

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 352 931**

21 Número de solicitud: 201001550

51 Int. Cl.:

**C07H 21/00** (2006.01)

**C07K 14/00** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **02.12.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **24.02.2011**

Fecha de la concesión: **20.12.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **30.12.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**30.12.2011**

73 Titular/es:  
**UNIVERSIDAD DE MÁLAGA  
PLAZA DE EL EJIDO S/N  
29071 MÁLAGA, ES**

72 Inventor/es:  
**KHAN, ZAFARUDDIN**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **USO DE LA PROTEÍNA RGS-14 PARA LA PREVENCIÓN Y/O TRATAMIENTO DE UN  
DESORDEN COGNITIVO Y/O UN DESORDEN DE LA MEMORIA.**

57 Resumen:

Uso de la proteína RGS-14 para la prevención y/o tratamiento de un desorden cognitivo y/o un desorden de la memoria.

La invención se refiere al uso de una secuencia nucleotídica que codifica para una proteína RGS-14 de humanos, del vector que comprende dicha secuencia nucleotídica; del producto de expresión de dicha secuencia nucleotídica, donde preferiblemente dicho producto es la proteína, o de la composición que comprende cualquiera de las secuencias o productos anteriores, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de al menos un desorden cognitivo y/o al menos un desorden de la memoria en un mamífero. Preferiblemente dicho desorden cognitivo y/o desorden de la memoria están producidos por el envejecimiento o por la enfermedad de Alzheimer.

ES 2 352 931 B1

## DESCRIPCIÓN

Uso de la proteína RGS-14 para la prevención y/o tratamiento de un desorden cognitivo y/o un desorden de la memoria.

La presente invención se enmarca en el campo de medicina y se refiere al uso de una secuencia nucleotídica o aminoácídica correspondiente a RGS-14 de humanos, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de al menos un desorden cognitivo y/o un desorden de la memoria en un mamífero.

### Estado de la técnica anterior

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 y memoria a largo plazo.

La memoria a corto plazo es una forma en la que un mamífero retiene y almacena datos con capacidad y duración de tiempo que varía entre segundos y horas. Esta información sólo se consolida si se transfiere a la memoria a largo plazo. La memoria a largo plazo es una forma de almacenar recuerdos vividos, conocimiento acerca del mundo, imágenes, conceptos, estrategias de actuación, etc. 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 también un síntoma que se pone de manifiesto en distintas enfermedades neurológicas, psiquiátricas y/o 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. Se 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 a 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 enfermedad de Alzheimer u otros tipos de demencia. En el Deterioro Cognitivo Ligero (DCL), los fallos de memoria se sitúan entre lo que podríamos llamar normal para una persona mayor y una demencia, por ejemplo la 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 cuando transcurra 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 hidrocloreuro 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 M1, 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 carezca de secundarios.

La proteína RGS-14 es un regulador de la señalización mediada por la proteína G. Esta proteína contiene un dominio conservado que se une a Gi/o a-guanosina trifosfato para conferirle actividad GTPasa (Cho *et al.*, 2000. *Mol. Pharmacol.*, 58, 569; Hollinger *et al.*, 2001. *J. Neurochem.* 79: 941). Esta proteína se ha asociado con los microtúbulos y es un importante factor de mitosis (Martin-McCaffrey *et al.*, 2005. *Cell Cycle*, 4: 953). Aunque la proteína RGS-14 ha sido relacionada previamente con su efecto en la conversión de la memoria a corto plazo en memoria a largo plazo en animales sanos (López-Aranda *et al.*, 2009. *Science*, 325: 87-89), nada se conoce al respecto del efecto de su sobreexpresión en el cerebro de animales que padezcan desórdenes cognitivos y/o de la memoria.

Por lo tanto, es deseable proporcionar nuevos métodos y productos para la prevención y/o para el tratamiento de la pérdida de la memoria causada por enfermedades cognitivas y de la memoria.

### Explicación de la invención

La invención se refiere al uso de una secuencia nucleotídica que codifica para una proteína RGS-14 de humanos, del vector que comprende dicha secuencia nucleotídica; del producto de expresión de dicha secuencia nucleotídica, donde preferiblemente dicho producto es la proteína o de la composición que comprende cualquiera de las secuencias o productos anteriores, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de al menos un desorden cognitivo y/o al menos un desorden de la memoria en un mamífero.

La presente invención proporciona evidencias de que la administración de la proteína RGS-14, también conocida como regulador de la proteína-G señalizadora 14, en cerebro de ratas y ratones, provoca un incremento de la memoria en el reconocimiento de objetos en sujetos viejos o que padecen la enfermedad de Alzheimer, es decir, es útil para la prevención y/o tratamiento de al menos un desorden cognitivo y/o al menos un desorden de la memoria. En la presente invención se ha utilizado el test de memoria de reconocimiento de objetos (ORM; de las siglas en inglés *Object Recognition Memory*) para ensayar el aprendizaje y memoria en ratones y ratas. En estos tests, se presentaron a las ratas y ratones 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.

La sobreexpresión de la proteína RGS-14 potencia la memoria tanto a corto plazo como a largo plazo. Puesto que existe una gran similitud entre especies en cómo se procesa la memoria y en las estructuras cerebrales entre mono y hombre, así como en la propia secuencia de la proteína RGS-14, tal como se muestra en la tabla 1, los resultados de funcionalidad de RGS-14 en ratón y rata serían extrapolables a la especie humana.

Hasta la actualidad, el remedio contra los desórdenes cognitivos y/o de la memoria provocados como consecuencia de trastornos como por ejemplo el envejecimiento o la enfermedad de Alzheimer, continúa siendo un reto, sin embargo, la presente invención proporciona datos experimentales de que el tratamiento de las neuronas del área V2 de la corteza visual secundaria, concretamente de la capa V6, con la proteína RGS-14, a través de la expresión de una secuencia nucleotídica que codifica para la misma, produce tanto la prevención como el tratamiento de la pérdida de memoria declarativa en animales enfermos. Es conocido que el uso de la proteína RGS-14 puede potenciar la memoria, promoviendo la conversión de la memoria de corta duración en memoria de larga duración en animales sanos (López-Aranda *et al.*, 2009. *Science*, 325: 87-89), sin embargo, nunca antes se había demostrado que la administración de la proteína RGS-14 podría funcionar correctamente en la prevención y/o tratamiento de desórdenes cognitivos y/o de la memoria ya que éstos desórdenes son patologías complejas que implican la interacción de numerosos factores y como consecuencia, el uso de la proteína RGS-14 para la prevención y/o el tratamiento de dichos desórdenes no tendría por qué mejorar la capacidad de la memoria de los sujetos enfermos, sin embargo, los inventores demuestran que la administración de dicha proteína previene los desórdenes cognitivos y de la memoria producidos por el envejecimiento así como por la enfermedad de Alzheimer.

En los ejemplos de la presente invención se muestra un incremento significativo del índice de discriminación que mide la ORM. Este efecto ha sido demostrado tanto en ratas viejas como en ratones modelos de la enfermedad de Alzheimer. La expresión de la proteína RGS-14 en las mismas neuronas del área V2 no sólo es capaz de revertir el déficit de ORM en las ratas viejas y en los de ratones transgénicos modelos de la enfermedad de Alzheimer, sino que además previenen sus comienzos en ambas condiciones. Estos datos experimentales indican que la activación de las neuronas de la capa 6 del área V2 mediada por la proteína RGS-14 es suficiente para corregir la pérdida de memoria observada tanto en el envejecimiento como en la enfermedad de Alzheimer. De este modo, mediante la presente invención se aporta una herramienta útil tanto para el tratamiento como para la prevención de la disfunción de la memoria declarativa en mamíferos, preferiblemente en mamíferos humanos, no resuelta hasta la fecha.

Complementariamente, el tratamiento de ratas y ratones con la proteína RGS-14 potenció la ORM hasta tal punto que llevó a la conversión de la ORM a corto plazo (de 45 minutos) en memoria a largo plazo (de larga duración) en ratas, detectable incluso después de varios meses. El efecto de esta proteína en la potenciación de la ORM hacia estímulos nuevos no sólo persistió durante meses, sino que duró toda la vida de la rata. Además la eliminación selectiva de estas neuronas de la capa 6 del área V2 mediante el tratamiento con la inmunotoxina Ox7-SAP produjo una pérdida completa tanto de la ORM normal como de la memoria potenciada por la proteína RGS-14. El conjunto de estas observaciones indica que el área V2 de la corteza visual secundaria es crítica para el procesamiento de la ORM. No obstante, por otra parte, la deficiencia en la ORM durante el envejecimiento normal y la enfermedad de Alzheimer está considerada como una de las anomalías cognitivas claves asociadas a la memoria declarativa. Por tanto, en la presente invención se demuestra que la expresión de la proteína RGS-14 de humanos en las neuronas del área V2 de mamíferos podía prevenir y/o revertir la pérdida de la ORM tanto en el envejecimiento como en la enfermedad de Alzheimer.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 80% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1, que corresponde a la proteína RGS-14 de humanos, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de al menos un desorden cognitivo y/o desorden de la memoria en un mamífero.

La proteína RGS-14 es un miembro de la familia de reguladores de la señalización de la proteína G, de las siglas en inglés *Regulator of G protein Signaling*. La secuencia SEQ ID NO: 1 de esta proteína es la secuencia de RGS-14 de *Homo sapiens*.

Las secuencias aminoacídicas con, al menos, un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1 son secuencias homologas de la proteína RGS-14 de humanos en otros mamíferos. Las secuencias homologas se refieren a secuencias de especies distintas que proceden de una secuencia ancestral común. Dentro de la homología de secuencia se distinguen dos tipos de homología: la ortología y la paralogía. Las secuencias ortólogas pertenecen a especies que tienen un antepasado

común. Las secuencias parálogas son aquellas que se encuentran en el mismo organismo y una procede de la duplicación de la otra. En esta realización preferida de la presente invención se consideran todas las secuencias homologas, tanto ortólogas como parálogas, que tienen, al menos, un 80% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1.

5 El porcentaje de identidad se ha establecido en base a la determinación del % de identidad de la secuencia aminoacídica de la proteína RGS-14 de *Homo sapiens* (AAY26402.1 [SEQ ID NO: 1] y NP\_006471.2 [SEQ ID NO: 11]) con respecto a las secuencias aminoacídicas publicadas en las bases de datos de "Genbank" de las proteínas RGS-14 de *Pan troglodytes* (Chimpancé), *Callithrix jacchus* (Tití), *Canis familiaris* (Perro), *Bos taurus* (Toro), *Mus musculus* (ratón), *Rattus norvegicus* (Rata), *Gallus gallus* (Gallo), *Salmo salar* (Salmón) y *Anopheles gambiae* (Mosquito)  
10 (Tablas 1 y 2). Como puede observarse en los porcentajes de identidad mostrados en las Tablas 1 y 2, la secuencia aminoacídica de la proteína RGS-14 se mantiene con un nivel de conservación en mamíferos por encima del 81%, sin embargo, en aves como *Gallus gallus* (gallo) el porcentaje desciende a un 50%, en peces como *Salmo salar* el porcentaje es de entre un 31-38% y en insectos como el mosquito *Anopheles gambiae*, el porcentaje de identidad es de entre un 25-28%. Como consecuencia, en la presente invención se establece un porcentaje de identidad de al menos un  
15 80% con respecto a la secuencia aminoacídica de la proteína RGS-14 de *Homo sapiens* con nº de acceso AAY26402.1, es decir, de SEQ ID NO: 1.

20 TABLA 1

*Porcentaje de identidad de varias secuencias homologas de la proteína RGS-14 de diferentes organismos respecto de la secuencia SEQ ID NO: 1 (Homo sapiens). El nº de acceso y el identificador de secuencia de la tabla se muestra entre paréntesis: Homo sapiens (AAY26402.1; SEQ ID NO: 1), Pan troglodytes (XP\_001142125.1; SEQ ID NO: 2), Callithrix jacchus (XP\_002744538.1; SEQ ID NO: 3), Canis familiaris (XP\_546208.1; SEQ ID NO: 4), Bos taurus (XP\_611732.3; SEQ ID NO: 5), Mus musculus (NP\_058038.2; SEQ ID NO: 6), Rattus norvegicus (NP\_446216.1; SEQ ID NO: 7), Gallus gallus (XP\_001231918.1; SEQ ID NO: 8), Salmo salar (ACI34131.1; SEQ ID NO: 9) y Anopheles gambiae (XP\_312542.4; SEQ ID NO: 10)*

<b>Especie 1</b>	<b>Especie 2</b>	<b>% identidad</b>
<i>Homo sapiens</i>	<i>Pan troglodytes</i>	<b>99</b>
	<i>Callithrix jacchus</i>	<b>94</b>
	<i>Canis familiaris</i>	<b>85</b>
	<i>Bos taurus</i>	<b>86</b>
	<i>Mus musculus</i>	<b>82</b>
	<i>Rattus norvegicus</i>	<b>81</b>
	<i>Gallus gallus</i>	51
	<i>Salmo salar</i>	31
	<i>Anopheles gambiae</i>	25

TABLA 2

Porcentaje de identidad de varias secuencias homologas de la proteína RGS-14 de diferentes organismos respecto de la secuencia SEQ ID NO: 11 (*Homo sapiens*). El n° de acceso y el identificador de secuencia de la tabla se muestra entre paréntesis: *Homo sapiens* (NP\_006471.2; SEQ ID NO: 11), *Pan troglodytes* (XP\_001142125.1; SEQ ID NO: 2), *Callithrix jacchus* (XP\_002744538.1; SEQ ID NO: 3), *Canis familiaris* (XP\_546208.1; SEQ ID NO: 4), *Bos taurus* (XP\_611732.3; SEQ ID NO: 5), *Mus musculus* (NP\_058038.2; SEQ ID NO: 6), *Rattus norvegicus* (NP\_446216.1; SEQ ID NO: 7), *Gallus gallus* (XP\_001231918.1; SEQ ID NO: 8), *Salmo salar* (ACI34131.1; SEQ ID NO: 9) y *Anopheles gambiae* (XP\_312542.4; SEQ ID NO: 10)

Especie 1	Especie 2	% identidad
<i>Homo sapiens</i>	<i>Pan troglodytes</i>	99
	<i>Callithrix jacchus</i>	96
	<i>Canis familiaris</i>	88
	<i>Bos taurus</i>	90
	<i>Mus musculus</i>	88
	<i>Rattus norvegicus</i>	87
	<i>Gallus gallus</i>	50
	<i>Salmo salar</i>	38
	<i>Anopheles gambiae</i>	28

El término “% de identidad” entre dos secuencias de aminoácidos, tal como se interpreta en la presente invención, se refiere al número de posiciones aminoacídicas sobre la longitud total de la secuencia que se compara, donde todos los aminoácidos en esa posición son idénticos.

Este primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 80% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1 para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de al menos un desorden cognitivo y/o desorden de la memoria en un mamífero. La secuencia de aminoácidos puede estar codificada por cualquier secuencia nucleotídica cuya transcripción y traducción den lugar a cualquiera de las secuencias de aminoácidos mencionadas. Debido a que el código genético es degenerado, un mismo aminoácido puede ser codificado por diferentes codones (tripletes), por ello, la misma secuencia de aminoácidos puede ser codificada por distintas secuencias de nucleótidos. Dicha secuencia nucleotídica puede ser la secuencia codificante (ADNc; secuencia que contiene sólo los exones) del gen que codifica para la proteína RGS-14 o la propia secuencia nucleotídica presente en el genoma. Por tanto, la secuencia de nucleótidos de esta realización preferida puede tener intrones (no codificantes) y exones, o solamente exones. Tras el procesado (*splicing*) del ARN mensajero transcrito, se da lugar a una proteína idéntica partiendo de cualquiera de las secuencias nucleotídicas correspondientes. Preferiblemente la secuencia nucleotídica es SEQ ID NO: 12 que corresponde con la secuencia nucleotídica de n° de acceso AY987041, a la que se hace referencia en los ejemplos de la presente invención.

Preferiblemente, la presente invención se refiere al uso de una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1 para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de al menos un desorden cognitivo y/o desorden de la memoria en un mamífero. Una realización más preferida de la presente invención se refiere al uso de una secuencia nucleotídica que codifica para la secuencia SEQ ID NO: 1, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de al menos un desorden cognitivo y/o desorden de la memoria en un mamífero.

El medicamento al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o veterinario. El “medicamento de uso humano” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El “medicamento de uso veterinario” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas

con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario. También se considerarán “medicamentos veterinarios” las “premezclas para piensos medicamentosos” elaboradas para ser incorporadas a un pienso.

5

El término “tratamiento de un desorden cognitivo y/o desorden de la memoria” tal como se entiende en la presente invención se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de desorden cognitivo y/o desorden de la memoria en un mamífero, y preferiblemente en un humano, que incluye:

- 10 (i) inhibir dicho desorden cognitivo y/o desorden de la memoria, es decir, detener su desarrollo;
- (ii) aliviar dicho desorden cognitivo y/o desorden de la memoria, es decir, causar la regresión del desorden cognitivo y/o desorden de la memoria o su sintomatología;
- 15 (iii) estabilizar el desorden cognitivo y/o desorden de la memoria.

20 El término “prevención” tal como se entiende en la presente invención consiste en evitar la aparición del desorden cognitivo y/o desorden de la memoria, es decir, evitar que se produzca el desorden cognitivo y/o el desorden de la memoria en un mamífero, y preferiblemente en un humano, en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica.

La invención también se refiere, alternativamente, a un método para la prevención y/o para el tratamiento de un mamífero, incluyendo un humano, de un desorden cognitivo y/o de un desorden de la memoria, que comprende la administración a dicho mamífero, de una cantidad efectiva de la proteína RGS-14.

25

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.

30

El desorden cognitivo y/o el desorden 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 dismnnesia 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. 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.

45

En adelante, se podrá hacer referencia a cualquiera de las secuencias aminoacídicas con al menos un 80% de identidad con respecto a SEQ ID NO: 1, tal como se describe en la presente invención, con el término “proteína de la invención” o “proteína de la presente invención”.

50

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una secuencia nucleotídica que codifica para la secuencia aminoacídica o proteína de la invención para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de al menos un desorden cognitivo y/o desorden de la memoria en un mamífero, donde dicha secuencia nucleotídica forma parte de un vector de expresión que comprende dicha secuencia. El término “vector” se refiere a un fragmento de ADN que tiene la capacidad de replicarse en un determinado huésped y, como el término indica, puede servir de vehículo para multiplicar otro fragmento de ADN que haya sido fusionado al mismo (inserto). Inserto se refiere a un fragmento de ADN que se fusiona al vector; en el caso de la presente invención, el vector puede comprender cualquiera de las secuencias nucleotídicas que codifican para la proteína de la invención que, fusionadas al mismo puede replicarse en el huésped adecuado. Los vectores pueden ser plásmidos, cósmidos, bacteriófagos o vectores virales, sin excluir otro tipo de vectores que se correspondan con la definición realizada de vector. En adelante para hacer referencia al vector descrito se podrá emplear el término “vector de la invención” o “vector de la invención de la presente invención”.

60

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un producto de expresión de una secuencia nucleotídica que codifica para la proteína de la invención, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de al menos un desorden cognitivo y/o desorden de la memoria en un mamífero.

65

El término “producto de la expresión de una secuencia” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a cualquier producto resultante de la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína de la

invención. Así pues, como producto resultante de la expresión de la secuencia nucleotídica se entiende, por ejemplo, el ARN que se obtiene de la transcripción de dicha secuencia, el ARN procesado, la proteína resultante de la traducción del ARN o posteriores modificaciones de la secuencia nucleotídica en el interior de la célula siempre que la secuencia resultante tenga su origen en la secuencia original transferida o no pierda la característica funcional que la caracteriza en la presente invención. Según una realización preferida, el producto de expresión es la proteína de la invención, es decir, cualquier proteína cuya secuencia aminoacídica tiene al menos un 80% con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una composición que comprende:

- a. una secuencia nucleotídica que codifica para la proteína de la invención,
- b. un vector de expresión que comprende la secuencia nucleotídica según el apartado (a), o
- c. un producto de expresión de la secuencia nucleotídica según el apartado (a),

para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de al menos un desorden cognitivo y/o desorden de la memoria en un mamífero.

La composición, definida de forma general, es un conjunto de componentes que está formado al menos por la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína de la invención, por el vector de la invención y/o por una expresión de la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína de la invención. Según una realización preferida, dicha composición es una composición farmacéutica que además comprende un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

La composición farmacéutica es un conjunto de componentes que está formado al menos por la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína de la invención, por el vector de la invención y/o por una expresión de la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína de la invención, así como por al menos un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables, que tiene al menos una aplicación en la mejora del bienestar físico o fisiológico o psicológico de un sujeto, que implique una mejora del estado general de su salud.

El término “vehículo” o portador, es preferiblemente una sustancia inerte. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea para diluir cualquiera de los componentes de la composición farmacéutica de la presente invención hasta un volumen o peso determinado; o bien que aún sin diluir dichos componentes es capaz de permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquiera de los componentes de la composición de la presente invención, estabiliza dichos componentes o ayuda a la preparación de la composición farmacéutica 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 componentes 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. Por tanto, el término “excipiente” se define como aquella materia que, incluida en las formas galénicas, se añade a los principios activos o a sus asociaciones para posibilitar su preparación y estabilidad, modificar sus propiedades organolépticas o determinar las propiedades físico-químicas de la composición farmacéutica y su biodisponibilidad. El excipiente “farmacéuticamente aceptable” debe permitir la actividad de los compuestos de la composición farmacéutica, es decir, que sea compatible con dichos componentes. La “forma galénica o forma farmacéutica” es la disposición a que se adaptan los principios activos y excipientes para constituir un medicamento. Se define por la combinación de la forma en la que la composición farmacéutica es presentada por el fabricante y la forma en la que es administrada.

Además, el excipiente y el vehículo deben ser farmacológicamente aceptables, es decir, que el excipiente y el vehículo esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

En adelante, para hacer referencia a la composición o a la composición farmacéutica, que han sido definidas en párrafos anteriores, se podrá emplear el término “composición de la invención” o “composición de la presente invención”.

Otra realización más preferida de la presente invención se refiere al uso de la composición de la invención donde la composición farmacéutica además comprende otra sustancia activa. Además del requerimiento de la eficacia terapéutica, donde dicha composición farmacéutica 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 com-

puesto 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.

5 Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína de la invención, del producto de expresión de la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína de la presente invención, de la proteína de la invención, de la composición de la invención, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de al menos un desorden cognitivo y/o desorden de la memoria en un mamífero, donde la memoria es la memoria declarativa. La memoria declarativa contiene información referida al conocimiento sobre el mundo y sobre las experiencias vividas por cada sujeto, así como información referida al conocimiento general, sobre todo respecto a los conceptos extrapolados de situaciones vividas. La memoria declarativa puede ser memoria visual, memoria espacial, memoria episódica (pasajera) o la memoria de procesamiento de la información visual. En una realización más preferida de la presente invención, la memoria declarativa es la memoria visual, que es la memoria relacionada con la información de un objeto, una escena o un evento. Preferiblemente la memoria visual es memoria visual de reconocimiento de objetos. En otra realización más preferida, la memoria declarativa es la memoria espacial, que es la memoria sobre la información de un objeto en un sitio o posición determinados.

20 Tal como se muestra en los ejemplos de la presente invención, se llevó a cabo el ensayo del reconocimiento de un objeto. Dicho ensayo es un ensayo de la memoria declarativa que mide la capacidad de ratas y ratones para distinguir entre objetos conocidos y desconocidos.

El test de reconocimiento de objetos se realizó de forma similar a como se describió anteriormente (López-Aranda *et al.*, 2009. *Science*, 325: 87-9; Ennaceur and Delacour, 1988. *Behav Brain Res*, 31: 47-59). El ensayo de reconocimiento de objetos de la presente invención consiste en los siguientes pasos: en un primer paso, se confronta a una rata o ratón con dos objetos idénticos en una caja de exploración denominada “*Open field box*”. El sujeto examinará a fondo ambos objetos, es decir, los olfateará y los tocará. En un segundo paso, después de un intervalo de 1 hora o 24 horas, se coloca nuevamente al sujeto en el área de observación. Ahora, uno de los objetos conocidos está reemplazado por un objeto nuevo, desconocido. Cuando el sujeto reconoce el objeto conocido, principalmente examinará el objeto desconocido. Sin embargo, después de un tiempo (por ejemplo, alrededor de 1 hora para una rata), el sujeto normalmente ha olvidado qué objeto examinó en el primer paso y, por ello, inspeccionará ambos objetos de forma igualmente detallada. Esta capacidad de la memoria se expresa por medio de un índice de discriminación. Un índice de discriminación de 0.5 significa que la rata examina ambos objetos, el antiguo y el nuevo, durante un tiempo igualmente largo; es decir, no ha reconocido el objeto antiguo y reacciona ante ambos objetos como si fueran desconocidos y nuevos. Un índice de discriminación mayor de 0.66 significa que la rata inspecciona el objeto nuevo durante un tiempo más largo que el antiguo; es decir, la rata ha reconocido el objeto antiguo.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína de la invención; del producto de expresión de la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína de la presente invención; de la proteína de la invención; o de la composición de la invención, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de al menos un desorden cognitivo y/o desorden de la memoria en un mamífero, donde la memoria es la memoria operativa o la memoria a largo plazo.

La memoria operativa, también conocida como memoria a corto plazo se define como la memoria que el sujeto almacena la información por un tiempo corto. Esta memoria está limitada entre segundos hasta horas. Esta memoria se alimenta principalmente de la información que haya pasado por la memoria auxiliar de trabajo, tanto proveniente de la memoria a medio y largo plazo como de la experiencia y razonamiento del tiempo mencionado más arriba. En el ser humano, el tiempo en que esta memoria es más eficaz se corresponde con 16 horas aproximadamente, reservando aproximadamente 8 horas diarias para su mantenimiento. Seguramente, no todo el tiempo que se está dormido se utilice en limpiar la memoria a corto plazo, también se dedicará una parte importante al trasvase de información de la memoria a medio plazo a la memoria a largo plazo, por expresarlo de forma simplificada, y otras funciones de mantenimiento de carácter diverso. En la presente invención se pueden usar términos sinónimos de “memoria a corto plazo” como por ejemplo “memoria de trabajo” o “memoria operativa”.

La memoria a largo plazo es aquella en la que se almacenan los recuerdos vividos, nuestro conocimiento acerca del mundo, imágenes, conceptos, estrategias de actuación, etc. Se considera la memoria en la que se inserta la información a través de la memoria de trabajo o memoria a corto plazo, para usarla posteriormente.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína de la invención, del producto de expresión de la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína de la presente invención, de la proteína de la invención, de la composición de la invención, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de al menos un desorden cognitivo y/o desorden de la memoria en un mamífero, donde el desorden cognitivo y/o desorden de la memoria se produce en un mamífero que tiene una enfermedad neurológica, una enfermedad neurodegenerativa o un desorden del desarrollo cerebral, en cualquier fase de desarrollo de cualquiera de dichas enfermedades o desórdenes.

El desorden cognitivo y/o el desorden de la memoria pueden estar asociados con un gran número de enfermedades neurológicas, neurodegenerativas o 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.

5 El desorden de la memoria puede deberse a uno o varios desórdenes neuropsiquiátricos como la esquizofrenia, la epilepsia, el autismo, el desorden de déficit de atención, la hiperactividad infantil con déficit de atención, enfermedad relacionada con la ansiedad, desorden alimenticio, desorden por drogas de abuso, trastorno de personalidad u otra enfermedad mental.

10 Una realización más preferida de la presente invención se refiere al uso de la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína de la invención; del producto de expresión de la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína de la presente invención; de la proteína de la invención o de la composición de la invención, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de al menos un desorden cognitivo y/o desorden de la memoria en un mamífero, donde el desorden cognitivo y/o desorden de la memoria se produce en un mamífero que tiene una enfermedad neurológica donde dicha enfermedad neurológica es Alzheimer, o donde el desorden cognitivo y/o desorden de la memoria se produce en dicho mamífero como consecuencia del envejecimiento.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína de la invención; del producto de expresión de la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína de la presente invención; de la proteína de la invención o de la composición de la invención, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de al menos un desorden cognitivo y/o desorden de la memoria en un mamífero, donde cualquiera de dichos productos (principio activo) se presentan en una forma adaptada a la administración oral, parenteral, o adaptada a la administración directa en el cerebro. La administración directa en el cerebro se lleva a cabo preferiblemente por medio de inyección en el cerebro vía cirugía.

25 El principio activo (secuencia nucleotídica que codifica para la proteína de la invención; vector que la comprende; producto de expresión de la misma o proteína de la invención) puede actuar sistémica y/o localmente. Preferiblemente el principio activo actúa en las neuronas del área V2 de la corteza visual secundaria. Más preferiblemente el principio activo actúa en las neuronas de la capa V6 del área V2 de la corteza visual secundaria. Para este fin, dicho principio activo puede administrarse de forma apropiada como por ejemplo, por vía oral, parenteral, pulmonar, nasal, sublingual, lingual, bucal, rectal, transdérmica, conjuntival, ótica, inyección en el cerebro vía cirugía o como implante. En cada caso la forma de presentación del medicamento se adaptará al tipo de administración utilizada, por ello, el principio activo 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 farmacéutica 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.

30 Para la administración oral, son apropiadas formas farmacéuticas en sí conocidas, que suministran el principio activo de forma rápida y/o modificada como, por ejemplo, comprimidos (tanto comprimidos no recubiertos, como recubiertos, por ejemplo, por cubiertas resistentes al jugo gástrico), cápsulas, grageas, granulados, gránulos, polvos, emulsiones, suspensiones y soluciones.

La administración parenteral puede realizarse evitando un paso de reabsorción (en forma endovenosa, intrarterial, intracardiaca, intraespinal o intralumbar) o intercalando una reabsorción (en forma intramuscular, subcutánea, intracutánea, percutánea, o intraperitoneal). Para la administración parenteral, entre otras, son apropiadas formas farmacéuticas en forma de preparaciones inyectables y para infusión, en forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, liofilizados o polvos estériles.

Para las otras vías de administración, son apropiadas, por ejemplo, formas medicamentosas para inhalar (entre otros, inhaladores de polvo, nebulizadores), gotas nasales/soluciones nasales, aerosoles; comprimidos de administración lingual, sublingual o bucal, o cápsulas, supositorios, preparados óticos y oftálmicos, cápsulas vaginales, suspensiones acuosas (lociones, mezclas para agitar), suspensiones lipófilas, pomadas, cremas, leche, pastas, polvos esparcibles o implantes.

55 Los principios activos pueden transferirse de manera conocida a las formas farmacéuticas nombradas. Esto se realiza usando coadyuvantes farmacéuticos apropiados inertes no tóxicos. A éstos, entre otros, pertenecen vehículos (por ejemplo, celulosa micro-cristalina), disolventes (por ejemplo, polietilenglicoles líquidos), emulsionantes (por ejemplo, dodecilsulfato de sodio), agentes dispersantes (por ejemplo, polivinilpirrolidona), bio-polímeros sintéticos y naturales (por ejemplo, albúmina), estabilizantes (por ejemplo, antioxidantes como ácido ascórbico), colorantes (por ejemplo, pigmentos inorgánicos como óxidos de hierro) o correctores del sabor y/o del olor.

La cantidad administrada de principio activo variará en función del peso corporal del sujeto que se desea tratar, de la vía de administración, del comportamiento individual frente al principio activo, del tipo de preparación y del momento o intervalo, en el que se efectúa la administración.

65 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.

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

## 5 Descripción de las figuras

Fig. 1. *Muestra cómo la expresión de la proteína RGS-14 en neuronas de la capa 6 del área V2 produce tanto la recuperación como la prevención de la pérdida de ORM observada en ratas viejas.*

10 Las figuras muestran el índice de discriminación (ORM, de las siglas en inglés *Object Recognition Memory*) de ratas control (sin tratamiento; barras blancas), ratas control vehículo (a las que se les ha administrado el vector que no contiene la secuencia que codifica para la proteína RGS-14; barra gris) así como ratas tratadas con el vector que contiene la secuencia que codifica para dicha proteína (barras negras).

15 (a) Las ratas tienen 3, 18 o 22 meses de edad y el periodo de ensayo para medir el índice de discriminación fue de 45 minutos, 60 minutos o 24 horas según se indica en la figura.

(b) Las ratas tienen 3, 5, 8, 11, 18 y 22 meses de edad y el periodo de ensayo para medir el índice de discriminación fue de 60 minutos o 24 horas según se indica en la figura

20 D: índice de discriminación (ORM).

X: Edad en meses.

25 El asterisco indica una pérdida de ORM significativa cuando es comparada con los animales controles normales de 3 meses de edad. Los rombos muestran una potenciación significativa en ORM cuando es comparada con los animales de 18 meses de edad en (a) y con los controles tratados con el vehículo en (b) ( $P < 0.05$ ).

30 Fig. 2. *Muestra la prevención y recuperación de la pérdida de ORM en ratones AD mediante la administración de la proteína RGS-14 en neuronas de la capa 6 del área V2.*

35 Las figuras muestran el índice de discriminación (ORM) de ratones control tipo salvaje sanos sin tratamiento (barras blancas), ratones modelo de la enfermedad de Alzheimer sin tratamiento (barra gris) así como ratones modelo de la enfermedad de Alzheimer tratados con el vector que contiene la secuencia que codifica para la proteína RGS-14 (barras negras).

(a) Los ratones tienen 2, 4 ó 7 meses de edad.

40 (b) Los ratones tienen 4 y 7 meses de edad.

(c) Los ratones tienen 10 y 12 meses de edad.

45 D: índice de discriminación (ORM).

X: Edad en meses.

50 Los asteriscos simbolizan una pérdida de ORM significativa y los rombos muestran una potenciación significativa de la ORM cuando es comparada con los controles de tipo silvestre y ratones AD respectivamente ( $P < 0.05$ ).

Fig. 3. *Muestra la localización de la proteína RGS-14 en el cerebro de rata.*

55 Las secciones de cerebro fueron montadas y analizadas mediante el fluorocromo RGS-DsRed. A continuación se presenta una imagen de la fluorescencia observada en las secciones secuenciales coronales (a) y sagitales (b). En conjunto, a y b proporcionan una vista de 360 grados del área de localización de la proteína RGS-14 observada en el cerebro. Las proteínas RGS-14 se localizaron en la capa 6 del área V2 (V2). En el córtex cerebral (Ctx), la localización del área V2 está indicada por una línea de puntos que va a través de todas las capas del Ctx y que es más oscuro que el resto del Ctx. Cc, Cuerpo Calloso; Hp, Hipocampo.

60

Fig. 4. *Muestra la pérdida de ORM en ratas a los 18 meses de edad a las que se ha administrado el control-vehículo (sin la secuencia que codifica para la proteína RGS-14).*

65 Se muestra el índice de discriminación (ORM) de ratas control a las que se ha administrado el vehículo (sólo el vector) a los 3 y 18 meses de edad. El periodo de ensayo para medir el índice de discriminación fue de 45 minutos. Los valores se presentan como la media  $\pm$  SEM del número (n) de animales, que están indicados entre paréntesis debajo de cada columna. D: índice de discriminación (ORM). X: Edad en meses.

Fig. 5. Muestra la localización de la proteína RGS-14 en el cerebro de ratones.

Se muestra una imagen de la localización de la proteína en el cerebro de los ratones. La proteína RGS-14 se encontró en la capa 6 del área V2 (V2). La localización del área V2 en córtex está claramente marcada en ambas secciones. Cc, Cuerpo calloso; Ctx, córtex; Hp, Hipocampo.

Fig. 6. Muestra las placas A $\beta$  en hipocampos de ratones modelo de la enfermedad de Alzheimer(AD)+RGS a los 8 y 12 meses de edad.

Se detectó un elevado número de placas A $\beta$  en los ratones a la edad de 12 meses de edad (12M) (b) en comparación con los de 8 meses de edad (8M) (a). No hubo diferencias entre los cerebros de los grupos ratones-AD y AD+RGS.

## 15 Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención, sin servir de limitación, mediante unos ensayos realizados por los inventores que describen el efecto de la administración de la proteína RGS-14 en la memoria de animales con envejecimiento normal y con enfermedad de Alzheimer mostrando que esta proteína puede ser utilizada como fármaco para el tratamiento y/o prevención de la pérdida de memoria declarativa en sujetos ya que la expresión de la proteína RGS-14 en el área V2 no sólo corrigió la pérdida de ORM, memoria de reconocimiento de objetos (de las siglas en *Object Recognition Memory*, ORM), observada en ratas viejas normales y en ratones que desarrollan la enfermedad de Alzheimer (AD), sino que también previno su aparición, tal como puede observarse en los siguientes ejemplos.

### 25 Ejemplo 1

#### *Uso de la proteína RGS-14 en el tratamiento de la pérdida de la memoria declarativa*

La “memoria declarativa”, también conocida como “memoria explícita” contiene información referida al conocimiento sobre el mundo y sobre las experiencias vividas por cada sujeto (memoria episódica), así como información referida al conocimiento general, sobre todo respecto a los conceptos extrapolados de situaciones vividas (memoria semántica). En la presente invención se ha empleado la memoria visual como representación de la memoria declarativa. Para evaluar el estado de la memoria visual se utilizó una tarea de comportamiento de ORM, un test conocido como referente de la memoria declarativa. En este test, ratas *Wistar Han* de 3-24 meses de edad fueron expuestas a dos objetos idénticos durante un periodo de tiempo en un espacio abierto y entonces fueron analizados para determinar la duración de la retentiva de la información del objeto en la memoria. Aquí los resultados son presentados como un índice de discriminación donde los valores mayores de 0.66 indican que los animales fueron capaces de guardar la información del objeto en la memoria. De forma similar a como se mostró anteriormente (López-Aranda *et al.* 2009. *Science*, 325: 87-89), se observó que cuando las ratas normales de 3 meses eran expuestas a dos objetos idénticos durante 3 minutos, pudieron retener la información del objeto en la memoria durante 45 minutos (Fig. 1a), pero sin embargo no fueron capaces de hacerlo durante 60 minutos (Fig. 1a). Esta ORM limitada de 45 minutos es referida aquí como una ORM normal y al sobrepasar este límite se considera como un incremento en la ORM. Por el contrario, la reducción en la ORM normal es considerada como una pérdida de ORM.

#### *Tratamiento ratas de 18 meses de edad con deficiencia en la ORM*

Utilizando esta estrategia, se observó que las ratas de 3 meses de edad tenían una ORM normal, pero cuando se examinó a las mismas ratas con 18 meses de edad, se observó una pérdida en la ORM (Fig. 1a). Es más, la expresión de las proteínas RGS-14 a través de la liberación de lentivirus de RGS-14 en neuronas de la capa 6 del área V2 de estas ratas de 18 meses de edad con deficiencia en la ORM condujo no sólo a la completa recuperación de la pérdida de ORM, sino que transformó la ORM normal de 45 minutos de duración en ORM a largo plazo (Fig. 1a; 22 meses en intervalos de 60 minutos y 24 horas). La confirmación de la localización de la proteína RGS-14 en neuronas de la capa 6 del área V2 se realizó en las ratas RGS mediante el análisis de secciones seriadas de cerebro coronales y sagitales (Fig. 3). A diferencia del tratamiento con el vector lentivirus-RGS-14, la inyección del vector lentivirus sin la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína (control vehículo) no produjo ningún efecto en las ratas de 3 meses de edad, que al igual que las ratas normales, al alcanzar los 18 meses de edad mostraron también una pérdida en la ORM normal (Fig. 4). Tal como se muestra en la Fig. 4, las ratas inyectadas con el vehículo (sólo el vector) mostraron una ORM normal de 45 minutos a los 3 meses de edad, pero mostraron una pérdida sustancial de ORM a la edad de 18 meses. Por tanto, estos resultados, junto con la observación de ningún efecto sobre la potenciación de la ORM probada a los 5 meses de edad (Fig. 1b), sugieren que la inyección del vector no tiene ningún efecto en la ORM y que la prolongada potenciación de la memoria en las ratas fue debido a la expresión de la proteína RGS-14. Por tanto, los resultados de estos estudios demuestran que las proteínas RGS-14 son altamente eficaces en la recuperación de la pérdida de ORM observada en ratas viejas.

## Ejemplo 2

*Prevención de la pérdida de la memoria declarativa*

5 A continuación, se ensayó si la expresión de esta proteína en ratas jóvenes prevenía la pérdida de la ORM normal observada en los animales de 18 meses de edad. Para ello, se utilizaron ratas jóvenes de 3 meses de edad con ORM normal de 45 minutos pero no de 60 minutos a las que se les inyectó lentivirus RGS-14 en neuronas de la capa 6 del área V2 para la expresión de proteínas RGS-14. Se hizo un seguimiento del estado de la ORM de estos animales hasta la edad de 22 meses (Fig. 1b). Tal como se muestra en la Fig. 1b, tanto las ratas normales (3 meses) como las controles tratadas con el vehículo (5 meses) fueron incapaces de retener la información del objeto en la memoria en un intervalo de tiempo de 60 minutos. La expresión de la proteína RGS-14 en ratas normales de 3 meses de edad produjo una potenciación en la ORM y este efecto persistió hasta que los animales fueron capaces de comportarse eficazmente (5-22 meses; intervalos de 60 minutos y 24 horas). Esta potenciación de la ORM mediada por la proteína RGS previno la aparición de la pérdida de ORM observada en animales normales de 18 meses de edad.

15 Como puede observarse en la Fig. 1b, los animales tratados con la proteína RGS-14 mostraron un aumento en la ORM normal que fue detectado después de un intervalo de 60 minutos. Además, este elevado nivel de memoria se mantuvo a lo largo de 22 meses, tiempo en que los animales fueron capaces de desempeñar eficazmente la tarea de ORM (Fig. 1b; edades de 5-22 meses en intervalos de 60 minutos y 24 horas). Se realizó un intento para evaluar el nivel de ORM de estos animales a los 24 meses de edad. Aunque sólo participaron 3 animales en el test, todos ellos mostraron un nivel de memoria alto. En los experimentos de control, la inyección del vehículo lentivirus en lugar del RGS-lentivirus no produjo ningún efecto (Fig. 1b), lo cual indica que el aumento de la memoria estaba asociado únicamente a la proteína RGS-14. Se encontró que la estimulación de las neuronas de la capa 6 del área V2 mediante la expresión de esta proteína fue suficiente para recuperar, así como para prevenir, la pérdida de la ORM observada en ratas viejas normales.

## Ejemplo 3

*Tratamiento y prevención de la pérdida de la memoria de reconocimiento de objetos en ratones modelo de la enfermedad de Alzheimer*

30 Se utilizaron ratones transgénicos *hAPPSwInd* modelos de la enfermedad de Alzheimer de 2-12 meses de edad. Se comprobó si la expresión de proteínas RGS-14 en neuronas de la capa 6 del área V2 produciría un efecto similar en los ratones transgénicos modelos de la enfermedad de Alzheimer (ratones AD) en los que también se ha encontrado un déficit en la ORM (Escribano, *et al.* 2009. *Biochem Biophys Res Commun*, 379: 406-10; Escribano, *et al.* 2010. *Neuropsychopharmacology*, 35: 1593-604). A diferencia de las ratas, siguiendo el protocolo mencionado en apartados anteriores, los ratones AD fueron expuestos 2 veces durante 10 minutos a 2 objetos idénticos, apartándolos 10 minutos, y se examinó el estado de la ORM después de un intervalo de 24 horas (Escribano, *et al.* 2009. *Biochem Biophys Res Commun*, 379: 406-10). Bajo estas condiciones, la retentiva de la información del objeto en la memoria fue considerada como ORM normal en los experimentos de ratones AD (Escribano, *et al.* 2009. *Biochem Biophys Res Commun*, 379: 406-10; Escribano, *et al.* 2010. *Neuropsychopharmacology*, 35: 1593-604). Los ratones AD mostraron una ORM normal a los 2 meses de edad, mientras que a la edad de 4 meses se observó una pérdida en ORM (Fig. 2a, b). Es más, la expresión de proteínas RGS-14 en neuronas de la capa 6 del área V2 en ratones AD de 2 meses de edad, un periodo anterior a la aparición del déficit de ORM, previno la pérdida de ORM observada en los ratones AD de 4 meses de edad (Fig. 2a). Estos animales AD+RGS mostraron una memoria normal cuando fueron examinados a la edad de 7 meses (Fig. 2a).

55 Tal como se muestra en la Fig. 2a, los ratones AD de 2 meses de edad mostraron una ORM normal, mientras que se observó una pérdida sustancial de ORM en animales de 4 y 7 meses de edad. La expresión de la proteína RGS-14 en los animales de 3 meses de edad (AD+RGS) previno la pérdida de ORM. En la Fig. 2b se muestran la recuperación de ratones AD de 4 meses de edad con deficiencia de ORM inoculados con lentivirus RGS para la expresión de la proteína RGS-14. La recuperación de la pérdida de ORM y su normalización se observó hasta la edad de 7 meses. En la Fig. 2c se observa cómo la normalización de la ORM perduró hasta los 10 meses de edad en estos ratones AD+RGS, ya que a los 12 meses de edad se observó un declive en la función normal de ORM.

60 La confirmación de la localización de la proteína RGS-14 en neuronas de la capa 6 del área V2 de los ratones AD+RGS se realizó mediante el análisis de secciones de cerebro seriadas coronales y sagitales (Fig. 5). Al igual que en los experimentos anteriores de ratas, se examinó el efecto de las proteínas RGS-14 en la deficiencia de ORM en ratones AD donde la pérdida de ORM ya estaba presente.

65 Los ratones AD con deficiencia de ORM ya establecida (de 5 meses de edad) fueron inyectados con lentivirus RGS-14 en neuronas de la capa 6 del área V2 y se evaluó su estado de ORM. Después del tratamiento, estos animales AD+RGS mostraron una completa recuperación en su nivel de ORM normal (Fig. 2b; 7 meses). Considerando el efecto potenciador de la memoria a largo plazo de la proteína RGS-14 en ratas, se ensayó el tiempo que se mantenía la ORM normal en estos ratones. Los resultados muestran que los ratones AD+RGS mantuvieron el nivel normal de ORM hasta la edad de 10 meses. Sin embargo, a los 12 meses de edad estos ratones fallaron en el mantenimiento del nivel normal de ORM y comenzaron a mostrar un declive (Fig. 2c). La aparición de la pérdida de ORM observada en los animales de 12 meses de edad puede estar causada por un mecanismo diferente del observado en la edad de 4 meses

ya que el inicio de formación de placas del péptido  $\beta$  amiloide ( $A\beta$ ) es observada a la edad de 6 meses, a diferencia de los 4 meses de edad donde no existen placas de péptido  $A\beta$ , mientras que a la edad de 12 meses se observó una gran cantidad de placas de péptido  $A\beta$  (Fig. 6). Además, en estos ratones AD de edad avanzada se ha visto que las placas del péptido  $A\beta$  están localizadas principalmente en hipocampo y áreas parahipocampales, estructuras que pertenecen al sistema del lóbulo temporal medio (MTL) (Squire, *et al.*, 2004. *Annu Rev Neurosci*, 27: 279-306) cuya integridad se cree que es importante para una función adecuada de la ORM (Squire, *et al.*, 2007. *Nat Rev Neurosci*, 8: 872-83; Eichenbaum, *et al.*, 2007. *Annu Rev Neurosci*, 30: 123-52; Murray *et al.*, 2007. *Annu Rev Neurosci*, 30: 99-122). Y no se localizó ninguna placa de péptido  $A\beta$  en el área V2. Así, es posible argumentar que el deterioro de la ORM en los ratones AD+RGS en edad avanzada es quizás debido a la degradación de las conexiones sinápticas dentro del MTL y no a una limitación en el efecto potenciador de la memoria de la proteína RGS-14. Es más, se ha observado que el péptido  $A\beta$  produce una pérdida sináptica y, como resultado, una interrupción en la comunicación neuronal (Mucke, L. *et al.* 2000. *J Neurosci*, 20: 4050-8; Selkoe, 2002. *Science*, 298: 789-91; Palop and Mucke, 2010. *Nat Neurosci*, 13: 812-8).

## 15 Materiales y métodos

*Preparación de Lentivirus.* El cDNA humano de RGS-14 (Número de acceso de GenBank AY987041) fue clonado en el Gateway vector pLenti6/Ubc/V5-DEST o en el vector pLVX-DsRed-Monomer-C1 y el Lentivirus de RGS-14 fue producido de acuerdo con los protocolos de los Sistemas de Expresión Lentiviral ViraPower™ de Invitrogen y Sistemas de Expresión Lentiviral Lenti-X™ de Clontech, respectivamente. La eficacia de ambos tipos de lentivirus fue igualmente buena.

*Animales.* Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las pautas del Comité Institucional del Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Málaga (ratas) y de la Universidad de Navarra (ratones). Tanto las ratas como los ratones fueron alojadas en una habitación con temperatura controlada ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y con un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad. El agua de bebida y la comida estuvieron disponibles *ad libitum*. Los animales fueron aclimatados en la habitación durante al menos una semana antes de comenzar los experimentos, los cuales se llevaron a cabo durante el ciclo de luz.

- *Ratas.* Para este estudio se utilizaron Ratas *Wistar Han*, que fueron alojadas individualmente en jaulas estandarizadas.

- *Ratones transgénicos.* Para este estudio se utilizaron ratones transgénicos *hAPPSwInd* (J20) del laboratorio *Jackson Lab* (número de stock 006293). Estos ratones expresan una forma mutante de la APP portadora de las mutaciones *Swedish* (K670N/M671L) e *Indiana* (V717F) de la enfermedad familiar de Alzheimer (Mucke, L. *et al.* 2000. *J Neurosci*, 20: 4050-8). La expresión mutante de APP está dirigida en neuronas bajo el control de un promotor del Factor de Crecimiento de Cadena  $\beta$  Derivado de Plaqueta humana (*Platelet-derived growth factor  $\beta$  chain*; PDGFB). Estos ratones tienen una base genética endogámica de C57BL/6J. La aparición de los depósitos de  $A\beta$  ha sido observada a la edad de 6 meses. Estos ratones muestran discapacidades niveles sináptico y cognitivo entre otras características de la enfermedad de Alzheimer y han sido ampliamente usados para estudios cognitivos (Mucke, L. *et al.* 2000. *J Neurosci*, 20: 4050-8; Chin, *et al.*, 2005. *Neurosci*, 25: 9694-703; Palop *et al.* 2003. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 9572-7). También ha sido observada una drástica pérdida en la ORM en estos ratones. Se utilizaron como controles ratones de la cepa silvestre C57BL/6J. En cada jaula se enjaularon entre cuatro y cinco ratones.

*Inoculación de Lentivirus.* Ratas (290-460 gramos) y ratones (18-26 gramos) fueron anestesiados con ketamina (75 mg/Kg, i.p.) y medetomidina (0.5 mg/kg) y fueron colocados en un aparato estereotáxico de acuerdo con las coordenadas obtenidas de los atlas *Stereotaxic Coordinates of The Rat Brain* de G. Paxinos y C. Watson (cuarta edición) y *The Mice Brain* de G. Paxinos y K.B.J. Franklin (segunda edición). Las coordenadas del lugar de la inyección en la capa 6 del área V2 de la corteza visual fueron AP -4.3, ML  $\pm$  2.1, DV -1.9 (ratas) y AP -2.3 ML  $\pm$  1.3, DV -0.7 (ratones). Se inyectó un volumen de 2  $\mu$ l de la solución stock titulada de 2.1 x 10<sup>7</sup> TU/ml de manera unilateral mediante una cánula interna de acero inoxidable de un espesor 30. A los animales se les dejó un tiempo de recuperación de 14 días antes de comenzar el entrenamiento de comportamiento. Los tests de ORM fueron realizados después de 3 semanas de la inyección.

*Tests de memoria de reconocimiento de objetos en ratas.* El estudio de ORM se realizó de forma similar a como se describió anteriormente (López-Aranda *et al.*, 2009. *Science*, 325: 87-9; Ennaceur and Delacour, 1988. *Behav Brain Res*, 31: 47-59). Previo al test, las ratas fueron manipuladas ocho minutos diariamente durante cinco días consecutivos y los siguientes dos días fueron acostumbradas a estar en un espacio abierto (100 x 100 x 50 cm) durante 12 minutos. El día del experimento y durante las sesiones de exploración, las ratas fueron colocadas en el mismo espacio abierto con 2 objetos idénticos y se les permitió explorar libremente durante 3 minutos. Tras un intervalo de 45 minutos o mayor, se examinó el estado de ORM de los animales mediante un objeto anteriormente presentado y un objeto nuevo. El tiempo de exploración fue registrado tanto durante la exploración como en las sesiones de tests de ORM.

Los objetos incluidos en este estudio fueron botellas y recipientes de diferentes formas hechos de plástico y de cristal. Los objetos fueron seleccionados de forma que el animal no pudiera sentarse ni volcarlo y tuvieran de un tamaño similar al de las ratas. La localización del objeto nuevo fue cambiada a derecha o izquierda al azar. Los animales hicieron 1 test por día durante 2 días consecutivos en un momento concreto. Los objetos mostrados durante las sesiones de examen (exploración + test) no se presentaron más al mismo animal. Tanto el espacio abierto como los objetos

fueron limpiados después de cada sesión. Las sesiones fueron grabadas en vídeo. Los tiempos de exploración fueron calculados usando un cronómetro durante la sesión por una persona y por 1-2 observadores independientes mirando el vídeo. Normalmente, las variaciones entre los observadores fueron de 0-2 segundos. El tiempo de exploración fue contabilizado sólo cuando el animal tocaba el objeto con la nariz. Levantarse apoyándose en el objeto o mirar el objeto no fue contabilizado.

Todas las sesiones y el cálculo de tiempo fueron realizadas por personas con conocimientos de la condición animal. El índice discriminatorio se calculó dividiendo el tiempo empleado en la exploración del objeto nuevo entre el tiempo total de exploración (objeto nuevo+objeto antiguo). Un índice de 0.5 refleja que los animales no fueron capaces de retener la información del objeto en la memoria, mientras que un índice más alto indica que los animales sí pudieron hacerlo.

*Tests de memoria de reconocimiento de objetos en ratones.* Los tests de ORM en ratones fueron muy parecidos a los de las ratas, con algunas salvedades. El espacio abierto utilizado fue menor (50 x 35x 50 cm.) Una hora antes del test, a los ratones se les permitió explorar el espacio abierto durante 5 minutos. Después, en la sesión de exploración, los ratones fueron expuestos dos veces durante 10 minutos a 2 objetos idénticos, con una separación temporal de 10 minutos. En las sesiones de examen de ORM, la retención de información del objeto en la memoria se evaluó después de un intervalo de 24 horas.

Los objetos utilizados en este estudio con ratones fueron juguetes, botes pequeños y objetos decorativos hechos de plástico o de cristal. La altura de los objetos fue aproximadamente igual al tamaño de los ratones.

*Estadística.* La significación estadística entre el tiempo de exploración de los objetos antiguos y nuevos tanto en los animales control como en los animales RGS fue analizada mediante el Test *t de Student* con el programa informático *SigmaStat*. Los valores de *p* menores de 0.05 se consideraron significativos.

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 80% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1, que corresponde a la proteína RGS-14 de humanos, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de al menos un desorden cognitivo y/o desorden de la memoria en un mamífero.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, donde dicha secuencia nucleotídica forma parte de un vector de expresión que comprende dicha secuencia.
- 15 3. Uso de un producto de expresión de una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 80% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de al menos un desorden cognitivo y/o desorden de la memoria en un mamífero.
- 15 4. Uso según la reivindicación 3, donde el producto de expresión es una proteína cuya secuencia aminoacídica tiene al menos un 80% con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 20 5. Uso de una composición que comprende:
- 20 a. una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 80% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1,
- 25 b. un vector de expresión que comprende la secuencia nucleotídica según el apartado (a), o
- 25 c. un producto de expresión de la secuencia nucleotídica según el apartado (a),
- para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de al menos un desorden cognitivo y/o desorden de la memoria en un mamífero.
- 30 6. Uso de la composición según la reivindicación 5, donde dicha composición es una composición farmacéutica que además comprende un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.
- 35 7. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, que además comprende otro principio activo.
- 40 8. Uso de la secuencia nucleotídica según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, del producto de expresión según se describe en la reivindicación 3, de la proteína según se describe en la reivindicación 4 o de la composición según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, donde la secuencia nucleotídica que codifica para la secuencia aminoacídica de la proteína RGS-14 es SEQ ID NO: 12.
- 45 9. Uso de la secuencia nucleotídica según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, del producto de expresión según se describe en la reivindicación 3, de la proteína según se describe en la reivindicación 4 o de la composición según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, donde la secuencia aminoacídica que tiene al menos un 80% con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1 es la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 50 10. Uso de la secuencia nucleotídica según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, del producto de expresión según se describe en la reivindicación 3, de la proteína según se describe en la reivindicación 4, de la composición según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, o uso según la reivindicación 8 o según la reivindicación 9, donde la memoria es la memoria declarativa.
- 50 11. Uso según la reivindicación 10, donde la memoria declarativa es la memoria visual.
- 55 12. Uso de la secuencia nucleotídica según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, del producto de expresión según se describe en la reivindicación 3, de la proteína según se describe en la reivindicación 4, de la composición según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, o uso según la reivindicación 8, donde la memoria es la memoria operativa.
- 60 13. Uso de la secuencia nucleotídica según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, del producto de expresión según se describe en la reivindicación 3, de la proteína según se describe en la reivindicación 4, de la composición según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, o uso según la reivindicación 8 o según la reivindicación 9, donde la memoria es la memoria a largo plazo.
- 65 14. Uso de la secuencia nucleotídica según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, del producto de expresión según se describe en la reivindicación 3, de la proteína según se describe en la reivindicación 4, de la composición según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, o uso según la reivindicación 8 o según la reivindicación 9, donde el desorden cognitivo y/o desorden de la memoria se produce en un mamífero que tiene una enfermedad neurológica, una enfermedad neurodegenerativa o un desorden del desarrollo cerebral.

15. Uso según la reivindicación 14, donde la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer.

5 16. Uso de la secuencia nucleotídica según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, del producto de expresión según se describe en la reivindicación 3, de la proteína según se describe en la reivindicación 4, de la composición según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, o uso según la reivindicación 8 o según la reivindicación 9, donde el desorden cognitivo y/o desorden de la memoria se produce en dicho mamífero como consecuencia del envejecimiento.

10 17. Uso de la secuencia nucleotídica según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, del producto de expresión según se describe en la reivindicación 3, de la proteína según se describe en la reivindicación 4, de la composición según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, o uso según la reivindicación 8 o según la reivindicación 9, donde cualquiera de dichos productos se presentan en una forma adaptada a la administración oral, parenteral o adaptada a la administración directa en el cerebro.

15

20

25

30

35

40

45

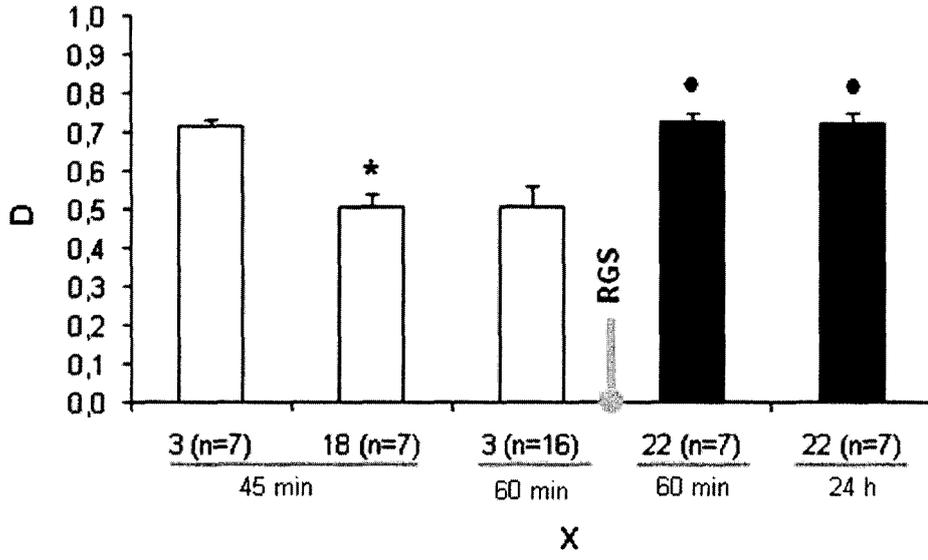
50

55

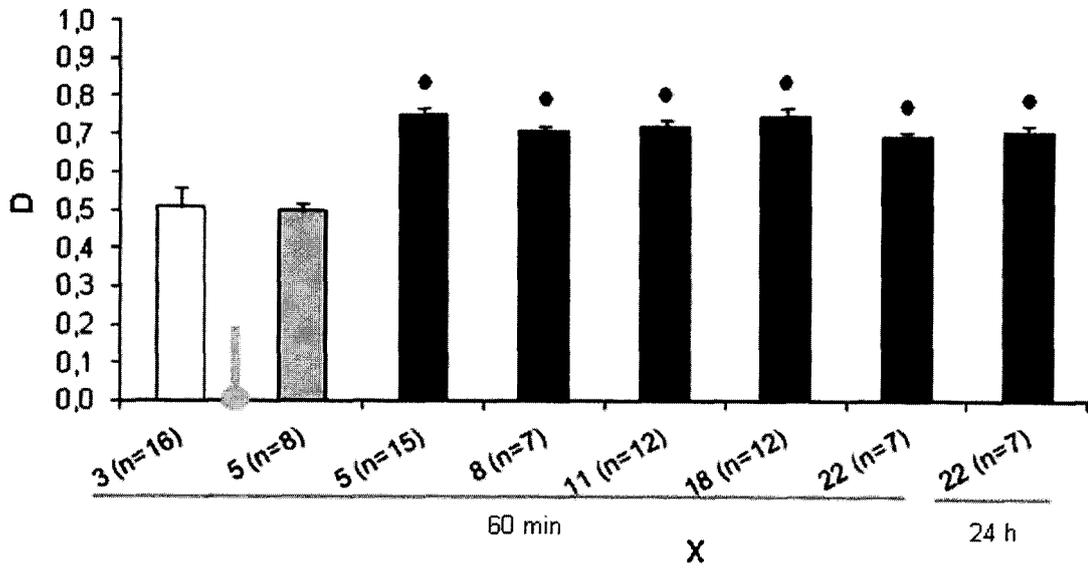
60

65

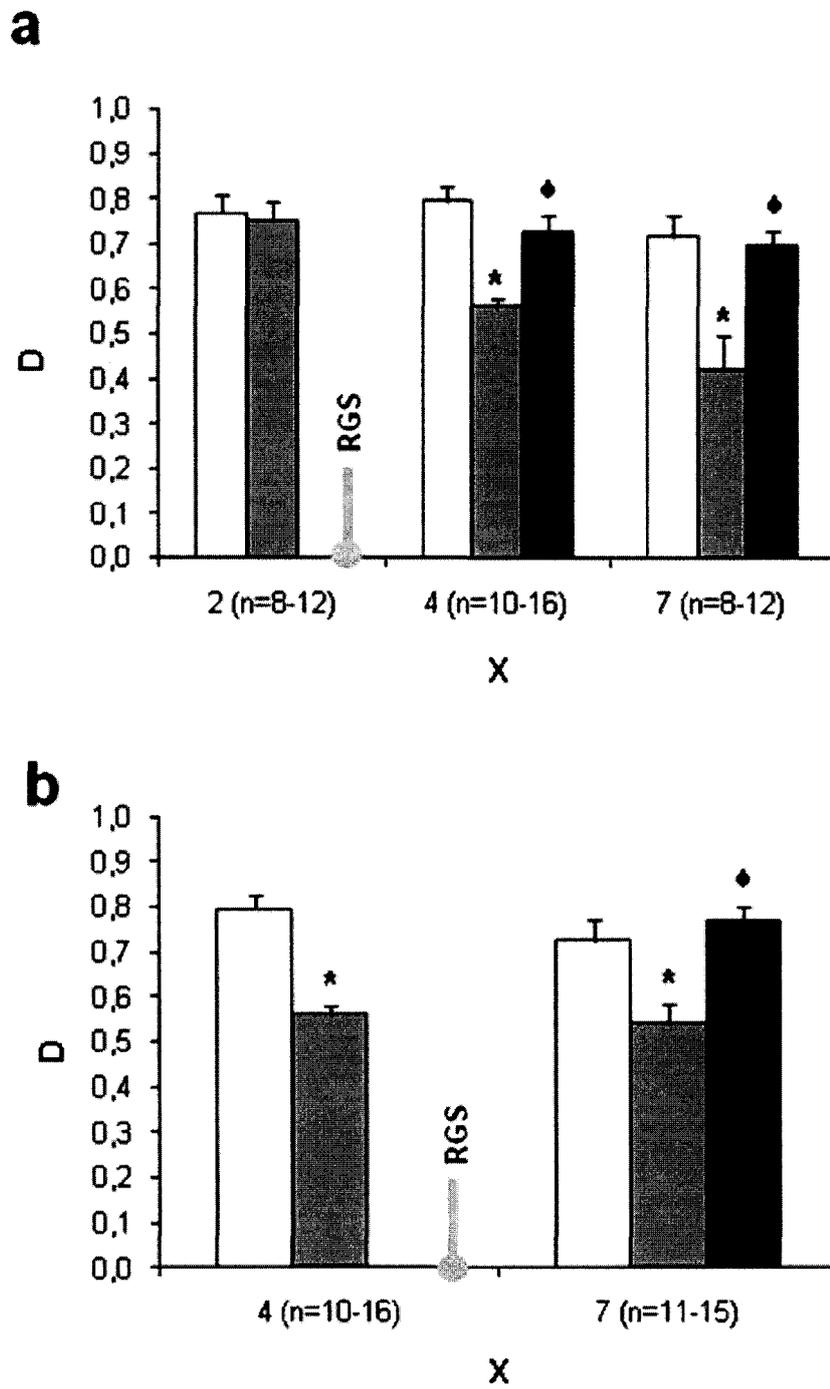
**a**



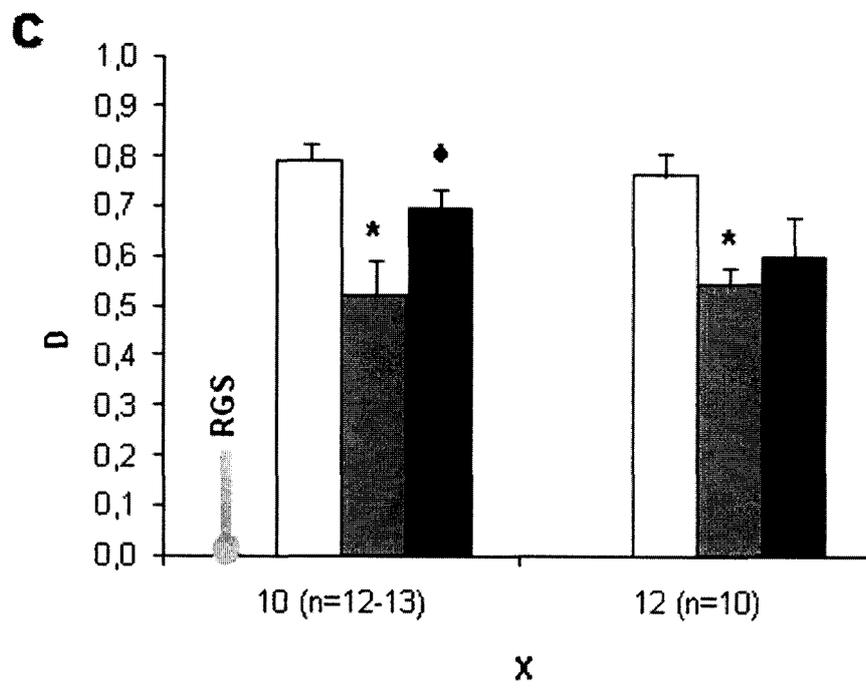
**b**



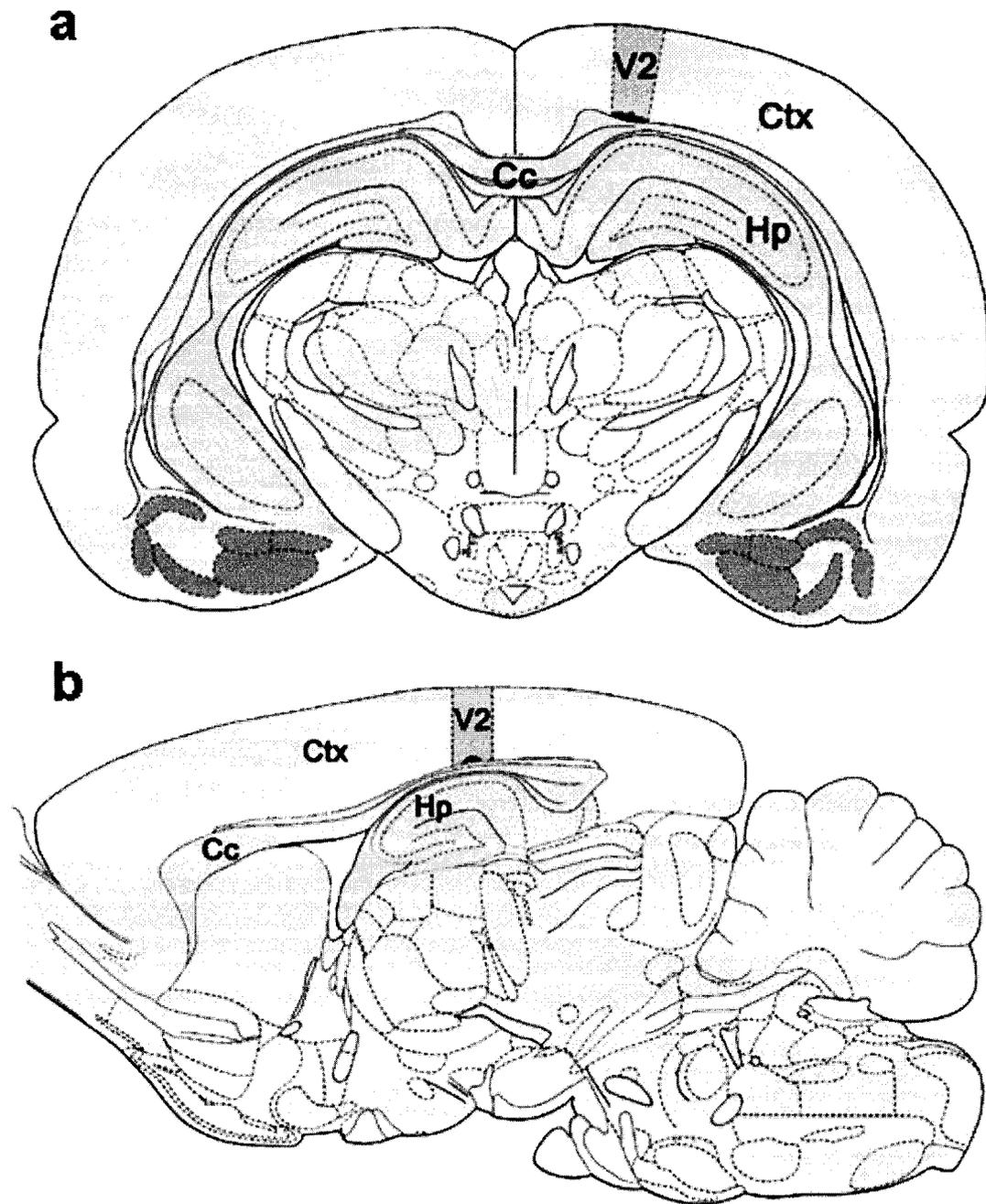
**FIG. 1**



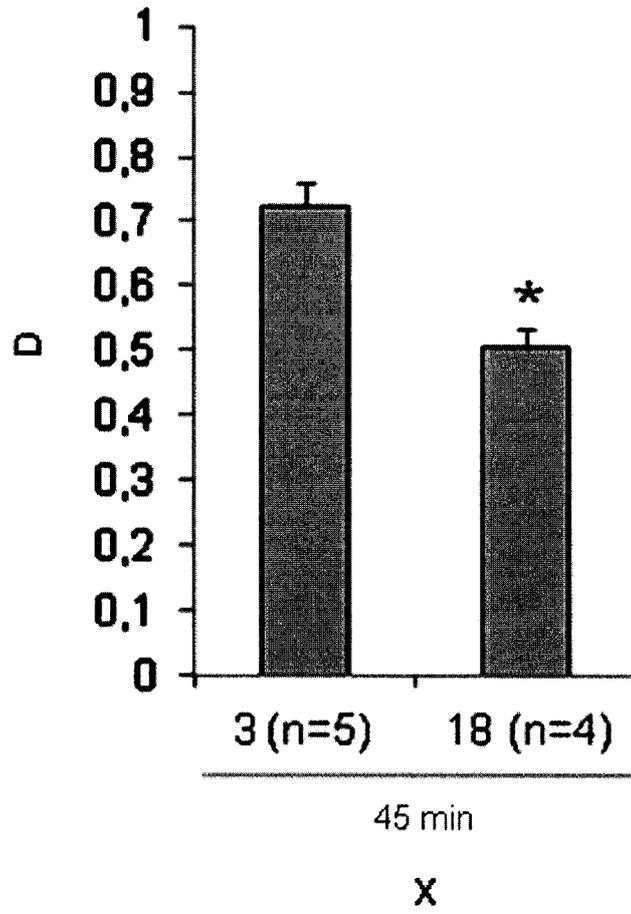
**FIG. 2**



**FIG. 2 (Cont.)**



**FIG. 3**



**FIG. 4**

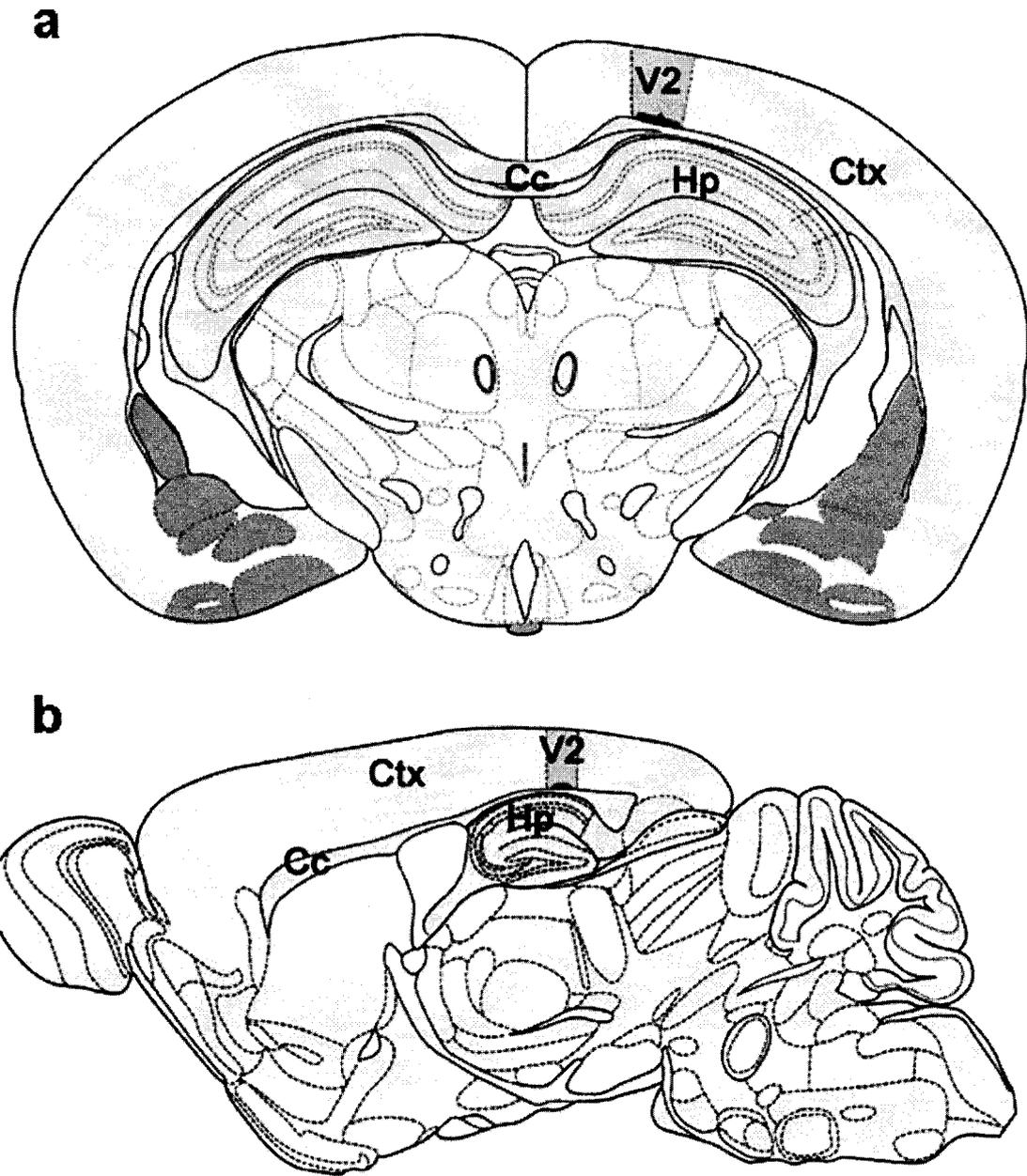
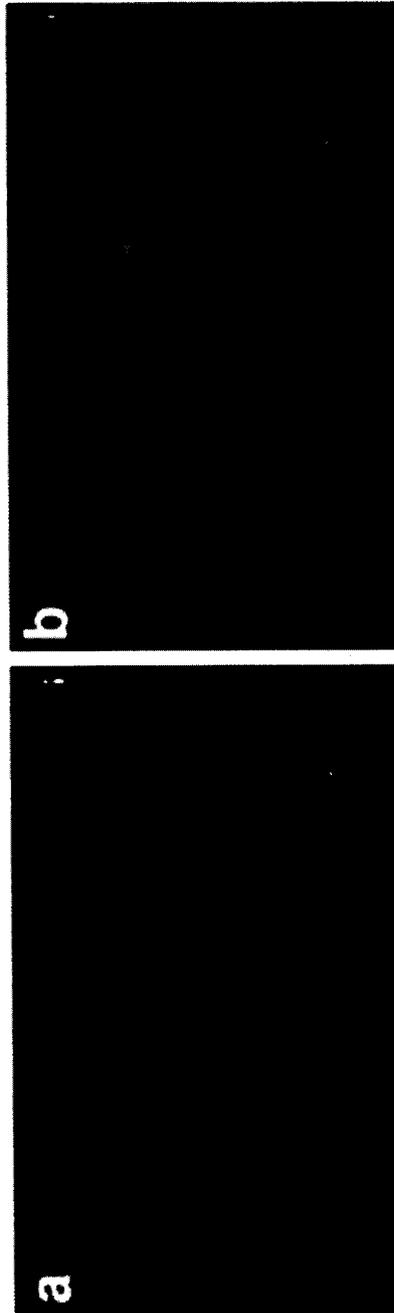


FIG. 5



**FIG. 6**



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201001550

②② Fecha de presentación de la solicitud: 02.12.2010

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2010136621 A1 (UNIVERSIDAD DE MÁLAGA [ES/ES]) 02.12.2010, todo el documento, especialmente, página 3, línea 9 – página 7, línea 12; página 14, reivindicaciones 1-7.	1-17
X	LÓPEZ-ARANDA, MF et al. Role of layer 6 of V2 visual cortex in object-recognition memory. Science. Julio 2009, Vol. 325, páginas 87-89, todo el documento.	1-5,8,9
A	US 20030119716 A1 (WYETH, NJ [US]) 26.06.2003, resumen; párrafos 40,44,48,84,85,86,87,88,92.	1-5,8,9
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 <sup>rd</sup> 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.	1-5,8,9

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
31.01.2011

Examinador  
M. García Grávalos

Página  
1/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07H21/00** (01.01.2006)

**C07K14/00** (01.01.2006)

**A61K48/00** (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)

C07H, 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 DATABASE, JPO PATENT DATABASE, PUBMED, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.01.2011

**Declaración**

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

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	WO 2010136621	02.12.2010
D02	LÓPEZ-ARANDA, MF et al. Science. Julio 2009, Vol. 325, páginas 87-89.	03.07.2009
D03	US 20030119716 A1	26.06.2003
D04	HEPLER JR et al. 3 <sup>rd</sup> RGS Protein Colloquium. An ASPET Colloquium. Abril 2008.	04.04.2008

**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 una secuencia nucleotídica, que codifica para una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con la secuencia definida como SEQ ID NO: 1, que corresponde a la proteína RGS-14 de humanos, y del producto de expresión de dicha secuencia nucleotídica, 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 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 (ver todo el documento, especialmente, página 3, línea 9 □ página 7, línea 12; Página 14, reivindicaciones 1-7).

El documento D02 se refiere a que la sobreexpresión de la proteína RGS-14, regulador de la proteína G señalizadora 14, potencia la memoria. La administración de esta proteína, mediante inyección de lentivirus RGS-14 en cerebro de rata provoca en estos animales un incremento de la memoria en el reconocimiento de objetos, de lo que se deduce el uso terapéutico de RGS-14 para potenciar la memoria (ver todo el documento).

El documento D03 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 D04 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).

**1. NOVEDAD y ACTIVIDAD INVENTIVA ((Art. 6.1 y 8.1) LP 11/1986)****1.1. REIVINDICACIONES 1- 17**

D01 es el documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la presente invención, ya que anticipa el uso de la proteína RGS-14, cuya secuencia coincide la SEQ ID NO: 1 de la invención, Así como de un ácido nucleico que la codifica, cuya secuencia coincide la SEQ ID NO: 12 de la invención, 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.

Por otra parte, el documento D02 también anticipa el uso terapéutico de RGS-14 para potenciar la memoria.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-17 de la presente solicitud no cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva ((Art. 6.1 y 8.1) LP 11/1986).

Los documentos D03 y D04 se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes a efectos de la valoración de la novedad y actividad inventiva de la presente solicitud.