

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0711816-3 A2**

(22) Data de Depósito: 18/05/2007
(43) Data da Publicação: 13/12/2011
(RPI 2136)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 31/4015
A61K 31/4412
A61P 25/28
A61P 43/00

(54) **Título:** INIBIDORES FOSFODIESTERASE 4 PARA REHABILITAÇÃO MOTORA E COGNITIVA

(30) **Prioridade Unionista:** 19/05/2006 US 60/801.949

(73) **Titular(es):** Helicon Therapeutics, Inc.

(72) **Inventor(es):** Rusiko Bourtchouladze, Thomas M. Hallam, Timothy Tully

(74) **Procurador(es):** Alexandre Ferreira

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2007069279 de 18/05/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/137181 de 29/11/2007

(57) **Resumo:** INIBIDORES FOSFODIESTERASE 4 PARA REHABILITAÇÃO MOTORA E COGNITIVA. A presente invenção provê métodos de aperfeiçoamento de déficits cognitivo e motor associado com condições e distúrbios do sistema nervoso central em um ser. Os métodos caracterizam-se por compreender uma administração de inibidores fosfodiesterase 4 e opcionalmente o treinamento de um ser sob condições adequadas de modo a produzir um aperfeiçoamento no desempenho.

"INIBIDORES FOSFODIESTERASE 4 PARA REABILITAÇÃO MOTORA E COGNITIVA"

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Uma estimativa de cerca de 4 a 5 milhões de americanos (cerca de 2 por cento de todas as idades e 15 de por cento dos mais velhos que 65 anos) têm alguma forma ou grau de falha cognitiva. A falha cognitiva (função ou perda das funções cognitivas, o processo pelo qual o conhecimento é adquirido, retido e usado) comumente ocorre em associação com distúrbios ou condições do sistema nervoso central (SNC), incluindo danos à memória associados à idade, delírio (por vezes denominada estado confusional agudo), demência (por vezes classificada como tipo Alzheimer ou não Alzheimer, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, mal de Huntington (córea), retardo mental, doença cérebro vascular (por exemplo, derrame, isquemia), distúrbios afetivos (por exemplo, depressão), distúrbios psicóticos (por exemplo, esquizofrenia, autismo (Síndrome de Kanner), distúrbios neuróticos (por exemplo, ansiedade, distúrbio compulsivo-obsessivo), distúrbio da deficiência de atenção (DDA), hematoma subdural, hidrocéfalo normalpressivo, tumor cerebral, trauma cerebral o de cabeça)).

A disfunção cognitiva é tipicamente manifestada por um ou mais déficits cognitivos que inclui dano à memória (dano à capacidade de aprender novas informações ou de lembrar informação já previamente aprendida), afasia, (distúrbio na fala/expressão oral), apraxia ((dano à capacidade de conduzir atividades motoras apesar da função motora se mostrar intacta) agnosia, (falha em reconhecer ou identificar objetos apesar da função sensorial intacta) perturbação em funções executivas (tais como planejamento, organização, seqüenciação, abstração)).

A disfunção cognitiva provoca significativo dano às funções ocupacionais ou sociais, que podem interferir com a capacidade de um indivíduo realizar atividades cotidianas e expressivamente impactam a autonomia e a qualidade de vida do indivíduo.

Protocolos de treinamento cognitivo são geralmente empregados na reabilitação de indivíduos que têm alguma forma e grau de disfunção cognitiva. Por exemplo, protocolos de treinamento cognitivo são comumente empregados na reabilitação de derrames e em perda de memória associada à idade.

Pelo fato de que muitas sessões de treinamento múltiplos serem com freqüência necessárias antes de um aperfeiçoamento ou implementação de uma aspecto específico do desempenho cognitivo (capacidade ou função) é obtido nos indivíduos, protocolos de treinamento cognitivo são freqüentemente bem custosos e dispendiosos em termos de tempo.

Um dano ao cérebro humano com freqüência resulta em prejuízos motores e cognitivos. Ainda que avanços na medicina em cuidados críticos e administração de pacientes possam conduzir a aperfeiçoamentos no paciente oriundo de dano cerebral traumático (TBI),

não existe no presente nenhum tratamento conhecido de modo a prevenir a morte da célula neural e na disfunção que se segue ao TBI. Contudo tratamentos múltiplos têm provado ser neuroprotetivos nos modelos pré-clínicos de TBI, muitos têm falhado ao mostrar eficácia nos seres humanos.

Uma vez que um paciente fica estabilizado seguinte ao TBI, os padrões de cuidados ditam reabilitação cognitiva ou moto extensiva. Durante esta reabilitação o paciente com frequência obtém novamente capacidades perdidas, por fim resultando em aperfeiçoar funções reavidas. Seria benéfico se tratamentos farmacêuticos pudessem ser desenvolvidos de modo a aumentar reabilitação cognitiva e motora seguinte ao TBI, e desta forma aperfeiçoar as funções reavidas.

No rato, o bem caracterizado dano cerebral de percussão fluida lateral (LFP) resulta em extensiva morte celular necrótica e apoptótica no hipocampo, tálamo, e no córtex (incluindo córtex motor). Esta morte neuronal conduz a disfunção neuronal e a danos nos sistemas cerebrais múltiplos. Estudos têm documentado déficits na função cognitiva e motora (Hamm, R.J. et al., *Behav. Brain Res*, 59 (1-2): 169-173 (1993); Gong et al., *Brain Res*. 700(1-1): 299-302(1995); Hamm, R.J., *J Neurotrauma*, 18(11): 1207-16 (2001); floyd et al., *J.Neurotrauma*, 19(3): 303-16 (2002); Hallan et al.; *J. Neurotrauma*. 21(5): 52-39(2004)) seguinte ao dano cerebral LFP. A reabilitação extensiva pode resultar em aperfeiçoadas neurobehavioral atividades reavidas seguinte a vários danos cerebrais experimentados.

Teorias atuais atestam que durante a reabilitação, os neurônios dentro do tecido do cérebro atingido e circundantes à área prejudicada são retreinadas de modo a assumir algo da função perdida. Este "retreinamento" é uma forma de aprender e ocorre através de indução da plasticidade neural.

Números estudos mostraram que AMP-cíclico (Camp) e a proteína de ligação cAMP responsiva do fator de transcrição jusante (CREB) são recursos reguladores na indução da memória de longo termo e na plasticidade neural (Yin. J.C. et al., *Cell* 79(1): 49-58(1994); Bourtchuladze. R. et al., *Cell*, 79(1): 59-68(1994), S. et al., *Nat. Neurosci*, 1(7): 595-601(1998)). Intervenções genéticas e farmacológicas que danificam a formação de memória de longa duração danosa tipo cAMP/CREB e a plasticidade da sinapse. Contraditoriamente, as intervenções farmacológicas e genéticas que ampliam a plasticidade sináptica e a formação da memória de longa duração que facilitam a sinalização cAMP/CREB.

Resumo da Invenção

A presente invenção relata a administração de um fármaco empreendedor de vias de proteínas de ligação de elementos CREB responsáveis AMP cíclicos que podem indistintamente (1) reabilitar varias formas de disfunções cognitivas mais eficazmente que qualquer outro recurso da atualidade, (2) aumentar o desempenho cognitivo normal (capacidade ou função), (3) reabilitar várias formas de disfunções motoras mais eficazmente que qualquer

outro método, ou (4) aumentar o desempenho motor normal (habilidade ou função). A de um fármaco empreendedor de vias de proteínas de ligação de elementos CREB responsáveis AMP cíclicos podem ser aplicadas para qualquer aspecto da função cerebral que mostra um ganho de desempenho duradouro após treino motor ou cognitivo. Desta forma, proteínas de ligação de elementos CREB responsáveis AMP cíclicos podem ser usados na reabilitação de um ser com alguma forma e grau de disfunção motora ou cognitiva ou no aumento (aperfeiçoamento) cognição normal ou desempenho motor em um ser. A de um fármaco empreendedor de vias de proteínas de ligação de elementos CREB responsáveis AMP cíclicos pode também ser usado para um ajuste fino das conexões das sinapses novamente readquiridas, células estame transplantadas que diferenciam nos neurônios.

Conforme aqui descrito, a de um fármaco empreendedor de vias de proteínas de ligação de elementos CREB responsáveis AMP cíclicos pode sr produzido isolado ou no conjunto de Treinamento de Cognição Ampliada (ACT). O ACT compreende duas partes: (1) um protocolo de treinamento específico para cada função de cérebro (cognitivo ou motor) e (2) de um fármaco empreendedor de vias de proteínas de ligação de elementos CREB responsáveis AMP cíclicos. Esta combinação pode aumentar o treinamento cognitivo pela redução da duração de e/ou número de sessões de treinamento necessárias para desenvolver um ganho de desempenho em relação àquele obtido com o treinamento cognitivo isolado ou pelo requerer um menor ou nenhum intervalo remanescente entre as sessões de treinamento a desenvolver um ganho de desenvolvimento. A combinação pode também aumentar o treinamento cognitivo pela redução da duração e/ou o número de sessões de treinamento necessárias para a indução em um circuito neuronal específico de um padrão de atividade neuronal ou pela redução da duração e/ou número de sessões de treinamento ou um padrão jazente de atividade neuronal necessária para induzir a função/estrutural de longa duração CREB-dependente (isto é longo desempenho) cambia entre as conexões das sinapses do circuito neuronal. Desta maneira, de um fármaco empreendedor de vias de proteínas de ligação de elementos CREB responsáveis AMP cíclicos pode aperfeiçoar a eficácia dos protocolos de treinamento cognitivo existentes, assim desenvolvendo significantes benefícios significantes.

Como resultado da presente invenção, métodos de desenvolvimento de um aspecto específico do desempenho cognitivo em um ser (particularmente um ser humano ou outro mamífero ou um vertebrado) em necessitando do mesmo são providos aqui de modo a compreender (a) a administração ao ser um agente de aumento que amplia as funções de alcance do CREB; e, opcionalmente treinar o ser sob condições suficientes de modo a produzir um desenvolvimento no desempenho de uma tarefa cognitiva de interesse pelo ser.

“Agentes de aumento” são também referidos aqui como “fármacos de aumento da realização CREB”.

Métodos são providos aqui para aperfeiçoar um déficit cognitivo associado com um distúrbio ou condição do sistema nervoso central caracterizado pelo fato de compreender o tratamento de um ser com um agente de aumento que desenvolve a função de realização CREB na ausência de um treinamento cognitivo formal. Métodos são também aqui providos por promover aperfeiçoamentos sustentados em um déficit cognitivo associado com um distúrbio ou condição do sistema nervoso central caracterizado pelo fato de compreender a administração ao ser um agente de aumento que promove o desenvolvimento da função de realização CREB; e detecção do referido aperfeiçoamento sustentado. Em uma realização o método adicionalmente compreende o treinamento de um ser sob condições adequadas de modo a produzir um aperfeiçoamento no desempenho de uma tarefa cognitiva em particular pelo ser. Condições e distúrbios do sistema nervoso central incluem danos à memória associado à idade, doenças neurodegenerativas (por exemplo, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, mal de Huntington (corea) e outras demências senis) doenças psiquiátricas (por exemplo, depressão, esquizofrenia, autismo, distúrbio do déficit de atenção) perda dependente de trauma de função (por exemplo, doenças cerebrovasculares (por exemplo, derrame, isquemia), tumor cerebral, dano cerebral ou de cabeça) falhas genéticas (por exemplo, síndrome de Rubinstein-Taybi, síndrome de Down, síndrome de Angelman, neurofibromatose, síndrome de Coffin-Lowry, síndrome de Reff, distrofia miotônica, síndrome da fragilidade X (por exemplo, fragilidade X-1, fragilidade X-2) síndrome de William) e inabilitação à aprendizagem. É contemplado que o tratamento com um agente de aumento que desenvolve a função de realização CREB resulta em aperfeiçoamento permanente, mantido ou sustentado no desempenho da tarefa cognitiva pelo ser após a administração do agente de aumento ser interrompido ou descontinuado.

Métodos são aqui providos para aperfeiçoamento de um déficit cognitivo associado com a retardação mental em um ser necessitando do referido tratamento caracterizado pelo fato de compreender o tratamento de um animal com um agente de aumento que desenvolve a função de realização CREB (por exemplo, inibidor fosfodiesterase 4) na ausência de um treinamento cognitivo formal. Métodos são também providos de modo a proporcionar um aperfeiçoamento no déficit cognitivo associado com a retardação mental caracterizado pelo fato de compreender a administração ao ser de um agente de aumento que desenvolve a função de realização CREB (por exemplo, inibidor fosfodiesterase 4) e detecta o referido aperfeiçoamento sustentado. Em uma realização, o método adicionalmente compreende o treinamento de um ser sob condições adequadas de modo a produzir um aperfeiçoamento no desempenho pelo ser de uma tarefa cognitiva cujo déficit está associado com retardação mental. A retardação mental impacta o processamento cognitivo e as funções cognitivas incluindo aprendizagem e aquisição de memória. A retardação mental pode ser provocada por fatores genéticos ou cromossômicos, infecções congênitas, teratogênicas (drogas e ou-

tras substâncias químicas), má nutrição, radiação ou outras condições desconhecidas afetantes da implantação e da embriogênese. As síndromes de retardação mental incluem a síndrome de Rubinstein-Taybi, a síndrome de down, a síndrome de Angelman, neurofibromatosis, síndrome de Coffin-Lowry, síndrome de Reff, distrofia miotônica, síndrome da fragilidade x (por exemplo, fragilidade x-1, fragilidade X-2) e síndrome de William (Weeber, e. J. et al, Neuron, 33:845-848 (2002)). Métodos são aqui proporcionados para aperfeiçoar um déficit cognitivo associado com uma disfunção ou distúrbio do sistema nervoso central em um ser possuindo um estame de célula neuronal disfuncional ou a manipulação de estames de células gliais caracterizam se por compreender o tratamento do ser com um agente de aumento que desenvolve a função de realização CREB na ausência de um treinamento cognitivo formal. Métodos são também aqui providos para promover aperfeiçoamentos sustentados em um déficit cognitivo associado com uma condição ou distúrbio do sistema nervoso central em um ser possuindo manipulação de estames de células neuronais disfuncionais caracterizado por compreender a administração a um ser de um agente de aumento que desenvolve a função de realização CREB; e, a detecção do referido aperfeiçoamento sustentado. Em uma realização, o método adicionalmente compreende o treinamento do animal sob condições adequadas para estimular ou induzir a atividade neuronal ou um padrão de atividade neuronal em um ser. Por "manipulação de estame de célula neuronal" se entende que (1) células de estame neuronal exógenas são transplantadas para o cérebro ou da coluna espinal de um ser (2) células de estame neuronal endógena são estimuladas ou induzidas de modo a proliferar no ser ou (3) células de estame que dão suporte a função celular neuronal.

Métodos são aqui providos para estimulação aperfeiçoada de atividade neuronal ou um padrão de atividade neuronal, de forma que faz circuitos neuronais específicos, em um ser caracterizado por compreender o tratamento do ser com um agente de aumento que desenvolve a função de realização CREB na ausência de treinamento formal cognitivo. Métodos são também aqui providos de modo a promover aperfeiçoamento sustentado na estimulação de atividade neuronal ou um padrão de atividade neuronal, tal como a que faz circuitos neuronais específicos em um ser, caracterizado pelo fato de compreender a administração a um ser de um agente de aumento que desenvolve a função de realização CREB; e, a detecção do referido aperfeiçoamento sustentado. Em uma realização, o método adicionalmente compreende o treinamento de um animal sob condições adequadas para estimular ou induzir a atividade neuronal ou um padrão de atividade neuronal no ser.

Em uma realização, a invenção refere-se a um método para aperfeiçoar um déficit cognitivo associado com uma deficiência de memória associada com a idade em um ser caracterizado por compreender o tratamento do ser com um agente de aumento que desenvolve a função de realização CREB na ausência de treinamento cognitivo formal. Em uma

outra realização, a invenção refere-se a um método de provisão de um aperfeiçoamento sustentado em um déficit cognitivo associado com uma deficiência da memória associado à idade em um ser caracterizado pelo fato de compreender a administração ao ser um agente de aumento que desenvolve a função de realização CREB, e detecção do referido aperfeiçoamento sustentado. Em uma realização, o método adicionalmente caracteriza-se por compreender o treinamento de um ser sob condições adequadas para produzir um aperfeiçoamento sustentado em desempenho por um ser de uma atividade cognitiva cuja perda está associada com uma deficiência à memória associada com a idade.

E uma outra realização, a invenção refere-se a um método para aperfeiçoamento de déficit cognitivo associado com uma doença neurodegenerativa (por exemplo, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, mal de Huntington, outras demências senis) em um ser caracterizado pelo fato de compreender o tratamento do ser com um agente de aumento que desenvolve a função de realização de CREB na ausência de treinamento cognitivo formal. Em uma outra realização, a invenção refere-se a um método de prover um aperfeiçoamento sustentado em um déficit de cognição associado com uma doença neurodegenerativa (por exemplo, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, mal de Huntington, outras demências senis) em um ser caracterizado pelo fato de compreender a administração ao ser um agente de aumento que desenvolve a função de realização CREB; e a detecção dos referidos aperfeiçoamentos sustentados. Em uma realização, o método adicionalmente compreende o treinamento do ser sob condições adequadas de modo a produzir aperfeiçoamentos sustentados no desempenho por parte do ser de uma tarefa cognitiva cujo déficit está associado com a doença neurodegenerativa.

Em uma outra realização, a invenção refere-se a um método para aperfeiçoar um déficit cognitivo associado com uma doença psiquiátrica (por exemplo, depressão, esquizofrenia, autismo, distúrbio do déficit de atenção) em um ser caracterizado pelo fato de que compreende o tratamento do ser com um agente de aumento que promove a função de realização CREB na ausência de treinamento cognitivo formal. Em uma outra realização, a invenção refere-se a um método de promover aperfeiçoamentos sustentados em um déficit cognitivo associado com doenças psiquiátricas (por exemplo, depressão, esquizofrenia, autismo, distúrbio da deficiência de atenção) em um ser caracterizado pelo fato de compreender a administração a um ser um agente de aumento que desenvolve a função de realização CREB; e a detecção do referido aperfeiçoamento sustentado. Em uma realização, o método adicionalmente compreende o treinamento do ser sob condições adequadas para produzir um aperfeiçoamento no desempenho pelo ser de uma tarefa cognitiva cujo déficit está associado com uma doença psiquiátrica.

Em uma outra realização, a invenção refere-se a um método para aperfeiçoamento um déficit cognitivo associado com uma perda dependente de um trauma de função cogniti-

va. (por exemplo, doenças cerebrovasculares (por exemplo, derrame, isquemia), tumor cerebral, dano cerebral ou de cabeça) em um ser caracterizado pelo fato de compreender o tratamento do ser com um agente de aumento que desenvolve a função de realização na ausência de um treinamento formal. Em uma outra realização, a invenção refere-se a um método de provisão de um aperfeiçoamento sustentado em um déficit cognitivo associado com uma perda de dependente de trauma de função cognitiva (por exemplo, doenças cerebrovasculares (por exemplo, derrame, isquemia), tumor cerebral, dano cerebral ou de cabeça) e um ser caracterizado pelo fato de compreender a administração ao ser de um agente de aumento que desenvolve a função de realização CREB; e a detecção do referido aperfeiçoamento sustentado. Em uma realização, um método adicionalmente caracteriza-se por compreender o treinamento do ser sob condições adequadas de modo a produzir um aperfeiçoamento sustentado no desempenho pelo ser de uma tarefa cognitiva cujo déficit está associado com uma perda dependente de trauma de função cognitiva.

Em uma outra realização, a invenção refere-se a um método para aperfeiçoamento de um déficit cognitivo associado com uma falha genética (por exemplo, síndrome de Rubinstein – Taybi, síndrome de Down, síndrome de Angelman, neurofibromatose, síndrome de Coffin-Lowry, síndrome de Rett, distrofia miotônica, síndrome da fragilidade X (por exemplo, fragilidade X-1, fragilidade X-2) e síndrome de William, em um ser caracterizado por compreender o tratamento de um ser com um agente de aumento que desenvolve a função de realização CREB na ausência de um treinamento cognitivo formal. Métodos são também aqui proporcionados para promover o aperfeiçoamento sustentado em uma deficiência cognitiva associada com uma falha genética em um ser caracterizado por compreender a administração a um ser um agente de aumento que desenvolve a função de realização CREB; e a detecção do referido aperfeiçoamento sustentado. Em uma realização, o método adicionalmente compreende treinamento do ser sob condições adequadas de modo a produzir um aperfeiçoamento no desempenho pelo ser de uma tarefa cognitiva cujo déficit está associado com uma falha genética.

Métodos são aqui proporcionados para o aperfeiçoamento de um déficit motor associado com uma condição ou um distúrbio do sistema nervoso central em um ser caracterizado pelo fato de compreender o tratamento do ser com um agente de aumento que desenvolve a função de realização CREB na ausência de um treinamento motor formal. Métodos são também aqui providos para provisão de um aperfeiçoamento sustentado em um déficit motor associado com uma condição ou distúrbio do sistema nervoso central em um ser necessitando do referido tratamento caracterizado por compreender a administração ao ser de um agente de aumento que desenvolve a função de realização CREB; e detecção do referido aperfeiçoamento sustentado. Em uma realização, o método adicionalmente compreende o treinamento de um ser sob condições adequadas para produzir um aperfeiçoamento no de-

sempenho de uma tarefa motora em particular pelo ser. Condições e distúrbios do sistema nervoso central incluem deficiência da memória associada à idade, doenças neurodegenerativas (por exemplo, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, Esclerose Lateral Amiotrófica (ALS ou mal de Lou Gehrig). Mal neuro motor, mal de Huntington (corea) e outras demências senis) doenças psiquiátricas (por exemplo, depressão, esquizofrenia, autismo, distúrbio do déficit de atenção), perda por dependência traumática de função (por exemplo, doenças cérebro vascular (por exemplo, derrame, isquemia), tumor cerebral, dano espinal ou cerebral, cabeça) falhas genéticas (por exemplo, síndrome de Rubinstein-Taybi, síndrome de down, síndrome de Angelman, neurofibromatosis, síndrome de Coffin-Lowry, síndrome de Rett distrofia miotônica, síndrome de fragilidade x (por exemplo, fragilidade x-1, fragilidade x-2) síndrome de William) e inabilidade de aprendizagem. Contempla-se o tratamento com um agente de aumento que desenvolve a função de realização CREB que resulta em aperfeiçoamento permanente o mantido no desempenho das atividade motora pelo ser após a administração do agente de aumento ser interrompido ou descontinuado.

Contempla-se o tratamento que em varias realizações, o agente de aumento compreende um inibidor fosfodiesterase 4 (PDE). Exemplos de inibidores PDE4 incluem rolipram e compostos da seguinte fórmula:

N.T. veja a formula na página 9 do original em que Me significa metila e cPent significa ciclopentila. Compreende-se que a formula mencionada agasalha ambos enantiômeros e misturas dos mesmos. Os compostos podem ser preparados usando-se a metodologia provida na Patente U.S. de número 6.458.829, cujos ensinamentos estão aqui incorporados a titulo de referencia. Em uma realização particular, os carbonos 3 e 5 da formula mencionada estão na configuração S (HT-0712):

N.T. veja a formula na página 9 do original em que Me significa metila e cPent significa ciclopentila. Outros exemplos de inibidores PDE4 podem ser encontrados na patente U.S Publicação nº 2002/0028842 A1 (publicada em 7 de março de 2002); Patente U.S. 6.458.829; Patente U.S. 6.525.055B1; Patente U.S. 5.552.438; Patente U.S. 6.436.965; e Patente U.S. 6.204.275. Aditivamente outros inibidores PDE4 são conhecidos e prontamente disponíveis na técnica.

Descrição Resumida dos Desenhos

A Figura 1 é um curso temporal das avaliações do objeto em reconhecimento. A avaliação consistia de uma sessão de treinamento simples seguida por uma sessão de teste 24 horas após (exceto às 4 horas de intervalo para a avaliação da sessão de teste simples). Antes de causar um dano às cobaias (ratos) houve cinco avaliações de modo que se verificou a pontuação obtida pela memória antes do dano causado. As cobaias então receberam TBI, recuperada durante 7 dias, e iniciaram a reabilitação OR conforme a seguir: avaliação pós-dano de base 6 (BSI), avaliação de treinamento 7 com fármaco (TDI), avalia-

ção 8, teste de memória de curta duração (STM) com 4 horas de intervalo entre o treinamento e a testagem sem uso de qualquer fármaco, base segunda estável de avaliação 9 (BS2), reabilitação cognitiva controlada de fármaco de avaliações 10-14 (fármaco dado antes de cada sessão de treinamento); ajustamento de memória de primeira pós-reabilitação avaliação 15 (Ass1) sem uso de fármaco durante o treinamento. Uma semana de repouso, ajustamento de memória de segunda pós-reabilitação avaliação 16 (Ass2), cinco semanas de repouso, ajustamento de memória de terceira pós-reabilitação avaliação 17, 1 semana de repouso, treinamento de condicionamento de ato, uma semana de repouso, teste de condicionamento de ato.

A Figura 2 mostra reabilitação locomotora na etapa escalonada. Antes do dano, as cobaias foram treinadas para um desempenho estabelecido na tarefa de etapa (A-D, Dia 0). Todas as cobaias foram submetidas a um dano cerebral e liberadas para recuperação durante 7 dias. Elas foram testadas por um desprezível número de erros (falhas de pé). (Figura 2A & B) e latência (Fig. 2C & D) na tarefa de etapa escalonado (Dia 1, ponto base). Todos os grupos tiveram aumentos no número de falha básica pé ($p < 0.001$). Às cobaias foi proporcionada tratamento e reabilitação com rolipram ($n=11$) e HT-0712 ($n=13$) tiveram bem poucos erros de pé (fig 2A) e menor latência (Fig C), em seguida as cobaias foi proporcionado um tratamento de veículo e reabilitação ($n=11$). As cobaias às quais foram administrados HT-0712 inibidor PDE4 sem a etapa de reabilitação escalonado tiveram poucas falhas de pé (Fig 2B) e menores latências (Fig 2D) que as cobaias tratadas com veículo sem reabilitação.

A Figura 3 mostra um atividade de reconhecimento de objeto (isto é DI e S.E.M.). Um dia de retenção de memória em reconhecimento de objeto é dependente da formação de memória de longa duração. As cobaias foram submetidas a 5 avaliações antes do dano, cada avaliação consistiu de uma sessão de 7,5 minutos para um par de idênticos objetos e uma sessão de testagem 24 horas após ajustamento da retenção da memória de longa duração. A retenção de memória foi quantificada como um índice de discriminação (veja os Métodos). Antes do dano, as cobaias discriminaram entre objetos previamente explorados (antigos) e novos objetos. Todas as avaliações pré-dano foram mediadas de modo a obter um índice de discriminação de pré-dano (Figura 3A). Não foram significativamente diferentes no desempenho da memória entre grupos que posteriormente receberam o tratamento de veículo ou fármaco (Fig 3A). Seguinte ao dano cerebral e 7 dias de recuperação, ambos os grupos tiveram déficits de memória de longa duração para o reconhecimento de objetos (Fig 3B) Não houve diferenças significativas entre os grupos para reconhecimento de objeto. Assim, o dano cerebral rompeu a memória 24 horas normal para reconhecimento de objetos para todos os grupos anterior ao tratamento (Fig 3B). Para o experimento a seguir às cobaias foram dadas quer 0,15 mg/kg de HT-0712 ou o veículo (i.p.) por 20 minutos antes do treinamento. O grupo HT-0712 mostrou uma preferência para o novo objeto e teve um índice

de discriminação significativamente mais alta que o grupo veículo (Fig 3C). Com o propósito de determinar se o dano cerebral resultou em um déficit de memória de curto tempo, no experimento seguinte as cobaias foram treinadas sem o tratamento por fármaco, porém testados após 4 horas, ao invés do intervalo padrão de 24 horas. Ambos grupos mostraram uma preferência para o novo objeto e não houve diferenças significativas entre os grupos. Contudo, podemos concluir que o dano cerebral provocou déficits de memória para reconhecimento de objetos em 24 horas e não em 4 horas ($p < 0.05$).

A Figura 3B mostra o rendimento de reconhecimento de objeto nas cobaias antes do dano. A retenção de memória em um dia no reconhecimento de objeto é dependente da formação de memória de longa duração. As cobaias foram treinadas durante 7,5 minutos para um par de objetos idênticos e então testadas 24 horas mais tarde para verificar a retenção de memória. A retenção de memória foi quantificada como um índice de discriminação. Este repetido treinamento e testagem para retenção de memória 24 horas mais tarde foi repetido por 5 experimentos antes do dano ao cérebro. Durante este treinamento pré-dano cerebral, as cobaias não foram inclusive inseridas ao grupo de tratamento e não receberam o tratamento com PDE4. Antes do dano grupos de comparação de teste do Análise não revelaram significativas diferenças no rendimento de reconhecimento de objetos em qualquer dos dias de testagem (Experimento 1, $p = 0,591$; Experimento 2, $p = 0,177$; Experimento 3, $p = 0,911$; Experimento 4, $p = 0,755$; Experimento 5, $p = 0,780$).

A Figura 4 mostra um desempenho de reabilitação cognitiva por ministração de um fármaco (isto é DI $\pm$ SEM). No primeiro dia da reabilitação cognitiva repetida, as cobaias foram testadas por uma segunda vez sem a injeção do fármaco ou veículo (Figura 4A, experimento 0). Não houve significativa diferença entre os grupos HT-0712 e o veículo neste segunda inserção de base, as cobaias iniciaram uma reabilitação cognitiva por ministração de um fármaco diariamente com HT-0712 ou veículo por 5 experimentos (Figura 4A, experimento 1-5). No experimento de reabilitação 1 ($p = 0,001$), experimento 2 ($p = 0,001$), experimento 3 ($p = 0,007$), e experimento 5 ($p = 0,001$) o grupo HT-0712 rendeu significativamente melhor que o grupo de veículo. De modo a verificar se o desempenho da memória aperfeiçoada de reabilitação ministrada por fármaco sem o fármaco, as cobaias foram treinadas/testadas sem o tratamento com fármaco. O grupo receptor de HT-0712 presenciou um rendimento de reabilitação cognitiva significativamente melhor que o grupo de veículo (Figura 4B).

Com o propósito de determinar se esta melhoria de déficit de memória de longa duração era devido a um sub-agudo efeito da repetida administração de HT-0712, as cobaias foram repousadas por uma semana sendo testadas novamente para a função de memória de longa duração sem o fármaco (Figura 4C). Novamente o efeito da reabilitação cognitiva por ministração de PDE4 persistiu. O grupo HT-0712 apresentou um rendimento signifi-

cativamente melhor que o grupo de veículo tratado. (* $p < 0,05$).

A Figura 5 mostra os efeitos longos duradouros da reabilitação cognitiva. De modo a determinar se o aperfeiçoamento na função de memória seguindo a reabilitação cognitiva por ministração de PDE4 foi de longa duração, as cobaias foram testadas para o desempenho de reconhecimento de objetos durante 8 semanas seguinte ao fim da reabilitação (Figura 5A). O grupo de reabilitação ministrado por PDE4 desempenhou-se significativamente melhor que o grupo veículo tratado. As cobaias foram então testadas durante 1 semana quanto à retenção de memória por condicionamento de medo. Novamente o grupo de reabilitação cognitiva ministrado de PDE4 desempenhou-se significativamente melhor que o grupo veículo tratado, (Figura 5B)(* $p < 0,05$). A função de memória transferiu-se para uma outra atividade de memória dependente do hipocampo.

A Figura 5C mostra o rendimento da memória por condicionamento por medo na moto-reabilitação nos seres. De modo a determinar se o aperfeiçoamento no desempenho motor (memória motora) nos grupos de reabilitação fármaco ministrado por PDE4 foi específico no desempenho motor, ou se se transferiu para o desempenho cognitivo aperfeiçoado por condicionamento de medo, as cobaias foram treinadas por condicionamento de medo uma semana após o termino da reabilitação motora. As cobaias foram testadas condicionamento de medo durante uma semana seguinte ao treinamento. Não houve diferenças significativas entre qualquer dos grupos reabilitação/PDE4 e não reabilitação.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Para muitas atividades em muitas espécies, incluindo o ser humano, protocolos de treinamento espaçados, (múltiplas sessões de treinamento com intervalo de repouso entre cada uma) produzem memória mais forte, de longa duração que os protocolos de treinamento maciços (sessões de treinamento múltiplos sem intervalo de descanso eles).

Estudos do comportamento genético de aprendizagem olfatoria de Pavlov em *Drosophila* tiveram constância que o treinamento maciço produz uma memória de longa duração que, no entanto, diminui em pelo menos quatro dias, é um não síntese-dependente de proteína, não é rompido por sobre expressão de um transgênico CREB-repressor, e é rompido em mutantes radiais (Tully, T., Cell 79(1): 33-47 (1994); e Yin, J.C. et al., Cell, 79(1): 49-58 (1994)). Em contraste, o treinamento produz uma memória de longa duração que persiste por pelo menos sete dias, é uma síntese-dependente de proteína. é interrompido pela sobrepressão de transgênico CREB-repressor e é um radial mutante, (Tully, T. et al., Cell 79(1) 35-47 (1994); e Yin, C et. al., Cell 79(1): 49-58)). Um dia após a retenção de memória de treinamento espaçado ser composto de ambas a síntese de proteínas e da memória precoce de longa duração CREB-dependente (ARM) e da síntese de proteína e memória de longa duração CREB dependente (LTM). Treinamento maciço adicional é insuficiente para induzir LTM (Tully, T et al., Cell79(1); 35-47 (1994); e Yin., J.C. et al., Cell 79(1): 49-58 (1994)).

Uma realização crescente de evidência estende os presente resultados a partir dos invertebrados para os mamíferos. Por exemplo, em *Aplysia*, manipulações moleculares de expressão CREB, análogas àquelas em moscas, supressão ou aumento (i) LTM de uma resposta eletrofisiológica facilitadora em uma monossinapse sensomotora em culturas de células e (ii) as conexões sinápticas entre os neurônios sensores e motores que são normalmente produzidos após o as aplicações espaçadas dos estímulos facilitadores (Bartsch, et al., *Cell*, 83(6):979-992 (1995)). Nas cobaias as injeções de oligonucleotídeos RNA anti-senso ou formação de LTM blocos de amígdala no hipocampo de duas diferentes atividades que são dependentes em atividade nestas regiões anatômicas, respectivamente (Guzowsky, J.F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(6):2693-2698 (1997) e Lamprecht, R. et al *J. Neurosci* 17(21):8443-8450 (1997). Em camundongos, a formação de LTM para ambas atividades implícitas e explícitas é defectiva em camundongos mutantes CREB (Bourtchuladze, R. et al., *Cell*. 79(1):59-58(1994)) O treinamento de camundongos transgênicos, conduzindo um gene transmissor CREB-dependente (beta-galactosidase), um condicionamento por medo contextual dependente do hipocampo ou atividades de repulsão passiva induz a expressão de gene transmissor CREB-dependente CA1 e CA3 do hipocampo. O treinamento destes camundongos em uma atividade condicionante por medo amígdala-dependente induz a expressão de gene transmissor CREB-dependente na amígdala, mas não o hipocampo. Desta forma, protocolos de treinamento que induz a formação de LTM também induz a transcrição de gene CREB-dependente em áreas anatômicas específicas do cérebro do mamífero (Impey, S. et al, *Natl. Neurosci.*, 1(7):595-601(1998)). Com este modelos de cobaias, três destacados casos de crescimento de LTM foram demonstrados. O primeiro, uma sobre-pressão de um transgênico CREB-ativador formalizamos requisitos para sessões de treinamento espaçadas e, ao invés disto, induz à formação de LTM após um único treinamento (o qual normalmente produz pouca ou nenhuma retenção de memória em 24 horas após(Yin., J. C. et al. *Cell* 81(1):107-115 (1995)). Segundo, um transgênico CREB-ativador expresso viralmente para a amígdala do rato é também suficiente para aumentar a memória após treinamento maciço para uma resposta inesperada de temor-potenciado, que formalizam a necessidade de um intervalo de repouso no treinamento espaçado (Josselyn, S.A. et al., *Society for J. Neurosci.*, 21:2404-2412 (2001)). Terceiro a formação em camundongos de CREB-deficiente (Bourtchuladze, R. et al, *Cell*. 79(1):59-58 (1994) pode formar-se normalmente, se o camundongo mutante forem submetidos a um diferente, protocolo de treinamento espaçado (Kogan, J. II et al., *Curr. Biol.*7(1): 1-11 (1997)).

O CREB também aparece envolvido em varias formas de celular e desenvolvimental plasticidade nos cérebros dos vertebrados. Por exemplo, a atividade neuronal aumenta a atividade CREB no córtex (Moore. A. N. et al., *J. Biol.Chem.*, 271(24):14214-14220 (1996)). O CREB também media a plasticidade desenvolvimental no hipocampo (Murphy, D.D. et al.,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(4): 1482-1487)) no córtex somatosensorial (Glazowski, S. et al., Cereb. Córtex 9(3):249-256 (1999))) no estriato (Liu, F.C. et al., Neuron. 17(6): 1133-1144(1996)), e no córtex visual (Pham. T.A et al., Neuron, 22(1):63-72*1999)).

O CREB parece ser afetado nas doenças degenerativas humanas e danos cerebrais. Por exemplo a expressão e/ou ativação do CREB é interrompida no mal de Alzheimer (Ikezu, et al., Embo. 15(10):2468-2475 (1996); Sato. N. et al., Biochem, Biophys. Res. Commun., 232(3):637-642(1997); Yamamoto-Sasaki, M. et al., Brin Res. 824(2):300-303 (1999); Vitolo O. V. et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 13217-13221 (2002))). A expressão e/ou ativação do CREB é também elevada após crises de isquemia (Blendy, J.A. et al., Brain Res., 681(1-2):8-14 (1995); e Tanaka, K. et al., Neuroreport . 10(1):2245-2250 (1999)). O “Enriquecimento Ambiental” é neuroprotetivo, prevenindo a morte celular por ação através do CREB (Young, D. et al., Nat. Méd., 5(4):448-453(1999)).

As funções CREB durante a sensibilidade e retirada do fármaco. Por exemplo, o CREB é afetado por etanol (Pandey, S.C. et al., Alcohol Clin. Exp. Res., 23(9):1425-1434 (1999); Constantinescu, A. et al.; J. Biol. Chem. 274(38):26985-26991 (1999); Yang, X. et al., Alcohol clin. Exp. Res. 22(2):382-390(1998); Yang, x. et al., J. Neurochem., 70(1):224-232 (1998); e Moore, M.; S. et al.; Cell. 93(6):997-1007 (1998)), por cocaína (Carlezon, W. A. Jr. Et al, Science, 238(5397):2272-2275(1998)) por morfina (Widnell, K.L. et al. J. Pharmacol. Exp. Ther., 276(1):276(1):306-315 (1996)); por metamphetamine (Muratake, T. et al, Ann N.Y. Acad. Sci., 844(21-26) (1998) e por canabinoide (Calandra, B. et al., 374(3):445-455 (1999); e Herring A. C. et al., biochem, Pharmacol., 55(7):1013-1023(1998)).

Um sinal de via de transdução que pode estimular a via transcricional CREB/CRE está no sistema regulador de cAMP. Consistente com isto, a 1 ciclase adenilata de ambos comundongos (ACI) e a enzima AC8 falha no processo de aprendizagem (Wong s. T. et al, Neuron, 23(4):787-798(1999). Nestes comundongos, a administração de forskolina à área CA1 dos restauradores de hipocampo de memória e aprendizagem das atividades hipocampus-dependentes. Aditivamente, o tratamento de cobaias envelhecidas com fármacos que elevam os níveis de cAMP ameriolatos (tais como rolipram e receptores agonistas D1) nas perdas de um etário-dependente de memória hipocampal-dependente e potenciação de longa duração celular (Barad, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., Usa, 95(25):15020-15025 (1998)). Estes dados últimos sugerem que o sinalizador cAMP é defectivo em cobaias envelhecidas com dano de aprendizagem (Bach, M.E. et al., Proc.Natl., Acad. Sci. USA, 96(9):5280-5285 (1999))

A presente invenção refere-se a uma nova metodologia, que pode (1) reabilitar várias formas de disfunção cognitiva ou (2) aumento do desempenho cognitivo normal. Administração de um fármaco de desenvolvimento via CREB age através de um mecanismo molecular de plasticidade sináptica, que aparentemente converte o efeito bioquímico de experi-

ência recentemente adquirida em uma mudança estrutural de longa duração da sinapse. A administração de um fármaco de desenvolvimento via CREB pode ser aplicada por qualquer um aspecto da função cerebral que mostra um ganho de desempenho duradouro após o treino cognitivo. Em consequência, a administração de um fármaco de desenvolvimento via

5 CREB pode ser usada na reabilitação de um ser com qualquer forma de disfunção cognitiva ou motora ou no aperfeiçoamento de qualquer característica de desempenho motor ou normal cognitivo em um ser.

Um crescimento da modalidade sugere que os neurônios continuam a proliferar no cérebro adulto (Arsenijevic, Y. et al., *Exp., Neurol.*, 170:48-62(2001); Vescovi, A. I., et al., *Biomed Pharmacother.*, 55:202-205(2001); Cameron, H. A. and McKay, R.D., *J. Comp. Neurol.*, 435:406-417 (2001); e Geuna, S. et al., *Anat. Rec.*, 265:132-141(2001)) e que tais proliferações está em relação responsiva a várias experiências (Nilsson, M. et al., *J. Neurobiol.*, 39:569-578 (1999); Gould E. et al.; *Trends Cogn. Sci.* 3:186-192 (1999); Fuchs, E. and Gould, E. *Eur. J. Neurosci.*, 12:2211-2214(2000); gould. E. et al., *Biol. Psychiatry*, 49:715-720(2000); e Gould, E. et al., *Nat. Neurosci.*, 2:260-265 (1999)). No presente estratégias experimentais são caminhos para o transplante de estames neuronais para o cérebro adulto por varias indicações terapêuticas (Kurimoto, Y. et al., *Neurosci. Lett.* 306:57-60 (2001); Singh, G. *Neuropathology*, 21:110-114(2001); e Cameron, H.A. e McKay, R.D. *Nat. Neurosci.*, 2:894-897 (1999)). Muito já seja conhecido sobre neureogeneses em estágios embrionários de desenvolvimento (Saitoe, M. e Tully, T., " Making Connections between synaptic and behavioral plasticity in Drosophila" – Fazendo Conexões entre plasticidade behavioral e sináptica em Drosophila). In *Toward a Theory of Neuplasticity.*, J. McEachem and C. Shaw Eds. (New York: Psychology Press). Paginas 193-200 (2000). A diferenciação neuronal, extensão neurítica e o reconhecimento de algo da sinapse inicial todas aparecem de modo a ocorrer em uma feição atividade-independente. Subseqüente crescimento cinético e sinaptogênese, contudo, em consequência requer atividade neuronal ocorrente para conexões sinápticas de sintonia fina de uma maneira funcionalmente relevante. Estes encontros sugerem que integração (final) funcional de células de estame neurais transplantadas requerem atividade neuronal. Desta forma, a administração de fármaco de um aumento de via de

10

15

20

25

30

35

CREB pode ser usado de modo a exercitar circuitos neuronais para sintonizar finamente as conexões sinápticas de forma nova adquirida, células de estame transplantadas diferenciam nos neurônios. Por "circuito(s) neuronal de exercício apropriado" se entende como sendo a indução nos circuito(s) neuronais apropriados de um padrão de atividade neuronal, que corresponde àquele produzido por um protocolo de treinamento cognitivo em particular. O protocolo de treinamento cognitivo pode ser usado para induzir este tipo de atividade neuronal. Alternativamente, a atividade neuronal pode ser induzida por estimulação elétrica direta do circuito neuronal. "Atividade neuronal" e "atividade neural" são aqui usadas intercambiavel-

mente .

ACT compreende um protocolo de treinamento específico para cada função cerebral e uma administração de fármaco de um aumento de via de CREB. O protocolo de (treinamento cognitivo) induz a atividade neuronal em regiões cerebrais específicas e produz desempenhos aperfeiçoados de uma função (cognitiva) cerebral específica. Os fármacos de via-aumento de CREB, também aqui referida como agente de aumentos, aumentam a função de via de CREB, que é necessária para consolidar as informações recentemente adquiridas junto a LTM. “por função de via de CREB aumentada” é entendido como a capacidade de aumentar ou aperfeiçoar a expressão de gene CREB-dependente. A expressão de gene CREB-dependente pode ser aumentada ou aperfeiçoada pela implementação da produção de CREB endogenoso, por exemplo, pelo estimular direta ou indiretamente o gene endogenoso para produzir quantidades crescidas de CREB ou pelo aumento funcional (ativo biologicamente) de CREB. Veja por exemplo. Patente Norte-Americana de número 5.929.223; Patente Norte Americana de número 6.051.559; e Publicação Internacional N° W09611270 (publicada em 18 de abril de 1996), cujas referencias são aqui incorporadas em sua totalidade a título de referência.

A administração de fármaco de um aumento de via de CREB diminui o treinamento necessário para render um ganho de desempenho reativo àquele obtido com o treinamento de forma isolada. De modo particular, o ACT pode aumentar o treinamento cognitivo pela redução do numero de sessões de treinamento necessárias para render um ganho de desempenho relativo àquele produzido com treinamento cognitivo isolado ou pelo requerer de menor ou mesmo nenhum intervalo entre as sessões de treinamento de modo a render um ganho de desempenho. Neste caso, ACT pode aperfeiçoar a eficiência das técnicas de treinamento cognitivo, doravante produzindo um benefício econômico significativo. Por “ganho de desempenho se entende um aperfeiçoamento em um aspecto de desempenho cognitivo.

A invenção proporciona métodos para aumento de um aspecto específico do desempenho cognitivo em um ser (particularmente em um ser humano ou outro mamífero ou vertebrado) necessitando do mesmo caracterizado por compreender (a) a administração ao ser de um agente de aumento que desenvolve a função de via de CREB; e opcionalmente (b) pelo treinar do ser sob condições adequadas de modo a produzir um aperfeiçoamento no desempenho de uma atividade cognitiva em particular pelo ser.

Por exemplo, protocolos de treinamento cognitivo formal são empregados no tratamento de pacientes com depressão (monopolar) e/ou fobias que promovem o a dar resposta patológicas inadequadas associadas com a depressão e/ou fobias e desenvolvem comportamento adequado. A administração de fármaco de um aumento de via de CREB opcionalmente em conjunto com o treinamento cognitivo reduz o tempo e/ou o número de sessões de treinamento necessárias para produzir um ganho de rendimento nos referidos pacientes.

Este tipo de tratamento geral é complementado em um período de tempo mais curto.

De forma análoga, os protocolos de treinamento cognitivo formal são empregados no tratamento de pacientes com autismo que promovem as resposta patológicas inadequadas e de modo a conduzir à aprendizagem de comportamento adequado. A administração de fármaco de um aumento de via de CREB apcionalmente em conjunto com o treinamento cognitivo reduz o tempo e/ou o numero de sessões necessárias para proporcionar um ganho no desempenho destes pacientes.

Protocolos de treinamento cognitivo formal (por exemplo terapia física, métodos de bio-retroalimentação) são empregados nos pacientes com derrame cerebral (reabilitação de derrame cerebral), particularmente reabilitando funções moto-sensoriais ou danificadas. A administração de fármaco de um aumento de via de CREB em conjunto com treinamento cognitivo reduz o tempo e/ou numero de sessões de treinamento necessárias para proporcionar um ganho no desempenho nestes pacientes.

Mais rápida e mais eficiente a recuperação da perda cognitiva ou das funções motoras são esperadas como um resultado.

Protocolos de treinamento cognitivo formal (por exemplo treinamento, treinamento espaçado) são empregados na aprendizagem de uma nova linguagem ou na aprendizagem de um novo instrumento musical. A administração de fármaco de um aumento de via de CREB em conjunto com o treinamento cognitivo reduz o tempo e/ou numero de sessões de treinamento necessárias para render um ganho em desempenho. Como um resultado, menos pratica (sessões de treinamento) é necessária para aprender uma nova linguagem ou para aprender um novo instrumento musical.

Protocolos de treinamento cognitivo formal são empregados no aperfeiçoamento da aprendizagem e/ou em indivíduos com incapacidade de aprendizagem, de linguagem e de leitura. A administração de fármaco de um aumento de via de CREB em conjunto com treinamento cognitivo reduz o tempo e/ou numero de sessões de treinamento necessárias para render um ganho no desempenho destes indivíduos.

Protocolos de treinamento cognitivo formal são empregados para exercitar circuitos neuronais em indivíduos para dar sintonia fina às conexões sinápticas de recém adquiridas células de estame transplantadas que diferenciam nos neurônios. A administração de fármaco de um aumento de via de CREB em conjunto com treinamento cognitivo reduz o tempo e/ou o número de sessões de treinamento necessárias para a indução em (a) circuito(s) neuronais específicos de um padrão de atividade neuronal nestes indivíduos.

Protocolos de treinamento cognitivo formal são empregados para estimulação repetida de atividade neuronal ou um padrão de atividade neuronal jazente (a)circuitos neuronais específicos em indivíduos. A administração de fármaco de um aumento de via de CREB em conjunto com treinamento cognitivo reduz o tempo e/ou numero de sessões de treinamento

e/ou jaz o padrão de atividade neuronal necessária para induzir a função/estrutura de longa duração CREB-dependente (isto é longa duração) mudam entre as conexões sinápticas do circuito neuronal.

A terapia de reabilitação intensiva pode melhorar a recuperação após o dano cerebral. Esta recuperação ocorre através da reorganização do tecido cerebral residual quando os neurônios sobreviventes são “retreinados” de modo a assumir funções perdidas. Mudanças na plasticidade neural acredita-se fazerem frente a esta organização. A ativação da via cAMP/CREB é uma etapa essencial para mudanças nas experiências dependentes em plasticidade neural. Os efeitos de HT-0712 e do Rolipram na reabilitação cognitiva e motora seguinte ao dano cerebral de percussão fluida lateral (LFP) foram examinadas. Cobaias adultas foram treinadas em critérios de desempenho em uma atividade motora hábil de fase escalonada e danificadas usando o dispositivo LFP. Após uma semana de recuperação, as cobaias iniciaram a reabilitação motora hábil com indistintamente, inibidores PDE4 e veículo. Ambos HT-0712 e Rolipram expressivamente ampliaram a reabilitação motora. Em um grupo separado de seres, as cobaias foram primeiro testadas para um desempenho de memória base para reconhecimento de objeto.

Seguinte ao dano cerebral, as cobaias mostraram reconhecimento intacto de objeto em 4 horas após o treinamento, porém memória deficiente em 24 horas. HT-0712 ou veículo foi dado durante repetido treinamento cognitivo para reconhecimento de objeto (reabilitação cognitiva). Após seis sessões de reabilitação, o grupo HT-0712 desempenhou significativamente melhor que o grupo veículo. Este aperfeiçoamento de memória durou por tanto tempo quanto oito semanas na ausência de fármaco e transmitido para desempenho de memória aperfeiçoada por condicionamento por intimidação. De forma surpreendente o inibidor PDE4 HT-0712 pode ser usado para melhorar a recuperação cognitiva e motora seguinte ao dano cerebral.

O treinamento pode compreender um ou múltiplas sessões de treinamento e é treinamento apropriado para produzir um aperfeiçoamento no desempenho da atividade cognitiva de interesse. Por exemplo, se um aperfeiçoamento na aquisição da linguagem for desejada, o treinamento focaria na aquisição da linguagem. Se um aperfeiçoamento na habilidade de aprender a tocar um instrumento musical for desejada, o treinamento focaria na aprendizagem do instrumento musical. Se o aperfeiçoamento em uma habilidade motora for desejada, o treinamento focaria na aquisição da habilidade motora. A tarefa cognitiva específica de interesse é trabalhada com o treinamento apropriado.

A invenção também provê métodos para estimulação repetida de atividade neuronal ou um padrão de atividade neuronal, tal como aquela jazente a circuito(s) neuronal específico, em um ser caracterizado pelo fato de compreender (a) administração a um ser um agente de aumento que amplia a função de via de CREB; e (b) treinamento do ser sob condições

adequadas para estimular ou induzir a atividade neuronal ou um padrão de atividade neuronal no ser. Neste caso, treinamento é o treinamento apropriado para estimular ou induzir atividade neuronal ou um padrão de atividade neuronal no animal.

Por “ sessões de treinamento múltiplo” se entende como duas ou mais sessões de treinamento. O agente de aumento pode ser administrado antes, durante ou após uma ou mais das sessões de treinamento. Em uma particular realização, o agente de aumento é administrado antes e durante cada sessão de treinamento. O tratamento com agente de treinamento em conexão com cada sessão de treinamento é também referido como “tratamento de aumento”. Por “treinamento” se entende como “treinamento cognitivo”.

Protocolos de treinamento cognitivo formal são conhecidos e prontamente disponibilizados na técnica. Veja, por exemplo, Karni, A. e Sagi, D., “Onde a prática faz a perfeição na discriminação do texto: evidencia para plasticidade do córtex cerebral visual primário”, Proc. Natl. Acad. Sci, USA 88:4966-4970 (1991); Karni, A., e Sagi, D., “The time course of learning a visual skill” (O tempo de duração para aprendizagem de uma habilidade visual” Nature, 365:250-252 (1993)) Kramer, A.F et al., “Task coordination and aging : exploration of executive control processes in the task switching paradigm” (Coordenação de atividade e envelhecimento: exploração do processo de controle executivo na atividade de ligação paradigma). Acta Psychol (Amst), 101:339-378 (1999); Kramer, A.F et al., “Training for executive control: Task coordination strategies and aging, (Treinamento para controle executivo: estratégias de coordenação de atividade e envelhecimento”, Em envelhecimento e desempenho habilitado: Avanços na teoria e Pedidos, W. Rogers et al., eds (Hillsdale, N.J.: Erlbaum) (1999); Rider, R.A. and Abdulahad, D.T., “Efeitos da prática maciça versus a distribuída na proficiência de motricidade fina ou grosseira de adolescentes mentalmente deficientes”. Percept, Mot. Skills, 73:219-224(1991); Willis, S. L. and Schaie. K.W. “Treinando o mais velho em fatores de habilidade de orientação espacial e razões indutivas”. Psychol. Aging., 1:239-247(1986); Willis, S. L. and Nesselroade, C.S. “ Efeito de longa duração no treinamento de habilidade fluida em idosos”. Develop. Psychol., 26:905-910(1990); Wek, S.R. e Husak, W.S. “Efeitos práticos maciços e distribuídos no desempenho motor e a aprendizagem de crianças autistas”. Percept, Mot. Skills, 68:107-113(1989); Verhachem, P et al., “Aperfeiçoamento no desempenho da memória no idoso através do treinamento mnemônico: um estudo meta-analítico”, Psychol, AGing, 7:242-252(1992); Verhaghen, P. and Salthouse, T.A.”Meta-análise de relações etária-cognitiva e na fase adulta: estimativas de efeitos em idades linear e não linear e modelos instrumentais”, Psychol. Bull., 122:231-249 (1997); Dean, C. M et al.; “treinamento de circuito ativo-relato aperfeiçoa o desempenho de atividades locomotoras em derrame cerebral crônico: um experimento piloto controlado, randômico”; Arch. Phys. Méd. Rehabil. 81:409-417 (2000); Greener, J. et al “Terapia da linguagem e da fala para afasia seguinte ao derrame cerebral”, Cochrane Database Syst. Ver., CD000425

- (2000); Hummelsheim, H. e Eickhof, C., "Treinamento sensor-motor repetitivo para um membro superior e mão em um paciente com síndrome de bloqueio" *Scand. J. Rehabil. Méd.*; 31:250-256 (1999); Johansson, B.B. "Plasticidade cerebral e reabilitação de derrame cerebral. A literatura de Willis", *Stroke*. 31:-:223-230 (2000); Ko Ko, C., "Eficácia da reabilitação para esclerose múltipla", *Clin., Rehabil.*, 13 (Suppl. 1):33-41 (1999)), Lange, G. et al "Influencia Estratégica Organizacional no desempenho da memória visual após um derrame cerebral: contrastes do hemisfério esquerdo/direito e cortical/subcortical", *Arch Phys. Méd. Rehabil.*, 81:89-94 (2000); Liepert, J. et al. "Reorganização Cortical do Tratamento-induzido após derrame cerebral em seres humanos", *Stroke*, 31:1210-1216(2000); Lotery, A.J. et al., "Dano visual corrigível em pacientes sob reabilitação de derrame cerebral". *Age Ageing*, 29:221-222 (2000); Majid, M. J. et al., "Reabilitação cognitiva para déficits de memória seguinte ao derrame cerebral".(revisão Cochrane), *Cochrane database Syst. Ver.* CD0002239 (2000); Merzenich, M. et al., "Plasticidade cortical fazendo o desenvolvimento de habilidade cognitiva, motor e perceptual: implicações para a neuroreabilitação", *Cold Spring Har. Symp. Quant. Biol.*, 61:1-8 (1996); Merzenich, M. M. et al., "Déficits de processamento temporal em crianças com dano de aprendizagem na linguagem ameriolatadas por treinamento", *Science*, 271:77-81 (1196); murphy, E., "Reabilitação de Derrame Cerebral", *J.R. Coll. Physicians Lond.*, 33:466-468(1999); Nagrajan, s. S. et al., "Algoritmos de modificações na fala usado para treinamento de crianças com dano de aprendizagem na linguagem", *IEEE Trans., Rehabil. Eng.*, 6:257-268 91998); Oddone, et al., "Iniciativa de Pesquisa no Aumento da Qualidade em derrame cerebral: prevenção, tratamento e reabilitação", *Med. Cair* 38:192-1104 (2000); Rice-Oxley, M. e Turner-Stokes, L., "Eficácia da reabilitação do dano cerebral", *clin. Rehabil.*, 13(Suppl 1):7-24(1999); Tallal, P. et al; "Danos na aprendizagem da linguagem: ciência básica de integração, tecnologia e remediação", *Exp. Brain Res.*, 123:210-219 (1998); Tallal, P. et al., "Compreensão da Linguagem em crianças danificadas na aprendizagem da linguagem aperfeiçoado com fala acusticamente modificada " *Science*, 271:81-84 (1996); Wingfield, A. et al., "Recuperação do tempo perdido: adulto envelhecendo e o efeito da restauração do tempo na memória da fala tempo comprimida" *Psychol.* 14:380-389 (1999), cujas referencias estão aqui incorporadas em sua totalidade a titulo de referencia.
- Conforme aqui usado, o termo "ser" inclui mamíferos, assim como também outros animais vertebrados e invertebrados (por exemplo, pássaros, peixes, répteis, insetos (por exemplo espécies drosófila), moluscos, (por exemplo *Aplysia*). Os termos "mamífero" e "mamífero" conforme aqui usado refere-se a qualquer tipo de vertebrado, incluindo monotremas, marsupiais e placentais, que lambem seus nascidos e dão parto aos nascituros (eutariano e mamíferos placentais) ou são de pôr vos (metatarian ou mamíferos não placentais). Exemplos de espécies de mamíferos incluem os seres humanos e os primatas (por exemplo macacos, chimpanzés) roedores 9por exemplo ratos, camundongos, porquinhos da Índia) e

ruminantes (por exemplo vacas, porcos, cavalos).

O ser pode ser um ser com alguma forma e grau de disfunção cognitiva ou um ser de desempenho cognitivo (isto é, um por exemplo um ser sem qualquer forma de falha cognitiva (disfunção ou perda de qualquer função cognitiva)).

5 A disfunção cognitiva comumente associada com disfunção cerebral e o sistema nervoso central surge devido a hereditariedade, doença e dano cerebral e/ou idade. Condições e distúrbios do sistema Nervoso Central associadas com alguma forma ou grau de falha cognitiva (disfunção) incluem, mas não se limitam ao seguinte:

1) dano à memória associada à idade;

10 2) distúrbio neurovegetativo, tais como delírio (estado agudo confusional); demência, incluindo o mal de Alzheimer, mal não do tipo Alzheimer como demência, tais como, mas não se limitando a, demência de corpo Lewy, demência vascular, demência de Binswanger (encefalopatia arterioesclerótica subcortical), demências associados com o mal de Parkinson, disfunção supranuclear progressiva, mal de Huntington (corea), mal de Pick, hidrocéfalo normal-pressivo, mal de Creutzfeldt-Jakob, mal de Gerstman-Strussler-Scheiker, 15 neurosífilis (paresis geral) ou infecção por HIV, síndromes de demência lobo frontal, demências associadas com trauma craniano incluindo demência pugilística, trauma cerebral, hematoma subdural, tumor cerebral, hipotireoidismo, deficiência da vitamina b sub 12, radiação intracraniana, outros distúrbios neurodegenerativos;

20 3) distúrbios psiquiátricos, incluindo distúrbios afetivos (distúrbios de humor), tais como, porém não se limitando a, depressão, incluindo pseudodemência depressiva; distúrbios psicóticos, tais como, porém não se limitando a, esquizofrenia e autismo (síndrome de Kanner), distúrbios neuróticos, tais como, mas não se limitando a, ansiedade, distúrbio obsessivo-compulsivo, distúrbio do déficit de atenção;

25 4) perda por trauma dependência da função cognitiva, tal como, porém não se limitando a aquelas associadas (devido a) doenças cérebro vascular, incluindo derrame cerebral e isquemia, incluindo derrame cerebral isquêmico; trauma cerebral, incluindo hematoma subdural e tumor cerebral; dano craniano, complicações devido à neurotoxicidade, cirurgia, excitotoxicidade e extensões e mal funcionamento de CABG – Implante do Marcapasso de 30 Artéria Coronária

5) distúrbios associados com alguma forma ou grau de disfunção cognitiva surgente devido a falha genética, tais como, porém não se limitando a, síndrome de Rubinstein-Taybi, síndrome de down, síndrome de Angelman, síndrome de fragilidade x (fragilidade x-1 e fragilidade x-2), neurofibromatose, síndrome de Coffin-Lowry, distrofia miotônica, síndrome de 35 Rett, síndrome de William, síndrome de Klinefelter, mosaicismos, trisomia 13 (síndrome de Patau), trisomia 18 (síndrome de Edward), síndrome de Turner, síndrome de cri du Chat, síndrome de Lesch-Nyhan (hiperuricemia), síndrome de Hunter, síndrome de oculocerebro-

renal Lowe, mal de Gaucher, síndrome de Hurler (mucopolissacarídeos), mal de Neiman-Pick, mal de Tay-Sachs, galactosemia, mal da urina viscosa de carvalho, fenilquetonúria, aminoacidúrias, acidemias, escleroses tuberosas e microcefalia primária;

6) inabilitação na leitura, linguagem e aprendizagem, particularmente em crianças.

5 Por inabilitação na aprendizagem se entende como os distúrbios nos processos psicológicos básicos que afetam o meio no qual o indivíduo aprende. Incapacidade de aprendizagem pode provocar dificuldades na audição, pensamento, conversa, leitura, escrita, soletragem, aritmética ou combinações de qualquer dos mencionados.. Incapacidade de aprendizagem inclui deficiências percentuais, dislexia afasia desenvolvimental.

10 Os termos desempenho cognitivo e função cognitiva são termos reconhecidos pelos versados na arte e são usados aqui a com os suas denominações aceitas pelos versados. Por tarefa cognitiva se entende uma função cognitiva. As funções cognitivas incluem aquisição de melhoria, discriminação visual, discriminação auditoria, funcionamento executivo, aprendizagem de habilidade motora, raciocínio abstrato, habilidade espacial, habilidades na
15 língua e fala, e aquisição de linguagem. Por “aumentar um aspecto específico do desempenho cognitivo” se entende a capacidade em aumentar ou aperfeiçoar um função cerebral ou cognitiva específica, tal como, por exemplo, a aquisição de memória ou do desempenho da tarefa aprendida. Por “aperfeiçoamento no desempenho de uma tarefa cognitiva partícula” se entende um aperfeiçoamento no desempenho de uma tarefa cognitiva específica ou as-
20 pecto de uma função cerebral relativa ao desempenho anterior ao treinamento. Por exemplo, se após um derrame cerebral, um paciente pode somente mover o dedo dele ou dela, um aperfeiçoamento no desempenho (ganho de desempenho) no paciente seria a capacidade de andar, por exemplo.

“Proporcionar de aperfeiçoamento sustentado” significa que o aperfeiçoamento no
25 desempenho de uma tarefa particular cognitiva permanece após a administração do agente de aumento ser interrompido.

Em consequência, a invenção também se refere a métodos de aperfeiçoar um déficit associado com um distúrbio ou condição do sistema nervoso central em um ser (particularmente um ser humano ou um outro mamífero ou vertebrado) caracterizado pelo fato de
30 compreender o tratamento do ser com um agente de aumento que desenvolve a função de via CREB e detecção de um aperfeiçoamento sustentado. A invenção também se refere a métodos adicionalmente compreendendo o treinamento do ser sob condições adequadas de modo a produzir um aperfeiçoamento no desempenho de uma tarefa de uma particular tarefa cognitiva.

35 Em uma realização, a invenção refere-se a um método de tratamento de um déficit cognitivo associado com um dano à memória associado com idade em um ser necessitando do referido tratamento caracterizado pelo fato de compreender (a) administração ao animal

de um agente de aumento que aumenta a função de via de CREB; e opcionalmente (b) treinar o ser sob condições adequadas de modo a produzir um aperfeiçoamento no desempenho pelo ser de uma tarefa cognitiva cuja perda está associada com danos à memória associada à idade.

5 Em ma realização particular, o agente de aumento é um inibidor é fosfodiesterase 4 (PDE4). Exemplos de inibidores 4 (PDE4) incluem rolipram e compostos da formula a seguir:

N.T., veja a fórmula na pagina 24 do original, em que Me significa metila e cPent significa ciclopentila. É compreendido que a fórmula mencionada ampara ambos enântime-
10 ros e misturas dos mesmos. Os compostos podem ser preparados usando a metodologia proporcionada pela Patente Norte-Americana de número 6.458.829 , as técnicas das quais estão aqui incorporadas a título de referencia. Em uma realização particular, os 3 e 5 carbonos da referida fórmula estão na configuração S.

N.T. veja a configuração na página 24 do original em que Me significa metila e
15 cPent significa ciclopentila. Outros exemplos de inibidores PDE4 podem ser encontrado na publicação U.S. de nº 2002/0028842 A1 (publicada em 7 de março de 2002), U.S Pat. Nº 6.458.829; U.S. Pat. Nº 6.525.055b1; U.S. Pat. Nº 5.552.438; U.S. Pat. Nº 6.436.965; em U.S Pat nº 6.204.275. Ainda outros inibidores 4PDE são conhecidos e prontamente disponíveis na técnica. A retardação mental impacta as funções cognitivas e o processamento cog-
20 nitivo incluindo aquisição de aprendizagem e memória (Weeber, E. J. et al., Neuron, 33:845-848)). A retardação mental pode ser causada por fatores genéticos ou cromossomais, infecções congênitas, teratogênicas (drogas e outros elementos químicos), má nutrição, radiação ou condições desconhecidas afetantes da implantação e embriogênese. As síndromes de retardação mental incluem, mas se limitam a, síndrome de Klinefelter, mosaicismo, trisomia,
25 13 (síndrome de Patau, trisomia 18 (Síndrome de Edward), síndrome de Turner, síndrome de cri du Chat, síndrome de Lesch-Nyhan (hiperucemia), síndrome de Huter, síndrome oculocerebrorenal de Lowe, mal de Gaucher, síndrome de Hurler (mucopolissacaridose), mal de Niemann-Pick, mal de Tay-Sachs, galactosemia, mal da urina de secreção de carvalho, fenilquetonura, aminoacidurias, acidemias, esclerose tuberosa e microcefalia primaria. As sín-
30 dromes de retardação mental também incluem síndrome de Rubinstein-Taybi, síndrome de down, síndrome de Angelmann, neurofibromatosis, síndrome de Coffin-Lowry, síndrome de Rett, distrofia miotronica síndrome da fragilidade X (por exemplo, fragilidade X-1 e fragilidade X-2) e síndrome de William (Weeber, E. J. et al., Neuron, 33:845-848 (2002)).

A invenção também se refere a métodos de terapia de um déficit cognitivo com
35 condição ou distúrbio de CNS (Sistema Nervoso Central) em um ser possuindo manipulação de células estames neuronal incompleta caracterizada pelo fato de compreender (a) a administração ao ser de uma agente de aumento que desenvolve a função de via de CREB; e

(b) treinar o ser sob condições adequadas para estimular ou induzir a atividade neuronal ou um padrão de atividade neuronal no ser. Pó “manipulação de célula de estame neuronal” se entende que (1) as células de estame neuronal exógenas são transplantadas para o cérebro ou coluna espinhal de um ser ou (2) células de estame neuronal endógeno são estimuladas a proliferar no ser. Métodos de transplante de células de estame neuronal para o cérebro ou coluna espinhal de um ser são conhecidas e prontamente disponíveis na arte. (veja por exemplo Cameron, H. A. e McKay, R.D. *Nat Neurosci.*, 2:894-897 (1999); Kurimoto, Y. et al., *Neurosci. Lett.*, 306:57-60 (2001); e Singh, G., *Neuropathology*, 21:110-114(2001)). Métodos de estimulação ou de proliferação de indução de células de estame neuronal endógena em um ser são conhecidas e prontamente disponíveis na técnica (veja por exemplo Gould, et al., *Trend Cogn. Sci.*, 3:186-192 (1999); Gould, E. et al, *Biol Psychiatry*, 48:715-20(2000), Nilsson, M. et al, *J. Neurobol.*, 39:569-578 (1999); Fuchs, E., and Gould, E., *Eur. J. Neurosci*, 12:2211-2214 (2000); and Gould, E. Et al., *Nat. Neurosci.*, 2:260-265 (1999)). Os métodos particulares de transplante de células de estame neuronais para o cérebro ou coluna espinhal de um ser e os método particular de estimulação ou proliferação de indução de células de estame neuronal endógena em um ser não são críticas aos que praticam a presente invenção.

O invenção também se refere a métodos de aperfeiçoamento ou melhoria na capacidade de aprendizagem e/ou desempenho em um ser com incapacidade de aprendizagem, linguagem ou leitura, ou mesmo combinações dos mesmos, caracterizado pelo fato de compreender (a) a administração ao ser de agente de aumento amplia a função de via CREB; e (b) treinar o ser sob condições adequadas para produzir um aperfeiçoamento no desempenho pelo ser de uma atividade cognitiva associada com a incapacidade de desempenhar aprendizagem, leitura e linguagem.

Agentes de aumento, conforme aqui referidos, são compostos com atividade farmacológica e incluem fármacos, compostos químicos, compostos iônicos, compostos orgânicos, ligantes orgânicos, incluindo cofatores, sacarídeos, peptídeos sintéticos e recombinantes, proteínas, peptídeos, seqüências ácido nucléicas, incluindo genes, produtos ácido nucléico, e outras moléculas e composições.

Por exemplo, agentes de aumento podem ser análogos cAMP permeante de célula (por exemplo 8-bromo cAMP); ativadores de ciclase adenilato1 (ACI) (por exemplo forskolina); agentes afetantes de receptor ligado ao G-proteína, tais como, porém não limitado a receptores adrenérgicos e receptores opioides e seus ligantes (por exemplo fenetilaminas); moduladores de concentração de cálcio intracelular (por exemplo, tapisigargina, agonistas receptores N-metil-D-aspartato (NMDA)); inibidores fosfodiesterase 4 (PDE4) responsáveis para ruptura de cAMP (por exemplo inibidores fosfodiesterase 1(PDE1) (por exemplo isobuto-meto-xantina (IBMX)). Inibidores fosfodiesterase 2(PDE2); inibidores fosfodiesterase

3(PDE3); inibidores fosfodiesterase 4 (PDE4) (por exemplo rolipram, HT-0712)etc)(veja também, por exemplo, U.S. Pat nº 6.458.829B1) a publicação U.S. de nº 2002/0028842A1 (publicada em 7 de março de 2002)) e moduladores de quinase proteína e fosfatases proteí-

5 Agentes de aumento podem ser CREB exógeno. CREB análogos, moléculas CREB-semelhantes, fragmentos de CREB biologicamente ativos, proteínas de fusão CREB, seqüências de ácido nucléico codificando CREB exógeno, análogos CREB, moléculas CREB-semelhantes, fragmentos CREB biologicamente ativos ou proteínas de fusão de CREB.

10 Agentes de aumento podem também serem moduladores da função CREB ou seqüências ácido nucléico codificam os moduladores da função CREB. Os moduladores da função CREB, conforme aqui usado, possuem a capacidade de modular a função de via CREB. Por “modular” se entende capacidade de mudar (aumentar ou diminuir) ou alterar a função de via CREB.

15 Os agentes de aumento podem ser compostos que são capazes de aumentar a função CREB no Sistema Nervoso Central. Tais compostos incluem mas não se limitam a, compostos que afetam a estabilidade da membrana e fluidez e a imunoestimulação específica. Em uma realização específica, o agente de aumento é capaz de transilientemente aumentar a função de via CREB no Sistema Nervoso Central.

20 Análogos CREB, ou derivados, são aqui definidos como proteínas possuindo seqüências de aminoácidos análogos a CREB endogenoso. Seqüências de amino ácidos análogos são aqui definidos de modo a significar seqüências de amino ácidos com identidade suficiente de seqüência de amino ácido de CREB endogenoso para possuir a atividade biológica do CREB endogenoso, porém com um ou mais mudanças “silenciosas” na seqüência de amino ácidos. Análogos CREB incluem CREM mamíferos, ATF-1 mamíferos e outro
25 membros de subfamília CREB/CREM/ATF-1.

Molécula CREB-semelhante, conforme o termo aqui usado, refere-se a uma proteína que funcionalmente arruma (mímica) o CREB. Moléculas CREB-semelhantes não necessitam possuir seqüências de amino ácido análogos ao CREB endogenoso.

30 Fragmentos polipeptídios biologicamente ativos de CREB podem incluir somente uma parte da seqüência de amino ácido de longa extensão do CREB, ainda possui atividade biológica. Os referidos fragmentos podem ser produzidos por deleções de terminal amino ou carboxila., assim como deleções internas.

35 Proteínas de fusão caracterizam ser por compreender uma proteína CREB conforme descrito aqui, referido como primeira porção, ligada à segunda porção não ocorrendo na proteína CREB. A segunda porção pode ser um aminoácido simples, peptídeo ou polipeptídeo ou outra porção orgânica, tal como um carboidrato, um lipídeo ou uma molécula inorgânica.

Seqüências de ácido nucléico são aqui definidas como heteropolímeros de moléculas de ácido nucléico. As moléculas de ácido nucléico pode ser duplo fiado ou simples fiado e pode ser um molécula deoxiribonucleotidea (DNA), tal como cDNA ou DNA genômico, ou uma molécula ribonucleotidea. Desta forma, a seqüência ácido nucléico pode, por exemplo

5 incluir um ou mais exons, com ou sem , de forma apropriada, introns, assim como um ou mais seqüências controle adequada. Em um exemplo, a molécula do ácido nucléico contém um estrutura de leitura aberta simples que codificam o produto do ácido nucléico desejado. A seqüência do ácido nucléico é “ligado operavelmente” para um promotor adequado.

A seqüência de ácido nucléico codifica uma proteína CREB desejado, análogo CEB

10 (incluindo CREM, A-1), molécula CREB-semelhante, fragmento CREB biologicamente ativo, proteína de fusão CREB ou modulador de função CREB podem ser isoladas a partir da natureza, modificada a partir de seqüenciais originais ou remanufaturadas, conforme descrito em, por exemplo, Ausubel et al., Current Protocol in Molecular Biology, John Wiley x sons, New York (1998); e Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition,

15 Cold Spring Harbor University Press, New York (1989). Ácidos nucléicos podem ser isolados e fundidos juntos por métodos conhecidos na técnica, tais como exploração e clonagem compatível de manufaturação ou locais restritos.

De forma típica, a seqüência de ácido nucléico será um gene que codifica a proteína CREB desejada, o análogo CREB, a molécula CREB-semelhante, a proteína de fuso

20 CREB ou o modulador de função CREB. Tal gene e caracteristicamente ligado operavelmente a seqüências de controle adequadas capaz de efetivar a expressão da proteína CREB ou o modulador da função CREB, preferivelmente no Sistema Nervoso Central. O termo “ligado operavelmente conforme aqui usado,, é definido como sendo o gene (ou a seqüência de ácido nucléico) está ligado às seqüências de controle em uma maneira que

25 permite a expressão do gene (ou a seqüência do ácido nucléico). Geralmente, ligado operavelmente significa contíguo.

Os controles de seqüência incluem um promotor transcricional, uma seqüência de operador opcional para controlar a transcrição, uma seqüência codificando pontos de ligação ribossomal RNA (mRNA) transmissor adequado e seqüências que controlam a terminação da transcrição e translação. Em uma realização particular, um gene recombinante (ou

30 uma seqüência de ácido nucléico) codifica a proteína CREB, o análogo CREB, a molécula CREB-semelhante, o fragmento CREB biologicamente ativo, a proteína de fusão CREB ou o modulador de função CREB pode ser colocado sob o controle regulador de um promoter que pode ser induzido ou repressado, daí oferecendo um grau maior de controle em relação

35 ao nível do produto.

Como aqui usado, o termo “promotor” refere-se à seqüência de DNA (ADN), comumente jusante (5') da região de codificação de uma estrutura de gene, que controla a ex-

pressão da região de código pelo reconhecimento provido em locais ligados para a polimerase RNA e outros fatores que podem ser necessários para iniciação da transcrição. Promotores adequados são bem conhecidos na técnica. Promotores exemplares incluem fator de alongação humana (EFI) e SV40. Outros promotores estão prontamente disponíveis na técnica (veja por exemplo, Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York (1998); Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor University Press, New York (1989); e a U.S Pat. Nº 5.682.735). Agentes de aumento podem ampliar a função de via CREB através de uma variedade de mecanismos. Por exemplo, um agente de aumento pode afetar uma via de transdução de sinal que conduz à indução de expressão de gene CREB-dependente. A indução de expressão de gene CREB-dependente pode ser alcançada, por exemplo, via regulação-ascendente dos realizadores positivos da função de CREB /ou regulação-descendente dos realizadores negativos da função CREB. Realizadores positivos de função CREB incluem ciclasas adenilata e ativadores CREB. Realizadores negativos de função CREB incluem fosfodiesterase cAMP (cAMP PDE) e repressores CREB.

Um agente de aumento pode implementar a função via CREB pela atuação bioquimicamente jusante de ou diretamente atuar em um ativador ou de forma repressora de uma proteína e/ou em uma proteína CREB contendo transcrição complexa. Por exemplo, função de via CREB pode ser afetado pelo aumento dos níveis das proteínas CREB transcricionalmente, post-transcricionalmente, ou ambos transcricionalmente e post-transcricionalmente; pelo alterar da afinidade de proteína CREB ou outros componentes necessários do complexo de transcrição, tal como, por exemplo, proteína CREB-ligante (proteína CBP);pela alteração da afinidade de uma proteína CREB contendo complexo de transcrição para elementos responsivos DNA CREB na região promotora, ou pela indução de imunidade quer passiva ou ativa para isoformas de proteína CREB. O mecanismo particular pelo qual um agente de aumento desenvolve a função de via CREB não é crítica para a prática da invenção.

Agentes de aumento podem ser administrados diretamente a ser em uma variedade de formas. Em uma realização preferida, agentes de aumento são administrados sistematicamente. Outras vias de administração são geralmente conhecidas na arte e incluem injeções intravenosas incluindo infusão e/ou injeção bolus, intracerebroventricularmente, intratecal, parenteral, mucosal, implante, intraperitoneal, oral, intradermal, transdermal (por exemplo, em polímeros de liberação lenta), intramuscular, subcutânea, topical, epidural. Outras vias adequadas de administração podem ser também usados, por exemplo, para atingir absorção através ligações epitelial ou mucocutaneas. Agentes de aumento particular podem também serem administradas pela terapia de gene, em que uma molécula DNA codificando uma ou proteína terapêutica particular ou peptídeo é administrado ao ser, por exemplo, atra-

vés de vetor, que faz com que a proteína ou proteína particular seja expressa e secretada em níveis terapêuticos “in vivo”.

Um vetor, conforme um termo aqui usado, refere-se um vetor ácido nucléico, por exemplo, um plasmídeo DNA, vírus ou outro replicante adequado (por exemplo, vetor viral).

5 Vetores virais incluem retrovírus, denovírus, parvovírus (por exemplo, vírus adeno-associado), coronavírus, vírus de cepa negativa tais como ortomixovírus (por exemplo, vírus de influenza), rabdovírus (por exemplo, vírus estomatites vesicular e rábico), paramixovírus (por exemplo, Measles e Sendai) vírus de cepa negativa de RNA tais como picornavírus e algafavírus, de vírus Dna de cepa dupla incluindo adenovírus, herpesvírus (por exemplo, 10 vírus do tipo Herpes Simples tipo 1 e 2, vírus Epstein-Barr, citomegalovírus) e vírus da varíola (por exemplo, vacina, varíola aviária e de passaro). Outros vírus incluem vírus de Norwalk, togavírus, falvírus, reovírus, papovírus, hepadonavírus, e vírus de hepatite, por exemplo. Exemplos de retrovírus incluem: leucosi-sarcoma de ave, C-tipo mamífero, vírus B-tipo, vírus tipo-B, grupo HTLC-BLV, lentivírus, espumavírus (Coffin, J.M. Retrovírus: The viruses 15 and their replication, In Fundamental Virology, third Edition, B.N. Fields, et al., Eds., Leppincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996). Outros exemplos incluem, vírus da leucemia murine, vírus do sarcoma murine, vírus do tumor mamário do rato, vírus da leucemia bovina, vírus da leucemia felina, vírus da leucemia aviária, vírus da leucemia T-célula humana, vírus endogenoso babuíno, vírus da leucemia do macaco gibão, vírus do macaco Pfizer Mason, 20 vírus da imunodeficiência simia, vírus do sarcoma simio, vírus e lentivírus do sarcoma de Rous. Outros exemplos de vetores são descritos, por exemplo, em MacVey et al., U.S. Pat. Nº 5.801.030, os ensinamentos dos quais são aqui incorporados por referência.

Uma sequência de ácido nucléico codificando uma proteína ou peptídeo (por exemplo proteína CREB, análogo CREB (incluindo CREM, ATF-1), molécula CREB-semelhante, 25 fragmento de CREB biologicamente ativo, proteína de fusão de CREB, modulador de função CREB) podem ser inseridos em um vetor de ácido nucléico de acordo com métodos geralmente conhecidos na técnica (veja, por exemplo, Ausubel et al, Eds. Current Protocol in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. New York (1998); Sambrook et al., Eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor University Press, New York 30 (1989)).

O modo de administração está preferivelmente no local das células alvo. Em uma realização particular, o modo de administração é para neurônios.

Agentes de aumento podem ser administrados em conjunto com outros componentes dos agentes biologicamente ativos, tais como tensoativos farmacêuticamente ativos (por exemplo glicerídeos) excipientes (por exemplo lactose) estabilizadores, preservativos, umectantes, emolientes, antioxidantes, veículos, diluentes e veículos. Se desejado, determinados adocicantes, flavorizantes e/ou agentes colorizantes podem ser também adicionados. 35

Agentes de aumento podem ser formulados como uma solução, suspensão, emulsão ou um pó liofilizado em associação com um veículo parenteral farmacêuticamente aceitável. Exemplos de tais veículos são água, salmoura, solução de Ringer, solução de cloreto de sódio isotônico, solução de dextrose, e 5 por cento de soro de albumina humana. Lipossomas e veículos não aquosos tais como os óleos fixados também podem ser usados. O veículo ou pó liofilizado pode conter aditivos que mantêm a isotonicidade (por exemplo cloreto de sódio, manitol) e estabilidade química (por exemplo tamponadores e preservativos). A formulação pode ser esterilizada pelo uso de técnicas comuns. Condutores farmacêuticos adequados são descritos em Remington's Pharmaceutical Sciences.

A dosagem do agente de aumento administrada a ser é aquela quantidade necessária para efetivar uma mudança na expressão de gene CREB-dependente, particularmente em neurônios. A dose administrada a um animal, incluindo a frequência da administração, variará dependendo de uma variedade de fatores, incluindo características farmacodinâmicas do agente de aumento particular, modo e via de administração; tamanho, idade, sexo, saúde, peso corporal e dieta do receptor; natureza e extensão dos sintomas sendo tratados ou a natureza e extensão das funções cognitivas que estão sendo aumentadas, tipo de tratamento em sendo aplicado, frequência do tratamento e o efeito desejado.

Agentes de aumento podem ser administrados em doses simples ou divididas (por exemplo uma série de doses separadas em intervalos de dias, semanas ou meses), ou em uma forma de liberação sustentada, dependendo dos fatores tais como natureza e extensão dos sintomas, tipo de tratamento aplicado e do efeito desejado. Outros regimes terapêuticos ou agentes podem ser usados em conjunto com a presente invenção.

A presente invenção será agora ilustrada pelo seguinte exemplo, o qual não deve ser considerado como limitando de forma nenhuma.

EXEMPLO

As cobaias eram 103 ratos da raça Sprague-Dale machos adultos (Taconic, Greentown, NY), pesando entre 275 a 300 g no momento do experimento. Os ratos foram isolados em gaiolas com uma facilidade de controle de temperatura do animal com ciclo de 12;12 de penumbra e tiveram acesso a alimentação e água *ad libitum*. Todos protocolos dos animais seguiram as normas NIH e foram aprovados pelo Cold Spring Harbor Laboratory Animal Care and Use Committee.

Reabilitação Motora com Tarefa de Fase Escalonada

A tarefa de fase escalonada usada no presente estudo foi caracterizada previamente por Klint et., *Journal of Neurotrauma*, 21st. Annual National Neurotrauma Society Symposium, 20(10):2003). Consiste em uma pista de 8' de extensão e 3,5' de largura cujas séries de 28 obstáculos foram afixadas. Os obstáculos eram alternativamente escalonada. 5 cm do ponto médio e 25 cm entre obstáculos. Este posicionamento colocava o ponto alto de super-

fície diretamente na linha com baia de caminhada natural de um rato de 350 g. Uma peça delgada de Plexiglass (8' de comprimento 2,5' de largura e 1mm de espessura) foi colocada no centro da pista de modo a prevenir que os ratos de costurarem a caminhada entre as etapas e também para servirem como uma muleta de modo a recuperar o andar após queda na superfície de caminhar desta fase. Os lados e cimo da pista foram fechadas com Plexi-
 5 glas de modo a limitar os movimentos laterais e verticais do animal. Gaiolas domesticas es-
 curecidas (12" x 12" x 12") foram afixadas em ambas extremidades da pista. Uma luz bri-
 lhante e um som com um gerador de ruído branco foram anexados ao interior da gaiola do-
 mestica e do lado de fora da gaiola de forma que ficava fechada dentro da pista. Uma porta
 10 controlada por computador foi usada para administrar a entrada e saída das gaiolas.

Nos dias de 1-3 os ratos foram manipulados, acostumados à pista, e treinados para livremente transitarem na pista caminhado na superfície superior dos obstáculos. Uma vez familiarizados com a pista, os ratos foram treinados usando um paradigma de reforço nega-
 tivo para (1) sair da gaiola; (2) transitarem na pista e (3) entrar na gaiola oposta para finali-
 15 zar o estímulo negativo (luz brilhante e ruído branco). Após 60 segundos de intervalo de re-
 pousou o rato foi então treinado de modo a voltar para a gaiola original usando os mesmos
 paradigmas de treinamento de reforço negativo. Iniciando o 14º dia de treinamento, os ra-
 tos foram treinados diariamente por 5 experimentos até que eles encontrassem um desem-
 penho de critério (latência <12 segundos, e 1 ou menos totais de erros em 3 cruzamentos
 20 consecutivos). Um erro foi apontado a cada vez uma pata deslizava fora da passada ou uma
 passada dirigida foi tomada que não atingiu a superfície de cima da passada.

Vinte e quatro horas após o rato alcançar o critério, ele foi danificado usando um dispositivo LFP. O animal foi liberado para recuperar-se por sete dias. No 8º dia pos dano, o rato foi testado para um desempenho básico (3 travessias) na tarefa de fase escalonada. No
 25 dia seguinte o animal foi randomicamente designado para um dos 5 grupos de tratamento:
 veículo com reabilitação (n=11), 0,15 mg/kg de HT-712 com reabilitação (n=13), 0.1 mg/kg
 de rolipram com reabilitação , (n=10) ou veículo sem reabilitação (n=10). Injeções foram da-
 das i.p 20 minutos antes da reabilitação (ou uma vez diariamente para os grupos de não
 reabilitação). Reabilitações/injeções foram repetidas por 8 dias consecutivos. No 10º dia (o
 30 ultimo dia de reabilitação) não foram dadas injeções e todos os ratos foram testados outra
 vez para desempenho na etapa SS.

Condicionamento por Traço

Após uma semana completando a reabilitação da reabilitação motora, os ratos fo-
 ram treinados por condicionamento de traço por medo. Um aparelho de condicionamento
 por medo para o rato padronizado (Méd. Associates, Inc., VA) foi colocado dentro de uma
 35 gaiola atenuante de som penumbra (Med Associates, Inc. VA). No dia do treinamento, o
 rato foi colocado na câmara de condicionamento por 2 minutos antes do ajuste do estímulo

condicionado (CS), um tom de 2800 Hertz que durou por 20 segundos a 75 dB. Trinta segundos após o termino do tom, um estímulo incondicionado de choque a 0,5 mA (US) foi aplicado ao animal por 2 segundos. Um intervalo de 3 minutos de interexperimento separou o ajuste do US e o procedimento CS. Os ratos foram treinados por 5 aparelhamentos de CS e US. Após o último US, o rato foi deixado na câmara por um período adicional de 30 segundos e então retornou à sua gaiola. Após cada matéria experimental, o aparelho foi completamente limpo com 75% de etanol, água, secado e ventilado. Os ratos foram 7 dias após o treinamento. De modo a diferenciar o contexto do dia de treinamento, a testagem foi realizada em uma câmara de atenuação de som e câmaras internas com novas dimensões, cores, texturas e iluminação. A câmara foi limpa usando-se uma solução Windex ao invés de etanol. Cada teste iniciou com 120 segundos de familiarização, então 20 segundos de tom (CS), seguido por um período adicional de 240 segundos de intervalo de repouso, até que o CS ficou presente por 3 vezes. O congelamento foi apontado em intervalos de 5 segundos. O congelamento foi definido como uma falha completa de movimento por 3 a 5 segundos. Um percentual de congelamento foi calculado pela subtração do percentual do congelamento pré-CS (durante o inicial de 20 segundos) do percentual total seguindo o CS. Cada experimento foi filmado. Em todas os experimentos, o elemento de experiência estava cego para o uso do fármaco e condições de treinamento dos elementos.

Reabilitação Cognitiva com Reconhecimento de Matéria Nova Repetida

A arena de exploração aberta (uma caixa de Plexiglas de 80 cm de comprimento, 60 cm de largura, e 50 cm de altura, indiretamente iluminada com 55 lumens) continha uma camada delgada de matéria de cama de gaiola, que foi substituída com cama fresca no início de cada dia. Uma câmara de vídeo diretamente montada acima da arena registrava todas as sessões de treinamento e teste. Os elementos foram colocados nas posições marcadas na are central da caixa, e a posição espacial os elementos (lados esquerdo e direito) foi contrabalançado entre os elementos. Antes do treinamento OR os animais foram manuseados e familiarizados à arena de exploração por 4 minutos por dia durante 3 dias consecutivos. Para o treinamento os ratos livremente exploraram a arena contendo dois objetos (por exemplo (por exemplo um castiçal) durante 7,5 minutos. Vinte e quatro horas após o treinamento, o rato foi colocado na arena de exploração durante 5 minutos com um objeto que ele havia explorado no dia anterior e um outro objeto de tamanho familiar. Para fins deste estudo nós iremos referir à sessão de treinamento e da sessão de testagem seguinte 24 após um simples "Experimento". Um dia (24 horas) após o complementar de um experimento, as cobaias começaram um novo experimento por treinar com um novo conjunto de objetos idênticos, seguido por sessões de testagem no dia seguinte. Durante a reabilitação cognitiva, os ratos No total cada rato foi treinado com 17 pares de objetos (5 antes do dano e 13 após o dano cerebral). Durante o treinamento, o numero de alcances e o tempo despendido para cada

exploração foi registrado. Durante a testagem, o tempo gasto explorando cada objeto foi registrado. Um índice de discriminação foi calculado com o tempo de exploração dos novos e antigos objetos, usando a seguinte fórmula $((\text{novo objeto} - \text{antigo objeto}) / (\text{novo objeto} + \text{antigo objeto})) * 100$.

5 O tempo do processo da reabilitação cognitiva foi como a seguir. Veja a Figura 1 para uma representação gráfica do procedimento de reabilitação: Dia 1-10: Experimentos 1-5, análise pré-dano; Dia 11: indução do dano cerebral traumático experimental (TBI); Dia 12-18: recuperação do TBI; Dia 19-20: Experimento, base pós-dano (BS1); Dia 21-22: Experimento 7, treinamento com fármaco (TD1); Dia 23: Experimento, teste de memória de curta
10 duração (STM) com 4 horas de intervalo entre o treinamento e o teste sem uso de fármaco; Dia 24-25: Experimento 9, desempenho de segunda base estável (BS2) anterior a reabilitação por administração de fármaco; Dia 26-34: Experimento 10-14, reabilitação cognitiva por administração de fármaco (fármaco fornecido 20 antes do treinamento); Dia 35-36: Experimento 15, o primeiro sem fármaco ministrado para pós-reabilitação de memória (Ass1)
15 quando do tempo de treinamento; Dia 42-43: Experimento 16, segundo após 1 semana de repouso (Ass2) ministrado para pós-reabilitação de memória; Dia 79-79: Experimento 17, terceiro após 5 semanas de repouso (Ass3) ministrado para pós-reabilitação de memória; Dia 85: condicionamento por traço; Dia 92: teste de condicionamento de traço.

Redução de Dano Cerebral Traumático

20 O dano cerebral traumático foi produzido usando-se o bem caracterizado modelo de percussão fluido lateral (LFP) (McIntosh et al., Neurosci. 28(1): 233-34 (1989), Hallam et al., J. Neurotrauma, 21(5): 521-39 (2004). Em resumo, os ratos foram anestesiados, entubados, e mecanicamente ventilados com 2% de isoflurano usando o ar cirúrgico como um condutor de gás. A temperatura corporal foi monitorada e mantida a $37,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por um controlador
25 de temperatura de informação (Physitemp Instruments, Clifton, New Jersey). Uma incisão intermediária foi feita no escalpo e uma craniotomia circular de 4,8mm foi realizada no meio entre a região bregma e a região lambda, 3,0 à direita da sutura central. Um conector leur-lock modificado (cânula de trama), 2,6 mm de diâmetro interno, foi firmado na craniotomia com adesivo cianoacrilico e acrílico dental. O TBI foi produzido por rapidamente injetar um
30 pequeno volume de solução salina na cavidade craniana com um dispositivo de percussão fluida (VCU Biomedical Engineering, Richmond, VA). A cobaia foi então removida do dispositivo, removida a cânula e o acrílico, e a incisão foi suturada. A ventilação foi continuada com ar ambiente sem isoflurano até uma respiração espontânea. O dispositivo LFP foi calibrado para um dano cerebral severo (3,2atm). O referido dano cerebral resultou uma taxa de
35 mortalidade de 34% (22 a 30 ratos sobreviveram para estudo OR, e 57 dos 85 ratos sobreviveram no estudo SS)).

Preparação do Fármaco e Injeção

Os inibidores 4 (PDE4) HT-0712 (0,15mg/kg) ou Rolipram (0,1 mg/kg) foram dirigidos em um veículo de solução salina contendo 1.5% de sulfoxide dimetila (DMSO) e 10% de Cremophor. Esta dosagem foi escolhida a partir d estudos prévios mostrando 0,15 mg/kg de HT-0712 foi a mais eficaz dose para aumento da memória nos ratos (McDonald et al., Society for Neuroscience, Vol 24, Resumo 6821.7. (2004)

Analise Estatística

Todos os dados estão expressos como sendo $\pm$ SEM. A análise dos dados foi realizada usando SPSS, o programa 12.0 (SOSS, Chicago, Illinois). Nível significativo foi $P < 0,05$ para todas os testes. Para efeito de comparação do desempenho pré-dano pós-dano na etapa escalonada, um teste parelhado foi realizado usando-se todos os grupos para analise. Um ANOVA foi realizado entre grupos para base de analise pós-dano (1 dia) e o atestamento da pós-reabilitação locomotora (1 dia). Para análise da etapa de escalonamento (dia 2-10), a variável dependente (faltas de fundo ou latência) foi analisado usando-se repetidas-medições ANOVA com dias à medida que repetições dentro dos objetos variavam. Os testes pós-hoc de Dunnett foram realizados para se determinar as diferenças estatísticas entre os grupos de veículo injetado os de fármaco injetados. Para analise do reconhecimento dos objetos e os dados de condicionamento de traço, testes t de observados não alinhados foram usados para comparar entre os grupos em cada dia de teste.

Resultados

Inibidores PDE4 Desenvolvem a Reabilitação Motora

Os nossos experimentos anteriores em camundongos jovens adultos estáveis cuja formação de memória de longa duração foi desenvolvida pelos inibidores PDE4 HT-0712 e rolipram (Bourtchouladz r., et al (2003). Um modelo de camundongo de Síndrome de Rubinstein Taybi: memória de longa duração defectiva é ameriolatado por inibidores de fosfodiesterase 4 (PDE4). *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 100:10518-10522; Scott r., et al., (2002) CREB e a descoberta dos aperfeiçoadores cognitivos. *Journal of Molecular Neuroscience* 19:171-177; tully t., et al., (2003); Objetivando a via CREB para aperfeiçoamento da memória. *Nature Reviews Discovery* 2:267-77). Especificamente, os fármacos desenvolvem a formação da memória pele redução da quantidade treinamentos necessários para produzir memória de máxima longa duração. Se estes inibidores PDE4 puderam facilitar a reabilitação motora seguinte ao dano cerebral nos ratos foi testado por redução da quantidade de reabilitação necessária para recuperar função motora habilitada. Para tal finalidade, os ratos foram treinados a um critério de desempenho em uma atividade de locomoção habilitada, a tarefa de passo escalonado. Após atingir o desempenho critério, s ratos foram cérebro danificados usando-se o dispositivo de dano cerebral LFP e liberado para se recuperar por 1 semana. Sete dias após o dano (reabilitação por 1 dia), todos do grupo de cérebro danificados tiveram uma significativa interrupção no andar e na precisão

dos passos na locomoção habilitada conforme avaliado por um significativo aumento nas falhas de base ($t = 18.36$, $p = 4,28e-25$) (Figura 2A) e latência de travessia ($t = 13,52$, $p = 7,86e-19$) comparada à base de pré-dano. Uma ANOVA em 1 dia de reabilitação revelou insignificantes diferenças no desempenho na base pós-dano entre os grupos de tratamento

5 (F 4,50 = 0,646, $p = 0,632$). No dia seguinte, os ratos foram aleatoriamente apropriados para receberem indistintamente administração diária de inibidores veículo/PDE4 com reabilitação ou injeção diária de inibidores veículo/PDE4 sem reabilitação. Para os ratos receptores da reabilitação, um efeito significativo do tratamento com fármaco nos erros da etapa escalonada (F2,32 = 7,50, $p = 0,02$) e latência foi observado. A análise pós-hoc de Dunnet revelou que

10 ambos os grupos HT—712 ($p = 0,008$) e grupo rolipram ($p = 0,004$) realizaram-se significativamente melhor que o grupo tratado.

Em adição, caso a injeção diária do veículo/HT-0712 sem reabilitação diária aperfeiçoaria o desempenho no dia de teste final fosse acessado. Um comparação ANOVA o 10º dia mostrou um efeito significativo do tratamento (F4,50 = 10.11, $p = 0,00004$). O post-hoc

15 da análise de Bonferroni não revelou diferenças entre os grupos veículos ($p = 10$) e nenhuma diferença entre os grupos inibidores PDE4 ($p = 1.0$). Contudo, todos os grupos receptores de injeções diárias de inibidores PDE4 realizaram-se significativamente melhor que todos controles de veículos injetado (a comparação não é mostrada). Especificamente, o grupo HT-0712 com nenhuma reabilitação realizou-se significativamente melhor que o grupo veículo

20 sem reabilitação ($p = 10$) e significativamente melhor que o grupo veículos com reabilitação ($p = 0,28$).

Inibidores PDE4 Aumentam a Reabilitação Cognitiva

Nossos prévios experimentos mostraram que os inibidores PDE4 rolipram e HT-0712 podem melhorar os déficits de memória de longa duração nos camundongos, especificamente camundongos CBP^{+/−} mutantes. Estes camundongos CBP^{−/−} mutantes são de um

25 modelo de camundongo da síndrome de Rubinstein-Taybi e possuem déficits de memória provocada por uma lesão molecular na etapa via CREB (Bourtchuladze et al., Proc. Natl Acad Scie USA., 100(19):10518-22, (2003). Olike et al., Hum Mol Genet. 8(3):387-96 (1999)). O tratamento com o HT-0712 inibidor PDE4 quando do treinamento foi capaz em

30 restaurar a função de memória de longa duração a níveis similares do tipo camundongos não domésticos. Numerosos estudos têm mostrado que ratos sob dano de LFP possuem déficits em memória de longa duração (cite). Duas hipóteses principais foram testada(1) poderia uma simples administração de HT-0712 inibidor de PDE4 dada quando do tempo de treinamento melhorar os déficits em ratos com dano cerebral observados, e (2) poderia o

35 HT-0712 inibidor PDE4 ser usado para facilitar a reabilitação cognitiva em ratos com dano cerebral. Para testar estas hipóteses, uma atividade foi necessária para que: 1) necessitasse de uma formação de memória de longa duração, 2) permitisse para um treinamento e

teste do desempenho da memória, e (3) assegurar o desempenho em um experimento individual não fosse confundido pelo desempenho da memória em um experimento anterior. A tarefa de reconhecimento de objeto promoveu um encontro dos três requisitos. O reconhecimento do objeto é uma atividade não aversiva que recai sobre o comportamento exploratório natural do rato. Durante o treinamento para esta tarefa, os ratos são apresentados com dois objetos idênticos. Dadas as exposições adequadas (tempo de treinamento), ratos normais formam um LTM de um objeto explorado. Quando os ratos são apresentados com dois diferentes objetos (isto é um objeto novo e um objeto previamente explorado) os ratos irão escolher em despendendo mais tempo explorando o novo objeto (cite). Esta tarefa pode ser realizada repetidamente nos mesmos animais por expô-los seriamente a diferentes conjuntos de novos objetos. Desta forma, o reconhecimento do objeto é uma tarefa ideal para testar estas hipóteses.

Antes do dano, os ratos foram treinados/testados por 5 experimentos para memória de reconhecimento de objetos durante 24 horas de treinamento. Em todos os experimentos, os ratos retiveram uma memória do objeto previamente explorados e expuseram uma preferência por objetos novos (Figura 3E). Não houve significativa diferença no desempenho de memória entre os grupos que iriam posteriormente receber o fármaco ou veículo (Figura 3E). Contudo, todos os índices de discriminação pré-dano para cada grupo foram mediados e o desempenho de base do pré-danificado para cada grupo foi obtido (Figura 3A). Novamente não houve diferenças significativas entre os grupos ($p=0,391$). Uma vez o completar do experimento 5, os ratos foram danificados com o dispositivo LFP e permitidos se recuperarem por 7 dias. No primeiro experimento base seguinte ao dano (Figura 3B), ambos os grupos mostraram déficits de memória de longa duração. Não houve estatisticamente significativa diferença entre os grupos ($p=.665$) nesta primeira base de acesso. Desta forma, o dano cerebral experimental resultou em déficits de memória no reconhecimento de memória.

Em seguida, contudo HT-0712 inibidor PDE4 pode aumentar a memória de longa duração para reconhecimento de objeto nos ratos com dano cerebral foi determinado. Os ratos foram aleatoriamente introduzidos no grupo de treinamento e injetados durante 20 minutos antes da sessão de treinamento com indistintos veículos ou HT-0712. Após o teste, o grupo receptor de HT-0712 mostrou uma preferência para o novo objeto e desempenhou-se significativamente melhor que o grupo veículo ($p=0,001$) (Figura 3B). Entretanto, uma administração simples de HT-0712 inibidor PDE4 podia melhorar o déficit de longa duração observada nos cérebros danificados dos ratos.

Em seguida, estes ratos tiveram disfuncionalidade na memória de curta duração em adição a déficit de memória de longa duração foi determinada. Para testar estes, ambos grupos (sem fármaco) foram treinados e testados por 4 horas para retenção de memória de curta duração. Ambos grupos mostraram retenção do objeto previamente explorados e tive-

ram preferência para novos objetos 4 horas após o treinamento (Figura 3C). Não houve significativas diferenças entre grupos ($p=0.311$). Contudo, dano LFP interrompeu a memória de longa duração dos ratos para reconhecimento de objetos, porém deixou a memória de curto tempo não afetada ao ponto onde os ratos puderam desempenhar-se normalmente 4 horas após o treinamento.

Com o propósito de se determinar se uma simples administração do HT-0712 mudou o desempenho da memória de longa duração, os animais foram treinados por uma segunda vez sem o fármaco e o a injeção do veículo (Figura 4A, dia 0). Sob a testagem não houve diferença entre os grupos veículo e HT-0712 ($p=0.607$). Isto indicou que embora uma simples injeção de HT-0712 poderia aumentar memória de longa duração para aquele experimento, uma administração de um fármaco simples não melhorou os déficits de memória de reconhecimento de objeto dos animais.

A reabilitação cognitiva por administração de fármaco com HT-0712 foi iniciada. Os ratos foram submetidos a 5 experimentos de teste/treinamento OR. Aos ratos foram administrados indistintamente veículo ou HT-0712 por 20 minutos antes de cada sessão de treinamento. No dia 1 da reabilitação ($p=0.001$), dia 2 ($p=0.001$, dia 3 ($p=0.007$) e dia 5 ($p=0.001$), o grupo HT-0712 desempenhou-se de forma significativamente melhor que o grupo veículo.

De modo a acessar qualquer aperfeiçoamento na função memória de longa duração seguindo reabilitação cognitiva assistida por fármaco, os ratos foram testados/treinados sem o tratamento com fármaco. O grupo que recebeu reabilitação cognitiva assistida por HT-0712 desempenhou-se significativamente melhor que aquele do grupo veículo ($p=0.003$) (Figura 4B). Isto implica que o HT-0712 inibidor PDE4 dado durante a reabilitação cognitiva repetida foi capaz de melhorar o déficit de memória de longa duração para reconhecimento de objetos observados in cérebro de ratos danificados.

Se a observada melhoria do déficit de longa duração foi devida ao efeito subagudo da repetida administração de HT-0712, ou o efeito verdadeiro da reabilitação foi determinado. Contudo, os ratos foram permitidos repousar por 1 semana e acessaram a função de memória de longa duração sem fármaco. Novamente o efeito da reabilitação cognitiva assistida por PDE4 persistiu, e o grupo HT-0712 desempenhou-se melhor que o grupo veículo tratado ($p=0.04$) (Figura 4C).

Com o propósito de determinar se este efeito era duradouro, os ratos permitiu-se repousar por 7 semanas. Após o que ele foram manuseados e re-familiarizados na arena OR. Seguindo a refamiliarização (8 semanas após o termino da reabilitação), os ratos foram testados para desempenho OR. Novamente o grupo receptor HT-0712 presenciou um desempenho de reabilitação significativamente melhor que o grupo veículo tratado ($p=0.012$) (Figura 5A). A partir destas duas conclusões podem ser produzidos ilustrações, primeiro que

o dano cerebral LFP resulta em duradouro déficits na memória de longa duração para uma tarefa de reconhecimento de um objeto, e, segundo, a reabilitação cognitiva assistida por HT-0712 pode melhorar estes déficits de memória de longa duração para tarefa de reconhecimento de um objeto.

Com o propósito de determinar se a referida reabilitação foi específica ao reconhecimento do objeto ou se este se generalizou às atividades dependentes do hipocampo, os ratos foram testados quanto ao rendimento da memória em tarefas de condicionamento por traços de ameaça. Nesta versão dependente do hipocampo deste tipo de tarefa os ratos são treinados a associar um tom (CS) com um choque (US). Um intervalo de “traço” de 30 segundos de separa o CS e US, fazendo desta uma atividade dependente do hipocampo (McEcheron et al., *Hippocampus*, 8(6):638-46, (1998). Quando os ratos foram testados 1 semana após o treinamento, o grupo receptor IT-0712 presenciou um reabilitação cognitiva desempenhada significativamente melhor que o grupo veículo ($p=0,012$ (FIG. 5b). Isto implica que o grupo IIT-012 presenciou um reabilitação cognitiva de forma generalizada a uma tarefa dependente do hipocampo.

Devido reabilitação cognitiva generalizada a partir de uma tarefa dependente do hipocampo para uma outra, caso a reabilitação de PDE4 presenciada foi específica ao método de reabilitar ou isto de fato generaliza aperfeiçoamentos em múltiplas modalidades foi verificada. Especificamente, seria capaz o ser que também recebeu a reabilitação motora PDE4 assistida também obter um desempenho de ganho de memória aperfeiçoado em uma atividade não motora ?. Para este fim , uma semana seguinte à reabilitação motora assistida pelo PDE4, os ratos de reabilitação motora foram treinados na tarefa de condicionamento de estímulo por medo e foram testados 1 semana depois. Não houve diferença significativa entre qualquer dos grupos submetidos à reabilitação ($p=0.185$) (Figura 5C)

Uma comparação estatística direta entre os animais de reabilitação motora e os animais de reabilitação cognitiva através da memória de estímulo por medo torna-se questionável. Um congelamento pré-CS muito maior (dados não mostrados) foi observado nos grupos de reabilitação motora. É possível que como um resultado do paradigma de treinamento de reforço negativo usado para motivar os animais quando realizando a tarefa na etapa de reação, os animais tiveram um temor crescente generalizado a qualquer ambiente privacional não doméstico. Isto aumentou o temor de forma generalizada mostrado como um congelamento que poderia mascarar qualquer efeito do tratamento.

Todas as publicações, patente e pedidos de patente mencionadas na presente especificação são incorporadas aqui a título de referencia que ao mesmo se estende como se cada publicação individual, patente o pedido de patente fosse especificadamente e individualmente incorporada por referencia.

Embora a presente invenção tenha sido particularmente mostrada e descrita com

referencias às realizações preferidas contudo, será compreendido pelos versados no assunto que várias mudanças na forma e detalhes pode ser feitas no mesmo sem se afastar do âmbito da presente invenção incluídas pelas reivindicações apenas



PI0711816-3

REIVINDICAÇÕES

1. Método para aperfeiçoar um déficit cognitivo associado com um distúrbio ou condição de sistema nervoso central (CNS) em um animal **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender o tratamento do animal com inibidor fosfodiesterase 4 (PDE4) na ausência de um treinamento formal cognitivo.

2. Método de acordo com a reivindicação 1 **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido ser um ser humano.

3. Método de acordo com a reivindicação 2 **CARACTERIZADO** pelo fato que o referido déficit cognitivo é uma retardação mental.

4. Método de acordo com a reivindicação 2 **CARACTERIZADO** pelo fato que o referido déficit cognitivo é um dano na memória.

5. Método de acordo com a reivindicação 4 **CARACTERIZADO** pelo fato que o referido dano na memória esta associado à idade.

6. Método de acordo com a reivindicação 2 **CARACTERIZADO** pelo fato que o referido déficit cognitivo esta associado com uma doença ou condição neurovegetativa.

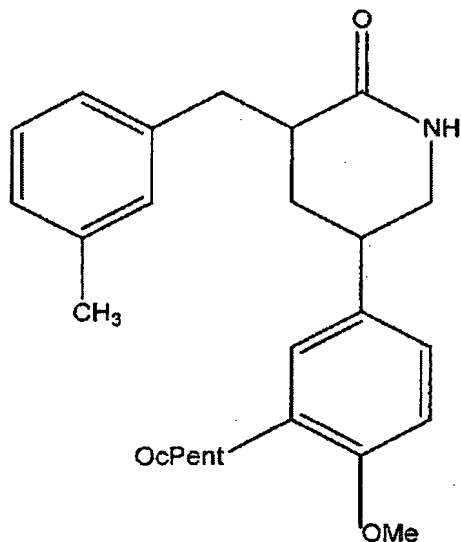
7. Método de acordo com a reivindicação 2 **CARACTERIZADO** pelo fato que o referido déficit cognitivo esta associado com uma condição ou doença psiquiátrica.

8. Método de acordo com a reivindicação 2 **CARACTERIZADO** pelo fato que o referido déficit cognitivo está associado com perda dependente de um trauma em uma função cognitiva.

9. Método de acordo com a reivindicação 2 **CARACTERIZADO** pelo fato que referido déficit cognitivo está associado com uma falha genética.

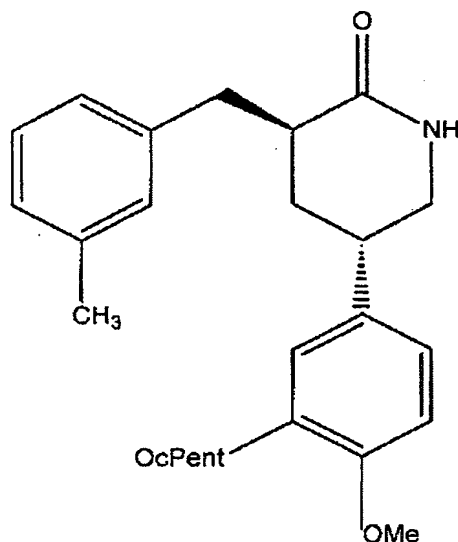
10. Método de acordo com a reivindicação 2 **CARACTERIZADO** pelo fato que o referido déficit cognitivo resulta da manipulação de uma célula estame neuronal.

11. Método de acordo com a reivindicação 1 **CARACTERIZADO** pelo fato que o inibidor fosfodiesterase 4 (PDE4) é selecionado de rolipram ou compostos de Formula I:



em que Me significa “metila” e cPent significa ciclopentila e enântimeros e misturas dos mesmos

12. Método de acordo com a reivindicação 11 **CARACTERIZADO** pelo fato que o inibidor fosfodiesterase 4 (PDE4) compreende a estrutura:



5

em que Me significa “metila” e cPent significa “ciclopentila”.

13. Método para prover um aperfeiçoamento sustentado em um déficit cognitivo associado com um distúrbio ou condição do sistema nervoso central em um ser **CARACTERIZADO** pelo fato que compreende a administração a este ser um inibidor fosfodiesterase 4 (PDE4); e a detecção do referido aperfeiçoamento sustentado.

14. Método de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADO** pelo fato que adicionalmente compreende a etapa do treinamento do ser sob condições adequadas para produzir um aperfeiçoamento no desempenho de uma tarefa cognitiva em particular.

15. Método de acordo com a reivindicação 14 **CARACTERIZADO** pelo fato que o ganho performático é alcançado em relação ao desempenho da referida tarefa cognitiva alcançada pelo treinamento isolado.

16. Método de acordo com a reivindicação 14 **CARACTERIZADO** pelo fato que o treinamento compreende sessões de treinamento múltiplas.

17. Método de acordo com a reivindicação 14 **CARACTERIZADO** pelo fato que o referido inibidor fosfodiesterase 4 (PDE4) é administrado antes e durante cada sessão de treinamento.

18. Método de acordo com a reivindicação 14 **CARACTERIZADO** pelo fato que o referido inibidor fosfodiesterase 4 (PDE4) é administrado após cada sessão de treinamento.

19. Método para aperfeiçoamento da estimulação da atividade neuronal ou um padrão de atividade neuronal, de modo que jaz um circuito neuronal, em um ser

CARACTERIZADO pelo fato que compreende o ser com um inibidor fosfodiesterase 4 (PDE4) na ausência de um treinamento formal cognitivo.

20. Método de acordo com a reivindicação 19 **CARACTERIZADO** pelo fato que o referido ser um ser humano.

5 21. Método para prover aperfeiçoamentos sustentados na estimulação de atividade neuronal ou um padrão de atividade neuronal, de modo que jaz um circuito neuronal específico, em um animal **CARACTERIZADO** pelo fato que compreende administrar ao ser um inibidor fosfodiesterase 4 (PDE4); e, a detecção do referido aperfeiçoamento sustentado.

10 22. Método de acordo com a reivindicação 21, **CARACTERIZADO** pelo fato que adicionalmente compreender a etapa de treinamento do ser sob condições suficientes a estimular ou induzir uma atividade neural ou um padrão de atividade neuronal no ser.

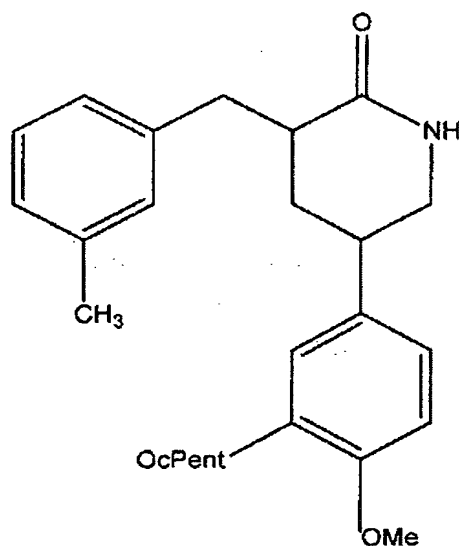
23. Método de acordo com a reivindicação 22 **CARACTERIZADO** pelo fato que o referido ser é um ser humano

15 24. Método de aperfeiçoamento de um déficit de mobilidade associado com uma condição ou distúrbio do sistema nervoso central em um ser **CARACTERIZADO** pelo fato que pelo fato de compreender o tratamento do ser com inibidor fosfodiesterase 4 (PDE4) na ausência de um treinamento cognitivo formal.

25. Método de acordo com a reivindicação 24 **CARACTERIZADO** pelo fato que o referido ser é um ser humano

20 26. Método de acordo com a reivindicação 24 **CARACTERIZADO** pelo fato que o referido inibidor fosfodiesterase 4 (PDE4) é selecionado de rolipram ou compostos de fórmula I:

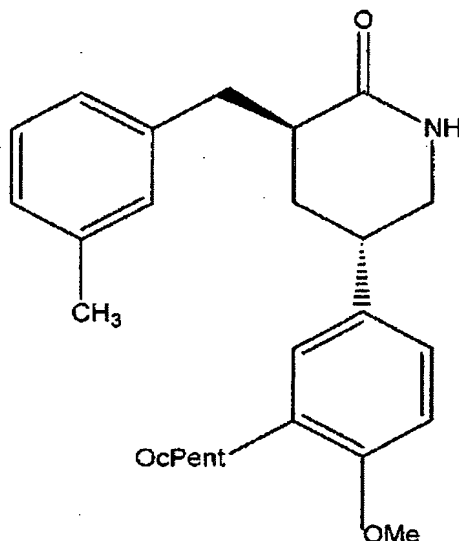
Formula I



25 reivindicações em que Me significa "metila" e cPent significa "ciclopentila" e enân-

tiomeros e misturas dos mesmos.

27. Método de acordo com a reivindicação 26 **CARACTERIZADO** pelo fato que o inibidor fosfodiesterase 4 (PDE4) compreende a estrutura:



5 reivindicações em que Me significa “metila” e CPent significa “ciclopentila”.

28. Método para prover aperfeiçoamento sustentado em um déficit de mobilidade associado com uma condição ou distúrbio no sistema nervoso central **CARACTERIZADO** pelo fato que compreende a administração ao ser de um inibidor fosfodiesterase 4 (PDE4); e a detecção do referido aperfeiçoamento sustentado.

10 29. Método de acordo com a reivindicação 28, **CARACTERIZADO** pelo fato que adicionalmente compreende a etapa de treinamento do ser sob condições suficientes para produzir um aperfeiçoamento no desempenho de uma tarefa cognitiva em particular.

30. Método de acordo com a reivindicação 29 **CARACTERIZADO** pelo fato que ganho performático é alcançado em relação o desempenho da referida tarefa cognitiva alcançada pelo treinamento isolado.

15 31. Método de acordo com a reivindicação 29 **CARACTERIZADO** pelo fato que compreende sessões de treinamento múltiplas.

32. Método de acordo com a reivindicação 29 **CARACTERIZADO** pelo fato que o inibidor fosfodiesterase 4 (PDE4) é administrado antes e durante cada sessão de treinamento.

20 33. Método de acordo com a reivindicação 29 **CARACTERIZADO** pelo fato que o referido inibidor fosfodiesterase 4 (PDE4) é administrado após cada sessão de treinamento.

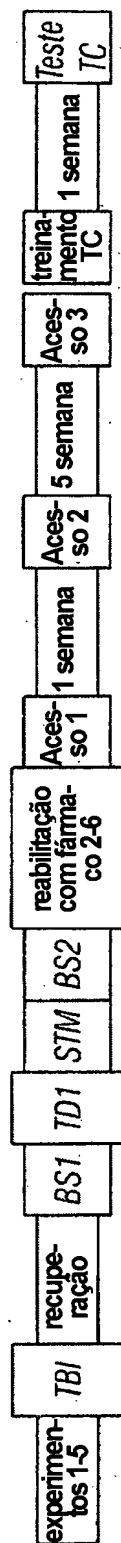


FIG. 1

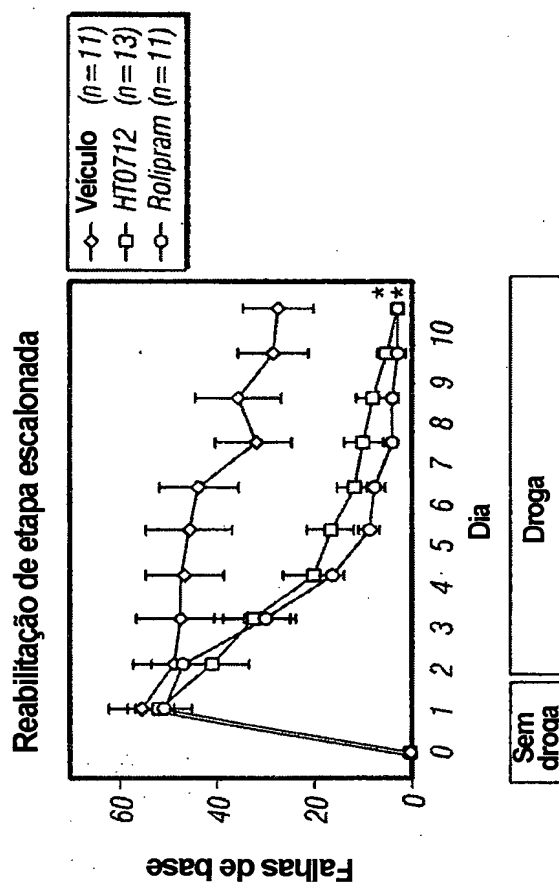
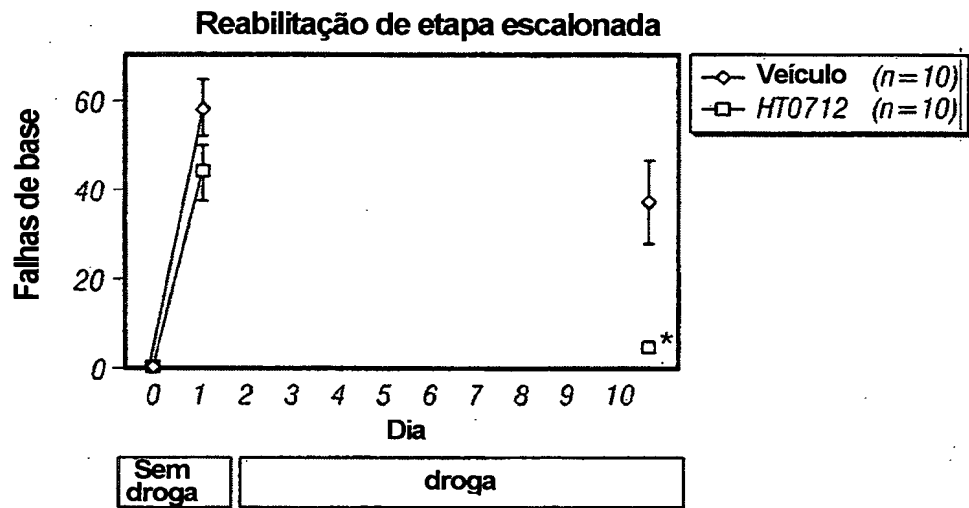
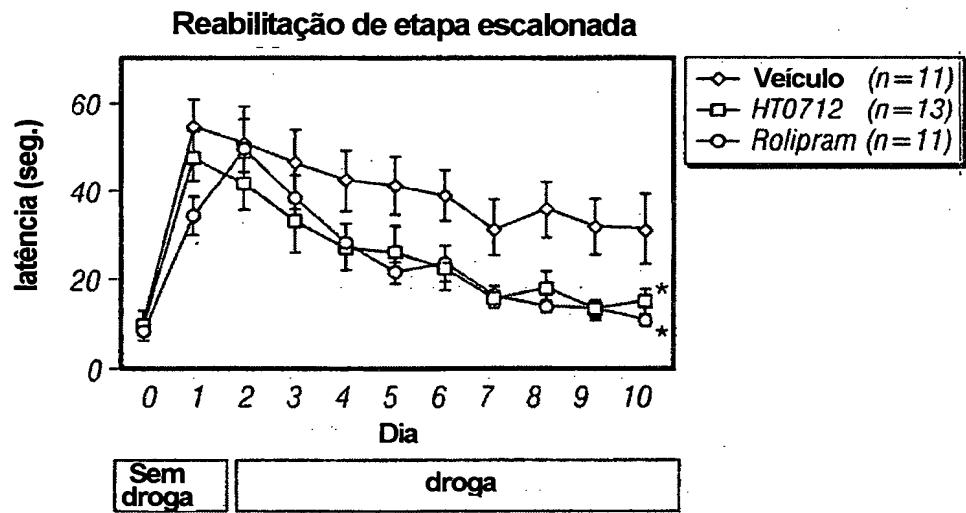
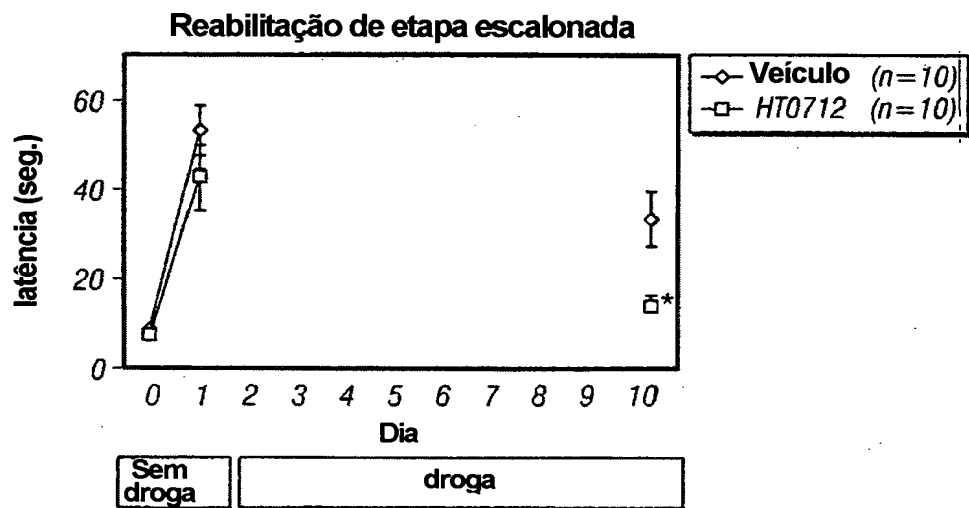
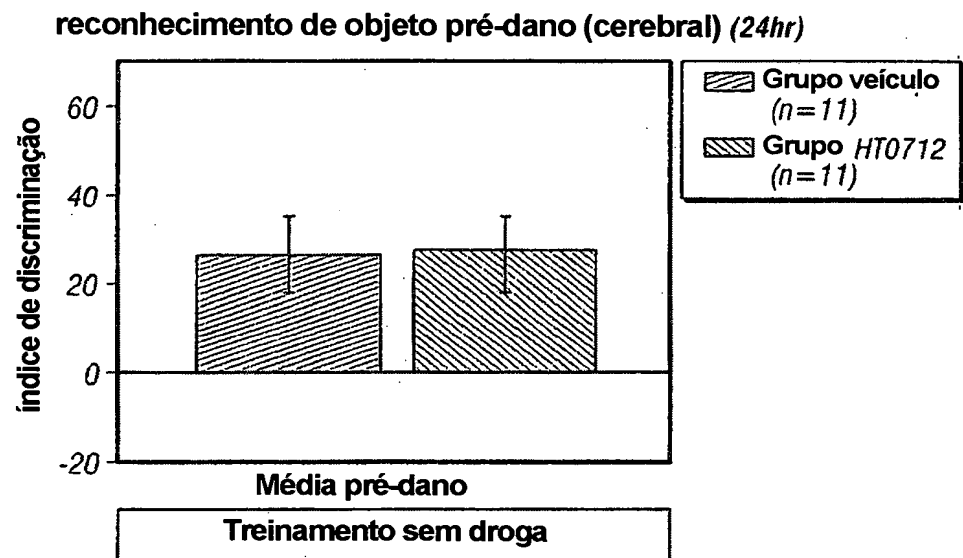


FIG. 2A

**FIG. 2B****FIG. 2C**

**FIG. 2D****FIG. 3A**

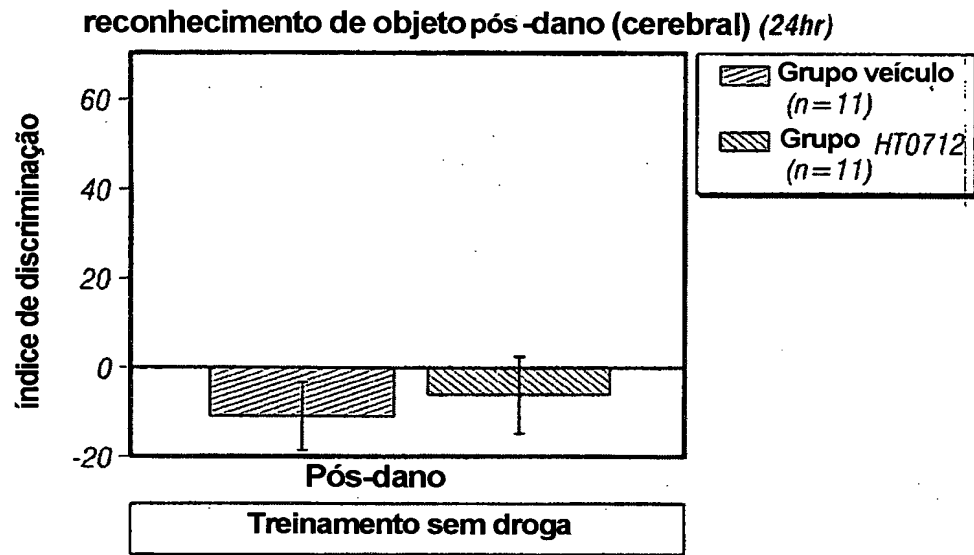


FIG. 3B

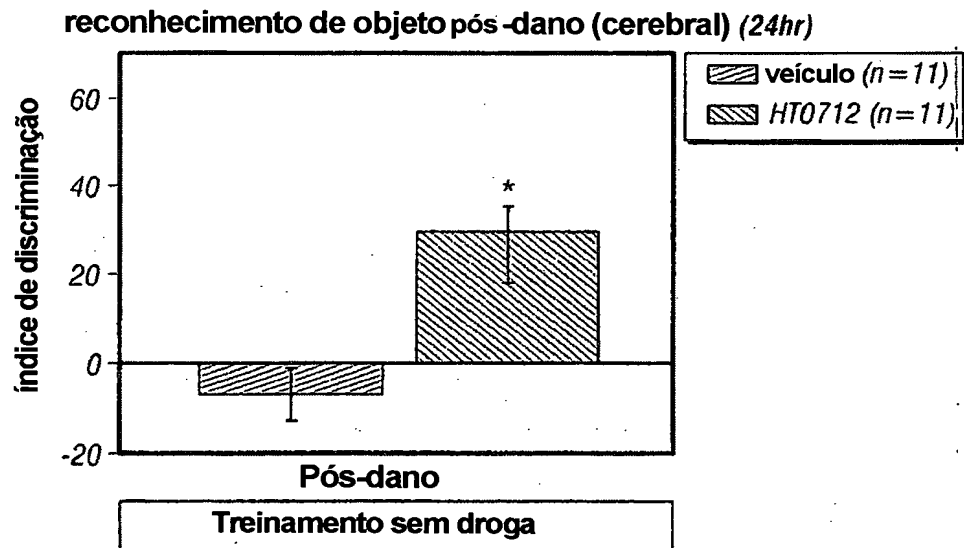


FIG. 3C

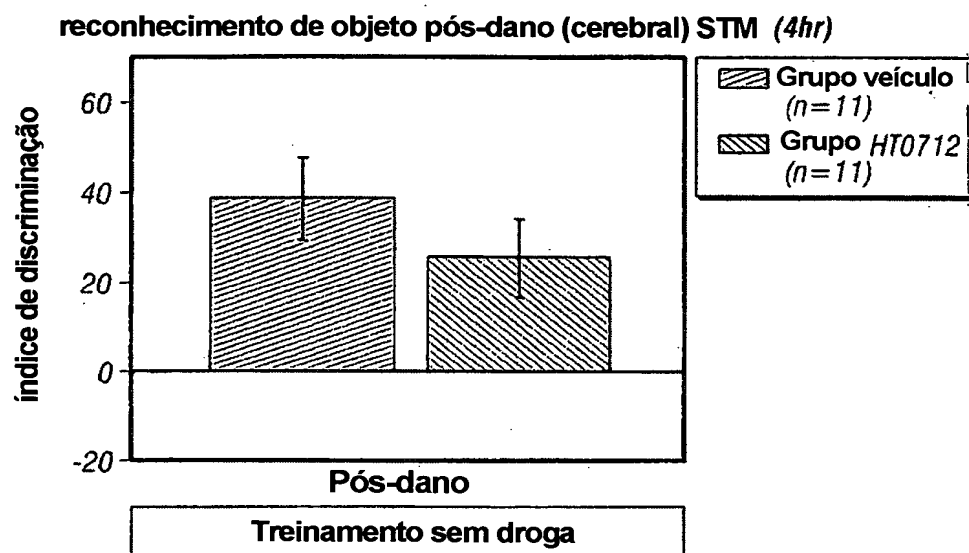


FIG. 3D

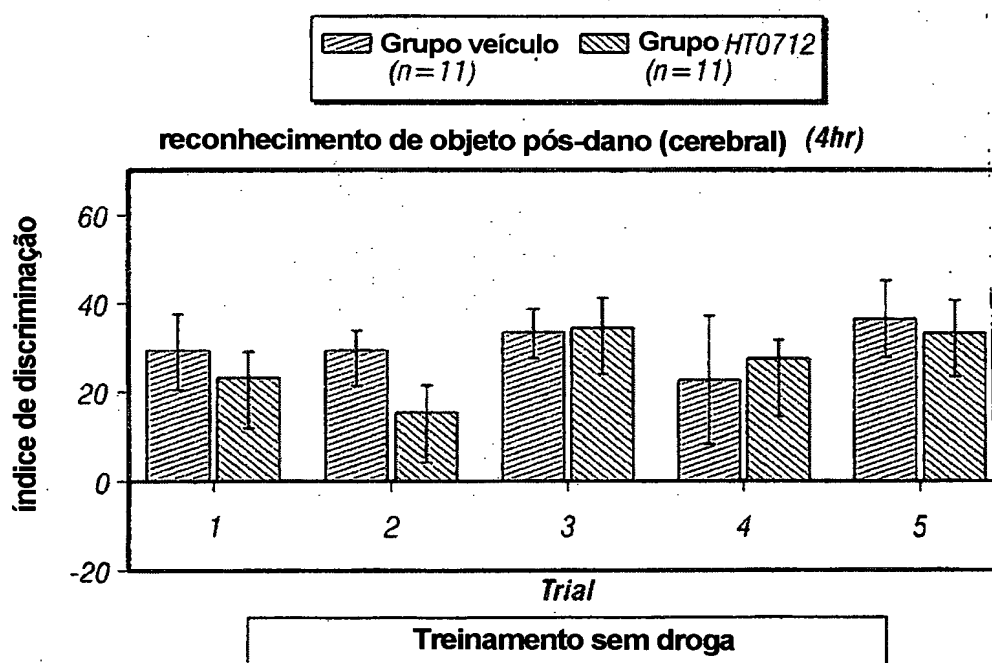


FIG. 3E

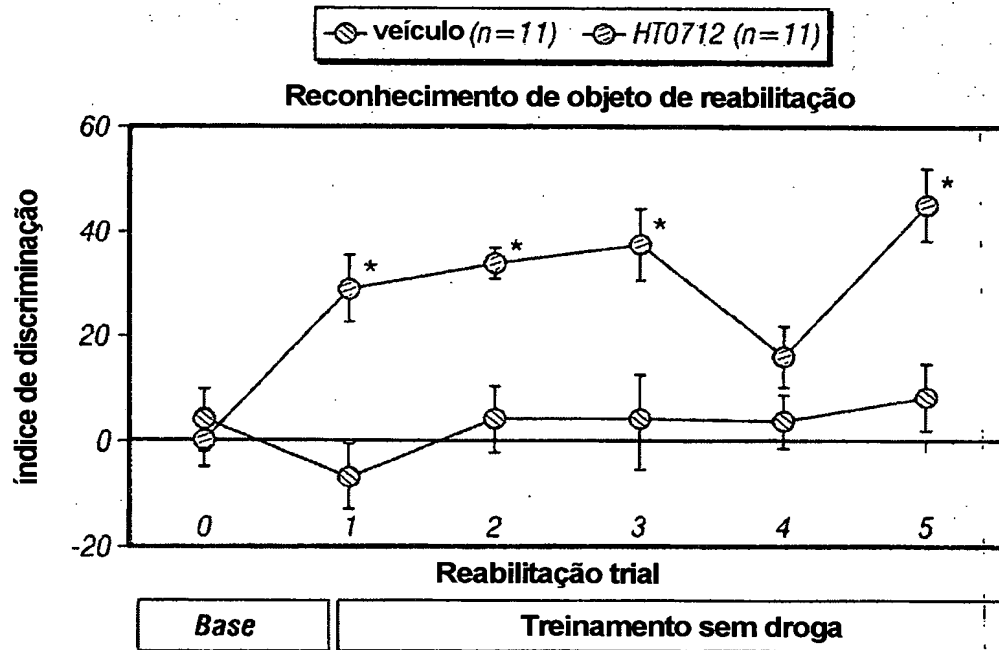


FIG. 4A

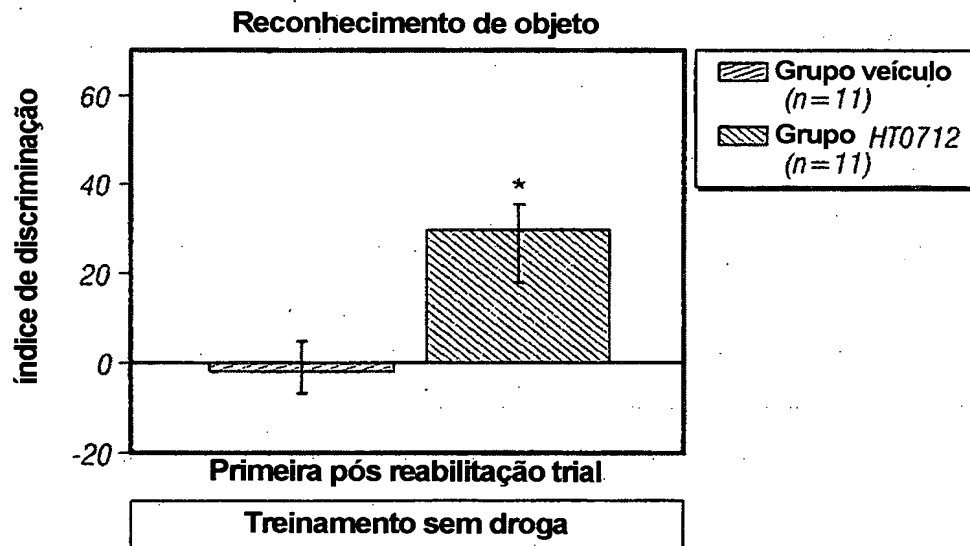
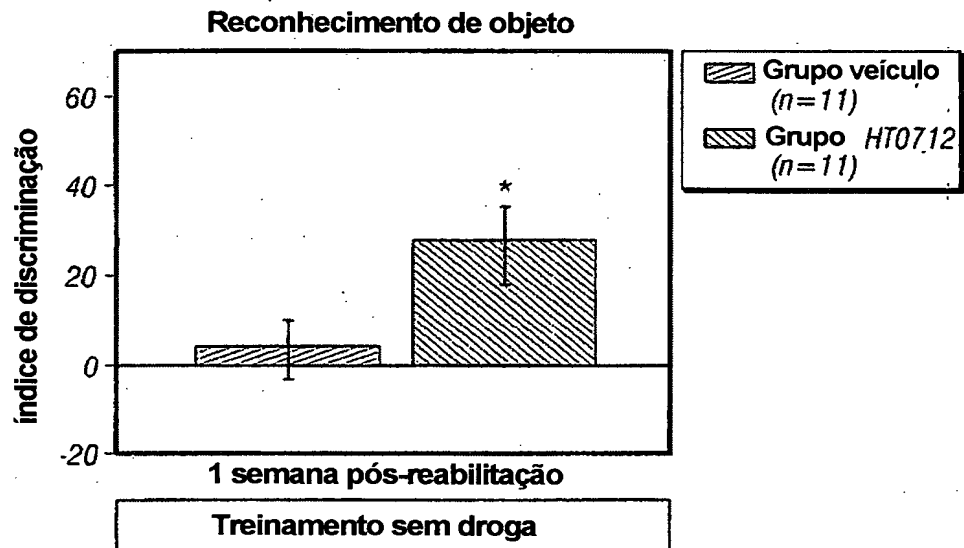
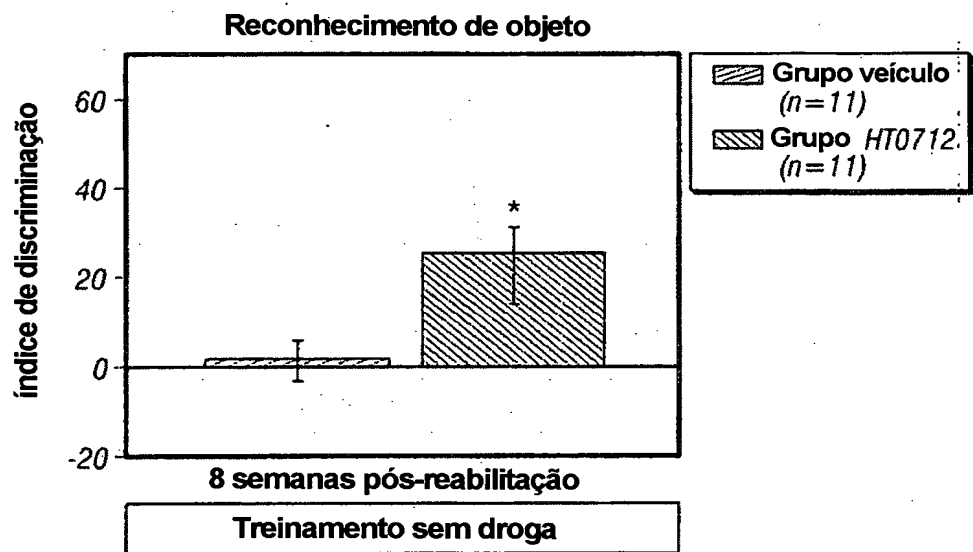


FIG. 4B

**FIG. 4C****FIG. 5A**

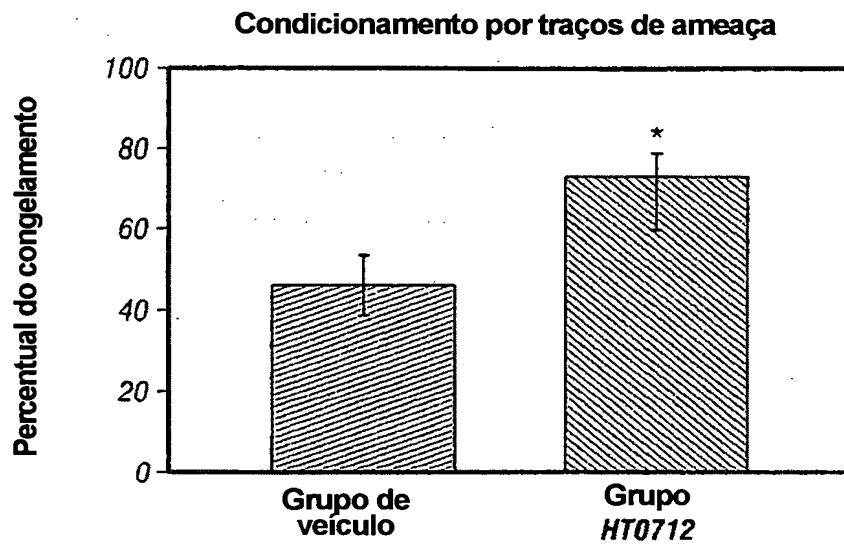


FIG. 5B

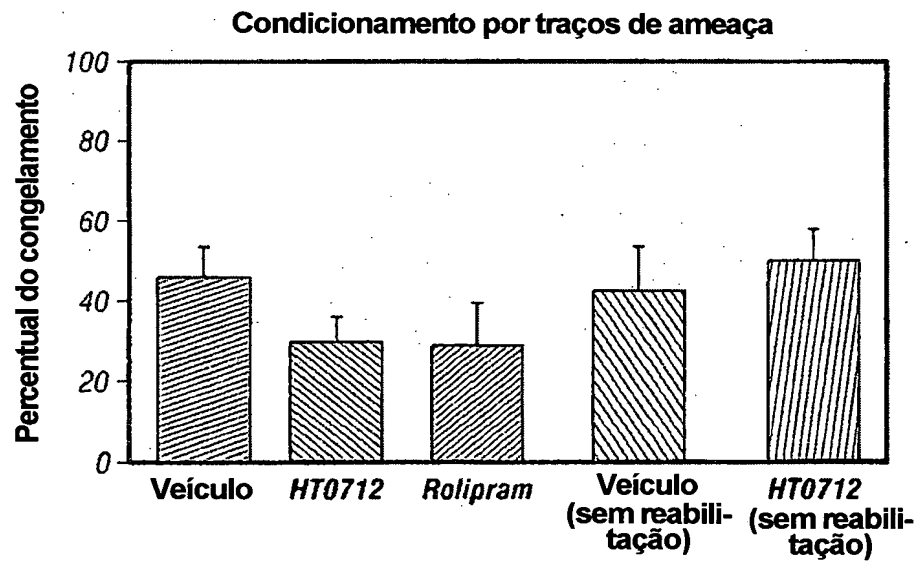


FIG. 5C

RESUMO

"INIBIDORES FOSFODIESTERASE 4 PARA REHABILITAÇÃO MOTORA E COGNITIVA"

5 A presente invenção provê métodos de aperfeiçoamento de déficits cognitivo e motor associado com condições e distúrbios do sistema nervoso central em um ser. Os métodos caracterizam-se por compreender uma administração de inibidores fosfodiesterase 4 e opcionalmente o treinamento de um ser sob condições adequadas de modo a produzir um aperfeiçoamento no desempenho.