



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 348 348**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08160783 .0**

96 Fecha de presentación : **13.08.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1982704**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.10.2008**

54 Título: **Nueva diana molecular de la neurotoxicidad.**

30 Prioridad: **14.08.2001 FR 01 10819**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.12.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.12.2010

73 Titular/es: **EXONHIT THERAPEUTICS S.A.**
63-65, boulevard Massena
75013 Paris, FR

72 Inventor/es: **Schweighoffer, Fabien;**
Ait Ikhlef, Ali y
Resink, Annelies

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

La presente invención se refiere al campo de la biología, la genética y la medicina. Se refiere especialmente a nuevos métodos para la detección, la caracterización y/o el tratamiento (o la gestión) de patologías neurodegenerativas, y particularmente de la esclerosis lateral amiotrófica. La invención describe asimismo métodos para la identificación o screening de compuestos activos en dichas patologías. La invención se refiere asimismo a los compuestos, genes, células, plásmidos o composiciones útiles para el empleo de dichos métodos. La invención resulta especialmente de la identificación del papel de la fosfodiesterasa 4B en estas patologías y describe su uso como diana o marcador terapéutico, diagnóstico o experimental de estos trastornos.

Se han descrito numerosas patologías neurodegenerativas que tienen un componente o una etapa ligado al fenómeno de la excitotoxicidad. Es el caso de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple y corea de Huntington.

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA o ALS por “Amyotrophic Lateral Sclerosis”) es una enfermedad neurodegenerativa asociada a diferentes tipos de inclusiones tales como cuerpos de Lewis y caracterizada por una apoptosis de las motoneuronas espinales y corticales cuyo resultado mortal está asociado a veces a una demencia frontal. Las formas esporádicas, sin ninguna mutación descrita, coexisten con las formas familiares (ELAF) asociadas a mutaciones en el gen SOD1 que codifica la superóxido dismutasa. La mayoría de casos son esporádicos, las formas familiares (ELAF) son muy raras. Es probable que un largo periodo asintomático preceda la aparición de síntomas clínicos, que son variados y cuya clasificación es compleja. Los futuros desarrollos terapéuticos sustituirán a los tratamientos de la sintomatología con estrategias basadas en las causas moleculares de la patología. Al nivel celular, estos síntomas están asociados a la muerte de motoneuronas corticales y motoneuronas espinales. Esta muerte neuronal se ha conectado con diferentes fenómenos que constituyen la base de varias patologías neurodegenerativas. Este es el caso de la excitotoxicidad ligada al glutamato, del estrés oxidativo, de una cierta autoinmunidad dirigida contra marcadores neuronales (los canales cálcicos en el caso de ELA), así como anomalías del citoesqueleto. Aunque estos fenómenos están descritos, la o las causas de estas enfermedades, entre ellas la ELA, son desconocidas. Aunque las ELAF están ligadas a mutaciones en el gen SOD1 que codifica la superóxido dismutasa, los mecanismos que comprometen a las neuronas a la muerte celular, de la que al menos un componente es la apoptosis, son desconocidos. Asimismo, el estudio de Block y Kosinski (Nervenartz 2001 72: 393-405) describe la implicación de los receptores del glutamato en distintas enfermedades neurodegenerativas, sin identificar las causas de la muerte de las motoneuronas en dichas patologías.

La identificación de los eventos moleculares implicados en los diferentes fenómenos implicados en la muerte celular permitirá establecer nuevas estrategias terapéuticas. El estudio de estos eventos es difícilmente realizable a partir de biopsias humanas. Estas biopsias proceden evidentemente de muestras post-mortem cuya calidad es difícilmente controlable y sólo representan estados patológicos representativos de fases tardías de la enfermedad.

Los modelos animales dan acceso a muestras biológicas que permiten analizar diferentes etapas del desarrollo de una patología y comparar estas etapas con sujetos sanos. A este respecto, están disponibles ratones transgénicos que expresan el gen humano SOD1 que porta una de las mutaciones prevalentes en ELAF (mutación G93A) en el Jackson Laboratory, a condición de una concesión de licencia de uso por la NorthWestern University. Este modelo reproduce en 120 días el resultado mortal de la enfermedad con síntomas comparables a los de la enfermedad humana. La aparición de síntomas de ELA ligados a la mutación G93A en SOD1 no es la consecuencia de una reducción de la actividad superóxido dismutasa, sino de una ampliación de función que aumenta la capacidad de la enzima de generar radicales libres. A pesar de estas informaciones, los eventos moleculares que presiden las diferentes etapas de la ELA son mal conocidos. La complejidad de estos eventos moleculares refleja la evolución de la patología: en el modelo transgénico estudiado, no se ha reseñado ninguna desregulación neuronal ni manifestación clínica a los 30 días. Los 60 días corresponden a una etapa que precede por poco a los primeros síntomas pero que se caracteriza ya a nivel cerebral por cambios en la fisiología celular tales como una alteración del metabolismo mitocondrial, un estrés y una muerte celular asociados a un fenómeno de excitotoxicidad. A los 90 días, el 50% de las motoneuronas corticales y espinales han muerto y se ha iniciado un proceso activo de apoptosis neuronal paralelamente a una activación astrocítica. El fenómeno de excitotoxicidad no se observa ya en esta etapa. La muerte neuronal está asociada a la activación de caspasas que no parecen implicadas en las fases tempranas de la patología.

Identificar los diferentes eventos moleculares específicos de las diferentes fases de la patología debe permitir identificar nuevas dianas terapéuticas así como nuevos marcadores diagnósticos. Uno de los enfoques más eficaces para realizar esta identificación consiste en identificar los genes y las proteínas cuya expresión caracteriza un estado fisiopatológico.

La presente invención describe ahora la identificación de eventos genéticos implicados en los fenómenos de excitotoxicidad y muerte neuronal. La presente invención proporciona así nuevos enfoques terapéuticos y diagnósticos de patologías asociadas a estos fenómenos, así como nuevas dianas para la identificación de compuestos activos.

Más particularmente, se ha efectuado un análisis cualitativo diferencial a partir de ARN extraídos de muestras de cerebro y de médula espinal, sin aislamiento previo de neuronas, con

el fin de tener en cuenta un máximo de eventos de corte y empalme alternativos ligados al desarrollo de la patología. Este análisis se ha efectuado mediante cribado diferencial cualitativo según la técnica DATAS (descrita en la solicitud nº WO99/46403), que presenta ventajas desiguales.

5 La presente solicitud de patente resulta especialmente de la construcción por el solicitante de un repertorio de alteraciones de corte y empalme en el cerebro de animales modelo de ELA de 60 días de edad. Este repertorio, que contiene más de 200 secuencias distintas, implica a actores clave del fenómeno de excitotoxicidad tales como los canales potásicos y el receptor de NMDA. Las secuencias derivadas de ARN que codifican las
10 proteínas implicadas en la respuesta al estrés, como las proteínas de choque térmico, forman parte igualmente de este repertorio, subrayando la implicación de esta respuesta en las fases tempranas de ELA. Una alteración del metabolismo energético parece afectar claramente a las motoneuronas corticales de los animales que desarrollan la patología. Por ejemplo, se aísla específicamente el intrón 6 de la forma mitocondrial de creatina cinasa a partir de ARN
15 mensajeros expresados en condiciones patológicas en animales de 60 días de edad. Esta interrupción de la secuencia de codificación por esta retención de intrón desemboca en un ARN mensajero que codifica una forma inactiva de la enzima. Esta observación está de acuerdo con las observaciones bioquímicas que han mostrado una disminución de la actividad creatina cinasa mitocondrial, correlacionada con una disminución de la cantidad de esta enzima en las
20 neuronas de animales del mismo modelo transgénico. La especificidad de las secuencias que constituyen este repertorio está atestiguada por el hecho de que el mismo análisis diferencial cualitativo de la expresión genética realizado en animales de 90 días de edad desemboca en un repertorio diferente del que están ausentes especialmente los diferentes marcadores de excitotoxicidad. El análisis de las modificaciones de corte y empalme confirma que los eventos
25 moleculares son diferentes según la etapa de la patología.

De manera particularmente interesante e inesperada, la realización de DATAS sobre ARN de animales de control y transgénicos de 60 días de edad ha permitido aislar un fragmento de ADNc derivado de ARNm de fosfodiesterasa 4B. Este fragmento corresponde a un fragmento de exón presente específicamente en los animales de control y que se elimina
30 específicamente en los animales transgénicos de SOD1G93A en la etapa de 60 días. Este fragmento abarca los nucleótidos 377 a 486 referidos a partir del codón de paro de PDE4B de ratón (SEC ID Nº 1) (secuencia igualmente accesible en GenBank, nº AF208023). Esta secuencia comprende 2912 bases, correspondiendo el fragmento eliminado a las bases 2760 a 2869. Esta región no codificante se expresa diferencialmente entre los animales de control y los
35 animales transgénicos, debido al uso alternativo de un exón 3' no codificante o debido al uso

de dos sitios de poliadenilación alternativos. Esta expresión diferencial se ha puesto en evidencia mediante experimentos de PCR TI presentados en las figuras 1A y 1B.

La presente solicitud demuestra por tanto la implicación de la fosfodiesterasa 4B en el desarrollo de los procesos de excitotoxicidad y muerte neuronal. Los resultados obtenidos muestran una expresión más pronunciada de PDE4B en los tejidos nerviosos patológicos, ligada a una modificación estructural del ARN correspondiente, especialmente a la delección de una región en la parte 3' no codificante. Este resultado es absolutamente compatible con la presencia de secuencias de desestabilización del ARNm en la secuencia identificada por DATAS. Su delección del ARNm de PDE4B mediante corte y empalme o mediante el uso de secuencias de poliadenilación alternativas puede desembocar en una estabilización, por tanto un aumento de la expresión de la parte codificante de este ARN. Este evento se produce específicamente en el cerebro de sujetos patológicos y no en sujetos de control. La presente invención describe por tanto un evento molecular original que desemboca en un aumento de la expresión del ARNm de PDE4B en el cerebro de sujetos patológicos y que está correlacionado en el tiempo con el fenómeno de excitotoxicidad y/o muerte neuronal. La invención muestra igualmente, por primera vez, que un aumento de la expresión de PDE4B está asociado a las etapas tempranas de ELA. La PDE4B constituye por tanto una diana terapéutica nueva e importante en el desarrollo de terapias de estas patologías, utilizables especialmente en fases tempranas de su desarrollo, y que se dirigen a las verdaderas bases moleculares de la patología y no a los síntomas o componentes inflamatorios asociados. La invención describe igualmente nuevos procedimientos de diagnóstico, cribado, detección, determinación de una predisposición o seguimiento de la evolución o de la eficacia del tratamiento de estas patologías.

Detección, diagnóstico y cribado

La presente invención describe por tanto un procedimiento de detección de una situación de excitotoxicidad o de estrés neuronal en un sujeto, que comprende la medida *in vitro* de la expresión de fosfodiesterasa 4, especialmente de fosfodiesterasa 4B, en una muestra procedente del sujeto. El procedimiento comprende ventajosamente una medida de la expresión diferencial de la región 3' no codificante del gen de PDE4B y del resto del gen, especialmente de la parte codificante.

La invención describe por tanto un procedimiento de detección de una situación de excitotoxicidad o de estrés neuronal en un sujeto, que comprende la detección de la presencia de una forma mutada de ARN de fosfodiesterasa 4, especialmente de fosfodiesterasa 4B, en una muestra procedente del sujeto, particularmente de una forma con delección total o parcial de la región 3' no codificante.

La invención divulga igualmente el uso de un ácido nucleico que comprende toda o parte de una secuencia derivada del gen o del ARN mensajero de PDE4B para el empleo de un procedimiento de diagnóstico o de detección de una situación de estrés neuronal y más particularmente de la situación de excitotoxicidad.

La invención se basa, en general, en el uso de un ácido nucleico complementario de todo o parte del gen o del mensajero de PDE4B para la detección de eventos patológicos de tipo excitotoxicidad, estrés o muerte neuronal, etc. Más generalmente, la invención se fundamenta en un procedimiento de diagnóstico, cribado, caracterización o seguimiento de una patología degenerativa, que comprende la puesta en evidencia de una alteración en el gen de PDE4 o en el ARN correspondiente, típicamente de PDE4B.

La expresión de PDE4, o la expresión diferencial, o la presencia de una forma alterada pueden determinarse mediante técnicas convencionales de biología molecular como, por ejemplo, mediante secuenciación, hibridación, amplificación, PCR-TI, migración en gel, etc. La invención es aplicable al diagnóstico o la detección de diferentes patologías que implican fenómenos de excitotoxicidad, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, ELA, corea de Huntington o isquemia cerebral. Puede usarse para la detección precoz, la puesta en evidencia de una predisposición, la elección y adaptación de un tratamiento, el seguimiento de la evolución de la patología, etc. Está particularmente adaptada a la detección en una etapa temprana de esclerosis múltiple o ELA.

Para el empleo de los procedimientos genéticos de diagnóstico o de detección según la invención, se usan más particularmente ácidos nucleicos capaces de poner en evidencia una forma de ARNm de PDE4B con delección, especialmente una forma desprovista de toda o parte de la región 3' no codificante. A modo de ejemplo específico, se usa un ácido nucleico complementario de toda o parte de la región comprendida entre los residuos 2760 a 2869 de la secuencia SEC ID N° 1, o de los residuos correspondientes a la secuencia del gen o del ARNm de PDE4B humana. La secuencia de ADNc que codifica la PDE4B humana y de la proteína correspondiente se representan en las secuencias SEC ID N° 3 y 4 (véase igualmente Genbank, n° NM_002600). La región 3' no codificante del ARN o del gen de PDE4B humana corresponde a los residuos 2461 a 4068 de la SEC ID N° 3.

Ventajosamente, el ácido nucleico usado (como sonda) comprende toda o parte de la secuencia codificante de la región 3' no codificante del gen o del ARN de PDE4B comprendida entre los nucleótidos 2384 y 2869 de la secuencia SEC ID N° 1 o entre los nucleótidos 2461 y 4068 de la secuencia SEC ID N° 3, o una secuencia complementaria de las mismas.

La invención describe asimismo el uso de un ácido nucleico complementario de una región comprendida en una de las siguientes secuencias:

- residuos 2384 a 2869 de la SEC ID N° 1
- residuos 2500 a 2869 de la SEC ID N° 1
- residuos 2760 a 2869 de la SEC ID N° 1
- residuos 2780 a 2850 de la SEC ID N° 1
- 5 - residuos 2790 a 2810 de la SEC ID N° 1
- residuos 2600 a 4040 de la SEC ID N° 3
- residuos 3000 a 4040 de la SEC ID N° 3
- residuos 3500 a 4040 de la SEC ID N° 3
- residuos 3900 a 4040 de la SEC ID N° 3.

10 La invención describe asimismo el uso de un ácido nucleico complementario de la secuencia de la región de ARN de PDE4 resultante de la delección de toda o parte de la parte 3' no codificante. La eliminación de un dominio crea efectivamente nuevas uniones en la secuencia, que son específicas de la forma con delección y pueden usarse para poner en evidencia la presencia de dicha forma en una muestra.

15 La complementariedad entre la sonda y la secuencia diana es preferiblemente perfecta para asegurar una mejor especificidad de hibridación. Sin embargo, se entiende que pueden tolerarse ciertos desapareamientos. El ácido nucleico usado para el empleo de los procedimientos anteriores puede ser un ADN o un ARN, preferiblemente un ADN de origen sintético. Comprende preferiblemente de 10 a 500 bases, típicamente de 10 a 100 bases. Se
20 entiende que puede usarse un ácido nucleico más largo, si se desea, aunque no sea preferible. El ácido nucleico es ventajosamente un ADN monocatenario de 10 a 500 bases, complementario de una región al menos de la secuencia 3' no codificante de PDE4B. El ácido nucleico puede estar marcado, por ejemplo, por vía radiactiva, enzimática, luminiscente, fluorescente, química, etc.

25 Otro enfoque para detectar la presencia de una alteración del gen de PDE4 usa un cebador o un par de cebadores nucleicos que permiten una amplificación selectiva de una porción del ARN de PDE4, preferiblemente que comprende una porción de la región 3' no codificante. Se usa típicamente un cebador que permite la amplificación selectiva de la forma alterada del ARN de PDE4, especialmente un cebador específico de la unión creada por la
30 eliminación de parte de la región 3' del ARN.

A este respecto, la invención describe un cebador complementario de una parte de la región 3' no codificante de PDE4B y que permite la amplificación de una parte de esta región. El cebador comprende ventajosamente de 8 a 20 bases. Está compuesto preferiblemente por un fragmento de 8 a 20 residuos consecutivos de la secuencia comprendida entre los
35 nucleótidos 2384 y 2869 de la secuencia SEC ID N° 1 o entre los nucleótidos 2461 y 4068 de la

secuencia SEC ID N° 3 o de una secuencia complementaria de las mismas. La invención describe un par de cebadores que permiten la amplificación específica de una parte al menos de la región 3' no codificante de PDE4, comprendiendo dicho par al menos un cebador tal como se define anteriormente.

5 Para el empleo de los procedimientos descritos en la invención, se pone en contacto *in vitro* una muestra biológica de un sujeto, que contiene un ácido nucleico, con un ácido nucleico (sonda, cebador, etc.) tal como se define anteriormente, y se detecta la formación de un híbrido o de un producto de amplificación. La muestra biológica puede ser una muestra de sangre, fluido, célula, tejido, etc. El ácido nucleico puede estar inmovilizado sobre un soporte de tipo
10 vidrio, sílice, nailon, etc.

 El procedimiento de detección, cribado o diagnóstico puede emplearse a partir de diferentes tipos de muestras procedentes de un sujeto como, por ejemplo, biopsias de tejidos, especialmente de tejido nervioso. De manera particularmente sorprendente y ventajosa, la presente invención muestra además que la desregulación de la expresión de PDE4,
15 correlacionada con el fenómeno de excitotoxicidad, puede ponerse en evidencia directamente en el tejido muscular. Esto es particularmente notable en el caso de patologías neurodegenerativas tales como ELA.

 En el transcurso del desarrollo de ELA, los fenómenos degenerativos se producen no sólo en el cerebro, sino igualmente en la médula espinal, y en consecuencia en el músculo por
20 falta de innervación. La figura 2 presenta las modificaciones de expresión del ARNm de PDE4B en músculos de ratones de control y transgénicos, seguidas usando los mismos cebadores de PCR que en el estudio del ARN de cerebros de estos mismos animales. De forma análoga, aunque menos pronunciada, se observa una disminución de la expresión de la región 3' no codificante de PDE4B, y no del resto del este ARNm (especialmente la parte codificante),
25 específicamente en el músculo de animales al final de la fase presintomática, es decir, de 90 días de edad.

 Una de las dificultades encontradas en los estudios y los tratamientos de ELA es la dificultad de establecer un diagnóstico precoz. Esta observación de desregulación del ARNm de PDE4B en el músculo de ELA permite proponer un diagnóstico precoz a partir de biopsias
30 musculares de pacientes. Este diagnóstico está basado en la detección de la expresión diferencial de la región 3' no codificante y del resto de la secuencia, especialmente codificante, de PDE4B.

 Un procedimiento particular de detección de una situación de estrés neuronal, especialmente de excitotoxicidad, ligada particularmente a una patología neurodegenerativa en
35 un sujeto, comprende la medida de la expresión del gen de PDE4B, o de la presencia de

formas con delección del mensajero de PDE4B, en una muestra de células musculares procedentes de dicho sujeto.

Para medir la expresión diferencial, se usa por ejemplo una sonda correspondiente a (es decir, específica de) una parte de la región 3' no codificante y una sonda correspondiente a una parte de la región codificante de PDE4B. La señal detectada con cualquiera de estas sondas permite evaluar el diferencial de expresión. Otro enfoque usa dos pares de cebadores que permiten la amplificación de una porción de la región 3' no codificante por un lado y de una parte de la región codificante por otro lado.

La presente invención divulga igualmente un kit para el análisis de la expresión de PDE4, especialmente de la expresión diferencial entre la región 3' no codificante y la región codificante, comprendiendo el kit una sonda nucleotídica específica de una parte de la secuencia de la región 3' no codificante y una sonda nucleotídica específica de una parte de la secuencia de la región codificante.

La presente invención divulga igualmente un kit para el análisis de la expresión de PDE4, especialmente de la expresión diferencial entre la región 3' no codificante y la región codificante, comprendiendo el kit un par de cebadores nucleotídicos que permiten la amplificación específica de una parte al menos de la región 3' no codificante de PDE4 y un par de cebadores nucleotídicos que permiten la amplificación específica de una parte al menos de la región codificante de PDE4.

Terapia

Las fosfodiesterasas hidrolizan los ácidos nucleicos cíclicos tales como AMPc y GMPc, regulando diferentes cascadas de señalización. La PDE4B hidroliza el AMPc, regulando así la concentración intracelular de este segundo mensajero. La implicación del AMPc en el equilibrio que existe entre la viabilidad celular y la apoptosis está bien descrita en la bibliografía. Especialmente, la cascada de AMPc está bien integrada en las cascadas de supervivencia celular que implican a cinasas tales como Akt y P13K, así como en la regulación de la actividad del factor de transcripción CREB. Ha de observarse que este factor de transcripción está implicado en la supervivencia neuronal y el crecimiento de neuritas. Sin embargo, el uso de inhibidores de PDE y ventajosamente de PDE4 no se ha propuesto nunca para mejorar la viabilidad neuronal y más particularmente su protección contra la excitotoxicidad. Los inhibidores de PDE4, desarrollados para inhibir los fenómenos inflamatorios, se han sugerido como potencialmente útiles en patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer. Esta sugerencia se apoya en la voluntad de reducir las inflamaciones que se observan en el cerebro en el transcurso de los procesos neurodegenerativos y no en un razonamiento enfocado a inhibir directamente la muerte neuronal.

La presente invención muestra la existencia de eventos de corte y empalme o de sitios de poliadenilación alternativos que afectan al gen de PDE4, asociados al desarrollo de la excitotoxicidad neuronal, y proporciona la base molecular que justifica el uso de inhibidores de PDE4 para el tratamiento de ELA y más generalmente para mejorar la viabilidad neuronal en los fenómenos de excitotoxicidad, particularmente desde las fases tempranas de estas patologías.

Un objeto de la invención reside por lo tanto en el uso tal como se identifica en la reivindicación 1 o 2.

Otro objeto de la invención se basa en el uso de un compuesto capaz de inhibir o reducir la expresión o la actividad de PDE4B, para la preparación de una composición destinada al tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, especialmente en fase temprana, más preferiblemente para reducir la excitotoxicidad neuronal temprana asociada a las enfermedades neurodegenerativas tales como ELA, Alzheimer o Parkinson.

La invención describe asimismo el uso de un inhibidor de PDE4B para la preparación de una composición destinada al tratamiento de ELA, especialmente para reducir la excitotoxicidad en sujetos aquejados de ELA o para aumentar la supervivencia neuronal en sujetos aquejados de ELA.

La invención describe asimismo el uso de un compuesto capaz de inhibir (preferiblemente de manera selectiva) la expresión o la actividad de PDE4B de secuencia SEC ID N° 2 ó 4 para la preparación de una composición destinada a reducir la excitotoxicidad neuronal.

La invención describe asimismo un procedimiento de tratamiento de una patología asociada a un estrés neuronal, especialmente a una excitotoxicidad, que comprende la administración a un sujeto de un compuesto inhibidor de la actividad o de la expresión de PDE4B, preferiblemente un compuesto inhibidor selectivo de PDE4.

La invención describe asimismo un procedimiento de tratamiento de ELA, especialmente en un procedimiento para aumentar la supervivencia de neuronas en pacientes aquejados de ELA, que comprende la administración a un sujeto de un inhibidor de PDE4, preferiblemente un compuesto inhibidor selectivo de PDE4.

En el contexto de la invención, el término “tratamiento” designa el tratamiento preventivo, curativo, paliativo así como la gestión de pacientes (reducción del sufrimiento, mejora de la duración de vida, ralentización de la progresión de la enfermedad), etc. El tratamiento puede realizarse además en combinación con otros agentes o tratamientos, especialmente dirigidos a los eventos tardíos de la patología, tales como inhibidores de caspasas u otros compuestos activos.

El compuesto utilizado puede ser cualquier compuesto capaz de inhibir la expresión de PDE4, especialmente PDE4B, es decir en particular cualquier compuesto que inhiba la transcripción del gen, la maduración de los ARNs, la traducción del ARNm, la modificación post-traducciona

5 modificación del ARN, especialmente la delección de una parte de la región 3' no codificante.

El compuesto puede ser especialmente un ácido nucleico antisentido, capaz de inhibir la transcripción del gen de PDE4B o la traducción del mensajero correspondiente. El ácido nucleico antisentido puede incluir toda o parte de la secuencia del gen de PDE4B, un fragmento de la misma, del mensajero de PDE4B, o de una secuencia complementaria de éstas. El antisentido puede incluir especialmente una región complementaria de la secuencia incluida entre los residuos 218-2383 de SEC ID N° 1 o 766-2460 de SEC ID N° 3, e inhibir (o reducir) su traducción en proteína. El antisentido puede ser un ADN, un ARN, una ribozima, etc. Puede ser monocatenario o bicatenario. Puede tratarse asimismo de un ARN codificado por un gen antisentido. Tratándose de un oligonucleótido antisentido, incluye típicamente

10 menos de 100 bases, por ejemplo del orden de 10 a 50 bases. Este oligonucleótido puede modificarse para mejorar su estabilidad, su resistencia a las nucleasas, su penetración celular, etc.

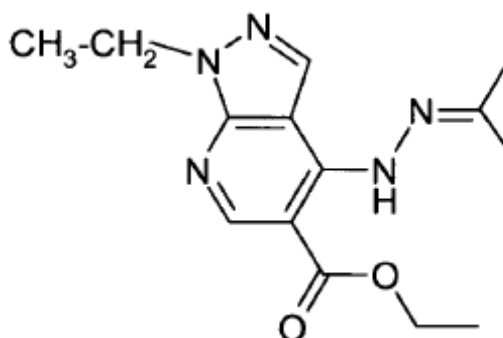
El compuesto puede ser asimismo un péptido, por ejemplo que incluya una región de la proteína PDE4 (especialmente PDE4B) y capaz de antagonizar su actividad.

Según un modo de realización, el compuesto es un compuesto químico, de origen natural o sintético, especialmente una molécula orgánica o inorgánica, de origen vegetal, bacteriano, vírico, animal, eucariota, sintético o semi-sintético, capaz de modular la expresión o la actividad de PDE4B.

En una variante preferida, se utiliza un compuesto de síntesis, inhibidor de PDE4. Se pueden emplear distintos tipos de inhibidores. Se trata preferiblemente de compuestos de la familia de las pirazolopiridinas, entre las que figuran especialmente el etazolato, o de compuestos de la familia de los derivados de xantina (o 2,6-dioxopurina), entre los que figura especialmente la pentoxifilina.

Los compuestos de la familia de las pirazolopiridinas se seleccionan particularmente entre los compuestos siguientes:

El etazolato de fórmula siguiente:



éster etílico del ácido 4-butilamino-1-etil-6-metil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico (tracazolato),

éster etílico del ácido 4-butilamino-1-etil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

5 1-(4-aminopirazolo[3,4-*b*]piridin-1-il)- β -D-1-desoxirribofuranosa,

éster etílico del ácido 1-etil-4-(*N*-isopropilidenhidrazino)-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico (SQ 20009),

4-amino-6-metil-1-*n*-pentil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina,

10 éster etílico del ácido 4-amino-1-etil-6-metil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico (tracacolato de desbutilo),

4-amino-1-pentil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxamida,

éster etílico del ácido 1-etil-6-metil-4-metilamino-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

éster etílico del ácido 4-amino-6-metil-1-propil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

éster etílico del ácido 1-etil-4-etilamino-6-metil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

15 éster etílico del ácido 4-amino-1-butil-6-metil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

5-(4-aminopirazolo[3,4-*b*]piridin-1-il)-2-hidroximetiltetrahydrofuran-3-ol,

éster alílico del ácido 1-alil-4-amino-6-metil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

éster etílico del ácido 4-amino-1-etil-3,6-dimetil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

20 éster etílico del ácido 4-dimetilamino-1-etil-6-metil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

éster etílico del ácido 1-etil-6-metil-4-propilamino-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

éster etílico del ácido 4-amino-1-pentil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

éster etílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pent-4-inil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

25 4-amino-1-but-3-enil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-alilamida,

4-amino-1-pentil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-isopropilamida,

4-amino-1-pentil-*N*-*n*-propil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxamida,

éster alílico del ácido 4-amino-1-butil-6-metil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

éster etílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pent-3-inil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-

carboxílico,

4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-prop-2-inilamida,

éster alílico del ácido 4-amino-1-(3-metilbutil)-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-*N*-(2-propenil)carboxamida,

5 éster alílico del ácido 4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-butilamida,

éster alílico del ácido 4-amino-1-but-3-inil-6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

éster alílico del ácido 4-amino-1-but-3-enil-6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-alilamida,

10 éster alílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

éster alílico del ácido 4-amino-6-metil-1-(3-metilbutil)-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

éster isobutílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-butilamida,

15 éster alílico del ácido 4-amino-6-metil-1-(3-metilbut-2-enil)-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-ciclopropilamida,

4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-hidroxamato de etilo,

éster prop-2-inílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-

20 carboxílico,

éster alílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pent-4-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

éster alílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pent-4-enil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

25 4-amino-1-pent-3-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-propilamida,

4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-ciclopropilmetilamida,

éster 2-metilalílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

4-amino-1-pent-3-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-alilamida (ICI 190.622),

30 4-amino-1-pent-4-inil-*N*-2-propenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxamida,

4-amino-1-pent-3-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-prop-2-inilamida,

4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-but-2-inilamida,

éster alílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pent-3-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

35 éster alílico del ácido 4-amino-1-(2-ciclopropiletil)-6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-

carboxílico,

éster alílico del ácido 4-amino-1-hex-5-inil-6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
4-amino-1-pent-3-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-ciclopropilmetilamida,

éster but-3-enílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-
5 carboxílico,

éster ciclopropilmetílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-
carboxílico,

4-butilamino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-alilamida,

éster 2-ciclopropiletílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-
10 carboxílico,

éster ciclopropilmetílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pent-3-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-
5-carboxílico,

éster ciclopropilmetílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pent-4-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-
5-carboxílico,

éster etílico del ácido 4-amino-1-bencil-6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-bencilamida,

4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-fenilamida,

éster bencílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

4-azido-1- β -D-ribofuranosilpirazolo[3,4-*b*]piridina,

1-pent-3-inil-*N*-2-propenil-4-propionamido-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxamida,

2-(4-aminopirazolo[3,4-*b*]piridin-1-il)-5-hidroximetiltetrahidrofurano-3,4-diol,

2-(6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-ilamino)etanol,

3-(6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-ilamino)propan-1-ol,

éster propílico del ácido 3-(6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-ilamino)acético,

éster etílico del ácido 2-(6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-ilamino)propiónico,

éster etílico del ácido 2-(6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-ilamino)pentanoico,

éster etílico del ácido 2-(6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-ilamino)benzoico,

éster propílico del ácido 3-(6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-ilamino)pentanoico,

N-benciliden-*N'*-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)hidrazina,

N-furan-2-ilmetilen-*N'*-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)hidrazina,

N-(4-fluorobenciliden)-*N'*-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)hidrazina,

N-(3-furan-2-ilaliliden)-*N'*-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)hidrazina,

N-(4-metoxibenciliden)-*N'*-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)hidrazina,

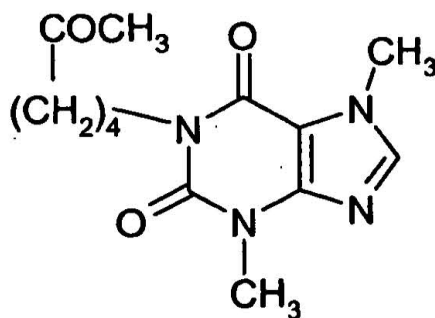
4-[(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)hidrazonometil]-benzonitrilo,

N-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetilen-*N'*-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)hidrazina,

N-(3-metil-1-fenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)-*N*-(4-nitrobenciliden)-hidrazina,
N-(3-metil-1-fenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)-*N*-(2-nitrobenciliden)-hidrazina,
N-(3-metil-1-fenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)-*N*-(4-trifluorometil-benciliden)hidrazina,
N-(3-metil-1-fenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)-*N*-(5-nitrofuran-2-ilmetilen)hidrazina,
5 *N*-(3-metil-1-fenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)-*N*-(2-trifluorometil-benciliden)hidrazina,
N-(3-metil-1-fenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)-*N*-(6-nitrobenzo[1,3]-dioxol-5-ilmetilen)hidrazina,
ácido 4-(3-cloro-4-metoxibencilamino)-1-etil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
4-(3-cloro-4-metoxibencilamino)-1-etil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-(piridin-4-ilmetil)amida,
10 4-(3-cloro-4-metoxibencilamino)-1-etil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-(tetrahidrofuran-2-ilmetil)amida,
4-(3-cloro-4-metoxibencilamino)-1-etil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-(5-hidroxipentil)amida,
4-(3-cloro-4-metoxibencilamino)-1-etil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-[3-(2-oxopirrolidin-1-il)propil]amida,
15 éster etílico del ácido 4-*terc*-butilamino-1-(2-cloro-2-feniletíl)-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
éster etílico del ácido 1-(2-cloro-2-feniletíl)-4-ciclopropilamino-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
éster etílico del ácido 1-(2-cloro-2-feniletíl)-4-propilamino-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-
20 carboxílico,
éster etílico del ácido 1-(2-cloro-2-feniletíl)-4-fenilamino-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
éster etílico del ácido 4-butilamino-1-(2-cloro-2-feniletíl)-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
25 éster etílico del ácido 1-(2-cloro-2-feniletíl)-4-(2-etoxietilamino)-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
éster etílico del ácido 4-bencilamino-1-(2-cloro-2-feniletíl)-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
éster etílico del ácido 1-(2-cloro-2-feniletíl)-4-fenetilamino-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-
30 carboxílico,
Entre los derivados de xantina, se utilizan en particular (i) los (ω -1)-hidroxialquil-dialquilxantina en el que el grupo (ω -1)-hidroxialquilo contiene 5 o 6 átomos de carbono y está en posición 1 o 7, el grupo alquilo en la otra posición 7 o 1 contiene de 1 a 12 átomos de carbono y el grupo alquilo en posición 3 contiene de 1 a 4 átomos de carbono, (ii) los (ω -1)-
35 oxoalquil-dimetilxantina en el que el grupo (ω -1)-oxoalquilo contiene 5 o 6 átomos de carbono y

está en posición 1 o 7, o (iii) los derivados de dimetilxantina que tienen un grupo alquilo que contiene de 4 a 12 átomos de carbono o un grupo bencilo en posición 1 o 7. Típicamente, las oxoalquil-dialquilxantinas incluyen por ejemplo los 1-(5-oxohexilo)-3,7- y 7-(5-oxohexilo)-1,3-dimetilxantinas. Se pueden utilizar asimismo otras xantinas, especialmente las 3,7-dimetilxantinas y 1,3-dimetilxantinas sustituidas por un grupo butilo, isoamilo, hexilo, laurilo o bencilo en posición 1 o 7, así como los homólogos de dichos compuestos con un grupo hidroxilo u oxo en posición (ω -1)-posición, p. ej. las 1-(4-hidroxipentilo)- y 1-(5-hidroxihexilo)-3,7-dimetilxantinas, 7-(4-hidroxipentilo)- y 7-(5-hidroxihexilo)-1,3-dimetilxantinas, 1-(4-oxopentilo)-, 1-(5-oxohexilo)-, 1-(2-metil-3-oxobutilo) y 1-(2-etil-3-oxobutilo)-3,7-dimetilxantinas y los compuestos 1,3-dimetilo correspondientes que presentan el grupo (ω -1)-hidroxialquilo o (ω -1)-oxoalquilo en posición 7. Los homólogos de las hidroxialquil-dimetilxantinas mencionadas anteriormente son aquellos que presentan en posición 1 o 7, no ocupada por un grupo hidroxialquilo, en lugar de un grupo metilo, un grupo alquilo con de 2 a 12 átomos de carbono, como 1-etilo-, 1-propilo-, 1-butilo- y 1-isobutil-3-metil-7-(5-hidroxihexilo)-xantinas y 7-etilo-, 7-propilo-, 7-butilo- y 7-isobutilo-1-(5-hidroxihexilo)-3-metilxantinas, y los compuestos correspondientes que presentan en lugar del radical metilo en posición un grupo alquilo de 2 a 4 átomos de carbono, especialmente un radical etilo, n-propilo, isopropilo, isobutilo o n-butilo.

Entre dichos derivados de xantina, se utiliza especialmente la pentoxifilina de fórmula siguiente:



La presente invención propone por tanto, por primera vez, a la PDE4B como diana terapéutica para el tratamiento de eventos moleculares asociados a la excitotoxicidad. Según los modos de empleo particulares, la invención puede usarse para inhibir o reducir la excitotoxicidad neuronal en fase temprana de enfermedades neurodegenerativas. Es aplicable especialmente al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple, la ELA, la corea de Huntington o la isquemia cerebral.

La invención describe asimismo:

- el uso de los compuestos indicados anteriormente, particularmente de etazolato o la

pentoxifilina, para el tratamiento de ELA, especialmente para reducir la excitotoxicidad neuronal temprana de ELA, o

- el uso de los compuestos indicados anteriormente, particularmente de la pentoxifilina o el etazolato, para la preparación de una composición destinada a inhibir la actividad de PDE4B en pacientes aquejados de ELA.

La invención se refiere igualmente a procedimientos de tratamiento de ELA que comprenden la administración de un compuesto que inhibe selectivamente la expresión o actividad de PDE4B de secuencia SEC ID Nº 2 ó 4. Preferiblemente, se usan los procedimientos de la invención para el tratamiento en fase temprana de enfermedades neurodegenerativas.

La administración puede realizarse mediante cualquier procedimiento conocido por el experto en la técnica, preferiblemente por vía oral o por inyección, típicamente por vía intraperitoneal, intracerebral, intravenosa, intraarterial o intramuscular. Se prefiere la administración por vía oral. Las dosis administradas pueden adaptarse por el experto en la técnica. Típicamente, se inyectan aproximadamente de 0,01 mg a 100 mg/kg para los compuestos inhibidores de naturaleza química. Para los compuestos nucleicos, las dosis pueden variar, por ejemplo, entre 0,01 mg y 100 mg por dosis. Se entiende que puede realizarse inyecciones repetidas, eventualmente en combinación con otros agentes activos o cualquier vehículo aceptable en el plano farmacéutico (por ejemplo, tampones, disoluciones salinas, isotónicas, en presencia de agentes estabilizantes, etc.).

La invención es utilizable en mamíferos, especialmente en el ser humano. Los resultados presentados en los ejemplos ilustran la eficacia de inhibidores de PDE4B para mejorar la viabilidad de neuronas dispuestas en condiciones de excitotoxicidad.

Procedimientos de selección y herramientas

La invención describe también procedimientos de selección, identificación o caracterización de compuestos activos sobre las patologías asociadas a la excitotoxicidad, o al estrés neuronal, que comprenden la puesta en contacto de compuestos de ensayo con una célula que expresa PDE4B (especialmente, una variante desprovista del dominio 3' no codificante) y la puesta en evidencia de compuestos que inhiben la expresión o la actividad de esta proteína.

Los procedimientos pueden emplearse con diferentes poblaciones celulares tales como células primarias o líneas de células de origen mamífero (humano, murino, etc.). Se usan ventajosamente células que no expresan naturalmente la PDE4B, transfectadas con un ácido nucleico que codifica la variante deseada. De esta manera, aumenta la selectividad del procedimiento. Se pueden usar igualmente células eucarióticas inferiores (levadura, etc.) o

células procarióticas.

Los procedimientos de cribado pueden realizarse igualmente en un sistema acelular, mediante la medida de la capacidad de los compuestos de ensayo de ligarse a PDE4B o una variante o fragmento de la misma.

5 La invención describe igualmente, cualquier ácido nucleico que codifique un polipéptido tal como se define anteriormente, a los vectores que lo contienen, células recombinantes y usos. Los vectores pueden ser plásmidos, fagos, cósmidos, virus, cromosomas artificiales, etc. Son vectores preferidos, por ejemplo, vectores plasmídicos, como aquellos derivados de plásmidos comerciales (pUC, pcDNA, pBR, etc.). Dichos vectores comprenden ventajosamente
10 un gen de selección y/o un origen de replicación y/o un promotor transcripcional. Son otros vectores particulares, por ejemplo, virus o fagos, especialmente virus recombinantes defectivos de replicación tales como virus derivados de retrovirus, adenovirus, AAV, herpesvirus, baculovirus, etc. Los vectores pueden usarse en cualquier hospedador competente como, por ejemplo, células procarióticas o eucarióticas. Puede tratarse de bacterias (por ejemplo *E. coli*),
15 levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces* o *Kluyveromyces*), células vegetales, células de insectos, células de mamíferos, especialmente humanas, etc. Puede tratarse de líneas, células primarias, cultivos mixtos, etc.

Aparecerán otros aspectos y ventajas de la presente invención tras la lectura de los ejemplos siguientes, que deben considerarse ilustrativos y no limitativos.

20 **LEYENDA DE LAS FIGURAS**

Figura 1: PCR semicuantitativa de PDE4B a partir de muestras de cerebro (1A) y de músculo (1B).

Figura 2: La pentoxifilina protege a las neuronas primarias de gránulos cerebelosos de la excitotoxicidad inducida por el cainato.

25 Figura 3: La pentoxifilina protege a las neuronas primarias de gránulos cerebelosos de la excitotoxicidad inducida por NMDA/serina.

Figura 4: Efecto neuroprotector del etazolato sobre la toxicidad inducida por NMDA/serina sobre células granulares del cerebelo.

30 Figura 5: Efecto neuroprotector del etazolato sobre la toxicidad inducida por cainato sobre células granulares del cerebelo.

Figura 6: Efecto neuroprotector de la pentoxifilina sobre la toxicidad inducida por NMDA/serina sobre neuronas corticales.

Figura 7: Efecto neuroprotector de la pentoxifilina sobre la toxicidad inducida por cainato sobre neuronas corticales.

35 Figura 8: Efecto neuroprotector del etazolato sobre la toxicidad inducida por

NDMA/serina sobre neuronas corticales.

Figura 9: Efecto neuroprotector del etazolato sobre la toxicidad inducida por cainato sobre neuronas corticales.

Figura 10: Efecto neuroprotector del 8-bromo-AMPC sobre la toxicidad inducida por NDMA/serina sobre células granulares del cerebelo.

Figura 11: Efecto neuroprotector del 8-bromo-AMPC sobre la toxicidad inducida por cainato sobre células granulares del cerebelo.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Identificación de PDE4 como diana molecular de la excitotoxicidad

Se ha efectuado el análisis cualitativo diferencial a partir de ARN poliadenilados (poli A+) extraídos de muestras de cerebros de animales correspondientes a las diferentes etapas, sin aislamiento previo de neuronas con el fin de tener en cuenta el máximo de eventos de corte y empalme alternativos ligados al desarrollo de la patología.

Se preparan los ARN poli A+ según técnicas conocidas por el experto en la técnica. Puede tratarse particularmente de un tratamiento mediante agentes caotrópicos tales como tiocianato de guanidinio seguido de una extracción del ARN total mediante disolventes (fenol, cloroformo, por ejemplo). Dichos procedimientos son bien conocidos por el experto en la técnica (véanse Maniatis *et al.*, Chomczynski *et al.*, Anal. Biochem. 162 (1987) 156), y pueden practicarse fácilmente usando kits disponibles comercialmente. A partir de estos ARN totales, se preparan los ARN poli A+ según procedimientos clásicos conocidos por el experto en la técnica y propuestos por kit comerciales.

Estos ARN poli A+ sirven de matriz a reacciones de transcripción inversa con la ayuda de transcriptasa inversa. Ventajosamente, se usan transcriptasas inversas desprovistas de actividad ARNasa H, que permiten obtener las primeras cadenas de ADN complementario de tamaños superiores a los obtenidos con transcriptasas inversas clásicas. Dichas preparaciones de transcriptasas inversas sin actividad ARNasa H están disponibles comercialmente.

Para cada punto de la cinética de desarrollo de la patología (30 días, 60 días y 90 días), se preparan ARN poli A+ así como ADNc monocatenarios a partir de animales transgénicos (T) y animales de control singénicos (C).

Según la técnica DATAS, para cada punto de la cinética se realizan hibridaciones de ARNm (C) con ADNc (T) e hibridaciones recíprocas de ARNm (T) con ADNc (C).

Estos heterodúplex de ARNm/ADNc se purifican a continuación según los protocolos de la técnica DATAS.

Las secuencias de ARN no apareadas con un ADN complementario se liberan de estos heterodúplex bajo la acción de la ARNasa H, degradando esta enzima las secuencias de ARN

apareadas. Estas secuencias no apareadas representan las diferencias cualitativas que existen entre los ARN por lo demás homólogos entre sí. Estas diferencias cualitativas pueden localizarse en cualquier lugar sobre la secuencia de ARN, tanto en 5', 3' o en el interior de la secuencia, y especialmente en la secuencia codificante. Según su localización, estas secuencias pueden ser no sólo modificaciones de corte y empalme, sino igualmente consecuencias de translocaciones o deleciones.

Las secuencias de ARN que representan las diferencias cualitativas se clonan a continuación según técnicas conocidas por el experto en la técnica y especialmente aquellas descritas en la patente de la técnica DATAS.

Estas secuencias se reagrupan dentro de los bancos de ADNc que constituyen los bancos cualitativos diferenciales. Uno de estos bancos contiene los exones y los intrones específicos de la situación sana; los otros bancos contienen los eventos de corte y empalme característicos de condiciones patológicas.

Se ha verificado la expresión diferencial de clones mediante hibridación con sondas obtenidas mediante transcripción inversa a partir de ARN mensajeros extraídos de las diferentes situaciones estudiadas. Los clones que hibridan de forma diferencial se han retenido para análisis posterior. Las secuencias identificadas por DATAS corresponden a intrones y/o a exones expresados de forma diferencial mediante corte y empalme entre las situaciones patológicas y la situación sana. Estos eventos de corte y empalme pueden ser específicos de una etapa dada del desarrollo de la patología o característicos del estado sano.

La comparación de estas secuencias con los bancos de datos permite clasificar las informaciones obtenidas y proponer una selección razonada de secuencias según su interés diagnóstico o terapéutico.

La realización de DATAS sobre ARN de animales de control y transgénicos de 60 días de edad ha permitido aislar un fragmento de ADNc derivado de ARNm de fosfodiesterasa 4B. Este fragmento corresponde a un fragmento de exón presente específicamente en los animales de control y por tanto específicamente eliminado en los animales transgénicos de SOD1 G93A en la etapa de 60 días. Este fragmento abarca los nucleótidos 377 a 486 referidos a partir del codón de paro de PDE4B de ratón (SEC ID Nº 1). Esta secuencia comprende 2912 bases, correspondiendo el fragmento eliminado a las bases 2760 a 2869. Esta región es no codificante y se expresa diferencialmente entre los animales de control y los animales transgénicos, debido al uso alternativo de un exón 3' no codificante o debido al uso de dos sitios de poliadenilación alternativos.

Ejemplo 2: Experimentos de PCR-TI: confirmación de la expresión diferencial:

Se ha verificado la expresión diferencial de PDE4B en una situación de estrés neuronal,

con relación a una situación de referencia, mediante los experimentos de PCR-TI presentados en la figura 1.

Estos experimentos se han realizado según técnicas bien conocidas por el experto en la técnica y han permitido seguir las expresiones de dos regiones distintas del ARNm de PDE4B.

5 Una de estas regiones abarca el codón de inicio de este ARNm (PDE4B 5'), el otro abarca en parte el fragmento identificado según la técnica DATAS (PDE4B DATAS). Las localizaciones de los cebadores de PCR usados se indican en la figura 1.

10 El ARN PO corresponde a un ARN ribosómico usado como control interno destinado a verificar que se usa la misma cantidad de ARN para cada punto experimental. Los análisis se han realizado a partir de ARN extraídos de animales de control (C) y transgénicos (T) de 30, 60 y 90 días de edad, es decir, antes de la aparición de síntomas patológicos.

15 Los ARN totales de cerebro de ratones de control o SOD1 G93A de 30, 60 y 90 días de edad se transcriben a ADNc usando el protocolo estándar de Superscript™ (Invitrogen). Para las PCR semicuantitativas, se diluyen 10 veces los productos de reacción de transcripción inversa. Los cebadores específicos del fragmento DATAS corresponden para el sentido a los nucleótidos 2526-2545 (5' GCC AGG CCG TGA AGC AAA TA 3'; SEC ID Nº 5), y para el antisentido a los 2790-2807 (5' TCA AAG ACG CGA AAA CAT 3'; SEC ID Nº 6), y para el fragmento más en 3' los cebadores corresponden para el sentido a los nucleótidos 145-165 (5' CCG CGT CAG TGC CTT TGC TAT 3'; SEC ID Nº 7), y para el antisentido a los 426-404 (5' 20 CGC TGT CGG ATG CTT TTA TTC AC 3'; SEC ID Nº 8). Como gen de referencia, se usa el gen PO y se amplifica mediante los cebadores, con sentido: 5' TCG CTT TCT GGA GGG TGT C 3' (SEC ID Nº 9) y antisentido: CCG CAG GGG CAG CAG TGG 3' (SEC ID Nº 10). La amplificación se efectúa mediante los 30 ciclos de PCR siguientes:

- 30 segundos a 94 °C
- 25 - un minuto a 57 °C
- 30 segundos a 72 °C, seguido de un ciclo de 2 minutos a 72°C.

Se ponen los diferentes productos de PCR sobre un gel de agarosa al 1,5%. Se repite el experimento tres veces con dos reacciones de transcripción inversa diferentes.

30 La figura 1 presenta los resultados obtenidos a partir de ARN extraídos de cerebros o de músculos de animales. Aunque que se amplifica la misma cantidad de ADNc a partir del ARN de PO en todas las muestras, se observan variaciones para el ARNm de PDE4B: se detectan las variaciones más significativas en los animales de 90 días de edad; aunque se observa un aumento del nivel de expresión del fragmento PDE4 5' en el cerebro de animales transgénicos, se observa una muy fuerte disminución de la expresión de PDE4B (DATAS) en el 35 cerebro de animales transgénicos.

Este resultado establece una correlación entre la disminución de la expresión de un fragmento 3' no codificante del ARNm de PDE4B y el aumento de la expresión de la parte 5' codificante de este mismo mensajero. Este resultado es absolutamente compatible con la presencia de secuencias de desestabilización de ARNm en la secuencia identificada por DATAS y demuestra la correlación entre la expresión de PDE4B y el fenómeno de excitotoxicidad.

Ejemplo 3: Inhibición de la excitotoxicidad mediante inhibidores de PDE4

Para este ejemplo, se han puesto en cultivo neuronas granulares de cerebelo de rata así como neuronas corticales según técnicas conocidas por el experto en la técnica.

Cultivo primario de células granulares de cerebelo:

Se decapitan ratas Wistar de 7 días de edad y se disecan sus cerebelos. Después de extirpar las meninges, se corta el tejido en pequeños trozos y se tripsiniza durante 15 minutos a 37°C. Se disocian las células mediante trituración y se ponen en cultivos a una densidad de 300.000 células por cm² en medio basal Eagle suplementado con 10% de suero fetal de ternero y glutamina 2 mM. Al día siguiente, se añade ARA-C 10 µM, un antimicótico, para impedir la proliferación de células gliales. Se tratan las células el día 9 de cultivo con los inhibidores de fosfodiesterasa, pentoxifilina y etazolato tres horas antes de la adición de los tóxicos cainato 50 µM o N-metil-D-asparato 100 µM en presencia de D-serina 10 µM. Se añade 8-bromo-AMPC justo antes de los tóxicos. Se efectúan todos los tratamientos como mínimo por duplicado y en al menos dos cultivos diferentes. Después de una incubación de seis horas, se mide la toxicidad mediante un ensayo MTT. Los resultados, normalizados a la media de no tratado, se analizan estadísticamente mediante el test de Wilcoxon. Se determina el valor significativo a p inferior o igual a 0,05.

Cultivos primarios de células corticales:

Se extirpan embriones de rata Wistar de 16 días de edad y se disecan los córtex. Después de la tripsinación a 37°C durante 25 minutos, se disocian las células mediante trituración. Se siembran las células en medio esencial mínimo suplementado con 10% de suero equino y 10% de suero fetal bovino y glutamina 2 mM a una densidad de 300.000 células por cm². Después de 4 días de cultivo, se cambia la mitad del medio por medio esencial mínimo suplementado con 5% de suero equino y glutamina 2 mM. El mismo día, se añaden 10 µM de 5-fluoro-2-desoxiuridina, un antimetabólico. Después de siete y once días de cultivo, se cambia la mitad del medio por medio acondicionado. El medio acondicionado está compuesto por MEM que contiene 5% de suero equino y glutamina 2 mM; este medio se pasa por una capa de astrocitos corticales durante una noche antes de su uso. El día 14, se tratan las células con los inhibidores de fosfodiesterasa, pentoxifilina y etazolato, una hora antes de la adición de los

tóxicos cainato 50 μ M o N-metil-D-aspartato 20 μ M en presencia de D-serina 10 μ M. Todos los tratamientos se efectúan como mínimo por duplicado y en al menos dos cultivos diferentes. Después de una incubación de seis horas, se mide la toxicidad mediante un ensayo MTT. Se analizan estadísticamente los resultados, normalizados a la media de no tratado, mediante el test de Wilcoxon. Se determina el valor significativo a p inferior o igual a 0,05.

MTT:

Se mide la toxicidad usando el ensayo MTT. Después de incubación con los compuestos, se añade MTT a una concentración final de 0,5 mg/ml por pocillo. Se incuban a continuación las placas durante 30 minutos a 37°C en la oscuridad. Se aspira el medio y se resuspenden los cristales en 500 μ l de DMSO (dimetilsulfóxido). Se lee la absorbancia a 550 nm y se calcula el porcentaje de viabilidad.

Resultados:

Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 2-10. Estos resultados ilustran el efecto protector de los compuestos de la invención sobre la supervivencia neuronal. En caso de cotratamiento de neuronas con un inhibidor de PDE4, se observa un efecto protector dependiente de la dosis en los dos modos de inducción de la excitotoxicidad (NDMA/serina y cainato). Se observa dicho efecto protector con la ayuda de pentoxifilina y etazolato.

Las figuras 2 y 3 presentan los resultados obtenidos con la ayuda de pentoxifilina sobre las células granulares del cerebelo. Los resultados presentados muestran que la pentoxifilina permite conseguir en las células un efecto protector de un 43% en el caso de tratamiento con NMDA/serina, y de un 33% en el caso de la toxicidad inducida por cainato.

Las figuras 4 y 5 presentan los resultados obtenidos con la ayuda del etazolato sobre las células granulares del cerebelo. Los resultados presentados muestran que el etazolato permite conseguir en estas células un efecto protector de un 60% en el caso de tratamiento con NMDA/serina y de un 57% en el caso de toxicidad inducida por cainato.

Las figuras 6 y 7 presentan los resultados obtenidos con la ayuda de pentoxifilina sobre las neuronas corticales. Los resultados presentados muestran que la pentoxifilina permite conseguir en las células un efecto protector de un 50% en el caso de tratamiento con NMDA/Ser, y de un 66% en el caso de toxicidad inducida por cainato.

Las figuras 8 y 9 presentan los resultados obtenidos con la ayuda del etazolato sobre las neuronas corticales. Los resultados presentados muestran que el etazolato permite conseguir en las células un efecto protector de un 33% en el caso de tratamiento con NDMA/Ser, y de un 25% en el caso de toxicidad inducida por cainato.

La pertinencia de estas protecciones está atestiguada por los % de protección obtenidos por concentraciones crecientes de AMPc, sustrato de PDE, dados a modo de ejemplo para

células granulares del cerebelo en las figuras 10 y 11. Estos % son de 40% para el tratamiento con NMDA/serina y de 40% para el tratamiento con cainato.

La presente invención documenta por tanto no sólo la implicación de PDE4B en los mecanismos de excitotoxicidad, especialmente en un modelo de ELA, sino igualmente la capacidad de inhibidores de PDE4 de conservar la viabilidad neuronal en caso de estrés ligado a la excitotoxicidad.

Ejemplo 4: Uso clínico en el hombre

Este ejemplo describe las condiciones de un uso clínico humano de un inhibidor de PDE4 en el tratamiento de ELA. Este ejemplo ilustra el potencial terapéutico de la invención y sus condiciones de aplicación al ser humano.

En este ensayo clínico, el tratamiento está basado en una combinación de pentoxifilina y riluzol. La dosis de pentoxifilina usada es de 400 mg por administración, en forma de tres tomas diarias, es decir una dosis diaria total de 1.200 mg. La pentoxifilina se usa en forma de comprimidos. El ensayo es multicéntrico y se realiza con doble ciego frente a placebo en 400 pacientes. Los pacientes incluidos en el ensayo son hombres o mujeres de 18 a 80 años de edad, aquejados de ELA esporádica o familiar, y bajo tratamiento con riluzol (50 mg dos veces al día) desde hace 3 meses al menos. El tratamiento con pentoxifilina se prevé con una duración de 18 meses.

Se mide principalmente la eficacia por las tasas de supervivencia de los pacientes, la calidad de vida y los ensayos musculares.

Otros aspectos y aplicaciones de la invención se basan en:

- el uso de toda o parte de una secuencia derivada de ARN mensajero de PDE4B con fines de diagnóstico o cribado o de caracterización de patologías neurodegenerativas que tienen un componente o una etapa ligado al fenómeno de excitotoxicidad, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, corea de Huntington, ELA o isquemia cerebral;
- el uso de cualquier fragmento de ácido nucleico incluido en el ARN antisentido con el objeto de inhibir la expresión de PDE4B en pacientes aquejados de dichas patologías;
- el uso de cualquier compuesto químico, especialmente pentoxifilina o etazolato o de cualquier composición farmacéutica que los contenga, con el objeto de inhibir la actividad de PDE4B en pacientes aquejados de dichas patologías;
- el uso de toda o parte de una secuencia derivada de ARN mensajero de PDE4B con fines de caracterización del tejido y de la situación isquémica.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Exonhit Therapeutics

<120> Nueva diana molecular de la neurotoxicidad

<130> B0100EPPC2

<140>

<141>

5 <160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2912

<212> ADN

10 <213> ratón

<220>

<221> CDS

<222> (218)..(2383)

<400> 1

aaaggcagcc tgataaagct ccttgtgaca ggctgtcttg ccagtctccc agtatgctcc 60

tcttgctctg aagtgtcca ggattgaaac cacagcttcc caaattagcc tgggaagagt 120

gtgoggaccc agcagccttt taaccgcggt cagtgccttt gctatgttca agactgctgt 180

tttggatggg gaatgctagc tagcactcca tcgagac atg aca gca aaa aat tct 235

Met Thr Ala Lys Asn Ser

1

5

cca aaa gaa ttt act gct tcg gaa tct gag gtt tgc ata aag act ttc 283

Pro Lys Glu Phe Thr Ala Ser Glu Ser Glu Val Cys Ile Lys Thr Phe

10

15

20

aag gag cag atg cgc ttg gaa ctt gag ctt cca aag cta cca gga aac 331

Lys Glu Gln Met Arg Leu Glu Leu Glu Leu Pro Lys Leu Pro Gly Asn

25

30

35

aga cct aca tct ccc aaa att tct cca cgc agt tca cca agg aat tca 379

Arg Pro Thr Ser Pro Lys Ile Ser Pro Arg Ser Ser Pro Arg Asn Ser

40

45

50

15 cca tgc ttt ttc aga aag ttg ctg gtg aat aaa agc atc cga cag cgg 427

Ser Glu Met	Ser Arg	Ser Gly	Asn Gln	Val Ser	Glu Tyr	Ile Ser	Asn	
250			255			260		
acg ttc tta gac aag cag aac gat gtg gaa atc cca tct ccc acg cag	1051							
Thr Phe Leu Asp Lys Gln Asn Asp Val Glu Ile Pro Ser Pro Thr Gln								
265		270		275				
aag gac agg gag aag aag aag aag cag cag ctc atg acc cag ata agt	1099							
Lys Asp Arg Glu Lys Lys Lys Lys Gln Gln Leu Met Thr Gln Ile Ser								
280		285		290				
gga gtg aag aaa ctg atg cac agc tca agc ctg aac aac aca agc atc	1147							
Gly Val Lys Lys Leu Met His Ser Ser Ser Leu Asn Asn Thr Ser Ile								
295		300		305		310		
tca cgc ttc ggg atc aac acg gaa aat gag gat cat cta gcc aag gag	1195							
Ser Arg Phe Gly Ile Asn Thr Glu Asn Glu Asp His Leu Ala Lys Glu								
		315		320		325		
ctg gaa gac ctg aac aaa tgg ggc ctt aac atc ttc aat gtg gct ggg	1243							
Leu Glu Asp Leu Asn Lys Trp Gly Leu Asn Ile Phe Asn Val Ala Gly								
		330		335		340		
tac tca cat aat cgg ccc ctt acg tgc atc atg tat gca ata ttc cag	1291							
Tyr Ser His Asn Arg Pro Leu Thr Cys Ile Met Tyr Ala Ile Phe Gln								
		345		350		355		
gaa aga gac ctt ctg aag acg ttt aaa atc tca tct gac acc ttt gta	1339							
Glu Arg Asp Leu Leu Lys Thr Phe Lys Ile Ser Ser Asp Thr Phe Val								
		360		365		370		
acc tac atg atg act tta gaa gac cat tac cat tct gat gtg gca tat	1387							
Thr Tyr Met Met Thr Leu Glu Asp His Tyr His Ser Asp Val Ala Tyr								
375		380		385		390		
cac aac agc ctg cat gct gct gac gtg gcc cag tca act cac gtt ctc	1435							
His Asn Ser Leu His Ala Ala Asp Val Ala Gln Ser Thr His Val Leu								
		395		400		405		
ctt tct acg ccg gca ctg gat gct gtc ttc aca gac ctg gaa atc ctg	1483							
Leu Ser Thr Pro Ala Leu Asp Ala Val Phe Thr Asp Leu Glu Ile Leu								
		410		415		420		
gct gcc att ttt gca gct gcc atc cat gat gtc gat cat cct gga gtc	1531							
Ala Ala Ile Phe Ala Ala Ala Ile His Asp Val Asp His Pro Gly Val								
		425		430		435		
tcc aat cag ttt ctc atc aat aca aat tct gaa ctt gct ttg atg tat	1579							

Ser Asn Gln Phe Leu Ile Asn Thr Asn Ser Glu Leu Ala Leu Met Tyr	
440	445 450
aat gat gaa tct gtt ctg gaa aac cat cac ctt gct gtg gga ttc aaa	1627
Asn Asp Glu Ser Val Leu Glu Asn His His Leu Ala Val Gly Phe Lys	
455	460 465 470
ttg cta caa gag gaa cac tgc gac atc ttt cag aat ctt acc aag aag	1675
Leu Leu Gln Glu Glu His Cys Asp Ile Phe Gln Asn Leu Thr Lys Lys	
475	480 485
caa cgc cag aca ctc agg aaa atg gtg att gac atg gtg ttg gca act	1723
Gln Arg Gln Thr Leu Arg Lys Met Val Ile Asp Met Val Leu Ala Thr	
490	495 500
gat atg tcc aaa cac atg agc ctc ctg gca gac ctt aaa aca atg gta	1771
Asp Met Ser Lys His Met Ser Leu Leu Ala Asp Leu Lys Thr Met Val	
505	510 515
gaa acc aag aag gtg aca agc tcc ggt gtt ctc ctc ctg gac aac tat	1819
Glu Thr Lys Lys Val Thr Ser Ser Gly Val Leu Leu Leu Asp Asn Tyr	
520	525 530
act gac cgg ata cag gtt ctt cgc aac atg gta cac tgt gca gac ctg	1867
Thr Asp Arg Ile Gln Val Leu Arg Asn Met Val His Cys Ala Asp Leu	
535	540 545 550
agc aac ccc acc aag tcc ttg gaa ttg tat cgg caa tgg acc gat cgt	1915
Ser Asn Pro Thr Lys Ser Leu Glu Leu Tyr Arg Gln Trp Thr Asp Arg	
555	560 565
atc atg gag gag ttt ttc cag cag gga gac aaa gaa cgg gag agg gga	1963
Ile Met Glu Glu Phe Phe Gln Gln Gly Asp Lys Glu Arg Glu Arg Gly	
570	575 580
atg gag att agc cca atg tgt gat aag cac aca gct tct gtg gaa aaa	2011
Met Glu Ile Ser Pro Met Cys Asp Lys His Thr Ala Ser Val Glu Lys	
585	590 595
tcc cag gtt ggt ttc att gac tac att gtc cat cca ctg tgg gag acc	2059
Ser Gln Val Gly Phe Ile Asp Tyr Ile Val His Pro Leu Trp Glu Thr	
600	605 610
tgg gca gac ctg gtt caa ccg gat gct caa gat att ctg gat aca cta	2107
Trp Ala Asp Leu Val Gln Pro Asp Ala Gln Asp Ile Leu Asp Thr Leu	
615	620 625 630
gaa gat aac agg aac tgg tac cag agt atg ata ccc cag agc cct tcc	2155

Glu Asp Asn Arg Asn Trp Tyr Gln Ser Met Ile Pro Gln Ser Pro Ser
 635 640 645
 ccg cca ctg gat gag agg agc agg gac tgc caa ggc ctg atg gag aag 2203
 Pro Pro Leu Asp Glu Arg Ser Arg Asp Cys Gln Gly Leu Met Glu Lys
 650 655 660
 ttt cag ttt gaa ctg acc ctt gag gaa gag gat tct gag gga ccg gaa 2251
 Phe Gln Phe Glu Leu Thr Leu Glu Glu Glu Asp Ser Glu Gly Pro Glu
 665 670 675
 aag gag gga gaa ggc cac agc tat ttc agc agc aca aag acg ctt tgt 2299
 Lys Glu Gly Glu Gly His Ser Tyr Phe Ser Ser Thr Lys Thr Leu Cys
 680 685 690
 gtg att gat cca gag aac agg gat tct ctg gaa gag act gac ata gac 2347
 Val Ile Asp Pro Glu Asn Arg Asp Ser Leu Glu Glu Thr Asp Ile Asp
 695 700 705 710
 att gca aca gaa gac aag tct ccg atc gac aca taa tctctctccc 2393
 Ile Ala Thr Glu Asp Lys Ser Pro Ile Asp Thr
 715 720
 tctgtgtgga gatgaacatt ccacccttga ctgagcatgc ccgctgagtg gtagggtcac 2453
 ctaccatggc caaggcctgc acaggacaaa ggccacctgg cctttccagt tacttgagtt 2513
 tggagccaga atgccaggcc gtgaagcaaa tagcagttcc atgctgtctt gccttgccctg 2573
 caagcttggc ggagaccgc agctgtatgt ggtagtagag gccagttccc atcaaagcta 2633
 aaatggcttg aaaacagagg acacaaagct gagagattgc tctgcactag gtgttgggaa 2693
 gctgtcctga cagatgactg aactcactaa caacttcata tataaatctc accacccaac 2753
 ccattgtctg ccaacctgtg tgcctttttt tgtaaaatgt tttcgcgtct ttgaaatgcc 2813
 tgttgaatat ctagagttta gtaccaactt ctacaaactt ttttgagtct ttcttgaaaa 2873
 acaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2912
 <210> 2
 <211> 721
 <212> PRT
 5 <213> ratón
 <400> 2

```

Met Thr Ala Lys Asn Ser Pro Lys Glu Phe Thr Ala Ser Glu Ser Glu
 1           5           10           15
Val Cys Ile Lys Thr Phe Lys Glu Gln Met Arg Leu Glu Leu Glu Leu
 20           25           30
Pro Lys Leu Pro Gly Asn Arg Pro Thr Ser Pro Lys Ile Ser Pro Arg
 35           40           45
Ser Ser Pro Arg Asn Ser Pro Cys Phe Phe Arg Lys Leu Leu Val Asn
 50           55           60
Lys Ser Ile Arg Gln Arg Arg Arg Phe Thr Val Ala His Thr Cys Phe
 65           70           75           80
Asp Val Glu Asn Gly Pro Ser Pro Gly Arg Ser Pro Leu Asp Pro Gln
 85           90           95
Ala Gly Ser Ser Ser Gly Leu Val Leu His Ala Ala Phe Pro Gly His
100           105           110
Ser Gln Arg Arg Glu Ser Phe Leu Tyr Asp Leu Asp Ser Asp Tyr Asp
115           120           125
Leu Ser Pro Lys Ala Met Ser Arg Asn Ser Ser Leu Pro Ser Glu Gln
130           135           140
His Gly Asp Asp Leu Ile Val Thr Pro Phe Ala Gln Val Leu Ala Ser
145           150           155           160
Leu Arg Ser Val Arg Asn Asn Phe Thr Leu Leu Thr Asn Leu His Gly
165           170           175
Ala Pro Asn Lys Arg Ser Pro Ala Ala Ser Gln Ala Pro Val Ser Arg
180           185           190
Val Ser Leu Gln Glu Glu Ser Tyr Gln Lys Leu Ala Met Glu Thr Leu
195           200           205
Glu Glu Leu Asp Trp Cys Leu Asp Gln Leu Glu Thr Ile Gln Thr Tyr
210           215           220
Arg Ser Val Ser Glu Met Ala Ser Asn Lys Phe Lys Arg Met Leu Asn
225           230           235           240
Arg Glu Leu Thr His Leu Ser Glu Met Ser Arg Ser Gly Asn Gln Val
245           250           255
Ser Glu Tyr Ile Ser Asn Thr Phe Leu Asp Lys Gln Asn Asp Val Glu
260           265           270
Ile Pro Ser Pro Thr Gln Lys Asp Arg Glu Lys Lys Lys Lys Gln Gln
275           280           285
Leu Met Thr Gln Ile Ser Gly Val Lys Lys Leu Met His Ser Ser Ser
290           295           300
Leu Asn Asn Thr Ser Ile Ser Arg Phe Gly Ile Asn Thr Glu Asn Glu
305           310           315           320
Asp His Leu Ala Lys Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Trp Gly Leu Asn
325           330           335
Ile Phe Asn Val Ala Gly Tyr Ser His Asn Arg Pro Leu Thr Cys Ile
340           345           350
Met Tyr Ala Ile Phe Gln Glu Arg Asp Leu Leu Lys Thr Phe Lys Ile
355           360           365
Ser Ser Asp Thr Phe Val Thr Tyr Met Met Thr Leu Glu Asp His Tyr
370           375           380

```

His Ser Asp Val Ala Tyr His Asn Ser Leu His Ala Ala Asp Val Ala
 385 390 395 400
 Gln Ser Thr His Val Leu Leu Ser Thr Pro Ala Leu Asp Ala Val Phe
 405 410 415
 Thr Asp Leu Glu Ile Leu Ala Ala Ile Phe Ala Ala Ala Ile His Asp
 420 425 430
 Val Asp His Pro Gly Val Ser Asn Gln Phe Leu Ile Asn Thr Asn Ser
 435 440 445
 Glu Leu Ala Leu Met Tyr Asn Asp Glu Ser Val Leu Glu Asn His His
 450 455 460
 Leu Ala Val Gly Phe Lys Leu Leu Gln Glu Glu His Cys Asp Ile Phe
 465 470 475 480
 Gln Asn Leu Thr Lys Lys Gln Arg Gln Thr Leu Arg Lys Met Val Ile
 485 490 495
 Asp Met Val Leu Ala Thr Asp Met Ser Lys His Met Ser Leu Leu Ala
 500 505 510
 Asp Leu Lys Thr Met Val Glu Thr Lys Lys Val Thr Ser Ser Gly Val
 515 520 525
 Leu Leu Leu Asp Asn Tyr Thr Asp Arg Ile Gln Val Leu Arg Asn Met
 530 535 540
 Val His Cys Ala Asp Leu Ser Asn Pro Thr Lys Ser Leu Glu Leu Tyr
 545 550 555 560
 Arg Gln Trp Thr Asp Arg Ile Met Glu Glu Phe Phe Gln Gln Gly Asp
 565 570 575
 Lys Glu Arg Glu Arg Gly Met Glu Ile Ser Pro Met Cys Asp Lys His
 580 585 590
 Thr Ala Ser Val Glu Lys Ser Gln Val Gly Phe Ile Asp Tyr Ile Val
 595 600 605
 His Pro Leu Trp Glu Thr Trp Ala Asp Leu Val Gln Pro Asp Ala Gln
 610 615 620
 Asp Ile Leu Asp Thr Leu Glu Asp Asn Arg Asn Trp Tyr Gln Ser Met
 625 630 635 640
 Ile Pro Gln Ser Pro Ser Pro Pro Leu Asp Glu Arg Ser Arg Asp Cys
 645 650 655
 Gln Gly Leu Met Glu Lys Phe Gln Phe Glu Leu Thr Leu Glu Glu Glu
 660 665 670
 Asp Ser Glu Gly Pro Glu Lys Glu Gly Glu Gly His Ser Tyr Phe Ser
 675 680 685
 Ser Thr Lys Thr Leu Cys Val Ile Asp Pro Glu Asn Arg Asp Ser Leu
 690 695 700
 Glu Glu Thr Asp Ile Asp Ile Ala Thr Glu Asp Lys Ser Pro Ile Asp
 705 710 715 720
 Thr

<210> 3

<211> 4068

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (766)..(2460)

<223> PDE4B

5

<400> 3

gaattcctcc tctcttcacc ccgttagctg ttttcaatgt aatgetgccg tccttctctt 60
 gcactgcctt ctgcgetaac acctccattc ctgtttataa ccgtgtattt attacttaat 120
 gtatataatg taatgttttg taagttatta atttatatat ctaacattgc ctgccaatgg 180
 tgggtgttaa tttgtgtaga aaactctgcc taagagttac gactttttct tgtaatgttt 240
 tgtattgtgt attatataac ccaaactgca cttagtagag acatatggcc cccttggcag 300
 agaggacagg ggtgggcttt tgttcaaagg gtctgccctt tccttgctg agttgctact 360
 tctgcacaac ccctttatga accagttttc accgaattt tgactgtttc atttagaaga 420
 aaagcaaat gagaaaaagc tttcctcatt tctccttgag atggcaaagc actcagaaat 480
 gacatcacat accctaaaga accctgggat gactaaggca gagagagtct gagaaaactc 540
 tttgggtgctt ctgccttttag ttttaggaca ctttatgca gatgagctta taagagaccg 600
 tccccccgc cttcttctc agaggaagtt tcttggtaga tcaccgacac ctcattccagg 660
 cgggggggtg gggggaaact tggcaccagc catcccaggc agagcaccac tgtgatttgt 720
 tctcctggtg gagagagctg gaaggaagga gccagcgtgc aaata atg aag gag cac 777
 Met Lys Glu His

1

ggg ggc acc ttc agt agc acc gga atc agc ggt ggt agc ggt gac tct 825
 Gly Gly Thr Phe Ser Ser Thr Gly Ile Ser Gly Gly Ser Gly Asp Ser
 5 10 15 20
 gct atg gac agc ctg cag ccg ctc cag cct aac tac atg cct gtg tgt 873
 Ala Met Asp Ser Leu Gln Pro Leu Gln Pro Asn Tyr Met Pro Val Cys
 25 30 35
 ttg ttt gca gaa gaa tct tat caa aaa tta gca atg gaa acg ctg gag 921
 Leu Phe Ala Glu Glu Ser Tyr Gln Lys Leu Ala Met Glu Thr Leu Glu
 40 45 50

gaa tta gac tgg tgt tta gac cag cta gag acc ata cag acc tac cgg	969
Glu Leu Asp Trp Cys Leu Asp Gln Leu Glu Thr Ile Gln Thr Tyr Arg	
55 60 65	
tct gtc agt gag atg gct tct aac aag ttc aaa aga atg ctg aac cgg	1017
Ser Val Ser Glu Met Ala Ser Asn Lys Phe Lys Arg Met Leu Asn Arg	
70 75 80	
gag ctg aca cac ctc tca gag atg agc cga tca ggg aac cag gtg tct	1065
Glu Leu Thr His Leu Ser Glu Met Ser Arg Ser Gly Asn Gln Val Ser	
85 90 95 100	
gaa tac att tca aat act ttc tta gac aag cag aat gat gtg gag atc	1113
Glu Tyr Ile Ser Asn Thr Phe Leu Asp Lys Gln Asn Asp Val Glu Ile	
105 110 115	
cca tct cct acc cag aaa gac agg gag aaa aag aaa aag cag cag ctc	1161
Pro Ser Pro Thr Gln Lys Asp Arg Glu Lys Lys Lys Lys Gln Gln Leu	
120 125 130	
atg acc cag ata agt gga gtg aag aaa tta atg cat agt tca agc cta	1209
Met Thr Gln Ile Ser Gly Val Lys Lys Leu Met His Ser Ser Ser Leu	
135 140 145	
aac aat aca agc atc tca cgc ttt gga gtc aac act gaa aat gaa gat	1257
Asn Asn Thr Ser Ile Ser Arg Phe Gly Val Asn Thr Glu Asn Glu Asp	
150 155 160	
cac ctg gcc aag gag ctg gaa gac ctg aac aaa tgg ggt ctt aac atc	1305
His Leu Ala Lys Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Trp Gly Leu Asn Ile	
165 170 175 180	
ttt aat gtg gct gga tat tct cac aat aga ccc cta aca tgc atc atg	1353
Phe Asn Val Ala Gly Tyr Ser His Asn Arg Pro Leu Thr Cys Ile Met	
185 190 195	
tat gct ata ttc cag gaa aga gac ctc cta aag aca ttc aga atc tca	1401
Tyr Ala Ile Phe Gln Glu Arg Asp Leu Leu Lys Thr Phe Arg Ile Ser	
200 205 210	
tct gac aca ttt ata acc tac atg atg act tta gaa gac cat tac cat	1449
Ser Asp Thr Phe Ile Thr Tyr Met Met Thr Leu Glu Asp His Tyr His	
215 220 225	
tct gac gtg gca tat cac aac agc ctg cac gct gct gat gta gcc cag	1497
Ser Asp Val Ala Tyr His Asn Ser Leu His Ala Ala Asp Val Ala Gln	
230 235 240	

gct tct gtg gaa aaa tcc cag gtt ggt ttc atc gac tac att gtc cat 2121
 Ala Ser Val Glu Lys Ser Gln Val Gly Phe Ile Asp Tyr Ile Val His
 440 445 450

cca ttg tgg gag aca tgg gca gat ttg gta cag cct gat gct cag gac 2169
 Pro Leu Trp Glu Thr Trp Ala Asp Leu Val Gln Pro Asp Ala Gln Asp
 455 460 465

att ctc gat acc tta gaa gat aac agg aac tgg tat cag agc atg ata 2217
 Ile Leu Asp Thr Leu Glu Asp Asn Arg Asn Trp Tyr Gln Ser Met Ile
 470 475 480

cct caa agt ccc tca cca cca ctg gac gag cag aac agg gac tgc cag 2265
 Pro Gln Ser Pro Ser Pro Leu Asp Glu Gln Asn Arg Asp Cys Gln
 485 490 495 500

ggt ctg atg gag aag ttt cag ttt gaa ctg act ctc gat gag gaa gat 2313
 Gly Leu Met Glu Lys Phe Gln Phe Glu Leu Thr Leu Asp Glu Glu Asp
 505 510 515

tct gaa gga cct gag aag gag gga gag gga cac agc tat ttc agc agc 2361
 Ser Glu Gly Pro Glu Lys Glu Gly Glu Gly His Ser Tyr Phe Ser Ser
 520 525 530

aca aag acg ctt tgt gtg att gat cca gaa aac aga gat tcc ctg gga 2409
 Thr Lys Thr Leu Cys Val Ile Asp Pro Glu Asn Arg Asp Ser Leu Gly
 535 540 545

gag act gac ata gac att gca aca gaa gac aag tcc ccc gtg gat aca 2457
 Glu Thr Asp Ile Asp Ile Ala Thr Glu Asp Lys Ser Pro Val Asp Thr
 550 555 560

taa tccccctctc cctgtggaga tgaacattct atccttgatg agcatgccag 2510
 565

ctatgtggta gggccagccc accatggggg ccaagacctg cacaggacaa gggccacctg 2570

gcctttcagt tacttgagtt tggagtcaga aagcaagacc aggaagcaaa tagcagctca 2630

ggaaatccca cggttgactt gccttgatgg caagcttggt ggagagggct gaagctgttg 2690

ctggggggccg attctgatca agacacatgg cttgaaaatg gaagacacaa aactgagaga 2750

tcattctgca ctaagtttcg ggaacttatc cccgacagtg actgaactca ctgactaata 2810

acttcattta tgaatcttct cacttgctcc tttgtctgcc aacctgtgtg ccttttttgt 2870

aaaacatttt catgtcttta aaatgcctgt tgaataacctg gagtttagta tcaacttcta 2930
 cacagataag ctttcaaagt tgacaaactt ttttgactct ttctggaaaa gggaaagaaa 2990
 atagtcttcc ttctttcttg ggcaatatcc ttcaactttac tacagttact tttgcaaaca 3050
 gacagaaagg atacacttct aaccacattt tacttccttc cctgtttgtc cagtccaact 3110
 ccacagtcac tottaaaact tctctctgtt tgctgcctc caacagtact tttaactttt 3170
 tgctgtaaac agaataaaat tgaacaaatt agggggtaga aaggagcagt ggtgtcgttc 3230
 accgtgagag tctgcataga actcagcagt gtgccctgct gtgtcttgga cctgcccc 3290
 cacaggagtt gctacagtcc ctggcctgc ttccatcct cctctcttca cccgtagc 3350
 tgttttcaat gtaatgctgc cgtccttctc ttgcactgcc ttctgcgcta acacctccat 3410
 tcctgtttat aaccgtgtat ttattactta atgtatataa tgtaatgttt tgtaagttat 3470
 taatttatat atctaacatt gcctgccaat ggtggtgtta aatttggtga gaaaactctg 3530
 cctaagagtt acgacttttt cttgtaatgt tttgtattgt gtattatata acccaaactg 3590
 cacttagtag agacatatgg ccccttggc agagaggaca ggggtgggct tttgttcaa 3650
 ggggtctgcc tttccctgcc tgagttgcta cttctgcaca acccctttat gaaccagttt 3710
 tggaaacaat attctcacat tagatactaa atggtttata ctgagtcttt tacttttgta 3770
 tagcttgata ggggcagggg caatgggatg tagtttttac ccaggttcta tccaaatcta 3830
 tgtgggcatg agttgggtta taactggatc ctactatcat tgtggctttg gttcaaaagg 3890
 aaacactaca tttgtcaca gatgattctt ctgattcttc tgaatgctcc cgaactactg 3950
 actttgaaga ggtagcctcc tgctgccat taagcaggaa tgcattgttc cagttcatta 4010
 caaaagaaaa caataaaaca atgtgaattt ttataataaa aaaaaaaaaa aggaattc 4068

<210> 4

<211> 564

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

```

Met Lys Glu His Gly Gly Thr Phe Ser Ser Thr Gly Ile Ser Gly Gly
 1              5              10              15
Ser Gly Asp Ser Ala Met Asp Ser Leu Gln Pro Leu Gln Pro Asn Tyr
      20              25              30
Met Pro Val Cys Leu Phe Ala Glu Glu Ser Tyr Gln Lys Leu Ala Met
      35              40              45
Glu Thr Leu Glu Glu Leu Asp Trp Cys Leu Asp Gln Leu Glu Thr Ile
      50              55              60
Gln Thr Tyr Arg Ser Val Ser Glu Met Ala Ser Asn Lys Phe Lys Arg
 65              70              75              80
Met Leu Asn Arg Glu Leu Thr His Leu Ser Glu Met Ser Arg Ser Gly
      85              90              95
Asn Gln Val Ser Glu Tyr Ile Ser Asn Thr Phe Leu Asp Lys Gln Asn
      100             105             110
Asp Val Glu Ile Pro Ser Pro Thr Gln Lys Asp Arg Glu Lys Lys Lys
      115             120             125
Lys Gln Gln Leu Met Thr Gln Ile Ser Gly Val Lys Lys Leu Met His
      130             135             140
Ser Ser Ser Leu Asn Asn Thr Ser Ile Ser Arg Phe Gly Val Asn Thr
 145             150             155             160
Glu Asn Glu Asp His Leu Ala Lys Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Trp
      165             170             175
Gly Leu Asn Ile Phe Asn Val Ala Gly Tyr Ser His Asn Arg Pro Leu
      180             185             190
Thr Cys Ile Met Tyr Ala Ile Phe Gln Glu Arg Asp Leu Leu Lys Thr
      195             200             205
Phe Arg Ile Ser Ser Asp Thr Phe Ile Thr Tyr Met Met Thr Leu Glu
      210             215             220
Asp His Tyr His Ser Asp Val Ala Tyr His Asn Ser Leu His Ala Ala
 225             230             235             240
Asp Val Ala Gln Ser Thr His Val Leu Leu Ser Thr Pro Ala Leu Asp
      245             250             255
Ala Val Phe Thr Asp Leu Glu Ile Leu Ala Ala Ile Phe Ala Ala Ala
      260             265             270
Ile His Asp Val Asp His Pro Gly Val Ser Asn Gln Phe Leu Ile Asn
      275             280             285
Thr Asn Ser Glu Leu Ala Leu Met Tyr Asn Asp Glu Ser Val Leu Glu
      290             295             300
Asn His His Leu Ala Val Gly Phe Lys Leu Leu Gln Glu Glu His Cys
 305             310             315             320
Asp Ile Phe Met Asn Leu Thr Lys Lys Gln Arg Gln Thr Leu Arg Lys
      325             330             335
Met Val Ile Asp Met Val Leu Ala Thr Asp Met Ser Lys His Met Ser
      340             345             350
Leu Leu Ala Asp Leu Lys Thr Met Val Glu Thr Lys Lys Val Thr Ser
      355             360             365
Ser Gly Val Leu Leu Leu Asp Asn Tyr Thr Asp Arg Ile Gln Val Leu
      370             375             380

```

Arg Asn Met Val His Cys Ala Asp Leu Ser Asn Pro Thr Lys Ser Leu
 385 390 395 400
 Glu Leu Tyr Arg Gln Trp Thr Asp Arg Ile Met Glu Glu Phe Phe Gln
 405 410 415
 Gln Gly Asp Lys Glu Arg Glu Arg Gly Met Glu Ile Ser Pro Met Cys
 420 425 430
 Asp Lys His Thr Ala Ser Val Glu Lys Ser Gln Val Gly Phe Ile Asp
 435 440 445
 Tyr Ile Val His Pro Leu Trp Glu Thr Trp Ala Asp Leu Val Gln Pro
 450 455 460
 Asp Ala Gln Asp Ile Leu Asp Thr Leu Glu Asp Asn Arg Asn Trp Tyr
 465 470 475 480
 Gln Ser Met Ile Pro Gln Ser Pro Ser Pro Pro Leu Asp Glu Gln Asn
 485 490 495
 Arg Asp Cys Gln Gly Leu Met Glu Lys Phe Gln Phe Glu Leu Thr Leu
 500 505 510
 Asp Glu Glu Asp Ser Glu Gly Pro Glu Lys Glu Gly Glu Gly His Ser
 515 520 525
 Tyr Phe Ser Ser Thr Lys Thr Leu Cys Val Ile Asp Pro Glu Asn Arg
 530 535 540
 Asp Ser Leu Gly Glu Thr Asp Ile Asp Ile Ala Thr Glu Asp Lys Ser
 545 550 555 560
 Pro Val Asp Thr

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 5

gccaggccgt gaagcaaata 20

10 <210> 6

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 6

tcaaagacgc gaaaacat 18

<210> 7

<211> 21

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 <400> 7
 5 ccgcgtcagt gcctttgcta t 21
 <210> 8
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 <400> 8
 cgctgtcga tgcttttatt cac 23
 <210> 9
 15 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 20 <400> 9
 tcgctttctg gaggggtgc 19
 <210> 10
 <211> 18
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 <400> 10
 ccgcaggggc agcagtgg 18
 30

REIVINDICACIONES

1. Uso de al menos un compuesto de la familia de las pirazolopiridinas capaz de inhibir o reducir la actividad de PDE4, para la preparación de una composición farmacéutica destinada a inhibir o reducir la excitotoxicidad neuronal en fase temprana de por lo menos una enfermedad neurodegenerativa elegida entre la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.

2. Uso de por lo menos un compuesto de la familia de las pirazolopiridinas, capaz de inhibir o reducir la actividad de PDE4B, para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple, la corea de Huntington o la isquemia cerebral.

3. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque se elige dicho compuesto entre los siguientes compuestos:

Etazolato

éster etílico del ácido 4-butilamino-1-etil-6-metil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico (tracazolato),

éster etílico del ácido 4-butilamino-1-etil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

1-(4-aminopirazolo[3,4-*b*]piridin-1-il)- β -D-1-desoxirribofuranosa,

éster etílico del ácido 1-etil-4-(*N*-isopropilidenhidrazino)-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico (SQ 20009),

4-amino-6-metil-1-*n*-pentil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina,

éster etílico del ácido 4-amino-1-etil-6-metil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico (tracacolato de desbutilo),

4-amino-1-pentil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxamida,

éster etílico del ácido 1-etil-6-metil-4-metilamino-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

éster etílico del ácido 4-amino-6-metil-1-propil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

éster etílico del ácido 1-etil-4-etilamino-6-metil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

éster etílico del ácido 4-amino-1-butil-6-metil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

5-(4-aminopirazolo[3,4-*b*]piridin-1-il)-2-hidroximetiltetrahidrofuran-3-ol,

éster alílico del ácido 1-alil-4-amino-6-metil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

éster etílico del ácido 4-amino-1-etil-3,6-dimetil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

éster etílico del ácido 4-dimetilamino-1-etil-6-metil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

- éster etílico del ácido 1-etil-6-metil-4-propilamino-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 éster etílico del ácido 4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 éster etílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pent-4-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 4-amino-1-but-3-enil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-alilamida,
 5 4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-isopropilamida,
 4-amino-1-pentil-*N*-n-propil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxamida,
 éster alílico del ácido 4-amino-1-butil-6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 éster etílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pent-3-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-prop-2-inilamida,
 10 éster alílico del ácido 4-amino-1-(3-metilbutil)-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-*N*-(2-propenil)carboxamida,
 éster alílico del ácido 4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-butilamida,
 éster alílico del ácido 4-amino-1-but-3-inil-6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 15 éster alílico del ácido 4-amino-1-but-3-enil-6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-alilamida,
 éster alílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 éster alílico del ácido 4-amino-6-metil-1-(3-metilbutil)-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 éster isobutílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 20 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-butilamida,
 éster alílico del ácido 4-amino-6-metil-1-(3-metilbut-2-enil)-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-ciclopropilamida,
 4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-hidroxamato de etilo,
 25 éster prop-2-inílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 éster alílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pent-4-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 éster alílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pent-4-enil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 4-amino-1-pent-3-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-propilamida,
 4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-ciclopropilmetilamida,
 30 éster 2-metilalílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 4-amino-1-pent-3-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-alilamida (ICI 190.622),
 4-amino-1-pent-4-inil-*N*-2-propenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxamida,
 4-amino-1-pent-3-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-prop-2-inilamida,
 4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-but-2-inilamida,
 35 éster alílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pent-3-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

- éster alílico del ácido 4-amino-1-(2-ciclopropiletíl)-6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 éster alílico del ácido 4-amino-1-hex-5-inil-6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 4-amino-1-pent-3-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-ciclopropilmetilamida,
 éster but-3-enílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 5 ester ciclopropilmetílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-
 carboxílico,
 4-butilamino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-alilamida,
 éster 2-ciclopropiletílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-
 carboxílico,
 10 éster ciclopropilmetílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pent-3-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-
 carboxílico,
 éster ciclopropilmetílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pent-4-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-
 carboxílico,
 éster etílico del ácido 4-amino-1-bencil-6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 15 4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-bencilamida,
 4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-fenilamida,
 éster bencílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 4-azido-1- β -D-ribofuranosilpirazolo[3,4-*b*]piridina,
 1-pent-3-inil-*N*-2-propenil-4-propionamido-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxamida,
 20 2-(4-aminopirazolo[3,4-*b*]piridin-1-il)-5-hidroximetiltetrahidrofurano-3,4-diol,
 2-(6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-ilamino)etanol,
 3-(6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-ilamino)propan-1-ol,
 éster propílico del ácido 3-(6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-ilamino)acético,
 éster etílico del ácido 2-(6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-ilamino)propiónico,
 25 éster etílico del ácido 2-(6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-ilamino)pentanoico,
 éster etílico del ácido 2-(6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-ilamino)benzoico,
 éster propílico del ácido 3-(6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-ilamino)pentanoico,
N-benciliden-*N*-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)hidrazina,
N-furan-2-ilmetilen-*N*-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)hidrazina,
 30 *N*-(4-fluorobenciliden)-*N*-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)hidrazina,
N-(3-furan-2-ilaliliden)-*N*-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)hidrazina,
N-(4-metoxibenciliden)-*N*-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)hidrazina,
 4-[(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)hidrazonometil]-benzonitrilo,
N-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetilen-*N*-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)hidrazina,
 35 *N*-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)-*N*-(4-nitrobenciliden)-hidrazina,

- N*-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)-*N*-(2-nitrobenciliden)-hidrazina,
N-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)-*N*-(4-trifluorometil-benciliden)hidrazina,
N-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)-*N*-(5-nitrofuran-2-ilmetilen)hidrazina,
N-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)-*N*-(2-trifluorometil-benciliden)hidrazina,
 5 *N*-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)-*N*-(6-nitrobenzo[1,3]-dioxol-5-ilmetilen)hidrazina,
 ácido 4-(3-cloro-4-metoxibencilamino)-1-etil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 4-(3-cloro-4-metoxibencilamino)-1-etil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-(piridin-4-ilmetil)amida,
 4-(3-cloro-4-metoxibencilamino)-1-etil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-(tetrahidrofuran-2-ilmetil)amida,
 10 4-(3-cloro-4-metoxibencilamino)-1-etil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-(5-hidroxipentil)amida,
 4-(3-cloro-4-metoxibencilamino)-1-etil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-[3-(2-oxopirrolidin-1-il)propil]amida,
 éster etílico del ácido 4-*terc*-butilamino-1-(2-cloro-2-feniletil)-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 15 éster etílico del ácido 1-(2-cloro-2-feniletil)-4-ciclopropilamino-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 éster etílico del ácido 1-(2-cloro-2-feniletil)-4-propilamino-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 éster etílico del ácido 1-(2-cloro-2-feniletil)-4-fenilamino-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 éster etílico del ácido 4-butilamino-1-(2-cloro-2-feniletil)-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 20 éster etílico del ácido 1-(2-cloro-2-feniletil)-4-(2-etoxietilamino)-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 éster etílico del ácido 4-bencilamino-1-(2-cloro-2-feniletil)-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 éster etílico del ácido 1-(2-cloro-2-feniletil)-4-fenetilamino-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico.
- 25 4. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque dicho compuesto es el etazolato.
5. Compuesto de la familia de las pirazolopiridinas capaz de inhibir o reducir la actividad de PDE4, para su uso en un procedimiento destinado a inhibir o reducir la excitotoxicidad neuronal
 30 en fase temprana de por lo menos una enfermedad neurodegenerativa elegida entre la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.
6. Compuesto de la familia de las pirazolopiridinas capaz de inhibir o reducir la actividad de PDE4B, para su uso en un procedimiento de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, la
 35 enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple, la corea de Huntington o la isquemia cerebral.

7. Compuesto según una de las reivindicaciones 5 o 6, caracterizado porque dicho compuesto se elige entre los siguientes compuestos:

Etazolato

- 5 éster etílico del ácido 4-butilamino-1-etil-6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico (tracazolato),
éster etílico del ácido 4-butilamino-1-etil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
1-(4-aminopirazolo[3,4-*b*]piridin-1-il)- β -D-1-desoxirribofuranosa,
éster etílico del ácido 1-etil-4-(*N*-isopropilidenhidrazino)-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico
- 10 (SQ 20009),
4-amino-6-metil-1-*n*-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina,
éster etílico del ácido 4-amino-1-etil-6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico (tracacolato de desbutilo),
4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxamida,
- 15 éster etílico del ácido 1-etil-6-metil-4-metilamino-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
éster etílico del ácido 4-amino-6-metil-1-propil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
éster etílico del ácido 1-etil-4-etilamino-6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
éster etílico del ácido 4-amino-1-butil-6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
5-(4-aminopirazolo[3,4-*b*]piridin-1-il)-2-hidroximetiltetrahidrofuran-3-ol,
- 20 éster alílico del ácido 1-alil-4-amino-6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
éster etílico del ácido 4-amino-1-etil-3,6-dimetil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
éster etílico del ácido 4-dimetilamino-1-etil-6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
éster etílico del ácido 1-etil-6-metil-4-propilamino-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
- 25 éster etílico del ácido 4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
éster etílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pent-4-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
4-amino-1-but-3-enil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-alilamida,
4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-isopropilamida,
4-amino-1-pentil-*N*-*n*-propil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxamida,
- 30 éster alílico del ácido 4-amino-1-butil-6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
éster etílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pent-3-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-prop-2-inilamida,
éster alílico del ácido 4-amino-1-(3-metilbutil)-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-*N*-(2-propenil)carboxamida,
- 35 éster alílico del ácido 4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

- 4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-butilamida,
 éster alílico del ácido 4-amino-1-but-3-inil-6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 éster alílico del ácido 4-amino-1-but-3-enil-6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-alilamida,
 5 éster alílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 éster alílico del ácido 4-amino-6-metil-1-(3-metilbutil)-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 éster isobutílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-butilamida,
 éster alílico del ácido 4-amino-6-metil-1-(3-metilbut-2-enil)-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-
 10 carboxílico,
 4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-ciclopropilamida,
 4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-hidroxamato de etilo,
 éster prop-2-inílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 éster alílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pent-4-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 15 éster alílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pent-4-enil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 4-amino-1-pent-3-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-propilamida,
 4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-ciclopropilmetilamida,
 éster 2-metilalílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 4-amino-1-pent-3-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-alilamida (ICI 190.622),
 20 4-amino-1-pent-4-inil-*N*-2-propenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxamida,
 4-amino-1-pent-3-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-prop-2-inilamida,
 4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-but-2-inilamida,
 éster alílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pent-3-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 éster alílico del ácido 4-amino-1-(2-ciclopropiletil)-6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 25 éster alílico del ácido 4-amino-1-hex-5-inil-6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 4-amino-1-pent-3-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-ciclopropilmetilamida,
 éster but-3-enílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 éster ciclopropilmetílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-
 carboxílico,
 30 4-butilamino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-alilamida,
 éster 2-ciclopropiletílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-
 carboxílico,
 éster ciclopropilmetílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pent-3-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-
 carboxílico,
 35 éster ciclopropilmetílico del ácido 4-amino-6-metil-1-pent-4-inil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-

- carboxílico,
 éster etílico del ácido 4-amino-1-bencil-6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-bencilamida,
 4-amino-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-fenilamida,
 5 éster bencilico del ácido 4-amino-6-metil-1-pentil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 4-azido-1- β -D-ribofuranosilpirazolo[3,4-*b*]piridina,
 1-pent-3-inil-*N*-2-propenil-4-propionamido-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxamida,
 2-(4-aminopirazolo[3,4-*b*]piridin-1-il)-5-hidroximetiltetrahidrofurano-3,4-diol,
 2-(6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-ilamino)etanol,
 10 3-(6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-ilamino)propan-1-ol,
 éster propílico del ácido 3-(6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-ilamino)acético,
 éster etílico del ácido 2-(6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-ilamino)propiónico,
 éster etílico del ácido 2-(6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-ilamino)pentanoico,
 éster etílico del ácido 2-(6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-ilamino)benzoico,
 15 éster propílico del ácido 3-(6-metil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-ilamino)pentanoico,
N-benciliden-*N*-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)hidrazina,
N-furan-2-ilmetilen-*N*-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)hidrazina,
N-(4-fluorobenciliden)-*N*-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)hidrazina,
N-(3-furan-2-ilaliliden)-*N*-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)hidrazina,
 20 *N*-(4-metoxibenciliden)-*N*-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)hidrazina,
 4-[(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)hidrazonometil]-benzonitrilo,
N-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetilen-*N*-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)hidrazina,
N-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)-*N*-(4-nitrobenciliden)-hidrazina,
N-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)-*N*-(2-nitrobenciliden)-hidrazina,
 25 *N*-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)-*N*-(4-trifluorometil-benciliden)hidrazina,
N-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)-*N*-(5-nitrofuran-2-ilmetilen)hidrazina,
N-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)-*N*-(2-trifluorometil-benciliden)hidrazina,
N-(3-metil-1-fenil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-il)-*N*-(6-nitrobenzo[1,3]-dioxol-5-ilmetilen)hidrazina,
 ácido 4-(3-cloro-4-metoxibencilamino)-1-etil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,
 30 4-(3-cloro-4-metoxibencilamino)-1-etil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-(piridin-4-ilmetil)amida,
 4-(3-cloro-4-metoxibencilamino)-1-etil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-(tetrahidrofuran-2-ilmetil)amida,
 4-(3-cloro-4-metoxibencilamino)-1-etil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-(5-hidroxipentil)amida,
 4-(3-cloro-4-metoxibencilamino)-1-etil-1 *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-[3-(2-oxopirrolidin-1-il)propil]amida,
 35

éster etílico del ácido 4-*tert*-butilamino-1-(2-cloro-2-feniletíl)-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

éster etílico del ácido 1-(2-cloro-2-feniletíl)-4-ciclopropilamino-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

5 éster etílico del ácido 1-(2-cloro-2-feniletíl)-4-propilamino-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

éster etílico del ácido 1-(2-cloro-2-feniletíl)-4-fenilamino-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

éster etílico del ácido 4-butilamino-1-(2-cloro-2-feniletíl)-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

éster etílico del ácido 1-(2-cloro-2-feniletíl)-4-(2-etoxietilamino)-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

10 éster etílico del ácido 4-bencilamino-1-(2-cloro-2-feniletíl)-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico,

éster etílico del ácido 1-(2-cloro-2-feniletíl)-4-fenetilamino-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-5-carboxílico.

8. Compuesto según una de las reivindicaciones 5 o 6, caracterizado porque dicho

15 compuesto es el etazolato.

Análisis de expresión de isoforma PDE4B en el cerebro mediante PCR semicuantitativa

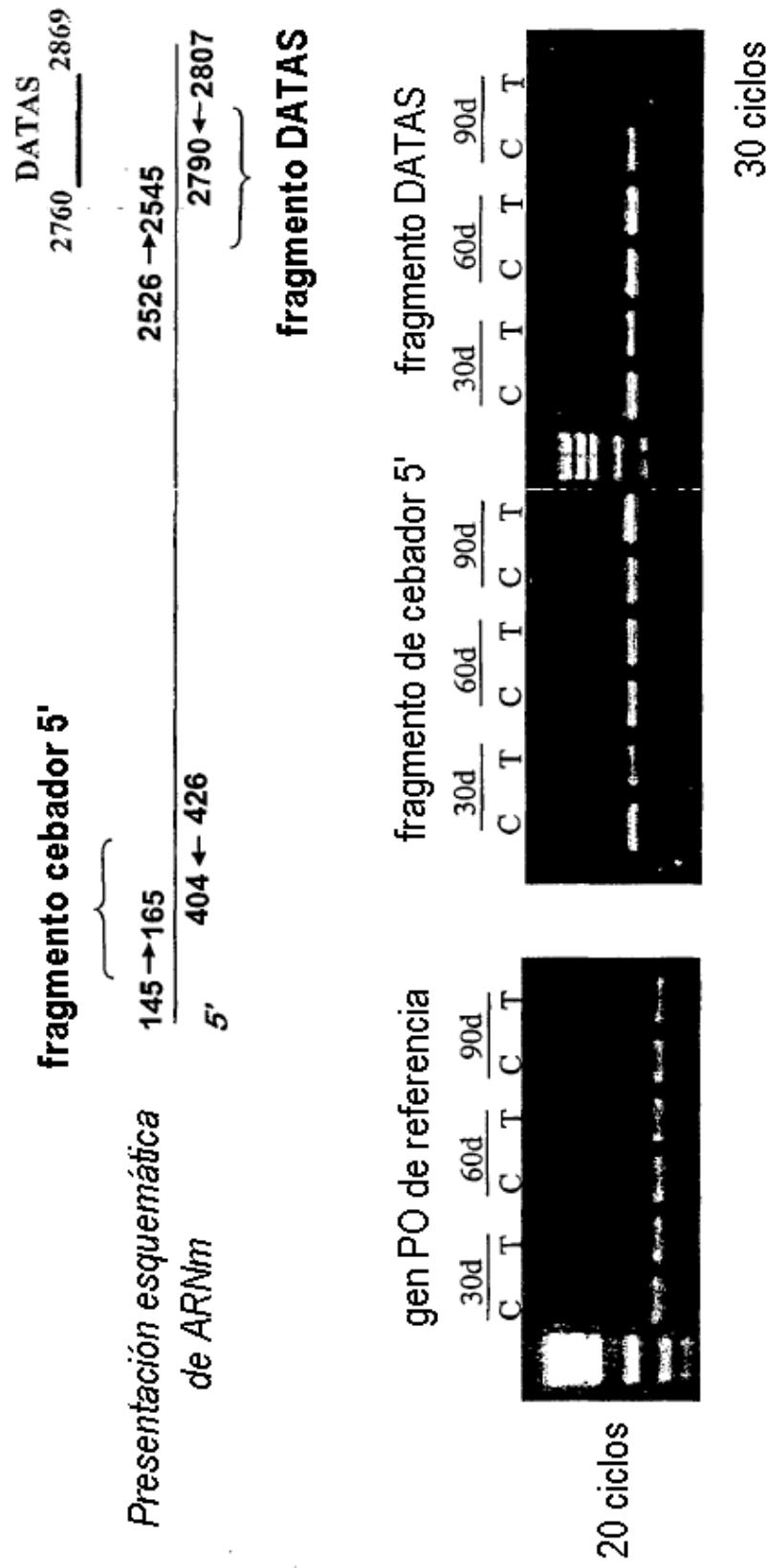
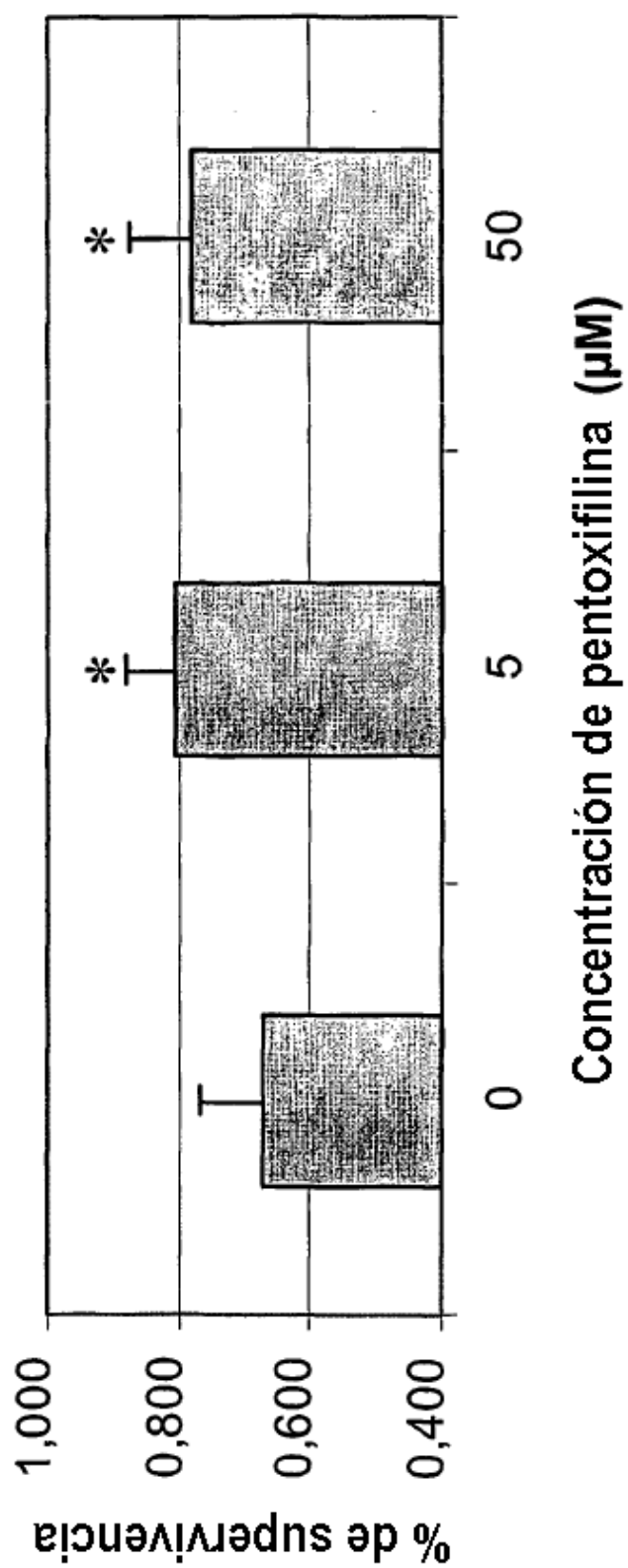


Figura 1A



Figura 1B



*: $p < 0,05$ test de Wilcoxon

Figura 2

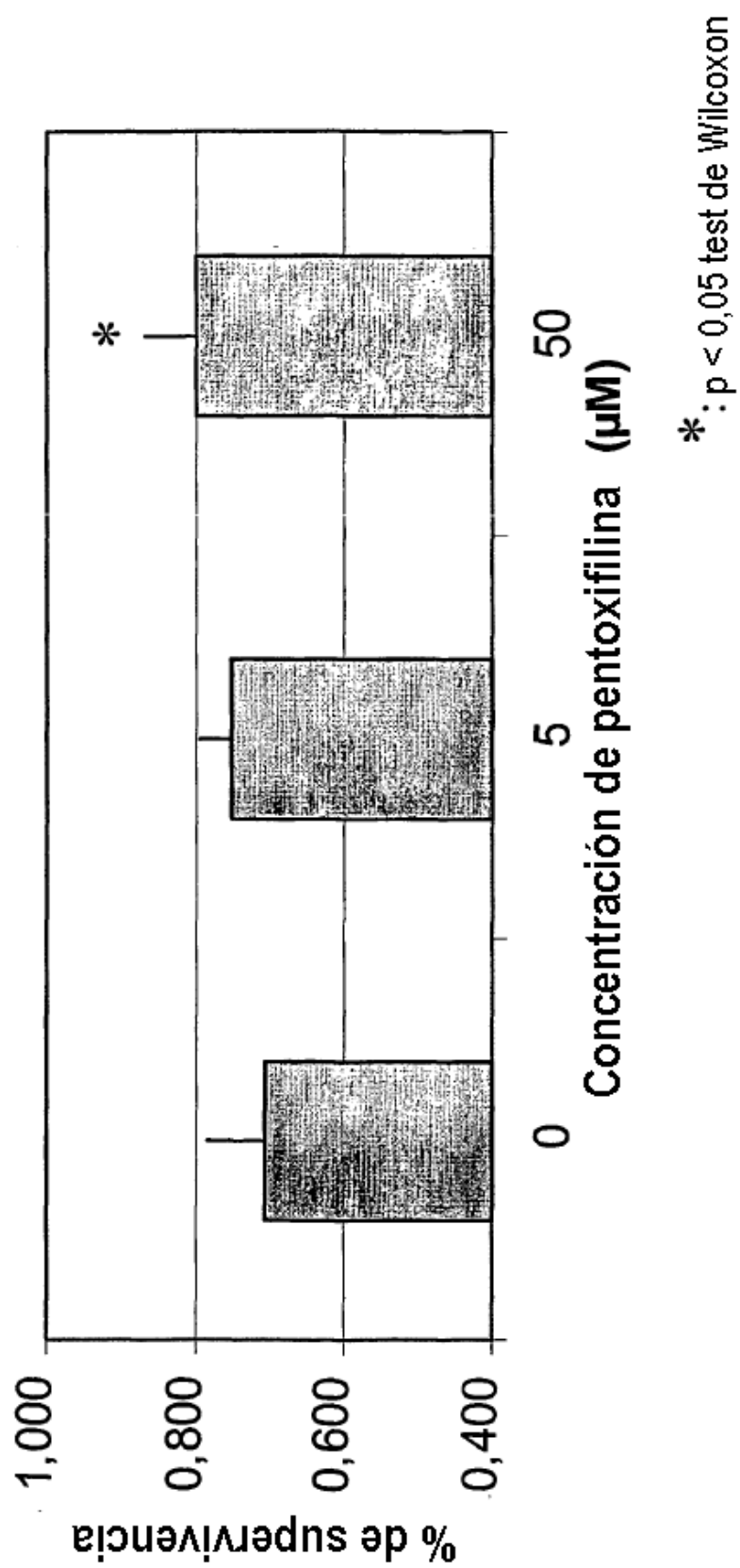


Figura 3

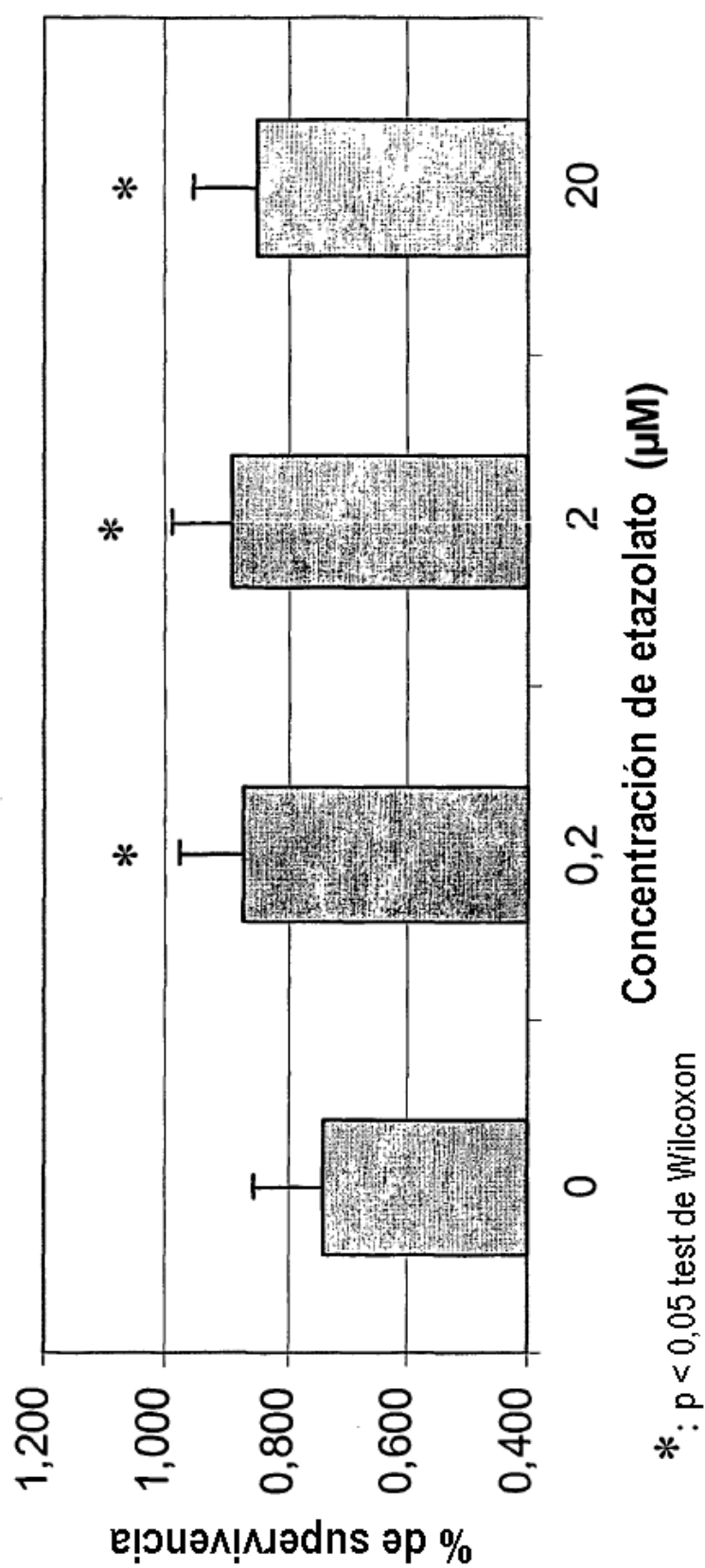
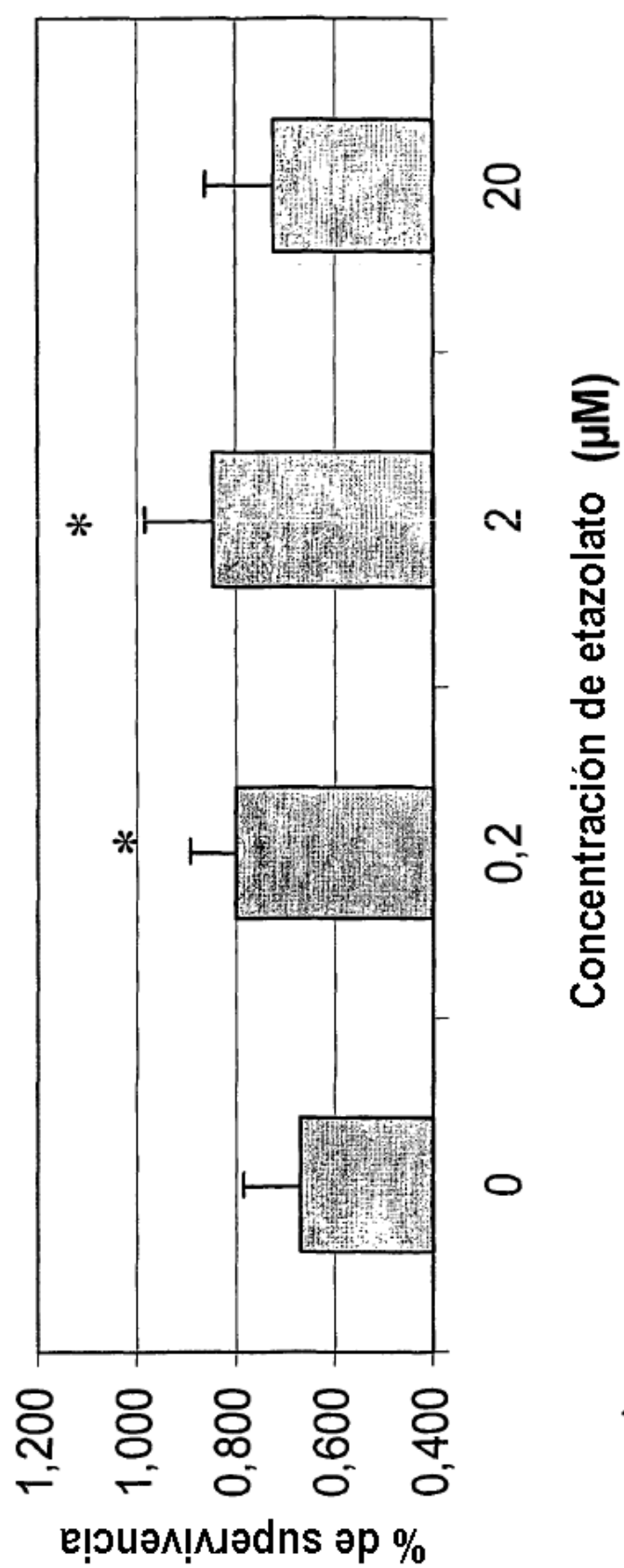
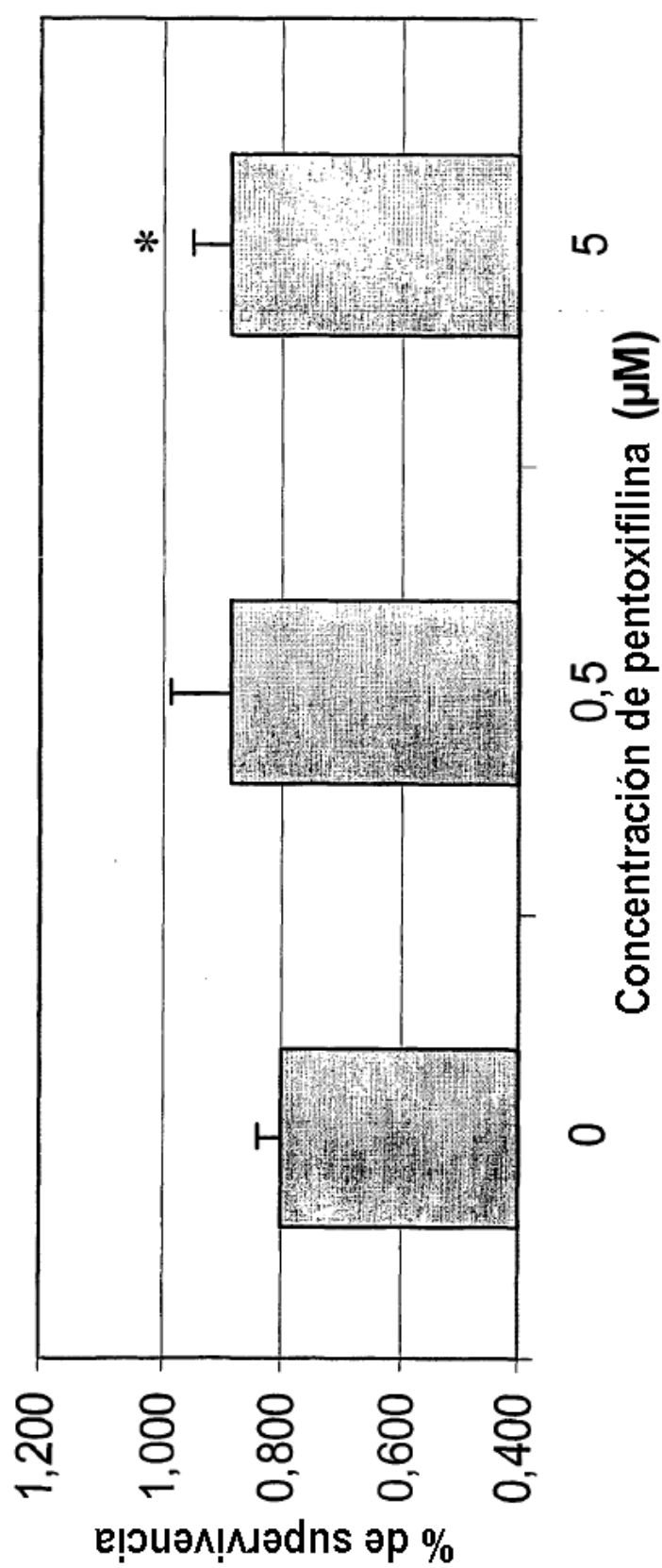


Figura 4



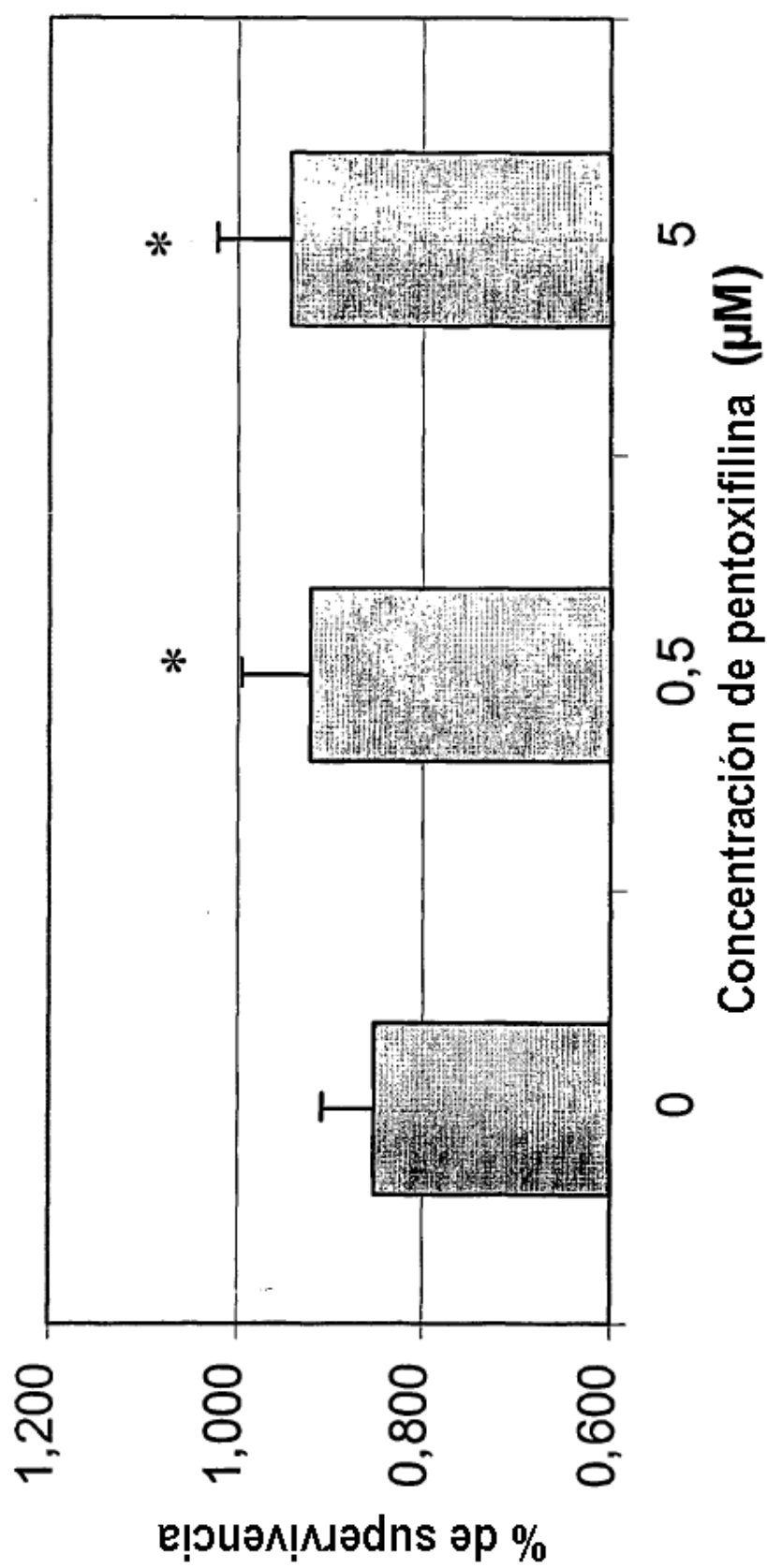
*: $p < 0,05$ test de Wilcoxon

Figura 5



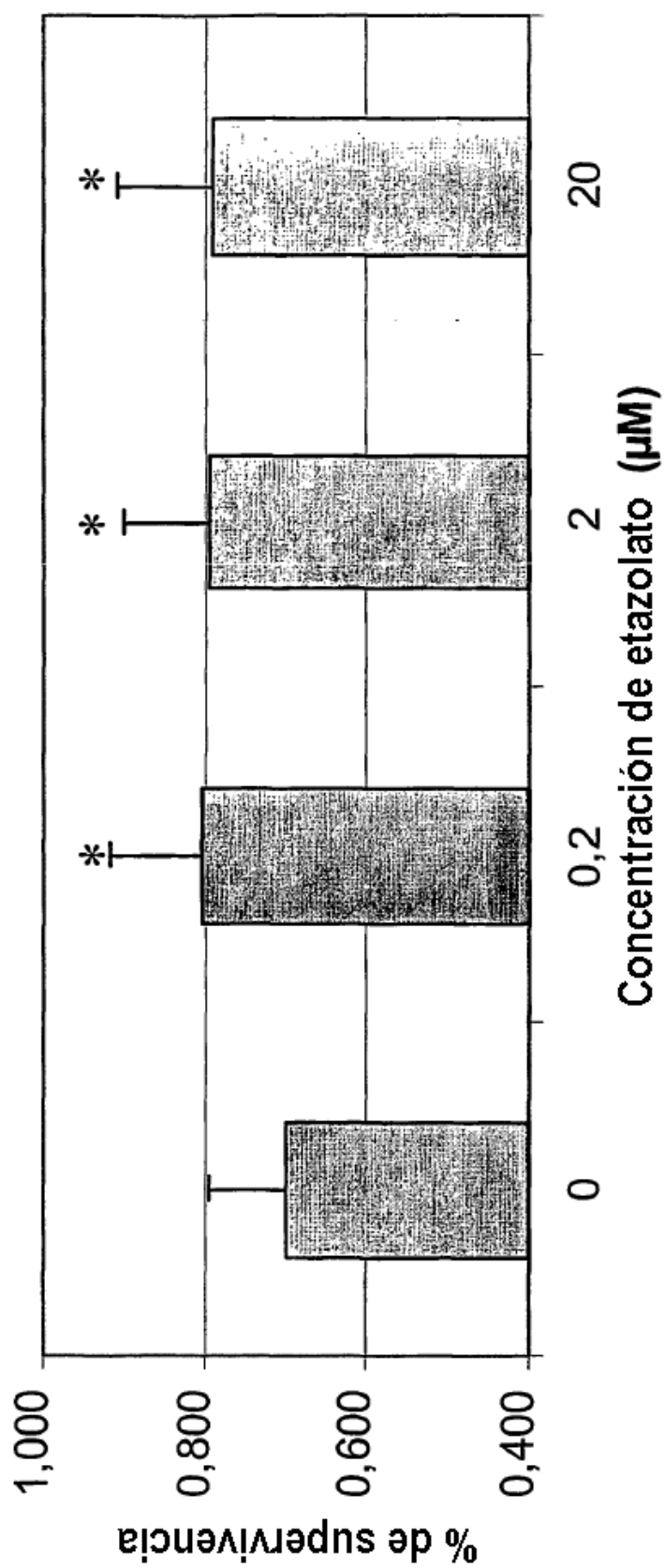
*: $p < 0,05$ test de Wilcoxon

Figura 6



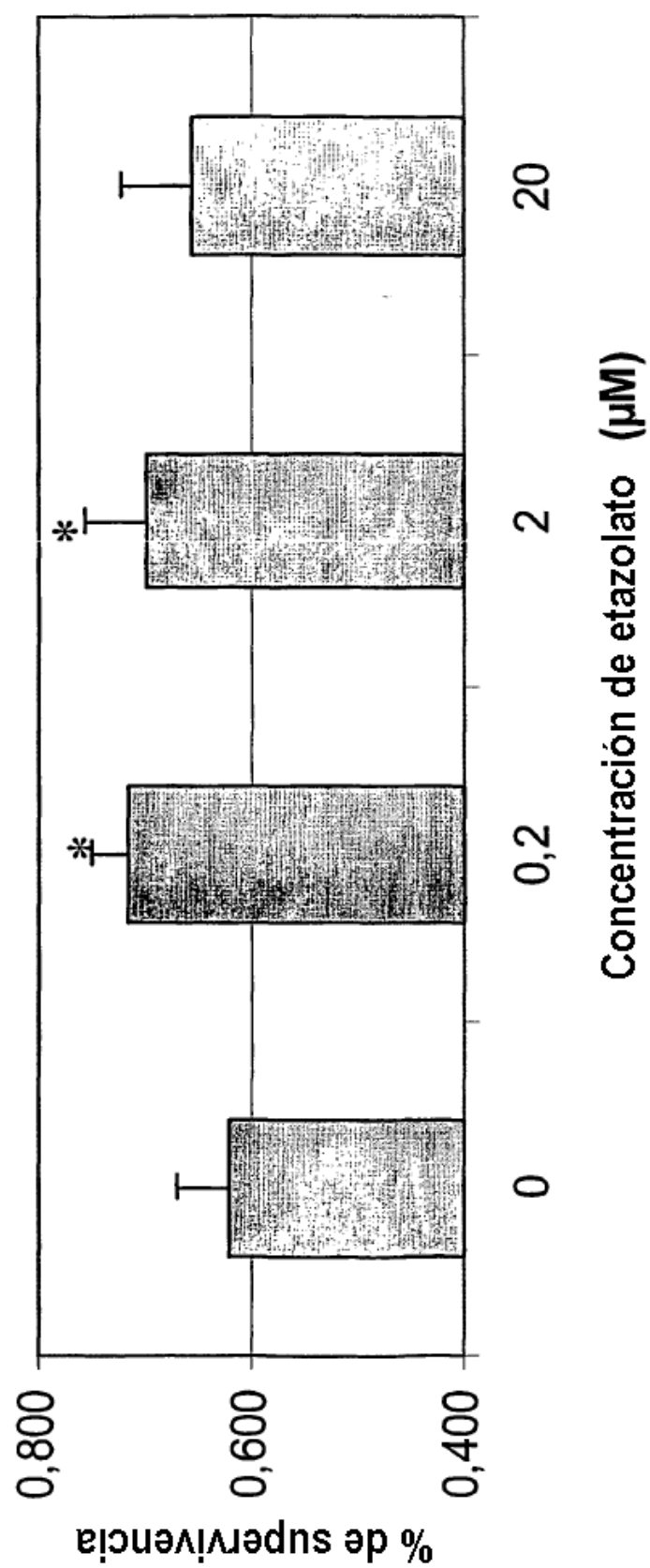
*: $p < 0,05$ test de Wilcoxon

Figura 7



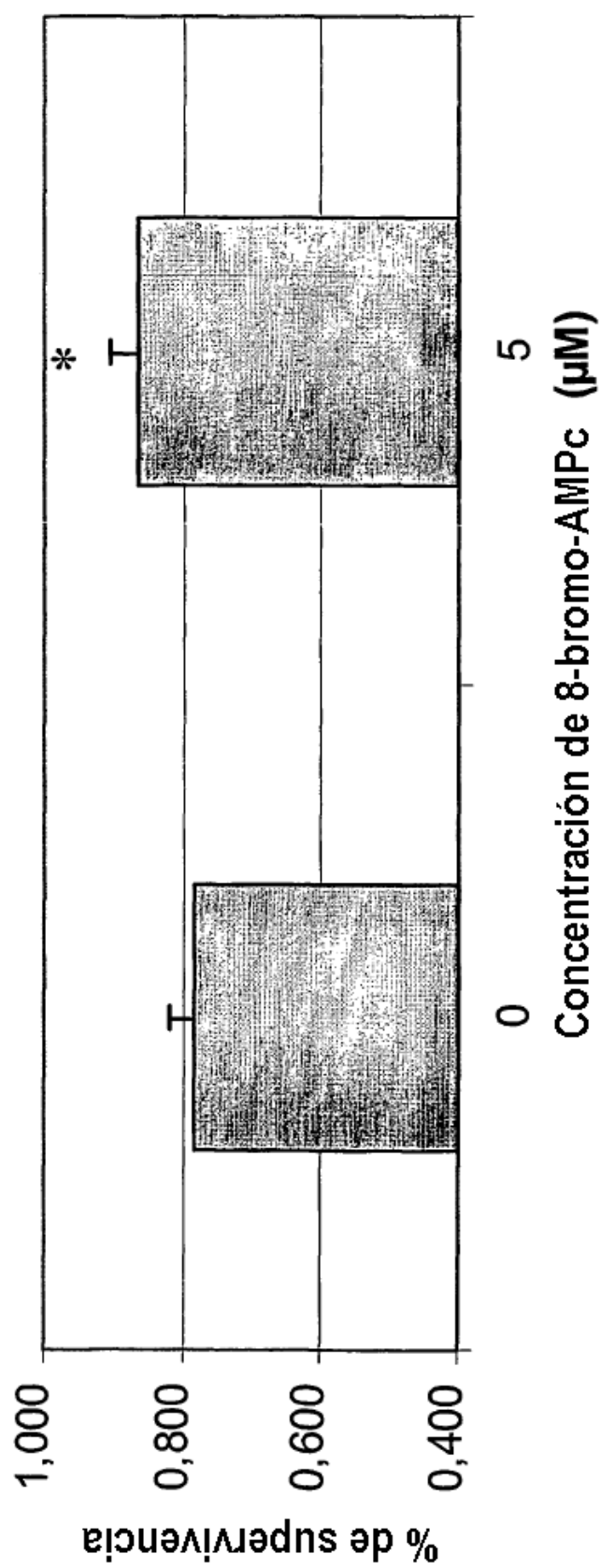
*: $p < 0,05$ test de Wilcoxon

Figura 8



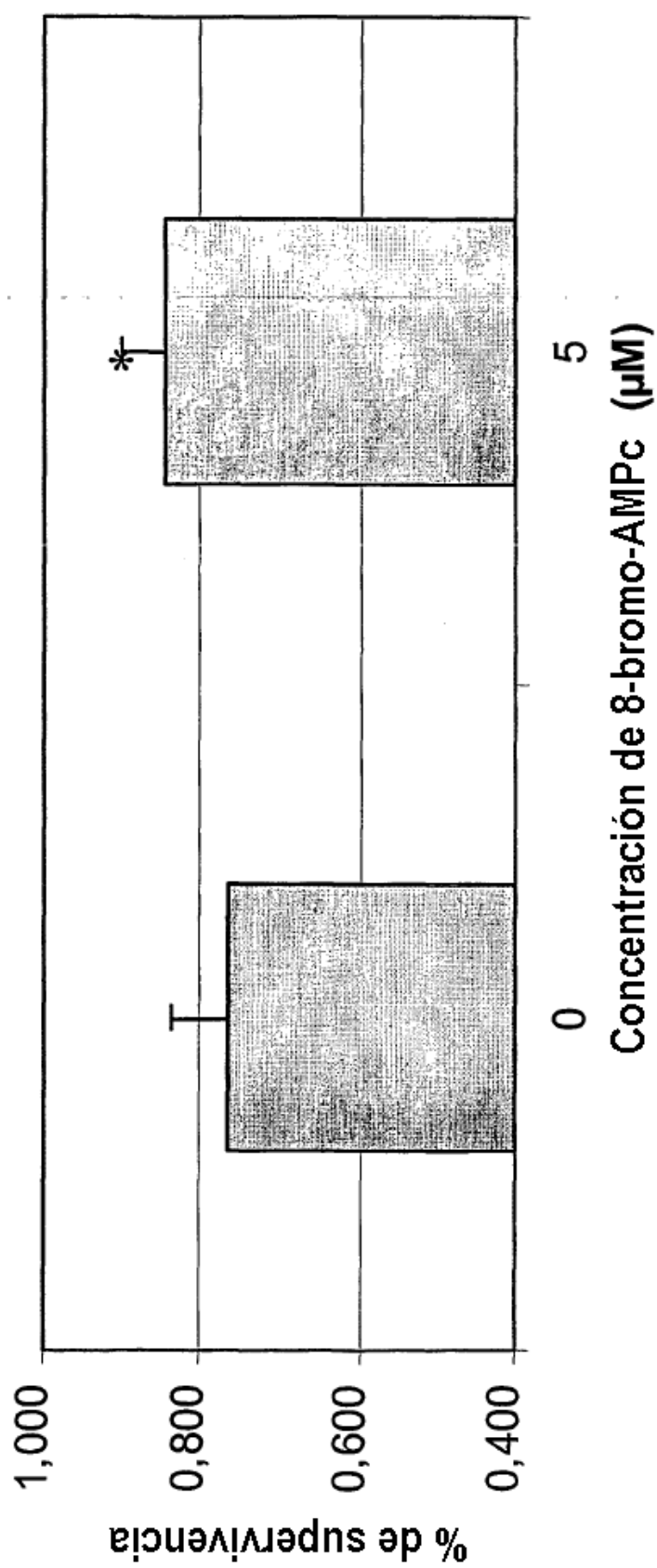
*: $p < 0,05$ test de Wilcoxon

Figura 9



*: $p > 0,05$ test de Wilcoxon

Figura 10



*: $p < 0,05$ test de Wilcoxon

Figura 11