



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 411**

51 Int. Cl.:

G01N 33/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03788648 .8**

96 Fecha de presentación : **19.08.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1540335**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.06.2005**

54 Título: **Métodos de escrutinio para potenciadores cognitivos.**

30 Prioridad: **19.08.2002 US 404620 P**
26.08.2002 US 406405 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.08.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.08.2010

73 Titular/es: **Helicon Therapeutics, Inc.**
One Bioscience Park Drive
Farmingdale, New York 11735, US

72 Inventor/es: **Tully, Timothy P.;**
Scott, Roderick E.M. y
Bourtchouladze, Rusiko

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 344 411 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de escrutinio para potenciadores cognitivos.

5 Antecedentes del invento

Un número estimado de 4 a 5 millones de norteamericanos (aproximadamente el 2% de todas las edades y el 15% de los mayores de 65) tienen alguna forma o grado de fallo cognitivo o cognoscitivo. El fallo cognitivo (disfunción o pérdida de funciones cognitivas, el proceso por el que el conocimiento es adquirido, retenido y usado) ocurre corrientemente en asociación con desórdenes o condiciones del sistema nervioso central (CNS), incluyendo discapacidades de la memoria asociadas con la edad, delirio (algunas veces denominado estado de confusión aguda), demencia (algunas veces clasificada como de tipo Alzheimer o de tipo no Alzheimer), enfermedad de Alzheimer, síndrome de Parkinson, enfermedad de Huntington (baile de San Vito o "corea"), enfermedad cerebrovascular (por ejemplo, ictus o derrame cerebral, isquemia), desórdenes afectivos (por ejemplo, depresión), desórdenes sicóticos (por ejemplo, esquizofrenia, autismo (Síndrome de Kanner)), desórdenes neuróticos (por ejemplo, ansiedad, desorden obsesivo-compulsivo), desorden de falta de atención (ADD), hematoma subdural, hidrocefalia de presión normal, tumor cerebral o traumatismo cerebral.

La disfunción cognitiva se manifiesta típicamente por uno o más déficit cognitivos, que incluyen discapacidad de la memoria (discapacidad para aprender nueva información o para recordar información aprendida previamente), afasia (perturbación del lenguaje/capacidad para hablar), apraxia (discapacidad para llevar a cabo actividades motrices a pesar de que la función motriz esté intacta), agnosia (fallo para reconocer o identificar objetos a pesar de que la función sensorial esté intacta), perturbación en funciones ejecutivas (es decir, planificar, organizar, ordenar secuencialmente, abstraer).

La disfunción cognitiva causa discapacidades significativas de funcionamiento social y/o ocupacional, que pueden interferir con la capacidad de un individuo para realizar actividades de la vida diaria y afectan gravemente a la autonomía y calidad de vida del individuo. Así, hay un interés considerable en identificar candidatos clínicos para usar en la rehabilitación de un animal con cualquier forma de disfunción cognitiva.

30 Sumario del invento

El presente invento se refiere a métodos (ensayos) basados en células de alto rendimiento para identificar o explorar (seleccionar) detenidamente potenciadores cognitivos que actúan aumentando la función de la vía de CREB. El invento permite la identificación de potenciadores cognitivos que tienen poco o ningún efecto sobre la función de la vía de CREB sola, pero que actúan para aumentar (mejorar) la función de la vía de CREB en combinación con un agente que estimula la función de CREB. Los potenciadores cognitivos identificados de acuerdo con el invento se espera que produzcan candidatos clínicos efectivos para usar en la rehabilitación de un animal con disfunciones cognitivas y para usar en la mejora de la memoria o del rendimiento (capacidad o función) cognitivo normal en un animal normal. Los "potenciadores cognitivos" son también denominados aquí como "compuestos capaces de mejorar la función de la vía de CREB" y "fármacos que mejoran la vía de CREB". Los "agentes estimulantes de la función de CREB" son también denominados aquí como "agentes que estimulan la función de la vía de CREB". Se ha comprendido que, en ciertos casos, un potenciador cognitivo identificado de acuerdo con el presente invento puede ser un agente estimulante de la función de CREB. Así, un agente estimulante de la función de CREB puede ser identificado como un potenciador cognitivo que usa los métodos descritos aquí.

Como se ha descrito aquí, los métodos para identificar o explorar detenidamente potenciadores cognitivos comprenden una exploración primaria, una exploración secundaria y una exploración terciaria. Preferiblemente, la exploración primaria es un método basado en células usado para identificar compuestos candidatos; la exploración secundaria es un método basado en células usado para identificar compuestos candidatos confirmados; y la exploración terciaria usa un modelo de comportamiento para identificar potenciadores cognitivos.

La exploración primaria comprende: (a) poner en contacto células anfitrionas (particularmente células de origen neural (por ejemplo, neuroblastomas, células madre neurales) que comprenden un gen indicador enlazado operativamente con un promotor de CRE con un compuesto de ensayo y con una dosis subóptima de un agente estimulante de la función de CREB (por ejemplo, forskolina); (b) determinar la actividad del indicador en células anfitrionas que han sido puestas en contacto con el compuesto de ensayo y con el agente estimulante de la función de CREB; (c) comparar la actividad del indicador determinada en la operación (b) con la actividad del indicador en células de control que han sido puestas en contacto con el agente estimulante de la función de CREB y que no han sido puestas en contacto con el compuesto de ensayo (es decir, células de control que han sido puestas en contacto solamente con el agente estimulante de la función de CREB); (d) seleccionar el compuesto de ensayo si (1) la actividad del indicador determinada en la operación (b) ha aumentado de modo significativo estadísticamente con relación a la actividad del indicador en las células de control de la operación (c); y (2) la actividad del indicador en células de control que no han sido puestas en contacto con el agente estimulante de la función de CREB y que han sido puestas en contacto con el compuesto de ensayo (es decir, células de control que han sido puestas en contacto sólo con el compuesto de ensayo) no es diferente de modo significativo estadísticamente con relación a la actividad del indicador en células de control que no han sido puestas en contacto ni con el agente estimulante de la función de CREB ni con el compuesto de ensayo (es decir, células de control que no han sido puestas en contacto con nada); (e) repetir las operaciones (a) a (d) con una gama o

ES 2 344 411 T3

variedad de concentraciones diferentes (por ejemplo, 2 o más) del compuesto de ensayo seleccionado en la operación (d); y (f) seleccionar el compuesto de ensayo si: (1) la actividad del indicador ha aumentado de modo significativo estadísticamente de modo proporcional en la gama de concentraciones diferentes para dicho compuesto de ensayo con relación a la actividad del indicador en las células de control que han sido puestas en contacto sólo con el agente estimulante de la función de CREB; y (2) la actividad del indicador en células de control a la que ha sido introducida la gama de concentraciones diferentes del compuesto de ensayo control no es significativamente diferente con relación a la actividad del indicador en células de control que no han sido puestas en contacto ni con el agente estimulante de la función de CREB ni con el compuesto de ensayo, en el que el compuesto de ensayo es identificado como un compuesto candidato. En una realización particular, las células anfitrionas son puestas en contacto con el compuesto de ensayo antes del contacto con el agente estimulante de la función de CREB. En otra realización, el gen indicador codifica luciferasa. Un gen indicador enlazado operativamente con un promotor de CRE es denominado también como un gen indicador mediado por CREB. Un gen indicador mediado por CREB es un ejemplo de un transgen mediado por CREB.

Alternativamente, la exploración primaria comprende: (a) poner en contacto células anfitrionas (particularmente células de origen neural (por ejemplo, neuroblastomas, células madre neurales) con un compuesto de ensayo y con una dosis subóptima de un agente estimulante de la función de CREB (por ejemplo, forskolina); (b) evaluar la expresión de gen endógeno dependiente de CREB en las células anfitrionas que han sido puestas en contacto con el compuesto de ensayo y con el agente estimulante de la función de CREB; (c) comparar la expresión de gen endógeno dependiente de CREB evaluada en la operación (b) con la expresión de gen endógeno dependiente de CREB en células de control que han sido puestas en contacto con el agente estimulante de la función de CREB y que no han sido puestas en contacto con el compuesto de ensayo (es decir, células de control que han sido puestas en contacto solo con el agente estimulante de la función de CREB); (d) seleccionar el compuesto de ensayo si (1) la expresión de gen endógeno dependiente de CREB determinada en la operación (b) ha aumentado de modo significativo estadísticamente con relación a la expresión de gen endógeno dependiente de CREB en las células de control de la operación (c); y (2) la expresión de gen dependiente de CREB en células de control que no han sido puestas en contacto con el agente estimulante de la función de CREB y que han sido puestas en contacto con el compuesto de ensayo (es decir, células de control que han sido puestas en contacto solo con el compuesto de ensayo) no es diferente de modo significativo estadísticamente con relación a la expresión de gen dependiente de CREB en células de control que no han sido puestas en contacto con el agente estimulante de la función de CREB o el compuesto de ensayo (es decir, células de control que no han sido puestas en contacto con nada); (e) repetir las operaciones (a) a (d) con una gama de diferentes concentraciones (por ejemplo, 2 o más) del compuesto de ensayo seleccionado en la operación (d); y (f) seleccionar el compuesto de ensayo si: (1) la expresión de gen dependiente de CREB ha aumentado de modo significativo estadísticamente de manera proporcional en la gama de diferentes concentraciones para dicho compuesto de ensayo con relación a la expresión de gen dependiente de CREB en las células de control que han sido puestas en contacto solo con el agente estimulante de la función de CREB; y (2) la expresión de gen dependiente de CREB en células de control a las que se ha introducido la gama de diferentes concentraciones del compuesto de ensayo solo no es significativamente diferente con relación a la expresión de gen dependiente de CREB en células de control que no han sido puestas en contacto ni con el agente estimulante de la función de CREB ni con el compuesto de ensayo, en que el compuesto de ensayo es identificado como un compuesto candidato. En una realización particular, las células anfitrionas son puestas en contacto con el compuesto de ensayo antes de hacer contacto con el agente estimulante de la función de CREB.

La exploración secundaria comprende: (a) poner en contacto células de origen neural (particularmente neuronas primarias (por ejemplo, células primarias del hipocampo) con un compuesto candidato identificado en la exploración primaria y con una dosis subóptima de un agente estimulante de la función de CREB; (b) evaluar la expresión de gen endógeno dependiente de CREB en las células que han sido puestas en contacto con el compuesto candidato y con el agente estimulante de la función de CREB; y (c) comparar la expresión de gen endógeno dependiente de CREB evaluada en la operación (b) con la expresión de gen endógeno dependiente de CREB en células de control que han sido puestas en contacto con el agente estimulante de la función de CREB y que no han sido puestas en contacto con el compuesto candidato (es decir, células de control que han sido puestas en contacto sólo con el agente estimulante de la función de CREB). Una diferencia significativa estadísticamente en la expresión de gen dependiente de CREB evaluada en la operación (b) comparada con la expresión de gen dependiente de CREB en células de control que han sido puestas en contacto sólo con el agente estimulante de la función de CREB y ninguna diferencia significativa en la expresión de gen dependiente de CREB en células de control que no han sido puestas en contacto con el agente estimulante de la función de CREB y que han sido puestas en contacto con el compuesto candidato (es decir, células de control puestas en contacto sólo con el compuesto candidato) con relación a la expresión de gen dependiente de CREB en células de control que no han sido puestas en contacto ni con el agente estimulante de la función de CREB ni con el compuesto candidato (es decir, células de control que no han sido puestas en contacto con nada) identifica el compuesto candidato como un compuesto candidato confirmado. En una realización particular, las células son puestas en contacto con el compuesto candidato antes de hacer contacto con el agente estimulante de la función de CREB.

Alternativamente, la exploración secundaria comprende: (a) poner en contacto células de origen neural (particularmente neuronas primarias (por ejemplo, células primarias del hipocampo) que comprenden un gen indicador enlazado operativamente a un promotor de CRE con un compuesto candidato identificado en la exploración primaria y con una dosis subóptima de un agente estimulante de la función de CREB; (b) determinar la actividad del indicador en las células que han sido puestas en contacto con el compuesto candidato y con el agente estimulante de la función de CREB; y (c) comparar la actividad del indicador evaluada en la operación (b) con una actividad del indicador en células de control que han sido puestas en contacto con el agente estimulante de la función de CREB y que no han

ES 2 344 411 T3

sido puestas en contacto con el compuesto candidato (es decir, células de control que han sido puestas en contacto sólo con el agente estimulante de la función de CREB). Una diferencia significativa estadísticamente en la actividad del indicador determinada en la operación (b) comparada con la actividad del indicador en células de control que han sido puestas en contacto sólo con el agente estimulante de la función de CREB y ninguna diferencia significativa en la actividad del indicador en células de control que han sido puestas en contacto con el agente estimulante de la función de CREB y que no han sido puestas en contacto con el compuesto candidato (es decir, células de control puestas en contacto sólo con el compuesto candidato) con relación a la actividad del indicador en células de control que no han sido puestas en contacto ni con el agente estimulante de la función de CREB ni con el compuesto candidato (es decir, células de control que no han sido puestas en contacto con nada) identifica el compuesto candidato como un compuesto candidato confirmado. En una realización particular, las células son puestas en contacto con el compuesto candidato antes de hacer contacto con el agente estimulante de la función de CREB.

En una realización particular, las células de origen neural usadas en la exploración secundaria son diferentes de las células anfitrionas usadas en la exploración primaria. En otra realización, el gen endógeno mediado por CREB o el transgen mediado por CREB en la exploración secundaria son diferentes del transgen mediado por CREB o del gen endógeno mediado por CREB en la exploración primaria. Por ejemplo, en una realización las células anfitrionas en la exploración primaria son neuroblastomas y las células en la exploración secundaria no son neuroblastomas. En otra realización, el transgen mediado por CREB en la exploración primaria es luciferasa (CRE enlazado operativamente al gen de luciferasa) y el transgen mediado por CREB en la exploración secundaria no es luciferasa. En una realización particular, las células anfitrionas en la exploración primaria son células que proliferan (tales como neuroblastomas y células madre neurales) y las células en la exploración secundaria son no proliferantes, células diferenciadas de origen neural (tales como neuronas o células gliales). En otra realización particular, el gen mediado por CREB en la exploración primaria es un gen indicador mediado por CREB (un transgen mediado por CREB) y el gen mediado por CREB en la exploración secundaria es un gen endógeno mediado por CREB.

En una realización, la exploración terciaria es un método de comportamiento para evaluar la formación de memoria a largo plazo en un animal que comprende: (a) administrar una cantidad efectiva de un compuesto candidato confirmado identificado en la exploración secundaria al animal (por ejemplo, humano, otro mamífero, vertebrado o invertebrado); (b) entrenar al animal administrado con el compuesto candidato confirmado en condiciones apropiadas para producir la formación de memoria a largo plazo en el animal; (c) evaluar la formación de memoria a largo plazo en el animal entrenado en la operación (b); y (d) comparar la formación de memoria a largo plazo evaluada en la operación (c) con la formación de memoria a largo plazo producida en el animal de control al que no se le ha administrado el compuesto candidato confirmado. Si se ha observado una mejora en la formación de memoria a largo plazo evaluada en el animal tratado con el compuesto candidato confirmado con relación a la formación de memoria a largo plazo evaluada en el animal de control, el compuesto candidato confirmado es identificado como un potenciador cognitivo. Las exploraciones terciarias con protocolos muy similares están disponibles usando métodos de comportamiento (modelos) para otras disfunciones cognitivas.

El invento también se refiere a métodos para evaluar el efecto de un compuesto en una expresión de gen dependiente de CREB (expresión de gen mediado por CREB) que comprende: (a) poner en contacto células de origen neural (particularmente neuronas primarias (por ejemplo, células primarias de hipocampo) con un compuesto que ha de ser evaluado y con una dosis subóptima de un agente estimulante de la función de CREB; (b) evaluar la expresión de gen endógeno dependiente de CREB en las células que han sido puestas en contacto con el compuesto y con el agente estimulante de la función de CREB; y (c) comparar la expresión de gen endógeno dependiente de CREB evaluada en la operación (b) con la expresión de gen endógeno dependiente de CREB en las células de control que han sido puestas en contacto con el agente estimulante de la función de CREB y que no han sido puestas en contacto con el compuesto (es decir, células de control que han sido puestas en contacto sólo con el agente estimulante de la función de CREB). Una diferencia significativa estadísticamente en la expresión de gen dependiente de CREB evaluada en la operación (b) comparada con la expresión de gen dependiente de CREB en células de control que han sido puestas en contacto con el agente estimulante de la función de CREB y sin diferencia significativa en la expresión de gen dependiente de CREB en células de control que no han sido puestas en contacto con el agente estimulante de la función de CREB y que han sido puestas en contacto con el compuesto (es decir, células de control puestas en contacto sólo con el compuesto) con relación a la expresión de gen dependiente de CREB en células de control que no han sido puestas en contacto ni con el agente estimulante de la función de CREB ni con el compuesto (es decir, células de control puestas en contacto con nada) identifica el compuesto como el que tiene un efecto sobre la expresión de gen dependiente de CREB. En una realización particular, las células son puestas en contacto con el compuesto que ha de ser evaluado antes de hacer contacto con el agente estimulante de la función de CREB. Preferiblemente, el compuesto que ha de ser evaluado es un compuesto candidato identificado en la exploración primaria.

Alternativamente, métodos para evaluar el efecto de un compuesto sobre la expresión de gen dependiente de CREB comprenden: (a) poner en contacto células de origen neural (particularmente neuronas primarias (por ejemplo, células primarias del hipocampo) que comprenden un gen indicador enlazado operativamente a un promotor de CRE con un compuesto que ha de ser evaluado y con una dosis subóptima de un agente estimulante de la función de CREB; (b) determinar la actividad del indicador en las células que han sido puestas en contacto con el compuesto y con el agente estimulante de la función de CREB; y (c) comparar la actividad del indicador determinada en la operación (b) con la actividad del indicador en células de control que han sido puestas en contacto con el agente estimulante de la función de CREB y que no han sido puestas en contacto con el compuesto (es decir, células de control que han sido puestas en contacto sólo con el agente estimulante de la función de CREB). Una diferencia significativa estadísticamente en la

actividad del indicador determinada en la operación (b) comparada con la actividad del indicador en células de control que han sido puestas en contacto sólo con el agente estimulante de la función de CREB y sin diferencia significativa en la actividad del indicador en células de control que no han sido puestas en contacto con el agente estimulante de la función de CREB y que han sido puestas en contacto con el compuesto (es decir, células de control que han sido puestas en contacto sólo con el compuesto) con relación a la actividad del indicador en las células de control que no han sido puestas en contacto con el agente estimulante de la función de CREB ni con el compuesto (es decir, células de control contactadas con nada) identifica el compuesto como uno que tiene un efecto sobre la expresión de gen dependiente de CREB. En una realización particular, las células son puestas en contacto con el compuesto que ha de ser evaluado antes de hacer contacto con el agente estimulante de la función de CREB. Preferiblemente, el compuesto que ha de ser evaluado es un compuesto candidato identificado en la exploración primaria.

En una realización particular, las células usadas en los métodos para evaluar el efecto de un compuesto sobre la expresión de gen dependiente de CREB son diferentes de las células anfitrionas en la exploración primaria. En otra realización, el gen endógeno mediado por CREB o el transgen mediado por CREB usados en los métodos para evaluar el efecto de un compuesto sobre la expresión de gen dependiente de CREB son diferentes del transgen mediado por CREB o del gen endógeno mediado por CREB en la exploración primaria.

El invento se refiere además a métodos para evaluar el efecto de un potenciador cognitivo en la formación de memoria a largo plazo en un animal que comprende: (a) administrar una cantidad efectiva de potenciador cognitivo a un animal (por ejemplo, humano, otro mamífero, vertebrado o invertebrado); (b) entrenar al animal al que se le ha administrado el potenciador cognitivo en condiciones apropiadas para producir la formación de memoria a largo plazo en el animal; (c) evaluar la formación de memoria a largo plazo en el animal entrenado en la operación (b); y (d) comparar la formación de memoria a largo plazo evaluada en la operación (c) con la formación de memoria a largo plazo producida en el animal de control al que no se ha administrado el potenciador cognitivo. Si se ha observado alguna diferencia en la formación de memoria a largo plazo evaluada en el animal tratado con el potenciador cognitivo con relación a la formación de memoria a largo plazo evaluada en el animal de control, el potenciador cognitivo puede ser categorizado como que mejora (perfeccionando, aumentando) la formación de memoria a largo plazo en el animal.

Los potenciadores cognitivos identificados de acuerdo con el invento pueden ser usados para reducir la duración y/o número de sesiones de entrenamiento requeridas para la inducción en un circuito o circuitos neuronales específicos de un modelo de actividad neuronal o para reducir la duración y/o número de sesiones de entrenamiento requeridas para inducir el cambio estructural/funcional de largo plazo dependiente de CREB (es decir, duradero) entre conexiones sinápticas del circuito neuronal. Los potenciadores cognitivos identificados de acuerdo con el invento pueden ser usados para reducir el número de sesiones de entrenamiento requeridas para inducir una ganancia de rendimiento con relación al obtenido sólo con entrenamiento o para permitir intervalos más cortos o sin descanso entre sesiones de entrenamiento para inducir una ganancia de rendimiento o para aumentar el nivel total de rendimiento.

Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 es un diagrama de barras que muestra los resultados de la mejora de memoria inducida por fármacos (parcial) mediante rolipram, un inhibidor de fosfodiesterasa (PDE). La retención de cinco días después de entrenamiento débil (2x) es menor que con entrenamiento fuerte (5x). Solo la memoria después de entrenamiento débil es mejorada por inyecciones bilaterales de hipocampo (1 μ l) de rolipram inmediatamente después del entrenamiento. El rolipram redujo el número de sesiones de entrenamiento requeridas para producir memoria. % Congelación = % Tiempo de observación de ratones consumido en congelación/inmovilidad.

La fig. 2 es un diagrama esquemático que muestra esos cambios dependientes de la experiencia en la expresión de gen que modula la actividad neuronal. Algunos de estos cambios en la expresión de gen producen cambios estructurales y funcionales en las conexiones sinápticas entre neuronas. De esta manera, el circuito neural es sintonizado fino constantemente para mejorar la percepción, la cognición y las respuestas de comportamiento.

La fig. 3 es un gráfico de barras que muestra los resultados de una exploración antisentido de Ácido Nucleico Bloqueado (LNA) de CREB. Los oligos LNB de CREB son numerados en el orden en el que fueron designados. Los oligos LNB de CREB que no fueron explorados (es decir, CREB 4, 10, 11, 13 y 14) no se han mostrado.

Descripción detallada del invento

El factor de transcripción de CREB desempeñan una misión primaria en la formación de memoria a largo plazo y la plasticidad sináptica de largo plazo subyacente. Estudios conductuales-genéticos de aprendizaje olfativo de Pavlov en *Drosophila* han establecido el CREB como un conmutador central para la conversión de información adquirida de nuevo desde la memoria a corto plazo a la memoria a largo plazo (Tully, T. y col., Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 94 (9):4239-4241 (1997)). El entrenamiento espaciado después de una tarea de asociación de choque olfativo induce una memoria a largo plazo dependiente de la síntesis de proteína (Tully, T. y col., Cell 79(1):35-47 (1994)), cuya formación es específicamente bloqueada por expresión inducida de un transgen represor de CREB (Yin, J.C. y col., Cell, 79 (1):49-58 (1994)). El aprendizaje y la memoria a corto plazo (inmediatamente anterior) son normales en estas moscas transgénicas (Tully, T. y col., Cell 79(1):35-47 (1994); y Yin, J.C. y col., Cell 79(1):49-58 (1994)). En contraste con estos resultados de pérdida de función, la expresión inducida de un transgen activador de CREB mejora específica-

mente la memoria a largo plazo específicamente mediante abrogación de los requisitos para sesiones de entrenamiento repetitivas y durante un intervalo de descanso entre cada sesión (Yin, J.C. y col., *Cell* 81(1):107-115 (1995)). Una sesión de entrenamiento es suficiente para formar una memoria máxima de largo plazo en moscas transgénicas con sobreexpresión de activador de CREB (Yin, J.C. y col., *Cell* 81(1):107-115(1995)). No se ha producido más memoria a largo plazo. En vez de ello, es inducida memoria a largo plazo con menos práctica.

El documento WO0213867 explica el entrenamiento del ratón transgénico, que lleva un gen indicador dependiente de CRE (betagalactosidasa), en el hipocampo induciendo por ello la transcripción del gen dependiente de CRE en áreas anatómicas específicas del cerebro de mamíferos. Por ello la formación de la memoria a largo plazo (LTM) se ha encontrado enlazada con la transcripción del gen dependiente de CRE en áreas anatómicas específicas del cerebro de mamíferos. Más abajo en el texto, la aplicación pone en evidencia el hecho de que con el fin de tratar déficit cognitivos asociados con un desorden o condición de CNS en un animal, es necesario administrar un denominado agente aumentador (también llamados “fármacos que mejoran la vía de CREB” más abajo en el texto) que mejora la función de la vía de CREB (página 15). Por “Mejorar la función de la vía de CREB” el documento WO0213867 quiere significar la capacidad de mejorar o perfeccionar la expresión de gen dependiente de CREB. La expresión dependiente de CREB puede ser mejorada o perfeccionada aumentando la producción de CREB endógeno, por ejemplo estimulando directa o indirectamente el gen endógeno para producir cantidades incrementadas de CREB, o incrementando el CREB funcional (esquemático en la página 10), atención también para las reivindicaciones 1ª a 27ª. La forskolina como un agente estimulante de la función de CREB es mencionada particularmente en la página 17, segundo y último párrafo y en la página 18.

Esta mejora de memoria también es específica de la asociación temporal de dos estímulos. Altos niveles del activador de CREB fueron inducidos en todas las células de la mosca debido al uso de un promotor de un golpe de calor con el transgen. En ausencia de entrenamiento, no se observó efecto mensurable sobre el comportamiento de las moscas. Además, presentaciones espaciadas de olor y golpe, desplazados en el tiempo, fallaron en la producción de memoria a largo plazo en moscas de activador de CREB (moscas inducidas para expresar niveles elevados de activador de CREB). Estos resultados sugieren que el aprendizaje asociativo induce la señalización aguas arriba requerida para activar (fosforilato) el conmutador de CREB durante la formación de memoria a largo plazo olfativa.

Un cuerpo creciente de evidencia extiende estos resultados desde los invertebrados hasta los mamíferos. Por ejemplo, en *Aplysia*, manipulaciones moleculares de la expresión de CREB, similares a las de las moscas, suprimen o mejoran (1) la memoria a largo plazo de una respuesta electrofisiológica facilitadora en una monosinapsis sensitivo-motriz en el cultivo de células y (2) las conexiones sinápticas entre neuronas sensitivas y motrices que son producidas normalmente después de aplicaciones espaciadas del estímulo facilitador (Bartsch, D. y col., *Cell*, 83(6):979-992 (1995)). En un estudio enfocado en una forma de memoria traumática, denominado como un acondicionamiento al miedo (Bourtchuladze, R. y col., *Cell* 79(1):59-68(1994)), los ratones mutantes que transportan un golpe parcial de CREB mostraron un aprendizaje y una memoria a corto plazo normales pero la memoria a largo plazo fue abolida. Por el contrario, un ratón normal requiso sólo una prueba de entrenamiento para formar una memoria a largo plazo de esta experiencia. Estos resultados sugieren que (1) para el experimento de acondicionamiento al miedo, la memoria a largo plazo formada en un ratón normal era más parecida a la de las moscas de activador de CREB y (2) la mutación de CREB en el ratón mutante puede tener un conmutador funcional de CREB que es ajustado a un nivel similar al de las moscas normales. Como tal, el entrenamiento espaciado recuperaría el déficit de la memoria a largo plazo en el ratón mutante de CREB. De hecho, Kogan y col., mostraron que la memoria a largo plazo puede formarse con normalidad en el ratón mutante de CREB sometido a entrenamiento espaciado, pero no masificado, proporcionado así un soporte fuerte para el modelo de conmutador de CREB (Kogan, J.H. y col., *Curr. Biol.*, 7(1):1-11 (1997)).

En ratas, inyecciones de oligonucleótidos de ARN antisentido en el hipocampo o en las amígdalas bloquean la formación de memoria a largo plazo de dos tareas diferentes que son dependientes de la actividad en estas regiones anatómicas, respectivamente (Guzowski, J.F. y McGaugh, J.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(6):2693-2698 (1997); y Lamprecht, y col., *J. Neurosci.*, 17(21):8443-8450 (1997)). En particular, los experimentos antisentido con ARN han revelado una misión para el CREB durante la formación de la memoria a largo plazo de una tarea de laberinto de agua (diente del hipocampo) y aversión del gusto condicionada (dependiente de las amígdalas) en ratas (Guzowski, J.F. y McGaugh, J.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(6):2693-2698 (1997); y Lamprecht, R. Y col., *J. Neurosci.*, 17(21):8443-8450 (1997)).

Experimentos más recientes tienen un activador de CREB sobreexpresado en las amígdalas y se ha observado una formación de memoria mejorada de una respuesta de sobresalto potenciada por el miedo en ratas, con una firma de CREB similar a la observada en moscas (Josselyn, S.A. y col., *Sociedad para Neurociencia*, 28ª Reunión Anual, Vol. 24, Resumen 365.10 (1998); y Josselyn, S.A. y col., *J. Neurosci.*, 21(7):2404-2412 (2001)).

Las observaciones celulares en ratones y ratas han reforzado estos resultados conductuales revelando que la función de CREB neuronal (fosforilación o regulación de gen) es modulada en una forma dependiente de la experiencia (Impey, S. y col., *Neuron*, 16(5):973-982 (1996); Taubenfeld S.M. y col., *Nat. Neurosci.*, 2(4):309-310 (1999); y Taubenfeld, S.M. y col., *J. Neurosci.*, 21(1):84-91(2001)).

Además de estar implicado en la formación de memorias experimentales, el CREB también aparece para funcionar en la plasticidad del desarrollo y celular de varias regiones corticales (Ahn, S. y col., *Neuron*, 23(3):559-569 (1999); Barth, A.L. y col., *J. Neurosci.*, 20(11):4206-4216 (2000); Glazewski, S. y col., *Córtex Cerebral*, 9(3):249-256 (1999);

Pham, T.A. y col., *Neuron*, 22(1):63-72 (1999); y Pham, T.A. y col., *Neuron*, 31(3):409-420 (2001)). La actividad neuronal aumenta la actividad del CREB en el córtex (Moore, A.N. y col., *J. Biol. Chem.*, 271(24):14214-14220 (1996)). El CREB también media o interviene en la plasticidad del desarrollo en el hipocampo (Murphy, D.D. y Segal, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(4):1482-1487(1997)), en córtex somatosensorial (Glazewski, S. y col., *Córtex Cerebral*, 9(3):249-256 (1999)), en estriado (Liu, F.C. y Graybiel, A.M., *Neuron*, 17(6):1133-1144 (1996)) y en el córtex visual (Pham, T.A. y col., *Neuron*, 22(1):63-72 (1999)). Estos datos soportan la idea de que el CREB es un conmutador molecular generalmente implicado en convertir la actividad neural a cambios estructurales en la sinapsis. Como tal, la vía CREB representa (1) un objetivo significativo para el descubrimiento de nuevos fármacos y (2) una cabeza de playa genética para la identificación de genes aguas abajo que también participan en la plasticidad sináptica dependiente de la actividad.

El presente invento proporciona métodos para identificar o explorar detenidamente estos fármacos, también denominados aquí como potenciadores cognitivos. El invento proporciona métodos (ensayos) de alto rendimiento basados en células para identificar o explorar detenidamente potenciadores cognitivos que actúan aumentando la función de la vía de CREB.

Los potenciadores cognitivos pueden aumentar, mejorar o perfeccionar la función de la vía de CREB mediante una variedad de mecanismos. Por ejemplo, un potenciador cognitivo puede afectar a una vía de transducción de señal que conduce a la inducción de la expresión de gen dependiente de CREB. La inducción de la expresión de genes dependiente de CREB puede ser conseguida, por ejemplo, a través de la regulación de efectores positivos de la función de CREB y/o la regulación descendente de efectores negativos de la función de CREB. Los efectores positivos de la función de CREB incluyen ciclasas de adenilato y activadores de CREB. Los efectores negativos de la función de CREB incluyen fosfodiesterasa de cAMP (cAMP PDE) y represores de CREB.

Un potenciador cognitivo puede aumentar, mejorar o perfeccionar la función de la vía CREB actuando bioquímicamente aguas arriba de o actuando directamente sobre una forma de activador o de represor de una proteína de CREB y/o sobre una proteína de CREB que contiene una transcripción compleja. Por ejemplo, la función de la vía CREB puede ser afectada aumentando los niveles de proteína de CREB transcripcionalmente, post-transcripcionalmente, o tanto transcripcional como post-transcripcionalmente; alterando la afinidad de la proteína de CREB con otros componentes necesarios de la transcripción compleja, tal como, por ejemplo, a la proteína de aglutinación del CREB (proteína CBP); alterando la afinidad de una proteína de CREB que contiene un complejo de transcripción para elementos de respuesta de ADN CREB en la región del promotor; o induciendo bien una inmunidad pasiva o activa a isoformas de proteína de CREB. El mecanismo particular por el que un potenciador cognitivo aumenta, mejora o perfecciona la función de la vía CREB no es crítico para la práctica del invento.

Por "aumentar la función de la vía CREB" o "mejorar la función de la vía CREB" se quiere decir la capacidad para aumentar, mejorar o perfeccionar la expresión de gen dependiente de CREB. Por "modular la función de la vía CREB" se quiere significar la capacidad para modular la expresión de gen dependiente de CREB. La expresión de gen dependiente de CREB puede ser aumentada, mejorada o perfeccionada aumentando la producción de CREB endógeno, por ejemplo estimulando directa o indirectamente los genes endógenos para producir cantidades incrementadas de CREB, o aumentando el CREB funcional (biológicamente activo). Véase, por ejemplo, la Patente Norteamericana n° 5.929.223; la Patente Norteamericana n° 6.051.559; y el documento n° WO96/11270 (publicado el 18 de Abril, de 1996). Por "aumentar el CREB funcional (biológicamente activo)" se quiere decir incluir la capacidad para aumentar la capacidad de aglutinación del ADN, el estado de fosforilación, la estabilidad de proteína, la localización subcelular, etc. La expresión de gen dependiente de CREB puede ser modulada aumentando o disminuyendo la producción de CREB endógeno, por ejemplo estimulando directa o indirectamente el gen endógeno para producir cantidades aumentadas o disminuidas de CREB, aumentando o disminuyendo el CREB funcional (biológicamente activo).

Como se ha descrito aquí, métodos para identificar o explorar detenidamente potenciadores cognitivos comprenden una exploración primario, una exploración secundario y una exploración terciario. Preferiblemente, la exploración primaria es un método basado en células usado para identificar compuestos candidatos; y la exploración terciaria usa un modelo de comportamiento para identificar potenciadores cognitivos. Las exploraciones primaria y secundaria incluyen métodos basados en células de rendimiento elevado.

La exploración primaria comprende: (a) poner en contacto las células anfitrionas que comprenden un gen indicador enlazado operativamente a un promotor con un compuesto de ensayo y con una dosis subóptima de un agente estimulante que activa vías de señalización en CREB; (b) determinar la actividad del indicador en células anfitrionas que han sido puestas en contacto con el compuesto de ensayo y con el agente estimulante; (c) comparar la actividad del indicador determinada en la operación (b) con la actividad del indicador en células de control que han sido puestas en contacto con el agente estimulante y que no han sido puestas en contacto con el compuesto de ensayo (células de control que han sido puestas en contacto sólo con el agente estimulante); (d) seleccionar el compuesto de ensayo si (1) la actividad del indicador determinada en la operación (b) ha aumentado de modo significativo estadísticamente con relación a la actividad del indicador en las células de control de la operación (c); y (2) la actividad del indicador en las células de control que no han sido puestas en contacto con el agente estimulante y que han sido puestas en contacto con el compuesto de ensayo (células de control puestas en contacto sólo con el compuesto de ensayo) no es diferente de modo significativo estadísticamente con relación a la actividad del indicador en células de control que no han sido puestas en contacto ni con el agente estimulante ni con el compuesto de ensayo (células de control que no han sido puestas en contacto con nada); (e) repetir las operaciones (a) a (d) con una gama de diferentes concentraciones del

ES 2 344 411 T3

compuesto de ensayo seleccionado en la operación (d); y (f) seleccionar el compuesto de ensayo si: (1) la actividad del indicador ha aumentado estadísticamente de modo significativo proporcionalmente en la gama de diferentes concentraciones de dicho compuesto de ensayo con relación a la actividad del indicador en las células de control que han sido puestas en contacto sólo con el agente estimulante; y (2) la actividad del indicador en células de control a las que se ha introducido la gama de diferentes concentraciones del compuesto de ensayo sólo no es significativamente diferente con relación a la actividad del indicador en células de control que no han sido puestas en contacto ni con el agente estimulante ni con el compuesto de ensayo, en que el compuesto de ensayo es identificado como un compuesto candidato. En una realización particular, el compuesto de ensayo es seleccionado en la operación (f) si (1) la actividad del indicador ha aumentado estadísticamente de modo significativo proporcionalmente en la gama lineal de diferentes concentraciones para el compuesto de ensayo; y (2) la actividad del indicador en células de control a las que se ha introducido la gama de diferentes concentraciones del compuesto de ensayo sólo no es significativamente diferente con relación a la actividad del indicador en células de control que no han sido puestas en contacto ni con el agente estimulante ni con el compuesto de ensayo. En otra realización, las células anfitrionas son puestas en contacto con el compuesto de ensayo antes de hacer contacto con el agente estimulante.

Alternativamente, la exploración primaria comprende: (a) poner en contacto células anfitrionas con un compuesto de ensayo y con una dosis subóptima de un agente estimulante que activa las vías de señalización en CREB; (b) evaluar la expresión de gen endógeno dependiente de CREB en las células anfitrionas que han sido puestas en contacto con el compuesto de ensayo y con el agente estimulante; (c) comparar la expresión de gen endógeno dependiente de CREB evaluada en la operación (b) con la expresión de gen endógeno dependiente de CREB en células de control que han sido puestas en contacto con el agente estimulante y que no han sido puestas en contacto con el compuesto de ensayo (células de control que han sido puestas en contacto sólo con el agente estimulante); (d) seleccionar el compuesto de ensayo si (1) la expresión de gen endógeno dependiente de CREB determinada en la operación (b) ha aumentado de modo significativo estadísticamente con relación a la expresión de gen endógeno dependiente de CREB en las células de control de la operación (c); y (2) la expresión de gen dependiente de CREB en células de control que no han sido puestas en contacto con el agente estimulante y que han sido puestas en contacto con el compuesto de ensayo (células de control que han sido puestas en contacto sólo con el compuesto de ensayo) no es diferente de modo significativo estadísticamente con relación a la expresión de gen dependiente de CREB en células de control que no han sido puestas en contacto ni con el agente estimulante ni con el compuesto de ensayo (células de control que no han sido puestas en contacto con nada); (e) repetir las operaciones (a) a (d) con una gama de diferentes concentraciones del compuesto de ensayo seleccionado en la operación (d); y (f) seleccionar el compuesto de ensayo si: (1) la expresión de gen dependiente de CREB ha aumentado estadísticamente de modo significativo proporcionalmente en la gama de diferentes concentraciones para dicho compuesto de ensayo con relación a la expresión de gen dependiente de CREB en las células de control que han sido puestas en contacto sólo con el agente estimulante; y (2) la expresión de gen dependiente de CREB en células de control a las que se ha introducido la gama de diferentes concentraciones del compuesto de ensayo sólo no es significativamente diferente con relación a la expresión de gen dependiente de CREB en células de control que no han sido puestas en contacto ni con el agente estimulante ni con el compuesto de ensayo, en que el compuesto de ensayo es identificado como un compuesto candidato. En una realización particular, el compuesto de ensayo es seleccionado en la operación (f) si (1) la expresión de gen dependiente de CREB ha aumentado estadísticamente de modo significativo proporcionalmente en la gama lineal de las diferentes concentraciones del compuesto de ensayo; y (2) la expresión de gen dependiente de CREB en células de control a las que se ha introducido la gama de diferentes concentraciones del compuesto de ensayo sólo no es significativamente diferente con relación a la expresión de gen dependiente de CREB en células de control que no han sido puestas en contacto ni con el agente estimulante ni con el compuesto de ensayo. En otra realización, las células anfitrionas son puestas en contacto con el compuesto de ensayo antes de hacer contacto con el agente estimulante.

Preferiblemente, el “agente estimulante que activa las vías de señalización en CREB” usado en la exploración primaria es un agente estimulante de la función de CREB. Un agente estimulante de la función de CREB es un agente estimulante que es capaz de estimular la función de la vía de CREB. Por “estimular la función de la vía de CREB” se quiere decir la capacidad para estimular la expresión de gen dependiente de CREB estimulando la producción de CREB endógeno, por ejemplo estimulando directa o indirectamente el gen endógeno para producir cantidades aumentadas de CREB, o aumentando el CREB funcional (biológicamente activo). Véase, por ejemplo, la Patente Norteamericana n° 5.929.223; la Patente Norteamericana n° 6.051.559; y el documento n° WO96/11270 (publicado el 18 de Abril, de 1996). Los “agentes estimulantes de la función de CREB” incluyen fármacos, compuestos químicos, compuestos iónicos, compuestos orgánicos, aglutinantes orgánicos, que incluyen cofactores, sacáridos, recombinantes y péptidos sintéticos, proteínas, peptoides, secuencias de ácido nucleico, que incluyen genes, productos de ácido nucleico, y otras moléculas y composiciones. Los agentes estimulantes de la función de CREB pueden ser activadores de ciclase 1 de adenilato (AC1) (por ejemplo, forskolina); análogos de cAMP de células penetrantes (por ejemplo, 8-bromo cAMP); agentes (neurotransmisores) que afectan al receptor enlazado a la proteína, tal como, pero no limitado a receptores adrenérgicos y receptores opiáceos y sus aglutinantes (por ejemplo, isoprotenerol, fenetilaminas); moduladores de concentración de calcio intracelular (por ejemplo, cloruro de potasio, tapsigargina, receptor antagonista de N-metil-D-aspartato (NMDA)); inhibidores (antagonistas) de las fosfodiesterasas responsables de la interrupción de cAMP (por ejemplo, rolipram (que inhibe la fosfodiesterasa 4), iso-buto-meto-xantina (IBMX) (que inhibe fosfodiesterasas 1 y 2)); moduladores (antagonistas) de kinasas proteínas y fosfatasa proteínas que media la activación de la proteína de CREB y la expresión de gen dependiente de CREB. Los agentes estimulantes de la función de CREB pueden también ser compuestos que son capaces de mejorar la función de CREB en el sistema nervioso central (CNS). Tales compuestos incluyen, pero no están limitados a, compuestos que afectan a la estabilidad de la membrana y fluidez e inmunoestimulación específica.

ES 2 344 411 T3

Las vías de señalización que se activan sobre CREB incluyen la vía que señaliza la kinasa proteína activada por mitogeno (MAPK) y la A kinasa proteína (PKA). Así, los agentes estimulantes que activan las vías de señalización sobre CREB incluyen inhibidores de kinasa de MAPK/Erk (MEK). Otros agentes estimulantes que activan las vías de señalización sobre CREB son conocidos y fácilmente disponibles para los expertos en la técnica.

5

En otra realización, la exploración primaria puede ser reemplazado con un método de exploración que usa *Drosophila*, donde dicho método de exploración comprende: (a) administrar un compuesto de ensayo a *Drosophila* que tiene un gen indicador enlazado operativamente a un promotor de CRE; (b) evaluar la actividad del indicador en la *Drosophila* a la que se le ha administrado el compuesto de ensayo; y (c) comparar la actividad del indicador evaluado en la operación (b) con la actividad del indicador en la *Drosophila* de control a la que no se le ha administrado el compuesto de ensayo. Una diferencia significativa estadísticamente en la actividad del indicador en la operación (b) comparada con la actividad del indicador en la *Drosophila* de control a la que se le ha administrado el compuesto de ensayo identifica el compuesto de ensayo como un compuesto candidato.

15

Las células anfitrionas que comprenden un gen indicador enlazado operativamente a un promotor de CRE pueden ser fabricadas introduciendo en las células una construcción de ADN que comprende un gen indicador enlazado operativamente a un promotor de CRE. Las construcciones de ADN pueden ser introducidas en células de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, transformación, respuesta directa, precipitación de fosfato de calcio, electroporación o electroporación, bombardeo con proyectiles, usando liposomas). Tales métodos han sido descritos en mayor detalle, por ejemplo, en Sambrook y col., *Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio*, 2ª Edición/New York; Cold Spring Harbor University Press) (1989); y Ausubel, y col., *Protocolos Actuales en Biología Molecular* (New York; John Wiley & Sons) (1998).

25

La *Drosophila* que comprende un gen indicador enlazado operativamente a un promotor de CRE puede ser producida como se ha descrito en Belvin y col., *Neuron*, 22(4):777-787 (1999).

30

Las construcciones de ADN que comprenden un gen indicador enlazado operativamente a un promotor de CRE pueden ser fabricadas como se ha descrito, por ejemplo, en Ausubel y col., *Protocolos Actuales en Biología Molecular* (New York: John Wiley & Sons) (1998); y Sambrook y col., *Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio*, 2ª Edición (New York: Cold Spring Harbor University Press) (1989).

35

Como se ha usado aquí, el término “promotor” se refiere a una secuencia de ADN, usualmente aguas arriba (5') de la región de codificación o un gen estructural, que controla la expresión de la región de codificación proporcionando lugares de reconocimiento y de aglutinación para polimerasa de ARN y otros factores que pueden ser requeridos para iniciar la transcripción. Los promotores de CRE son conocidos en la técnica.

40

El término “gen indicador”, como se ha usado aquí, se refiere a una secuencia de ácido nucleico cuyo producto puede ser fácilmente ensayado, por ejemplo, colorimétricamente como un producto de reacción enzimática, tal como la luciferasa que codifica el gen. Otros ejemplos de genes indicadores usados ampliamente incluyen aquellas enzimas codificadas, como β -galactosidasa, β -glucoronidasa y β -glucosidasa; moléculas luminiscentes, tales como proteína fluorescente verde y luciferasa de luciérnaga; y fabricantes de auxotróficos tales, como His3p y Ura3p. Véase, por ejemplo, Ausubel y col., *Protocolos Actuales en Biología Molecular* (New York: John Wiley & Sons, Inc.), Capítulo 9 (1998).

45

Las células (por ejemplo, células anfitrionas, células de origen neural, etc.) puestas en contacto con un compuesto de ensayo y/o un agente estimulante de la función de CREB tomarán o asumirán el compuesto de ensayo y/o el agente estimulante de la función de CREB.

50

Por “dosis subóptima del agente estimulante de la función de CREB” se quiere decir esa cantidad, o dosis, de agente estimulante de la función de CREB que es requerida para estimular (inducir) la función de vía de CREB a un nivel que está por encima de los niveles endógenos (basales), de tal modo que otro aumento significativo estadísticamente en la función de la vía de CREB debido a la inducción por un potenciador cognitivo puede ser medido y la medición no es atribuible a fluctuaciones o variaciones celulares naturales como consecuencia de fluctuaciones celulares naturales. Una dosis subóptima del agente estimulante de la función de CREB es esa dosis o concentración en que la magnitud del efecto (actividad indicadora, expresión de gen dependiente de CREB) es proporcional a la dosis o concentración y la magnitud del efecto no cambia cuando la dosis o concentración cambia. La dosis subóptima de agente estimulante de la función de CREB es determinada empíricamente y variará dependiendo de varios factores, incluyendo las características farmacodinámicas del agente estimulante de la función de CREB particular y las células particulares que han de ser puestas en contacto. Por ejemplo, la dosis subóptima de agente estimulante de la función de CREB puede ser determinada (a) poniendo en contacto diferentes muestras de una célula anfitriona que comprende un gen indicador enlazado operativamente a un promotor de CRE con una concentración diferente del agente estimulante de la función de CREB; y (b) determinar la gama de concentraciones del agente estimulante de la función de CREB requerido para afectar a la actividad del indicador desde la línea base a la respuesta máxima evaluando la actividad del indicador en las muestras de la célula anfitriona. La dosis subóptima del agente estimulante de la función de CREB será cualquier concentración que produzca (1) el 50% o menos de la actividad de indicador máxima y (2) una actividad de indicador por encima de las fluctuaciones celulares naturales. La determinación de la dosis subóptima de agente estimulante de la función de CREB está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. Por “dosis subóptima de un agente estimulante que activa vías de señalización sobre CREB” se quiere decir esa cantidad, o dosis, de agente estimulante que es requerida para estimular (inducir) una vía de señalización sobre CREB.

65

ES 2 344 411 T3

Por “gama de diferentes concentraciones del compuesto de ensayo” se quieren decir 2 o más (es decir, 2, 3, 4, 5, etc.) concentraciones diferentes del compuesto de ensayo. La gama de concentraciones seleccionada flanquea generalmente la concentración del compuesto de ensayo en la operación (a) de la exploración primaria. Por “gama lineal de concentraciones (diferentes)” se quieren decir las concentraciones en las que está aumentando el efecto (actividad de indicador, expresión de gen dependiente de CREB) con concentración pero antes del momento cuando el efecto ya no está cambiando con cambios de concentración. Seleccionar gamas de concentración también está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

Por “CREB funcional (biológicamente activo)” se quiere significar el hecho de incluir la capacidad de aglutinación de ADN de las proteínas, estado de fosforilación, estabilidad de proteína, localización subcelular, etc.

La “expresión de gen dependiente de CREB” también es denominada aquí como “expresión de gen mediado por CREB”. La expresión de gen dependiente de CREB puede ser determinada por métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, transferencia Northern, transferencia Western). Tales métodos se han descrito en mayor detalle, por ejemplo, en Ausubel y col., *Protocolos Actuales en Biología Molecular* (New York: John Wiley & Sons) (1998); y Sambrook y col., *Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio*, 2ª Edición (New York: Cold Spring Harbor University Press (1989)).

Los “Genes endógenos mediado por CREB” son también denominados aquí como “genes endógenos dependientes de CREB”. Tales genes son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, c-fos, prodinorfina, tPA y factor neurotrópico derivado del cerebro (BDNF) (Barco, A. y col., *Cell*, 108(5):689-703 (2002)). Los genes mediado por CREB pueden también ser identificados por los expertos en la técnica usando métodos conocidos y disponibles actualmente en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel y col., *Protocolos Actuales en Biología Molecular* (New York: John Wiley & Sons) (1998); y Sambrook y col., *Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio*, 2ª edición (New York: Cold Spring Harbor University Press (1989)).

La exploración secundaria comprende: (a) poner en contacto células de origen neural con un compuesto candidato identificado en la exploración primaria y con una dosis subóptima de un agente estimulante que activa las vías de señalización sobre CREB; (b) evaluar la expresión de gen endógeno dependiente de CREB en las células que han sido puestas en contacto con el compuesto candidato y con el agente estimulante; y (c) comparar la expresión de gen endógeno dependiente de CREB evaluada en la operación (b) con la expresión de gen endógeno dependiente de CREB en células de control que han sido puestas en contacto con el agente estimulante y que no han sido puestas en contacto con el compuesto candidato (células de control que han sido puestas en contacto sólo con el agente estimulante). Una diferencia significativa estadísticamente en la expresión de gen dependiente de CREB evaluada en la operación (b) comparada con la expresión de gen dependiente de CREB en células de control identifica el compuesto candidato como un compuesto candidato confirmado. Preferiblemente, una diferencia no significativa es obtenida en la expresión dependiente de CREB en células de control que no han sido puestas en contacto con el agente estimulante y que han sido puestas en contacto con el compuesto candidato (células de control que han sido puestas en contacto sólo con el compuesto candidato) con relación a la expresión de gen dependiente de CREB en células de control que no han sido puestas en contacto ni con el agente estimulante ni con el compuesto candidato (células de control que no han sido puestas en contacto con nada). En una realización particular, las células son puestas en contacto con el compuesto candidato antes de hacer contacto con el agente estimulante.

Alternativamente, la exploración secundaria comprende: (a) poner en contacto células de origen neural que comprenden un gen indicador enlazado operativamente a un promotor de CRE con un compuesto candidato identificado en la exploración primaria y con una dosis subóptima de agente estimulante que activa vías de señalización sobre CREB; (b) determinar la actividad del indicador en las células que han sido puestas en contacto con el compuesto candidato y con el agente estimulante; y (c) comparar la actividad del indicador evaluada en la operación (b) con la actividad del indicador en las células de control que han sido puestas en contacto con el agente estimulante y que no han sido puestas en contacto con el compuesto de ensayo (células de control que han sido puestas en contacto sólo con el agente estimulante). Una diferencia significativa estadísticamente en la actividad del indicador determinada en la operación (b) comparada con la actividad del indicador en células de control identifica el compuesto candidato como un compuesto candidato confirmado. Preferiblemente, una diferencia no significativa es obtenida en la actividad del indicador en células de control que no han sido puestas en contacto con el agente estimulante y que han sido puestas en contacto con el compuesto candidato (células de control que han sido puestas en contacto sólo con el componente candidato) con relación a la actividad del indicador en células de control que no han sido puestas en contacto ni con el agente estimulante ni con el compuesto candidato (células de control que no han sido puestas en contacto con nada). En una realización particular, las células son puestas en contacto con el compuesto candidato antes de hacer contacto con el agente estimulante.

Preferiblemente, el “agente estimulante que activa vías de señalización sobre CREB” usado en la exploración primaria es un agente estimulante de la función de CREB.

En otra realización, la exploración secundaria puede ser reemplazado con un método de exploración que usa *Drosophila*, en el que dicho método de exploración comprende: (a) administrar un compuesto candidato identificado en la exploración primaria a la *Drosophila* que tiene un gen indicador enlazado operativamente a un promotor de CRE; (b) evaluar la actividad del indicador en la *Drosophila* a la que se le ha administrado el compuesto candidato; y (c) comparar la actividad del indicador evaluada en la operación (b) con la actividad del indicador en la *Drosophila* de

control a la que no se le ha administrado el compuesto candidato. Una diferencia significativa estadísticamente en la actividad del indicador en la operación (b) comparada con la actividad del indicador en la *Drosophila* de control a la que no se le ha administrado el compuesto candidato identifica el compuesto candidato como un compuesto candidato confirmado.

5

En una realización particular, las células usadas en la exploración secundaria son diferentes de las células anfitrionas usadas en la exploración primaria. En otra realización, el gen endógeno mediado por CREB o el transgen mediado por CREB en la exploración secundaria son diferentes del transgen mediado por CREB o del gen endógeno mediado por CREB en la exploración primaria. Por ejemplo, en una realización, las células anfitrionas en la exploración primaria son neuroblastomas y las células para la exploración secundaria no son neuroblastomas. En otra realización, el transgen mediado por CREB en la exploración primaria es luciferasa (CRE enlazado operativamente al gen luciferasa) y el transgen mediado por CREB en la exploración secundaria no es luciferasa.

10

Preferiblemente, las células anfitrionas en la exploración primaria son células proliferantes (tales como neuroblastomas) y las células en la exploración secundaria no son proliferantes, células diferenciadas de origen neural (tales como neuronas (por ejemplo, células primarias del hipocampo) y células gliales). En una realización particular, el gen mediado por CREB en la exploración primaria es un gen indicador mediado por CREB (un transgen mediado por CREB) y el gen mediado por CREB en la exploración secundaria es un gen endógeno mediado por CREB.

15

Como se ha usado aquí, una célula se refiere a una célula animal. La célula puede ser una célula madre o una célula somática. Células animales adecuadas pueden ser por ejemplo, de origen mamífero. Ejemplos de células de mamífero incluyen células humanas (tales como las células HeLa), bobinas, ovinas, porcinas, de roedor (tal como rata, de ratón (tales como células madre embrionarias), conejo, etc) y de monos (tales como células de COS1). Preferiblemente, la célula es de origen neural (tal como neuroblastoma, neurona, célula madre neural, célula glial, etc.). La célula puede también ser una célula embrionaria, una célula madre de médula ósea u otra célula progenitora. Cuando la célula es una célula somática, la célula puede ser, por ejemplo, una célula epitelial, fibroblasto, célula de músculo lisa, célula sanguínea (incluyendo una célula hematopoyética, un glóbulo rojo, una célula T, una célula B, etc.), célula tumoral, célula de músculo cardíaco, macrófago, célula dendrítica, célula neuronal (por ejemplo, una célula glial o astrocito), o célula infectada por patógeno (por ejemplo, las infectadas por bacterias, virus, virusoides, parásitos, o priones). Las células pueden ser obtenidas comercialmente o a partir de un depositario u obtenidas directamente de un animal, tal como por biopsia.

25

30

En una realización, la exploración terciaria es un método conductual para evaluar la formación de memoria a largo plazo en un animal que comprende: (a) administrar una cantidad efectiva de un compuesto candidato confirmado identificado en la exploración secundaria al animal (por ejemplo, humano, otro mamífero, vertebrado o invertebrado); (b) entrenar al animal al que se le ha administrado el compuesto candidato confirmado en condiciones apropiadas para producir la formación de memoria a largo plazo en el animal; (c) evaluar la formación de memoria a largo plazo en el animal entrenado en la operación (b); y (d) comparar la formación de memoria a largo plazo evaluada en la operación (c) con la formación de memoria a largo plazo producida en el animal de control al que no se ha administrado el compuesto candidato confirmado. Si se ha observado una mejora en la formación de memoria a largo plazo evaluada en el animal tratado con el compuesto candidato confirmado con relación a la formación de memoria a largo plazo evaluada en el animal de control, el compuesto candidato confirmado es identificado como un potenciador cognitivo. Las exploraciones terciarias con protocolos similares están disponibles usando métodos conductuales (modelos) para otras, disfunciones cognitivas.

45

En una realización particular, el método para identificar o explorar potenciadores cognitivos comprende; (a) poner en contacto las células anfitrionas que comprenden un gen indicador de luciferasa enlazado operativamente a un promotor de CRE con un compuesto de ensayo, produciendo así una muestra de ensayo; (b) poner en contacto la muestra de ensayo producida en la operación (a) con una dosis subóptima de un agente estimulante de la función de CREB (por ejemplo, forskolina, cloruro de potasio); (c) determinar la actividad de CRE-luciferasa en las células anfitrionas que han sido puestas en contacto con el compuesto de ensayo y con el agente estimulante de la función de CREB; (d) comparar la actividad de CRE-luciferasa determinada en la operación (c) con la actividad de CRE-luciferasa en células de control que han sido puestas en contacto con el agente estimulante de la función de CREB y que no han sido puestas en contacto con el compuesto de ensayo (células de control que han sido puestas en contacto sólo con el agente estimulante de la función de CREB); (e) seleccionar el compuesto de ensayo si tiene un pequeño efecto o ningún efecto y si además aumenta los niveles (actividad) de CRE-luciferasa en las células anfitrionas que han sido puestas en contacto con el agente estimulante de la función de CREB, seleccionando por ello un compuesto de "Hit Activo"; (f) repetir las operaciones (a) a (e) usando una gama de diferentes concentraciones del compuesto de Hit Activo seleccionado en la operación (e); y (g) seleccionar el compuesto de Hit Activo si tiene sólo un pequeño o ningún efecto y si además cambia proporcionalmente los niveles (actividad) de CRE-luciferasa en las células anfitrionas que han sido puestas en contacto con el agente estimulante de la función de CREB, para la gama lineal de concentraciones del compuesto de Hit Activo, seleccionado así un compuesto "Activo Confirmado". Las células anfitrionas que comprenden un gen indicador de luciferasa enlazado operativamente a un promotor de CRE (gen indicador de luciferasa activado por CRE) pueden ser generadas transfiriendo las células con un gen indicador de luciferasa activado por CRE. Tales células son también denominadas aquí como células de CRE-luci. En una realización particular, las células anfitrionas son células de neuroblastoma humanas. Las células de neuroblastoma humanas transferidas con un gen indicador de luciferasa activado por CRE también son denominadas aquí como células de neuroblastoma de CRE-luci. Un compuesto de Hit Activo Confirmado es también denominado como un compuesto candidato.

65

ES 2 344 411 T3

Un compuesto Confirmado Activo (o un compuesto candidato) puede ser ensayado o evaluado para ver su efecto sobre la expresión de gen endógeno, mediado por CREB (expresión de gen endógeno dependiente de CREB) por (a) poner en contacto neuronas (particularmente células del hipocampo) con el compuesto Activo Confirmado (o el compuesto candidato), produciendo por ello una muestra; (b) poner en contacto la muestra con una dosis subóptima de un agente estimulante de la función de CREB; (c) evaluar la expresión de gen endógeno dependiente de CREB en las neuronas que han sido puestas en contacto con el compuesto Activo Confirmado (o el compuesto candidato) y el agente estimulante de la función de CREB; y (d) comparar la expresión de gen endógeno dependiente de CREB evaluada en la operación (c) con la expresión de gen endógeno dependiente de CREB en neuronas de control que han sido puestas en contacto con el agente estimulante de la función de CREB y que no han sido puestas en contacto con el compuesto Activo Confirmado (o compuesto candidato). Una diferencia significativa estadísticamente en la expresión de gen dependiente de CREB evaluada en la operación (c) comparada con la expresión de gen dependiente de CREB en células de control identifica el compuesto Activo Confirmado (o compuesto candidato) como el que tiene un efecto sobre la expresión de gen dependiente de CREB y como un compuesto candidato confirmado. Preferiblemente, no es obtenida ninguna diferencia significativa en la expresión dependiente de CREB en células de control que no han sido puestas en contacto con el agente estimulante de la función de CREB y que han sido puestas en contacto con el compuesto Activo Confirmado (o compuesto candidato) (células de control que han sido puestas en contacto sólo con el compuesto Activo Confirmado (o compuesto candidato)) con relación a la expresión de gen dependiente de CREB en células de control que no han sido puestas en contacto ni con el agente estimulante de la función de CREB ni con el compuesto Activo Confirmado (compuesto candidato) (células de control que no han sido puestas en contacto con nada).

El compuesto candidato confirmado puede ser ensayado o evaluado en un modelo animal (conductual) de formación de memoria a largo plazo dependiente para identificador potenciadores cognitivos. Tales métodos para ensayar o evaluar un compuesto candidato confirmado para identificar potenciadores cognitivos comprende (a) administrar una cantidad efectiva de un compuesto candidato confirmado a un animal; (b) entrenar al animal administrado el compuesto candidato confirmado en condiciones apropiadas para producir la formación de memoria a largo plazo en el animal; (c) evaluar la formación de memoria a largo plazo en el animal entrenado en la operación (b); y (d) comparar la formación de memoria a largo plazo evaluada en la operación (c) con la formación de memoria a largo plazo producida en el animal de control al que no se ha administrado el compuesto candidato confirmado. Si se ha observado una mejora significativa estadísticamente en la formación de memoria a largo plazo evaluada en el animal tratado con el compuesto candidato confirmado con relación a la formación de memoria a largo plazo evaluada en el animal de control, el compuesto candidato confirmado puede ser categorizado como que mejora (perfecciona, aumenta) la formación de memoria a largo plazo en el animal y es identificado como un potenciador cognitivo.

Como se ha descrito aquí, compuestos candidatos confirmados y potenciadores cognitivos de varias clases químicas son hechas progresar a través de modelos en vivo de formación de memoria.

Se han buscado compuestos activos que no mejoran la función de vía de CREB por sí solos sino más bien después de coestimulación con el agente estimulante de la función de CREB. Este requisito fue introducido para imitar los resultados de los experimentos originales en moscas: (1) la señalización de cAMP está implicada en la formación de memoria de la mosca y (2) se requiere entrenamiento para mejorar la formación de memoria cuando el activador de CREB es sobre-expresado.

Compuestos que han de ser evaluados o ensayados sobre su capacidad para aumentar la función de la vía de CREB, tales como agente farmacéuticos, fármacos, compuestos químicos, compuestos iónicos, compuestos orgánicos, aglutinantes orgánicas, incluyendo cofactores, sacáridos, recombinantes y péptidos sintéticos, proteínas, peptoides, secuencias de ácido nucleico, que incluyen genes, productos de ácido nucleico, y otras moléculas y composiciones, pueden ser explorados individualmente o uno o más compuestos pueden ser ensayados simultáneamente sobre la capacidad para aumentar la función de la vía de CREB de acuerdo con los métodos descritos aquí. Cuando es ensayada una mezcla de compuestos, los compuestos seleccionados por los métodos descritos pueden ser separados (como apropiados) e identificados por métodos adecuados (por ejemplo, cromatografía, formación de secuencia, PCR). La presencia de uno o más compuestos en una muestra de ensayo que tiene la capacidad de aumentar la función de la vía de CREB puede también ser determinada de acuerdo con estos métodos. Los compuestos que han de ser explorados sobre su capacidad para aumentar la función de la vía de CREB están generalmente en una concentración desde aproximadamente 10^{-9} molar hasta aproximadamente 10^{-3} molar.

Grandes bibliotecas combinatorias de compuestos (por ejemplo, compuestos orgánicos, recombinantes o péptidos sintéticos, peptoides, ácidos nucleicos) producidas por síntesis química combinatoria u otros métodos pueden ser ensayadas (véase, por ejemplo, Zuckerman, R.N. y col., *J. Med. Chem.*, 37:2678-2685 (1994) y referencias citadas aquí; véase también, Ohlmeyer, M.H.J. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:10922-10926 (1993) y DeWitt, S.H. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6909-6913 (1993), relativos a compuestos etiquetados; Rutter, W.J. y col. Patente Norteamericana n° 5.010.175; Huebner, V.D. y col., Patente Norteamericana n° 5.182.366; y Geysen, H.M., Patente Norteamericana n° 4.833.092). Cuando compuestos seleccionados de una biblioteca combinatoria llevan etiquetas únicas, es posible la identificación de compuestos individuales por métodos cromatográficos.

Bibliotecas químicas, caldos microbianos y bibliotecas de presentación de fagos ("phage display") pueden ser también ensayadas (cribadas) sobre la presencia de uno o más compuestos que son capaces de mejorar la función de la vía de CREB de acuerdo con los métodos descritos aquí.

ES 2 344 411 T3

El invento también se refiere a métodos para evaluar el efecto de un compuesto candidato sobre la expresión de gen dependiente de CREB (expresión de gen de inducido o mediado por CREB) que comprende: (a) poner en contacto células de origen neural con el compuesto candidato y con una dosis subóptima de un agente estimulante de la función de CREB; (b) evaluar la expresión de gen endógeno dependiente de CREB en las células que han sido puestas en contacto con el compuesto candidato y con el agente estimulante de la función de CREB; y (c) comparar la expresión de gen endógeno dependiente de CREB evaluada en la operación (b) con la expresión de gen endógeno dependiente de CREB en células de control que han sido puestas en contacto con el agente estimulante de la función de CREB y que no han sido puestas en contacto con el compuesto candidato. Una diferencia significativa estadísticamente en la expresión de gen dependiente de CREB evaluada en la operación (b) comparada con la expresión de gen dependiente de CREB en células de control identifica el compuesto candidato como el que tiene un efecto sobre la expresión de gen dependiente de CREB. Preferiblemente, no se ha obtenido ninguna diferencia significativa en la expresión de gen dependiente de CREB en células de control que no han sido puestas en contacto con el agente estimulante de la función de CREB y que han sido puestas en contacto con el compuesto candidato con relación a la expresión de gen dependiente de CREB en células de control que no han sido puestas en contacto ni con el agente estimulante de la función de CREB ni con el compuesto candidato (células de control que no han sido puestas en contacto con nada). En una realización particular, las células son puestas en contacto con el compuesto de ensayo antes de hacer contacto con el agente estimulante de la función de CREB.

Alternativamente, métodos para evaluar el efecto de un compuesto candidato sobre la expresión de gen dependiente de CREB comprende: (a) poner en contacto células de origen neural que comprenden un gen indicador enlazado operativamente a un promotor de CRE con el compuesto candidato y con una dosis subóptima de un agente estimulante de la función de CREB; (b) determinar la actividad del indicador en las células que han sido puestas en contacto con el compuesto candidato y con el agente estimulante de la función de CREB; y (c) comparar la actividad del indicador determinada en la operación (b) con la actividad del indicador en células de control que han sido puestas en contacto con el agente estimulante de la función de CREB y que no han sido puestas en contacto con el compuesto candidato. Una diferencia significativa estadísticamente en la actividad del indicador determinada en la operación (b) comparada con la actividad del indicador en células de control identifica el compuesto candidato como el que tiene un efecto sobre la expresión de gen dependiente de CREB. Preferiblemente no se ha obtenido diferencia significativa en la actividad del indicador en células de control que no han sido puestas en contacto con el agente estimulante de la función de CREB y que han sido puestas en contacto con el compuesto candidato con relación a la actividad del indicador en células de control que no han sido puestas en contacto ni con el agente estimulante de la función de CREB ni con el compuesto (células de control que no han sido puestas en contacto con nada). En una realización particular, las células son puestas en contacto con el compuesto de ensayo antes de hacer contacto con el agente estimulante de la función de CREB.

Como con la exploración secundaria, en una realización particular, las células usadas en los métodos para evaluar el efecto de un compuesto candidato sobre la expresión de gen dependiente de CREB son diferentes de las células anfitrionas en la exploración primaria. En otra realización, el gen endógeno mediado por CREB o el transgen mediado por CREB usados en los métodos para evaluar el efecto de un compuesto candidato sobre la expresión de gen dependiente de CREB son diferentes del transgen mediado por CREB o del gen endógeno mediado por CREB en la exploración primaria. En otra realización, las células usadas en los métodos para evaluar el efecto de un compuesto candidato sobre expresión de gen dependiente de CREB son no proliferantes, células diferenciadas de origen neural (tales como neuronas (por ejemplo células primarias del hipocampo) y células gliales). En una realización particular, el gen mediado por CRE en los métodos para evaluar el efecto de un compuesto candidato sobre la expresión de gen dependiente de CREB es un gen endógeno mediado por CRE.

La mejora de la formación de memoria a largo plazo puede ser definida como (a) un aumento en los niveles de rendimiento conductual; (b) una disminución en el número de ensayos o pruebas de entrenamiento requeridos para producir un nivel de rendimiento conductual; o (c) una disminución de la duración de descanso entre sesiones de entrenamiento para producir un nivel de rendimiento conductual. Por consiguiente el invento se refiere también a métodos para evaluar el efecto de un potenciador cognitivo en la formación de memoria a largo plazo en un animal que comprende: (a) administrar una cantidad efectiva de potenciador cognitivo a un animal; (b) entrenar al animal al que se le ha administrado el potenciador cognitivo en condiciones apropiadas para producir la formación de memoria a largo plazo en dicho animal; (c) evaluar la formación de memoria a largo plazo en el animal entrenado en la operación (b); y (d) comparar la formación de memoria a largo plazo evaluada en la operación (c) con la formación de memoria a largo plazo producida en el animal de control al que no se le ha administrado el potenciador cognitivo. Si se ha observado una mejora en la formación de memoria a largo plazo evaluada en el animal tratado con el potenciador cognitivo con relación a la formación de memoria a largo plazo evaluada en el animal de control, el potenciador cognitivo puede ser categorizado como que mejora la formación de memoria a largo plazo en el animal. Se espera que los potenciadores cognitivos identificados como que mejoran la formación de memoria a largo plazo en el animal sean candidatos efectivos para usar en la rehabilitación de un animal con disfunciones cognitivas y para usar en mejorar la memoria o el rendimiento o función cognitivo normal (capacidad o función) en un animal normal. Se ha comprendido que, en ciertos casos, un potenciador cognitivo identificado de acuerdo con el presente invento puede ser un agente estimulante de la función de CREB. Así, un agente estimulante de la función de CREB puede ser identificado como un potenciador cognitivo de acuerdo con el invento.

Las frases “rendimiento conductuales” y “rendimiento cognitivo” son frases conocidas en la técnica y son usadas aquí de acuerdo con su significado aceptado en la técnica.

ES 2 344 411 T3

Como es usado aquí, el término “animal” incluye mamíferos, así como otros animales, vertebrados e invertebrados (por ejemplo, pájaros, peces, reptiles, insectos (por ejemplo especies de *Drosophila*), moluscos (por ejemplo *Aplisia*). El término “mamífero” y “perteneciente al mamífero”, como son usados aquí, se refieren a cualquier animal vertebrado, incluyendo monotremas, marsupiales y placentarios, que amamantan a sus recién nacidos y o bien paren a sus nacidos vivos (mamíferos euterianos o placentarios) o bien depositan huevos (mamíferos metaterianos o no placentarios). Ejemplos de especies mamíferas incluyen seres humanos y primates (por ejemplo monos, chimpancés), roedores (por ejemplo ratas, ratones, cerdos de Guinea) y rumiantes (por ejemplo vacas, cerdos, caballos).

El animal puede ser un animal con alguna forma y grado de disfunción cognitiva o un animal con un rendimiento cognitivo normal (es decir un animal sin ninguna forma de fallo cognitivo (disfunción o pérdida de función cognitiva)).

Una cantidad efectiva de potenciador cognitivo o compuesto candidato confirmado es esa cantidad, o dosis, administrada a un animal que se requiere para efectuar un cambio (aumento o disminución) en la expresión de gen dependiente de CREB, particularmente en células de origen neural. La dosificación administrada a un animal, incluyendo la frecuencia de administración, variará dependiendo de varios factores, incluyendo características farmacodinámicas y farmacocinéticas del potenciador cognitivo particular o compuesto candidato confirmado, modo y ruta de administración; tamaño, edad, sexo, salud, peso corporal y dieta del receptor; naturaleza y extensión de los síntomas que son tratados o naturaleza y extensión de la disfunción o disfunciones cognitivas que son mejoradas o moduladas, tipo de tratamiento concurrente, frecuencia de tratamiento y el efecto deseado.

El entrenamiento de animales para la formación de memoria a largo plazo es conducido usando métodos generalmente conocidos en la técnica (véase por ejemplo, Josselyn y col., *Society for Neurosci.*, 24:926, Resumen 365.10 (1998); Casella y Davis, *Physiol. Behav.*, 36:377-383 (1986); Guzowski y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:2693-2698 (1997); Lamprecht y col., *J. Neuroscience*, 17(21):6443-6450(1997); Bourtschuladze y col., *Cell*, 79:59-68 (1994); Kogan y col., *Curr. Biol.*, 7:1-11 (1996); Tully y Quinn, *J. comp. Physiol. A Sens. Neural. Behav. Physiol.* 157:263-277 (1985); Tully y col., *Cell*, 79:35-47 (1994)). El entrenamiento puede comprender una o múltiples sesiones de entrenamiento. Por “múltiples sesiones de entrenamiento” se quiere decir dos o más sesiones de entrenamiento.

El invento se refiere además a métodos para evaluar el efecto de un potenciador cognitivo sobre la formación de memoria olfativa en la *Drosophila* que comprende: (a) administrar una cantidad efectiva de potenciador cognitivo a la *Drosophila*; (b) someter la *Drosophila* a un acondicionamiento clásico y al menos a un producto odorante y a un choque eléctrico; y (c) evaluar el índice de rendimiento del acondicionamiento clásico, en el que el efecto de un potenciador cognitivo ocurre cuando el compuesto altera el índice de rendimiento del índice de rendimiento obtenido por la *Drosophila* de la operación (a) en ausencia de un potenciador cognitivo.

El invento también se refiere a cada una de las exploraciones primaria, secundaria y terciaria que comprenden los métodos para identificar o explorar potenciadores cognitivos descritos aquí.

El invento anticipa un nuevo tipo de potenciador cognitivo que mejora la función de la vía de CREB y aumenta los efectos terapéuticos del entrenamiento cognitivo. Tales potenciadores cognitivos pueden ser usados como una terapia general para distintas formas de disfunción cognitiva que proceden de herencia, enfermedad, daños y edad, estimulando el proceso molecular que contribuye a la plasticidad del cerebro y para mejorar la memoria o el rendimiento cognitivo normal (capacidad o función).

Los potenciadores cognitivos identificados de acuerdo con los métodos del invento son compuestos con actividad farmacológica e incluyen fármacos, compuestos químicos, compuestos iónicos, compuestos orgánicos, aglutinantes orgánicos, incluyendo cofactores, sacáridos, recombinantes y péptidos sintéticos, proteínas, peptoides, secuencias de ácido nucleico, incluyendo genes, productos de ácido nucleico, y otras moléculas y composiciones.

Por “modular” se quiere significar la inclusión de la capacidad para inducir, mejorar, potenciar, reducir, bloquear, inhibir (total o parcial) y regular una acción o efecto bioquímico o fisiológico. Por “regular”, como el término es usado aquí, se quiere significar la capacidad para controlar la tasa y extensión a la que ocurre el proceso. Por “mejorar” se quiere indicar la capacidad para potenciar, aumentar, perfeccionar o hacer mayor o mejor, con relación a lo que se considera normal, una acción o efecto bioquímico o fisiológico.

La disfunción cognitiva, corrientemente asociada con la disfunción cerebral y desórdenes o condiciones del sistema nervioso central (CNS), se produce debido a herencia, enfermedad, daños y/o edad. Los desórdenes y condiciones del CNS asociados con alguna forma y grado de fallo cognitivo (disfunción) incluyen, pero no están limitados a lo siguiente:

- 1) daños en la memoria asociados con la edad o dependientes de la edad;
- 2) retraso mental que se plantea debido a un defecto hereditario, tal como, pero no limitado, al asociado con (debido a), anomalías cromosómicas, incluyendo el síndrome de Rubinstein-Taybi, el síndrome de Down, el síndrome de X frágil, el síndrome del maullido, el síndrome de Klinefelter, el síndrome de Turner, mosaicismos, el síndrome de Patau (trisomía 13) y el síndrome de Edward (trisomía 18); anomalías metabólicas genéticas, incluyendo el síndrome de Coffin-Lowry, desórdenes recesivos autosómicos, tales como aminoacidurias y acidemias, desórdenes peroxisómicos, tales como galactosemia, enfermedad

ES 2 344 411 T3

de orina de jarabe de arce y fenilcetonuria, defectos lisosómicos, tales como la enfermedad de Gaucher, el síndrome de Hurler (mucopolisacaridosis), la enfermedad de Niemann-Pick, y la enfermedad de Tay-Sachs, y desórdenes recesivos unidos o ligados a X, tales como el síndrome de Lesch-Nyhan (hiperuricemia). El síndrome de Hunter (una variante de la mucopolisacaridosis) y el síndrome oculocerebrorenal de Lowe; anormalidades neurológicas genéticas, y desórdenes recesivos autosómicos, tales como distrofia miotónica, neurofibromatosis y esclerosis tuberosa, y desórdenes recesivos autosómicos, tales como microcefalia primaria;

- 3) pérdida de función cognitiva dependiente de un trauma, tal como, pero no limitado a, la asociada con (debida a) enfermedades cerebrovasculares, incluyendo ictus e isquemia, incluyendo ictus isquémico; trauma cerebral, incluyendo hematoma subdural y tumor cerebral, daños en la cabeza;
- 4) desórdenes neurodegenerativos, tales como delirio (estado de confusión aguda); demencia, incluyendo la enfermedad de Alzheimer y las demencias que no son de tipo Alzheimer, tales como, pero no limitadas a, demencia corporal de Lewy, demencia vascular, demencia de Binswanger (encefalopatía arterioesclerótica subcortical) demencias asociadas con el síndrome de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Huntington (corea), enfermedad de Pick, hidrocefalia de presión normal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, neurosífilis (parálisis general) o infección de VIH, síndromes de demencia del lóbulo frontal, demencias asociadas con traumas en la cabeza, incluyendo demencia pugilística, trauma cerebral, hematoma subdural, tumor cerebral, hipotiroidismo, deficiencia de la vitamina B₁₂, radiación intracraneal; otras enfermedades y desórdenes neurodegenerativos;
- 5) desórdenes psiquiátricos, incluyendo desórdenes afectivos (desórdenes del humor), tales como, pero no limitados a, depresión, incluyendo pseudodemencia depresiva; desórdenes sicóticos, tales como, pero no limitados a, esquizofrenia y autismo (Síndrome de Kanner), desórdenes neuróticos, tales como, pero no limitados a, ansiedad y desorden compulsivo-obsesivo; desorden de déficit de atención; y
- 6) discapacidades en el aprendizaje, lenguaje o lectura, particularmente en niños. Por “discapacidades en el aprendizaje” se quiere significar los desórdenes de los procesos psicológicos básicos que afectan al modo de aprendizajes individuales. Las discapacidades en el aprendizaje pueden causar dificultades en oír, pensar, hablar, leer, escribir, deletrear, dificultades aritméticas o combinaciones de cualesquiera de las anteriores. Las discapacidades en el aprendizaje incluyen impedimentos o retrasos perceptivos, dislexia y afasia evolutiva.

Los potenciadores cognitivos y los compuestos candidatos confirmados pueden ser administrados directamente a un animal de varias formas. En una realización preferida, los potenciadores cognitivos y los compuestos candidatos confirmados son administrados sistémicamente. Otras rutas de administración son generalmente conocidas en la técnica e incluyen administración intravenosa incluyendo rutas de infusión y/o inyección de bolo, intracerebroventricularidad, intratecal, parenteral, en las mucosas, implante, intraperitoneal, oral, intradérmica, transdérmica (por ejemplo polímeros de liberación lenta), intramuscular, subcutánea, tópica, epidural, etc. Otras rutas adecuadas de administración pueden también ser usadas, por ejemplo para conseguir absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos. Los potenciadores cognitivos y compuestos candidatos particulares pueden también ser administrados por terapia genética, en la que una molécula de ADN que codifica una proteína o péptido terapéutico particular es administrada al animal, por ejemplo, mediante un vector, que hace que la proteína o péptido particular sea expresado y segregado a niveles terapéuticos *in vivo*.

Un vector, como es usado aquí el término, se refiere a un vector de ácido nucleico, por ejemplo un plásmido de ADN, virus u otro replicón adecuado (por ejemplo un vector viral). Los vectores virales incluyen retrovirus, adenovirus, parvovirus (por ejemplo virus adeno-asociados), coronavirus, virus de ARN de cadena negativa tales como ortomixovirus (por ejemplo el virus de la gripe), rabdovirus (por ejemplo virus de la rabia y de la estomatitis vesicular), paramixovirus (por ejemplo sarampión y Sensai), virus de ARN de cadena positiva tales como picornavirus y alfavirus, y virus de ADN de doble cadena incluyendo adenovirus, herpesvirus (por ejemplo virus de Herpes Simplex tipos 1 y 2, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus), y poxvirus (por ejemplo vacunas, viruela aviar y viruela de canarios). Otros virus incluyen virus de Norwalk, togavirus, flavivirus, reovirus, papovirus, hepadnavirus, y virus de hepatitis, por ejemplo. Ejemplos de retrovirus incluyen: leucosis-sarcoma aviar, virus de tipo C, virus de tipo B, virus de tipo D de mamífero, grupo de HTLV-BLV, lentivirus, espumavirus (Coffin, J.M., Retroviridae: Los virus y su replicación, En Virología Fundamental, Tercera Edición, B. N. Fields, y col., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, 1996). Otros ejemplos incluyen virus de leucemia de ratones, virus de sarcoma de ratones, virus de tumor mamario de ratones, virus de leucemia bovina, virus de leucemia felina, virus de sarcoma de felino, virus de leucemia aviar, virus de leucemia de células T o linfocitos T humanos, virus endógeno de babuino, virus de leucemia de mono Gibbon, virus de mono de Mason Pfizer, virus de inmunodeficiencia de simio, virus de sarcoma de simio, virus de sarcoma de Rous y lentivirus. Otros ejemplos de vectores están descritos, por ejemplo, en McVey y col., Patente Norteamericana n° 5.801.030.

El modo de administración es preferiblemente en la región de las células objetivo. En una realización particular, el modo de administración es a células de origen neural. Las células de origen neural incluyen células madre neurales, células de neuroblastoma, neuronas y células gliales.

ES 2 344 411 T3

Los potenciadores cognitivos y los compuestos candidatos confirmados pueden ser administrados junto con otros componentes o agentes biológicamente activos, tales como surfactantes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo glicéridos), excipientes (por ejemplo lactosa), estabilizadores, conservantes, humectantes, emolientes, antioxidantes, portadores, diluyentes y vehículos. Si se desea, pueden también ser añadidos ciertos agentes edulcorantes, saporíferos y/o colorantes.

Los potenciadores cognitivos y los compuestos candidatos confirmados pueden ser formulados como una solución, suspensión emulsión o polvo liofilizado en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de tales vehículos son agua, solución salina, solución de Ringer, solución de cloruro sódico isotónico, solución de dextrosa, y albúmina de suero humano al 5%. Los liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijados pueden ser también utilizados. El vehículo o polvo liofilizado puede contener aditivos que mantienen la isotonicidad (por ejemplo cloruro sódico, manitol) y estabilidad química (por ejemplo tampones y conservantes). La formulación puede ser esterilizada mediante técnica usadas corrientemente. Los portadores farmacéuticos adecuados están descritos en las Ciencias Farmacéuticas de Remington.

Los potenciadores cognitivos y los compuestos candidatos confirmados pueden ser administrados en dosis únicas o divididas (por ejemplo una serie de dosis separadas por intervalos de días, semanas o meses), o en forma de liberación sostenida, dependiendo de factores tales como la naturaleza y extensión de síntomas, tipos de tratamiento concurrente y el efecto deseado. Otros regímenes o agentes terapéuticos pueden ser usados en unión con el presente invento.

El presente invento será ilustrado a continuación por el siguiente ejemplo, que no ha de ser considerado limitativo en ningún modo.

Ejemplos

Ejemplo 1

A partir del programa de descubrimiento de fármacos descrito aquí, compuestos conductores de varias clases químicas son hechos progresar a través de modelos *in vivo* de formación de memoria.

Descubrimiento de Fármacos

Dos principios básicos guían el programa de descubrimiento de fármacos. En primer lugar, se han buscado componentes activos que no mejoran la función de CREB en sí mismos sino después de la coestimulación con forskolina, un activador de adenilil ciclasa. Este requisito fue introducido para imitar los resultados de los experimentos con *Drosophila* originales: (1) la señalización de cAMP está implicada en la formación de memoria de la mosca y (2) se requiere entrenamiento para mejorar la formación de memoria cuando el activador de CREB es sobreexpresado. En segundo lugar, el CREB parece funcionar similarmente en neuronas de distintas especies vertebradas e invertebradas. Para capitalizar sobre esta conservación evolutiva, se desarrolló una vía de progresión de medicina que incluye ensayos con moscas, roedores y humanos.

Exploración Primaria

Una exploración de alto rendimiento (HTS), basada en células fue diseñada para evaluar los efectos de componentes sobre la función de la vía de CREB. Las células de neuroblastoma humano (SKN-MC) fueron "transfectadas" (transformadas) de forma estable con una construcción indicadora, en la que se colocó luciferasa bajo el control de un promotor de CRE. Con este indicador, se vigilaron los aumentos en la función de la vía de CREB mediante una salida fluorescente. Esta línea de células de ensayo fue evaluada completamente usando activadores de CREB conocidos.

Para evaluar la actividad del compuesto, la línea de ensayo fue previamente incubada en presencia de un compuesto y a continuación fue estimulada con una dosis subóptima de forskolina antes de la lisis. La concentración y el transcurso de tiempo para la coestimulación de forskolina fueron calibrados para obtener de modo reproducible el 30% de saturación, produciendo una gama de 300% para efectos del compuesto. Componentes que produjeron un aumento \geq del 100% en la señal de luciferasa sobre células de control estimuladas solo con forskolina fueron hechos progresar a una segunda ronda de exploración para excluir falsos positivos estadísticos. Finalmente, estos componentes fueron evaluados a cuatro concentraciones diferentes con o sin coestimulación de forskolina.

Hasta la fecha, se han explorado 155.000 compuestos con esta aproximación, produciendo aproximadamente 180 Activos Confirmados.

Exploraciones Secundarias

Ochenta y seis de los 180 Activos Confirmados fueron elegidos para otros análisis basados en su estructura y potencia. Para excluir cualesquiera efectos artificiales potenciales de la construcción de gen indicador, se usó el PCR cuantitativo en tiempo real (QPCR) para evaluar los niveles de expresión de gen endógeno dependiente de CREB conocido en la línea de ensayo. La mayoría de los activos confirmados mostraron perfiles de potencia comparables tanto para la expresión de gen indicador de luciferasa como para la expresión de gen endógeno. Un análisis estructural de estos 86 Activos Confirmados reveló que 10 están relacionados con la digitoxigenina, 26 derivados de feniletilamina,

4 derivados de aminopropanediol, 3 inhibidores de fosfodiesterasa y 3 análogos a la cafeína. Los 40 restantes fueron estructuras químicas nuevas con similitudes no obvias a otros componentes conocidos. De estos, 11 Golpes Activos fueron elegidos para otro estudio basado en la potencia, solubilidad y facilidad para derivar. Para estos 11 Golpes Activos, la mejora de la expresión de gen endógeno dependiente de CREB fue confirmada en neuronas primarias del hipocampo de ratas de laboratorio. Análisis funcionales (enzimático, de afinidad a la unión, etc.) han revelado que 8 son inhibidores de PDE IV y 2 a otras moléculas objetivo.

Ensayos in vivo

Los 11 Golpes Activos fueron alimentados a archivos transgénicos, que transportan un transgen de luciferaza-CRE. Experimentos anteriores habían establecido que: (1) la actividad de gen indicador podría ser cuantificada desde archivos únicos y (2) el indicador de CRE-luciferasa ha mostrado normalmente un ciclo circadiano de expresión (Belvin, M.P. y col., *Neuron*, 22(4):777-787 (1999)). Estas observaciones han revelado un inicio eficiente en ensayos *in vivo* con lo que determinar las concentraciones de medicina necesarias para afectar a la expresión de CRE-luciferasa en el tejido cerebral de moscas alimentadas con medicina. La totalidad de los 11 Candidatos Conductores produjeron un aumento significativo en los niveles de expresión de CRE-luciferasa *in vivo*. Uno de estos componentes fue probado *in vivo* por sus efectos sobre la formación de memoria olfativa de una mosca. Mostró una mejora parcial de la memoria después de un entrenamiento en masa y ningún efecto sobre la memoria después de entrenamiento espaciado - un resultado reminiscente de la firma de CREB.

Estos Golpes Activos han sido evaluados en modelos de roedor en vivo de formación de memoria. Para hacerlo eficientemente, se validó un nuevo protocolo de entrenamiento conductual, que lógicamente fue afectado por la modulación aguas arriba de la vía de CREB. Durante las etapas iniciales de adquisición, ensayos de entrenamiento repetidos llevaron a niveles de cAMP incrementados. En algún punto, los niveles de cAMP sobrepasan un umbral, y el PKA activado (subunidad catalítica) es trasladado al núcleo, dónde fosforilata el CREB directamente o produce un estado permisivo para la fosforilación de CREB por un cofactor. En este contexto, inhibidores de fosfodiesterasa (PDE) actúan para aumentar los niveles de cAMP más allá del umbral con menos ensayos de entrenamiento, produciendo por ello una memoria más duradera con un entrenamiento más débil. Usando el inhibidor de PDE prototípico, rolipram, este efecto fue establecido como se había predicho (Fig. 1).

Ejemplo 2

Método para Identificar Oligos Antisentido de CREB Funcional

Detección de CREB ARNm con el Ensayo de ADNb

Se obtuvieron células *Mus musculus* Neuro2a a partir de la Colección de Cultivo de Tipo Americano (ATCC, Cat. No. CCL-131; Manassas, VA). Las células fueron plateadas en un Medio Esencial Mínimo de Eagle Modificada (Medio esencial mínimo (Eagle) con 2 mM de L-glutamina y BSS de Earle ajustada para contener 1,5 g/L de bicarbonato de sodio, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, y 1,0 mM de piruvato de sodio al 90%; suero bovino fetal, 10%) en un formato de 96-micropocitos en 2×10^4 células por pocito. Las células fueron mantenidas a 37°C y 5% de CO₂ durante la noche antes de transfectar con oligonucleótidos de Ácido Nucleico Bloqueado (LNA) de CREB.

Las células fueron transfectadas usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) con modificaciones a los protocolos del fabricante. Para cada muestra de transfección, el oligonucleótido de LNA de CREB correspondiente (véase la secuencia a continuación) fue diluido con 25 μ l de medio de suero reducido Opti-MEM (tampón HEPES, 2.400 mg/L de bicarbonato de sodio, hipoxantina, timidina, piruvato de sodio, L-glutamina, elementos de traza, factores de crecimiento, y rojo de fenol reducido a 1,1 mg/L (Invitrogen) a una concentración de transfección final de 0,2 μ M. La Lipofectamina 2000 también fue diluida en 25 μ l de medio de suero reducido Opti-MEM así la relación de oligonucleótido de LNA (μ l) a Lipofectamina 2000 (μ l) fue de 1:3, respectivamente. El oligonucleótido de LNA diluido fue combinado con la Lipofectamina 2000 diluida e incubado durante 15 minutos a temperatura ambiente para los complejos a formar. Cincuenta μ l de complejos de oligonucleótido-Lipofectamina LNA 2000 fueron añadidos a cada pocito. Las transfecciones fueron realizadas por triplicado para cada oligonucleótido de LNA de CREB a 0,2 μ M. Las células fueron incubadas a 37° C y 5% de CO₂ durante 24 horas. El medio de crecimiento fue reemplazado después de 5 horas con 100 μ l de medio MEME.

La cuantificación directa de ARN mensajero de CREB (mRNA) que sigue a la transfección de oligos antisentido, fue detectada usando el Kit de Expresión Quantigene de acuerdo con el protocolo del fabricante (Bayer Corporation; Tarrytown, NY). Veinticuatro horas después de las transfecciones de oligonucleótido de LNA antisentido, las células fueron sometidas a lisis con 50 μ l de tampón de lisis (Bayer Corporation) que contiene los Extendedores de Captura (CE) específicos de CREB agrupados, Extendedores de Etiqueta (LE), y oligonucleótidos de bloqueo (BL) (descritos a continuación). Después de 30 minutos de incubación, 100 μ l de la mezcla de lisis desde cada pocito se añadieron a un pocito de captura correspondiente (Bayer Corporation). La placa de captura fue sellada con un Sellador de Placa respaldado con adhesivo (Bayer Corporation) e incubada durante la noche a 50°C. Los pocitos fueron lavados tres veces con 390 μ l de tampón de lavado (0,1 x SSC y 0,03% de Sulfato de Litio Laurilo) en un Lavador de Placas ELx405 (BioTek Instruments). 100 μ l de reactivo amplificador que contiene sonda de amplificador en 1:1000 en diluyente de sonda de amplificador/etiqueta (proporcionado por Bayer Corporation) fueron inmediatamente añadidos

ES 2 344 411 T3

a cada pocito de la placa de captura, sellado, e incubado a 50°C durante 60 minutos. Los pocitos fueron lavados tres veces con un tampón de lavado como se ha descrito antes y 100 µl de reactivo de etiquetado que contiene la sonda de etiqueta diluida al 1:1000 en el diluyente de sonda de amplificador/etiqueta (Bayer Corporation) fueron inmediatamente añadidos a cada pocito de la placa de captura. La placa de captura fue sellada e incubada a 50°C durante 60 minutos. Los pocitos fueron lavados tres veces con un tampón de lavado como se ha descrito antes y 100 µl de solución de trabajo de sustrato (0,003% de Sulfato de Litio Laurilo en Reactivo de Trabajo de Sustrato; Bayer Corporation) fueron inmediatamente añadidos a cada pocito de la placa de captura. La placa de captura fue sellada e incubada a 50°C durante 30 minutos. La luminiscencia de cada pocito fue medida en un luminómetro de placa de Wallac Victor²V (Perkin Elmer) a 45°C.

La fig. 3 muestra los efectos de distintos oligos de LNA antisentido de CREB diferente en niveles de ARN de CREB en 131 células Neuro2a a continuación de la transfección, con relación a células tratadas con control del vehículo (reactivo de transfección menos cualquier oligo). Cada oligo de LNA de CREB tiene una secuencia única (véase a continuación). Los oligos de LNB de CREB fueron numerados en el orden en que fueron designados. Los oligos de LNB de CREB que no fueron explorados (ensayados) porque no tenían propiedades apropiadas (por ejemplo, temperatura de fusión) cuando se analizaron (es decir, CREB 4, 10, 11, 13 y 14) no se han mostrado.

Los resultados demuestran que los oligos CREB1 y CREB17 reducen los niveles de CREB ARN endógeno en al menos un 50%.

El oligo CREB3 es una secuencia que ha sido usada previamente para golpear CREB ARN (como un oligo de fosforotioato) Los resultados aquí demuestran que el oligo CREB3 también reduce los niveles de CREB ARN endógeno, aunque a una concentración mayor (0,5 µM).

Diseño de Oligonucleótido de Ácido Nucleico Bloqueado de CREB

Los oligonucleótidos antisentido fueron diseñados para CREB usando la secuencia para GenBank Accession Number M95106 con el Vector NTI Suite 8 (InforMax, Frederick, MD). Las secuencias de los oligonucleótidos de Ácido Nucleico Bloqueado (LNA) (Proligo LLC, Boulder, CO) son resumidas a continuación:

1. CCTCCgCCgCgTCACTCA (SEQ ID NO.1)
2. CCACgTAACACACCgCgT (SEQ ID NO.2)
3. TggTCATTTAgTTACCggTg (SEQ ID NO.3)
4. gCTggTTgTCTgCACCAG (SEQ ID NO.4)
5. TTTTCAGCTTCTgTTACA (SEQ ID NO.5)
6. CTgggCTTgAACTgTCAT (SEQ ID NO.6)
7. gCTAATgTggCAATCTgT (SEQ ID NO.7)
8. TgCTggCATggATACCTg (SEQ ID NO.8)
9. gCAGATgATgTTgCATgA (SEQ ID NO.9)
10. TgTCTgCCCATTgggCAg (SEQ ID NO.10)
11. gggCCgCCTggATAACgCC (SEQ ID NO.11)
12. TTCACTTTCTgCAATAgT (SEQ ID NO.12)
13. TCCACAgACTCCTgTgAA (SEQ ID NO.13)
14. AAAggATTTCCCTTCgTT (SEQ ID NO.14)
15. CAgAAgATAAgTCATTCA (SEQ ID NO.15)
16. TTCTCAATCCTTggCAC (SEQ ID NO.16)
17. TggCACTgTTACAgTggT (SEQ ID NO.17)
18. CTgCCCCTgCTAgTTTg (SEQ ID NO.18)
19. gCTCCTCCgTCACTgCTT (SEQ ID NO.19)
20. TgCACTAAggTTACAgTg (SEQ ID NO.20)

ES 2 344 411 T3

Los oligonucleótidos de LNA individuales fueron suspendidos de nuevo en 1 x TE (10 mM de Tris HCl, pH 8,0 y 1 mM de EDTA, pH 8,0) a una concentración de 200 μ M.

Diseño de Sonda de ADN de CREB

5

Las sondas de oligonucleótidos fueron diseñadas para la captura y amplificación de señal del ARNm de CREB con Quantigene ProbeDesigner Software (Bayer Corporation). Las secuencias de oligonucleótidos (Integrated ADN Technologies Inc; Coralville, CA) son resumidas a continuación:

10

CE ggatttcacctcggttttgggTTTTctcttggaaagaaagt (SEQ ID NO.:21)

15

CE caatccttggcaccctgggtTTTTctcttggaaagaaagt (SEQ ID NO.:22)

CE agtctcctcttctgacttttcttcttTTTTctcttggaaagaaagt (SEQ ID NO.:23)

20

CE tcctccctgggtaaatggcaTTTTctcttggaaagaaagt (SEQ ID NO.:24)

CE ccattgtagccagctgtattgcTTTTctcttggaaagaaagt (SEQ ID NO.:25)

25

CE ccggctgagtggcagctgTTTTctcttggaaagaaagt (SEQ ID NO.:26)

CE gcctgaggcagcttgaacaTTTTctcttggaaagaaagt (SEQ ID NO.:27)

CE tgctgcttcttcagcaggctTTTTctcttggaaagaaagt (SEQ ID NO.:28)

30

CE ttagacggacctctctcttccgTTTTctcttggaaagaaagt (SEQ ID NO.:29)

35

LE gaatcttcactttctgcaatagttgaTTTITaggcataggaccctgtgtct (SEQ ID NO.:30)

LE aatcagttacactatccacagactcctgtTTTTTaggcataggaccctgtgtct (SEQ ID NO.:31)

40

LE atgtactgcccactgctagtttggaTTTTTaggcataggaccctgtgtct (SEQ ID NO.:32)

45

LE ggccctgtaccccatccgtaTTTTTaggcataggaccctgtgtct (SEQ ID NO.:33)

LE cattggtcatggttaatgtcigcaTTTTTaggcataggaccctgtgtct (SEQ ID NO.:34)

50

LE gtctgtgcatactgtagaatggtagtacTTTTTag9cataggaccctgtgtct (SEQ ID NO.:35)

55

LE agaatctgctgtccatccgtgTTTTTaggcataggaccctgtgtct (SEQ ID NO.:36)

60

LE gtgccaatctggtatgttgtacatcTTTTTaggcataggaccctgtgtct (SEQ ID NO.:37)

65

LE acgccataacaactccagggTTTTTaggcataggaccctgtgtct (SEQ ID NO.:38)

ES 2 344 411 T3

BL cctgtaggaaggcctccttgaaa (SEQ ID NO.:39)

BL gcatcagaagataagtcattcaaaatttt (SEQ ID NO.:40)

5 BL tggatgatggcaggggctga (SEQ ID NO.:41)

BL aatgggggttgccactgttacag (SEQ ID NO.:42)

BL acaacttggttgctgggcact (SEQ ID NO.:43)

10 BL gcaatgggtgctagtgggtgct (SEQ ID NO.:44)

BL gtgtaggaagtgctggggagg (SEQ ID NO.:45)

15 Las sondas de (CE), (LE) y (BL) individuales fueron suspendidas de nuevo en 1 x TE, pH 8,0 a una concentración de 100 pmoles/ μ l. Los grupos de ajuste de sonda objetivo específicos (CE), (LE), y (BL) fueron suspendidos de nuevo en 1 x TE a una concentración final de 50, 200 y 100 fmoles/ μ l respectivamente.

20 *Efecto de oligos de LNA antisentido de CREB en respuesta de CRE-Luci a forskolina + HT0712 en células SK-N-MC*

25 Células humanas SK-N-MC (véase Ejemplo 1), establemente transfectadas con una construcción indicadora que consiste del promotor VIP que contiene 2 elementos de CRE junto con 2 elementos de CRE adicionales a partir del gen de tirosina aminotransferasa que activa la expresión de luciferasa, fueron colocadas en un Medio de Eagle Modificado Iscoves (IMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA), con 2 mM de glutamina L, 0,2 mM de aminoácidos no esenciales, 0,1 mM de HEPES, 10% de suero bovino fetal a una densidad de 20.000 células por pocito en un formato de 96 pocitos por placa. Las células fueron mantenidas a 37°C, 5% de CO₂ durante la noche antes de la transfección con 0,2 μ M de oligonucleótidos antisentido de LNA de CREB. Los oligos de CREB funcional fueron identificados en la exploración de ADNb descrita anteriormente. Los oligos de LNA de CREB utilizados fueron:

30 CREB1: CCTCCgCCgCgTCACTCA (SEQ ID NO.:46)

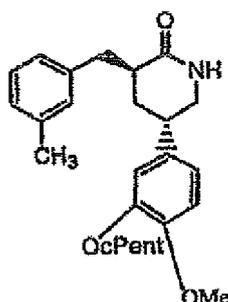
CREB3: CCACgTAACACACgCgT (SEQ ID NO.:47)

35 CREB17: TggCACTgTTACAgTggT (SEQ ID NO.:48)

40 Los oligos CREB 1 y CREB 3 tienen idéntica homología de secuencia tanto con ratón como con ser humano. El CREB 17 tiene una única diferencia de base. Los tres oligos de LNA han sido mostrados como funcionales en golpear hacia abajo los niveles de ARN de CREB humano en un ensayo de ADNb de CREB humano.

45 Las células fueron transfectadas con oligos de LNA de CREB humano usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) con modificaciones en el protocolo del fabricante. Para cada muestra de transfección, el oligonucleótido de LNA de CREB correspondiente (oligos 1, 3 y 17 de CREB) fue diluido con 25 μ l de medio de suero reducido de Opti-MEM (tampón HEPES, 2.400 mg/L de bicarbonato de sodio, hipoxantina, timidina, piruvato de sodio, L-glutamina, elementos de traza, factores de crecimiento, y rojo de fenol reducido a 1,1 mg/L; Invitrogen) a una concentración de transfección final de 0,2 μ M. La Lipofectamina 2000 fue también diluida en 25 μ l de medio de suero reducido de Opti-MEM de modo que la relación de oligonucleótido de LNA (μ l) a Lipofectamina 2000 (μ l) fue de 1:3 respectivamente. El oligonucleótido de LNA diluido fue combinado con la Lipofectamina 2000 diluida e incubado durante 15 minutos a temperatura ambiente para los complejos para formar. Se añadieron 50 μ l de complejos de oligonucleótido de LNA-Lipofectamina 2000 a cada pocito. Las células fueron incubadas a 37°C y 5% de CO₂ durante 16-24 horas. El medio de crecimiento fue reemplazado después de 5 horas con 100 μ l de medio de IMEM.

55 5 μ M de HT0712 ((3S, 5S)-5-(3-ciclopentiloxi-4-metoxi-fenil)-3-(3-metil-bencil)-piperidina-2-uno; también conocido como IPL 455.903)) fueron añadidos a las células transfectadas/tratadas con vehículo, e incubadas a 37°C, 5% de CO₂ durante 2 horas. El HT0712 tiene la siguiente fórmula:



ES 2 344 411 T3

en la que “Me” significa “metil” y “cPent” significa “ciclopentil”. El HT0712 puede ser preparado usando la metodología proporcionada en la patente norteamericana n° 6.458.829B1, cuyas enseñanzas están incorporadas aquí como referencia.

5

Se añadieron 2 μ M de forskolina, y las células fueron incubadas durante otras 6 horas, lavadas brevemente con PBS, tratadas mediante lisis en presencia de luciferina y la actividad de luciferasa medida usando un luminómetro 5 de Victor.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para identificar compuestos candidatos para mejorar la función de vía de CREB que comprende las operaciones de: a) poner en contacto células anfitrionas que comprenden un gen indicador enlazado operativamente a un promotor de CRE con un compuesto de ensayo y con una dosis subóptima de un agente estimulante de la función de CREB; b) determinar la actividad del indicador en células anfitrionas que han sido puestas en contacto con dicho compuesto de ensayo y con dicho agente estimulante de la función de CREB; c) comparar la actividad del indicador determinada en la operación b) con la actividad del indicador en células de control que han sido puestas en contacto con dicho agente estimulante de la función de CREB y que no han sido puestas en contacto con dicho compuesto de ensayo; d) seleccionar dicho compuesto de ensayo si: i) la actividad del indicador determinada en la operación b) ha aumentado con relación a la actividad del indicador en dichas células de control que han sido puestas en contacto con dicho agente estimulante de la función de CREB y que no han sido puestas en contacto con dicho compuesto de ensayo; y ii) la actividad del indicador en células de control que no han sido puestas en contacto con dicho agente estimulante de la función de CREB y que han sido puestas en contacto con el compuesto de ensayo no es diferente significativamente con relación a la actividad del indicador en células de control que no han sido puestas en contacto con dicho agente estimulante de la función de CREB y que no han sido puestas en contacto con dicho compuesto de ensayo; e) repetir las operaciones a) a d) con una gama o variedad de concentraciones diferentes de dicho compuesto de ensayo seleccionado en la operación d); y f) seleccionar dicho compuesto de ensayo si: i) la actividad del indicador ha aumentado en la gama de concentraciones diferentes para dicho compuesto de ensayo con relación a la actividad del indicador en dichas células de control que han sido puestas en contacto con dicho agente estimulante de la función de CREB y que no han sido puestas en contacto con dicho compuesto de ensayo; y ii) la actividad del indicador en células de control que no han sido puestas en contacto con dicho agente estimulante de la función de CREB y en las que ha sido introducida dicha gama de concentraciones diferentes de dicho compuesto de ensayo no es significativamente diferente con relación a la actividad del indicador en células de control que no han sido puestas en contacto con dicho agente estimulante de la función de CREB y que no han sido puestas en contacto con dicho compuesto de ensayo, en el que dicho compuesto de ensayo es identificado como un compuesto candidato para mejorar la función de vía de CREB, opcionalmente en el que dichas células anfitrionas son puestas en contacto con dicho compuesto de ensayo antes de hacer contacto con dicho agente estimulante de la función de CREB.

2. El método según la reivindicación 1ª, en el que a) dichas células anfitrionas son células de neuroblastoma humanas; y/o b) dicho gen indicador codifica luciferasa; y/o c) dicho agente estimulante de la función de CREB es forskolina.

35 3. El método según la reivindicación 1ª o 2ª en el que las operaciones a) a d) son repetidas con una gama de cuatro concentraciones diferentes de dicho compuesto de ensayo seleccionado en la operación d).

40 4. El método según la reivindicación 1ª, que comprende además las operaciones de: g) poner en contacto células de origen neural con dicho compuesto candidato y con una dosis subóptima de un agente estimulante de la función de CREB, en el que dichas células de origen neural son diferentes de las células anfitrionas de la operación a); h) evaluar la expresión de gen endógeno dependiente de CREB en dichas células que han sido puestas en contacto con dicho compuesto candidato y con dicho agente estimulante de la función de CREB; y i) comparar la expresión de gen endógeno dependiente de CREB evaluada en la operación h) con la expresión de gen endógeno dependiente de CREB en células de control que han sido puestas en contacto con dicho agente estimulante de la función de CREB y que no han sido puestas en contacto con dicho compuesto candidato, en el que una diferencia en la expresión de gen dependiente de CREB evaluada en la operación h) comparada con la expresión de gen dependiente de CREB en células de control confirma que dicho compuesto es un compuesto candidato para mejorar la función de vía de CREB, identificando por ello dicho compuesto candidato como un compuesto candidato confirmado, opcionalmente en el que dichas células de origen neural son puestas en contacto con dicho compuesto candidato antes de hacer contacto con el agente estimulante de la función de CREB.

55 5. El método según la reivindicación 4ª, en el que (a) dichas células de origen neural son neuronas, opcionalmente en el que dichas neuronas son células primarias del hipocampo; y/o (b) dicho agente estimulante de la función de la vía CREB es forskolina.

60 6. Un método para evaluar el efecto de un compuesto candidato sobre la expresión de gen dependiente de CREB para mejorar la función de vía de CREB que comprende las operaciones de: a) poner en contacto células de origen neural con un compuesto candidato y con una dosis subóptima de un agente estimulante de la función de CREB; b) evaluar la expresión de gen endógeno dependiente de CREB en las células que han sido puestas en contacto con dicho compuesto candidato y con dicho agente estimulante de la función de CREB; y c) comparar la expresión de gen endógeno dependiente de CREB evaluada en la operación b) con la expresión de gen endógeno dependiente de CREB en células de control que han sido puestas en contacto con dicho agente estimulante de la función de CREB y que no han sido puestas en contacto con dicho compuesto candidato, opcionalmente en el que dichas células de origen neural son puestas en contacto con dicho compuesto candidato antes de hacer contacto con dicho agente estimulante de la función de CREB.

ES 2 344 411 T3

7. El método según la reivindicación 6ª, en el que: (a) dichas células de origen neural son neuronas, opcionalmente en que dichas neuronas son células primarias del hipocampo; y/o (b) dicho agente estimulante de la función de la vía CREB es forskolina.

5 8. Un método para explorar detenidamente un compuesto para su capacidad de mejorar la función de vía de CREB que comprende las operaciones de: a) poner en contacto células anfitrionas que comprenden un gen indicador
enlazado operativamente a un promotor de CRE con un compuesto de ensayo, produciendo por ello una muestra de
ensayo; b) poner en contacto la muestra de ensayo producida en la operación a) con una dosis subóptima de un agente
estimulante de la función de CREB; c) determinar la actividad del indicador en dichas células anfitrionas que han
10 sido puestas en contacto con dicho compuesto de ensayo y con dicho agente estimulante de la función de CREB; (d)
comparar la actividad del indicador determinada en la operación c) con la actividad del indicador en células de control
que han sido puestas en contacto con dicho agente estimulante de la función de CREB y que no han sido puestas en
contacto con dicho compuesto de ensayo; e) seleccionar dicho compuesto de ensayo si: 1) la actividad del indicador
determinada en la operación c) ha aumentado con relación a la actividad del indicador en dichas células de control
15 que han sido puestas en contacto con dicho agente estimulante de la función de CREB y que no han sido puestas
en contacto con dicho compuesto de ensayo; y 2) la actividad del indicador en dichas células de control que no han
sido puestas en contacto con dicho agente estimulante de la función de CREB y que han sido puestas en contacto con
dicho compuesto de ensayo no es significativamente diferente con relación a la actividad del indicador en células de
control que no han sido puestas en contacto con dicho agente estimulante de la función de CREB y que no han sido
20 puestas en contacto con dicho compuesto de ensayo; f) repetir las operaciones a) a e) con una gama de diferentes
concentraciones de dicho compuesto de ensayo seleccionado en la operación e); g) seleccionar dicho compuesto de
ensayo si: 1) la actividad del indicador ha aumentado en la gama de concentraciones diferentes para dicho compuesto
de ensayo con relación a la actividad del indicador en dichas células de control que han sido puestas en contacto
con dicho agente estimulante de la función de CREB y que no han sido puestas en contacto con dicho compuesto de
25 ensayo; y 2) la actividad del indicador en células de control que no han sido puestas en contacto con dicho agente
estimulante de la función de CREB y en las que ha sido introducida dicha gama de concentraciones diferentes de
dicho compuesto de ensayo no es significativamente diferente con relación a la actividad del indicador en células
de control que no han sido puestas en contacto con dicho agente estimulante de la función de vía de CREB y que
no han sido puestas en contacto con dicho compuesto de ensayo, seleccionando por ello un compuesto candidato;
30 h) poner en contacto células de origen neural con dicho compuesto candidato seleccionado en la operación g) y
con una dosis subóptima de un agente estimulante de la función de CREB; i) evaluar la expresión de gen endógeno
dependiente de CREB en las células que han sido puestas en contacto con dicho compuesto candidato y con dicho
agente estimulante de la función de CREB; j) comparar la expresión de gen endógeno dependiente de CREB evaluada
en la operación i) con la expresión de gen endógeno dependiente de CREB en células de control que han sido puestas
35 en contacto con dicho agente estimulante de la función de CREB y que no han sido puestas en contacto con dicho
compuesto candidato; k) seleccionar dicho compuesto candidato si: 1) la expresión de gen endógeno dependiente de
CREB evaluada en la operación i) ha aumentado con relación a la expresión de gen endógeno dependiente de CREB
en células de control que han sido puestas en contacto con dicho agente estimulante de la función de CREB y que
no han sido puestas en contacto con dicho compuesto candidato; y 2) la expresión de gen endógeno dependiente de
40 CREB en células de control que no han sido puestas en contacto con dicho agente estimulante de la función de CREB
y que han sido puestas en contacto con dicho compuesto candidato no es significativamente diferente con relación a la
expresión de gen endógeno dependiente de CREB en células de control que no han sido puestas en contacto con dicho
agente estimulante de la función de CREB y que no han sido puestas en contacto con dicho compuesto candidato,
seleccionando por ello un compuesto candidato confirmado; l) administrar dicho compuesto candidato confirmado
45 seleccionado en la operación k) a un animal no humano (por ejemplo un mamífero); m) entrenar a dicho animal
al que se le ha administrado dicho compuesto candidato confirmado en condiciones apropiadas para producir una
formación de memoria a largo plazo en dicho animal; n) evaluar la formación de memoria a largo plazo en dicho
animal entrenado en la operación m); y o) comparar la formación de memoria a largo plazo evaluada en la operación
n) con dicha formación de memoria a largo plazo producida en el animal de control al que no se le ha administrado
50 dicho compuesto candidato confirmado.

9. El método según la reivindicación 8ª, en el que dichas células anfitrionas son células de neuroblastoma humanas
y dichas células de origen neural son neuronas, opcionalmente en las que dichas neuronas son células primarias del
hipocampo; y/o b) dicho gen indicador codifica luciferasa; y/o c) dicho agente estimulante de la función de CREB es
55 forskolina.

10. El método según la reivindicación 8ª o 9ª en el que las operaciones a) a e) son repetidas con una gama de cuatro
concentraciones diferentes de dicho compuesto de ensayo seleccionado en la operación e).

60

65

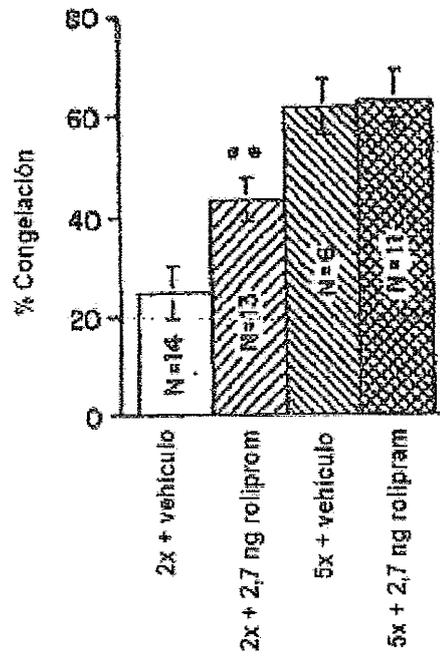


FIG. 1

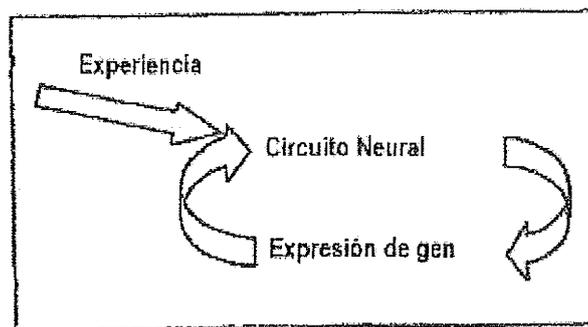


FIG. 2

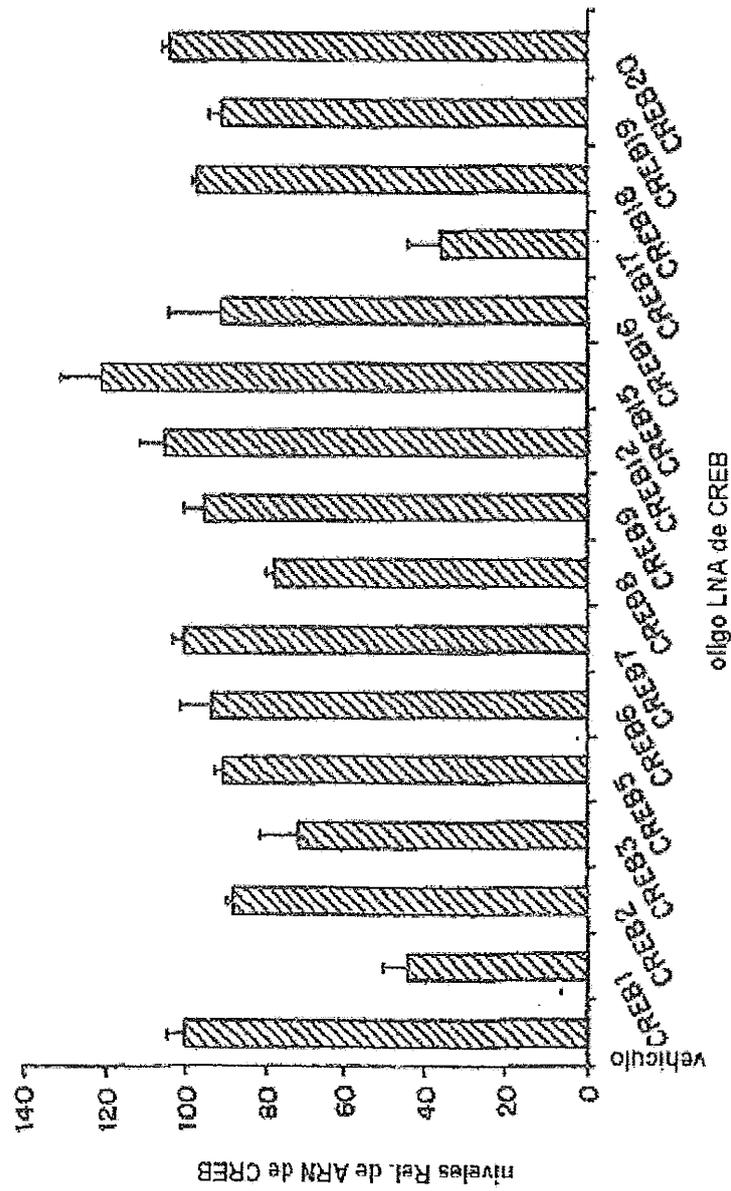


FIG. 3