

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 415 581**

21 Número de solicitud: 201132055

51 Int. Cl.:

A61K 31/352 (2006.01)

A61K 31/47 (2006.01)

A61K 31/382 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22

Fecha de presentación:

20.12.2011

43

Fecha de publicación de la solicitud:

25.07.2013

Fecha de la concesión:

12.02.2014

45

Fecha de publicación de la concesión:

19.02.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A
DISTANCIA (100.0%)**

**Bravo Murillo, 38
28015 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**ESTEBAN, José Antonio;
KNAFO, Dina Shira y
VENERO NÚÑEZ, César**

54

Título: **COMPUESTOS POTENCIADORES DEL APRENDIZAJE.**

57

Resumen:

Compuestos potenciadores del aprendizaje.

La presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) como potenciador del aprendizaje y/o la memoria, como nootrópico, así como a su uso para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del déficit de memoria, preferiblemente mediante una administración intermitente del compuesto.

ES 2 415 581 B2

DESCRIPCIÓN

COMPUESTOS POTENCIADORES DEL APRENDIZAJE

La presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) como potenciador del aprendizaje. Por tanto, la invención se podría encuadrar en el campo de la farmacología y la medicina.

ESTADO DE LA TÉCNICA

ERK (del inglés "*extracellular-signal-regulated kinase*") está implicada en la plasticidad neural y el la potenciación a largo plazo (LTP) (English y Sweatt 1996 Journal of Biological Chemistry, 271, 24329–24332; Martin et al. 1997 Neuron, 18, 899–912; Kanterewicz et al. 2000 J. Neurosci. 20: 3057–3066; Wu et al. 2001 Nat. Neurosci. 4: 151–158). MAPK/ERK kinasa, también llamada MEK o MAP2K (del inglés "*Mitogen-activated protein kinase kinase*") es una enzima con actividad kinasa que fosforila la MAPK (del inglés "*mitogen-activated protein kinase*"). Distintos trabajos de investigación han evaluado el efecto de la administración *in vivo* de un inhibidor de MEK en varias pruebas de aprendizaje y memoria dependientes de la función hipocampal. En general, la inhibición de MEK tiene un efecto negativo sobre distintos ensayos de aprendizaje y memoria. Así, en la prueba de evitación inhibitoria (del inglés "*inhibitory avoidance*" una prueba dependiente del hipocampo (Izquierdo et al 1992 Behav. Neural Biol. 58, 16; Lorenzini et al 1996 Brain Res. 730, 32), During y colaboradores comprobaron que la administración intracerebroventricular de 5 µg del inhibidor de MEK PD098059 bloquea el efecto potenciador de la memoria de evitación producido por la administración de HSEGTFTSD, un péptido homólogo al GLP-1 (del inglés "*Glucagon-like peptide 1*") (During et al. 2003 Nature Medicine 9; 9: 1173-1179).

En otro estudio, Walz y colaboradores observaron que la administración intrahipocampal de distintas dosis de un inhibidor de MEK (PD098059 0,5 µM, 5 µM o 50 µM) justo después del entrenamiento de los animales en la

prueba de evitación inhibitoria, producía el bloqueo de la memoria a corto plazo, mientras que la administración del inhibidor de MEK 180 minutos después del entrenamiento producía un bloqueo de la memoria a largo plazo (evaluada 24 horas después del entrenamiento). Cuando se inyectó el inhibidor de MEK 30, 90, 120 o 180 minutos después del entrenamiento, no produjo ningún efecto en la memoria (Walz et al. 1999 Behav Pharmacol. 10(8):723-30).

En la prueba de aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris, una prueba dependiente del hipocampo (Morris et al 1982 Nature 297: 681–683), se ha visto que la administración hipocampal de 2 µg del inhibidor de MEK PD098059 antes del entrenamiento en el laberinto acuático de Morris no altera el aprendizaje espacial, pero bloquea la memoria espacial (Blum et al. 1999 J. Neurosci. 19: 3535–3544). Además, en la misma prueba de aprendizaje espacial se ha visto que la inyección intrahipocampal de un inhibidor de MEK impide la memoria espacial (Nagai et al 2006 Neuroreport. 18;17(13):1453-7). En el mismo sentido, se ha descrito que la administración de un inhibidor de MEK en la corteza entorrinal (0,4 µg/rata) justo después del entrenamiento, bloquea la memoria espacial a largo plazo (Hebert y Dash 2002 Learning and Memory 9:156–166).

En el condicionamiento aversivo al sabor (una prueba dependiente del núcleo central de la amígdala, pero independiente del hipocampo), se ha observado que la administración intracerebroventricular de 10 picomoles de un inhibidor de MEK justo antes del entrenamiento, bloquea la adquisición del condicionamiento (Swank 2000 Physiology and Behavior 69: 499–503).

Las sustancias nootrópicas o nootrópicos se han llamado "drogas inteligentes", estimulantes de la memoria o potenciadores cognitivos. Se trata de sustancias que mejoran las funciones mentales tales como la cognición, memoria, inteligencia, motivación, atención y concentración. Algunos nootrópicos se emplean en el tratamiento de personas con

dificultades cognitivas, como enfermos de Alzheimer o Parkinson, por ejemplo. El uso de sustancias que potencian el aprendizaje es de gran utilidad tanto para sujetos normales como para pacientes de enfermedades que cursan con deterioro cognitivo.

5

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere, en un primer aspecto, al uso de al menos un inhibidor de MEK para potenciar el aprendizaje y la memoria bien de sujetos sanos o de sujetos con déficit de memoria donde la administración es intermitente. Preferiblemente, la administración ocurre en días alternos. Preferiblemente, el inhibidor de MEK es un compuesto de fórmula (I) y más preferiblemente el compuesto PD098059. Por tanto, la presente invención se refiere al uso de al menos un inhibidor de MEK bien como nootrópico o bien como medicamento para el tratamiento del déficit de memoria.

10
15

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al uso de inhibidores de MEK que, administrados de manera intermitente, son útiles para potenciar el aprendizaje y la memoria. Los autores de la presente invención han demostrado que la inhibición de MEK de manera intermitente mejora el aprendizaje de sujetos sanos y jóvenes. En la presente memoria se muestran resultados experimentales donde los sujetos tratados intermitentemente con un inhibidor de MEK llevan a cabo el test de memoria espacial del laberinto acuático de Morris (del inglés "*Morris water maze*") mejor que los sujetos tratados con vehículo. Los sujetos tratados intermitentemente con un inhibidor de MEK son capaces de aprender mejor dónde se encuentra la plataforma oculta en el laberinto acuático de Morris, y recuerdan mejor la posición de la plataforma cuando esta es retirada, en comparación con sujetos control tratados con vehículo. Como muestras los ejemplos de la presente memoria, así como las figuras, los sujetos tratados

20
25

30

intermitentemente con un inhibidor de MEK recorren una distancia menor hasta encontrar la plataforma oculta y, cuando la plataforma está ausente, recuerdan mejor su localización y pasan más tiempo nadando en el cuadrante en que dicha plataforma se localizaba durante el aprendizaje.

5

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de al menos un inhibidor de MEK (del inglés "*mitogen-activated/extracellular-signal-regulated kinase*") para la fabricación de una composición para potenciar el aprendizaje y la memoria.

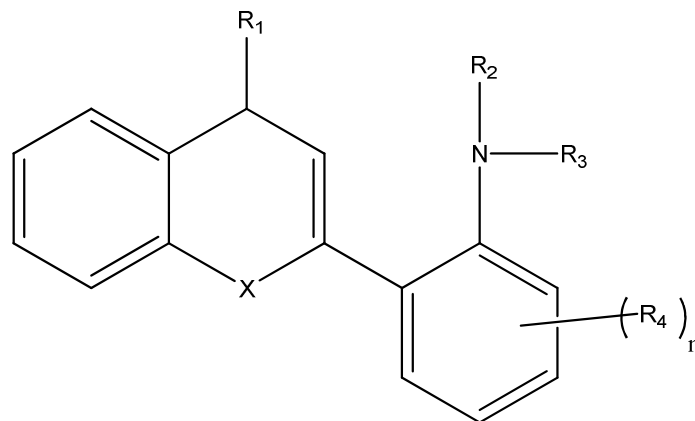
10

Dicha composición puede ser un medicamento para el tratamiento del déficit de memoria o un alimento funcional o un complemento alimentario o un nutracéutico. En una realización preferida de la invención, la composición es un fármaco nootrópico. En otra realización preferida, la composición es un alimento funcional o complemento alimentario que es útil como nootrópico.

15

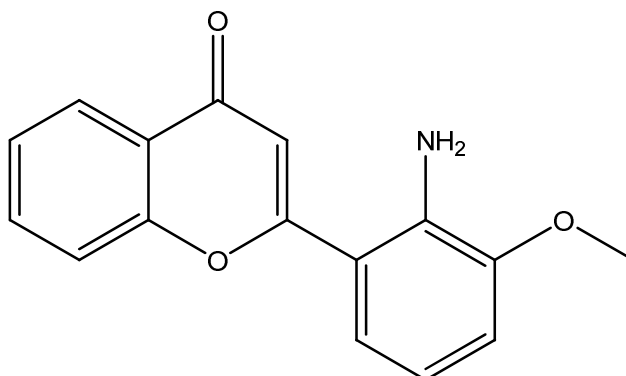
En una realización preferida de la invención, la composición es un medicamento para el tratamiento del déficit de memoria. Por tanto, la presente invención se refiere al uso de al menos un inhibidor para la fabricación de una composición para potenciar el aprendizaje, donde dicha composición se administra de manera intermitente. Preferiblemente, la administración se realiza en días alternos. En una realización preferida, el inhibidor de MEK es un compuesto con fórmula (I).

20



25

Preferiblemente, el inhibidor de MEK es el compuesto



en adelante llamado compuesto 1.

- 5 Preferiblemente, se usa una cantidad terapéuticamente efectiva del inhibidor de MEK. La expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad que, administrada en dosis y durante el período de tiempo necesario, es efectiva a la hora de conseguir el resultado profiláctico o terapéutico deseado, es decir, potenciar el aprendizaje y/o la memoria. Una
- 10 “cantidad terapéuticamente efectiva” del inhibidor de MEK o de la composición que lo comprende, puede variar la edad, el sexo y el peso del individuo, así como con el estadio de la enfermedad, y se refiere a una cantidad que no presenta efectos adversos ni toxicidad y es capaz de alcanzar el efecto profiláctico o terapéutico deseado.

15

- Un inhibidor de MEK puede caracterizarse mediante cualquiera de los ensayos conocidos en el estado de la técnica para ensayar la actividad de MEK. Por ejemplo, un ensayo puede consistir en medir la actividad de MEK mediante la detección y/o cuantificación de la fosforilación de ERK, ya que
- 20 ERK es fosforilada por MEK. Por ejemplo, se puede analizar la actividad de MEK sobre su sustrato no activado ERK2. La detección de la actividad kinasa de MEK se realiza por inmunoblot, usando un anticuerpo que reconoce específicamente y únicamente la forma doblemente fosforilada de la MAPK (Thr¹⁸³ y Tyr¹⁸⁵ en ERK2). Existen kits comerciales para la

detección y/o cuantificación de la actividad de MEK, como por ejemplo el kit de Sigma-Aldrich denominado *MEK Activity Assay Kit*.

5 Hasta la fecha se conocen multitud de compuestos inhibidores de MEK, como son por ejemplo, pero sin limitarse, AZD6244, PD0325901, CI-1040, U0126, BIX 02189, PD098059, AS703026, GSK1120212 (JTP-74057), TAK-733, AZD8330, PD318088, BIX 02188, RDEA119 (BAY 869766), SL327, y ARRY-162. Por tanto, una realización preferida de la presente invención es el uso de un inhibidor de MEK que se selecciona de la lista que comprende:
10 AZD6244, PD0325901, CI-1040, U0126, BIX 02189, PD098059, AS703026, GSK1120212 (JTP-74057), TAK-733, AZD8330, PD318088, BIX 02188, RDEA119 (BAY 869766), SL327, y ARRY-162, para potenciar el aprendizaje y/o la memoria. En una realización preferida, el inhibidor de MEK es PD098059.

15 AZD6244 (Selumetinib), también conocido como ARRY142886, es un inhibidor de MEK 1/2 con valores de GI50 de entre 14 y 50 nM.

PD0325901 es un inhibidor de MEK no competitivo con ATP (adenosín
20 trifosfato) con una K_i aproximadamente de 1 nM contra MEK1 y MEK2 activadas.

CI-1040 (PD184352) es un inhibidor de MEK 1/2 con una K_i de 300 nM.

25 U0126 es un inhibidor de MEK 1 y MEK2 con una IC50 de 72 nM y 58 nM respectivamente.

BIX 02189 es un inhibidor selectivo de MEK5/ERK5 con una IC50 de 59 nM.

30 PD098059 es un inhibidor de MEK1 y MEK2 con una IC50 de entre 4 μ M y 50 μ M. El PD098059 bloquea la vía de activación de la MAP kinasa mediante la inhibición de la fosforilación de las isoformas de MAP kinasa

ERK1 y ERK2 por las tirosina-treonina kinasa MEK (MAP/ERK Kinasa) (Alessi et al. 1995 J. Biol. Chem. 270: 27489–27494; Dudey et al 1995 Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 7686–9).

5 AS703026 es un inhibidor selectivo biodisponible oralmente con una IC50 de entre 0,005 a 2 μ M.

GSK1120212 (JTP-74057) es un inhibidor reversible, selectivo, alostérico de MEK1/2 con una IC50 de 0,7 nM y 0,9 nM, respectivamente.

10

TAK-733 es un inhibidor alostérico de MEK1/2 potente y selectivo con una IC50 de 3,2 nM.

15

AZD8330 es un inhibidor selectivo y oralmente activo de MEK con una IC50 de 7 nM.

PD318088 es un inhibidor alostérico de MEK1/2 no competitivo con ATP.

BIX02188 es un inhibidor selectivo de MEK5 con una IC50 de $0,8 \pm 1,0 \mu$ M.

20

RDEA119 (BAY 869766) es un inhibidor de MEK con IC50 de 73 nM.

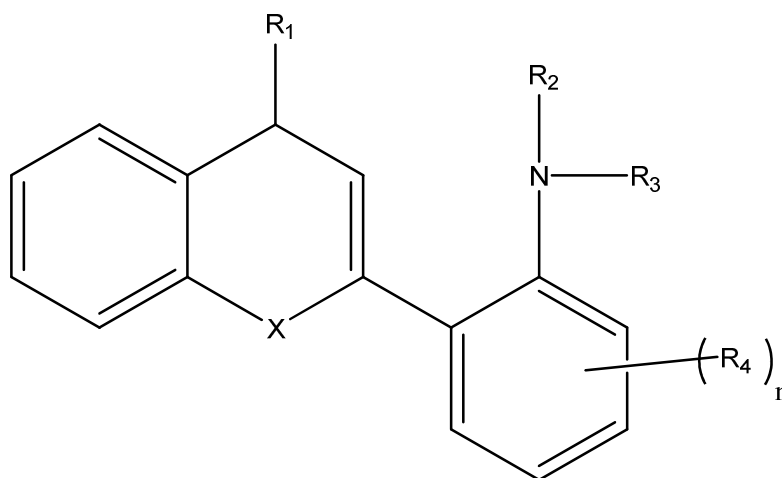
SL327 es un potente inhibidor selectivo de MEK1 y MEK2 con una IC50 de 0,18 y 0,22 μ M, respectivamente.

25

ARRY-162 es un inhibidor de MEK1 y MEK2 con una IC50 de 12 nM, para el que actualmente se está realizando un ensayo clínico de cáncer, en fase 1.

30

Por tanto, un segundo aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) para la fabricación de una composición para potenciar el aprendizaje y/o la memoria,



Fórmula I

donde:

X se selecciona de la lista que comprende: O, NH y S;

5 R₁ se selecciona de la lista que comprende: =O, OH, alcoxilo, =S, SR_a, NR_bR_c, donde R_a, R_b, y R_c se seleccionan independientemente de la lista que comprende: un grupo alquilo (C₁-C₆) y un hidrógeno;

R₂ y R₃, se seleccionan independientemente de la lista que comprende: un grupo alquilo (C₁-C₆) y un hidrógeno;

10 R₄ se selecciona de la lista que comprende: OH, alcoxilo, SR'_a y NR'_bR'_c, donde R'_a, R'_b, y R'_c se seleccionan independientemente de la lista que comprende: un grupo alquilo (C₁-C₆) y un hidrógeno; y

n tiene un valor de entre 1 a 4.

15 El compuesto de la invención además comprende cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables y sus derivados. El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a cualquier sal farmacéutica o cualquier otro compuesto que, siendo administrado a un sujeto, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto descrito en el presente

20 documento. Sin embargo se observará que las sales farmacéuticamente inaceptables están también en el ámbito de la invención ya que estas últimas pueden ser útiles en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables. La preparación de sales y derivados pueden ser llevadas a cabo por medio de métodos conocidos en la materia.

El término "alquilo", tal y como se emplea en la presente memoria, se refiere a cadenas hidrocarbonadas saturadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, terc-butilo, sec-butilo, n-pentilo, n-hexilo, etc. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 4 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como alquinilo, alquenilo, halo, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcoxicarbonilo, amino, nitro o mercapto.

10

El término "alcoxilo", tal y como se emplea en la presente memoria, se refiere a un grupo -OR', donde R' es un grupo alquilo tal y como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, el alcoxilo puede ser un metoxilo, etoxilo, propanoxilo, etc. Preferiblemente, el acoxilo es un metoxilo.

15

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, X es O.

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, R₁ es =O.

20 En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, R₄ es alcoxilo.

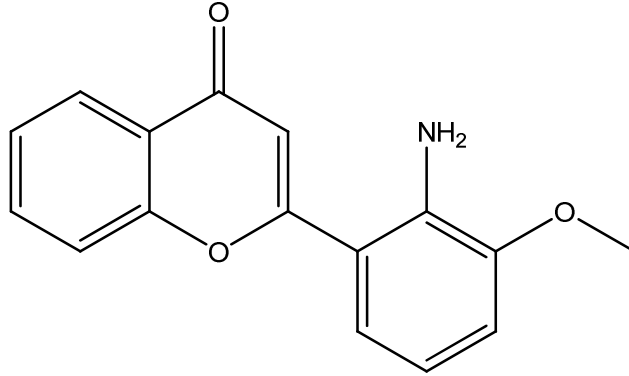
En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, R₄ es metoxilo y más preferiblemente el valor de n es 1, R₄ puede estar en cualquier posición y preferiblemente está en posición orto con respecto al grupo -NR₂R₃.

25

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, R₂ es H.

30 En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, R₃ es H.

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, el compuesto es



5 En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, la composición es un nootrópico. Como se demuestra en los ejemplos, sujetos sanos y jóvenes tratados intermitentemente con un compuesto de fórmula (I) presentan un incremento de la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris.

10

El término “sujeto” en la presente memoria se refiere a un vertebrado. Preferiblemente, el vertebrado es un mamífero. Más preferiblemente, el mamífero es un humano. Entre los mamíferos se incluyen, pero sin limitarse, los animales de granja (como las vacas), animales que participan en deportes, mascotas (como gatos, perros y caballos), primates, ratones y ratas.

15

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, la composición es un medicamento para el tratamiento del déficit de memoria o un alimento funcional o un complemento alimentario o un nutraceutico.

20

En la presente invención se entiende como “alimento funcional” un alimento o complemento alimentario incluidos los llamados “nutracéuticos”, que posee un efecto beneficioso sobre la salud.

El término “complemento alimentario” se refiere a una composición no alimenticia, es decir, que sin ser un alimento, aporta a la dieta un efecto beneficio sobre la salud. Estas composiciones pueden ser administradas de la misma forma que lo descrito para las composiciones farmacéuticas.

5 Preferiblemente, su administración es oral.

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, la composición es un medicamento para el tratamiento del déficit de memoria. Preferiblemente, el déficit de memoria se asocia a la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la demencia con cuerpos de Lewy, la demencia fronto-temporal, la demencia vascular, el deterioro cognitivo ligero, el síndrome de Down, la depresión mayor, la esquizofrenia, el trastorno por déficit de atención o la hiperactividad.

10 En una realización preferida de la invención, la administración de la composición es intermitente. Preferiblemente, la administración de la composición es en días alternos.

En una realización preferida de la invención, la composición, además del compuesto de fórmula (I), comprende un excipiente.

20 El término “excipiente” en la presente memoria se refiere a un componente de una composición farmacéutica que no es un compuesto activo sino un diluyente, un vehículo o un relleno, entre otros, que se considera “farmacéuticamente aceptable” cuando es seguro, no es tóxico y no presenta efectos adversos. El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción del compuesto, lo estabiliza o ayuda a la preparación del medicamento en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del

aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo. El término excipiente “farmacológicamente aceptable” hace referencia a que el excipiente esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra. Además, el excipiente debe ser farmacéuticamente adecuado, es decir, debe permitir la actividad de los compuestos de la composición farmacéutica, es decir, debe ser compatible con dichos componentes

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

En cada caso la forma de presentación del medicamento se adaptará al tipo de administración utilizada, por ello, la composición de la presente invención se puede presentar bajo la forma de soluciones o cualquier otra forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente efectiva. La composición de la invención se puede formular en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimido, cápsula, polvo, gránulo, ungüento, solución, supositorio, inyección, inhalante, gel, microesfera o aerosol.

La forma adaptada a la administración oral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración oral. Dicha forma adaptada a la

administración oral se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, gotas, jarabe, tisana, elixir, suspensión, suspensión extemporánea, vial bebible, comprimido, cápsula, granulado, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco o liofilizado.

5

La forma adaptada a la administración parenteral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración inyectable, es decir, preferiblemente en estado líquido. La administración parenteral se puede llevar a cabo por vía de administración intramuscular, intraarterial, 10 intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraósea o intraespinal, pero sin limitarse únicamente a estos tipos de vías de administración parenteral.

Otra posibilidad es que la composición farmacéutica se presente en una forma adaptada a la administración sublingual, nasal, bronquial, linfática, 15 rectal, transdérmica o inhalada.

En una realización preferida de la invención, la administración es oral o parenteral. Preferiblemente, la administración es parenteral. Más preferiblemente, la administración es intraespinal.

20

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 25 y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

30

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Muestra el resultado del test de memoria espacial del laberinto acuático de Morris para animales tratados con vehículo o con el

compuesto 1. En el eje de abscisas se representa el número del ensayo y en el eje de ordenadas se representa la distancia recorrida hasta la plataforma oculta, en centímetros. Los ensayos 1 a 4 se realizaron en el primer día y los ensayos 5 a 8, en el segundo día. Los círculos vacíos corresponden a los animales tratados con vehículo (n=8) y los círculos negros corresponden a los animales tratados con el compuesto 1 (n=5). En el primer día, los animales tratados con el compuesto 1 aprenden mejor que los controles, ya que recorren una distancia significativamente menor que los controles (tratados con vehículo), $F_{(1,44)} = 4,63$; $p < 0,037$ ANOVA de medidas repetidas. El aprendizaje tras los 8 ensayos es significativamente mayor en los animales tratados intermitentemente con el compuesto 1, $F_{(1,88)} = 7,32$; $P < 0,008$ ANOVA de medidas repetidas. En el ensayo 8, los animales tratados con el compuesto 1 recorren una distancia significativamente menor que los tratados con vehículo, * indica $p < 0,035$ (prueba t de Student).

15

FIG. 2. Muestra el resultado del test de memoria espacial del laberinto acuático de Morris un días después del entrenamiento, para animales tratados con vehículo (animales control) o con el compuesto 1. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje del tiempo que el animal pasa nadando en el cuadrante diana, buscando la plataforma. Los animales tratados intermitentemente con el compuesto 1 (n=5) recuerdan mejor en qué cuadrante estaba la plataforma, y por tanto pasan más tiempo en dicho cuadrante que los animales control, tratados con vehículo (n=8). Este efecto es estadísticamente significativo: * indica $p < 0,05$ en el test de Student.

25

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la eficacia del compuesto 1 como potenciador del aprendizaje.

30

Ejemplo 1: Efecto nootrópico del compuesto 1.

Como muestra la figura 1, los animales tratados con el compuesto 1 (n=5) presentan un mejor resultado en el test de memoria espacial *Morris Water Maze* (laberinto acuático de Morris), que los animales tratados con vehículo (n=8). Los animales tratados con el compuesto 1 recorren menores distancias hasta llegar a la plataforma oculta, lo que demuestra que han aprendido mejor y recuerdan mejor que los animales normales, la localización de la plataforma.

10

El análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas indicó que, sorprendentemente, las ratas que recibieron las 3 inyecciones intermitentes de compuesto 1 mostraron un mejor aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris, dado que nadaron distancias mas cortas para encontrar la plataforma sumergida, en comparación con las ratas controles que recibieron las inyecciones de vehículo ($F_{(1,88)} = 7,32$; $P < 0,008$) Ver figura 1.

15

Un día después del aprendizaje, los animales se sometieron a un test de memoria en el laberinto acuático de Morris en el que la plataforma se había retirado. Como muestra la figura 2, el análisis estadístico del porcentaje de tiempo que los animales buscaron la plataforma en el cuadrante diana (en donde estaba anteriormente la plataforma) indicó que los animales tratados con el compuesto 1 antes del aprendizaje espacial, mostraban una mejor memoria espacial en comparación con los animales inyectados con vehículo (t de Student de 1 cola, $p = 0,044$). Ver figura 2.

20

25

Animales

Ratas macho de la cepa Wistar fueron estabuladas en jaulas de tres en tres, bajo condiciones de luz (ciclo 12 horas luz/oscuridad; luz encendida a las 8 de la mañana) y condiciones de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) con comida y bebida *ad libitum*. Todos los procedimientos que implicaron el uso de animales se realizaron de acuerdo a la normativa Europea (86/609/EEC).

30

Procedimiento de inyección intracerebroventricular

Aproximadamente 3 semanas después de recibir los animales, estos fueron canulados intracerebroventricularmente. Para ello, las ratas fueron anestesiadas con isofluorano. A continuación se colocó a las ratas en un estereotáxico, y se implantó una cánula guía doble (modelo C313G, Plastic One, Roanoke, VA) con un obturador insertado en los ventrículos laterales. Las coordenadas utilizadas fueron 1,3 mm antero-posterior, 1,6 mm lateral, y 3,5 mm profundidad, usando la coordenada Bregma como referencia. La cánula guía fue fijada con dos tornillos y cemento dental (Duralay 2244, Reliance). Los animales se recuperaron de la operación al menos durante 12 días antes de ser entrenados en el laberinto acuático de Morris. Una vez operados, los animales se estabularon de dos en dos y se pesaron cada semana.

15

Preparación del compuesto 1 y administración

El compuesto 1 se preparó en líquido cerebroespinal artificial que contenía (1% DMSO y 20% ciclodextrano). El compuesto fue administrado intracerebroventricularmente 5, 3 y 1 día antes de entrenar a los animales en el laberinto acuático de Morris. Para ello, cada día de administración se retiró el obturador de la cánula doble y se insertó una cánula de inyección (modelo C313I, Plastic One, Roanoke, VA) conectada a un tubo flexible de poliuretano (0,12 mm de diámetro CMA, Microdialysis AB, Estocolmo, Suecia) que a su vez estaba conectado a una jeringa Hamilton de 2,5 ml. El animal estaba despierto y libre de movimiento. Una bomba de microinyección (Harvard Apparatus, Cambridge, MA) controlaba la administración de los 5 µl de la solución con el compuesto 1, a través de las cánulas, a un flujo de 1,25 µl/min. La cánula de inyección se dejó en su lugar durante 3 minutos más para permitir la difusión del compuesto antes de retirar la cánula y volver a poner el obturador. Todos los animales se habituaron a este protocolo de inyección (sin inyectar ninguna solución) durante 2 minutos, en los dos días previos a la primera inyección.

30

Laberinto acuático de Morris

Aprendizaje espacial: el laberinto acuático consiste en una piscina circular construida en PVC negro, de 2 metros de diámetro y 45 centímetros de alto.

5 Esta piscina se mantenía durante las sesiones llena de agua (32 centímetros de profundidad), a una temperatura de 25 ± 1 °C. Para realizar los análisis correspondientes, dividimos virtualmente la piscina en cuatro cuadrantes de igual medida y se diferenció una zona central de 160 cm de diámetro y un pasillo periférico de 20 cm. La plataforma circular de escape se colocaba en
10 la mitad de uno de los cuadrantes virtuales. Esta plataforma permanecía sumergida 2 centímetros por debajo de la superficie del agua, por tanto resultaba invisible para los animales que nadaban durante la prueba. La plataforma, de 11 centímetros de diámetro, es de acero inoxidable y está pintada de negro. Además, para facilitar que los animales pudieran subir a
15 ella sin resbalar, la parte superior consistía en una rejilla metálica también de color negro. El centro de esta plataforma se colocaba equidistante a la pared y al centro de la piscina. La piscina estaba rodeada por cortinas de distinto color que contenían numerosas claves espaciales, externas al laberinto, que permanecían en la misma posición durante todos los ensayos. El
20 comportamiento del animal fue monitorizado por una cámara de vídeo colocada en el techo, justo encima del centro de la piscina, y un sistema computerizado (EthoVision 1.9, Noldus IT, Wageningen, Holanda).

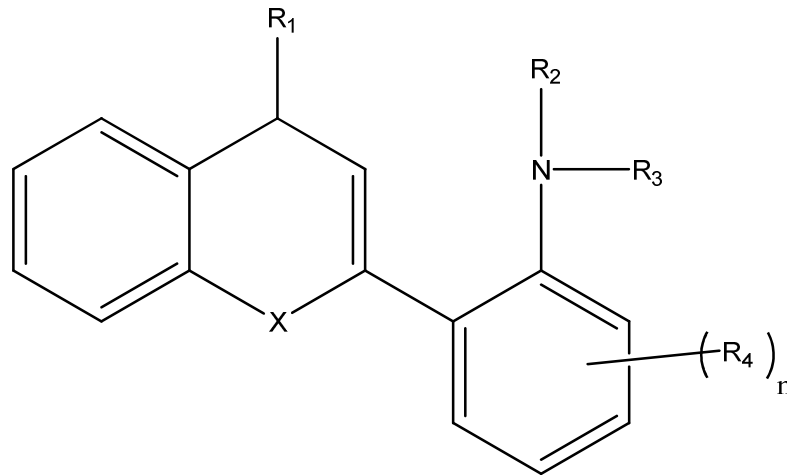
25 Se determinaron cuatro posiciones de comienzo alrededor del perímetro de la piscina. En cada sesión, se utilizaron las cuatro posiciones de comienzo de una manera aleatoria. El ensayo empezaba al situar a la rata dentro del agua, con el cuerpo orientado hacia la pared de la piscina, en una de las posiciones de comienzo. El tiempo máximo de cada ensayo era de 120 segundos, y en caso de que la rata no encontrara la plataforma, se la guiaba
30 con la mano hasta la misma. Una vez allí, el animal permanecía sobre la plataforma durante 30 segundos. Transcurrido este periodo de tiempo, se lo recogía colocándolo encima de una toalla y se lo llevaba al exterior de las

5 cortinas que rodeaban la piscina, donde permanecía otros 30 segundos, antes de comenzar un nuevo ensayo. Si se trataba del último ensayo de la sesión correspondiente, se llevaba a la rata a la habitación adyacente, que se mantenía a una temperatura de 30° C, donde se procedía a su secado en una jaula de características similares a la suya propia. Una vez la rata estaba seca se la devolvía al estabulario.

10 Un día después del entrenamiento, la memoria espacial de los animales fue ensayada en el laberinto acuático de Morris, en el cual la plataforma sumergida fue retirada. Los animales nadaron durante 60 segundos tratando de encontrar la plataforma sumergida en la posición en donde había estado durante los ensayos del entrenamiento espacial.

REIVINDICACIONES

1.- Uso de un compuesto de fórmula (I) para la fabricación de una composición para potenciar el aprendizaje y/o la memoria,



5

Fórmula I

donde:

X se selecciona de la lista que comprende: O, NH y S;

10 R_1 se selecciona de la lista que comprende: =O, OH, alcoxilo, =S, SR_a , NR_bR_c , donde R_a , R_b , y R_c se seleccionan independientemente de la lista que comprende: un grupo alquilo (C_1-C_6) y un hidrógeno;

R_2 y R_3 , se seleccionan independientemente de la lista que comprende: un grupo alquilo (C_1-C_6) y un hidrógeno;

15 R_4 se selecciona de la lista que comprende: OH, alcoxilo, SR'_a y $NR'_bR'_c$, donde R'_a , R'_b , y R'_c se seleccionan independientemente de la lista que comprende: un grupo alquilo (C_1-C_6) y un hidrógeno; y

n tiene un valor de entre 1 a 4.

2.- Uso según la reivindicación 1, donde X es O.

20

3.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde R_1 es =O.

4.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R_4 es alcoxilo.

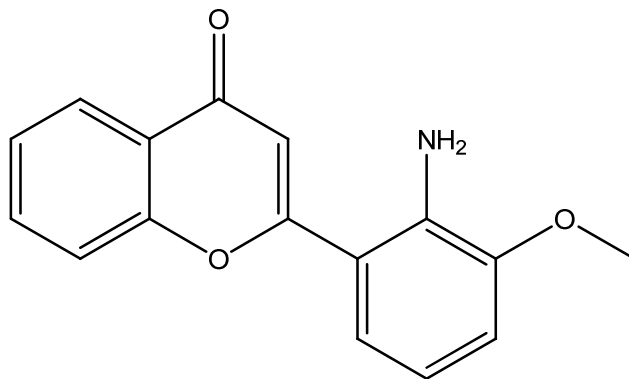
5.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde R_4 es metoxilo y el valor de n es 1.

6.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde R_2 es H.

5

7.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde R_3 es H.

8.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el compuesto es



10

9.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la composición es un medicamento para el tratamiento del déficit de memoria o un alimento funcional o un complemento alimentario o un nutracéutico.

15

10.- Uso según la reivindicación 9, donde la composición es un medicamento para el tratamiento del déficit de memoria.

20

11.- Uso según la reivindicación 10, donde el déficit de memoria se asocia a la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la demencia con cuerpos de Lewy, la demencia fronto-temporal, la demencia vascular, el deterioro cognitivo ligero, el síndrome de Down, la depresión mayor, la esquizofrenia, el trastorno por déficit de atención o la hiperactividad.

12.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde la administración de la composición es intermitente.

5 13.- Uso según la reivindicación 12, donde la administración de la composición es en días alternos.

10 14.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde la composición, además del compuesto de fórmula (I), comprende un excipiente.

15 15.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde la administración es oral o parenteral.

15 16.- Uso según la reivindicación 15, donde la administración es parenteral.

17.- Uso según la reivindicación 16, donde la administración es intraespinal.

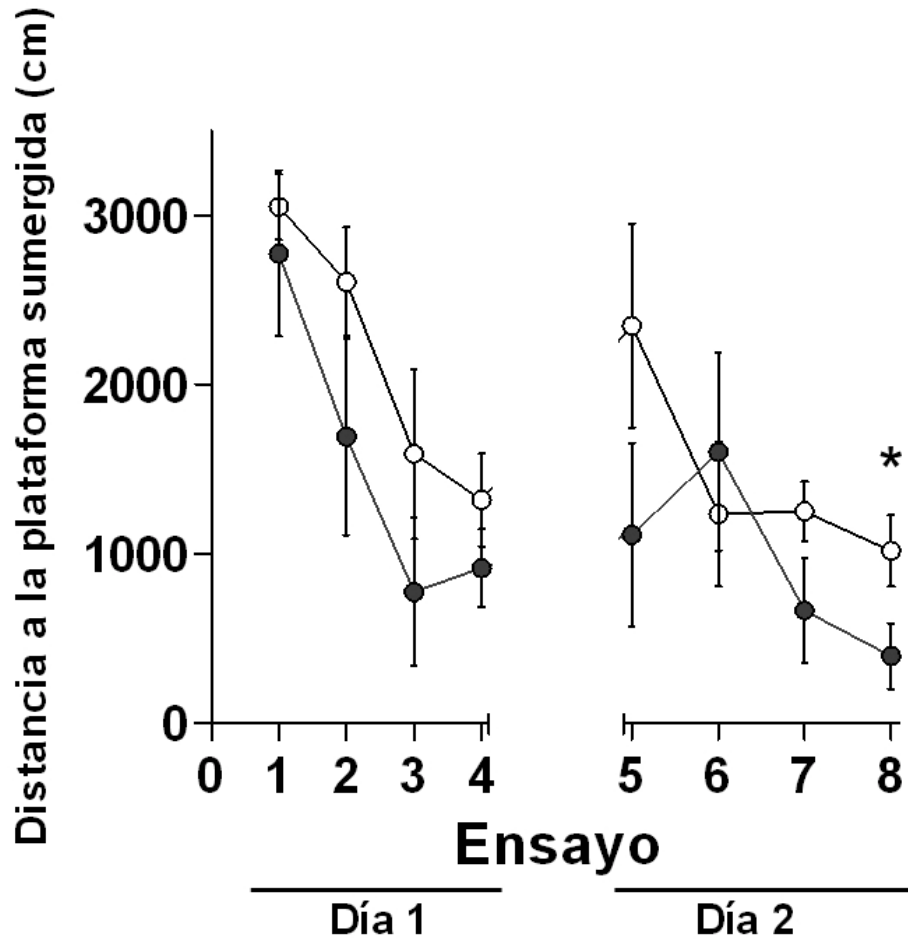


FIG.1

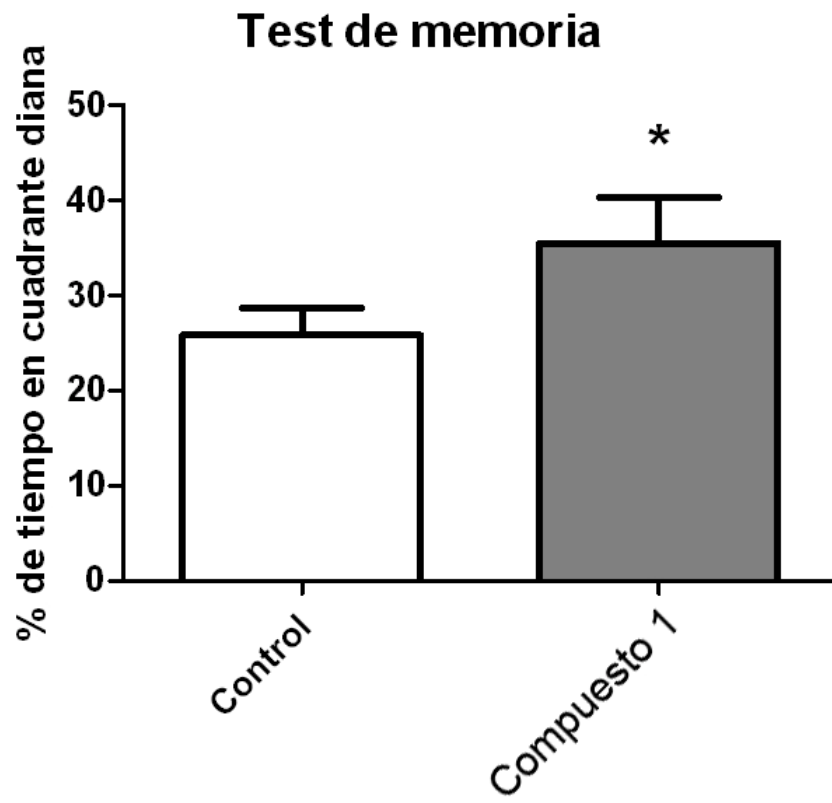


FIG.2



- ②① N.º solicitud: 201132055
②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.12.2011
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	HEBERT A E et al. Extracellular signal-regulated kinase activity in the entorhinalcortex is necessary for long-term spatial memory. Learning and Memory. 07.2002 VOL: 9 No: 4 Pags: 156-166 ISSN 1072-0502 (print) Doi: doi:10.1101/lm.48502, páginas 157,158.	1-17
A	US 2005214325 A1 (DAVID NATHANIEL E) 29.09.2005, párrafos 68,69; resumen; reivindicaciones.	1-17
A	WO 0134201 A2 (ADVANCED RES & TECH INST et al.) 17.05.2001, reivindicaciones.	1-17

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
09.04.2013

Examinador
H. Aylagas Cancio

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/352 (2006.01)

A61K31/47 (2006.01)

A61K31/382 (2006.01)

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

A61K

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

INVENES, WPI, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS, XPESP, XPESP2, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.04.2013

Declaración

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

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	HEBERT A E et al. Extracellular signal-regulated kinase activity in the entorhinalcortex is necessary for long-term spatial memory. Learning and Memory. 07.2002 VOL: 9 No: 4 Pags: 156-166 ISSN 1072-0502 (print) Doi: doi:10.1101/lm.48502, páginas 157,158.	30.06.2002
D02	US 2005214325 A1 (DAVID NATHANIEL E)	29.09.2005
D03	WO 0134201 A2 (ADVANCED RES & TECH INST et al.)	17.05.2001

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 se refiere al uso de un compuesto de fórmula I para la fabricación de una composición para potenciar el aprendizaje y/o la memoria. Se cita como compuesto preferente el PD098059. El déficit de memoria se asocia a la enfermedad de Alzheimer, a la de Parkinson, a la demencia y al déficit de atención.

El documento D1 cita la administración de un inhibidor de MEK en ratas se cita el compuesto PD098059 y el bloqueo de la memoria espacial a largo plazo.

Los documentos D2 y D3 se refieren al uso de inhibidores de MEK entre los que se citan el compuesto PD98059 o el compuesto U0126 aumentando la eficacia del tratamiento con neurotoxinas (documento D2) o como inhibidores de la neurofibromatosis tipo 1 (NF1) (documento D3).

En consecuencia a la vista de los documentos citados, la materia correspondiente a las reivindicaciones 1-17 de la presente solicitud tiene novedad y actividad inventiva de acuerdo con los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.