el vehículo control (16.09 ± 0.81 segundos; $n=16$) y los animales inyectados con RGS-14 (18.62 ± 1.47 s; $n=15$) (Fig. 5), de manera que se excluye la posibilidad de la implicación de otros factores que no sean la proteína RGS-14 en el incremento de la memoria. También se observó que la inyección de lentivirus de RGS-14 en las capas 2 y 3 de la corteza visual V2, un área dorsal al sitio diana, así como en CA1 y el giro dentado del hipocampo, que son áreas ventrales al sitio diana, no producía un efecto similar al observado con la inyección en la capa 6 de V2 de la corteza visual (Fig. 6). Por consiguiente, la conversión de la memoria a corto plazo (normal) de ORM en memoria a largo plazo es específica de la capa 6 del área V2, y este proceso es facilitado por proteínas RGS-14. La sobreexpresión de proteína RGS-14 en esta capa no sólo incrementó la ORM sino que los animales inyectados después de 20 meses mantenían esta condición frente a estímulos visuales (Fig. 1C) (en la figura se llega a los 14 meses pero el seguimiento de los animales ha sido hasta los 20 meses). Además, la capacidad para retener información de múltiples objetos también fue mayor en animales inyectados con RGS-14. Los animales normales pudieron retener la información de 2 objetos diferentes pero no podían con 4 objetos. Sin embargo, a diferencia de los animales normales, los animales inyectados con RGS-14 fueron capaces de retener la información de 6 objetos (Fig. 1D). Estos resultados sugieren que el incremento en la capacidad de memoria mediada por la proteína RGS-14, está relacionada tanto con el tiempo que puede mantener la información de los objetos, como en el número de objetos.

Inmunohistoquímica

Tras el estudio del comportamiento, se procesaron los cerebros de los animales inyectados con el lentivirus RGS-14 mediante inmunocitoquímica para localizar el área/sitio de expresión de la proteína inyectada, con el objetivo de poner de manifiesto una correlación anatómica al incremento de memoria observado en esos animales. Se llevó a cabo como se describe en I. Stepniewska *et al.*, “Topographic patterns of V2 cortical connections in macaque monkeys”, *J. Comp. Neurol.* 1996, vol. 371, pp. 129-152; y R. Gattas *et al.*, “Cortical projections of area V2 in the macaque”, *Cereb Cortex* 1997 vol. 7, pp. 110-29). En resumen, tras determinar el estudio de comportamiento en tareas de ORM, las ratas se perfundieron transcardialmente con un fijador que contenía 4% de paraformaldehído, 1.37% L-lisina y 0.21% meta-periodato, y posteriormente se crioprotegieron con sacarosa el 30%. Las secciones de cerebro fueron incubadas con anticuerpos específicos para RGS-14 (cfr. M.F. López-Aranda *et al.*, 2006 *supra*) acoplados con un fluorocromo verde para visualizar la proteína. Se incubaron secciones coronales y sagitales del cerebro, de un espesor de 30 μ m durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo purificado de conejo anti-RGS-14 (dilución 1:30). Las secciones se

incubaron durante 90 minutos con IgG Alexa Fluor 488 de cabra anti-conejo (dilución 1:1000; Molecular Probes) y se detectó por inmunofluorescencia con el microscopio.

Tinción de violeta de cresilo: Las secciones de cerebro se montaron sobre portaobjetos gelatinizados, y fueron teñidas durante 15 minutos con 1% de violeta de cresilo. Las secciones se deshidrataron y se montaron para su análisis al microscopio.

Se observó que la expresión de la proteína RGS-14 inyectada en el área V2 estaba principalmente localizada en la capa 6 (Fig. 2B). El análisis del sitio de inyección en secciones secuenciales de cerebro tanto en cortes coronales (Fig. 2C) como sagitales (Fig. 2D) confirmó la localización de la proteína RGS-14 en la capa 6 del área V2.

Estudio sobre el papel de las neuronas de la capa 6 del área V2 en la formación de ORM

Se estudió la importancia de las neuronas de la capa 6 del área V2 en la formación de ORM, mediante la eliminación selectiva de neuronas de esta capa. Se planteó la cuestión de si la eliminación de esta capa de neuronas podría eliminar tanto la memoria normal (memoria a corto plazo) como la memoria a largo plazo mediada por la proteína RGS-14. Por lo tanto, se inyectó Ox7-SAP, una inmunotoxina saporina que elimina neuronas de forma selectiva en la capa 6 del área V2 y se evaluó el estado de memoria de los animales (cfr. N. Traissard *et al.*, “Combined damage to entorhinal cortex and cholinergic basal forebrain neurons, two early neurodegenerative features accompanying Alzheimer’s disease: effects on locomotor activity and memory functions in rats”, *Neuropsychopharmacology* 2007, vol. 32, pp. 851-71; y B.C. Nolan *et al.*, “Purkinje cell loss by OX7-saporin impairs excitatory and inhibitory eyeblink conditioning”, *Behavioral Neuroscience* 2005, vol. 119, pp. 190-201).

Inyección de Ox7-SAP: la inyección de Ox7-SAP (0.9 µg en 1 µl) dentro del cerebro se llevó a cabo de forma similar a la descrita anteriormente para el lentivirus. El Ox7-SAP se obtuvo de Advanced Targeting Systems.

La inyección de inmunotoxina provocó la pérdida de casi todas las neuronas de este área, dejando otras células y estructuras intactas (Fig. 3B). La respuesta comportamental de los animales inyectados con Ox7-SAP en tareas de ORM mostró una pérdida total de la memoria ORM (demora de 45 minutos en Fig. 3C), sugiriendo un papel significativo de las neuronas de la capa 6 en la memoria visual. Además de facilitar la formación de memoria a largo plazo en ORM, las neuronas de la capa 6 son cruciales para el normal funcionamiento de la ORM. Además, la inyección de Ox7-SAP en animales inyectados con RGS-14, eliminó el incremento en ORM mediado por esta proteína (demora de 60 minutos en Fig. 3C). Este resultado además confirmó la asociación de las neuronas de la capa 6 en la formación de memoria a largo plazo en ORM. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre en la corteza visual V2, la inyección de Ox7-SAP en la capa 6 de la corteza parietal, un área adyacente al área V2, no produjo ningún efecto en la ORM normal (demora de 45 minutos en Fig. 3D). De forma similar, la sobreexpresión de la proteína RGS-14 en otras áreas tales como las capas 2 y 3 del área V2, giro dentado y CA1 de hipocampo (Fig. 6), y la capa 6 de la corteza parietal (Fig. 3D), tampoco tuvo efecto en la memoria a largo plazo en ORM (demora de 60 minutos).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de la proteína RGS-14, también conocida como el regulador de la proteína-G señalizadora 14, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de desórdenes cognitivos y de la memoria en un mamífero, incluido un humano.
2. Uso según la reivindicación anterior donde la memoria es la memoria visual de reconocimiento de objetos.
- 10 3. Uso según la reivindicación 1 donde la memoria es la memoria a corto plazo.
4. Uso según la reivindicación 1 donde la memoria es la memoria a largo plazo.
- 15 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la proteína se administra en forma de ácido nucleico que codifica RGS-14.
- 20 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde los desórdenes cognitivos y de la memoria están asociados a una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en una enfermedad neurológica, una enfermedad neurodegenerativa y un desorden del desarrollo.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde los desórdenes cognitivos y de la memoria están asociados al envejecimiento.

FIG. 1A

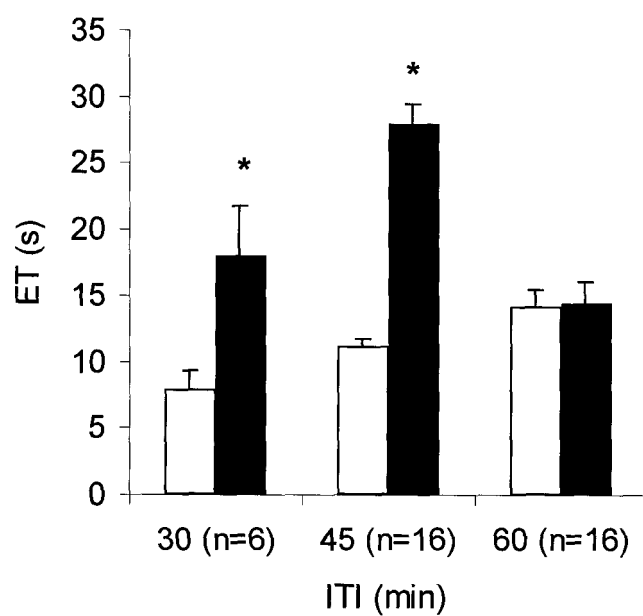


FIG. 1B

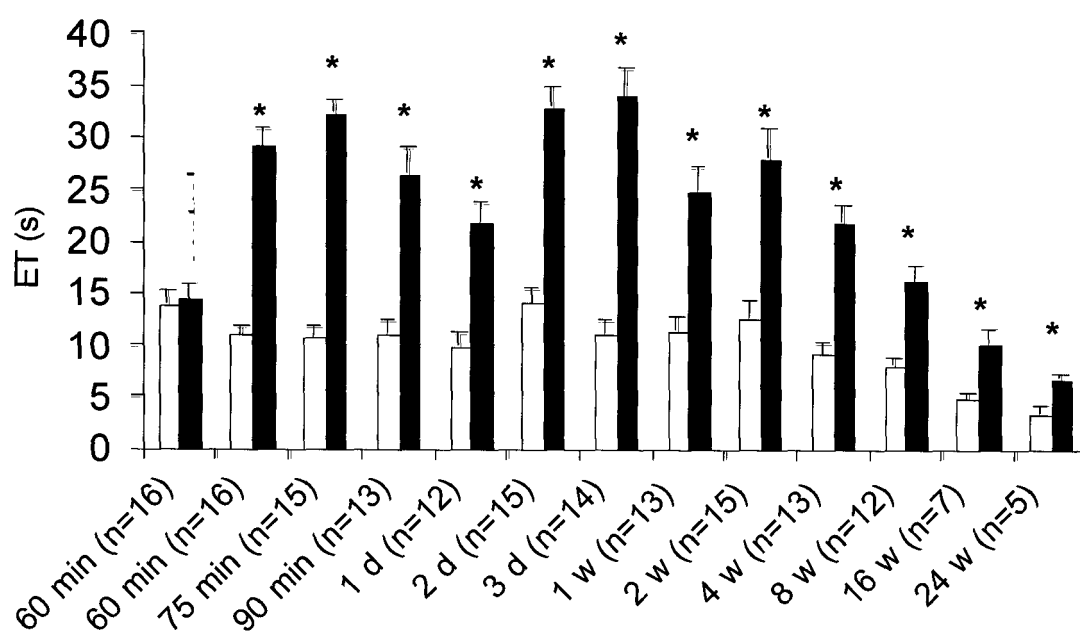


FIG. 1C

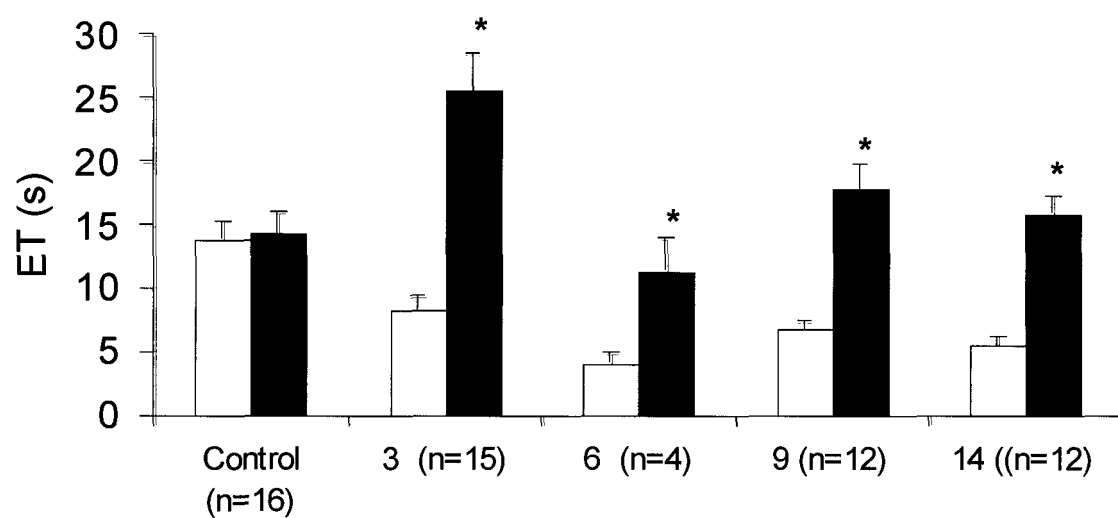


FIG. 1D

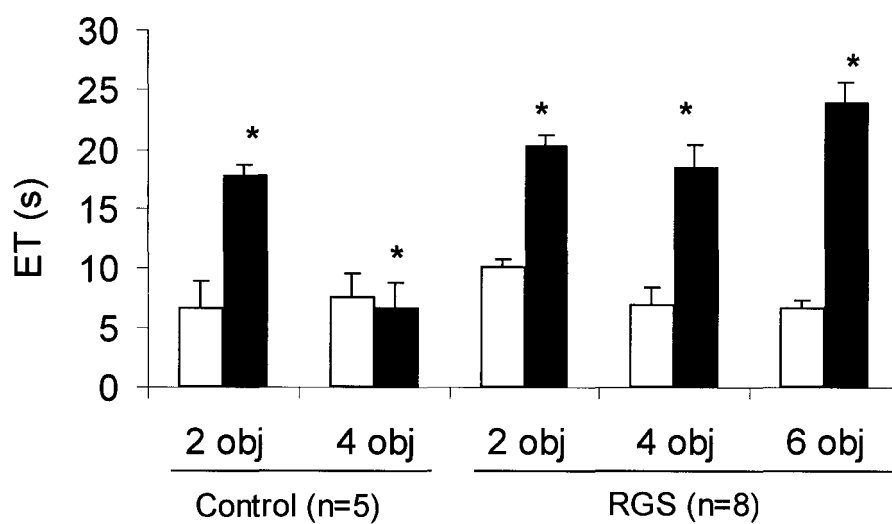
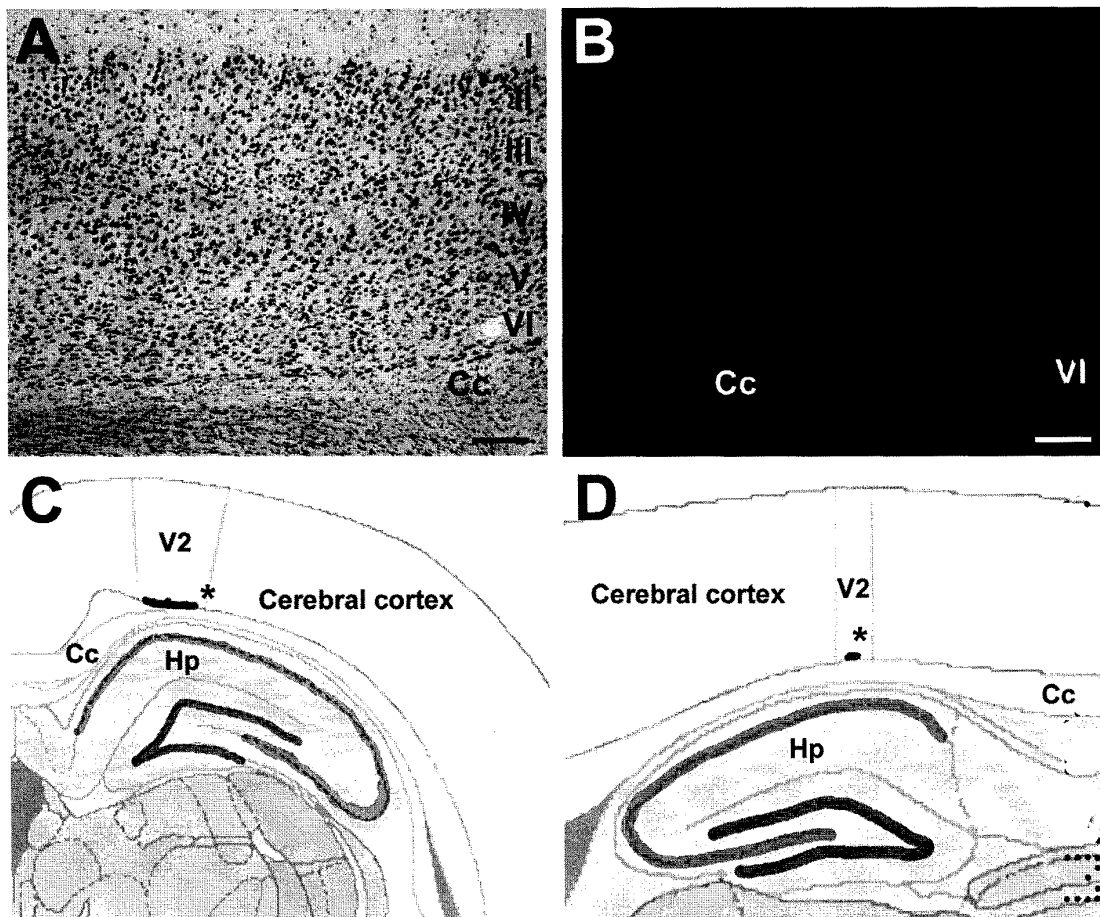


FIG. 2



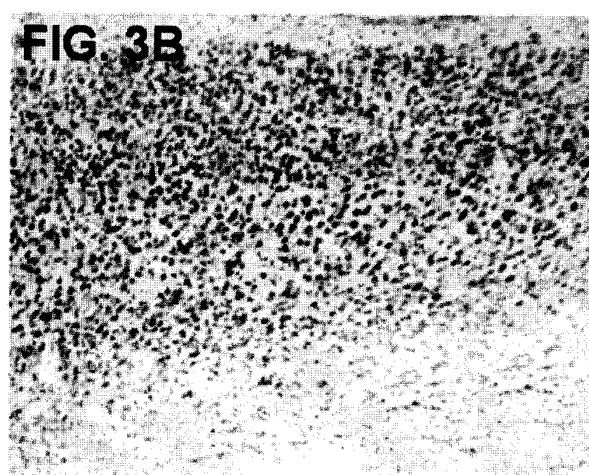
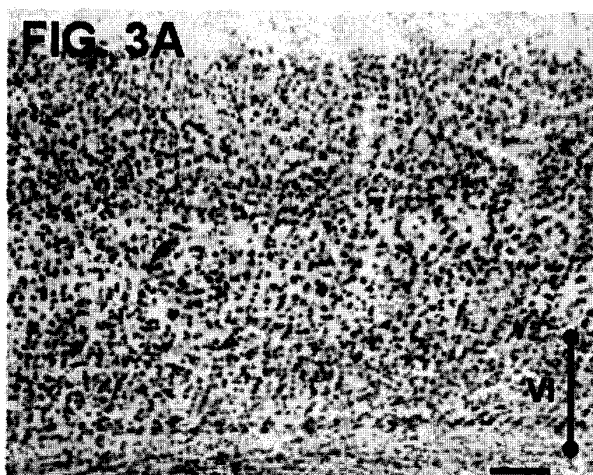


FIG. 3C

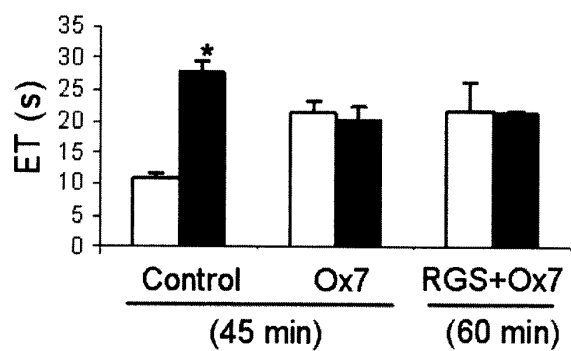


FIG. 3D

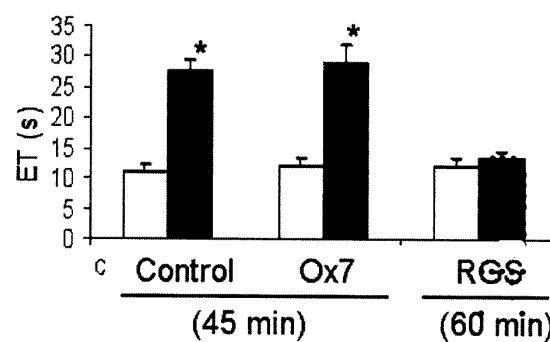


FIG. 4

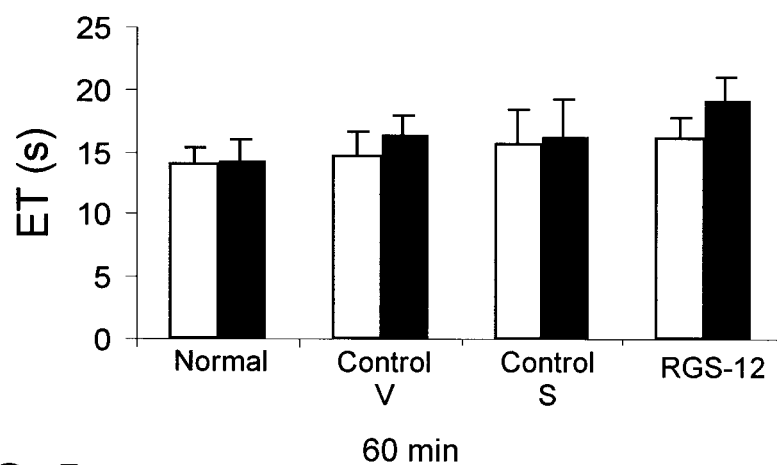


FIG. 5

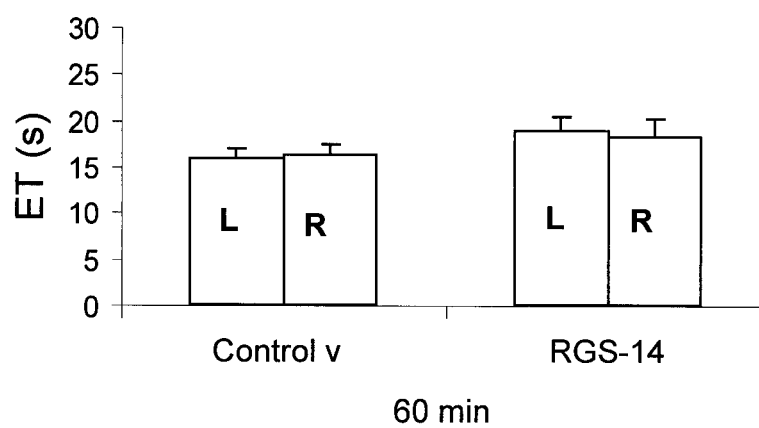
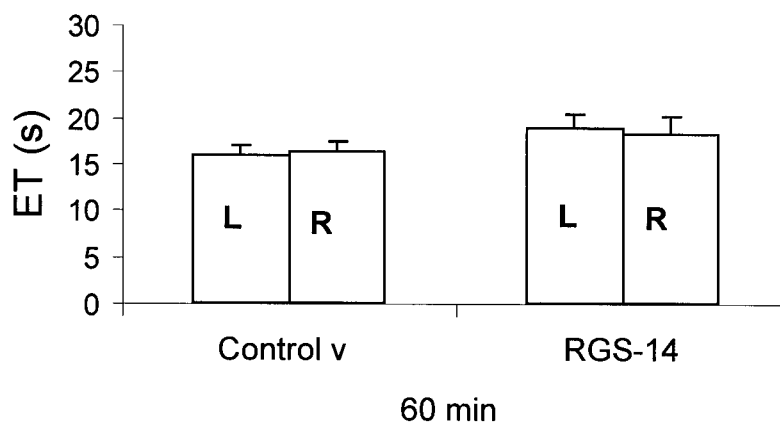


FIG. 6





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930223

②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.05.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 20030119716 A1 (WYETH, NJ [US]) 26.06.2003, resumen; párrafos 40,44,48,84,85,86,87,88,92.	1,5,6
O,A	HEPLER, JR et al. Is RGS14 a novel integrator of G protein and MAPkinase signaling cascades important for hippocampal-based learning and memory?. 3 rd RGS Protein Colloquium. An ASPET colloquium, Abril 2008. Recuperado de Internet el 23.09.2010: <URL:http://www.aspet.org/ uploadedFiles/Meeting/Annual_Meeting/RGS%20Program.pdf?n=1229>, página 12.	1-4,6,7
A	US 6410240 B1 (MILLENIUM PHARMACEUTICALS, INC., MA [US]) 25.06.2002, resumen; columna 2, líneas 22-24,47-67; columna 32, líneas 31-42;columna 44, líneas 60-67.	1,5

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
19.01.2011

Examinador
M. García Grávalos

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K14/00 (01.01.2006)**A61K38/17** (01.01.2006)**A61P25/28** (01.01.2006)

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

C07K, A61K, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI,NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATA BASE, JPO PATENT DATA BASE, PUBMED, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 19.01.2011

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-7
Reivindicaciones

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones 1-7
Reivindicaciones

SI
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	US 20030119716 A1	26.06.2003
D02	HEPLER, JR et al. 3 rd RGS Protein Colloquium. An ASPET colloquium, Abril 2008.	2008
D03	US 6410240 B1	25.06.2002

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 solicitud divulga el uso de la proteína RGS-14, o de un ácido nucleico que la codifica, como principio activo de un medicamento útil en el tratamiento o prevención de desórdenes cognitivos y de la memoria asociados a enfermedades neurológicas o al envejecimiento.

El documento D01 divulga compuestos inhibidores de proteínas RGS, o de los ácidos nucleicos que las codifican, útiles para el tratamiento o prevención de desórdenes neuropsiquiátricos asociados a la actividad de receptores acoplados a proteínas G. Asimismo, este documento se refiere a métodos de búsqueda de los citados inhibidores por medio de ensayos que comprenden el uso de proteínas RGS (ver resumen; párrafos 40, 44, 48, 84, 85, 86, 87, 88, 92).

El documento D02 divulga los resultados de un estudio sobre el papel fisiológico de la proteína RGS-14 en el cerebro. En dicho estudio se compara el comportamiento de aprendizaje de ratones defectivos en la proteína RGS-14 con el de ratones de tipo salvaje empleando el test de "Morris Water Maze (MWM)" (ver página 12).

El documento D03 divulga el uso de proteínas RGS, y en particular de h16395 o de los ácidos nucleicos que la codifican, para el tratamiento o profilaxis de desórdenes respiratorios, inmunes y hematológicos (ver resumen; columna 2, líneas 22-24, 47-67; columna 32, líneas 31-42; columna 44, líneas 60-67).

1. NOVEDAD y ACTIVIDAD INVENTIVA ((Art. 6.1 y 8.1) LP 11/1986)**1.1. REIVINDICACIONES 1- 7**

D01 es el documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la presente invención. Se basa en el principio de que ciertas proteínas RGS, que comprenden RGS-14, en combinación con proteínas G-alpha, atenúan significativamente la transducción de señal que tiene lugar a través de receptores acoplados a proteínas G. Dicha atenuación sirve como base a los inventores para el diseño de métodos de identificación de inhibidores de la actividad de las proteínas RGS-14 y/o G-alpha o de la expresión de los ácidos nucleicos que las codifican. Asimismo, describe el uso de composiciones que comprenden los citados inhibidores para potenciar la transducción de señales a través de receptores acoplados a proteínas G en situaciones patológicas en las que un nivel anormalmente atenuado de transducción se asocie a desórdenes cognitivos como la esquizofrenia, el trastorno bipolar y la depresión.

La presente solicitud comparte con la invención divulgada en D01 el uso de RGS-14 en el tratamiento o prevención de desórdenes cognitivos. Cabe destacar además que, si bien el objeto de la invención divulgada en D01 son los inhibidores de proteínas RGS, el documento hace también alusión a la posibilidad de atenuación de la transducción de señal en situaciones patológicas, que se entiende estarían relacionadas con niveles altos de transducción de señal, a través de la administración de RGS en estrategias, por ejemplo, de terapia génica. Sin embargo, a pesar de este posible uso terapéutico directo de proteínas RGS, y en su caso de RGS-14, mencionado en D01, resulta evidente que el uso de RGS-14 reivindicado en la presente solicitud es conceptualmente diferente al uso divulgado en D01 y se basa en estudios específicos de estimulación de memoria que proporcionan evidencias indiscutibles, no sólo de la potencial utilidad terapéutica particular de RGS-14 en desórdenes cognitivos asociados con pérdida de memoria, sino también del área concreta del cerebro donde esta proteína ejerce la acción que le confiere la aplicabilidad terapéutica reivindicada.

D02 se refiere a la implicación de RGS-14 en los mecanismos bioquímicos de memoria y aprendizaje en el cerebro y en particular en el hipocampo. En este estudio se valora el efecto de la supresión de RGS-14 sobre el aprendizaje y memoria de ratones a través del test MWM en lugar del test de memoria de reconocimiento de objetos empleado por los inventores de la presente solicitud, observando los autores de este documento que el aprendizaje espacial y la memoria de los ratones se estimulan significativamente en ausencia de RGS-14. Cabe destacar además que D02 no hace referencia alguna a un posible uso terapéutico de RGS-14. Por lo tanto, se considera que tampoco existe equivalencia entre D02 y la presente solicitud.

En base a lo expuesto, se concluye que el objeto de las reivindicaciones 1-7 no se encuentra en el estado de la técnica y no podría haber sido deducido del mismo por un experto en la materia a partir de lo divulgado en los documentos D01 y D02. Ninguno de estos dos documentos, tomados independientemente o en combinación, anticipa el efecto de RGS-14 de estimulación de la memoria a corto y largo plazo del que se deduce la aplicabilidad terapéutica reivindicada.

En conclusión, las reivindicaciones 1-7 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva ((Art. 6.1 y 8.1) LP 11/1986).

El documento D03 refleja meramente el estado de la técnica relativo a posibles usos de otras proteínas RGS y no se considera relevante a efectos de la valoración de la novedad y actividad inventiva de la presente solicitud.