

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 333**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4015 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2004** **E 09166577 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013** **EP 2116240**

54 Título: **Entrenamiento cognitivo aumentado**

30 Prioridad:

08.04.2003 US 410508

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.05.2013

73 Titular/es:

COLD SPRING HARBOR LABORATORY (100.0%)
One Bungtown Road Nichols Building
Cold Spring Harbor, NY 11724, US

72 Inventor/es:

TULLY, TIMOTHY P y
CAVALIERI, FILIPPO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 403 333 T3

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

DESCRIPCIÓN

Entrenamiento cognitivo aumentado

Antecedentes de la invención

5 Se calcula que 4 a 5 millones de americanos (aproximadamente el 2 % de todas las edades y el 15 % de los mayores de 65 años) tienen alguna forma y grado de insuficiencia cognitiva. La insuficiencia cognitiva (disfunción o pérdida de funciones cognitivas, el proceso por el que se adquiere, se retiene y se utiliza el conocimiento) ocurre comúnmente en asociación con trastornos o enfermedades del sistema nervioso central (SNC), incluyendo deterioro de la memoria asociado a la edad, delirio (llamado a veces estado confusional agudo), demencia (clasificada a veces como tipo Alzheimer o tipo no Alzheimer), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington (corea), retraso mental, enfermedad cerebrovascular (p.ej., ictus, isquemia); trastornos afectivos (p.ej., depresión), trastornos psicóticos (p.ej., esquizofrenia, autismo (Síndrome de Kanner)), trastornos neuróticos (p.ej., ansiedad, trastorno obsesivo-compulsivo), trastorno de déficit de atención (ADD), hematoma subdural, hidrocefalia normotensa, tumor cerebral, traumatismo craneal o cerebral.

15 La disfunción cognitiva se manifiesta típicamente por uno o más déficits cognitivos, que incluyen deterioro de la memoria (deterioro de la capacidad para aprender una nueva información o para recordar la información aprendida previamente), afasia (alteración del lenguaje/habla), apraxia (deterioro de la capacidad para llevar a cabo actividades motoras a pesar de tener intacta la función motora), agnosia (insuficiencia para reconocer o identificar objetos a pesar de tener intacta la función sensorial), alteración en el funcionamiento ejecutivo (esto es, planificar, organizar, ordenar, resumir).

20 La disfunción cognitiva produce un importante deterioro del funcionamiento social y/o ocupacional, que puede interferir en la capacidad de un individuo para realizar actividades de la vida diaria y puede impactar en gran medida en la autonomía y calidad de vida del individuo.

25 En general, se emplean protocolos de entrenamiento cognitivo en la rehabilitación de individuos que tienen alguna forma y grado de disfunción cognitiva. Por ejemplo, se emplean comúnmente protocolos de entrenamiento cognitivo en la rehabilitación del ictus y en la rehabilitación de la pérdida de memoria relacionada con la edad. Debido a que con frecuencia se requieren múltiples sesiones de entrenamiento antes de que se obtenga una mejora o potenciación de un aspecto específico del rendimiento cognitivo (capacidad o función) en los individuos, los protocolos de entrenamiento cognitivo son a menudo muy costosos y consumen mucho tiempo.

Compendio de la invención

30 En la invención, se utiliza HT0712 en terapia, tal como se define en las reivindicaciones.

35 Se describe además una metodología, también denominada en el presente documento entrenamiento cognitivo aumentado (ACT), que puede o bien (1) rehabilitar diferentes formas de la disfunción cognitiva más eficientemente que cualquier método actual, o bien (2) mejorar el rendimiento cognitivo normal (capacidad o función). El entrenamiento cognitivo aumentado se puede aplicar para cualquier aspecto de la función cerebral que muestre un aumento duradero del rendimiento después del entrenamiento cognitivo. Por consiguiente, se puede usar el entrenamiento cognitivo aumentado en la rehabilitación de un animal con alguna forma y grado de disfunción cognitiva o en el aumento (mejora) del rendimiento cognitivo normal en un animal. El entrenamiento cognitivo aumentado se puede usar también para ejercitar circuitos neuronales apropiados para ajustar las conexiones sinápticas de células madres trasplantadas de nueva adquisición, que se diferencian en neuronas. El documento WO 2002/013867 describe el entrenamiento cognitivo aumentado (ACT).

45 Como se describe aquí, el entrenamiento cognitivo aumentado comprende dos partes indivisibles: (1) un protocolo de entrenamiento específico para cada función cerebral (cognitiva) y (2) la administración de fármacos que potencian la ruta de la proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico (CREB). Esta combinación puede aumentar el entrenamiento cognitivo reduciendo el número de sesiones de entrenamiento necesarias para producir un aumento de rendimiento con respecto al obtenido con entrenamiento cognitivo solo o requiriendo intervalos de descanso más cortos entre las sesiones de entrenamiento, o ningún descanso, para producir un aumento del rendimiento. Esta combinación puede aumentar también el entrenamiento cognitivo reduciendo la duración y/o el número de sesiones de entrenamiento necesarias para la inducción en un circuito o circuitos neuronales específicos de un patrón de actividad neuronal o reduciendo la duración y/o el número de sesiones de entrenamiento o el patrón subyacente de actividad neuronal requerido para inducir un cambio funcional/estructural a largo plazo (esto es, de larga duración) dependiente de CREB entre las conexiones sinápticas del circuito neuronal. De esta manera, el entrenamiento cognitivo aumentado puede mejorar la eficiencia de los protocolos de entrenamiento cognitivo existentes, produciendo de este modo un beneficio económico importante.

5 Por ejemplo, los protocolos de entrenamiento cognitivo se emplean para tratar a pacientes con depresión (monopolar) y/o con fobias para ayudarles a desaprender las respuestas patológicas asociadas con la depresión y/o con las fobias y aprender el comportamiento apropiado. La administración de un fármaco que potencia la ruta de CREB junto con el entrenamiento cognitivo reduce el tiempo y/o el número de sesiones de entrenamiento requeridas para producir un aumento en el rendimiento de estos pacientes. De este modo, el tratamiento global se completa en un periodo de tiempo más corto.

10 Similarmente, los protocolos de entrenamiento cognitivo se emplean para tratar a pacientes con autismo para ayudarles a desaprender las respuestas patológicas y aprender el comportamiento apropiado. La administración de un fármaco que potencia la ruta de CREB junto con el entrenamiento cognitivo reduce el tiempo y/o el número de sesiones de entrenamiento requeridas para producir un aumento en el rendimiento de estos pacientes.

15 Los protocolos de entrenamiento cognitivo (p.ej., fisioterapia, métodos de biorregulación) se emplean en la rehabilitación de los pacientes con ictus (rehabilitación de ictus), particularmente en la rehabilitación de una función o funciones motoras-sensoriales deterioradas o perdidas. La administración de un fármaco que potencia la ruta de CREB junto con el entrenamiento cognitivo reduce el tiempo y/o el número de sesiones de entrenamiento requeridas para producir un aumento en el rendimiento de estos pacientes. Se espera como resultado una recuperación más rápida y más eficaz de la función o funciones cognitivas perdidas.

20 Los protocolos de entrenamiento cognitivo (p.ej., entrenamiento concentrado, entrenamiento espaciado) se emplean en el aprendizaje de un nuevo lenguaje o en el aprendizaje para tocar un nuevo instrumento musical. La administración de un fármaco que potencia la ruta de CREB junto con el entrenamiento cognitivo reduce el tiempo y/o el número de sesiones de entrenamiento requeridas para producir un aumento en el rendimiento. Como resultado, se requiere menos práctica (sesiones de entrenamiento) para aprender el nuevo lenguaje o para aprender a tocar el nuevo instrumento musical.

25 Los protocolos de entrenamiento cognitivo se emplean para mejorar el aprendizaje y/o el rendimiento en individuos con discapacidades de aprendizaje, de lenguaje o de lectura. La administración de un fármaco que potencia la ruta de CREB junto con el entrenamiento cognitivo reduce el tiempo y/o el número de sesiones de entrenamiento requeridas para producir un aumento en el rendimiento de estos individuos.

30 Los protocolos de entrenamiento cognitivo se emplean para ejercitar los circuitos neuronales en individuos para ajustar las conexiones sinápticas de células madre trasplantadas de nueva adquisición, que se diferencian en neuronas. La administración de un fármaco que potencia la ruta de CREB junto con el entrenamiento cognitivo reduce el tiempo y/o el número de sesiones de entrenamiento requeridas para la inducción en un circuito o circuitos neuronales específicos de un patrón de actividad neuronal en estos individuos.

35 Los protocolos de entrenamiento cognitivo se emplean para estimulación repetida de la actividad neuronal o un patrón de actividad neuronal que subyace en un circuito o circuitos neuronales específicos en los individuos. La administración de un fármaco que potencia la ruta de CREB junto con el entrenamiento cognitivo reduce el tiempo y/o el número de sesiones de entrenamiento y/o el patrón subyacente de actividad neuronal requerido para inducir el cambio estructural/funcional a largo plazo (esto es, de larga duración) dependiente de CREB entre las conexiones sinápticas del circuito neuronal.

40 Se describen aquí métodos para mejorar un aspecto específico del rendimiento cognitivo en un animal (particularmente un ser humano u otro mamífero o vertebrado) que lo necesite, que comprenden (a) administrar al animal un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB; y (b) entrenar al animal en condiciones suficientes para producir una mejora en la realización de una tarea cognitiva de interés por el animal. Los "agentes de aumento" se denominan también aquí "fármacos que potencian la ruta de CREB".

45 Se describen aquí métodos para tratar un déficit cognitivo asociado con un trastorno o afección del sistema nervioso central (SNC) en un animal que necesite dicho tratamiento, que comprenden (a) administrar al animal un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB; y (b) entrenar al animal en condiciones suficientes para producir una mejora en el rendimiento de una tarea cognitiva particular por el animal. Los trastornos y afecciones del sistema nervioso central incluyen deterioro de la memoria asociado a la edad, enfermedades neurodegenerativas (p.ej., enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington (corea), otras demencias seniles), enfermedades psiquiátricas (p.ej., depresión, esquizofrenia, autismo, trastorno de déficit de atención), pérdida de función dependiente de traumatismo (p.ej., enfermedades cerebrovasculares (p.ej., ictus, isquemia), tumor cerebral, lesión de cabeza o de cerebro), defectos genéticos (p.ej., síndrome de Rubinstein-Taybi, síndrome de Down, síndrome de Angelman, neurofibromatosis, síndrome de Coffin-Lowry, síndrome de Rett, distrofia miotónica, síndrome de X frágil (p.ej., X-1 frágil, X-2 frágil), síndrome de William) y discapacidades de aprendizaje.

55 En la invención, se usa HT0712 para tratar un déficit cognitivo asociado con retraso mental en un animal que necesite dicho tratamiento, que comprende (a) administrar al animal el agente de aumento HT0712 que potencia la función de la ruta de CREB; y (b) entrenar al animal en condiciones suficientes para producir una mejora en el

rendimiento por parte del animal de una tarea cognitiva cuyo déficit se asocia con el retraso mental. La presente invención incluye el uso de un agente particular de aumento, HT0712, que potencia la función de la ruta de CREB para uso en el tratamiento de un déficit cognitivo asociado con el retraso mental como se define en la reivindicación 1. El retraso mental impacta a los procesos cognitivos y a las funciones cognitivas, incluyendo el aprendizaje y la adquisición de memoria. El retraso mental puede ser causado por factores cromosómicos o genéticos, infecciones congénitas, teratógenos (fármacos y otros productos químicos), malnutrición, radiación o condiciones desconocidas que afectan a la implantación y a la embriogénesis. Los síndromes de retraso mental incluyen el síndrome de Rubinstein-Taybi, síndrome de Down, síndrome de Angelman, neurofibromatosis, síndrome de Coffin-Lowry, síndrome de Rett, distrofia miotónica, síndrome de X frágil (p.ej., X-1 frágil, X-2 frágil) y síndrome de William (Weeber, E.J. *et al.*, *Neuron*, 33: 845-848 (2002)). En una realización particular, se administra un inhibidor de la fosfodiesterasa 4 para el tratamiento de un déficit cognitivo asociado con retraso mental a una dosis de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 20,0 miligramos por kilogramo de peso corporal, y preferiblemente a una dosis de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10,0 miligramos por kilogramo de peso corporal, por administración. En los seres humanos, en una realización particular, se administra el inhibidor de la fosfodiesterasa 4 para el tratamiento de un déficit cognitivo asociado con retraso mental a una dosis total de aproximadamente 3,5 a 1.400 miligramos, y preferiblemente a una dosis total de aproximadamente 7 a aproximadamente 700 miligramos, por administración.

Se describen también aquí métodos para terapia de un déficit cognitivo asociado con un trastorno o afección del SNC en un animal que ha sido sometido a la manipulación de células madre neuronales, que comprenden (a) administrar al animal un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB; y (b) entrenar al animal en condiciones suficientes para estimular o inducir la actividad neuronal o un patrón de actividad neuronal en el animal. Por "manipulación de células madre neuronales" se entiende que (1) se trasplantan células madre neuronales exógenas al cerebro o a la médula espinal de un animal o (2) se estimulan o se inducen a proliferar en el animal, células madre neuronales endógenas.

Se describen también aquí métodos para la estimulación repetida de la actividad neuronal o un patrón de actividad neuronal, tal como el que subyace en un circuito o circuitos neuronales específicos, en un animal, que comprenden (a) administrar al animal un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB; y (b) entrenar al animal en condiciones suficientes para estimular o inducir la actividad neuronal o un patrón de actividad neuronal en el animal.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama esquemático que ilustra un mecanismo neuronal de la plasticidad cerebral, que forma la base neurológica para el entrenamiento cognitivo aumentado. Los protocolos de entrenamiento cognitivo específicos producen cambios (dependientes de la experiencia) en la actividad neuronal de circuitos neuronales subyacentes específicos. Esta actividad neuronal activa un proceso bioquímico que modula la expresión génica dependiente de CREB. Los efectores corriente abajo de esta cascada de factores de transcripción producen entonces cambios estructurales y funcionales de larga duración en la conectividad sináptica del circuito (esto es, memoria a largo plazo) (Dubnau J. *et al.*, *Current Biology*, 13: 286-296 (2003)). Este proceso de modificación sináptica dependiente de la experiencia se realiza en los animales normales y usualmente requiere múltiples sesiones de entrenamiento para la mayor parte de las tareas. El aumento de la ruta de CREB durante el entrenamiento reducirá el número de sesiones de entrenamiento (o acortará el intervalo de descanso entre ellas) requeridas para producir los cambios dependientes de la experiencia en la estructura y/o en la función sináptica.

La Figura 2A es una representación en gráfico de barras que describe resultados que demuestran que los inhibidores de la PDE4, rolipram y HT0712, potencian la expresión génica inducida por la forskolina en las células de neuroblastoma humano. Las unidades de luz relativas (RLU) emitidas a partir de la luciferasa se cuantificaron en células de neuroblastoma humano transfectadas de forma estable con un gen indicador de CRE-luciferasa y expuestas al vehículo solo o al fármaco (HT0712 o rolipram) durante dos horas antes de la estimulación por una dosis subóptima de forskolina. Los resultados demuestran que ambos fármacos aumentaron la expresión de CRE-luciferasa inducida por forskolina 1,9 veces más que la forskolina sola cuando se ensayaron 4 horas después de la estimulación con forskolina.

La Figura 2B es una representación en gráfico de barras que describe resultados que demuestran que los inhibidores de la PDE4, rolipram y HT0712, potencian la expresión génica inducida por la forskolina en las células de neuroblastoma humano. Se utilizó PCR en tiempo real para cuantificar la expresión de somatostatina, un gen endógeno sensible al cAMP. Se cuantifican los niveles de expresión inducidos por forskolina o por forskolina + fármaco como las diferencias en el número de ciclo umbral (ΔC_t) por encima de los grupos control con vehículo solo. Los resultados demuestran que HT0712 y rolipram produjeron aumentos de 4,6 veces y 2,3 veces respectivamente, en la expresión de somatostatina inducida por forskolina.

La Figura 3 es una representación en gráfico de barras que describe resultados que demuestran que los ratones CBP^{+/-} tienen deterioro de la memoria a largo plazo en la tarea de reconocimiento de objetos. Los ratones normales

(sin manipulación genética) y los ratones mutantes $CBP^{+/-}$ se entrenaron durante 15 minutos y se sometieron a la prueba 3 horas o 24 horas más tarde. Se cuantificó la retención de memoria como un Índice de Discriminación, la fracción de tiempo empleada en la exploración de un objeto nuevo frente a la de un objeto familiar. Los niveles de memoria de tres horas fueron similares para los ratones normales y para los ratones mutantes $CBP^{+/-}$ ($p = 0,76$; $n = 6$ para cada genotipo), pero la memoria de 24 horas fue significativamente más baja en los ratones mutantes que en los normales ($p < 0,01$; $n = 10$ para cada genotipo).

La Figura 4 es una representación en gráfico de barras que describe resultados que demuestran que los inhibidores de la PDE4, HT0712 y rolipram, mejoran el defecto de memoria a largo plazo en los ratones mutantes $CBP^{+/-}$. Los ratones normales y los ratones mutantes $CBP^{+/-}$ recibieron 0,1 mg/kg de HT0712 o de rolipram inyectados i.p. 20 minutos antes del entrenamiento. Se sometieron los animales a una sesión de entrenamiento de 15 minutos y se analizó la retención de memoria 24 horas más tarde. En los mutantes $CBP^{+/-}$ inyectados con vehículo, la memoria fue significativamente más baja que en los ratones normales inyectados con vehículo ($p < 0,01$; $n = 12$ y $n = 6$, respectivamente). En los mutantes $CBP^{+/-}$, inyectados con fármaco, la memoria fue significativamente más alta que en los mutantes inyectados con vehículo ($p < 0,05$; $N = 10$ y $N = 12$, respectivamente, para HT0712; $p < 0,05$; $N = 8$ y $N = 2$, respectivamente, para rolipram). La retención de memoria no difirió de modo significativo entre los ratones mutantes $CBP^{+/-}$ tratados con fármaco y los ratones normales tratados con fármaco ($p = 0,78$, $N = 10$ para cada grupo para HT0712; $p = 0,19$, $N = 8$ y $N = 10$, respectivamente, para rolipram).

La Figura 5 es una representación en gráfico de barras que describe resultados que muestran una curva dosis-respuesta para HT0712 en ratones normales. Los ratones recibieron una única inyección i.p. de fármaco o de vehículo solo 20 minutos antes del entrenamiento. Se utilizaron dosis de 0,001 mg/kg, 0,005 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,10 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,20 mg/kg y 0,50 mg/kg. Se sometieron los animales a un protocolo de entrenamiento de 3,5 minutos y se analizaron 24 horas más tarde. La retención de memoria en los animales inyectados con fármaco fue significativamente más alta que en los animales inyectados con vehículo solo ($N = 35$) a dosis de 0,05 mg/kg ($N = 20$; $p < 0,05$), 0,10 mg/kg ($N = 22$; $p < 0,0001$) y 0,15 mg/kg ($N = 18$; $p < 0,001$).

La Figura 6 es una representación gráfica que describe resultados que demuestran que los ratones mutantes $CBP^{+/-}$ y los ratones normales presentan una diferente sensibilidad a la dosis con HT0712. Los ratones mutantes $CBP^{+/-}$ y los ratones normales recibieron una única inyección i.p. de vehículo o de fármaco 20 minutos antes del entrenamiento. Se sometieron a una sesión de entrenamiento de 3,5 minutos y se analizaron 24 horas más tarde. En los ratones normales, la retención de memoria en los grupos tratados con fármaco fue más alta que en el grupo de vehículo solo ($N = 26$) a dosis de 0,05 mg/kg ($N = 12$; $p < 0,005$), 0,10 mg/kg ($N = 8$; $p < 0,0001$), 0,15 mg/kg ($N = 18$; $p < 0,005$) y 0,2 mg/kg ($N = 14$; $p < 0,005$). En los ratones mutantes $CBP^{+/-}$, la retención de memoria en los grupos tratados con fármaco fue más alta que en el grupo de vehículo solo ($N = 26$) a dosis de 0,10 mg/kg ($N = 8$; $p < 0,0001$), 0,15 mg/kg ($N = 10$; $p < 0,0001$) y 0,2 mg/kg ($N = 14$; $p < 0,0001$). En contraste con los ratones normales, una dosis de 0,05 mg/kg de HT0712 falló en la mejora de la memoria en los ratones mutantes $CBP^{+/-}$ ($N = 26$; $p = 0,79$).

Descripción detallada de la invención

Para muchas tareas en muchas especies, incluyendo el ser humano, los protocolos de entrenamiento espaciado (múltiples sesiones de entrenamiento con un intervalo de descanso entre cada una) producen una memoria más fuerte, de mayor duración que los protocolos de entrenamiento concentrado (múltiples sesiones de entrenamiento sin ningún intervalo de descanso entre ellas). Los estudios genéticos de comportamiento del aprendizaje olfatorio de Pavlov en la *Drosophila* han establecido que el entrenamiento concentrado produce una memoria de larga duración que sin embargo desaparecerá en al menos 4 días, que no es dependiente de la síntesis de proteínas, que no se interrumpe por la sobreexpresión de un transgén represor de CREB, y que se interrumpe en los mutantes *radish* (Tully, T. *et al.*, *Cell*, 79(1): 35-47 (1994); y Yin, J.C. *et al.*, *Cell*, 79(1): 49-58 (1994)). Por el contrario, el entrenamiento espaciado produce una memoria de larga duración que persiste durante al menos siete días, que es dependiente de la síntesis de proteínas, que se interrumpe por la sobreexpresión de un transgén represor de CREB y que es normal en los mutantes *radish* (Tully, T. *et al.*, *Cell*, 79(1): 35-47 (1994); y Yin, J.C. *et al.*, *Cell*, 79(1): 49-58 (1994)). Un día después del entrenamiento espaciado, la retención de memoria se compone tanto de la memoria temprana (ARM) independiente de la síntesis de proteínas e independiente de CREB como de la memoria a largo plazo (LTM) dependiente de la síntesis de proteínas y dependiente de CREB. El entrenamiento concentrado adicional es insuficiente para inducir la memoria a largo plazo (Tully, T. *et al.*, *Cell*, 79(1): 35-47 (1994); y Yin, J.C. *et al.*, *Cell*, 79(1): 49-58 (1994)).

Una cantidad creciente de pruebas extiende estos resultados de los invertebrados a los mamíferos. Por ejemplo, en *Aplysia*, las manipulaciones moleculares de la expresión de CREB, similares a las de las moscas, suprimen o potencian (i) la memoria a largo plazo de una respuesta electrofisiológica facilitadora en una monosinapsis sensoriomotora en cultivo celular y (ii) las conexiones sinápticas entre las neuronas motoras y sensoriales que se producen normalmente después de aplicaciones espaciadas del estímulo facilitador (Bartsch, D. *et al.*, *Cell*, 83 (6): 979-992 (1995)). En las ratas, las inyecciones de oligonucleótidos de RNA antisentido en el hipocampo o en la

amígdala bloquean la formación de la memoria a largo plazo de dos tareas diferentes que dependen de la actividad en estas regiones anatómicas, respectivamente (Guzowski, J.F. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (94) 6: 2693-2698 (1997); y Lamprecht, R. *et al.*, J Neurosci., 17 (21): 8443-8450 (1997)). En los ratones, la formación de la memoria a largo plazo tanto para tareas implícitas como explícitas es defectuosa en los ratones mutantes de CREB (Bourtchuladze, R. *et al.*, Cell, (79) 1: 59-68 (1994)).

El entrenamiento de ratones transgénicos, que portan un gen indicador dependiente de CRE (elemento de respuesta a cAMP) (beta-galactosidasa), en el condicionamiento de miedo contextual dependiente del hipocampo o en tareas de evitación pasiva induce la expresión de un gen indicador dependiente de CRE en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo. El entrenamiento de estos ratones en una tarea de condicionamiento de miedo dependiente de la amígdala induce la expresión del gen indicador dependiente de CRE en la amígdala, pero no en el hipocampo. Por lo tanto, los protocolos de entrenamiento que inducen la formación de la memoria a largo plazo inducen también la transcripción del gen dependiente de CRE en áreas anatómicas específicas del cerebro de los mamíferos (Impey, S. *et al.*, Nat. Neurosci., 1 (7): 595-601 (1998)).

Con estos modelos animales, se han demostrado tres casos destacados de potenciación de la memoria a largo plazo. En primer lugar, la sobreexpresión de un transgén activador de CREB anula la necesidad de sesiones múltiples de entrenamiento espaciado y, en su lugar, induce la formación de la memoria a largo plazo después de una única sesión de entrenamiento (que normalmente produce poca o ninguna retención de memoria 24 horas después (Yin, J.C. *et al.*, Cell, 81 (1): 107-115 (1995)). En segundo lugar, la inyección de un transgén activador de CREB expresado en virus en la amígdala de la rata también es suficiente para aumentar la memoria después de entrenamiento concentrado para la respuesta de sobresalto potenciado por miedo, que anula la necesidad de un intervalo de descanso en el entrenamiento espaciado (Josselyn, S.A. *et al.*, Society for Neuroscience, Vol. 24, Abstract 365.1.0 (1998); y Josselyn, S.A. *et al.*, J. Neurosci. 21: 2404-2412 (2001)). En tercer lugar, la formación de la memoria a largo plazo en ratones deficientes en CREB (Bourtchuladze, R. *et al.*, Cell, 79 (1): 59-68 (1994)) se puede producir normalmente, si los ratones mutantes se someten a un protocolo de entrenamiento espaciado diferente, (Kogan, J.H. *et al.*, Curr. Biol., 7 (1): 1-11 (1997)).

El CREB aparece también implicado en diversas formas de plasticidad de desarrollo y plasticidad celular en el cerebro de los vertebrados. Por ejemplo, la actividad neuronal aumenta la actividad de CREB en la corteza (Moore, A.N. *et al.*, J. Biol. Chem., 271 (24): 14214-14220 (1996)). El CREB media también en la plasticidad de desarrollo en el hipocampo (Murphy, D.D. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (4): 1482-1487 (1997)), en la corteza somatosensorial (Glazewski, S. *et al.*, Cereb. Cortex, 9 (3): 249-256 (1999)), en el cuerpo estriado (Liu, F.C. *et al.*, Neuron, 17 (6): 1133-1144 (1996)) y en la corteza visual (Pham, T.A. *et al.*, Neuron, 22 (1): 63-72 (1999)).

El CREB parece verse afectado en la enfermedad neurodegenerativa y en lesiones cerebrales humanas. Por ejemplo, la activación y/o la expresión de CREB se interrumpe en la enfermedad de Alzheimer (Ikezu, T. *et al.*, EMBO J, 15 (10): 2468-2475 (1996); Sato, N. *et al.*, Biochem. Biophys. Res Commun., 232 (3): 637-642 (1997); y Yamamoto-Sasaki, M. *et al.*, Brain. Res., 824 (2): 300-303 (1999)). La activación y/o la expresión de CREB es también elevada después de ataques o de isquemia (Blendy, J.A. *et al.*, Brain. Res., 681 (1-2): 8-14 (1995); y Tanaka, K. *et al.*, Neuroreport, 10 (11): 2245-2250 (1999)). El "enriquecimiento ambiental" es neuroprotector, evitando la muerte celular al actuar a través de CREB (Young, D. *et al.*, Nat., Med., 5 (4): 448-453 (1999)).

El CREB funciona durante la sensibilidad a las drogas y la abstinencia de las drogas. Por ejemplo, el CREB se ve afectado por el etanol (Pandey, S.C. *et al.*, Alcohol Clin. Exp. Res., 23 (9): 1425-1434 (1999); Constantinescu, A. *et al.*, J. Biol. Chem., 274 (38): 26985-26991 (1999); Yang, X. *et al.*, Alcohol Clin. Exp. Res., 22 (2): 382-390 (1998); Yang, X. *et al.*, J. Neurochem., 70 (1): 224-232 (1998); y Moore, M.S. *et al.*, Cell, 93 (6): 997-1007 (1998)), por la cocaína (Carlezon, W.A., Jr. *et al.*, Science, 282 (5397): 2272-2275 (1998)), por la morfina (Widnell, K.L. *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 276 (1): 306-315 (1996)), por la metanfetamina (Muratake, T. *et al.*, Ann N. Y. Acad. Sci., 844: 21-26 (1998)) y por los cannabinoides (Calandra, B. *et al.*, Eur. J. Pharmacol., 374 (3): 445-455 (1999); y Herring, A.C. *et al.*, Biochem. Pharmacol., 55 (7): 1013-1023 (1998)).

Una ruta de transducción de señales que puede estimular la ruta de transcripción de CREB/CRE es el sistema regulador de cAMP. De forma consistente con esto, los ratones que carecen tanto de la enzima adenilato ciclasa 1 (AC1) como de la enzima AC8 fallan en el aprendizaje (Wong S.T. *et al.*, Neuron, 23 (4): 787-798 (1999)). En estos ratones, la administración de forskolina al área CA1 del hipocampo restablece el aprendizaje y la memoria de las tareas dependientes del hipocampo. Además, el tratamiento de las ratas viejas con fármacos que elevan los niveles de cAMP (tales como rolipram y los agonistas del receptor D1) mejora una pérdida dependiente de la edad de la memoria dependiente del hipocampo y la potenciación celular a largo plazo (Barad, M. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95 (25): 15020-15025 (1998)). Estos últimos datos dan a entender que una señalización de cAMP es defectuosa en las ratas viejas con deterioro del aprendizaje (Bach, M.E. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96 (9): 5280-5285 (1999)).

Se describe además una metodología, también denominada en el presente documento entrenamiento cognitivo aumentado (ACT), que puede (1) rehabilitar diferentes formas de la disfunción cognitiva o (2) mejorar el rendimiento

cognitivo normal. El entrenamiento cognitivo aumentado actúa mediante un mecanismo molecular general de plasticidad sináptica, que aparentemente convierte el efecto bioquímico de una experiencia de nueva adquisición en un cambio estructural de la sinapsis de larga duración. El entrenamiento cognitivo aumentado se puede aplicar para cualquier aspecto de la función cerebral que muestre un aumento duradero del rendimiento después del entrenamiento cognitivo. En consecuencia, el entrenamiento cognitivo aumentado se puede usar en la rehabilitación de un animal con cualquier forma de disfunción cognitiva o en la potenciación o mejora de cualquier aspecto del rendimiento cognitivo normal en un animal.

Un grupo creciente de pruebas da a entender que las neuronas continúan proliferando en el cerebro adulto (Arsenijevic, Y. *et al.*, *Exp. Neurol.*, 170: 48-62 (2001); Vescovi, A. L. *et al.*, *Biomed. Pharmacother.*, 55: 201-205 (2001); Cameron, H. A. and McKay, R. D. J. *Comp. Neurol.*, 435: 406-417 (2001); y Geuna, S. *et al.*, *Anat. Rec.*, 265: 132-141 (2001)) y que dicha proliferación es en respuesta a diversas experiencias (Nilsson, M. *et al.*, *J. Neurobiol.*, 39: 569-578 (1999); Gould, E. *et al.*, *Trends Cogn. Sci.*, 3: 186-192 (1999); Fuchs, E. and Gould, E., *Eur. J. Neurosci.*, 12: 2211-2214 (2000); Gould, E. *et al.*, *Biol. Psychiatry*, 48: 715-720 (2000); y Gould, E. *et al.*, *Nat. Neurosci.*, 2: 260-265 (1999)). Ahora se están llevando a cabo estrategias experimentales para trasplantar células madre neuronales en el cerebro adulto para diversas indicaciones terapéuticas (Kurimoto, Y. *et al.*, *Neurosci. Lett.*, 306: 57-60 (2001); Singh, G., *Neuropathology*, 21: 110-114 (2001); y Cameron, H. A. and McKay, R. D., *Nat. Neurosci.*, 2: 894-897 (1999)). Ya se conoce mucho acerca de la neurogénesis en las etapas embrionarias del desarrollo (Saitoe, M. and Tully, T., "Making connections between synaptic and behavioral plasticity in *Drosophila*", en *Toward a Theory of Neuroplasticity*, J. McEachern and C. Shaw, Eds. (New York: Psychology Press.), pp. 193-220 (2000)). La diferenciación neuronal, la extensión de neuritas y el reconocimiento de la diana sináptica inicial parece que se producen todos de una manera independiente de la actividad. Sin embargo, la sinaptogénesis y el crecimiento sináptico posteriores, requieren después una actividad neuronal continua para ajustar las conexiones sinápticas de una manera funcionalmente relevante. Estos hallazgos sugieren que la integración funcional (final) de las células madre neuronales trasplantadas requiere actividad neuronal. Por lo tanto, el entrenamiento cognitivo aumentado se puede usar para ejercitar los circuitos neuronales apropiados para ajustar las conexiones sinápticas de las células madre trasplantadas de nueva adquisición que se diferencian en neuronas. Por "ejercitar el circuito o circuitos neuronales apropiados" se entiende la inducción en el circuito o circuitos neuronales apropiados de un patrón de actividad neuronal, que corresponde al producido por un protocolo de entrenamiento cognitivo particular. El protocolo de entrenamiento cognitivo se puede usar para inducir dicha actividad neuronal. Como alternativa, se puede inducir la actividad neuronal por estimulación eléctrica directa del conjunto de circuitos neuronales. "Actividad neuronal" y "actividad neural" se usan de forma intercambiable en el presente documento.

El entrenamiento cognitivo aumentado comprende un protocolo de entrenamiento específico para cada función cerebral y una administración general de fármacos potenciadores de la ruta de CREB. El protocolo de entrenamiento (entrenamiento cognitivo) induce la actividad neuronal en regiones específicas del cerebro y produce un mejor rendimiento de una función cerebral (cognitiva) específica. Los fármacos potenciadores de la ruta de CREB, también denominados aquí agentes de aumento, potencian la función de la ruta de CREB, que se requiere para consolidar la información de nueva adquisición en la memoria a largo plazo. Por "potenciar la función de la ruta de CREB" se entiende la capacidad de potenciar o mejorar la expresión génica dependiente de CREB. La expresión génica dependiente de CREB se puede potenciar o mejorar aumentando la producción de CREB endógeno, por ejemplo estimulando directa o indirectamente el gen endógeno para producir el aumento de las cantidades de CREB o aumentando el CREB funcional (biológicamente activo). Véase, p.ej., Patente de Estados Unidos N° 5.929.223; Patente de Estados Unidos N° 6.051.559; y Publicación Internacional N° WO9611270 (publicada el 18 de abril de 1996), cuyas referencias se incorporan aquí en su totalidad como referencia. La administración de fármacos potenciadores de la ruta de CREB reduce el entrenamiento necesario para producir un aumento de rendimiento con respecto al producido con entrenamiento solo. En particular, el entrenamiento cognitivo aumentado puede mejorar el entrenamiento cognitivo reduciendo el número de sesiones de entrenamiento requeridas para producir un aumento de rendimiento con respecto al producido con entrenamiento cognitivo solo o requiriendo intervalos de descanso más cortos o eliminándolos entre las sesiones de entrenamiento para producir un aumento de rendimiento. De esta manera, el entrenamiento cognitivo aumentado puede mejorar la eficiencia de las técnicas de entrenamiento cognitivo, produciendo de este modo un importante beneficio económico. Por "aumento de rendimiento" se entiende una mejora en un aspecto del rendimiento cognitivo.

Se describen métodos para potenciar un aspecto específico del rendimiento cognitivo en un animal (particularmente en un ser humano o en otro mamífero o vertebrado) que lo necesite, que comprenden (a) administrar al animal un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB; y (b) entrenar al animal en condiciones suficientes para producir una mejora en la realización de una tarea cognitiva particular por el animal.

El entrenamiento puede comprender una o múltiples sesiones de entrenamiento y es entrenamiento apropiado para producir una mejora en el rendimiento de la tarea cognitiva de interés. Por ejemplo, si se desea una mejora en la adquisición del lenguaje, el entrenamiento se debe enfocar en la adquisición del lenguaje. Si se desea una mejora en la capacidad para aprender a tocar un instrumento musical, el entrenamiento se debe enfocar en aprender a tocar el instrumento musical. Si se desea una mejora en una habilidad motora particular, el entrenamiento se debe enfocar

en la adquisición de la habilidad motora particular. La tarea cognitiva específica de interés se corresponde con el entrenamiento apropiado.

También se describen métodos para la estimulación repetida de la actividad neuronal o un patrón de actividad neuronal, tal como el que subyace en un circuito o circuitos neuronales específicos, en un animal, que comprenden (a) administrar al animal un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB; y (b) entrenar al animal en condiciones suficientes para estimular o inducir la actividad neuronal o un patrón de actividad neuronal en el animal. En este caso, el entrenamiento es entrenamiento apropiado para estimular o inducir la actividad neuronal o un patrón de actividad neuronal en el animal.

Por "múltiples sesiones de entrenamiento" se entienden dos o más sesiones de entrenamiento. El agente de aumento se puede administrar antes, durante o después de una o más de las sesiones de entrenamiento. En una realización particular, el agente de aumento se administra antes y durante cada sesión de entrenamiento. El tratamiento con un agente de aumento en conexión con cada sesión de entrenamiento se denomina también "tratamiento de aumento". Por "entrenamiento" se entiende entrenamiento cognitivo.

Se conocen y están fácilmente disponibles en la técnica protocolos de entrenamiento cognitivo. Véase, por ejemplo, Karni, A. and Sagi, D., "Where practice makes perfect in text discrimination: evidence for primary visual cortex plasticity", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 4966-4970 (1991); Karni, A. and Sagi, D., "The time course of learning a visual skill", *Nature*, 365: 250-252 (1993); Kramer, A.F. *et al.*, "Task coordination and aging: explorations of executive control processes in the task switching paradigm", *Acta Psychol. (Amst.)*, 101: 339-378 (1999); Kramer, A.F. *et al.*, "Training for executive control: Task coordination strategies and aging", In *Aging and Skilled Performance: Advances In Theory and Applications*, W. Rogers *et al.*, eds. (Hillsdale, N.J.: Erlbaum) (1999); Rider, R.A. and Abdulahad, D.T., "Effects of massed versus distributed practice on gross and fine motor proficiency of educable mentally handicapped adolescents", *Percept. Mot. Skills*, 73: 219-224 (1991); Willis, S.L. and Schaie, K.W., "Training the elderly on the ability factors of spatial orientation and inductive reasoning", *Psychol. Aging*, 1: 239-247 (1986); Willis, S.L. and Nesselroade, C.S., "Long-term effects of fluid ability training in old-old age", *Develop. Psychol.*, 26: 905-910 (1990); Wek, S.R. and Husak, W.S., "Distributed and massed practice effects on motor performance and learning of autistic children", *Percept. Mot. Skills*, 68: 107-113 (1989); Verhaegen, P. *et al.*, "Improving memory performance in the aged through mnemonic training: a meta-analytic study", *Psychol. Aging*, 7: 242-251 (1992); Verhaegen, P. and Salthouse, T.A., "Meta-analyses of age-cognition relations in adulthood: estimates of linear and nonlinear age effects and structural models", *Psychol. Bull.*, 122: 231-249 (1997); Dean, C.M. *et al.*, "Task-related circuit training improves performance of locomotor tasks in chronic stroke: a randomized, controlled pilot trial", *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 81: 409-417 (2000); Greener, J. *et al.*, "Speech and language therapy for aphasia following stroke", *Cochrane Database Syst. Rev.*, CD000425 (2000); Hummelsheim, H. and Eickhof, C., "Repetitive sensorimotor training for arm and hand in a patient with locked-in syndrome", *Scand. J. Rehabil. Med.*, 31: 250-256 (1999); Johansson, B.B., "Brain plasticity and stroke rehabilitation. The Willis lecture", *Stroke*, 31: 223-230 (2000); Ko Ko, C., "Effectiveness of rehabilitation for multiple sclerosis", *Clin. Rehabil.*, 13 (Suppl. 1): 33-41 (1999); Lange, G. *et al.*, "Organizational strategy influence on visual memory performance after stroke: cortical/subcortical and left/right hemisphere contrasts", *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 81: 89-94 (2000); Liepert, J. *et al.*, "Treatment-induced cortical reorganization after stroke in humans", *Stroke*, 31: 1210-1216 (2000); Lotery, A.J. *et al.*, "Correctable visual impairment in stroke rehabilitation patients", *Age Ageing*, 29: 221-222 (2000); Majid, M.J. *et al.*, "Cognitive rehabilitation for memory deficits following stroke" (Cochrane review), *Cochrane Database Syst. Rev.*, CD002293 (2000); Merzenich, M. *et al.*, "Cortical plasticity underlying perceptual, motor, and cognitive skill development: implications for neurorehabilitation", *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 61: 1-8 (1996); Merzenich, M.M. *et al.*, "Temporal processing deficits of language-learning impaired children ameliorated by training", *Science*, 271: 77-81 (1996); Murphy, E., "Stroke rehabilitation", *J. R. Coll. Physicians Lond.*, 33: 466-468 (1999); Nagarajan, S.S. *et al.*, "Speech modifications algorithms used for training language learning-impaired children", *IEEE Trans. Rehabil. Eng.*, 6: 257-268. (1998); Oddone, E. *et al.*, "Quality Enhancement Research Initiative in stroke: prevention, treatment, and rehabilitation", *Med Care* 38: 192-1104 (2000); Rice-Oxley, M. y Turner-Stokes, L., "Effectiveness of brain injury rehabilitation", *Clin. Rehabil.*, 13 (Supl 1): 7-24 (1999); Tallal, P. *et al.*, "Language learning impairments: integrating basic science, technology, and remediation", *Exp. Brain Res.*, 123: 210-219 (1998); Tallal, P. *et al.*, "Language comprehension in language-learning impaired children improved with acoustically modified speech", *Science*, 271: 81-84 (1996); Wingfield, A. *et al.*, "Regaining lost time: adult aging and the effect of time restoration on recall of time-compressed speech", *Psychol. Aging*, 14: 380-389 (1999), cuyas referencias se incorporan aquí en su totalidad por referencia.

Como se usa en el presente documento, el término "animal" incluye los mamíferos, así como otros animales vertebrados e invertebrados (p.ej., aves, peces, reptiles, insectos (p.ej., especies de *Drosophila*), moluscos (p.ej., *Aplysia*). El término "mamífero", como se usa aquí, se refiere a cualquier animal vertebrado, incluyendo monotremas, marsupiales y placentarios, que amamantan a sus crías y o bien paren crías vivas (mamíferos placentarios o euterios) o bien ponen huevos (mamíferos no placentarios o metaterios). Los ejemplos de especies de mamíferos incluyen los seres humanos y los primates (p.ej., monos, chimpancés), roedores (p.ej., ratas, ratones, cobayas) y rumiantes (p.ej., vacas, cerdos, caballos).

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

5 La disfunción cognitiva, comúnmente asociada con disfunción cerebral y trastornos o afecciones del sistema nervioso central (SNC), surge debido a la herencia, a enfermedad, lesión y/o la edad. Los trastornos y afecciones del SNC asociados con alguna forma y grado de insuficiencia (disfunción) cognitiva incluyen, pero no se limitan a lo siguiente:

1) deterioro de la memoria asociado a la edad;

10 2) trastornos neurodegenerativos, tales como delirio (estado confusional agudo); demencia, incluyendo la enfermedad de Alzheimer y las demencias de tipo no Alzheimer, tales como demencia de cuerpos de Lewy, demencia vascular, demencia de Binswanger (encefalopatía arteriosclerótica subcortical), demencias asociadas con la enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Huntington (corea), enfermedad de Pick, hidrocefalia de presión normal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, neurosífilis (paresia general) o infección por VIH, síndrome de demencia del lóbulo frontal, demencias asociadas con traumatismo craneal, incluyendo demencia pugilística, traumatismo cerebral, hematoma subdural, tumor cerebral, hipotiroidismo, deficiencia de vitamina B₁₂, radiación intracraneal; otros trastornos neurodegenerativos;

15 3) trastornos psiquiátricos, incluyendo trastornos afectivos (trastornos anímicos), tales como depresión, incluyendo pseudodemencia depresiva; trastornos psicóticos, tales como esquizofrenia y autismo (síndrome de Kanner); trastornos neuróticos, tales como ansiedad y trastorno obsesivo compulsivo; trastorno de déficit de atención;

20 4) pérdida de función cognitiva dependiente de traumatismo, tal como la asociada con (debida a) enfermedades cerebrovasculares, incluyendo ictus e isquemia, incluyendo el ictus isquémico; traumatismo cerebral, incluyendo hematoma subdural y tumor cerebral; lesión de cabeza;

25 5) trastornos asociados con alguna forma y grado de disfunción cognitiva que surge debido a un defecto genético, tal como síndrome de Rubinstein-Taybi, síndrome de Down, síndrome de Angelman, síndrome de X frágil (X-1 frágil, X-2 frágil), neurofibromatosis, síndrome de Coffin-Lowry, distrofia miotónica, síndrome de Rett, síndrome de William, síndrome de Klinefelter, mosaicismos, trisomía 13 (síndrome de Patau), trisomía 18 (síndrome de Edward), síndrome de Turner, síndrome del maullido de gato, síndrome de Lesch-Nyhan (hiperuricemia), síndrome de Hunter, síndrome oculocerebrorenal de Lowe, enfermedad de Gaucher, síndrome de Hurler (mucopolisacaridosis), enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Tay-Sachs, galactosemia, enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce, fenilcetonuria, aminoacidurias, acidemias, esclerosis tuberosa y microcefalia primaria;

30 6) discapacidades de aprendizaje, de lenguaje o de lectura, particularmente en los niños. Por "discapacidades de aprendizaje" se entienden trastornos de los procesos psicológicos básicos que afectan a la forma en que un individuo aprende. Las discapacidades de aprendizaje pueden provocar dificultades en escuchar, pensar, hablar, leer, escribir, deletrear, hacer cálculos o combinaciones de cualquiera de las anteriores. Las discapacidades de aprendizaje incluyen minusvalías perceptuales, dislexia y afasia del desarrollo.

35 Las expresiones "rendimiento cognitivo" y "función cognitiva" son términos reconocidos en la técnica y se usan en el presente documento de acuerdo con sus significados aceptados en la técnica. Por "tarea cognitiva" se entiende una función cognitiva. Las funciones cognitivas incluyen adquisición de memoria, discriminación visual, discriminación auditiva, funcionamiento ejecutivo, aprendizaje de habilidades motoras, razonamiento abstracto, capacidad espacial, habilidades de habla y lenguaje y adquisición del lenguaje. Por "potenciar un aspecto específico del rendimiento cognitivo" se entiende la capacidad para potenciar o mejorar una función cognitiva o cerebral específica, tal como, por ejemplo, la adquisición de memoria o la realización de una tarea aprendida. Por "mejora en el rendimiento de una tarea cognitiva particular" se entiende una mejora en el rendimiento de una tarea cognitiva específica o aspecto de la función cerebral con respecto al rendimiento antes del entrenamiento. Por ejemplo si, después de un ictus, un paciente solamente puede mover su dedo del pie, una mejora en el rendimiento (aumento de rendimiento) en el paciente debería ser la capacidad de caminar, por ejemplo.

40 Se describen métodos para tratar un déficit cognitivo asociado con un trastorno o afección del SNC en un animal (particularmente en un ser humano o en otro mamífero o vertebrado) que necesite dicho tratamiento, que comprenden (a) administrar al animal el agente de aumento HT0712 que potencia la función de la ruta de CREB; y (b) entrenar al animal en condiciones suficientes para producir una mejora en el rendimiento de una tarea cognitiva particular por el animal.

45 Se describe un método para tratar un déficit cognitivo asociado con el deterioro de la memoria asociado con la edad en un animal que necesite dicho tratamiento, que comprende (a) administrar al animal un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB; y (b) entrenar al animal en condiciones suficientes para producir una mejora

en la realización por el animal de una tarea cognitiva cuya pérdida se asocia con el deterioro de la memoria asociado con la edad.

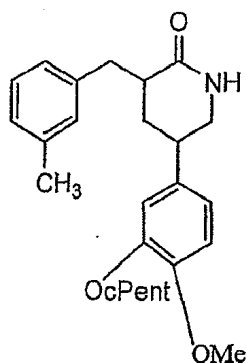
5 Se describe también un método para tratar un déficit cognitivo asociado con una enfermedad neurodegenerativa (p.ej., enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, otra demencia senil) en un animal que necesite dicho tratamiento, que comprende (a) administrar al animal un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB; y (b) entrenar al animal en condiciones suficientes para producir una mejora en la realización por el animal de una tarea cognitiva, cuyo déficit se asocia con la enfermedad neurodegenerativa.

10 Se describe también un método para tratar un déficit cognitivo asociado con una enfermedad psiquiátrica (p.ej., depresión, esquizofrenia, autismo, trastorno de déficit de atención) en un animal que necesite dicho tratamiento, que comprende (a) administrar al animal un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB; y (b) entrenar al animal en condiciones suficientes para producir una mejora en la realización por el animal de una tarea cognitiva cuyo déficit está asociado con la enfermedad psiquiátrica.

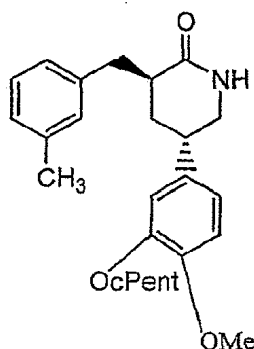
15 Se describe también un método para tratar un déficit cognitivo asociado con la pérdida de función cognitiva dependiente de traumatismo (p.ej., enfermedades cerebrovasculares (p.ej., ictus, isquemia), tumor cerebral, lesión de cabeza o cerebro) en un animal que necesite dicho tratamiento, que comprende (a) administrar al animal un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB; y (b) entrenar al animal en condiciones suficientes para producir una mejora en la realización por el animal de una tarea cognitiva cuyo déficit está asociado con pérdida de la función cognitiva dependiente de traumatismo.

20 Se describe un método para tratar un déficit cognitivo asociado con un defecto genético (síndrome de Down, síndrome de Angelman, neurofibromatosis, síndrome de Coffin-Lowry, síndrome de Rett, distrofia miotónica, síndrome de X frágil (p.ej., X-1 frágil, X-2 frágil) y síndrome de William) en un animal que necesite dicho tratamiento, que comprende (a) administrar al animal un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB; y (b) entrenar al animal en condiciones suficientes para producir una mejora en la realización por el animal de una tarea cognitiva cuyo déficit está asociado con un defecto genético.

25 En una realización particular, la invención se refiere a HT0712 para uso en métodos para tratar un déficit cognitivo asociado con retraso mental en un animal que necesite dicho tratamiento, que comprende (a) administrar al animal un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB; y (b) entrenar al animal en condiciones suficientes para producir una mejora en la realización por el animal de una tarea cognitiva cuyo déficit está asociado con retraso mental. La invención utiliza un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB para la
30 fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de un déficit cognitivo asociado con retraso mental. El agente de aumento es el inhibidor de la fosfodiesterasa 4 (PDE4), HT0712. También se describen otros agentes de aumento que son inhibidores de la PDE4. Los ejemplos de inhibidores de la PDE4 incluyen el rolipram y los compuestos de la siguiente fórmula:



35 en donde "Me" significa "metilo" y "cPent" significa "ciclopentilo". Se entiende que la fórmula anterior engloba tanto los enantiómeros como sus mezclas. Los compuestos se pueden preparar utilizando la metodología provista en la Patente de Estados Unidos N° 6.458.829, cuyas enseñanzas se incorporan aquí como referencia. En una realización particular, los carbonos 3 y 5 de la fórmula anterior están en la configuración S:



en donde "Me" significa "metilo" y "cPent" significa "ciclopentilo". Otros ejemplos de inhibidores de PDE4 se pueden encontrar en la Publicación de Estados Unidos No. 2002/0028842 A1 (publicada el 7 de marzo de 2002); Patente de Estados Unidos N° 6.458.829B1; Patente de Estados Unidos N° 6.525.055B1; Patente de Estados Unidos N° 5.552.438; Patente de Estados Unidos N° 6.436.965; y Patente de Estados Unidos N° 6.204.275. Además se conocen o están disponibles en la técnica otros inhibidores de PDE4.

El retraso mental impacta a los procesos cognitivos y a las funciones cognitivas, incluyendo el aprendizaje y la adquisición de memoria (Weeber, E.J. *et al.*, Neuron, 33: 845-848). El retraso mental puede ser causado por factores cromosómicos o genéticos, infecciones congénitas, teratógenos (fármacos y otros productos químicos), malnutrición, radiación o condiciones desconocidas que afectan a la implantación y a la embriogénesis. Los síndromes de retraso mental incluyen el síndrome de Klinefelter, mosaicismos, trisomía 13 (síndrome de Patau), trisomía 18 (síndrome de Edward), síndrome de Turner, síndrome del maullido de gato, síndrome de Lesch-Nyhan (hiperuricemia), síndrome de Hunter, síndrome oculocerebrorenal de Lowe, enfermedad de Gaucher, síndrome de Hurler (mucopolisacaridosis), enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Tay-Sachs, galactosemia, enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce, fenilcetonuria, aminoacidurias, acidemias, esclerosis tuberosa y microcefalia primaria. Los síndromes de retraso mental incluyen también el síndrome de Rubinstein-Taybi, síndrome de Down, síndrome de Angelman, neurofibromatosis, síndrome de Coffin-Lowry, síndrome de Rett, distrofia miotónica, síndrome de X frágil (p.ej., X-1 frágil, X-2 frágil) y síndrome de William (Weeber, E.J. *et al.*, Neuron, 33: 845-848 (2002)).

Se proporcionan métodos de terapia de un déficit cognitivo asociado con un trastorno o una afección del SNC en un animal que se haya sometido a una manipulación de células madre neuronales, que comprenden (a) administrar al animal un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB; y (b) entrenar al animal en condiciones suficientes para estimular o inducir la actividad neuronal o un patrón de actividad neuronal en el animal. Por "manipulación de células madre neuronales" se entiende que (1) se trasplantan células madre neuronales exógenas al cerebro o a la médula espinal de un animal o (2) se estimulan o se inducen a proliferar en el animal células madre neuronales endógenas. Se conocen y están fácilmente disponibles en la técnica métodos para trasplantar células madre neuronales al cerebro o a la médula espinal de un animal (véase, p.ej., Cameron, H. A. and McKay, R. D., Nat. Neurosci., 2: 894-897 (1999); Kurimoto, Y. *et al.*, Neurosci. Lett., 306: 57-60 (2001); y Singh, G., Neuropathology, 21: 110-114 (2001)). Se conocen y están fácilmente disponibles en la técnica métodos para estimular o inducir la proliferación de células madre neuronales endógenas en un animal (véase, p.ej., Gould, *et al.*, Trends Cogn. Sci" 3: 186-192 (1999); Gould, E. *et al.*, Biol. Psychiatry, 48: 715-20 (2000); Nilsson, M. *et al.*, J. Neurobiol., 39: 569-578 (1999); Fuchs, E. and Gould, E., Eur. J. Neurosci., 12: 2211-2214 (2000); y Gould, E. *et al.*, Nat. Neurosci., 2: 260-265 (1999)). Los métodos particulares para trasplantar células madre neuronales al cerebro o a la médula espinal de un animal y los métodos particulares para estimular o inducir la proliferación de células madre neuronales endógenas en un animal no son críticos para la práctica de la invención.

Se describen también métodos para mejorar o potenciar el aprendizaje y/o el rendimiento en un animal con una discapacidad de aprendizaje, de lenguaje o de lectura o combinaciones de cualquiera de las anteriores, que comprenden (a) administrar al animal un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB; y (b) entrenar al animal en condiciones suficientes para producir una mejora en la realización por el animal de una tarea cognitiva asociada con la discapacidad en el rendimiento de aprendizaje, lenguaje o lectura.

Los agentes de aumento, como se usan en el presente documento, son compuestos con actividad farmacológica e incluyen fármacos, compuestos químicos, compuestos iónicos, compuestos orgánicos, ligandos orgánicos, incluyendo cofactores, sacáridos, péptidos recombinantes y sintéticos, proteínas, peptoides, secuencias de ácido nucleico, incluyendo genes, productos de ácido nucleico y otras moléculas y composiciones.

Por ejemplo, los agentes de aumento pueden ser análogos de cAMP que permean las células (p.ej., 8-bromo-cAMP); activadores de adenilato ciclasa 1 (AC1) (p.ej., forskolina); agentes que afectan al receptor ligado a la

proteína G, tales como, pero sin limitarse a ellos, los receptores adrenérgicos y los receptores opioides y sus ligandos (p.ej., fenetilaminas); moduladores de la concentración de calcio intracelular (p.ej., taspigargina, agonistas del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA)); inhibidores de las fosfodiesterasas responsables de la ruptura de cAMP (p.ej., inhibidores de la fosfodiesterasa 1 (PDE1) (p.ej., iso-buto-meto-xantina (IBMX)), inhibidores de la fosfodiesterasa 2 (PDE2) (p.ej., iso-buto-meto-xantina (IBMX)), inhibidores de la fosfodiesterasa 3 (PDE3), inhibidores de la fosfodiesterasa 4 (PDE4) (p.ej., rolipram, HT0712), etc.) (véase también, p.ej., la Patente de Estados Unidos N° 6.458.829B1; Publicación de Estados Unidos N° 2002/0028842A1 (publicada el 7 de marzo de 2002)), y moduladores de las proteína-quinasas y proteína-fosfatasa, que median en la activación de la proteína CREB y en la expresión génica dependiente de CREB. Los agentes de aumento pueden ser CREB exógeno, análogos de CREB, moléculas tipo CREB, fragmentos de CREB biológicamente activos, proteínas de fusión de CREB, secuencias de ácido nucleico que codifican CREB exógeno, análogos de CREB, moléculas tipo CREB, fragmentos de CREB biológicamente activos o proteínas de fusión de CREB.

Los agentes de aumento pueden ser también moduladores de la función de CREB, o secuencias de ácido nucleico que codifican los moduladores de la función de CREB. Los moduladores de la función de CREB, como se usan aquí, tienen la capacidad de modular la función de la ruta de CREB. Por "modular" se entiende la capacidad para cambiar (aumentar o disminuir) o alterar la función de la ruta de CREB.

Los agentes de aumento pueden ser compuestos que son capaces de potenciar la función de CREB en el SNC. Tales compuestos incluyen, pero no se limitan a los compuestos que afectan a la estabilidad y fluidez y a la inmunoestimulación específica de la membrana. En una realización particular, el agente de aumento es capaz de potenciar transitoriamente la función de la ruta de CREB en el SNC.

Los análogos o derivados de CREB, se definen aquí como proteínas que tienen secuencias de aminoácidos análogas al CREB endógeno. Las secuencias de aminoácidos análogas se definen aquí para indicar secuencias de aminoácidos con suficiente identidad de secuencia de aminoácidos de CREB endógeno para tener la actividad biológica del CREB endógeno, pero con uno o más cambios "silenciosos" en la secuencia de aminoácidos. Los análogos de CREB incluyen CREM de mamíferos, ATF-1 de mamíferos y otros miembros de la subfamilia CREB/CREM/ATF-1.

Una molécula tipo CREB, como se usa este término aquí, se refiere a una proteína que se parece (imita) funcionalmente a CREB. Las moléculas tipo CREB no necesitan tener secuencias de aminoácidos análogas al CREB endógeno.

Los fragmentos polipeptídicos biológicamente activos de CREB pueden incluir solamente una parte de la secuencia de aminoácidos de longitud completa de CREB, pero todavía tienen actividad biológica. Tales fragmentos se pueden producir por deleciones de carboxilo o amino terminales, así como por deleciones internas.

Las proteínas de fusión comprenden una proteína CREB como se describe aquí, denominada como un primer resto, ligado a un segundo resto que no aparece en la proteína CREB. El segundo resto puede ser un único aminoácido, péptido o polipéptido u otro resto orgánico, tal como un carbohidrato, un lípido o una molécula inorgánica.

Las secuencias de ácido nucleico se definen aquí como heteropolímeros de moléculas de ácido nucleico. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser bicatenarias o monocatenarias y pueden ser una molécula de desoxirribonucleótido (DNA), tal como cDNA o DNA genómico o una molécula de ribonucleótido (RNA). De este modo, la secuencia de ácido nucleico puede incluir, por ejemplo, uno o más exones, con o sin intrones, según sea apropiado, así como una o más secuencias de control adecuadas. En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico contiene un único marco de lectura abierta que codifica un producto de ácido nucleico deseado. La secuencia de ácido nucleico está "ligada operativamente" a un promotor adecuado.

Una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CREB deseada, un análogo de CREB (incluyendo CREM, ATF-1), molécula de tipo CREB, fragmento de CREB biológicamente activo, proteína de fusión de CREB o modulador de la función de CREB, se puede aislar de la naturaleza, se puede modificar a partir de las secuencias nativas o se puede fabricar *de novo*, como se describe, por ejemplo, en Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons; New York (1998); y Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor University Press, New York. (1989). Los ácidos nucleicos se pueden aislar y fusionar entre sí por métodos conocidos en la técnica, tales como aprovechar y fabricar sitios de clonación o de restricción compatibles.

Típicamente, la secuencia de ácido nucleico será un gen que codifica la proteína CREB deseada, el análogo de CREB, la molécula de tipo CREB, la proteína de fusión de CREB o el modulador de la función de CREB. Dicho gen se liga típicamente de forma operativa a secuencias de control adecuadas capaces de efectuar la expresión de la proteína CREB o del modulador de la función de CREB, preferentemente en el SNC. La expresión "ligado de forma operativa", como se usa aquí, se define para significar que el gen (o la secuencia de ácido nucleico) se liga a

secuencias control de una manera que permite la expresión del gen (o la secuencia de ácido nucleico). Generalmente, ligado de forma operativa significa de forma contigua.

Las secuencias de control incluyen un promotor transcripcional, una secuencia operadora opcional para controlar la transcripción, un RNA mensajero adecuado (mRNA) que codifica una secuencia, sitios de unión a ribosoma y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y traducción. En una realización particular, un gen recombinante (o una secuencia de ácido nucleico) que codifica una proteína CREB, un análogo de CREB, molécula de tipo CREB, fragmento de CREB biológicamente activo, proteína de fusión de CREB o modulador de función de CREB se pueden poner bajo el control regulador de un promotor que puede ser inducido o reprimido, ofreciendo de este modo un mayor grado de control con respecto al nivel del producto.

Como se usa aquí, el término "promotor" se refiere a una secuencia de DNA, habitualmente cadena arriba (5') de la región codificante de un gen estructural, que controla la expresión de la región codificante proporcionando sitios de unión y reconocimiento para la RNA-polimerasa y otros factores que pueden ser necesarios para el inicio de la transcripción. Los promotores adecuados son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de promotores incluyen el SV40 y el factor de elongación humano (EF1). Otros promotores adecuados están fácilmente disponibles en la técnica (véase, p.ej., Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York (1998); Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor University Press, New York (1989); y la Patente de Estados Unidos N° 5.681.735).

Los agentes de aumento pueden potenciar la función de la ruta de CREB por una diversidad de mecanismos. Por ejemplo, un agente de aumento puede afectar a una ruta de transducción de señales lo que lleva a la inducción de la expresión génica dependiente de CREB. La inducción de la expresión génica dependiente de CREB se puede conseguir, por ejemplo, mediante la regulación por incremento de los efectores positivos de la función de CREB y/o mediante la regulación por reducción de los efectores negativos de la función de CREB. Los efectores positivos de la función de CREB incluyen adenilato ciclasas y activadores de CREB. Los efectores negativos de la función de CREB incluyen cAMP fosfodiesterasa (cAMP PDE) y represores de CREB.

Un agente de aumento puede potenciar la función de la ruta de CREB actuando bioquímicamente corriente arriba o actuando directamente sobre una forma activadora o represora de una proteína CREB y/o sobre un complejo de transcripción que contiene proteína CREB. Por ejemplo, la función de la ruta de CREB se puede ver afectada por el aumento de los niveles de proteína CREB transcripcionalmente, post-transcripcionalmente o tanto transcripcionalmente como post-transcripcionalmente; alterando la afinidad de la proteína CREB con otros componentes necesarios del complejo de transcripción, tales como, por ejemplo, con la proteína de unión a CREB (proteína CBP); alterando la afinidad de un complejo de transcripción que contiene proteína CREB para elementos sensibles a DNA CREB en la región promotora; o induciendo la inmunidad pasiva o activa a isoformas de proteína CREB. El mecanismo particular por el que un agente de aumento potencia la función de la ruta de CREB no es crítico para la práctica de la invención.

Los agentes de aumento se pueden administrar directamente a un animal en una variedad de modos. En una realización preferida, los agentes de aumento se administran sistémicamente. Generalmente se conocen en la técnica otras vías de administración e incluyen la vía intravenosa incluyendo la perfusión y/o la inyección por embolada, las vías intracerebroventricular, intratecal, parenteral, mucosal, de implante, intraperitoneal, oral, intradérmica, transdérmica (p.ej., en polímeros de liberación lenta), intramuscular, subcutánea, tópica, epidural, etc. Se pueden usar también otras vías adecuadas de administración, por ejemplo, para conseguir la absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneos. También se pueden administrar los agentes de aumento particulares mediante terapia génica, en la que una molécula de DNA que codifica una proteína o péptido terapéutico particular se administra al animal, p.ej., mediante un vector, que provoca que la proteína o péptido particular se expresen y secreten a niveles terapéuticos *in vivo*.

Un vector, como se usa este término en el presente documento, se refiere a un vector de ácido nucleico, p.ej., un plásmido de DNA, virus u otro replicón adecuado (p.ej., vector viral). Los vectores virales incluyen retrovirus, adenovirus, parvovirus (p.ej., virus adeno-asociados), coronavirus, virus de RNA de hebra negativa tales como los ortomixovirus (p.ej., virus de la gripe), rabdovirus (p.ej., virus de la rabia y virus de la estomatitis vesicular), paramixovirus (p.ej., sarampión y Sendai), virus de RNA de hebra positiva tales como picornavirus y alfavirus y virus de DNA bicatenario incluyendo adenovirus, herpesvirus (p.ej., virus de Herpes Simplex tipos 1 y 2, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus) y poxvirus (p.ej., vaccinia, viruela aviar y viruela de canarios). Otros virus incluyen virus Norwalk, togavirus, flavivirus, reovirus, papovavirus, hepadnavirus y virus de la hepatitis, por ejemplo. Los ejemplos de retrovirus incluyen: virus de sarcoma-leucosis aviar, virus de tipo C de mamífero, virus de tipo B, virus de tipo D, grupo HT-LV-BLV, lentivirus, espumavirus (Coffin, J.M., Retroviridae: The viruses and their replication, in Fundamental Virology, Third Edition, B.N. Fields, *et al.*, Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996). Otros ejemplos incluyen virus de leucemia murina, virus de sarcoma murino, virus de tumor mamario de ratón, virus de leucemia bovina, virus de leucemia felina, virus de sarcoma felino, virus de leucemia aviar, virus de leucemia de linfocitos T humanos, virus endógeno de babuino, virus de leucemia de gibón, virus de mono Mason Pfizer, virus de

la inmunodeficiencia de simios, virus de sarcoma de simios, virus de sarcoma de Rous y lentivirus. Otros ejemplos de vectores se describen, por ejemplo, en McVey *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.801.030.

5 Una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína o un péptido (p.ej., proteína CREB, análogo de CREB (incluyendo CREM, ATF-1), molécula de tipo CREB, fragmento de CREB biológicamente activo, proteína de fusión de CREB, modulador de función de CREB) se puede insertar en un vector de ácido nucleico de acuerdo con métodos generalmente conocidos en la técnica, (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, Eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York (1998); Sambrook *et al.*, Eds., Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor University Press, New York (1989)).

10 El modo de administración es preferiblemente en la ubicación de las células diana. En una realización particular, el modo de administración es en las neuronas.

Los agentes de aumento se pueden administrar junto con otros componentes de agentes biológicamente activos, tales como tensioactivos (p.ej., glicéridos), excipientes (p.ej., lactosa), estabilizantes, conservantes, humectantes, emolientes, antioxidantes, excipientes, diluyentes y vehículos farmacéuticamente aceptables. Si se desea, también se pueden añadir ciertos agentes edulcorantes, aromatizantes y/o colorantes.

15 Los agentes de aumento se pueden formular como una solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Son ejemplos de tales vehículos el agua, solución salina, solución de Ringer, solución de cloruro de sodio isotónica, solución de dextrosa y albúmina de suero humano al 5 %. También se pueden usar liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijos. El vehículo o el polvo liofilizado pueden contener aditivos que mantienen la isotonicidad (p.ej., cloruro de sodio, manitol) y la estabilidad química (p.ej., tampones y conservantes). La formulación se puede esterilizar por las técnicas utilizadas habitualmente. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences.

20 La dosis de agente de aumento administrada a un animal es la cantidad necesaria para efectuar un cambio en la expresión génica dependiente de CREB, particularmente en las neuronas. La dosis administrada a un animal, que incluyen la frecuencia de administración, variará dependiendo de una serie de factores, incluyendo las características farmacodinámicas del agente de aumento particular, el modo y vía de administración; la talla, edad, sexo, salud, peso corporal y dieta del receptor, la naturaleza y extensión de los síntomas a tratar o la naturaleza y extensión de la función o funciones cognitivas a potenciar o modular, el tipo de tratamiento concurrente, la frecuencia de tratamiento y el efecto deseado.

30 Los agentes de aumento se pueden administrar en dosis únicas o divididas (p.ej., una serie de dosis separadas por intervalos de días, semanas o meses), o en una forma de liberación sostenida, dependiendo de factores tales como la naturaleza y la extensión de los síntomas, el tipo de tratamiento concurrente y el efecto deseado. Otros regímenes terapéuticos o agentes se pueden usar junto con la presente invención.

La presente invención se ilustrará ahora con el siguiente ejemplo; que no se debe considerar de ningún modo como limitante.

35 Ejemplo

Se realizó este estudio para demostrar que un déficit cognitivo asociado con retraso mental se puede tratar con un inhibidor de la fosfodiesterasa 4 (PDE4) junto con un protocolo de entrenamiento cognitivo. Se realizó el estudio utilizando un modelo animal del síndrome de Rubinstein-Taybi (RTS).

40 El RTS es un trastorno genético humano caracterizado por retraso mental y anomalías físicas incluyendo pulgares anchos, dedos del pie grandes y anchos, estatura corta y anomalías craneofaciales (Rubinstein, J.H. & Taybi, H., Am. J. Dis. Child., 105: 588-608 (1963); Hennekam, R.C. *et al.*, Am. J. Ment. Retard., 96: 645-660 (1992); Levitas, A.S. & Reid, C.S., J. Intellect. Disabil. Res., 42(Pt 4): 284-292 (1998); y Cantani, A. & Gagliesi, D., Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci., 2: 81-87 (1998)). El RTS aparece aproximadamente en 1 de 125.000 nacimientos y representa tanto como 1 en 300 de los casos de personas con retraso mental institucionalizadas. En muchos pacientes, el RTS ha sido relacionado con el cromosoma 16p13.3 (Imaizumi, K. & Kuroki, Y., Am. J. Med. Genet., 38: 636-639 (1991); Breuning, M.H. *et al.*, Am. J. Hum. Genet., 52: 249-254 (1993); y Masuno, M. *et al.*, Am. J. Med. Genet., 53: 352-354 (1994)), la región del gen que codifica la proteína de unión a CREB (CBP) (Petrij, F. *et al.*, Nature, 376: 348-351 (1995)). Muchos pacientes de RTS son heterocigóticos para las mutaciones de CBP que producen truncaciones del C-terminal de CBP, lo que sugiere que un mecanismo negativo dominante puede contribuir a los síntomas clínicos (Petrij, F. *et al.*, Am. J. Med. Genet., 92: 47-52 (2000)).

Los ratones que tienen una forma truncada de CBP presentan varias anomalías de desarrollo similares a los pacientes con RTS. Los pacientes con RTS sufren retraso mental, mientras que la formación de memoria a largo plazo es defectuosa en los ratones mutantes en CBP. Parece que se conserva evolutivamente un papel crítico para la señalización de cAMP durante la formación de memoria a largo plazo dependiente de CREB.

Métodos

Ratones

La generación de ratones CBP^{+/-} fue descrita por Oike *et al.* (Human Molecular Genetics, 8: 387-396 (1999)). Los ratones CBP^{+/-} son un modelo aceptado de ratón del síndrome de Rubinstein-Taybi, particularmente porque (i) la lesión molecular (proteína truncada) en los ratones CBP^{+/-} es similar a las conocidas en algunos pacientes de RTS, (ii) la función de CBP en los ratones CBP^{+/-} heterocigóticos está reducida pero no bloqueada y (iii) la formación de memoria a largo plazo aparece específicamente interrumpida en estos animales mutantes, pero no el aprendizaje ni la memoria a corto plazo (Oike, Y. *et al.*, Human Molecular Genetics, 8: 387-396 (1999)). Para estos estudios, se generaron animales cruzando los ratones CBP^{+/-} con hembras C57BL/6 (Jackson laboratory). Se determinó el genotipo de los ratones con un protocolo de PCR como se ha descrito previamente (Oilce. Y. *et al.*, Human Molecular Genetics, 8: 387-396 (1999)). Se utilizaron para todos los experimentos ratones mutantes y crías de la misma camada normales (sin manipulación genética) emparejados por edad (12 a 14 semanas de edad en el momento de la manipulación) y sexo.

Se mantuvieron los ratones en ciclos de luz-oscuridad 12: 12, y se realizaron los experimentos durante la fase de luz del ciclo. Con la excepción de los tiempos de entrenamiento y los tiempos de prueba, los ratones tuvieron acceso *ad lib* a la comida y al agua. Se realizaron los experimentos según la norma Animal Welfare Assurance #A3280-01 y se mantuvieron los animales de acuerdo con el Acta de Bienestar Animal y la guía del Departamento de Salud y Servicios Humanos

Entrenamiento y prueba de reconocimiento de objetos

Se manipularon los ratones durante 3-5 minutos durante 5 días. El día antes del entrenamiento, se puso un ratón individual en un aparato de entrenamiento (una caja de Plexiglas de longitud = 48 cm; anchura = 38 cm y altura = 20 cm, colocada en una habitación débilmente iluminada) y se dejó que se habituara al entorno durante 15 minutos (véase también Pittenger, C. *et al.*, Neuron, 34: 447-462 (2002)). Se inició el entrenamiento veinticuatro horas después de la habituación. Se colocó de nuevo un ratón en la caja de entrenamiento, que contenía dos objetos idénticos (p.ej. un pequeño objeto con forma de cono), y se le dejó que explorara estos objetos. Se pusieron los objetos en el área central de la caja y la posición espacial de los objetos (lados izquierdo-derecho) fue compensada entre sujetos. Entre experimentos, los tiempos de entrenamiento variaron de 3,5 a 20 minutos.

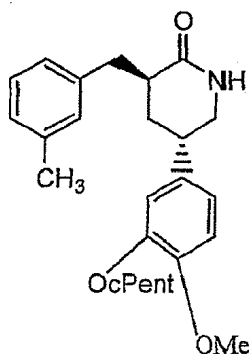
Se utilizaron tres grupos de animales separados, y si no se indica otra cosa experimentalmente sin ningún tratamiento previo. Se utilizó el primer grupo para los experimentos resumidos en las Figuras 3 y 4 (n = 10 por genotipo). Se utilizó el segundo grupo para el experimento resumido en la Figura 5 (ratones normales, n = 20). Se utilizó el tercer grupo para el experimento resumido en la Figura 6 (n = 8 por genotipo). Para cada experimento, se utilizó repetidamente el mismo grupo de animales con diferentes (nuevos) grupos de objetos para cada repetición. Todos los experimentos se diseñaron y realizaron de forma equilibrada, lo que significa que: (i) para cada condición experimental (p.ej. un específico dosis-efecto y/o un efecto genotipo-memoria) se utilizaron 2-6 ratones experimentales y 2-6 ratones control; (ii) los experimentos con inyecciones de HT0712 consistieron en ratones inyectados con el vehículo y ratones inyectados con 2-3 dosis diferentes de HT0712; (iii) se repitió cada condición experimental 2-4 veces independientes, y se añadieron días duplicados para generar el número final de sujetos.

Se realizaron cinco a ocho sesiones en cada grupo de ratones. Se entrenó y se sometió a prueba cada ratón no más de una vez por semana y con un intervalo de una semana entre las pruebas. En los experimentos con inyecciones de fármaco (véase más adelante), se compensaron los ratones inyectados con vehículo y los ratones inyectados con altas/bajas dosis de fármaco. En cada experimento, el experimentador no conocía (ensayo ciego) el tratamiento de los sujetos durante el entrenamiento y la prueba.

Para analizar la retención de memoria, se observaron los ratones durante 10 minutos 3 a 24 horas después del entrenamiento. Se presentaron a los ratones dos objetos, uno de los cuales se había utilizado durante el entrenamiento y por lo tanto era 'familiar' y el otro de los cuales era nuevo (p.ej. un pequeño objeto con forma piramidal). Los objetos del experimento se dividieron en diez grupos de dos objetos de "entrenamiento" más los objetos "de prueba", y se utilizó un nuevo grupo de objetos para cada sesión de entrenamiento. Después cada sujeto experimental, el aparato y los objetos se limpiaron con etanol al 90 %, se secaron y se ventilaron durante unos minutos.

Administración del fármaco

Veinte minutos antes del entrenamiento, se inyectó a los ratones en sus jaulas las dosis indicadas de HT0712 ((3S,5S)-5-(3-ciclopentiloxi-4-metoxi-fenil)-3-(3-metil-bencil)-piperidin-2-ona; conocida también como IPL 455,903)), Rolipram (en PBS/DMSO al 1 %) o vehículo solo (PBS/DMSO al 1 %). El HT0712 tiene la siguiente fórmula:



en donde "Me" significa "metilo" y "cPent" significa "ciclopentilo". El HT0712 se puede preparar utilizando la metodología provista en la Patente de Estados Unidos N° 6.458.829B1, cuyas enseñanzas se incorporan aquí como referencia.

- 5 El HT0712 se administró intraperitonealmente (i.p.) a las dosis: 0,001 mg/kg; 0,005 mg/kg; 0,01 mg/kg; 0,05 mg/kg; 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg y 0,2 mg/kg. El Rolipram (Sigma) se administró i.p. a la dosis de 0,1 mg/kg. Se inyectaron los fármacos con un intervalo de una semana para permitir suficiente tiempo de lavado (la semivida para HT0712 y Rolipram es < 3 horas). En adición los ratones inyectados con vehículo y los inyectados con fármaco se contrabalancearon de experimento a experimento. Tal diseño dejó al menos dos semanas de tiempo de lavado entre los usos repetidos de dosis altas. No se observaron efectos acumulativos de dosis con inyecciones repetidas entre/dentro de los grupos.

Análisis de los datos

15 Se grabaron los experimentos en video con un sistema de cámara de video colocada en lo alto. Los tipos fueron revisados por un observador a ciegas y se determinaron los siguientes parámetros de comportamiento: tiempo de exploración de cada uno de los objetos; el tiempo total de exploración de los objetos; el número de acercamientos a los objetos; y el tiempo (latencia) para el primer acercamiento a un objeto. Se determinó el índice de discriminación como se ha descrito previamente (Ennaceur, A. & Aggleton, J.P., *Behav. Brain Res.*, 88: 181-193 (1997)). Se analizaron los datos por la prueba t de Student no apareada utilizando un paquete de software estadístico (Statview 5.0,1; SAS Institute, Inc). Todos los valores en el texto y en las leyendas de las figuras se expresan como la media \pm SEM.

Resultados

25 El CBP es un co-activador transcripcional que se une al factor de transcripción CREB (proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP) fosforilado para regular la expresión génica (Lonze, B.E. & Ginty, D.D., *Neuron*, 35: 605-623 (2002)). Se ha encontrado que la expresión génica dependiente de CREB es subyacente a la formación de memoria a largo plazo en varias especies de vertebrados e invertebrados (Poser, S. & Storm, D.R., *Int. J. Dev. Neurosci.*, 19: 387-394 (2001); Bailey, C.H. *et al.*, *Nat. Rev. Neurosci.*, 1: 11-20 (2000); Dubnau, J. & Tully, T., *Ann. Rev. Neurosci.*, 21: 407-444 (1998); y Menzel, R., *Learn Mem.*, 8: 53-62 (2001)), llevando a la interesante teoría de que el retraso mental en los pacientes de RTS se puede derivar de la reducción de la función de CBP durante la formación de la memoria a largo plazo (D'Arcangelo, G. & Curran, T., *Nature*, 376,292-293-(1995)). A este fin, Oike *et al.* (*Human Molecular Genetics*, 8: 387-396 (1999)) generaron una mutación por truncación en el C-terminal de la CBP de ratón, que parece que actúa en una forma negativa dominante para recapitular muchas de las anomalías observadas en los pacientes de RTS. Los mutantes CBP^{-/-} homocigóticos sufren mortalidad embrionaria, mientras que los ratones CBP^{+/-} heterocigóticos presentan viabilidad reducida, retraso de crecimiento, retraso en la maduración ósea y maxilar superior hipoplásico (Oike, Y. *et al.*, *Human Molecular Genetics*, 8: 387-396 (1999)). Lo que es más importante, los ratones CBP^{+/-} mostraron un aprendizaje y memoria a corto plazo normales pero una memoria a largo plazo defectuosa para dos tareas de evitación pasiva, confirmando la idea de que se requiere una función CBP normal para la formación de memoria (Oike, Y. *et al.*, *Human Molecular Genetics*, 8: 387-396 (1999)).

40 Se realizó un cribado de fármacos de alto rendimiento utilizando células de neuroblastoma humano que fueron transfectadas de forma estable con un gen indicador con luciferasa dirigido por un promotor de CRE (elemento de respuesta a cAMP) (un cribado de fármacos para potenciadores de la función CREB) (Scott, R. *et al.*, *J. Mol. Neurosci.*, 19: 171-177 (2002)). Se expusieron las células al fármaco durante dos horas y después se estimularon con una dosis subóptima de forskolina durante otras cuatro horas. Se seleccionaron los compuestos que no tenían efectos por sí mismos pero que aumentaban significativamente la expresión de CRE-luciferasa inducida por forskolina. Entre las docenas de éxitos confirmados para varias dianas moleculares identificadas en este cribado, fueron numerosos los inhibidores de la PDE4.

Como se describe aquí, los inhibidores de la PDE4, HT0712 y rolipram, de los que se ha demostrado previamente que afectan al comportamiento en modelos animales de memoria (Barad, M. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 15020-15025 (1998); y Vitolo, O.V. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 13217-13221 (2002)), produjeron ambos, efectos importantes sobre la expresión de CRE-luciferasa y sobre la expresión de un gen endógeno dependiente de CRE, somatostatina (Figura 2). Se espera que otros inhibidores de la PDE4 produzcan efectos similares.

Los experimentos iniciales sobre ratones adultos jóvenes, normales, establecieron que la formación de memoria a largo plazo después de miedo contextual condicionado se potenciaba por los inhibidores de la PDE4 (p.ej., HT0712 y rolipram), administrados (i) directamente al hipocampo, (ii) intraventricularmente o (iii) intraperitonealmente (Scott, R. *et al.*, J. Mol. Neurosci., 19: 171-177 (2002)). Específicamente, estos fármacos potenciaron la formación de memoria reduciendo la cantidad de entrenamiento requerido para producir la máxima memoria a largo plazo.

Para determinar si estos fármacos podrían o no mejorar los defectos de memoria causados por lesiones moleculares en la ruta del CREB, se utilizó el modelo de ratón del síndrome de Rubinstein-Taybi particularmente porque (i) la lesión molecular (proteína truncada) en ratones era similar a las conocidas para algunos pacientes de RTS, (ii) la función de CBP en los ratones CBP^{+/-} heterocigóticos se reducía pero no se bloqueaba y (iii) la formación de memoria a largo plazo, parecía estar específicamente interrumpida en estos animales mutantes, pero no así el aprendizaje ni la memoria a corto plazo (Oike, Y. *et al.*, Human Molecular Genetics, 8: 387-396 (1999)).

Los defectos de la memoria a largo plazo en los mutantes CBP^{+/-} han sido descritos solamente para tareas basadas en el miedo (Oike, Y. *et al.*, Human Molecular Genetics, 8: 387-396 (1999)). Por lo tanto, se determinó en primer lugar si los ratones mutantes CBP^{+/-} tenían memoria a largo plazo defectuosa para un tipo diferente de tarea. El reconocimiento de objetos no es una tarea repulsiva, y se basa en un comportamiento exploratorio natural del ratón. Durante el entrenamiento para esta tarea, se presentaron a los ratones dos objetos nuevos idénticos, que los ratones exploraron durante algún tiempo adaptándose a ellos, oliéndolos y trepando sobre ellos. Los ratones recordarán después que han explorado ese objeto. Para comprobar dicha memoria, se presentaron a los ratones un tiempo después dos objetos diferentes, uno de los cuales había sido presentado previamente durante el entrenamiento y por lo tanto era "familiar," y el otro de los objetos era nuevo. Si el ratón recuerda el objeto familiar, emplea más tiempo en explorar el objeto nuevo. Por analogía con una tarea basada en el reconocimiento de un objeto "no concordante con la muestra" en monos y ratas (Mishkin, M., Nature, 273: 297-298 (1978); Mishkin, M. & Appenzeller, T., Sci. Am., 256: 80-89 (1987); y Wood, E.R. *et al.*, Behav. Neurosci., 107: 51-62 (1993)), se puede realizar esta tarea repetidamente sobre los mismos animales exponiéndolos de forma seriada a diferentes conjuntos de nuevos objetos.

Inicialmente, se concedió a los mutantes CBP^{+/-} y a sus crías de la misma camada sin manipulación genética (normales) 15 minutos para explorar un nuevo objeto durante el entrenamiento y después se comprobó su retención de memoria tres y 24 horas más tarde (Figura 3). A las tres horas la memoria apareció normal, pero a las 24 horas la memoria estaba significativamente reducida, en los mutantes CBP^{+/-}. Estos resultados indican que los ratones mutantes CBP^{+/-} tienen deterioro de la memoria a largo plazo, pero tienen memoria normal a corto plazo, para el reconocimiento de objetos. Estos hallazgos extienden las observaciones de Oike *et al.* (Human Molecular Genetics, 8: 387-396 (1999)) a un comportamiento etiológicamente relevante, no repulsivo, y confirman la idea de que las mutaciones con pérdida de función en CBP pueden producir defectos específicos en la formación de memoria a largo plazo.

Para evaluar los inhibidores de PDE4, se administraron el fármaco o el vehículo solo i.p. a ratones normales y a mutantes CBP^{+/-} 20 minutos antes de una sesión de entrenamiento de 15 minutos (Figura 4). Como en el experimento previo, la retención de memoria de 24 horas estaba significativamente reducida en los mutantes CBP^{+/-} en ausencia de fármaco. Por contraste destacado, sin embargo, una única administración de 0,10 mg/kg de inhibidor de PDE4 (p.ej., HT0712 o rolipram) restableció la memoria de 24 horas en los mutantes CBP^{+/-} a los niveles normales.

Para evaluar si los efectos de los fármacos eran específicos de la lesión molecular en CBP, se cambió el protocolo de entrenamiento y se determinaron las curvas de sensibilidad a la dosis para los animales mutantes y para los normales. El protocolo de entrenamiento de 15 minutos produce una retención máxima de 24 horas en los ratones normales usados aquí. En consecuencia, no se observó la mejora de la memoria inducida por el fármaco en los ratones normales (Figura 4). Reduciendo el entrenamiento a un protocolo de 3,5 minutos, la retención de 24 horas fue casi cero en los ratones normales, permitiendo de este modo una evaluación de los efectos potenciadores de los inhibidores de la PDE4. Debido a que los mutantes CBP^{+/-} tenían menos CBP funcional que los animales normales, puede ser necesaria una concentración más alta de fármaco en los mutantes que en los ratones normales para producir niveles equivalentes de mejora de la memoria. En esencia, la lesión molecular en CBP debería actuar para desplazar la sensibilidad a la dosis de un inhibidor de PDE4 para mejorar la formación de memoria.

Inicialmente, se cuantificó la curva dosis-respuesta para los ratones normales (Figura 5). En los ratones tratados con vehículo solo, el protocolo de entrenamiento de 3,5 minutos no produjo ninguna memoria apreciable de 24 horas. A concentraciones inferiores a 0,05 mg/kg o a 0,50 mg/kg, el HT0712 falló en producir ninguna mejora de la memoria.

Sin embargo, aumentó significativamente la retención de memoria de 24 horas, a concentraciones de 0,05, 0,10, y 0,15 mg/kg para el HT0712. A continuación, se comparó la retención de memoria entre los mutantes CBP^{+/-} y los animales normales a concentraciones seleccionadas de HT0712 (Figura 6). Se encontró que la dosis inicial eficaz es diferente entre los animales mutantes y los animales normales. A una dosis de 0,05 mg/kg para HT0712, los animales normales presentaron una mejora significativa de la memoria de 24 horas, pero no la presentaron los mutantes CBP^{+/-}. Se vio primero una mejora de la memoria en los mutantes CBP^{+/-} a la siguiente dosis más alta de HT0712 (0,10 mg/kg). Similarmente, el pico de dosis eficaz parece moverse hasta una concentración más alta en los mutantes (0,15 mg/kg) que en los ratones normales (0,10 mg/kg).

Se consideró también si el HT0712 podría aumentar el rendimiento en la tarea no específicamente por afectar la percepción del contexto del entrenamiento (objetos) o la motivación para explorar objetos durante el entrenamiento o la prueba. Se analizaron la latencia para el primer acercamiento a un objeto durante el entrenamiento, el número total de acercamientos a un objeto y el tiempo total de exploración. En todos los experimentos, no se observaron diferencias en la latencia para el primer acercamiento entre los genotipos y/o los tratamientos con fármacos. Los ratones mutantes CBP^{+/-} presentaron aumentos en el tiempo total de exploración y en el número total de acercamientos al objeto, pero los tratamientos con fármaco no cambiaron estas medidas, y estas respuestas de comportamiento no se correlacionaron con Índices de Discriminación.

Los datos del presente documento indican que los deterioros de memoria observados para los mutantes CBP^{+/-} en una tarea de reconocimiento de objetos se pueden mejorar por los inhibidores de PDE4. Estos inhibidores de PDE probablemente mejoran la señalización a CREB/CBP durante la formación de memoria aumentando los niveles de cAMP en respuesta a los cambios de la actividad neuronal dependientes de la experiencia (Barad, M. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 15020-15025 (1998); y Nagakura, A. *et al.*, Neuroscience, 113: 519-528 (2002)). Dadas las similitudes moleculares y patológicas entre estos ratones CBP^{+/-} y los pacientes con síndrome de Rubinstein-Taybi, los hallazgos de la presente descripción indican que los inhibidores de PDE4 representan una terapia eficaz para el retraso mental asociado con esta condición hereditaria salvando un defecto funcional en la formación de memoria a largo plazo y haciendo que el paciente sea capaz de beneficiarse del entrenamiento cognitivo y de la experiencia. Los hallazgos del presente documento implican también que los inhibidores de PDE4 representan una terapia eficaz para otros síndromes de retraso mental, incluyendo el síndrome de Angelman, neurofibromatosis, síndrome de Coffin-Lowry, síndrome de Down, síndrome de Rett, distrofia miotónica, síndrome de X frágil (p.ej., X-1 frágil, X-2 frágil) síndrome de William, tratando una disfunción cognitiva o déficit cognitivo asociado con el retraso mental y haciendo que el paciente sea capaz de beneficiarse del entrenamiento cognitivo y de la experiencia.

REIVINDICACIONES

1. HT0712 para uso en el tratamiento de un déficit cognitivo asociado con retraso mental, en donde dicho tratamiento comprende:
- a) administrar HT0712 a un animal que necesite dicho tratamiento; y
- 5 b) entrenar a dicho animal en condiciones suficientes para producir una mejora en el rendimiento por parte del animal de una tarea cognitiva cuyo déficit se asocia con el retraso mental, de tal modo que dicho déficit cognitivo es tratado.
2. HT0712 para uso según la reivindicación 1, en donde se alcanza un aumento de rendimiento con respecto al rendimiento de dicha tarea cognitiva alcanzado por entrenamiento solo.
- 10 3. HT0712 para uso según la reivindicación 1, en donde en la etapa b), el entrenamiento comprende múltiples sesiones de entrenamiento.
4. HT0712 para uso según la reivindicación 1, en donde HT0712 se administra antes y durante cada sesión de entrenamiento.
- 15 5. HT0712 para uso según la reivindicación 1, en donde HT0712 se administra a una dosis necesaria para efectuar un cambio en la expresión génica dependiente de CREB.
6. HT0712 para uso según la reivindicación 1, en donde HT0712 se administra después de cada sesión de entrenamiento.
7. HT0712 para uso según la reivindicación 1, en donde dicho animal es un mamífero.
8. HT0712 para uso según la reivindicación 7, en donde dicho mamífero es un ser humano.
- 20 9. HT0712 para uso según la reivindicación 1, en donde dicho retraso mental se asocia con un trastorno seleccionado del grupo que consiste en: síndrome de Rubinstein-Taybi, síndrome de Down, síndrome de Angelman, neurofibromatosis, síndrome de Coffin-Lowry, síndrome de Rett, distrofia miotónica, síndrome de X-1 frágil, síndrome de X-2 frágil y síndrome de William.
- 25 10. HT0712 para uso según la reivindicación 1, en donde HT0712 potencia la ruta de señalización de CREB, en donde dicho retraso mental es una condición hereditaria.
11. HT0712 para uso según la reivindicación 1, en donde dicho retraso mental es una condición hereditaria, salvando un defecto funcional en la formación de memoria a largo plazo.
12. HT0712 para uso en terapia.
- 30 13. HT0712 para uso en el tratamiento de un déficit cognitivo asociado con retraso mental o síndrome de Rubinstein-Taybi, en donde dicho tratamiento comprende un protocolo de entrenamiento específico para cada función cognitiva y la administración de HT0712.
14. HT0712 para uso según la reivindicación 3, en donde dicho tratamiento reduce el número de sesiones de entrenamiento necesarias para producir dicho aumento de rendimiento con respecto al aumento de rendimiento producido con entrenamiento cognitivo solo.

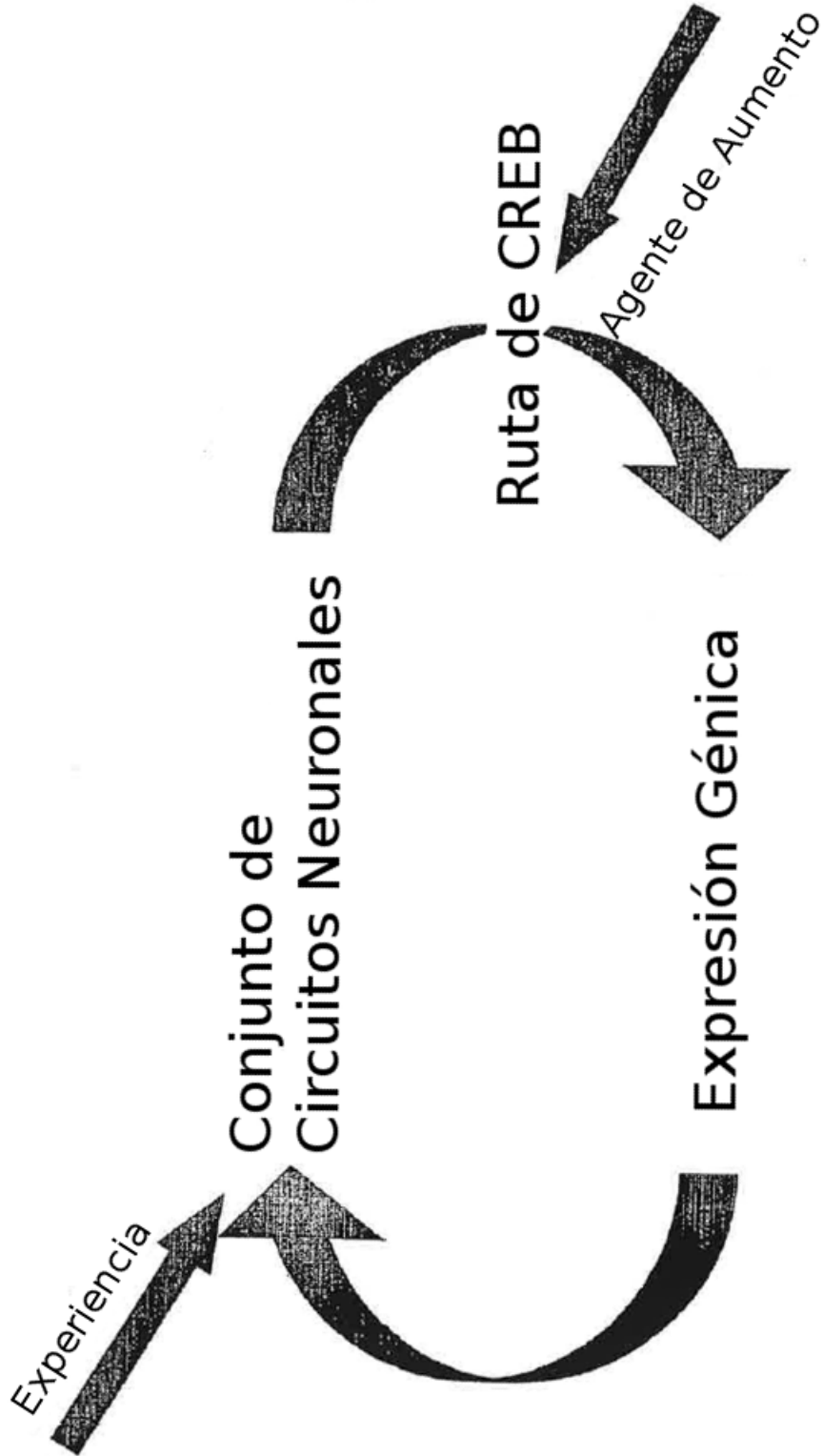


FIG. 1

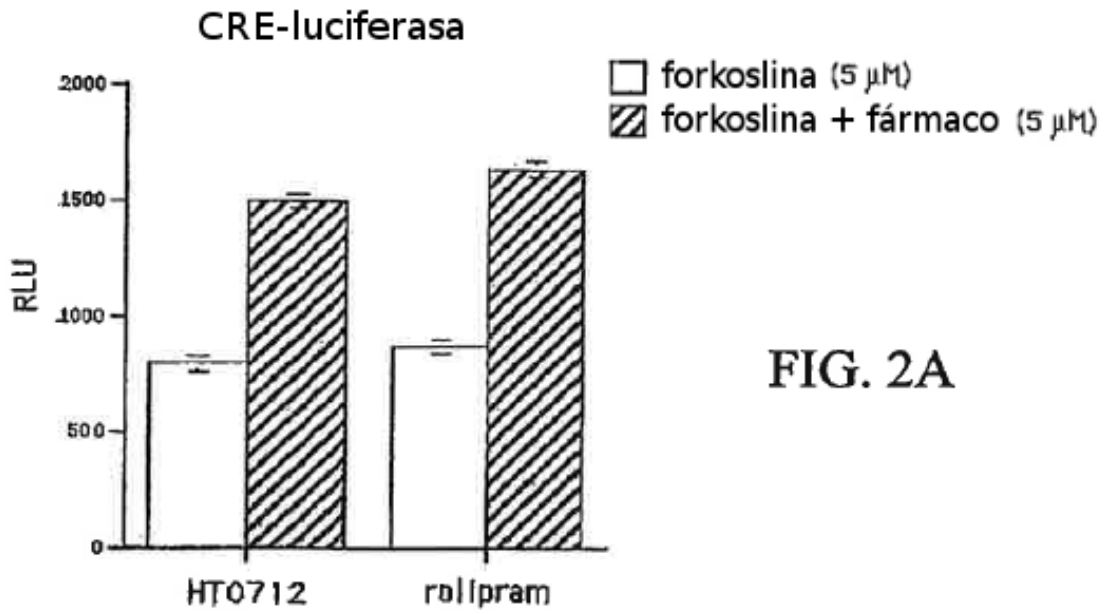


FIG. 2A

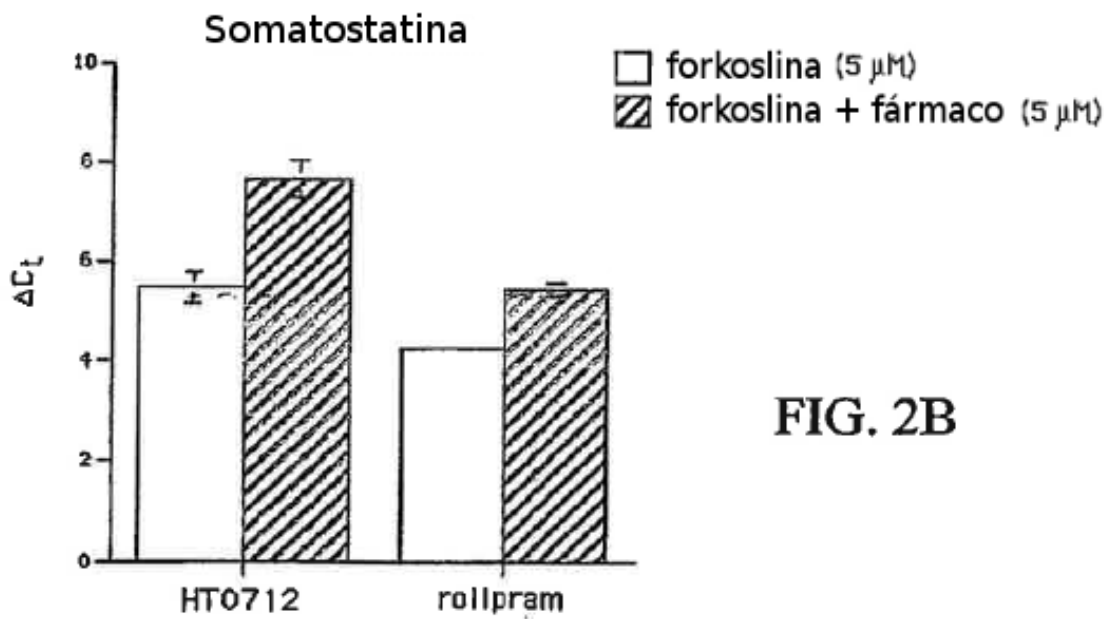


FIG. 2B

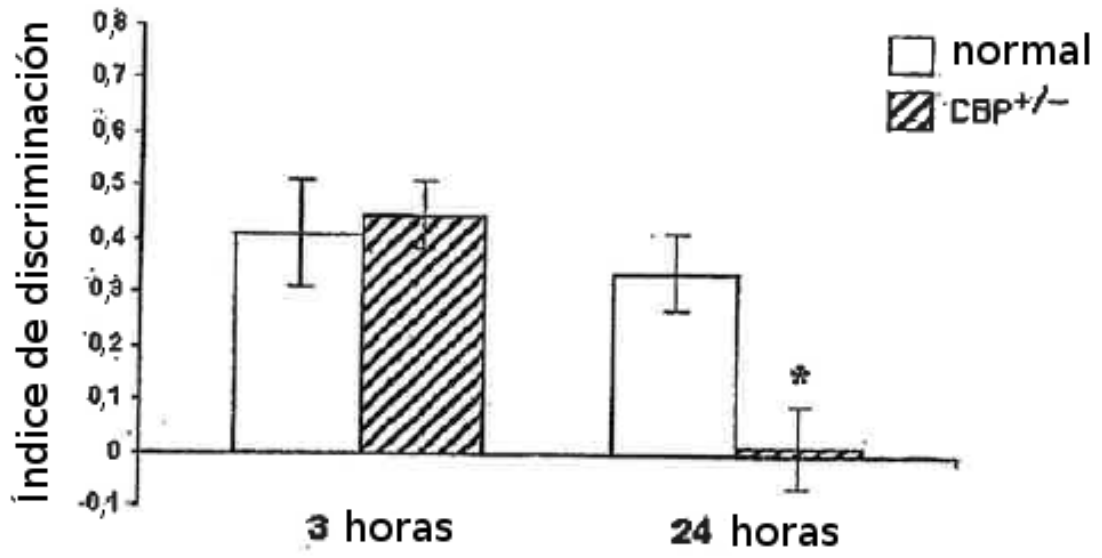


FIG. 3

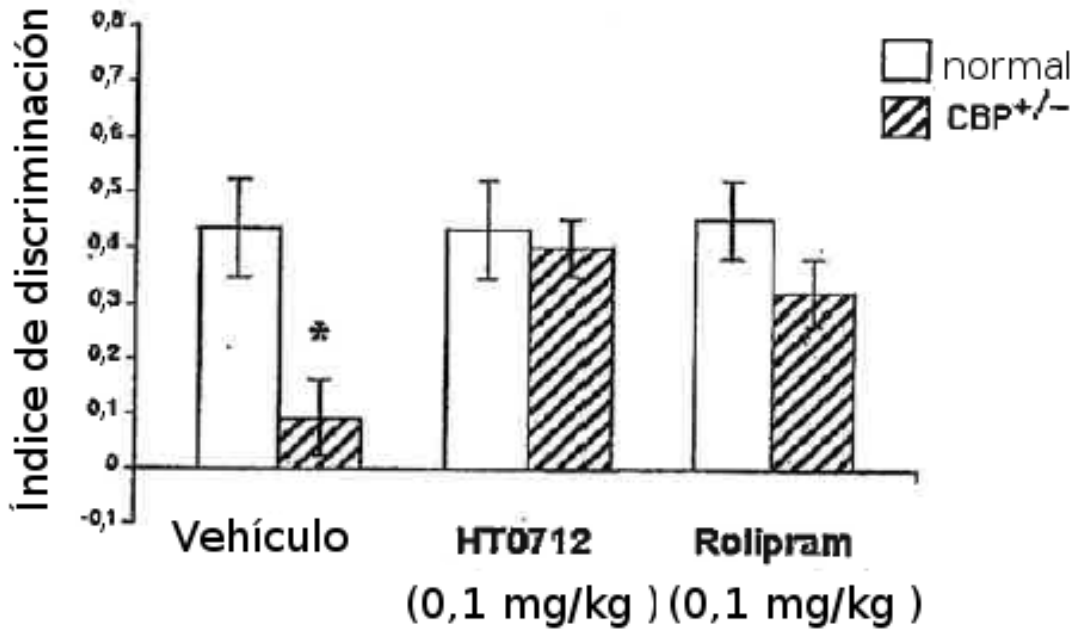


FIG. 4

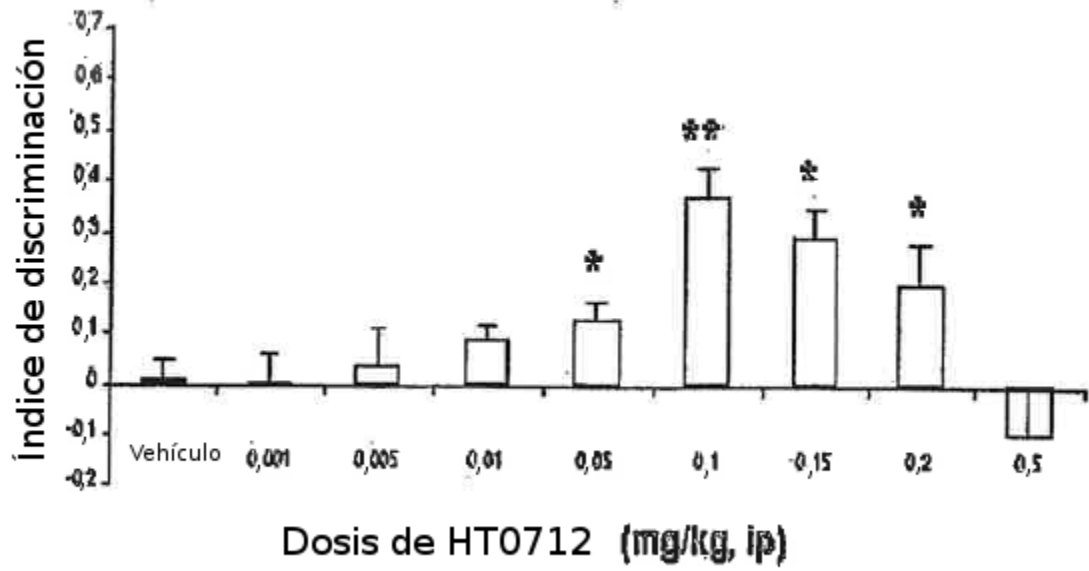


FIG. 5

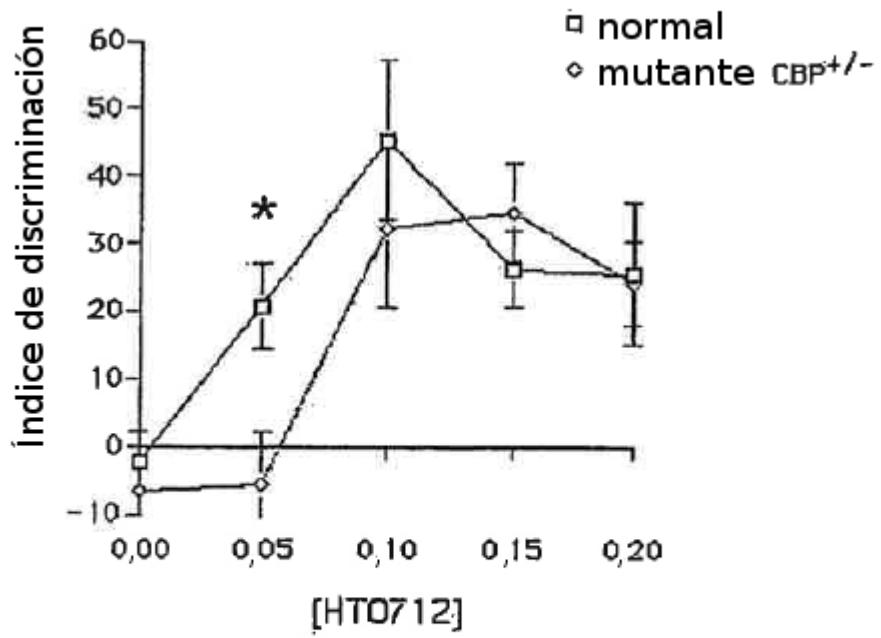


FIG. 6