

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 412 481**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4015 (2006.01)

A61K 31/4412 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2007 E 07783945 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2012 EP 2021001**

54 Título: **Inhibidores de la fosfodiesterasa 4 para la rehabilitación motora**

30 Prioridad:

19.05.2006 US 801949 P

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

11.07.2013

73 Titular/es:

**DART NEUROSCIENCE LLC (100.0%)
7473 Lusk Boulevard
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**HALLAM, THOMAS M.;
BOURTCHOULADZE, RUSIKO y
TULLY, TIMOTHY**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 412 481 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

Inhibidores de la fosfodiesterasa 4 para la rehabilitación motora

Antecedentes de la invención

- 5 Se estima que de 4 a 5 millones de estadounidenses (aproximadamente el 2 % de todas las edades y el 15 % de los mayores de 65 años) tienen algún tipo y grado de deterioro cognitivo. El deterioro cognitivo (disfunción o pérdida de las funciones cognitivas, el proceso por el que se adquiere, se mantiene y se usa el conocimiento) ocurre comúnmente en asociación con trastornos o afecciones del sistema nervioso central (SNC), incluyendo deterioro de la memoria asociado con la edad, delirio (a veces llamado estado confusional agudo), demencia (a veces clasificada como enfermedad de Alzheimer o de tipo no Alzheimer), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson,
- 10 enfermedad de Huntington (corea), retraso mental, enfermedad cerebrovascular (por ejemplo, ictus, isquemia), trastornos afectivos (por ejemplo, depresión), trastornos psicóticos (por ejemplo, esquizofrenia, autismo (Síndrome de Kanner), trastornos neuróticos (por ejemplo, ansiedad, trastorno obsesivo-compulsivo), trastorno por déficit de atención (TDA), hematoma subdural, hidrocefalia de presión normal, tumor cerebral, traumatismo craneal o cerebral.
- 15 La disfunción cognitiva se manifiesta normalmente en uno o más déficits cognitivos, que incluyen deterioro de la memoria (deterioro de la capacidad para aprender nueva información o recordar información aprendida previamente), afasia (alteración del lenguaje/habla), apraxia (alteración de la capacidad para llevar a cabo actividades motoras, a pesar de una función motora intacta), agnosia (incapacidad en el reconocimiento o identificación de objetos a pesar de una función sensorial intacta), alteración de la función ejecutiva (es decir, la planificación, organización, secuenciación y abstracción).
- 20 La disfunción cognitiva provoca un deterioro significativo del funcionamiento social y/o ocupacional que puede interferir con la capacidad de un individuo para realizar actividades de la vida diaria y afecta enormemente a la autonomía y la calidad de vida del individuo.
- 25 En la rehabilitación de los individuos que tienen alguna forma y grado de disfunción cognitiva se emplean generalmente protocolos de entrenamiento cognitivo. Por ejemplo, los protocolos de entrenamiento cognitivo son empleados habitualmente en la rehabilitación del ictus y en la rehabilitación de la pérdida de memoria relacionada con la edad. Debido a que frecuentemente se requieren múltiples sesiones de entrenamiento antes de obtenerse una mejoría o un reforzamiento de un aspecto específico de la función cognitiva (capacidad o función), los protocolos de entrenamiento cognitivo son a menudo muy costosos y consumen mucho tiempo.
- 30 La lesión cerebral humana a menudo tiene como resultado una afectación motora y cognitiva. Si bien los avances en la medicina de cuidados críticos y tratamiento del paciente han dado lugar a mejoras en los resultados del paciente después de una lesión cerebral traumática (LCT), actualmente no existe un tratamiento conocido para prevenir la muerte neuronal y la disfunción posterior a una LCT. A pesar de que muchos tratamientos han demostrado ser neuroprotectores en modelos preclínicos de la LCT, la mayoría no han demostrado eficacia en seres humanos.
- 35 Una vez que un paciente se estabiliza después de una LCT, el tratamiento de referencia dicta una rehabilitación motora o cognitiva intensiva. Durante esta rehabilitación, el paciente con frecuencia recupera habilidades perdidas, resultando finalmente en una mejoría del estado funcional. Sería beneficioso si pudieran desarrollarse tratamientos farmacéuticos para potenciar la rehabilitación motora o cognitiva tras una LCT, y por lo tanto mejorar los resultados del estado funcional.
- 40 En la rata, la lesión cerebral por percusión lateral por fluido (PLF) bien caracterizada tiene como resultado una extensa muerte celular por apoptosis y necrótica en el hipocampo, el tálamo y la corteza (incluida la corteza motora). Esta muerte neuronal conduce a disfunción neuronal y alteraciones en múltiples sistemas cerebrales. Los estudios han documentado déficits en la función motora y cognitiva (Hamm, R.J. y col., *Behav. Brain Res.*, 59 (1-2) :169-173 (1993); Gong y col., *Brain Res.*, 700 (1-2):299-302 (1995); Hamm, R.J., *J Neurotrauma.*, 18 (11): 1207-1216 (2001); Floyd y col., *J Neurotrauma.*, 19(3):303-16 (2002); Hallam y col., *J Neurotrauma*, 21(5):521-39 (2004)) tras una lesión
- 45 cerebral de tipo PLF. La rehabilitación intensiva puede mejorar el resultado neuroconductual después de varias lesiones cerebrales experimentales. Las teorías actuales sostienen que durante la rehabilitación, las neuronas en el tejido cerebral dañado y alrededor de la zona dañada se re-entrenan para asumir algunas de las funciones perdidas. Este "re-entrenamiento" es una forma de aprendizaje y se produce a través de la inducción de la plasticidad neural.
- 50 Numerosos estudios han demostrado que el AMP cíclico (AMPc) y el factor de transcripción de una etapa posterior, la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB) son reguladores clave en la inducción de la memoria a largo plazo y la plasticidad neural (Yin, J.C. y col., *Cell*, 79(1):49-58 (1994); Bourtchuladze, R. y col., *Cell*, 79(1):59-68 (1994); Impey, S. y col., *Nat. Neurosci.*, 1(7):595-601 (1998)). Intervenciones genéticas o farmacológicas que afecten a la señalización del AMPc/CREB, afectan al entrenamiento de la memoria a largo plazo y a la plasticidad sináptica. Por el contrario, las intervenciones genéticas o farmacológicas que aumentan la señalización del
- 55 AMPc/CREB facilitan el entrenamiento de la memoria a largo plazo y la plasticidad sináptica.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a la administración de fármacos que potencian la ruta de la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB), los cuales pueden rehabilitar varias formas de disfunción motora más eficazmente que cualquier procedimiento actual o estimular el rendimiento (capacidad o función) motor normal. La administración de fármacos que estimulan la ruta de la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB) se puede aplicar a cualquier aspecto de la función cerebral que muestre un aumento duradero del rendimiento tras el entrenamiento cognitivo o motor. Por consiguiente, la administración de fármacos que potencian la ruta de la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB) puede utilizarse para la rehabilitación de un animal con alguna forma y grado de disfunción motora o para aumentar (mejorar) el rendimiento cognitivo o motor normal en un animal.

Como se describe en la presente memoria, la administración de fármacos que potencian la ruta de la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc se puede hacer sola.

En la presente memoria se divulgan procedimientos para potenciar un aspecto específico del rendimiento cognitivo en un animal (en particular en un ser humano u otro mamífero o vertebrado) en necesidad del mismo que comprenden (a) administrar al animal un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB y opcionalmente, (b) entrenar al animal en condiciones suficientes para producir una mejora en la realización por el animal de una tarea cognitiva de interés.

“Agentes de aumento” también se denominan aquí “fármacos que potencian la ruta de la proteína CREB”.

En la presente memoria se divulgan procedimientos para la mejora de un déficit cognitivo asociado con un trastorno o afección del sistema nervioso central (SNC) en un animal que comprende tratar al animal con un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB en la ausencia de entrenamiento cognitivo formal. En la presente memoria también se divulgan procedimientos para proporcionar una mejora sostenida de un déficit cognitivo asociado con un trastorno o afección del sistema nervioso central (SNC) en un animal que comprende administrar al animal un agente de aumento que potencia la función de la ruta de la proteína CREB y detectar dicha mejora sostenida. También se divulga un procedimiento que comprende además entrenar al animal en condiciones suficientes para producir una mejora en la realización por el animal de una tarea cognitiva particular. Los trastornos y afecciones del SNC incluyen deterioro de la memoria asociado con la edad, enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington (corea), otro tipo de demencia senil), enfermedades psiquiátricas (por ejemplo, depresión, esquizofrenia, autismo, trastorno por déficit de atención), pérdida de funcionalidad debido a traumatismo (por ejemplo, enfermedades cerebrovasculares (por ejemplo, ictus, isquemia), tumor cerebral, lesión craneal o cerebral), defectos genéticos (por ejemplo, síndrome de Rubinstein-Taybi, síndrome de Down, síndrome de Angelman, neurofibromatosis, síndrome de Coffin-Lowry, síndrome de Rett, distrofia miotónica, síndrome del X frágil (por ejemplo, X frágil 1, X frágil 2), síndrome de William) y problemas de aprendizaje. Se contempla que el tratamiento con un agente de aumento de la función de la ruta de CREB tiene como resultado una mejora sostenida, mantenida o permanente en el desempeño de la tarea cognitiva por el animal después de suspender o interrumpir la administración del agente de aumento.

En la presente memoria se divulgan procedimientos para la mejora de un déficit cognitivo asociado con retraso mental en un animal en necesidad de dicho tratamiento que comprende tratar al animal con un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB (por ejemplo, un inhibidor de la fosfodiesterasa 4) en la ausencia de entrenamiento cognitivo formal. En la presente memoria también se divulgan procedimientos para proporcionar una mejora sostenida de un déficit cognitivo asociado con retraso mental en un animal que comprende administrar al animal un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB (por ejemplo, un inhibidor de la fosfodiesterasa 4) y detectar dicha mejora sostenida. También se divulga un procedimiento que comprende además entrenar al entrenamiento del animal en condiciones suficientes para producir una mejora en la realización por el animal de una tarea cognitiva cuyo déficit se asocia con retraso mental. El retraso mental afecta al procesamiento cognitivo y a las funciones cognitivas, incluyendo el aprendizaje y la adquisición de la memoria. El retraso mental puede ser causado por factores cromosómicos o genéticos, infecciones congénitas, teratógenos (fármacos y otras sustancias químicas), desnutrición, radiación o condiciones que afectan a la implantación y a la embriogénesis. Síndromes de retraso mental incluyen síndrome de Rubinstein-Taybi, síndrome de Down, síndrome de Angelman, neurofibromatosis, síndrome de Coffin-Lowry, síndrome de Rett, distrofia miotónica, síndrome del X frágil (por ejemplo, X frágil 1, X frágil 2) y síndrome de William (Weeher, H.J. y col., Neuron, 33:845-848 (2002)).

En la presente memoria se divulgan procedimientos para la mejora de un déficit cognitivo asociado con un trastorno o afección del SNC en un animal que haya sido sometido a manipulación de células madre neuronales o células madres gliales que comprende tratar al animal con un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB en la ausencia de entrenamiento cognitivo formal. En la presente memoria también se divulgan procedimientos para proporcionar una mejora sostenida de un déficit cognitivo asociado con un trastorno o afección del SNC en un animal que haya sido sometido a manipulación de células madre neuronales, que comprende administrar al animal un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB y detectar dicha mejora sostenida. También se divulga un procedimiento que comprende además entrenar al animal en condiciones suficientes para estimular o inducir la actividad neuronal o de un patrón de actividad neuronal en el animal. Por

“manipulación de células madre neuronales” se entiende que (1) se trasplantan células madre neuronales exógenas en el cerebro o médula espinal de un animal (2) se estimulan células madre neuronales endógenas o se induce su proliferación en el animal o (3) células madre que apoyan la función neuronal.

5 En la presente memoria se proporcionan procedimientos para la mejora de la estimulación de la actividad neuronal o de un patrón de actividad neuronal, como la que subyace a un circuito(s) neuronal específico, en un animal que comprende tratar al animal con un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB en la ausencia de entrenamiento cognitivo formal. En la presente memoria también se proporcionan procedimientos para proporcionar una mejora sostenida en la estimulación de la actividad neuronal o de un patrón de actividad neuronal, como la que subyace a un circuito(s) neuronal específico, en un animal que comprende administrar al animal un agente de
10 aumento que potencia la función de la ruta de CREB y detectar dicha mejora sostenida.

También se divulga un procedimiento para mejorar un déficit cognitivo asociado con el deterioro de la memoria asociado con la edad en un animal que comprende tratar al animal con un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB en la ausencia de entrenamiento cognitivo formal. Se divulga un procedimiento para proporcionar una mejora sostenida de un déficit cognitivo asociado con deterioro de la memoria asociado con la edad en un animal que comprende administrar al animal un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB y detectar dicha mejora sostenida en el deterioro de la memoria asociado con la edad.
15

También se divulga un procedimiento para mejorar un déficit cognitivo asociado con una enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, otro tipo de demencia senil) en un animal que comprende tratar al animal con un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB en la ausencia de entrenamiento cognitivo formal. También se divulga un procedimiento para proporcionar una mejora sostenida de un déficit cognitivo asociado con una enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, otro tipo de demencia senil) en un animal que comprende administrar al animal un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB y detectar dicha mejora sostenida. También se divulga un procedimiento que comprende además entrenar al animal en condiciones suficientes para producir una mejora sostenida en la realización por el animal de una tarea cognitiva, cuyo déficit se asocia con la enfermedad neurodegenerativa.
20
25

También se divulga un procedimiento para mejorar un déficit cognitivo asociado con una enfermedad psiquiátrica (por ejemplo, depresión, esquizofrenia, autismo, trastorno por déficit de atención) en un animal que comprende tratar al animal con un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB en la ausencia de entrenamiento cognitivo formal. También se divulga un procedimiento para proporcionar una mejora sostenida de un déficit cognitivo asociado con una enfermedad psiquiátrica (por ejemplo, depresión, esquizofrenia, autismo, trastorno por déficit de atención) en un animal que comprende administrar al animal un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB y detectar dicha mejora sostenida. También se divulga un procedimiento que comprende además 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 psiquiátrica.
30
35

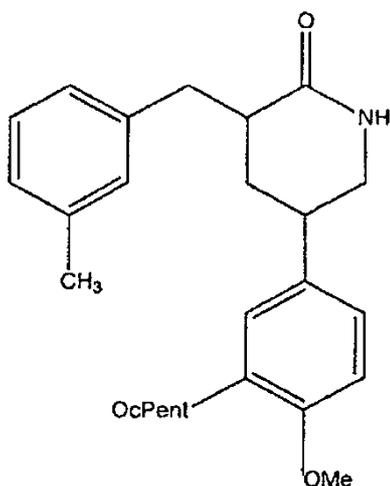
También se divulga un procedimiento para mejorar un déficit cognitivo asociado con la pérdida de función cognitiva asociada con traumatismo (por ejemplo, enfermedades cerebrovasculares (por ejemplo, ictus, isquemia), tumor cerebral, lesión craneal o cerebral) en un animal que comprende tratar al animal con un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB en la ausencia de entrenamiento cognitivo formal. También se divulga un procedimiento para proporcionar una mejora sostenida de un déficit cognitivo asociado con la pérdida de función cognitiva asociada a traumatismo (por ejemplo, enfermedades cerebrovasculares (por ejemplo, ictus, isquemia), tumor cerebral, lesión craneal o cerebral) en un animal que comprende administrar al animal un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB y detectar dicha mejora sostenida.
40

También se divulga un procedimiento para mejorar un déficit cognitivo asociado con un defecto genético (por ejemplo, síndrome de Rubinstein-Taybi, síndrome de Down, síndrome de Angelman, neurofibromatosis, síndrome de Coffin-Lowry, síndrome de Rett, distrofia miotónica, síndrome del X frágil (por ejemplo, X frágil 1, X frágil 2) y el síndrome de William) en un animal que comprende tratar al animal con un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB en la ausencia de entrenamiento cognitivo formal. En la presente memoria también se divulgan procedimientos para proporcionar una mejora sostenida en un déficit cognitivo asociado con un defecto genético en un animal que comprende administrar al animal un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB y detectar dicha mejora sostenida.
45
50

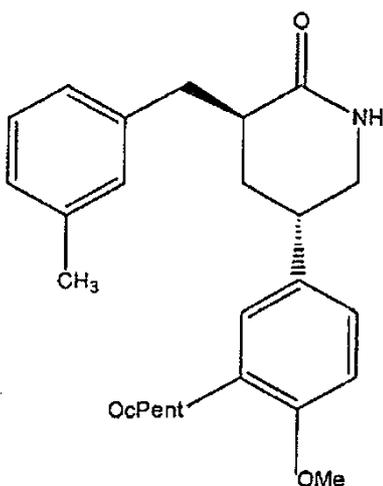
En la presente memoria se proporcionan procedimientos para mejorar un déficit motor asociado con un trastorno o afección del sistema nervioso central (SNC) en un animal que comprende tratar al animal con un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB en la ausencia de entrenamiento cognitivo formal. En la presente memoria también se proporcionan procedimientos para proporcionar una mejora sostenida de un déficit motor asociado con un trastorno o afección del sistema nervioso central (SNC) en un animal en necesidad de dicho tratamiento que comprende administrar al animal un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB y detectar dicha mejora sostenida. En una realización, el procedimiento comprende además el entrenamiento del animal en condiciones suficientes para producir una mejora en la realización por el animal de una tarea motora en particular. Trastornos y afecciones del SNC incluyen deterioro de la memoria asociado con la edad, enfermedades
55
60

neurodegenerativas (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA o enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad de las motoneuronas, enfermedad de Huntington (corea), otros tipos de demencia senil), enfermedades psiquiátricas (por ejemplo, depresión, esquizofrenia, autismo, trastorno por déficit de atención), pérdida de función asociada con traumatismo (por ejemplo, enfermedades cerebrovasculares (por ejemplo, ictus, isquemia), tumor cerebral, lesión craneal, cerebral o medular), defectos genéticos (por ejemplo, síndrome de Rubinstein-Taybi, síndrome de Down, síndrome de Angelman, neurofibromatosis, síndrome de Coffin-Lowry, síndrome de Rett, distrofia miotónica, síndrome del X frágil (por ejemplo, X frágil 1, X frágil 2), síndrome de William) y problemas de aprendizaje. Se contempla que el tratamiento con un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB tiene como resultado la mejora mantenida o permanente en la realización de la tarea motora por el animal después de suspender o interrumpir la administración del agente de aumento.

Se contempla que en las diversas realizaciones, el agente de aumento comprenda un inhibidor de la fosfodiesterasa 4 (PDE4). La presente invención se refiere al uso de un inhibidor de fosfodiesterasa 4 (PDE4) para la fabricación de un medicamento para tratar un déficit motor asociado con una lesión cerebral traumática en un animal, mediante la administración de dicho inhibidor al animal sin entrenamiento cognitivo formal y produciendo una mejora en la realización por el animal de una tarea motora particular, cuyo déficit se asocia con la lesión cerebral traumática. Ejemplos de inhibidores de la PDE4 incluyen rolipram y compuestos de la siguiente fórmula:



en la que "Me" significa "metilo" y "cPent" significa "ciclopentilo". Se entiende que la fórmula anterior abarca tanto los enantiómeros como las mezclas de los mismos. Los compuestos se pueden preparar usando la metodología proporcionada en la patente US-6.458.829, cuyas enseñanzas se incorporan aquí por referencia. En una realización particular, los carbonos 3 y 5 de esta fórmula anterior están en la configuración S (HT-0712):



en la que "Me" significa "metilo" y "cPent" significa "ciclopentilo". Otros ejemplos de inhibidores de la PDE4 se pueden encontrar en la publicación US-2002/0028842 A1 (publicada el 7 de marzo de 2002); patente US-6.458.829B1; patente US-6.525.055B1; patente US-5.552.438; patente US-6.436.965 y patente US-6.204.275. Se conocen otros inhibidores de la PDE4 y están fácilmente disponibles en la técnica.

Breve descripción de las figuras

- La FIG. 1 es una evolución temporal de los ensayos de reconocimiento de objetos (RO). La prueba consistía en una única sesión de entrenamiento seguido por una sesión de pruebas 24 horas más tarde (excepto en el intervalo de 4 horas para la prueba STM). Antes de la lesión, las ratas se sometieron a 5 ensayos para evaluar las puntuaciones de memoria antes de la lesión. A continuación recibieron una TBI (lesión cerebral traumática), se recuperaron durante 7 días y comenzó la rehabilitación para el RO de la siguiente manera: ensayo 6 después de la lesión inicial (BS1), ensayo 7 entrenamiento con fármaco (TD1), ensayo 8, prueba de la memoria a corto plazo (STM) intervalo de 4 h entre el entrenamiento y las pruebas sin ningún fármaco, ensayo 9 establecimiento de la segunda línea de base (BS2), ensayos 10-14 rehabilitación cognitiva asistida con fármaco (fármaco administrado antes de cada sesión de entrenamiento), ensayo 15 primera evaluación de la memoria post-rehabilitación (Ass1) sin administración de ningún medicamento en el momento del entrenamiento, una semana de descanso, ensayo 16 segunda evaluación de la memoria post-rehabilitación (Ass2), 5 semanas de descanso, ensayo 17, tercera evaluación de la memoria post-rehabilitación (Ass3), 1 semana de descanso, entrenamiento con condicionamiento con paradigma de traza, 1 semana de descanso, entrenamiento con condicionamiento con paradigma de traza (TC).
- La FIG. 2 muestra la rehabilitación locomotora en el paso escalonado. Antes de la lesión, las ratas fueron entrenadas para cumplir los criterios de la tarea del paso escalonado (A-D, día 0). A todas las ratas se les infringió una lesión cerebral y se dejaron recuperar durante 7 días. Se les evaluó para determinar el medio número de errores (fallo en la pisada) (Fig. 2A y B) y la latencia (FIG. 2C y D) en la tarea del paso escalonado (Día 1, línea de base). Todos los grupos mostraban un aumento significativo en el número de fallos en la pisada ($p < 0,001$). Las ratas que recibieron diariamente rehabilitación y tratamiento con los inhibidores de la PDE4 rolipram ($n = 11$) y HT-0712 ($n = 13$) tuvieron menos errores de pisada (Fig. 2A) y latencias más cortas (Fig. C) que las ratas que recibieron tratamiento de rehabilitación y vehículo ($n = 11$). Las ratas a las que se les administró el inhibidor de la PDE4 HT-0712 sin rehabilitación en el paso escalonado tuvieron menos fallos en la pisada (Fig. 2B) y latencias más cortas (FIG. 2D) que los animales tratados con vehículo sin rehabilitación. (* = $p < 0,05$)
- La FIG. 3 muestra el rendimiento de reconocimiento de objetos (media ID \pm EEM). La retención en la memoria de un día en el reconocimiento de objetos depende del entrenamiento de la memoria a largo plazo. Las ratas fueron entrenadas en 5 ensayos previos a la lesión. Cada ensayo consistió en una sesión de entrenamiento de 7,5 min con un par de objetos idénticos y una sesión de prueba 24 h más tarde para evaluar la retención de la memoria a largo plazo. La retención de la memoria se cuantificó como un índice de discriminación (ver Procedimientos). Antes de la lesión, las ratas discriminaban entre objetos previamente explorados (antiguos) y objetos novedosos. Todos los ensayos previos a la lesión se promediaron para obtener un único índice de discriminación previo a la lesión (FIG. 3A). No hubo diferencias significativas en el rendimiento de la memoria entre los grupos que más tarde recibirían tratamiento con fármaco o vehículo (FIG. 3A). Después de la lesión cerebral y de 7 días de recuperación, ambos grupos tenían déficits de memoria a largo plazo para el reconocimiento de objetos (FIG. 3B). No hubo diferencias significativas entre los grupos para el reconocimiento de objetos. Por lo tanto, la lesión cerebral alteró la memoria normal de 24 horas para el reconocimiento de objetos para todos los grupos antes del tratamiento (FIG. 3B). En el siguiente ensayo se administró a las ratas 0,15 mg/kg de HT-0712 o el vehículo (i.p.) 20 minutos antes del entrenamiento. El grupo HT-0712 mostró una preferencia por el objeto novedoso y tenía un índice de discriminación significativamente mayor ($p < 0,01$) que el grupo de vehículo (FIG. 3C). Con el fin de determinar si la lesión cerebral tenía como resultado déficits de memoria a corto plazo, en el siguiente ensayo las ratas fueron entrenadas sin tratamiento farmacológico y posteriormente se hicieron pruebas después de un intervalo de 4 horas, en lugar del intervalo normal de 24 h. Ambos grupos mostraron una preferencia por el objeto novedoso y no hubo una diferencia significativa entre los grupos. Por lo tanto, podemos concluir que la lesión cerebral por PLF causó déficits de memoria para el reconocimiento de objetos a las 24 horas, pero no a las 4 h (* = $p < 0,05$)
- La FIG. 3E muestra el rendimiento para el reconocimiento de objetos en ratas antes de la lesión. La retención en la memoria de un día en el reconocimiento de objetos depende del entrenamiento de la memoria a largo plazo. Las ratas fueron entrenadas durante 7,5 min para un par de objetos idénticos y después se hicieron pruebas 24 h después de la retención de la memoria. La retención de la memoria se cuantificó como un índice de discriminación. Este entrenamiento y pruebas 24 h después de la retención de la memoria repetidos se repitió durante 5 ensayos antes de la lesión. Durante este entrenamiento antes de la lesión, las ratas todavía no estaban asignadas a un grupo de tratamiento y no recibieron tratamiento inhibidor de la PDE4. Antes de la lesión, la prueba t que comparaba grupos no reveló diferencias significativas en el rendimiento de reconocimiento de objetos en cualquiera de los días de prueba (Ensayo 1, $p = 0,591$; Ensayo 2, $p = 0,177$; Ensayo 3, $p = 0,911$; Ensayo 4, $p = 0,755$; Ensayo 5, $p = 0,780$).
- La FIG. 4 muestra el rendimiento de rehabilitación cognitiva (media ID \pm EEM). En el primer día de la rehabilitación cognitiva repetida, se volvió a hacer una prueba a las ratas una segunda vez sin la inyección de fármaco o vehículo (FIG. 4A, ensayo 0). No hubo diferencia significativa entre el vehículo y los grupos de HT-0712 en esta segunda evaluación de la línea de base. Las ratas comenzaron a continuación con rehabilitación cognitiva asistida farmacológicamente con HT-0712 o el vehículo todos los días durante 5 ensayos (FIG. 4A, ensayo 1-5). En el ensayo de rehabilitación 1 ($p = 0,001$), ensayo 2 ($p = 0,001$), ensayo 3 ($p = 0,007$) y ensayo 5 ($p = 0,001$), el rendimiento del grupo HT-0712 fue significativamente mejor que el grupo del vehículo. Para evaluar si la rehabilitación asistida farmacológicamente mejoraba el rendimiento de la memoria sin fármaco, las ratas se

entrenaron/ensayaron sin tratamiento farmacológico. El grupo que recibe rehabilitación cognitiva asistida con HT-0712 tuvo un rendimiento significativamente mejor que el grupo del vehículo (FIG. 4B). Con el fin de determinar si esta mejora de los déficits de memoria a largo plazo se debía a un efecto sub-agudo de la administración repetida de HT-0712, las ratas descansaron durante 1 semana antes de ensayarlas de nuevo para la función de la memoria a largo plazo sin el fármaco (FIG. 4C). Una vez más, el efecto de la rehabilitación cognitiva asistida con HT-0712 persistía. El grupo de HT-0712 tuvo un rendimiento significativamente mejor que el grupo tratado con vehículo. (* = $p < 0,05$)

La FIG. 5 muestra los efectos a largo plazo de la rehabilitación cognitiva. Para determinar si la mejora en el funcionamiento de la memoria después de la rehabilitación cognitiva asistida con inhibidor de la PDE4 era de larga duración, las ratas fueron sometidas a pruebas para determinar el rendimiento en el reconocimiento de objetos 8 semanas después del final de la rehabilitación (FIG. 5A). El grupo de rehabilitación asistida con inhibidor de la PDE4 tuvo un rendimiento significativamente mejor que el grupo tratado con vehículo. A continuación, las ratas fueron sometidas a pruebas para determinar la retención de la memoria de 1 semana por condicionamiento por miedo con paradigma de traza. De nuevo el grupo de rehabilitación cognitiva asistida con inhibidor de la PDE4 tuvo un rendimiento significativamente mejor que el grupo tratado con vehículo (FIG. 5B). (* = $p < 0,05$). La mejora de la función de la se tradujo en otra tarea de memoria dependiente del hipocampo.

La FIG. 5C muestra el rendimiento de la memoria por condicionamiento por miedo con paradigma de traza en animales sometidos a rehabilitación motora. Para determinar si la mejora en el rendimiento motor (memoria motora) en los grupos sometidos a rehabilitación farmacológica asistida con inhibidor de la PDE4 era específica para el rendimiento motor, o si se traducía en una mejora del rendimiento cognitivo para la memoria por miedo con paradigma de traza, las ratas fueron entrenadas para memoria por miedo con paradigma de traza 1 semana después del final de la rehabilitación motora. Las ratas fueron sometidas a pruebas para determinar memoria por miedo con paradigma de traza una semana después del entrenamiento. No hubo diferencias significativas entre ninguno de los grupos inhibidor de la PDE4/rehabilitación/sin rehabilitación.

Descripción detallada de la invención

En numerosas tareas en muchas especies, incluyendo el ser humano, los protocolos de entrenamiento espaciado (varias sesiones de entrenamiento con un intervalo de descanso entre cada uno) producen una memoria más sólida y más duradera que los protocolos de entrenamiento concentrado (varias sesiones de entrenamiento sin intervalo de descanso entre ellas).

El documento WO03/032981 (Memory Pharmaceuticals Corporation) divulga el uso de inhibidores de la PDE4, tales como rolipram para el tratamiento de pacientes que sufren deterioro o declive de la cognición. En particular, se trata el deterioro de la memoria. Se divulga que los inhibidores de la PDE4 elevan los niveles de AMPc y evitan que las neuronas sufran apoptosis.

El documento WO2004/091609 (Cold Spring Harbor Laboratory) divulga un protocolo de entrenamiento cognitivo reforzado, en el que, además del entrenamiento de un paciente para mejorar los déficits cognitivos, se administra un inhibidor de la PDE4.

Los estudios genéticos de comportamiento de aprendizaje pavloviano olfativo en *Drosophila* han establecido que el entrenamiento concentrado produce una memoria de larga duración que no obstante se deteriora al cabo de al menos cuatro días, no es dependiente de síntesis proteica, no se interrumpe por la sobreexpresión de un transgen represor de CREB y se interrumpe en mutantes radish (Tully, T. et al, Cell, 79 (1):35-47 (1994) y Yin, J.C. y col., 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, es dependiente de síntesis proteica, se interrumpe por sobreexpresión de un transgen represor de CREB y es normal en mutantes radish (Tully, T. y col., Cell, 79 (1):35-47 (1994) y Yin, J.C. y col., Cell, 79(1):49-58 (1994)). Un día después del entrenamiento espaciado, la retención de memoria se compone de la memoria temprana (ARM) independiente tanto de CREB como de síntesis proteica y la memoria a largo plazo (LTM) dependiente de síntesis proteica y CREB. El entrenamiento concentrado adicional es insuficiente para inducir LTM (Tully, T. y col., Cell, 79 (1):35-47 (1994) y Yin, J.C. y col., Cell, 79(1):49-58 (1994)).

Una cantidad creciente de pruebas extiende estos resultados de invertebrados a mamíferos. Por ejemplo, en *Aplysia*, las manipulaciones moleculares de la expresión de CREB, similares a las de moscas, suprimen o potencian (i) la LTM de una respuesta electrofisiológica facilitadora en una monosinapsis sensoriomotora en cultivo celular y (ii) las conexiones sinápticas entre las neuronas sensoriales y motoras que se producen normalmente después de aplicaciones espaciadas del estímulo facilitador (Bartsch, D. y col., Cell, 83(6):979-992 (1995)). En ratas, las inyecciones de oligonucleótidos de ARN antisentido en el hipocampo o la amígdala bloquean la formación de LTM de dos tareas diferentes que dependen de la actividad en estas regiones anatómicas, respectivamente (Guzowski, J.F. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (94)6:2693-2698 (1997) y Lamprecht, R. y col., J Neurosci., 17(21):8443-8450 (1997). En ratones, la formación de LTM para tareas tanto implícitas como explícitas es defectuosa en ratones mutantes de CREB (Bourtchuladze, R. y col., Cell, (79)1:59-68 (1994)).

- El entrenamiento de ratones transgénicos, que portan un gen indicador dependiente de CRE (beta-galactosidasa), en condicionamiento por miedo al contexto dependiente del hipocampo o tareas de evitación pasiva inducen la expresión del gen indicador dependiente de CRE en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo. El entrenamiento de estos ratones en una tarea de condicionamiento por miedo dependiente de la amígdala induce la expresión del gen indicador dependiente de CRE en la amígdala, pero no el hipocampo. Por lo tanto, los protocolos de entrenamiento que inducen la formación de LTM también inducen transcripción del gen dependiente de CRE en áreas anatómicas específicas del cerebro de mamífero (Impey, S. y col., *Nat. Neurosci.*, 1(7):595-601 (1998)).
- Con estos modelos animales, se han demostrado tres casos notables de potenciación de LTM. En primer lugar, la sobreexpresión de un transgen activador de CREB anula los requisitos de sesiones de entrenamiento espaciadas múltiples y, en su lugar, induce formación de LTM después de solamente una sesión de entrenamiento (que normalmente produce poca o ninguna retención de memoria 24 horas después (Yin, J.C. y col., *Cell*, 81(1):107-115 (1995))). En segundo lugar, la inyección de un transgen activador de CREB expresado en virus en amígdala de rata también es suficiente para potenciar la memoria después de entrenamiento concentrado para la respuesta de sobresalto potenciada por miedo, que anula el requisito de un intervalo de descanso en entrenamiento espaciado (Josselyn, S.A. y col., *Society for Neuroscience*, Vol. 24, Resumen 365.10 (1998)). En tercer lugar, la formación de LTM en ratones deficientes en CREB (Bourtchuladze, R. y col., *Cell*, 79 (1):59-68 (1994)) puede formarse normalmente, si los ratones mutantes se someten a un protocolo de entrenamiento espaciado diferente, (Kogan, J.H. y col., *Curr. Biol.*, 7(1):1-11 (1997)).
- CREB también aparece implicado en diversas formas de plasticidad de desarrollo y celular en el cerebro de vertebrados. Por ejemplo, la actividad neuronal aumenta la actividad de CREB en el córtex (Moore, A.N. y col., *J. Biol. Chem.*, 271(24):14214-14220 (1996)). CREB también media la plasticidad de desarrollo en el hipocampo (Murphy, D.D. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(4):1482-1487 (1997)), en el córtex somatosensorial (Glazewski, S. y col., *Cereb. Cortex*, 9(3):249-256 (1999)), en el cuerpo estriado (Liu, F.C. y col., *Neuron*, 17(6):1133-1144 (1996)) y en el córtex visual (Pham, T.A. y col., *Neuron*, 22(1):63-72 (1999)).
- CREB parece estar afectado en la enfermedad neurodegenerativa humana y la lesión cerebral. Por ejemplo, la activación y/o expresión de CREB se interrumpe en la enfermedad de Alzheimer (Ikezu, T. y col., *EMBO J.*, 15(10):2468-2475 (1996); Sato, N. y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 232(3):637-642 (1997), Yamamoto-Sasaki, M. y col., *Brain. Res.*, 824(2):300-303 (1999)). Vitolo, O.V. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 13217-13221 (2002)). La activación y/o expresión de CREB también se eleva después de convulsiones o isquemia (Blendy, J.A. y col., *Brain. Res.*, 681(1-2):8-14 (1995) y Tanaka, K. y col., *Neuroreport*, 10(11):2245-2250 (1999)). El "enriquecimiento ambiental" es neuroprotector, lo que evita la muerte celular actuando a través de CREB (Young, D. y col., *Nat., Med.*, 5(4):448-453 (1999)).
- CREB actúa durante la sensibilidad a fármacos y la abstinencia. Por ejemplo, CREB se ve afectado por etanol (Pandey, S.C. y col., *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 23(9):1425-1434 (1999); Constantinescu, A. y col., *J. Biol. Chem.*, 274 (38):26985-26991 (1999); Yang, X. y col., *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 22(2):382-390 (1998); Yang, X. y col., *J. Neurochem.*, 70(1):224-232 (1998) y Moore, M.S. y col., *Cell*, 93(6):997-1007 (1998)), por cocaína (Carlezon, W.A., Jr. y col., *Science*, 282 (5397):2272-2275 (1998)), por morfina (Widnell, K.L. y col., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 276(1):306-315 (1996)), por metanfetamina (Muratake, T. y col., *Ann N. Y. Acad. Sci.*, 844:21-26 (1998)) y por cannabinoides (Calandra, B. y col., *Eur. J. Pharmacol.*, 374(3):445-455 (1999) y Herring, A.C. y col., *Biochem. Pharmacol.*, 55(7):1013-1023 (1998)).
- Una ruta de transducción de señal que puede estimular la ruta de transcripción CREB/CRE es el sistema regulador de AMPc. De forma coherente con esto, los ratones que carecen de enzimas tanto adenilato ciclasa 1 (AC1) como AC8 no aprenden (Wong S.T. y col., *Neuron*, 23(4):787-798 (1999)). En estos ratones, la administración de forskolina al área CA1 del hipocampo restaura el aprendizaje y la memoria de tareas dependientes del hipocampo. Además, el tratamiento de ratas envejecidas con fármacos que elevan los niveles de AMPc (tales como rolipram y agonistas del receptor D1) alivia una pérdida dependiente de edad de memoria del hipocampo y la potenciación celular a largo plazo (Barad, M. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(25):15020-15025 (1998)). Estos últimos datos sugieren que la señalización del AMPc es defectuosa en las ratas envejecidas con deterioro del aprendizaje (Bach, M.E. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(9):5280-5285 (1999)).
- Se divulga una metodología novedosa, que puede (1) rehabilitar varias formas de disfunción cognitiva o (2) potenciar el rendimiento cognitivo normal. La administración de un fármaco potenciador de la ruta de CREB actúa a través de un mecanismo molecular general de plasticidad sináptica, que aparentemente convierte el efecto bioquímico de una experiencia recientemente adquirida en un cambio estructural de larga duración de la sinapsis. La administración de un fármaco potenciador de la ruta de CREB se puede aplicar para cualquier aspecto de la función cerebral que muestre un incremento del rendimiento duradero después del entrenamiento cognitivo. Por consiguiente, la administración de un fármaco potenciador de la ruta de CREB puede utilizarse en la rehabilitación de un animal con cualquier forma de disfunción cognitiva o motora o para potenciar o mejorar cualquier aspecto del rendimiento cognitivo o motor normal en un animal.
- Un grupo creciente de pruebas sugiere que las neuronas continúan proliferando en el cerebro adulto (Arsenijevic, Y. y col., *Exp. Neurol.*, 170:48-62 (2001); Vescovi, A. L. y col., *Biomed. Pharmacother.*, 55:201-205 (2001); Cameron, H.

A. y McKay, R.D., *J. Comp. Neurol.*, 435:406-417 (2001) y Geuna, S. y col., *Anat. Rec.*, 265:132-141 (2001)) y que dicha proliferación es en respuesta a diversas experiencias (Nilsson, M. y col., *J. Neurobiol.*, 39:569-578 (1999); Gould, E. y col., *Trends. Cogn. Sci.*, 3:186-192 (1999); Fuchs, E. y Gould, E., *Eur. J. Neurosci.*, 12:2211-2214 (2000); Gould, E. y col., *Biol. Psychiatry*, 48:715-720 (2000) y Gould, E. y col., *Nat. Neurosci.*, 2:260-265 (1999)). En la actualidad se están llevando a cabo estrategias experimentales para trasplantar células madre neuronales en cerebro adulto para diversas indicaciones terapéuticas (Kurimoto, Y. y col., *Neurosci. Lett.*, 306:57-60 (2001); Singh, G., *Neuropathology*, 21:110-114 (2001) y Cameron, H. A y 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. y Tully, T., "Making connections between synaptic and behavioral plasticity in *Drosophila*", en *Toward a Theory of Neuroplasticity*, J. McEachem y C. Shaw, Eds. (Nueva York: Psychology Press.), págs. 193-220 (2000)). La diferenciación neuronal, extensión de neuritas y reconocimiento de la diana sináptica inicial parecen producirse de una manera independiente de la actividad. La sinaptogénesis y crecimiento sináptico posteriores, sin embargo, requieren por lo tanto 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, la administración de un fármaco potenciador de la vía de CREB puede usarse para ejercitar circuitos neuronales apropiados para ajustar las conexiones sinápticas de células madre trasplantadas de nueva adquisición que se diferencian en neuronas. Por "circuito o circuitos neuronales apropiados para ejercicio" 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 puede usarse para inducir dicha actividad neuronal. Como alternativa, puede inducirse actividad neuronal por estimulación eléctrica directa de la circuitería neuronal. "Actividad neuronal" y "actividad neural" se usan de forma intercambiable en la presente memoria.

En la presente memoria se divulgan procedimientos para potenciar un aspecto específico del rendimiento cognitivo en un animal (en particular en un ser humano u otro mamífero o vertebrado) en necesidad del mismo que comprenden (a) administrar al animal un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB y opcionalmente, (b) entrenar al animal en condiciones suficientes para producir una mejora en la realización por el animal de una tarea cognitiva de interés.

La terapia de rehabilitación intensiva puede mejorar la recuperación funcional después de una lesión cerebral. Esta recuperación se produce a través de la reorganización del tejido cerebral residual cuando las neuronas supervivientes son 'reentrenadas' para asumir la pérdida de función. Los cambios en la plasticidad neural se cree que son la base de esta reorganización. La activación de la ruta AMPc/CREB es un paso esencial para los cambios en la plasticidad neural dependientes de la experiencia. Se examinaron los efectos de HT-0712 y rolipram sobre la rehabilitación motora y cognitiva después de una lesión cerebral por percusión lateral por fluido (PLF). Se entrenaron ratas adultas para cumplir los criterios de una tarea de destreza motora (el paso escalonado) y se les infringió lesiones usando un dispositivo de PFL. Después de una semana de recuperación, se inició en las ratas la rehabilitación de la destreza motora, ya sea con inhibidores de la PDE4 o vehículo. Tanto HT-0712 como rolipram potenciaron significativamente la rehabilitación motora. En un grupo separado de animales, las ratas se ensayaron primero para el rendimiento de memoria para el reconocimiento de objetos en la línea de base. Después de la lesión, las ratas mostraron un reconocimiento de objetos intacto a las 4 horas después del entrenamiento, pero una memoria deficiente a las 24 horas. Se administró HT-0712 o vehículo durante el entrenamiento cognitivo repetido para el reconocimiento de objetos (rehabilitación cognitiva). Después de 6 sesiones de rehabilitación, el grupo de HT-0712 tuvo un rendimiento significativamente mejor que el grupo de vehículo. Esta mejora de la memoria se prolongó hasta ocho semanas en la ausencia de fármaco y se tradujo en un rendimiento mejorado de la memoria para el condicionamiento por miedo con paradigma de traza. Sorprendentemente, el inhibidor de la PDE4 HT-0712 se puede utilizar para mejorar la recuperación motora y cognitiva después de una lesión cerebral.

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

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

La disfunción cognitiva, habitualmente asociada con disfunción cerebral y trastornos o afecciones del sistema nervioso central (SNC), surge debido a herencia, enfermedad, lesión y/o edad. Los trastornos y afecciones del SNC asociados con alguna forma y grado de insuficiencia cognitiva (disfunción) incluyen, pero sin limitación, lo siguiente:

- 1) deterioro de la memoria asociado con la edad;
- 2) trastornos neurodegenerativos, tales como delirio (estado de confusión aguda); demencia, incluyendo enfermedad de Alzheimer y demencias de tipo no Alzheimer, tales como, pero sin limitación, demencia de

5 cuerpos de Lewy, demencia vascular, demencia de Binswanger (encefalopatía arteriosclerótica subcortical) , demencias asociadas con 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;

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

15 4) pérdida de función cognitiva dependiente de traumatismo, tal como, pero sin limitación, la asociada con (debido a), enfermedades cerebrovasculares, incluyendo ictus e isquemia, incluyendo ictus isquémico; traumatismo cerebral, incluyendo hematoma subdural y tumor cerebral; lesión craneal;

20 5) trastornos asociados con alguna forma y grado de disfunción cognitiva que surge debido a un defecto genético, tal como, pero sin limitación, síndrome de Rubinstein-Taybi, síndrome de Down; síndrome de Angelman, síndrome del X frágil (por ejemplo, X frágil 1, X frágil 2), neurofibromatosis, síndrome de Coffin-Lowry, distrofia miotónica, síndrome de Rett, síndrome de William, síndrome de Klinefelter, mosaicismos, la trisomía 13 (síndrome de Patau), trisomía 18 (síndrome de Edwards), 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;

25 6) discapacidades de aprendizaje, lenguaje o lectura, particularmente en 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, aritmética o combinaciones de cualquiera de las anteriores. Las discapacidades de aprendizaje incluyen minusvalías perceptuales, dislexia y afasia del desarrollo.

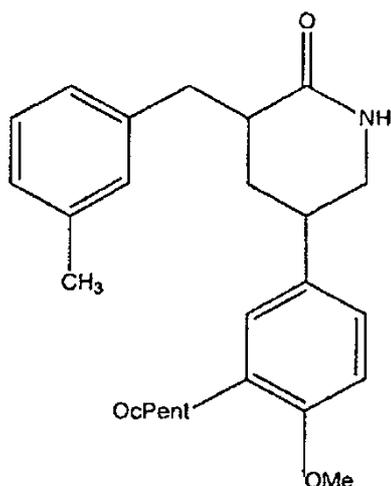
30 Las expresiones “rendimiento cognitivo” y “función cognitiva” son términos reconocidos en la técnica y se usan en la presente memoria de acuerdo con sus significados aceptados en la técnica. Por “tarea cognitiva” se entiende una función cognitiva. Las funciones cognitivas incluyen adquisición de memoria, diferenciación visual, diferenciación 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 en relación con el 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 sería la capacidad de caminar, por ejemplo.

40 “Proporcionar la mejora sostenida” significa que la mejora en el rendimiento de una determinada tarea cognitiva permanece después de la suspensión de la administración del agente de aumento.

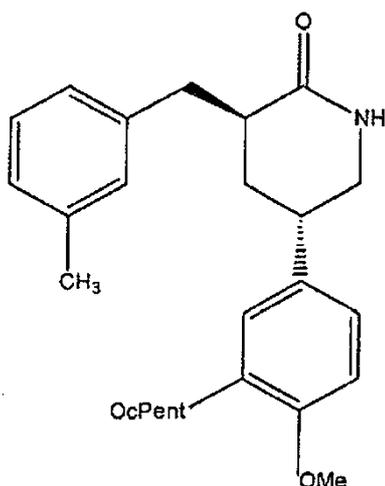
45 Por consiguiente, también se divulgan procedimientos para la mejora de un déficit cognitivo asociado con un trastorno o afección del sistema nervioso central (SNC) en un animal (en particular en un ser humano u otro mamífero o vertebrado) que comprende tratar al animal con un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB en la ausencia de entrenamiento cognitivo formal. También se divulgan procedimientos para proporcionar una mejora sostenida de un déficit cognitivo asociado con un trastorno o afección del sistema nervioso central (SNC) en un animal (en particular en un ser humano u otro mamífero o vertebrado) que comprende administrar al animal un agente de aumento que potencia la función de la ruta de CREB y detectar dicha mejora sostenida.

50 Se desvela un procedimiento para tratar un déficit cognitivo asociado con 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 opcionalmente (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 deterioro de la memoria asociado con la edad.

55 Por ejemplo, el agente de aumento es un inhibidor de la fosfodiesterasa 4 (PDE4). Ejemplos de inhibidores de la PDE4 incluyen rolipram y compuestos de la siguiente fórmula:



5 en la que "Me" significa "metilo" y "cPent" significa "ciclopentilo". Se entiende que la fórmula anterior abarca tanto los enantiómeros como las mezclas de los mismos. Los compuestos se pueden preparar usando la metodología proporcionada en la patente US-6.458.829, cuyas enseñanzas se incorporan aquí por referencia. En una realización particular, los carbonos 3 y 5 de esta fórmula anterior están en la configuración S:



10 en la que "Me" significa "metilo" y "cPent" significa "ciclopentilo". Otros ejemplos de inhibidores de la PDE4 se pueden encontrar en la publicación US-2002/0028842 A1 (publicada el 7 de marzo de 2002); patente US-6.458.829B1; patente US-6.525.055B1; patente US-5.552.438; patente US-6.436.965 y patente US-6.204.275. Se conocen otros inhibidores de la PDE4 y están fácilmente disponibles en la técnica

15 El retraso mental afecta al procesamiento cognitivo y a las funciones cognitivas, incluyendo el aprendizaje y la adquisición de la memoria (Weeber, E.J. y col., Neuron, 33:845-848)). El retraso mental puede ser causado por factores cromosómicos o genéticos, infecciones congénitas, teratógenos (fármacos y otras sustancias químicas), desnutrición, radiación o trastornos desconocidos que afectan a la implantación y la embriogénesis. Síndromes de retraso mental incluyen, pero no se limitan a, síndrome de Klinefelter, mosaicismos, trisomía 13 (síndrome de Patau),
 20 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. Síndromes de retraso mental también incluyen síndrome de Rubinstein-Taybi, síndrome de Down, síndrome de Angelman, neurofibromatosis, síndrome de Coffin-Lowry, síndrome de Rett, distrofia miotónica, síndrome del X frágil (por ejemplo, X frágil 1, X frágil 2) y síndrome de William (Weeber, E.J. y col., Neuron, 33:845-848 (2002)).

25 También se divulgan procedimientos de terapia de un déficit cognitivo asociado con un trastorno o afección del SNC en un animal que se ha sometido a 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 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 en el cerebro o médula espinal de un animal o (2) se estimulan células madre neuronales endógenas o se induce su

proliferación en el animal. Se conocen y están fácilmente disponibles en la técnica procedimientos para trasplantar células madre neuronales en el cerebro o médula espinal de un animal (véase, por ejemplo, Cameron, H.A. y McKay, R.D., *Nat. Neurosci.*, 2:894-897 (1999); Kurimoto, Y. y col., *Neurosci. Lett.*, 306:57-60 (2001) y Singh, G., *Neuropathology*, 21:110-114 (2001)). Se conocen y están fácilmente disponibles en la técnica procedimientos para estimular o inducir la proliferación de células madre neuronales endógenas en un animal (véase, por ejemplo, Gould, y col., *Trends Cogn. Sci.* 3:186-192 (1999); Gould, E. y col., *Biol. Psychiatry*, 48:715-20 (2000); Nilsson, M. y col., *J. Neurobiol.*, 39:569-578 (1999); Fuchs, E. y Gould, E., *Eur. J. Neurosci.*, 12:2211-2214 (2000) y Gould, E. y col., *Nat. Neurosci.*, 2:260-265 (1999)). Los procedimientos particulares de trasplantar células madre neuronales en el cerebro o médula espinal de un animal y los procedimientos 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 divulgan además procedimientos para mejorar o potenciar el aprendizaje y/o rendimiento en un animal con una discapacidad de aprendizaje, lenguaje o lectura o combinaciones de cualquiera de los 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 rendimiento de aprendizaje, lenguaje o lectura.

Los agentes de aumento, como se usa en la presente memoria, 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 celulares permeantes de AMPc (por ejemplo, 8-bromo AMPc); activadores de la adenilato ciclasa 1 (AC1) (por ejemplo, forskolina); agentes que afectan al receptor unido a la proteína G, tal como, pero sin limitarse a, receptores adrenérgicos y receptores opioides y sus ligandos (por ejemplo, fenetilaminas); moduladores de la concentración de calcio intracelular (por ejemplo, tapsigargina, agonistas del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA), inhibidores de las fosfodiesterasas responsables de la degradación de AMPc (por ejemplo, inhibidores de la fosfodiesterasa 1 (PDE1) (por ejemplo, iso-buto-meto-xantina (IBMX)), inhibidores de la fosfodiesterasa 2 (PDE2) (por ejemplo, iso-buto-meto-xantina (IBMX)), inhibidores de la fosfodiesterasa 3 (PDE3), inhibidores de la fosfodiesterasa 4 (PDE4) (por ejemplo, rolipram, HT0712), etc.) (véase también, por ejemplo, la patente US-6.458.829B1; la publicación US-2002/0028842A1 (publicada el 7 de marzo de 2002)) y moduladores de proteínas quinasas y proteínas fosfatasa, que median la activación de la proteína CREB y la expresión génica dependiente de CREB. Los agentes de aumento pueden ser CREB exógeno, análogos de CREB, moléculas de tipo CREB, fragmentos de CREB biológicamente activos, proteínas de fusión de CREB, secuencias de ácido nucleico que codifican para CREB exógeno, análogos de CREB, moléculas de tipo CREB, fragmentos de CREB biológicamente activos o proteínas de fusión de CREB.

Los agentes de aumento también pueden ser moduladores de la función de CREB o secuencias de ácidos nucleicos que codifican para moduladores de la función de CREB. Los moduladores de la función de CREB, tal como se utiliza en la presente memoria, 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 también compuestos que son capaces de aumentar la función de CREB en el SNC. Tales compuestos incluyen, pero no se limitan a, los compuestos que afectan la estabilidad y fluidez de la membrana y a la inmuoestimulación específica. En una realización particular, el agente de aumento es capaz de potenciar transitoriamente la función de la ruta de CREB en el SNC.

Análogos de CREB, o derivados, se definen en la presente memoria como proteínas que tienen secuencias de aminoácidos análogas a las del CREB endógeno. Secuencias de aminoácidos análogas se definen en la presente memoria como secuencias de aminoácidos con identidad suficiente de secuencia de aminoácidos de CREB endógeno para poseer la actividad biológica del CREB endógeno, pero con uno o más cambios "silenciosos" en la secuencia de aminoácidos. Análogos de CREB incluyen CREM de mamíferos, ATF-1 de mamíferos y otros miembros de la subfamilia CREB/CR-EM/ATF-1.

Molécula de tipo CREB, como se utiliza el término en la presente memoria, se refiere a una proteína que se asemeja funcionalmente (mimetiza) a CREB. Las moléculas de tipo CREB no necesitan tener secuencias de aminoácidos análogos a las de CREB endógeno.

Fragmentos de polipéptidos de CREB biológicamente activos pueden incluir sólo una parte de la secuencia de aminoácidos de longitud completa de CREB y, sin embargo, poseer una actividad biológica. Tales fragmentos pueden ser producidos por deleciones del carboxilo o el amino terminal, así como deleciones internas.

Las proteínas de fusión comprenden una proteína CREB como se describe en la presente memoria, referido como un primer resto, unido a un segundo resto que no existe en la proteína CREB. El segundo resto puede ser un solo aminoácido, un resto peptídico o polipéptido u otro resto orgánico, tal como un carbohidrato, un lípido o una molécula inorgánica.

Las secuencias de ácido nucleico se definen en la presente memoria como heteropolímeros de moléculas de ácido nucleico. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser bicatenarias o monocatenarias y pueden ser una molécula de desoxirribonucleótido (ADN), tal como ADNc o ADN genómico o una molécula de ribonucleótido (ARN). Como tal, la secuencia de ácido nucleico puede, por ejemplo, incluir uno o más exones, con o sin, según sea apropiado, intrones, 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, 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 puede aislarse de la naturaleza, modificarse a partir de secuencias nativas o fabricarse de novo, como se describe en, por ejemplo, Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York (1998) y Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor University Press, Nueva York. (1989). Los ácidos nucleicos pueden aislarse y fusionarse entre sí por procedimientos conocidos en la técnica, tales como explotar y fabricar sitios de clonación o restricción compatibles.

Normalmente, la secuencia de ácido nucleico será un gen que codifica la proteína CREB deseada, análogo de CREB, molécula de tipo CREB, proteína de fusión de CREB o modulador de la función de CREB. Dicho gen normalmente se liga operativamente a secuencias de control adecuadas capaces de efectuar la expresión de la proteína CREB o modulador de la función de CREB, preferentemente en el SNC. La expresión "ligado operativamente", como se usa en la presente memoria, se define de forma que significa que el gen (o la secuencia de ácido nucleico) se liga a secuencias de control de una manera que permite la expresión del gen (o la secuencia de ácido nucleico). Generalmente, ligado operativamente significa contiguo.

Las secuencias de control incluyen un promotor transcripcional, una secuencia operadora opcional para controlar la transcripción, un ARN mensajero (ARNm) adecuado 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, análogo de CREB, molécula de tipo CREB, fragmento de CREB biológicamente activo, proteína de fusión de CREB o modulador de la función de CREB puede colocarse bajo el control regulador de un promotor que puede inducirse o reprimirse, ofreciendo de este modo un mayor grado de control con respecto al nivel del producto.

Como se usa en la presente memoria, el término "promotor" se refiere a una secuencia de ADN, 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 ARN polimerasa y otros factores que pueden requerirse para el inicio de la transcripción. Se conocen bien en la técnica promotores adecuados. Ejemplos de promotores incluyen el SV40 y el factor de elongación humano (EF1). Otros promotores adecuados están fácilmente disponibles en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1998); Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor University Press, Nueva York (1989) y Patente US-5.681.735).

Los agentes de aumento pueden potenciar la función de la ruta de CREB por medio de diversos mecanismos. Por ejemplo, un agente de aumento puede afectar a una ruta de transducción de la señal que conduce a la inducción de expresión génica dependiente de CREB. La inducción de la expresión génica dependiente de CREB puede conseguirse, por ejemplo, mediante regulación al alza de efectores positivos de la función de CREB y/o regulación a la baja de 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 AMPc fosfodiesterasa (AMPc PDE) y represores de CREB.

Un agente de aumento puede potenciar la función de la ruta de CREB actuando bioquímicamente corriente arriba de o actuando directamente en una forma activadora o represora de una proteína CREB y/o en un complejo de transcripción que contiene proteína CREB. Por ejemplo, la función de la ruta de CREB puede verse 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 CREB de ADN en la región promotora; o induciendo 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 pueden administrarse directamente a un animal de diversas maneras. En una realización preferida, los agentes de aumento se administran sistémicamente. Otras vías de administración se conocen generalmente en la técnica e incluyen intravenosa incluyendo infusión y/o inyección de bolo, por vía intracerebroventricular, intratecal, parenteral, mucosal, de implante, intraperitoneal, oral, intradérmica, transdérmica (por ejemplo, en polímeros de liberación lenta), intramuscular, subcutánea, tópica, epidural, etc. Otras vías adecuadas de administración también pueden usarse, por ejemplo, para conseguir la absorción a través de los revestimientos epitelial o mucocutáneo. También pueden administrarse agentes de aumento particulares por terapia

génica, en la que una molécula de ADN que codifica una proteína o péptido terapéutico particular se administra al animal, por ejemplo, mediante un vector, que provoca que la proteína o péptido particular se exprese y secrete a niveles terapéuticos in vivo.

5 Un vector, como se usa el término en la presente memoria, se refiere a un vector de ácido nucleico, por ejemplo, un plásmido de ADN, virus u otro replicón adecuado (por ejemplo, vector viral). Los vectores virales incluyen retrovirus, adenovirus, parvovirus (por ejemplo, virus adeno-asociados), coronavirus, virus de ARN de hebra negativa, tales como ortomixovirus (por ejemplo, virus de la gripe), rabdovirus (por ejemplo, virus de la rabia y de estomatitis vesicular), paramixovirus (por ejemplo, sarampión y Sendai), virus de ARN de hebra positiva, tales como picornavirus y alfavirus y virus de ADN bicatenario incluyendo adenovirus, herpesvirus (por ejemplo, virus de Herpes Simplex tipos 1 y 2, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus) y poxvirus (por ejemplo, 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: sarcoma-leucosis aviar, virus de tipo B, de tipo C de mamífero, virus de tipo D, grupo HT-LV-BLV, lentivirus, spumavirus (Coffin, J.M., *Retroviridae: The viruses and their replication*, en *Fundamental Virology*, Tercera Edición, B.N. Fields, y col., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, 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 y col., Patente US-5.801.030, las enseñanzas de la cual se incorporan en el presente documento por referencia.

25 Una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína o péptido (por ejemplo, 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 la función de CREB) puede insertarse en un vector de ácido nucleico de acuerdo con procedimientos generalmente conocidos en la técnica, (véase, por ejemplo, Ausubel y col., Eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1998); Sambrook y col., Eds., *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor University Press, Nueva York (1989)).

El modo de administración es preferentemente en la localización de las células diana. En una realización particular, el modo de administración es a las neuronas.

30 Los agentes de aumento pueden administrarse junto con otros componentes de agentes biológicamente activos, tales como tensioactivos farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, glicéridos), excipientes (por ejemplo, lactosa), estabilizadores, conservantes, humectantes, emolientes, antioxidantes, excipientes, diluyentes y vehículos. Si se desea, también pueden añadirse ciertos agentes edulcorantes, saporíferos y/o colorantes.

35 Pueden formularse agentes de aumento como una solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de tales vehículos son agua, solución salina, solución de Ringer, solución de cloruro sódico isotónica, solución de dextrosa y albúmina de suero humano al 5 %. También pueden usarse liposomas y vehículos no acuosos, tales como aceites fijos. El vehículo o polvo liofilizado puede contener aditivos que mantienen la isotonicidad (por ejemplo, cloruro sódico, manitol) y estabilidad química (por ejemplo, tampones y conservantes). La formulación puede esterilizarse por técnicas habitualmente usadas. Se describen vehículos farmacéuticos adecuados en Remington's Pharmaceutical Sciences.

40 La dosis de agente de aumento administrado a un animal es la cantidad requerida para efectuar un cambio en la expresión génica dependiente de CREB, particularmente en neuronas. La dosis administrada a un animal, incluyendo la frecuencia de administración, variará dependiendo de diversos factores, incluyendo características farmacodinámicas del agente de aumento particular, modo y vía de administración; talla, edad, sexo, salud, peso corporal y dieta del receptor, naturaleza y alcance de los síntomas que se tratan o naturaleza y alcance de la función o funciones cognitivas que se potencian o modulan, tipo de tratamiento simultáneo, frecuencia de tratamiento y el efecto deseado.

45 Los agentes de aumento pueden administrarse en dosis sencillas o divididas (por ejemplo, una serie de dosis separadas por intervalos de días, semanas o meses) o en una forma de liberación prolongada, dependiendo de factores, tales como la naturaleza y el alcance de los síntomas, tipo de tratamiento simultáneo y el efecto deseado. Otros regímenes terapéuticos o agentes pueden usarse junto con la presente invención.

La presente invención se ilustrará ahora mediante el siguiente ejemplo, que no debe considerarse limitante de ninguna manera:

Ejemplo

55 Los sujetos fueron 103 ratas macho adultos Sprague-Dawley (Taconic, Gremantown, NY) con un peso entre 275 y 300 g al inicio de la experimentación. Las ratas fueron alojadas individualmente en una instalación para animales de temperatura controlada con un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h con acceso a voluntad a la comida y al agua. Todos los protocolos animales cumplían con las directrices NIH y fueron aprobados por el Comité del Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación del Cold Spring Harbor Laboratory.

Rehabilitación motora con la tarea del paso escalonado

La tarea del paso escalonado usada en este estudio la caracterizaron previamente Klint y col., Journal of Neurotrauma, 21 Simposio anual de la Sociedad Nacional de Neurotraumatología, 20(10): (2003). Se compone de una pista de 20 cm de largo por 9 cm de ancho en la que están dispuestas una serie de pasos elevados. Los pasos estaban alternativamente "escalonados" a 0,5 cm desde la línea media y a una distancia de 25 cm entre los escalones. Esta posición colocaba la superficie superior para caminar directamente en línea con el modo de andar natural de una rata de 350 g. Se colocó una fina pieza de plexiglás (20 cm de largo, 6 cm de ancho y 2 mm de espesor) en el centro de la pista para evitar que las ratas se colasen entre los escalones y que también servían como base para que los animales recuperasen el equilibrio después de caer de la superficie para caminar de los escalones. Los lados y la parte superior de la pista se encerraron en plexiglás para limitar el movimiento lateral y vertical del animal. Se acoplaron unas cajas oscuras *Homebox* (30 cm X 30 cm X 30 cm) a ambos extremos de la pista. Se acopló una luz brillante y un altavoz con generador de ruido blanco al interior de la caja y en el lado exterior de la misma, de tal modo que quedase encerrado dentro de la pista. Se utilizó una puerta controlada por ordenador para manejar la entrada/salida de las cajas.

En los días 1-13 las ratas fueron manipuladas, se habituaron a la pista y se las entrenó para atravesar libremente la pista pisando la superficie superior de los escalones. Una vez aclimatadas a la pista, las ratas fueron entrenadas utilizando un paradigma de entrenamiento por reforzamiento negativo para (1) salir de una caja, (2) atravesar la pista y (3) entrar en la caja opuesta para poner fin a un estímulo negativo (luz brillante y ruido blanco). Después de un intervalo de descanso de 60 segundos, la rata se entrenó para volver a la caja de origen usando el mismo paradigma de entrenamiento por reforzamiento negativo. A partir del día 14 de entrenamiento, las ratas fueron entrenadas diariamente en 5 ensayos hasta que cumplieron los criterios (latencia < 12 seg y 1 o menos errores totales en 3 pasos consecutivos). Se contaba como error cada vez que una pata se deslizaba de un escalón o se tomaba directamente un escalón sin pisar la superficie superior del escalón.

Veinticuatro horas después de que una rata cumpliera los criterios, se lesionó usando el dispositivo de PFL. Se dejó que el animal se recuperara durante 7 días. El día 8 después de la lesión, la rata fue sometida a pruebas para determinar el rendimiento en la línea de base (3 pasos) en la tarea del paso escalonado. Al día siguiente, el animal se asignó aleatoriamente a uno de 5 grupos de tratamiento: vehículo con rehabilitación (n=11), 0,15 mg/kg de HT-0712 con rehabilitación (n=13), 0,1 mg/kg de rolipram con rehabilitación (n=11), 0,15 mg/kg de HT-0712 sin rehabilitación, (n=10) o vehículo sin rehabilitación (n=10). Las inyecciones se administraron i.p. 20 minutos antes de la rehabilitación (o una vez al día para los grupos sin rehabilitación). La rehabilitación/inyecciones se repitieron durante 8 días consecutivos. En el día 10, (el último día de la rehabilitación) no se administró ninguna inyección y todas las ratas se sometieron de nuevo a pruebas para obtener el rendimiento en la tarea del paso escalonado.

Condicionamiento con paradigma de traza

Una semana después de completar la rehabilitación motora, las ratas fueron entrenadas para condicionamiento por miedo con paradigma de traza. Se colocó un aparato normalizado de condicionamiento por miedo al contexto para rata (Med Associates, Inc., VA) dentro de una caja oscura con atenuación del sonido (Med Associates, Inc., VA). En el día de entrenamiento, la rata se colocó en la cámara de acondicionamiento durante 2 minutos antes de la aparición del estímulo condicionado (EC), un tono de 2800 Hz que se prolongaba durante 20 segundos a 75 dB. Treinta segundos después de finalizar el tono, se aplicó al animal un estímulo incondicionado (EI) en forma de descarga eléctrica de 0,5 mA durante dos segundos. Un intervalo entre ensayos de 3 minutos separaba el cambio entre EI y el EC. Las ratas fueron entrenadas para recibir 5 pares de EC y EI. Después del último EI, la rata se dejó en la cámara durante 30 segundos más y luego se devolvió a su jaula. Después de someter al sujeto al experimento, el aparato se limpió a fondo con 75 % de etanol, agua, se secó y se ventiló. Las ratas se ensayaron 7 días después del entrenamiento. Para diferenciar el contexto del día de entrenamiento, el ensayo se realizó en una cámara de atenuación del sonido nueva, teniendo las cámaras interiores dimensiones, colores, texturas e iluminación diferentes. La cámara se limpió usando una solución limpiadora Windex en lugar de etanol. Cada ensayo se inició con 120 segundos de habituamiento, después 20 segundos de tono (EC), seguido de un intervalo adicional de descanso de 240 segundos, hasta que el EC se presentó tres veces. La inmovilidad se registró a intervalos de cinco segundos. La inmovilidad se definió como la ausencia completa de movimiento durante 3 a 5 segundos. Se calculó un porcentaje de la puntuación de inmovilidad restando el porcentaje inmovilidad pre-EC (durante los primeros 120 segundos) del porcentaje total de inmovilidad tras el EC. Cada experimento fue filmado. En todos los experimentos, el investigador desconocía el tratamiento farmacológico y las condiciones de entrenamiento de los sujetos.

Rehabilitación cognitiva con reconocimiento repetido de objetos novedosos

La caja de exploración de campo abierto (una caja negra de Plexiglas de 80 cm de largo, 60 cm de ancho y 50 cm de altura, iluminada indirectamente con 55 lúmenes) contenía una capa delgada de viruta, que se sustituyó por la mitad de viruta fresca al comienzo de cada día. Una cámara de video montada directamente sobre el campo de exploración grababa todas las sesiones de entrenamiento y ensayo. Los objetos se colocaron en posiciones marcadas en la zona central de la caja y la posición espacial de los objetos (lados izquierdo-derecho) se intercambiaba para los diferentes sujetos. Antes del entrenamiento para el RO, los animales fueron manipulados y habituados al campo de exploración durante 4 minutos por día durante 3 días consecutivos. Durante el

entrenamiento, las ratas exploraron libremente el campo de exploración que contenía dos objetos idénticos (por ejemplo, velas) durante 7,5 minutos. Veinticuatro horas después del entrenamiento, la rata se colocó de nuevo en el campo de exploración durante 5 minutos con un objeto que había explorado el día anterior y un nuevo objeto de tamaño similar. Para el propósito de este estudio nos referiremos a una sesión de entrenamiento y la sesión de ensayo siguiente 24 horas más tarde como un único "ensayo". Un día (24 horas) después de la finalización de un ensayo, los animales comenzaron un nuevo ensayo entrenando con un nuevo conjunto de objetos idénticos, seguido de sesiones de ensayo al día siguiente. Durante la rehabilitación cognitiva, las ratas fueron entrenadas o sometidas a pruebas sin ningún día de descanso. En total, cada rata fue entrenada para 17 pares de objetos (5 antes de la lesión y 13 después de la lesión). Durante el entrenamiento se registró el número de aproximaciones y el tiempo dedicado a explorar cada objeto. Durante el ensayo se registró el tiempo dedicado a la exploración de cada objeto. Se calculó un índice de discriminación con el tiempo de exploración del objeto novedoso y el antiguo usando la siguiente fórmula $((\text{objeto novedoso} - \text{objeto viejo}) / (\text{objeto novedoso} + \text{objeto viejo})) * 100$.

La evolución temporal de la rehabilitación cognitiva fue como sigue: Véase la FIG. 1 para la representación gráfica del procedimiento de rehabilitación: Día 1-10: Ensayos 1-5, análisis antes de la lesión; Día 11: inducción experimental de lesión cerebral traumática (TBI), Día 12-18: recuperación de la TBI; Día 19-20: Ensayo 6, después de la lesión en la línea de base (BS1), Día 21-22: Ensayo 7, entrenamiento con fármacos (TD1) Día 23: Ensayo 8, prueba de la memoria a corto plazo (STM) con intervalo de 4 h entre el entrenamiento y las pruebas sin ningún fármaco, Día 24-25: Ensayo 9, establecer segundo rendimiento en la línea de base (BS2) antes de la rehabilitación asistida farmacológicamente; Día 26-34: Ensayos 10-14, rehabilitación cognitiva asistida farmacológicamente (fármaco dado 20 minutos antes del entrenamiento), Día 35-36: Ensayo 15, primera evaluación de la memoria post-rehabilitación (ASS1) sin fármaco en el momento del entrenamiento; Día 42-43: Ensayo 16, segunda evaluación de la memoria post-rehabilitación (ASS2) después de 1 semana de descanso, Día 79-79: Ensayo 17, tercera evaluación de la memoria post-rehabilitación (ASS3) después de 5 semanas de descanso, Día 85: condicionamiento con paradigma de traza; Día 92: prueba de condicionamiento con paradigma de traza.

Inducción de la lesión cerebral traumática

La lesión cerebral traumática se produjo usando el modelo bien caracterizado de percusión lateral por fluido (PLF) (McIntosh y col., Neuroscience, 28(1):233-44 (1989), Hallam y col., J Neurotrauma, 21(5):521-39 (2004). Brevemente, las ratas fueron anestesiadas, intubadas y sometidas a ventilación mecánica con isoflurano al 2 % usando aire quirúrgico como gas portador. La temperatura corporal se monitorizó y se mantuvo a $37,5 \pm 0,5$ °C con un controlador de temperatura de realimentación (Physitemp Instruments, Clifton, Nueva Jersey). Se hizo una incisión en la línea media del cuero cabelludo y se llevó a cabo una craneotomía circular de 4,8 mm en el punto medio entre lambda y bregma, 3,0 mm a la derecha de la sutura central. Se fijó un conector de cierre luer modificado (cánula para traumatismo) de 2,6 mm de diámetro interior en la craneotomía con adhesivo cianoacrilico y acrilico dental. La LCR se produjo inyectando rápidamente un volumen pequeño de solución salina en la cavidad craneal cerrada con un dispositivo de percusión por fluido (VCU Biomedical Engineering, Richmond, VA). El animal se retiró a continuación del dispositivo, se retiraron el acrilico y la cánula y se suturó la incisión. La ventilación se continuó con aire ambiental sin isoflurano hasta que se reanudó la respiración espontánea. El dispositivo de PLF fue calibrado para infringir una lesión cerebral grave (3,2 atm). Esta lesión cerebral tuvo como resultado una tasa de mortalidad del 34 % (22 de 30 ratas sobrevivieron para el estudio de RO y 57 de 85 ratas sobrevivieron en el estudio de PE).

Preparación del fármaco e inyección

Se administraron inhibidores de la PDE4 HT-0712 (0,15 mg/kg) o rolipram (0,1 mg/kg) en un vehículo de solución salina que contiene dimetilsulfóxido (DMSO) al 1,5 % y Cremophor al 10 %. Esta dosis se ha elegido a partir de estudios anteriores en los que se demostró que 0,15 mg/kg de HT-0712, era la dosis más eficaz para mejorar la memoria motora en ratas (McDonald y col., Society for Neuroscience, vol. 24, Resumen 681,7. (2004).

Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como media \pm EEM. El análisis de los datos se realizó mediante el programa SPSS 12.0 (SPSS, Chicago, Illinois). El nivel de significación fue $P < 0,05$ para todas las pruebas. Para la comparación del rendimiento antes de la lesión con el rendimiento después de la lesión en el paso escalonado, se llevó a cabo una prueba t pareada usando todos los grupos para el análisis. Se realizó una ANOVA entre los grupos para el análisis de las líneas de base después de la lesión (día 1) y después de la evaluación locomotora post-rehabilitación (día 10). Para el análisis de la rehabilitación en el paso escalonado (días 2-10), se analizó la variable dependiente (fallo en la pisada o de latencia) utilizando ANOVA de medidas repetidas, siendo los días la medida repetida entre las variables del sujeto. Se realizaron pruebas post-hoc de Dunnett para determinar diferencias estadísticas entre los grupos de inyección de vehículo y de fármaco. Para el análisis de los datos de reconocimiento de objetos y de condicionamiento con paradigma de traza, se usaron pruebas t de Student no apareadas para comparar entre grupos en cada día de ensayo.

Resultados

Los inhibidores de la PDE4 potencian la rehabilitación motora

Nuestros experimentos anteriores realizados en ratones jóvenes y adultos normales establecieron que la formación de memoria a largo plazo era potenciada por los inhibidores de la PDE4 HT-0712 y rolipram (Bourtchouladze R., y col. (2003) A mouse model of Rubinstein Taybi Syndrome: defective long-term memory is ameliorated by inhibitors of phosphodiesterase 4. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 100: 10518-10522; Scott R., y col., (2002) CREB and the discovery of cognitive enhancers. *Journal of Molecular Neuroscience* 19: 171-177; Tully T., y col. (2003) Targeting the CREB pathway for memory enhancers. *Nature Reviews Drug Discovery* 2:267-77). En concreto, estos medicamentos mejoran la formación de la memoria mediante la reducción de la cantidad de entrenamiento requerido para producir la máxima memoria a largo plazo. Si estos inhibidores de PDE4 podrían facilitar la rehabilitación motora después de la lesión cerebral en ratas fue probado reduciendo la cantidad de rehabilitación necesaria para recuperar la destreza en la función locomotora. A tal fin, las ratas fueron entrenadas para el cumplimiento de un criterio en la destreza de una tarea locomotora, la tarea del paso escalonado. Después de cumplir con el criterio, se lesionó a las ratas usando el dispositivo de lesión cerebral PLF y se dejó que se recuperaran durante 1 semana. Siete días después de la lesión (día de la rehabilitación 1), todos los grupos con lesión cerebral mostraban una alteración significativa en la marcha y en la precisión de la destreza en el paso escalonado medido por un aumento significativo en los fallos de pisada ($t = -18,36$, $p = 4,28e^{-25}$) (Fig. 2A) y la latencia de cruce ($t = -13,52$, $p = 7,86e^{-19}$) (Fig. 2B) en comparación con la línea de base antes de la lesión. Un ANOVA en el día 1 de rehabilitación no reveló diferencias significativas en el rendimiento de la línea de base después de la lesión entre los grupos de tratamiento ($F_{4,50} = 0,646$, $p = 0,632$). Al día siguiente, las ratas fueron asignadas al azar para recibir la administración diaria de vehículo/inhibidor de la PDE4 con rehabilitación o la inyección diaria de vehículo/inhibidores de la PDE4 sin rehabilitación. Para las ratas que recibieron rehabilitación, se observó un efecto significativo del tratamiento farmacológico en los errores de paso escalonados ($F_{2,32} = 7,50$, $p = 0,02$) y la latencia. El análisis post-hoc de Dunnett reveló que tanto el grupo de HT-0712 ($p = 0,008$) como el grupo de rolipram ($p = 0,004$) tuvieron unos resultados significativamente mejores que el grupo tratado con el vehículo.

Además, se evaluó si la inyección diaria de vehículo/HT-0712 sin rehabilitación diaria podría mejorar el rendimiento en el día del ensayo final. Una comparación ANOVA en el día 10 mostró un efecto significativo del tratamiento ($F_{4,50} = 10,11$, $p = 0,00004$). El análisis post-hoc de Bonferroni no reveló diferencias significativas entre los grupos de vehículo ($p = 1,0$) y ninguna diferencia significativa entre los grupos de inhibidores de la PDE4 ($p = 1,0$). Sin embargo, todos los grupos que recibieron inyecciones diarias de inhibidores de la PDE4 tuvieron resultados significativamente mejores que todos los controles inyectados con vehículo (no se muestran todas las comparaciones). Específicamente el grupo HT-0712 sin rehabilitación tuvo un rendimiento significativamente mejor que el grupo de vehículo sin rehabilitación ($p = 0,01$) y significativamente mejor que el grupo de vehículo con rehabilitación ($p = 0,028$).

Los inhibidores de la PDE4 potencian la rehabilitación cognitiva

Nuestros experimentos anteriores han demostrado que los inhibidores de PDE4 rolipram y HT 0712 pueden mejorar los déficits de memoria a largo plazo en ratones, específicamente, los ratones mutantes $CBP^{+/-}$. Estos ratones mutantes $CBP^{+/-}$ son un modelo de ratón del síndrome de Rubenstein-Taybi y tienen déficits de memoria causados por una lesión molecular en la ruta de CREB (Bourtchouladze y col., *Proc Natl Acad Sci USA.*, 100(18):10518-22, (2003); Olike y col., *Hum Mol Genet.* 8(3):387-96. (1999)). El tratamiento con el inhibidor de la PDE4 HT-0712 en el momento del entrenamiento era capaz de restaurar la función de la memoria a largo plazo hasta niveles similares a la de los ratones de tipo salvaje. Numerosos estudios han demostrado que las ratas lesionadas por PLF tienen déficits en la memoria a largo plazo (cita). Se analizaron las dos hipótesis principales, (1) podría una única administración del inhibidor de la PDE4 HT-0712 en el momento del entrenamiento mejorar los déficits de memoria en ratas con lesión cerebral y (2) podría el inhibidor de la PDE4 HT-0712 utilizarse para facilitar la rehabilitación cognitiva en ratas con lesión cerebral. Para probar estas hipótesis, se necesitaba una tarea que: 1) requiriese la formación de memoria a largo plazo, 2) permitiese el entrenamiento repetido y analizar el rendimiento de la memoria y 3) garantizase que el rendimiento obtenido en un ensayo individual no se confundiese con el rendimiento de la memoria en un ensayo anterior. La tarea de reconocimiento de objetos cumplía estos tres requisitos. El reconocimiento de objetos es una tarea no aversiva que se basa en el comportamiento natural de exploración de una rata. Durante el entrenamiento para esta tarea, a las ratas se les presentan dos objetos idénticos. Dado una exposición adecuada (tiempo de entrenamiento), las ratas normales forman una MLP de un objeto explorado. Cuando a las ratas se presentan dos objetos diferentes (es decir, un objeto novedoso y un objeto previamente explorado) las ratas se eligen para pasar más tiempo explorando un objeto novedoso (cita). Esta tarea se puede realizar varias veces en los mismos animales exponiéndoles de forma seriada a diferentes conjuntos de objetos novedosos. Por lo tanto, el reconocimiento de objetos es una tarea ideal para probar estas hipótesis.

Antes de la lesión, las ratas fueron entrenadas/sometidas a pruebas en 5 ensayos para determinar la memoria de 24 horas después del entrenamiento en el reconocimiento de objetos. En todos los ensayos, las ratas conservaron una memoria del objeto previamente explorado y mostraron una preferencia por el objeto novedoso (Fig. 3E). No hubo diferencias significativas en el rendimiento de la memoria entre los grupos que más tarde recibirían fármaco o vehículo (Fig. 3E). Por lo tanto, todos los índices de discriminación antes de la lesión para cada grupo se

promediaron y se obtuvo un rendimiento en la línea de base de rendimiento antes de la lesión para cada grupo (FIG. 3A). De nuevo no hubo diferencias significativas entre los grupos ($p = 0,391$). Al término del ensayo 5, las ratas fueron lesionadas con el dispositivo de PLF y se dejaron recuperar durante 7 días. En el primer ensayo de la línea de base después de la lesión (FIG. 3B), ambos grupos mostraron déficits en la memoria a largo plazo para el reconocimiento de objetos. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p = 0,665$) en esta primera evaluación de la línea de base. Por lo tanto, la lesión cerebral experimental dio lugar a déficits de memoria en el reconocimiento de objetos.

A continuación, se determinó si el inhibidor de la PDE4 HT-0712 podía mejorar la memoria a largo plazo para el reconocimiento de objetos en ratas con lesión cerebral. Las ratas fueron asignadas al azar a un grupo de tratamiento y se les inyectó 20 minutos antes de la sesión de entrenamiento con vehículo o con HT-0712. Después de la prueba, el grupo que recibió HT-0712 mostró una preferencia por el objeto novedoso y tuvo un rendimiento significativamente mejor que el grupo del vehículo ($p = 0,001$) (FIG. 3B). Por lo tanto, una única administración del inhibidor de la PDE4 HT-0712 podía paliar el déficit de memoria a largo plazo observado en ratas con lesiones cerebrales.

A continuación se determinó si estas ratas tenían memoria disfuncional a corto plazo, además de los déficits de memoria a largo plazo. Para probar esto, los dos grupos (sin fármaco) fueron entrenados y probados para la retención de memoria a corto plazo (4 h). Ambos grupos mostraron una retención del objeto explorado previamente y tenían una preferencia por el objeto novedoso 4 h después del entrenamiento (FIG. 3C). No hubo diferencias significativas entre los grupos ($p = 0,311$). Por lo tanto, la lesión PLF interrumpió la memoria a largo plazo de las ratas para el reconocimiento de objetos, pero no afectó a la memoria a corto plazo hasta el punto de que las ratas mostraban un rendimiento normal a las 4 horas después del entrenamiento.

Con el fin de determinar si la administración única de HT-0712 cambiaba el rendimiento de la memoria a largo plazo de la rata, los animales fueron entrenados una segunda vez sin la inyección de fármaco o vehículo (FIG. 4A, día 0). En la prueba no hubo diferencia significativa entre los grupos del vehículo y HT-0712 ($p = 0,607$). Esto indicó que aunque una única inyección de HT-0712 podría mejorar la memoria a largo plazo para ese ensayo, una única administración del fármaco no mejoraría los déficits de memoria para el reconocimiento de objetos de los animales.

Se inició la rehabilitación cognitiva asistida farmacológicamente con HT-0712. Las ratas se sometieron a 5 ensayos de entrenamiento/ensayo de RO. A las ratas se les administró vehículo o HT 0712 20 min antes de cada sesión de entrenamiento. El día de la rehabilitación 1 ($p=0,001$), el día 2 ($p=0,001$), el día 3 ($p=0,007$) y el día 5 ($p=0,001$), el grupo HT-0712 tuvo un rendimiento significativamente mejor que el grupo de vehículo.

Para evaluar cualquier mejora en la función de memoria a largo plazo después de rehabilitación cognitiva asistida farmacológicamente, las ratas fueron entrenadas/sometidas a pruebas sin tratamiento farmacológico. El grupo que recibió rehabilitación cognitiva asistida con HT-0712 tuvo un rendimiento significativamente mejor que el grupo del vehículo ($p=0,003$) (FIG. 4B). Esto implica que el inhibidor de la PDE4 HT-0712 administrado durante la rehabilitación cognitiva repetida fue capaz de mejorar los déficits de memoria a largo plazo para el reconocimiento de objetos observados en las ratas con lesiones cerebrales.

Se determinó si la mejora observada de los déficits de memoria a largo plazo se debe a un efecto sub-agudo de la administración repetida de HT-0712 o a un verdadero efecto de la rehabilitación. Por lo tanto, se les permitió a las ratas descansar durante 1 semana y se evaluó la función de la memoria a largo plazo sin el fármaco. Una vez más el efecto de la rehabilitación cognitiva asistida con PDE4 persistió y el grupo de HT-0712 tuvo un rendimiento mejor que el grupo tratado con vehículo ($p=0,04$) (FIG. 4C).

Con el fin de determinar si este efecto era duradero, se permitió a las ratas descansar durante 7 semanas, después de lo cual fueron manipuladas y re-habituadas al campo de RO. Después de volver a la habituación (8 semanas después de la finalización de la rehabilitación), las ratas fueron sometidas a pruebas para determinar el rendimiento en el RO. Una vez más el grupo que recibió rehabilitación asistida con HT-0712 tuvo un rendimiento significativamente mejor que el grupo tratado con vehículo ($p=0,012$) (FIG. 5A). De esto se pueden sacar 2 conclusiones, lo primero, que la lesión cerebral por PLF tiene como resultado déficits duraderos en la memoria a largo plazo para una tarea de reconocimiento de objetos y, en segundo lugar, la rehabilitación cognitiva asistida con HT-0712 puede mejorar estos déficits de memoria a largo plazo para una tarea de reconocimiento de objetos.

Con el fin de determinar si esta rehabilitación era específica para el reconocimiento de objetos o si es generalizada para otras tareas dependientes del hipocampo, las ratas se ensayaron para el rendimiento de la memoria en la tarea de condicionamiento por miedo con paradigma de traza. En esta versión de la tarea dependiente del hipocampo, las ratas fueron entrenadas para asociar un tono (EC) con una descarga eléctrica (EI). Un intervalo de "traza" de 30 segundos separa el EC y el EI, haciendo de esta una tarea dependiente del hipocampo (McEcheron y col., Hippocampus, 8(6):638-46, (1998). Cuando las ratas se ensayaron una semana después del entrenamiento, el grupo que recibió rehabilitación cognitiva asistida con HT-0712 tuvo un rendimiento significativamente mejor que el grupo del vehículo ($p=0,012$) (FIG. 5B). Esto implica que la rehabilitación cognitiva asistida con HT-0712 era generalizado para una segunda tarea dependiente del hipocampo.

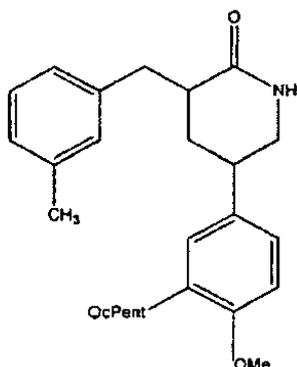
5 Debido a que la rehabilitación cognitiva se podía generalizar de una tarea dependiente del hipocampo a otra, se determinó si la rehabilitación asistida con inhibidor de la PDE4 era específica del método de rehabilitación o si las mejoras se podían generalizar a múltiples modalidades. En concreto ¿los animales que también recibían rehabilitación motora asistida con inhibidor de la PDE4 también obtenían un rendimiento mejor en la memoria en una tarea no motora? Para ello, 1 semana después de la rehabilitación motora asistida con inhibidor de la PDE4, las ratas sometidas a rehabilitación motora fueron entrenadas en la tarea de condicionamiento por miedo con paradigma de traza y se ensayaron 1 semana después. No hubo diferencias significativas entre ninguno de los grupos de rehabilitación motora ($p=0,185$) (FIG. 5C)

10 Una comparación estadística directa entre los animales sometidos a rehabilitación motora y los animales sometidos a rehabilitación cognitiva para la memoria por condicionamiento por miedo con paradigma de traza es cuestionable. En los grupos de rehabilitación motora se observó una inmovilidad antes del EC (datos no mostrados) mucho mayor. Es posible que, como resultado del paradigma de entrenamiento por reforzamiento negativo utilizado para motivar a los animales en la tarea del paso escalonado, los animales mostraran un mayor temor generalizado a cualquier entorno que no fuese una caja. Este mayor temor generalizado demostrado en forma de inmovilidad podría haber enmascarado cualquier efecto del tratamiento.

15 Aunque esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencias a realizaciones preferidas de la misma, se entenderá por los expertos en la técnica que pueden hacerse varios cambios en la forma y los detalles sin apartarse del alcance de la invención abarcada por las reivindicaciones adjuntas.

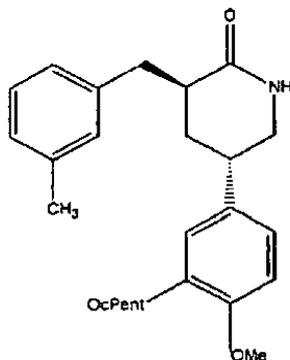
REIVINDICACIONES

1. El uso de un inhibidor de la fosfodiesterasa 4 (PDE4) para la fabricación de un medicamento para tratar un déficit motor asociado con una lesión cerebral traumática en un animal, mediante la administración de dicho inhibidor al animal sin entrenamiento cognitivo formal y produciendo una mejora en la realización por el animal de una tarea motora particular, cuyo déficit se asocia con la lesión cerebral traumática.
- 5 2. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el inhibidor de la fosfodiesterasa 4 (PDE4) se selecciona de rolipram o compuestos de Fórmula I:



en la que "Me" significa "metilo" y "cPent" significa "ciclopentilo" y enantiómeros y mezclas de los mismos.

- 10 3. El uso de la reivindicación 2 en el que el inhibidor de la fosfodiesterasa 4 (PDE4) comprende la estructura:



en la que "Me" significa "metilo" y "cPent" significa "ciclopentilo".

4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho animal es un ser humano.



FIG. 1

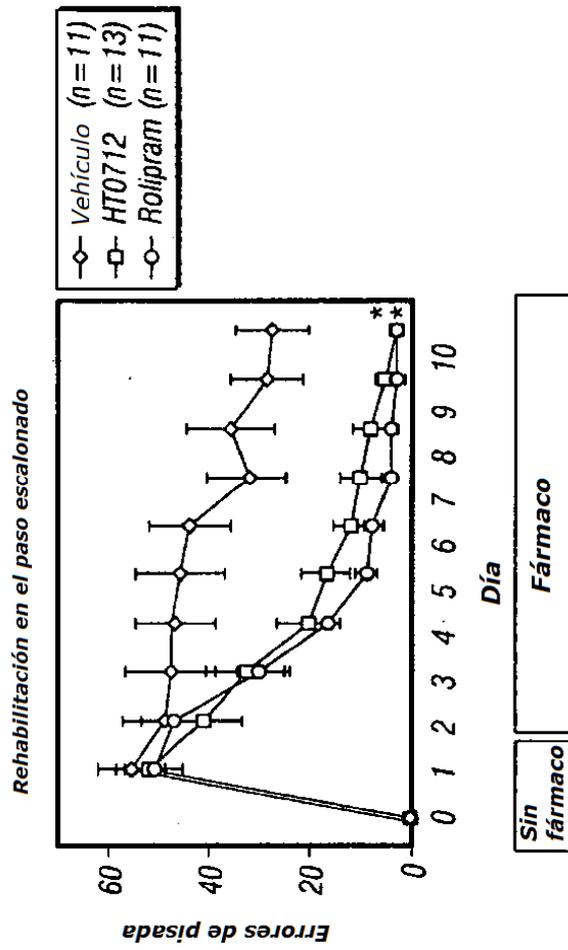
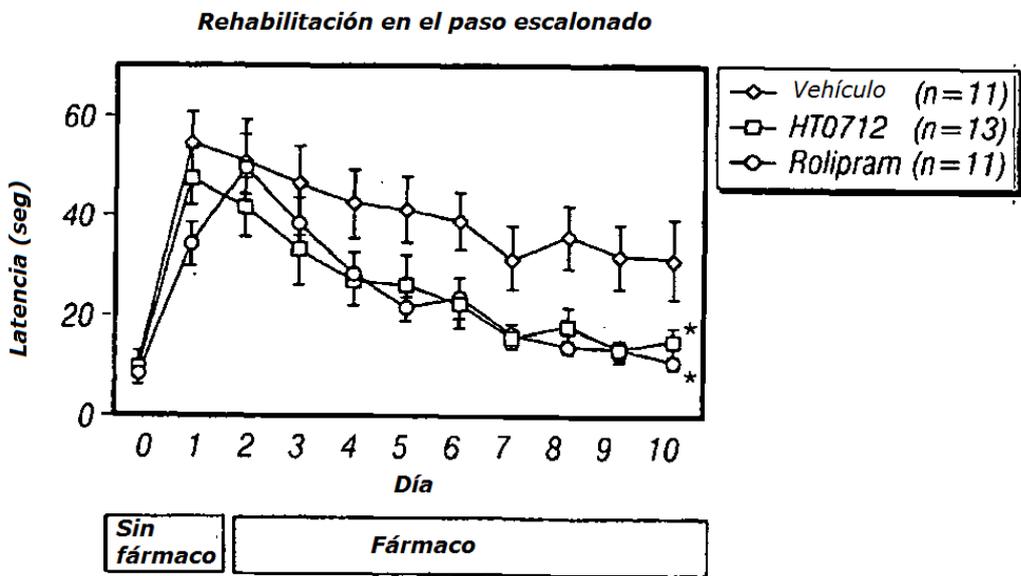
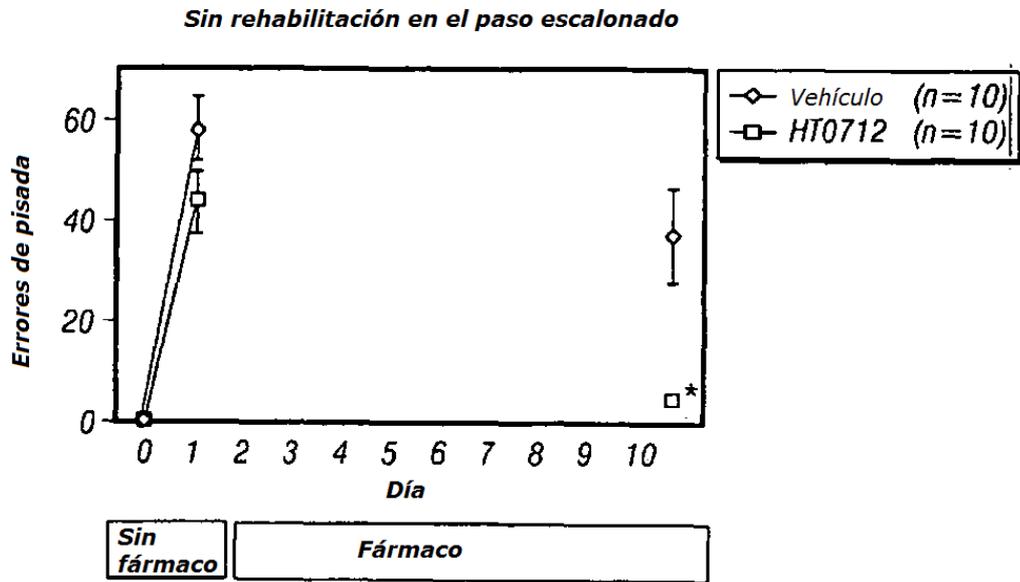


FIG. 2A



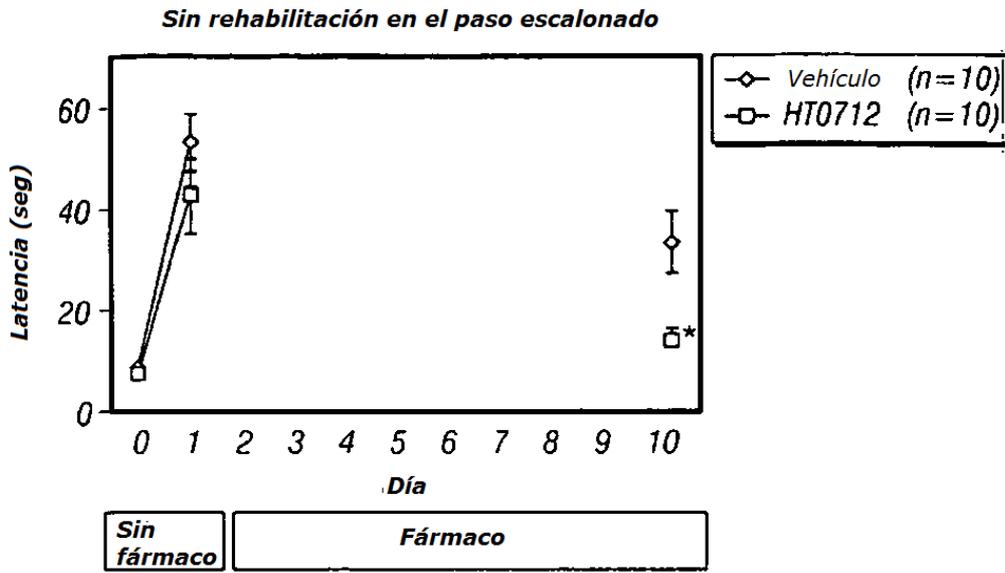


FIG. 2D

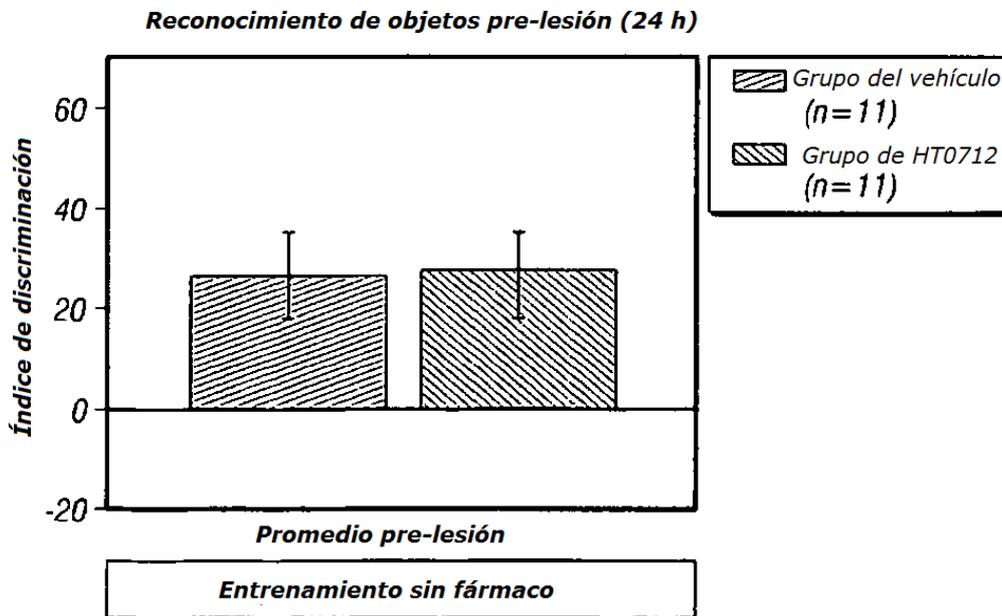


FIG. 3A

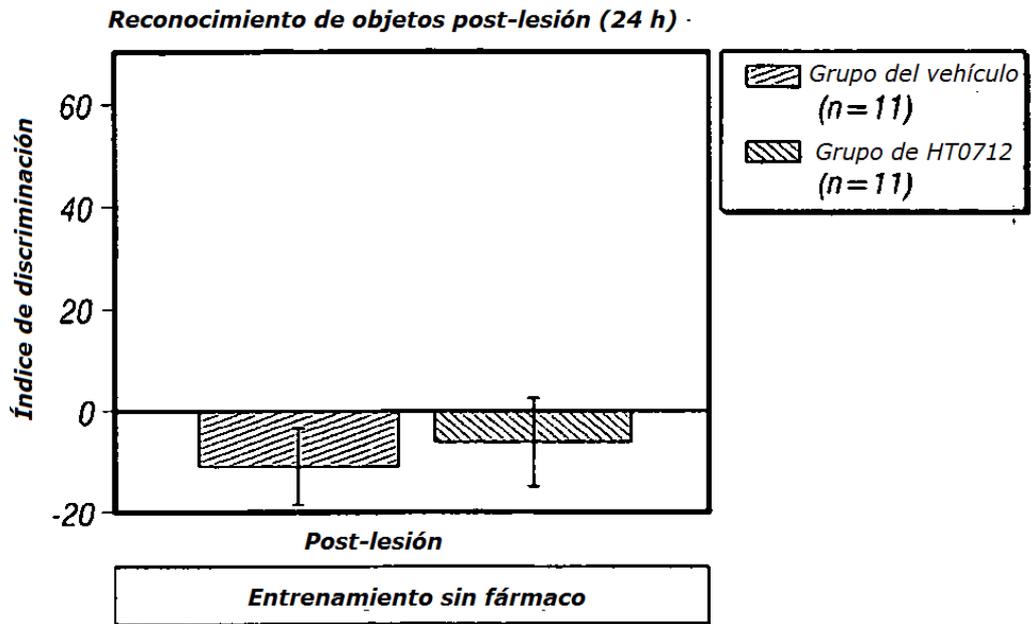


FIG. 3B

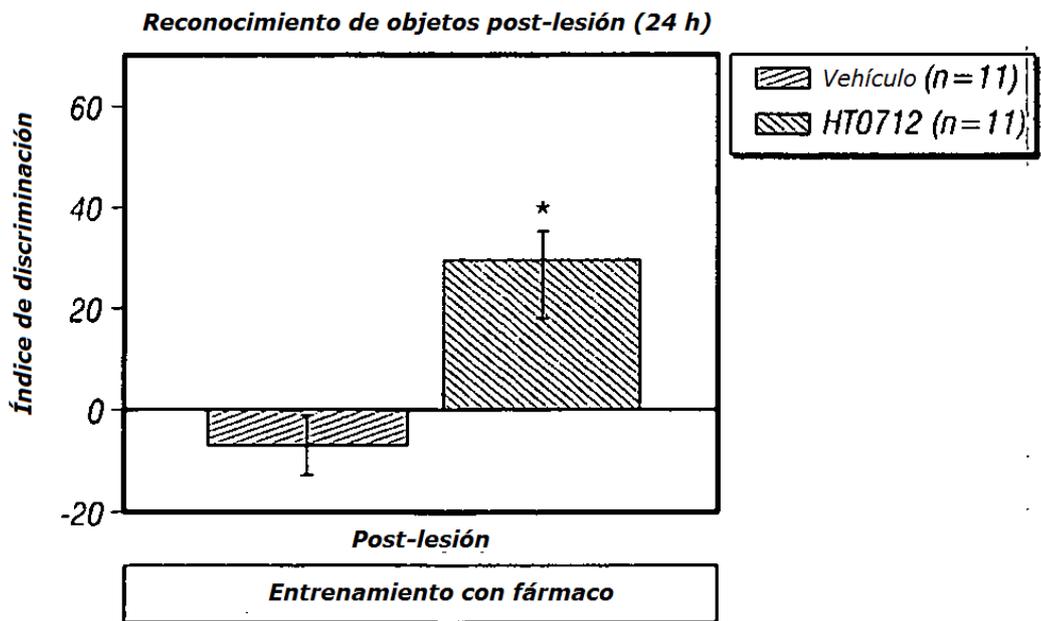


FIG. 3C

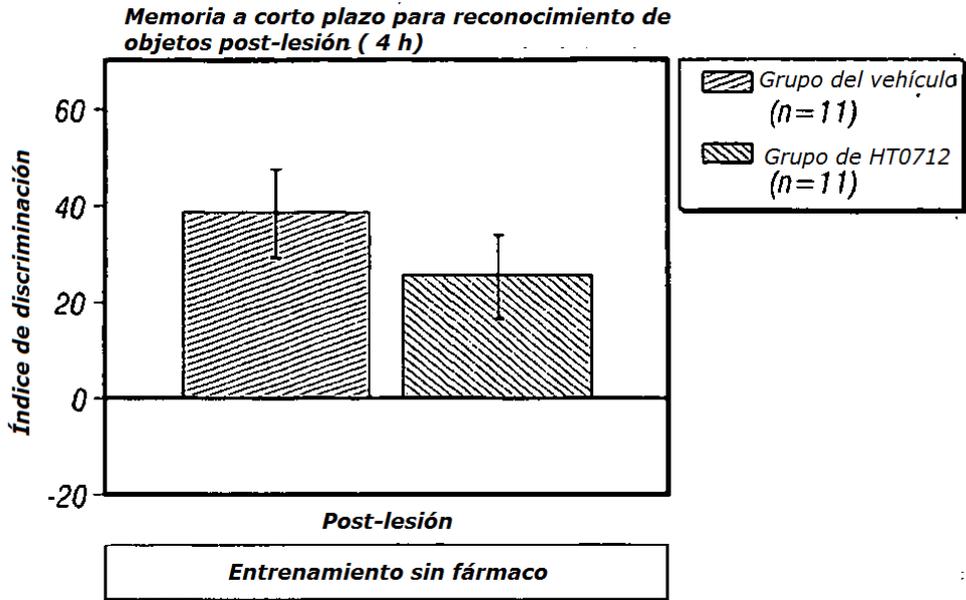


FIG. 3D

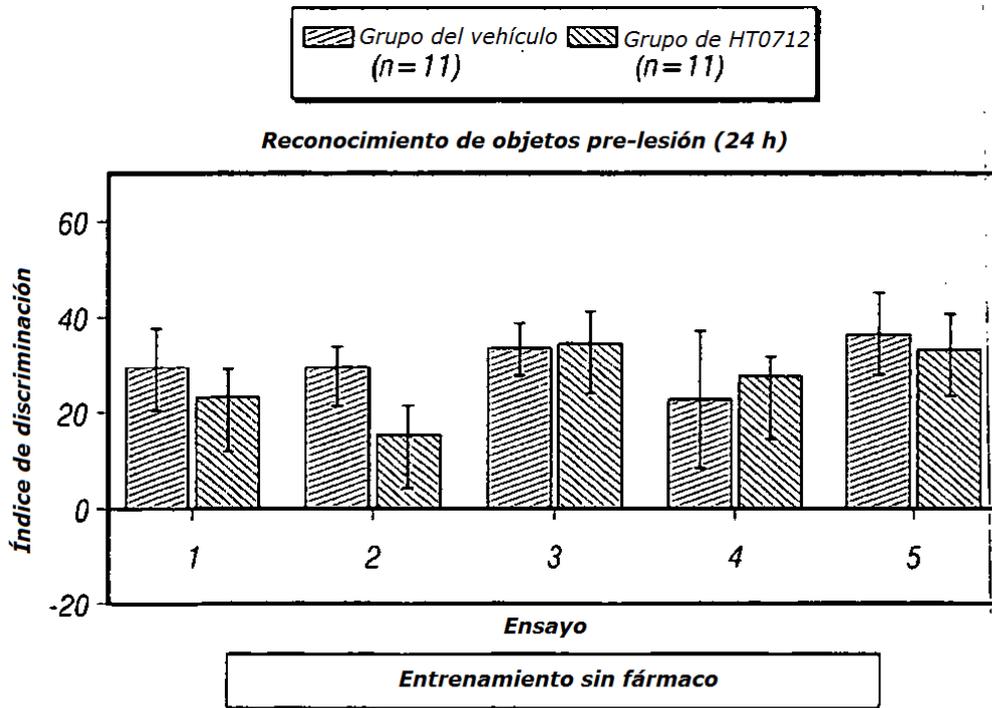


FIG. 3E

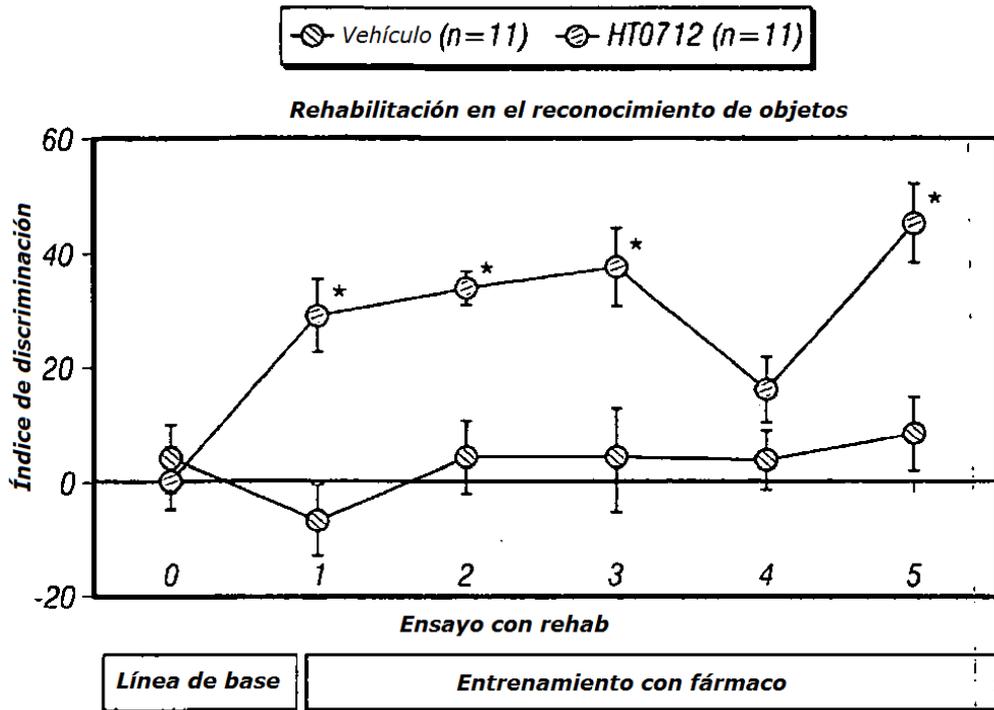


FIG. 4A

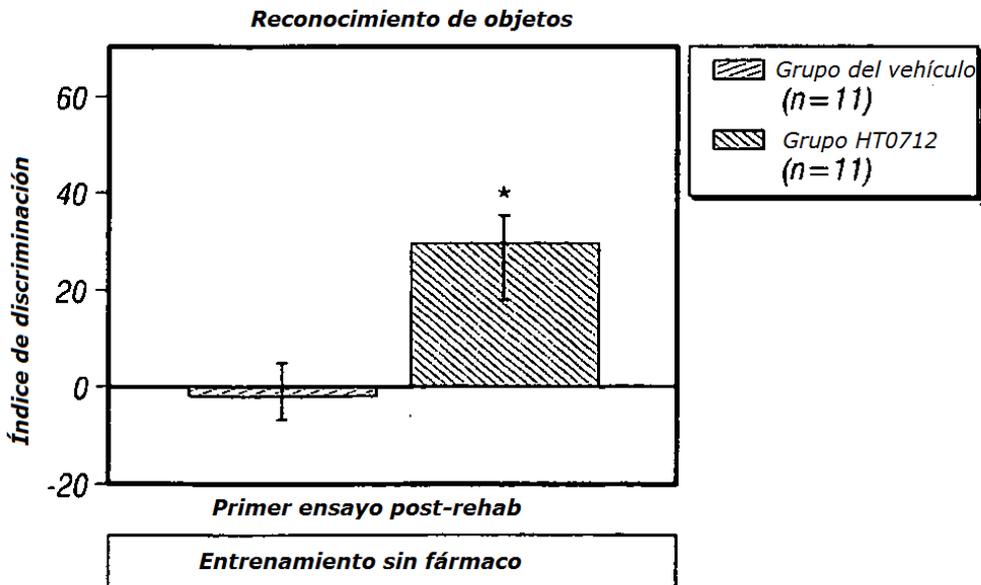


FIG. 4B

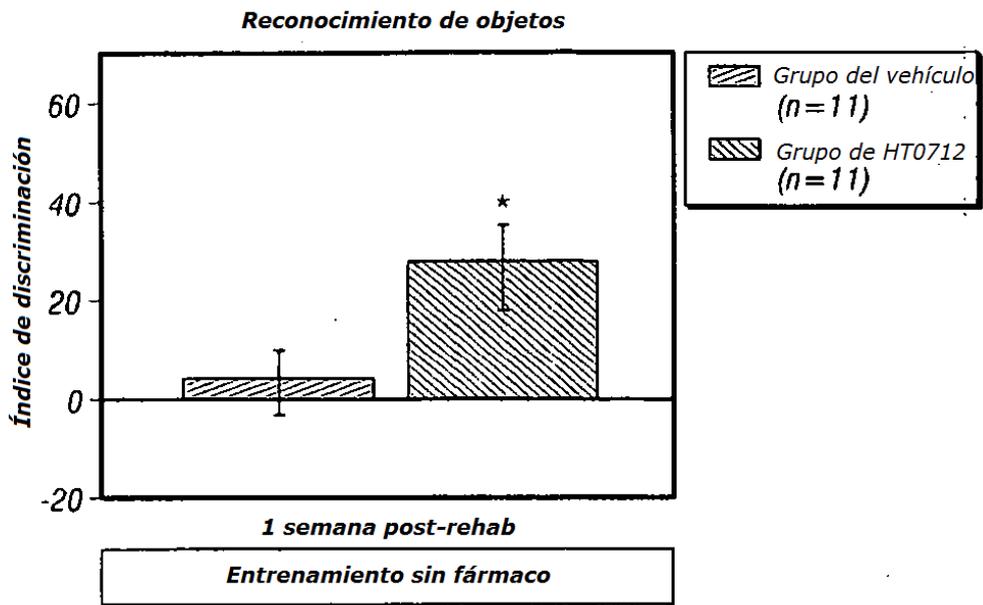


FIG. 4C

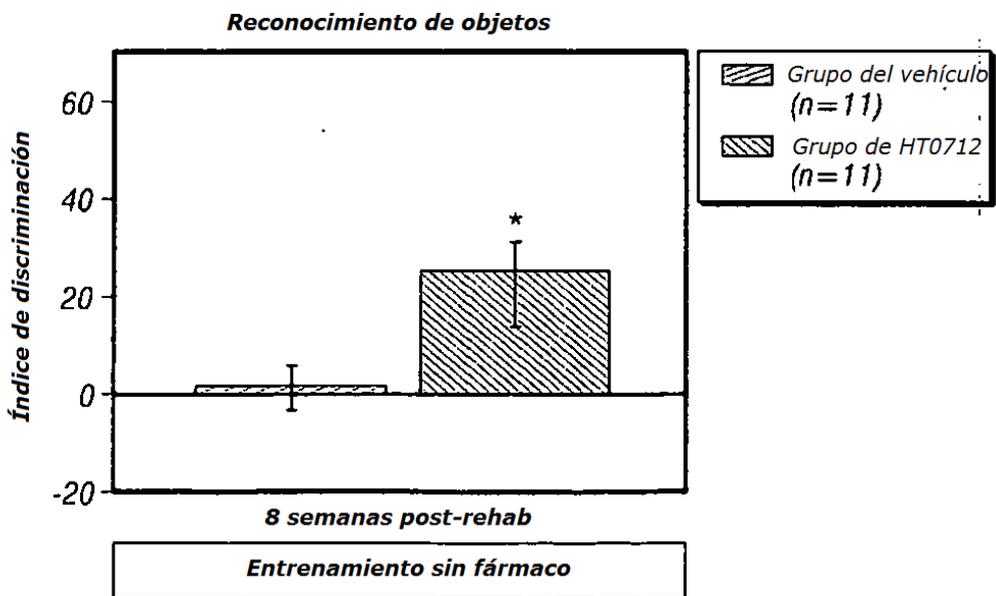


FIG. 5A

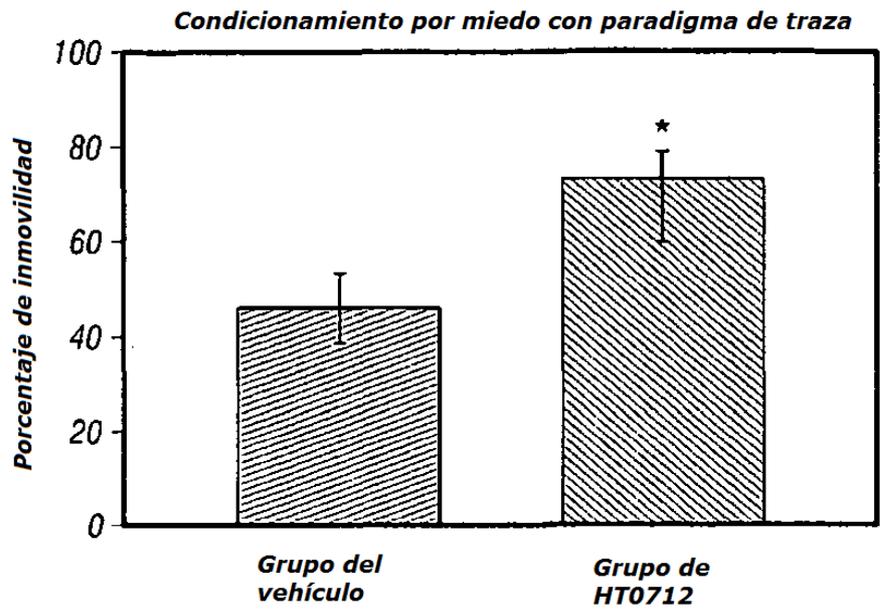


FIG. 5B

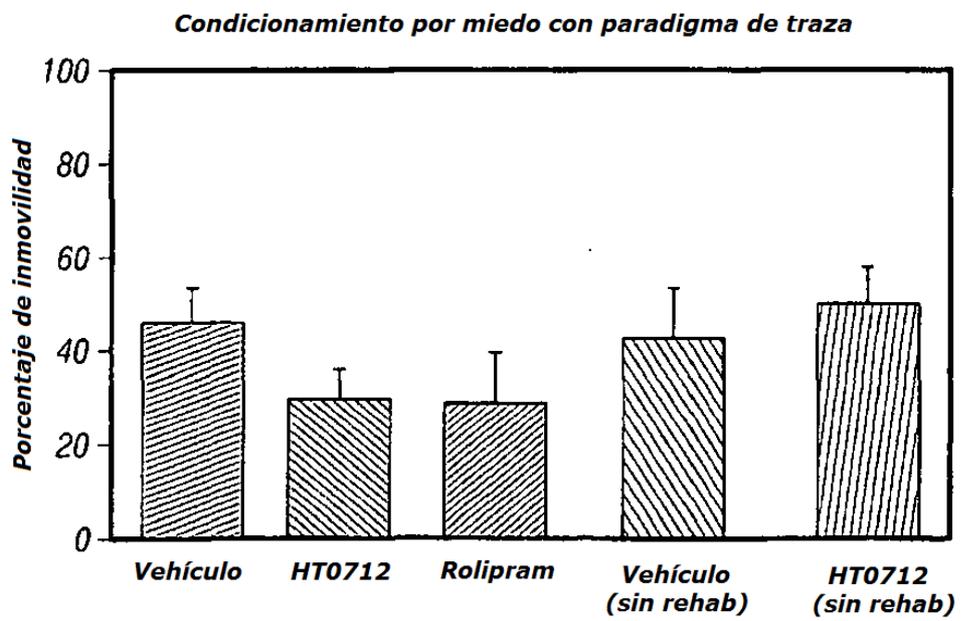


FIG. 5C