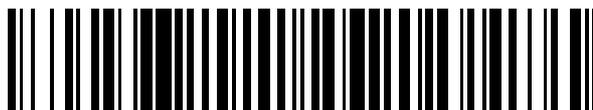


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 132**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

C12Q 1/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2002 E 02759514 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 1575916**

54 Título: **Actividad de fosfodiesterasa y regulación de la señalización mediada por fosfodiesterasa 1-B en el cerebro**

30 Prioridad:

31.08.2001 US 316320 P

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

13.11.2013

73 Titular/es:

**THE ROCKEFELLER UNIVERSITY (50.0%)
Office of Technology Transfer, 1230 York Avenue
New York, NY 10021-6399, US y
CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**GREENGARD, PAUL;
REPASKE, DAVID y
SNYDER, GRETCHEN**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 429 132 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).

ACTIVIDAD DE FOSFODIESTERASA Y REGULACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR FOSFODIESTERASA 1-B EN EL CEREBRO

Descripción

1. CAMPO TÉCNICO

5 **[0001]** La presente invención hace referencia a métodos para identificar compuestos que modulan la fosforilación de TR34 de DARPP 32.

2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 **[0002]** Los nucleótidos cíclicos y el calcio son los principales segundos mensajeros de las vías de transducción de señal en el área del cerebro conocida como ganglios basales o núcleo estriado. La activación del receptor de glutamato del tipo NMDA y/o la activación del receptor de dopamina D2 tiene como resultado concentraciones de calcio intracelular aumentadas (Greengard, P. *et al.* 1999. *Neuron* 23:435-447; Kotter, R. 1994. *Prog. Neurobiol.* 44:163-196) lo que lleva a la activación de efectores como quinasa II dependiente de calmodulina (CaMKII) y calcineurina y, de forma potencial, a la activación de fosfodiesterasas dependientes de camodulina (CaM-PDE) y calcio. La activación
15 del receptor de dopamina D1 o D2 lleva a la activación de adenilil ciclasa (y cAMP aumentado) o inhibición (y cAMP disminuido), respectivamente. La concentración intracelular de cGMP también se aumenta tras la activación del receptor de dopamina D1 y queda igual o inhibido tras la activación del receptor D2. Los nucleótidos cíclicos activan la proteína quinasa A (PKA; proteína quinasa dependiente del cAMP) y/o proteína quinasa G (PKG; proteína quinasa dependiente del cGMP) que
20 fosforilan elementos posteriores a la vía de transducción de señal como DARPP-32 (fosfoproteína regulada por cAMP y dopamina) y la proteína que une el elemento de respuesta de cAMP (CREB). Estas vías de señalización se infrarregulan con fosfodiesterasas (PDE) mediante hidrólisis de los nucleótidos cíclicos a sus 5'-monofosfatos. Por lo tanto, las PDE reguladas por calcio que hidrolizan cAMP y/o cGMP son interfaces potenciales entre vías de señalización intracelular reguladas por
25 dopamina y otras vías en los ganglios basales (núcleo estriado), que incluyen, sin carácter limitativo, vías de señalización intracelular de óxido nítrico, norepinefrina, neurotensina, CCK, VIP, serotonina, glutamato (p. ej., receptor NMDA, receptor AMPA), GABA, acetilcolina, adenosina (p. ej., receptor A2A), receptor cannabinoide, péptido natriurético (p. ej., ANP, BNP, CNP) o endorfina.

30 **[0003]** La potenciación a largo plazo y la depresión a largo plazo, las principales formas de plasticidad asociadas a la memoria y aprendizaje mediado por el hipocampo, también se regulan mediante cascadas de transducción de señal de calcio/calmodulina y nucleótidos cíclicos, incluyendo la actividad de PKA (Abel, T. *et al.* 1997. *Cell* 88:615-626; Skoulakis, E.M.C. *et al.* 1993. *Neuron* 11:197-208), CaMKII (Bach, M.E. *et al.* 1995. *Cell* 81:905-915; Mayford, M. *et al.* 1995. *Cell* 81:891-904), CREB (Bourtchuladze, R. *et al.* 1994. *Cell* 79:59-68; Guzowski, J.F. *et al.* 1997. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:2693-2698; Yin, J.C.P. *et al.* 1994. *Cell* 79:49-58), y calcineurina (Mansuy, I.M. *et al.* 1998. *Cell* 92:39-49). Los mutantes de drosophila han mostrado niveles intracelulares de cAMP cambiados o una vía de señalización de cAMP cambiada con el concomitante déficit de aprendizaje en un paradigma de condicionamiento olfativo. (Qui, Y. y R.L. Davis. 1993. *Genes Dev.* 7:1447-1458; Livingstone, M.S. *et al.* 1984. *Cell* 37:205-215; Skoulakis, E.M.C. *et al.* 1993. *Neuron* 11:197-208; Davis, R.L. *et al.* 1995. *Mol. Cell. Biochem.* 149/150:271-278). La actividad de cGMP también se ha
40

visto implicada en el aprendizaje y la memoria a través de la vía de óxido nítrico de la transducción de señal retrógrada (Gally, J.A. *et al.* 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3547-3551; Garthwaite, J. 1991. *Trends Neurosci.* 14:60-67).

[0004] Se han identificado diez familias de PDE pero solo se ha mostrado que la Familia I, las fosfodiesterasas dependientes de calmodulina (CaM-PDE), actúe como un punto potencial de interacción entre las vías de señalización de nucleótidos cíclicos y calcio. Los tres conocidos genes CaM-PDE, PDE1A, PDE1B y PDE1C, se expresan en el tejido del sistema nervioso central. PDE1A se expresa a través del cerebro con niveles mayores de expresión en las capas CA1 a CA3 del hipocampo y el cerebelo y a un nivel bajo en el núcleo estriado (Borisy, F.F. *et al.* 1992. *J. Neurosci.* 12:915-923; Yan, C. *et al.* 1994. *J. Neurosci.* 14:973-984). PDE1 B se expresa principalmente en el núcleo estriado, giro dentado, tracto olfativo y cerebelo y su expresión se ha relacionado con las regiones del cerebro que tienen altos niveles de innervación dopaminérgica (Furuyama, T. *et al.* 1994. *Mol. Brain Res.* 26:331-336; Polli, J.W. y R.L. Kincaid. 1994. *J. Neurosci.* 14:1251-1261; Yan, C. *et al.* 1994. *J. Neurosci.* 14:973-984). PDE1C se expresa principalmente en el epitelio olfativo, células granulosas cerebelosas y el núcleo estriado (Yan, C. *et al.* 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9677-9681; Yan, C. *et al.* 1996. *J. Biol. Chem.* 271:25699-25706). Mientras que los patrones de expresión se han estudiado de forma extensa, no se ha establecido un papel fisiológico para las CaM-PDE en el cerebro.

[0005] Kakkar *et al* (1999. *CMLS*, 55, 1164-1186) revelan que deprenilo, un inhibidor de PDE1B, mejora los síntomas de la enfermedad de Parkinson entre otros, potenciando la acción de L-dopa.

[0006] Polli *et al* (1994. *J Neurosci*, 14(3), 1251-1261) revelan una coincidencia de los resultados de los experimentos de hibridación de PDE1B1 *in situ* con la expresión del ARNm del receptor de dopamina D1.

[0007] WO9920273 revela un método de detección para agentes que modulan la fosforilación de Thr34 de DARPP-32. El método analiza el efecto del agente directamente sobre fosfo-Thr34 de DARPP añadido al análisis.

[0008] Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de proporcionar nuevos métodos de detección que pueden usarse para desarrollar composiciones o medicamentos innovadores que puedan usarse para tratar enfermedades o trastornos relacionados con la regulación de fosfodiesterasas en el sistema nervioso. Además, existe la necesidad de desarrollar tratamientos para dichas enfermedades o trastornos que se deben, al menos en parte, a una anomalía o desarreglo de una vía de señalización intracelular regulada por fosfodiesterasas. La presente invención proporciona dichos métodos y composiciones.

[0009] La mención o identificación de cualquier referencia en la sección 2, o en cualquier otra sección de esta solicitud, no debería considerarse una afirmación de que dicha referencia está disponible como técnica precedente a la presente invención.

3. RESUMEN DE LA INVENCION

[0010] La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento, por parte de los inventores, de que la actividad de fosfodiesterasa (PDE), en concreto, la actividad de fosfodiesterasa 1B (PDE1B), funciona en el tejido cerebral como un regulador de la actividad locomotora y el

aprendizaje y la memoria. Como antecedentes, PDE1B puede usarse como diana terapéutica para la regulación de las vías de señalización intracelulares, preferiblemente en el sistema nervioso, incluyendo, sin carácter limitativo, una vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1, receptor de dopamina D2, óxido nítrico, norepinefrina, neurotensina, CCK, VIP, serotonina, glutamato (p. ej., receptor NMDA, receptor AMPA), GABA, acetilcolina, adenosina (p. ej., receptor A2A), receptor cannabinoide, péptido natriurético (p. ej., ANP, BNP, CNP) o endorfina. En modos preferidos, PDE1B puede usarse como diana terapéutica para el tratamiento de, p. ej., un trastorno relacionado con PDE1B o un trastorno de la vía intracelular del receptor de dopamina D1. En un modo específico, PDE1B puede usarse como diana terapéutica para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

10 **[0011]** Como antecedentes, la invención muestra un método para modular la actividad de PDE1B en una célula o tejido que consiste en poner en contacto dicha célula o tejido con una cantidad de un compuesto suficiente para modular la actividad de una vía de señalización intracelular de dopamina D1, donde el contacto de dicha célula o tejido con el compuesto tiene como resultado la modulación de la actividad de PDE1B. En determinados modos, el compuesto se une a PDE1B. En otros modos, 15 el compuesto cambia la expresión de PDE1B. En otros modos, se modula la fosforilación de fosfo-Thr34 de DARPP-32 (de aquí en adelante “fosfo-Thr34”) o fosfo-Ser845 del receptor AMPA GluR1 (de aquí en adelante “fosfo-Ser845”).

[0012] Como antecedentes, la invención también muestra un método para tratar un trastorno, incluyendo sin carácter limitativo, un trastorno relacionado con PDE1B y un trastorno de la vía de 20 señalización intracelular del receptor de dopamina D1, en un paciente que lo necesite, que consiste en administrar al paciente un agente que cambia la actividad de PDE1B, donde la actividad de PDE1B modula la fosforilación de DARPP-32 y/o el receptor AMPA GluR1.

[0013] Como antecedentes, la presente invención muestra métodos para tratar un trastorno, incluyendo sin carácter limitativo, un trastorno relacionado con PDE1B y la vía de señalización 25 intracelular del receptor de dopamina D1, en una persona (p. ej., un paciente) o un sujeto animal administrando una cantidad eficaz de un compuesto de la invención con el fin de modular la actividad de PDE1B. En un modo, el agente promueve o aumenta la actividad de PDE1B. En otro modo el agente inhibe o disminuye la actividad de PDE1B. En determinado modos, el agente promueve (o aumenta) o inhibe (o disminuye) la actividad de una vía de señalización intracelular del receptor de 30 dopamina D1 a través de la modulación de la actividad de PDE1B.

[0014] En determinados modos, la invención muestra un método para tratar un trastorno, incluyendo sin carácter limitativo, un trastorno relacionado con PDE1B y la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1, en un paciente que lo necesite, que consiste en administrar al paciente un agente que modula la actividad de PDE1B, donde se modula la fosforilación de DARPP-32 en Thr34, 35 y/o la fosforilación del receptor AMPA GluR1 en Ser845. En modos concretos, el agente modula la actividad de PDE1B uniéndose a PDE1B.

[0015] En un modo, a un sujeto que necesite dicho tratamiento se le administra una cantidad de un compuesto de la presente invención suficiente para modular la actividad de PDE1B y modular la actividad de DARPP-32, la actividad del receptor AMPA GluR1 y/o la actividad de una vía de 40 señalización intracelular incluyendo, sin carácter limitativo, una vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1, el receptor de dopamina D2, óxido nítrico, norepinefrina, neurotensina,

CCK, VIP, serotonina, glutamato (p. ej., receptor NMDA, receptor AMPA), GABA, acetilcolina, adenosina (p. ej., receptor A2A), receptor cannabinoide, péptido natriurético (p. ej., ANP, BNP, CNP) o endorfina.

[0016] La invención proporciona un método para identificar un compuesto que modula la actividad de PDE1B en una vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 en una célula o tejido que comprende:- Un método *in vitro* para identificar un compuesto que modula la fosforilación de Thr34 de DARPP-32 en una célula o tejido, que consiste en:

- (a) poner en contacto dicha célula o tejido con un compuesto de ensayo; y
- (b) determinar un nivel de actividad de PDE1B en dicha célula o tejido;

donde una diferencia en dicho nivel y un nivel de control de la actividad de PDE1B en una célula o tejido comparable que no ha entrado en contacto con el compuesto de ensayo es indicativo de la capacidad de dicho compuesto para modular la fosforilación de Thr34 de DARPP-32.

- (a) determinar un primer nivel de actividad de PDE1B en dicha célula o tejido;
- (b) poner en contacto dicha célula o tejido con un compuesto de ensayo; y

donde una diferencia en dicho primer nivel y dicho segundo nivel de la actividad de PDE1B es indicativo de la capacidad de dicho compuesto para modular la actividad de PDE1B. En determinados modos, se modula la fosforilación de fosfo-Thr34 de DARPP-32 (de aquí en adelante "fosfo-Thr34") y o fosfo-Ser845 del receptor AMPA GluR1 (de aquí en adelante "fosfo-Ser845"). En otros modos, la diferencia en la actividad de PDE1B es indicativo de la capacidad de dicho compuesto de ensayo para modular la activación que depende de la fosforilación de DARPP-32 o el receptor AMPA GluR1.

[0017] Como antecedentes, la invención también muestra un método para identificar un compuesto que modula la actividad de una vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 en una célula o tejido que consiste en:

- (a) determinar un primer nivel de actividad de PDE1B en dicha célula o tejido;
- (b) poner en contacto dicha célula o tejido con un compuesto de ensayo; y
- (c) determinar un segundo nivel de actividad de PDE1B en dicha célula o tejido,

donde una diferencia en dicho primer nivel y dicho segundo nivel de la actividad de PDE1B es indicativo de la capacidad de dicho compuesto para modular la actividad de dicha vía.

[0018] Como antecedentes, la invención también muestra un método para identificar un compuesto que modula la actividad de una vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D2, óxido nítrico, norepinefrina, neurotensina, CCK, VIP, serotonina, glutamato, GABA, acetilcolina, adenosina, receptor cannabinoide, péptido natriurético o endorfina en una célula o tejido que consiste en:

- (a) determinar un primer nivel de actividad de PDE1B en dicha célula o tejido;
- (b) poner en contacto dicha célula o tejido con un compuesto de ensayo; y
- (c) determinar un segundo nivel de actividad de PDE1B en dicha célula o tejido,

donde una diferencia en dicho primer nivel y dicho segundo nivel de la actividad de PDE1B es indicativo de la capacidad de dicho compuesto de ensayo para modular la actividad de dicha vía.

[0019] Como antecedentes, la invención también muestra un método para identificar un compuesto que modula la actividad de una vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 en una célula o tejido que consiste en:

(a) poner en contacto dicha célula o tejido con un compuesto de ensayo; y

(c) determinar un nivel de actividad de PDE1B en dicha célula o tejido;

donde una diferencia en dicho nivel y un nivel de control de la actividad de PDE1B en una célula o tejido comparable que no se ha puesto en contacto con el compuesto de ensayo es indicativo de la capacidad de dicho compuesto de ensayo para modular la actividad de dicha vía.

5 **[0020]** Como antecedentes, la invención también muestra un método para identificar un compuesto que modula la actividad de PDE1B en una vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 en una célula o tejido que consiste en:

(a) poner en contacto dicha célula o tejido con un compuesto de ensayo; y

10 (c) determinar un nivel de actividad de PDE1B en dicha célula o tejido;

donde una diferencia en dicho nivel y un nivel de control de la actividad de PDE1B en una célula o tejido comparable que no se ha puesto en contacto con el compuesto de ensayo es indicativo de la capacidad de dicho compuesto de ensayo para modular la actividad de PDE1B.

15 **[0021]** La invención también proporciona un método para identificar un agente que ha de analizarse por su capacidad de tratar un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 o relacionado con PDE1B en un paciente que necesite dicho tratamiento, que consiste en:

(a) poner en contacto dicha célula o tejido de PDE1B y Thr34 de DARPP-32 desfosforilado con un agente potencial; y

(b) detectar la cantidad de fosforilación de Thr34 de DARPP-32 desfosforilado,

20 donde el agente se identifica si se detecta un aumento en la fosforilación de Thr34 de DARPP-32 desfosforilado en presencia de un agente potencial. En determinados modos, se analiza la capacidad de tratar el trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 o relacionado con PDE1B.

25 **[0022]** Como antecedentes, la invención también muestra un método para identificar un agente que ha de analizarse por su capacidad de tratar un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 o relacionado con PDE1B en un paciente que necesite dicho tratamiento, que consiste en:

(a) poner en contacto dicha célula o tejido de PDE1B y Ser845 del receptor AMPA GluR1 desfosforilado con un agente potencial; y

30 (b) detectar la cantidad de fosforilación de Ser845 del receptor AMPA GluR1 desfosforilado,

donde el agente se identifica si se detecta un aumento en la fosforilación de Ser845 del receptor AMPA GluR1 desfosforilado en presencia del agente potencial. En determinados modos, se analiza la capacidad de tratar el trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 o relacionado con PDE1B.

35 **[0023]** Como antecedentes, la invención también muestra un método para identificar un agente que ha de analizarse por su capacidad de modular la actividad de una vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 en una célula o tejido, que consiste en:

(a) determinar un primer nivel de actividad de PDE1B en dicha célula o tejido;

(b) poner en contacto dicha célula o tejido con un agente potencial; y

40 (c) determinar un segundo nivel de actividad de PDE1B en dicha célula o tejido,

donde una diferencia en dicho primer nivel y dicho segundo nivel de la actividad de PDE1B es

indicativo de la capacidad de dicho agente potencial para modular la actividad de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1. En determinados modos, el método comprende el paso adicional de:

(d) determinar si la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 se modula.

5 **[0024]** Como antecedentes, la invención también muestra un método para identificar un agente que ha de analizarse por su capacidad de modular la actividad de una vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D2, óxido nítrico, norepinefrina, neurotensina, CCK, VIP, serotonina, glutamato, GABA, acetilcolina, adenosina, receptor cannabinoide, péptido natriurético o endorfina en una célula o tejido que consiste en:

10 (a) determinar un primer nivel de actividad de PDE1B en dicha célula o tejido;

(b) poner en contacto dicha célula o tejido con un agente potencial; y

(c) determinar un segundo nivel de actividad de PDE1B en dicha célula o tejido,

donde una diferencia en dicho primer nivel y dicho segundo nivel de la actividad de PDE1B es

15 indicativo de la capacidad de dicho agente potencial para modular la actividad de dicha vía de señalización intracelular. En determinados modos, el método comprende el paso adicional de:

(d) determinar si la vía de señalización intracelular se modula.

[0025] Como antecedentes, la invención también muestra un método para identificar un agente que ha de analizarse por su capacidad de modular la actividad de una vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 en una célula o tejido, que consiste en:

20 (a) poner en contacto dicha célula o tejido con un agente potencial; y

(b) determinar un nivel de actividad de PDE1B en dicha célula o tejido;

donde una diferencia en dicho nivel y un nivel de control de la actividad de PDE1B en una célula o tejido comparable que no se ha puesto en contacto con el compuesto de ensayo es indicativo

25 de la capacidad de dicho compuesto de ensayo para modular la actividad de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1. En determinados modos, el método comprende el paso adicional de:

(c) determinar si la actividad de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 se modula.

30 **[0026]** Como antecedentes, la invención también muestra un método para identificar un agente que ha de analizarse por su capacidad de modular la actividad de una vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D2, óxido nítrico, norepinefrina, neurotensina, CCK, VIP, serotonina, glutamato, GABA, acetilcolina, adenosina, receptor cannabinoide, péptido natriurético o endorfina en una célula o tejido, que consiste en:

(a) poner en contacto dicha célula o tejido con un agente potencial; y

35 (b) determinar un nivel de actividad de PDE1B en dicha célula o tejido;

donde una diferencia en dicho nivel y un nivel de control de la actividad de PDE1B en una célula o tejido comparable que no se ha puesto en contacto con el compuesto de ensayo es indicativo de la capacidad de dicho compuesto de ensayo para modular la actividad de dicha vía de señalización intracelular. En determinados modos, el método comprende el paso adicional de:

40 (c) determinar si la actividad de dicha vía de señalización intracelular se modula.

[0027] Como antecedentes, la invención también muestra un método para seleccionar un agente

terapéutico potencial para usarlo en el tratamiento de un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 o relacionado con PDE1B que consiste en:

- (a) administrar un agente terapéutico potencial a un animal;
- (b) medir la respuesta de dicho animal a dicho agente terapéutico potencial;
- 5 (c) comparar la respuesta de dicho animal con la de un animal de control al que no se le ha administrado el agente terapéutico potencial; y
- (d) elegir un agente terapéutico potencial basándose en la diferencia en las respuestas observadas entre dicho animal y dicho animal de control.

10 **[0028]** En determinados modos, el animal es un ratón. En otros modos, el trastorno es la enfermedad de Parkinson.

[0029] Como antecedentes, la invención también muestra un método para seleccionar un agente terapéutico potencial para usarlo en el tratamiento de un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 o relacionado con PDE1B que consiste en:

- (a) administrar un agente terapéutico potencial a un animal;
- 15 (b) medir la respuesta de dicho animal a la administración de un neurotransmisor que interactúa con una vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1;
- (c) comparar la respuesta de dicho animal con la de un animal de control al que no se le ha administrado el agente terapéutico potencial; y
- (d) elegir un agente terapéutico potencial basándose en la diferencia en las respuestas
- 20 observadas entre dicho animal y dicho animal de control.

[0030] En determinados modos, el animal es un ratón. En otros modos, el trastorno es la enfermedad de Parkinson.

25 **[0031]** Como antecedentes, la invención también muestra un método para seleccionar un agente terapéutico potencial para usarlo en el tratamiento de un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 o relacionado con PDE1B que consiste en:

- (a) administrar un agente terapéutico potencial a un animal;
- (b) medir la respuesta de dicho animal a la administración de dopamina;
- (c) comparar la respuesta a la administración de dopamina de dicho animal con la de un animal de control al que no se le ha administrado el agente terapéutico potencial; y
- 30 (d) elegir un agente terapéutico potencial basándose en la diferencia en las respuestas observadas entre dicho animal y dicho animal de control.

[0032] En determinados modos, el animal es un ratón. En otros modos, el trastorno es la enfermedad de Parkinson.

35 **[0033]** Como antecedentes, la invención también muestra un método para seleccionar un agente terapéutico potencial para usarlo en el tratamiento de un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 o relacionado con PDE1B que consiste en:

- (a) administrar un agente terapéutico potencial a un animal;
- (b) medir la respuesta de dicho animal, donde la respuesta se elige del grupo que consiste en:
 - 40 (i) exhibición del comportamiento exploratorio durante un periodo de prueba para la actividad locomotora horizontal;
 - (ii) exhibición de hiperactividad tras la administración del tratamiento de metanfetamina;

- (iii) longitud de trayectoria en la obtención de un laberinto acuático de Morris;
- (iv) cambio en el nivel de fosfo-Thr34 o fosfo-Ser845 en cortes de núcleo estriado de dicho animal; y
- (v) cambio en el nivel de fosfo-Thr34 o fosfo-Ser845 en cortes de núcleo accumbens de dicho animal,

(c) comparar la respuesta de dicho animal con la de un animal de control al que no se le ha administrado el agente terapéutico potencial; y

(d) elegir un agente terapéutico potencial basándose en la diferencia en las respuestas observadas entre dicho animal y dicho animal de control.

10 **[0034]** En determinados modos, el animal es un ratón. En otros modos, el trastorno es la enfermedad de Parkinson.

[0035] Como antecedentes, la invención también muestra un modelo animal para analizar compuestos identificados mediante el método de detección de la presente invención, donde el compuesto se analiza para su utilidad funcional usando el modelo animal de la presente invención. En un modo preferido, la invención presenta un modelo animal que es deficiente en PDE1B, p. ej., un ratón “*knockout*” o nulo. En un modo, la invención presenta un ratón *knockout* transgénico que comprende una alteración homocigota en el gen PDE1B endógeno, donde dicha alteración impide la expresión de una proteína PDE1B funcional y donde, además, el fenotipo de dicho ratón *knockout* en relación a un ratón que tiene un gen PDE1B de tipo silvestre comprende la ausencia de actividad enzimática de PDE1B cuando se analizó por hidrólisis cGMP o cAMP. En determinados modos, la alteración comprende una alteración dirigida del sitio catalítico PDE1B. En otros modos, el fenotipo del ratón *knockout* en relación a un ratón que tiene un gen PDE1B de tipo silvestre comprende además un fenotipo elegido del grupo que consiste en: exhibición de comportamiento significativamente más exploratorio durante los primeros 30 minutos de un periodo de prueba para actividad locomotora horizontal, exhibición de significativamente más hiperactividad tras la administración del tratamiento de metanfetamina, exhibición de una trayectoria de recorrido considerablemente más larga en la obtención de un laberinto acuático de Morris, exhibición en cortes del núcleo estriado de dicho ratón de niveles aumentados de fosfo-Thr34 o fosfo-Ser845 tras la administración de un agonista del receptor D1 y la exhibición en cortes del núcleo accumbens de dicho ratón de niveles aumentados de fosfo-Thr34 o fosfo-Ser845 tras la administración de un agonista del receptor D1.

3.1. DEFINICIONES

[0036] Tal como se usa aquí, el término “modular” o “modulación” tendrá su significado común e incluye los significados de las palabras “aumentar”, “inhibir” y “imitar”. La “modulación” de actividad puede ser tanto un aumento como un descenso en la actividad.

[0037] Tal como se usa aquí, un “agonista” es cualquier compuesto que actúa de forma directa o indirecta sobre un receptor o a través de él para producir un efecto farmacológico, mientras que “antagonista” es cualquier compuesto que bloquea la estimulación de un receptor y su efecto farmacológico resultante.

[0038] Tal como se usa aquí, una “cantidad eficaz” de un compuesto modulador es una cantidad que

puede ser determinada por un experto en la técnica basándose en los datos de estudios que usan métodos de análisis tal como los que aquí se revelan. Dichos datos pueden incluir, pero sin carácter limitativo, resultados de determinaciones CI50, como se analiza a continuación.

5 **[0039]** Tal y como se usa aquí, el término “DARPP-32” se usa indistintamente con “fosfoproteína regulada por dopamina y AMP cíclico (cAMP)” y “DARPP32” y es una proteína citosólica de 32 kilodalton que se enriquece de forma selectiva en neuronas espinosas de tamaño medio en el núcleo estriado. Las secuencias de aminoácidos de DARPP-32 de humano, ratón, rata y bovino se revelan en la solicitud de patente estadounidense nº 09/419.379 por Bibb *et al.*, titulada "Methods of Identifying Agents That Regulate Phosphorylation/Dephosphorylation in Dopamine Signaling",
10 presentada el 15 de octubre, 1999 y 09/687.959 por Bibb *et al.*, titulada "Methods of Identifying Agents That Regulate Phosphorylation/Dephosphorylation in Dopamine Signaling," presentada el 13 de octubre, 2000, (véase SEQ ID NOS: 1-4, respectivamente).

15 **[0040]** Tal como se usa aquí, el término “Thr75 de DARPP-32” se usa indistintamente con “Thr75 de DARPP32”, “thr⁷⁵ de DARPP-32”, “Treonina-75 de DARPP-32” y “treonina-75 de DARPP-32” junto con abreviaturas análogas e indica el septuagésimo quinto residuo de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de DARPP-32 como reveló Brene *et al.* (*J. Neurosci.* 14:985-998 (1994)) que tiene el número de acceso GenBank AAB30129.1, que es un residuo de treonina que puede fosforilarse mediante Cdk5 y desfosforilarse mediante proteína fosfatasa 2A (PP2A).

20 **[0041]** Tal como se usa aquí, el término “Thr75DARPP-32” indica el septuagésimo quinto residuo de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de DARPP-32 humana. A menos que se indique lo contrario, el término puede también hacer referencia a un correspondiente residuo de aminoácido en el DARPP-32 de otras especies, p. ej., murino, bovino, etc. Estas secuencias son conocidas para un experto en la técnica y, usando los métodos comunes, se puede identificar el residuo de aminoácido correspondiente.

25 **[0042]** Tal como se usa aquí, el término “fosfo-Thr75 de DARPP-32” o abreviaturas análogas, como se revela anteriormente, indica la forma fosforilada de Thr75 de DARPP-32.

30 **[0043]** Tal como se usa aquí, el término “fragmento fosforilable por Cdk5 de DARPP-32” es un fragmento de proteína de DARPP-32 que contiene un residuo de treonina que, cuando se presenta en forma desfosforilada, puede fosforilarse mediante Cdk5 y desfosforilarse mediante proteína fosfatasa 2A (PP2A). Para DARPP-32 humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 1, el residuo de treonina es preferiblemente Thr75 de DARPP-32. Dichos fragmentos pueden ser entre aproximadamente 5 y 100 residuos, o más preferiblemente entre 10 y 50 residuos. Por ejemplo, en un modo concreto, el fragmento péptido comprende 5 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO. 1 incluyendo Thr75. En otro modo de este tipo, el fragmento péptido comprende 7 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO. 1 incluyendo Thr75. En un modo alternativo, el fragmento péptido comprende entre 10 y 25 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO. 1 incluyendo Thr75. Todos los fragmentos péptidos pueden ser parte de proteínas o péptidos de fusión. Un fragmento fosforilable por Cdk5 de DARPP-32 puede prepararse mediante cualquier método comúnmente conocido en la técnica, p. ej., segmentación (como con una proteasa) y desfosforilando el fragmento fosforilado o
35 segmentando (como con una proteasa) el fragmento desfosforilado a partir de un fragmento mayor de proteína Thr75 de DARPP-32 o a partir de toda la proteína DARPP-32. Así, los fragmentos pueden
40

sintetizarse ya sea mediante síntesis de péptidos convencionales reveladas a continuación o generarse con tecnología de ADN recombinante o bien mediante proteólisis clásica.

[0044] Tal como se usa aquí, el término “Thr34 de DARPP-32” se usa indistintamente con “Thr34 de DARPP32”, “thr³⁴ de DARPP-32”, “Treonina-34 de DARPP-32” y “treonina-34 de DARPP-32” junto con abreviaturas análogas e indica el trigésimo cuarto residuo de la secuencia de aminoácidos de DARPP-32 como reveló Brene *et al.* (*J. Neurosci.* 14:985-998 (1994)) que tiene el número de acceso GenBank AAB30129.1, que es un residuo de treonina que puede fosforilarse mediante la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) o desfosforilarse mediante proteína fosfatasa 2B (PP2B).

[0045] Tal como se usa aquí, el término “Thr34DARPP-32” indica el trigésimo cuarto residuo de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de DARPP-32 humana. A menos que se indique lo contrario, el término puede también hacer referencia a un correspondiente residuo de aminoácido en el DARPP-32 de otras especies, p. ej., murino, bovino, etc. Estas secuencias son conocidas para un experto en la técnica y, usando los métodos comunes, se puede identificar el residuo de aminoácido correspondiente.

[0046] Tal como se usa aquí, el término “fosfo-Thr34 de DARPP-32” o abreviaturas análogas, como se revelan anteriormente, indica la forma fosforilada de Thr34 de DARPP-32.

[0047] Tal como se usa aquí, el término “fragmento fosforilable por PKA de DARPP-32” es un fragmento de proteína de DARPP-32 que contiene un residuo de treonina que, cuando se presenta en forma desfosforilada, puede fosforilarse mediante PKA. Para DARPP-32 humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 1, el residuo de treonina es preferiblemente Thr34 de DARPP-32. Dichos fragmentos pueden ser entre aproximadamente 5 y 100 residuos, o más preferiblemente entre 10 y 50 residuos. Por ejemplo, en un modo concreto, el fragmento péptido comprende 5 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO. 1 incluyendo Thr34. En otro modo de este tipo, el fragmento péptido comprende 7 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO. 1 incluyendo Thr34. En un modo alternativo, el fragmento péptido comprende entre 10 y 25 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO. 1 incluyendo Thr34. Todos los fragmentos péptidos pueden ser parte de proteínas o péptidos de fusión. Un fragmento fosforilable por PKA de DARPP-32 puede prepararse mediante cualquier método comúnmente conocido en la técnica, p. ej., segmentación (como con una proteasa) y desfosforilando el fragmento fosforilado o segmentando (como con una proteasa) el fragmento desfosforilado a partir de un fragmento mayor de proteína Thr34 de DARPP-32 o a partir de toda la proteína DARPP-32. Así, los fragmentos pueden sintetizarse ya sea mediante síntesis de péptidos convencionales reveladas a continuación o generarse con tecnología de ADN recombinante o bien mediante proteólisis clásica.

[0048] Tal como se usa aquí, el término “Ser845 del receptor AMPAGluR1” se usa indistintamente con “Ser845-receptor AMPAGluR1”, “ser⁸⁴⁵ de AMPA GluR1”, “Serina-845 de AMPA GluR1” junto con abreviaturas análogas e indica el octingentésimo cuadragésimo quinto residuo de la secuencia de aminoácidos de la subunidad del receptor AMPA GluR1 humano maduro (p. ej. serina 863 de la secuencia de preproteína como reveló Puckett *et al.* (1991, “Molecular cloning and chromosomal localization of one of the human glutamate receptor genes”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (17), 7557-7561) que tiene el número de acceso GenBank NP_000818 (SEQ ID NO. 7)), que es un residuo de serina que puede fosforilarse mediante PKA.

[0049] Tal como se usa aquí, el término “Ser845 del receptor AMPA GluR1” indica el octingentésimo cuadragésimo quinto residuo de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la subunidad del receptor AMPA GluR1 humano maduro. A menos que se indique lo contrario, el término puede también hacer referencia a un correspondiente residuo de aminoácido en el AMPA GluR1 de otras especies, p. ej., murino, bovino, etc. Estas secuencias son conocidas para un experto en la técnica y, usando los métodos comunes, se puede identificar el residuo de aminoácido correspondiente.

[0050] Tal como se usa aquí, el término “fosfo-Ser845 del receptor AMPA GluR1” o abreviaturas análogas, como se revela anteriormente, indica la forma fosforilada de Ser845 del receptor AMPA GluR1.

[0051] Tal como se usa aquí, el término “fragmento fosforilable por PKA del receptor AMPA GluR1” es un fragmento de proteína del receptor AMPA GluR1 que contiene un residuo de serina que, cuando se presenta en forma desfosforilada, puede fosforilarse mediante PKA. Para el receptor AMPA GluR1 humano que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 7, el residuo de serina es preferiblemente Ser845 del receptor AMPA GluR1 de la forma madura (Ser 863 de la secuencia de preproteína). Dichos fragmentos pueden ser entre aproximadamente 5 y 100 residuos, o más preferiblemente entre 10 y 50 residuos. Por ejemplo, en un modo concreto, el fragmento péptido comprende 5 aminoácidos consecutivos incluyendo Ser845. En otro modo de este tipo, el fragmento péptido comprende 7 aminoácidos consecutivos incluyendo Ser845. En un modo alternativo, el fragmento péptido comprende entre 10 y 25 aminoácidos consecutivos incluyendo Ser845. Todos los fragmentos péptidos pueden ser parte de proteínas o péptidos de fusión. Un fragmento fosforilable por PKA del receptor AMPA GluR1 puede prepararse mediante cualquier método comúnmente conocido en la técnica, p. ej., segmentación (como con una proteasa) y desfosforilando el fragmento fosforilado o segmentando (como con una proteasa) el fragmento desfosforilado a partir de un fragmento mayor de proteína Ser845 del receptor AMPA GluR1 o a partir de toda la proteína del receptor AMPA GluR1. Así, los fragmentos pueden sintetizarse ya sea mediante síntesis de péptidos convencionales reveladas a continuación o generarse con tecnología de ADN recombinante o bien mediante proteólisis clásica.

[0052] Como será evidente para un experto en la técnica, otros fragmentos fosforilables y desfosforilables de moléculas de señalización intracelular, incluyendo, sin carácter limitativo DARPP-32 y AMPA GluR1, pueden prepararse según métodos ya conocidos en la técnica, usando los métodos generales revelados anteriormente.

[0053] Tal como se usa aquí, la cantidad y/o índice de fosforilación de DARPP-32 o de un fragmento fosforilable de DARPP-32, como se ha descrito anteriormente, en una reacción de quinasa “cambia de forma significativa” cuando la cantidad y/o índice de fosforilación de DARPP-32 o del fragmento fosforilable de DARPP-32 aumenta o disminuye una cantidad estadísticamente significativa, según se determina mediante métodos estadísticos convencionales conocidos en la técnica. En otro modo, el cambio significativo es al menos aproximadamente un 10-25 %, en relación a la reacción de control. Preferiblemente, un cambio significativo en el índice de la fosforilación de DARPP-32 mediante una molécula que sea de interés (p. ej., CK1 o Cdk5) observado en presencia de un modulador potencial está, en cierto punto, correlacionado con las constantes Michaelis (p. ej., Vmax o Km) de la reacción. Por ejemplo, en el caso de un inhibidor, puede determinarse un KI. Así, en determinados modos,

puede preferirse estudiar varias concentraciones de un modulador en una mezcla de reacción con el fin de permitir la identificación del modulador potencial como un modulador.

[0054] Tal como se usa aquí, la cantidad y/o índice de desfosforilación de DARPP-32 o de un fragmento desfosforilable de DARPP-32, como se ha descrito anteriormente, en una reacción de fosfatasa “cambia de forma significativa” cuando la cantidad y/o índice de desfosforilación de DARPP-32 o del fragmento desfosforilable de DARPP-32 aumenta o disminuye una cantidad estadísticamente significativa, según se determina mediante métodos estadísticos convencionales conocidos en la técnica. En otro modo, el cambio significativo es al menos aproximadamente un 10-25 %, en relación a la reacción de control. Preferiblemente, un cambio significativo en el índice de la desfosforilación de DARPP-32 mediante un molécula que sea de interés (p. ej., PP2C, PP2B o PP2A) observado en presencia de un modulador potencial está, en cierto punto, correlacionado con las constantes Michaelis (p. ej., Vmax o Km) de la reacción. Por ejemplo, en el caso de un inhibidor, puede determinarse un KI. Así, en determinados modos, puede preferirse estudiar varias concentraciones de un modulador en una mezcla de reacción con el fin de permitir la identificación del modulador potencial como un modulador.

[0055] Tal como se usa aquí, el término “trastorno relacionado con PDE1B” se usa indistintamente con el término “trastorno relacionado con fosfodiesterasa 1B”, “trastorno de PDE1B” o términos análogos. Un trastorno relacionado con PDE1B incluye, sin carácter limitativo, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, trastorno por déficit de atención (TDA), trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), enfermedad neurodegenerativa, síndrome de Tourette, tic nervioso, síndrome de Lesch-Nyhan, dolor, distonías, abuso de drogas o sustancias, esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo, depresión, trastorno afectivo, trastorno bipolar, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno de la conducta alimentaria, vómito, trastorno de pánico, trastorno de ansiedad, migraña, mioclonos, síndrome premenstrual (SPM), trastorno por estrés postraumático, síndrome carcinoide, enfermedad de Alzheimer, derrame cerebral, epilepsia, trastorno del ritmo circadiano o del sueño (p. ej. insomnio), disfunción sexual, trastorno por estrés, hipertensión y cáncer. Un trastorno relacionado con PDE1B también incluye, pero sin carácter limitativo, una enfermedad (p. ej., enfermedad de Parkinson) o un problema (p. ej., adicción a la cocaína) que implica una anomalía o desajuste de una vía de transmisión de señal, incluyendo, pero sin carácter limitativo, neurotransmisión mediada por PDE1B en tejidos, órganos o células excitables (p. ej., neuronas, cerebro, sistema nervioso central, etc.). Un trastorno relacionado con PDE1B también incluye, pero sin carácter limitativo, un síntoma de un trastorno relacionado con PDE1B. En determinados modos, la vía afectada incluye la fosforilación y/o desfosforilación de DARPP-32, con el correspondiente tratamiento del desajuste que implica la estimulación y/o inhibición de la fosforilación y/o desfosforilación de uno o más residuos de treonina y/o serina específicos de DARPP-32 (véase, p. ej., Greengard *et al.*, *Neuron* 23:435-447 (1999); Bibb *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:6809-68 14 (2000); y la solicitud de patente estadounidense nº 09/419.379, por Bibb *et al.*, titulada “Methods of Identifying Agents That Regulate Phosphorylation/Dephosphorylation in Dopamine Signaling”, presentada el 15 de octubre, 1999, y 09/687.959, por Bibb *et al.*, titulada “Methods of Identifying Agents That Regulate Phosphorylation/Dephosphorylation in Dopamine Signaling”, presentada el 13 de octubre, 2000). En otros modos, la vía afectada incluye la fosforilación de fosfo-Ser845 del receptor AMPA GluR1 por

la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) con el correspondiente tratamiento del desarreglo que implica la estimulación y/o inhibición de la fosforilación y/o desfosforilación de uno o más residuos de treonina y/o serina específicos del receptor AMPA GluR1 (véase, p. ej., Kameyama, K. *et al.* 1998. *Neuron* 21:1163-1175). Aún en otros modos, la vía afectada incluye la subunidad GluR1 del receptor AMPA como un criterio de valoración de la vía de dopamina. También en otros modos, la vía afectada incluye otros criterios de valoración para los efectos biológicos de las vías de señalización intracelulares dopaminérgicas, incluyendo, pero sin carácter limitativo, la fosforilación de varios tipos de canales de calcio, Na/K ATPasa, receptores NMDA, CREB, etc., como será evidente para un experto en la técnica.

5 [0056] Tal como se usa aquí, el término “vía de señalización intracelular de dopamina D1” se usa indistintamente con el término “vía de señalización intracelular del receptor D1”, cascada de señalización intracelular de dopamina D1”, cascada de señalización de dopamina D1” o términos análogos.

[0057] Tal como se usa aquí, el término “trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1” se usa indistintamente con el término “trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor D1” o términos análogos. Un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 incluye, pero sin carácter limitativo, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, trastorno por déficit de atención (TDA), trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), enfermedad neurodegenerativa, síndrome de Tourette, tic nervioso, 15 síndrome de Lesch-Nyhan, dolor, distonías, abuso de drogas o sustancias, esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo, depresión, trastorno afectivo, trastorno bipolar, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno de la conducta alimentaria, vómito, trastorno de pánico, trastorno de ansiedad, migraña, mioclonos, síndrome premenstrual (SPM), trastorno por estrés postraumático, síndrome carcinoide, enfermedad de Alzheimer, derrame cerebral, epilepsia, trastorno del ritmo circadiano o del sueño (p. 20 ej. insomnio), disfunción sexual, trastorno por estrés, hipertensión y cáncer. Un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 también incluye, pero sin carácter limitativo, una enfermedad (p. ej., enfermedad de Parkinson) o un problema (p. ej., adicción a la cocaína) que implica una anormalidad o desarreglo de una vía de transmisión de señal, incluyendo, pero sin carácter limitativo, neurotransmisión mediada por receptores D1 en tejidos, órganos o células 25 excitables (p. ej., neuronas, cerebro, sistema nervioso central, etc.). Un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 también incluye, pero sin carácter limitativo, un síntoma de un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1. En determinados modos, la vía afectada incluye la fosforilación y/o desfosforilación de DARPP-32, con el correspondiente tratamiento del desarreglo que implica la estimulación y/o inhibición de la 30 fosforilación y/o desfosforilación de uno o más residuos de treonina y/o serina específicos de DARPP-32 (véase, p. ej., Greengard *et al.*, *Neuron* 23:435-447 (1999); Bibb *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:6809-68 14 (2000); y la solicitud de patente estadounidense nº 09/419.379, por Bibb *et al.*, titulada “Methods of Identifying Agents That Regulate Phosphorylation/Dephosphorylation in Dopamine Signaling”, presentada el 15 de octubre, 1999, y 09/687.959, por Bibb *et al.*, titulada “Methods of 35 Identifying Agents That Regulate Phosphorylation/Dephosphorylation in Dopamine Signaling”, presentada el 13 de octubre, 2000).

En otros modos, la vía afectada incluye la fosforilación de fosfo-Ser845 del receptor AMPA GluR1 por la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) con el correspondiente tratamiento del desarreglo que implica la estimulación y/o inhibición de la fosforilación y/o desfosforilación de uno o más residuos de serina específicos del receptor AMPA GluR1 (véase, p. ej., Kameyama, K. *et al.* 1998. *Neuron* 21:1163-1175).

[0058] Tal como se usa aquí, una “pequeña molécula orgánica” es un compuesto orgánico (o compuesto orgánico complejo con un compuesto inorgánico (p. ej., metal)) que tiene un peso molecular de menos de 3 kilodalton, preferiblemente menos de 1,5 kilodalton. Preferentemente, la pequeña molécula orgánica puede cruzar la barrera hematoencefálica.

[0059] Tal como se usa aquí, el término “aproximadamente” significa entre 10 y 15 %, preferiblemente entre 5 y 10 %. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que contiene aproximadamente 60 residuos de aminoácido puede contener entre 51 a 69 residuos de aminoácido, más preferiblemente de 57 a 63 residuos de aminoácido.

4. DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0060] Figs. 1A-C. Estrategia dirigida para PDE1B y análisis Southern y Northern blot de la cría de los retrocruzamientos de tercera generación. A, Diagrama de una parte del gen PDE1B endógeno y el resultado de la recombinación homóloga con el vector dirigido. Se alteró una parte de 3,1 kb del gen PDE1B que codifica el dominio catalítico central mediante el reemplazo con el gen HPRT de 2,9 kb. La alteración tuvo como resultado un cambio de tamaño en el fragmento *Stu*I de 3,7 a 2,2 kb y un cambio de tamaño en un fragmento *Nde*I/*Kpn*I de 3,7 a 10,6 kb. Las barras por encima del gen PDE1B representan secuencias genómicas de ADN incluidas en el vector dirigido. Las barras por debajo del gen PDE1B indican los fragmentos de restricción usados para el análisis Southern blot del ADN genómico del ratón y las células madre embrionarias. Las líneas gruesas verticales y numeradas representan exones. Las líneas delgadas verticales indican sitios de enzimas de restricción. S, *Stu*I; N, *Nde*I; X, *Xba*I; A, *Acc*I; K, *Kpn*I. B, Southern blot de la cría de los retrocruzamientos de ratones de tercera generación de ADN genómico de ratón digerido con *Stu*I que muestra los genotipos de tipo silvestre (W), heterocigotos (H) y nulos (N). El fragmento de *Stu*I de 2,2 kb se generó mediante recombinación homóloga con el vector dirigido. Todas las transferencias se analizaron con una sonda de exón 3 de PDE1B. C, Se analizó el ARN total del cerebro de ratones de cada genotipo mediante el Northern blot hibridándolo con K-17, una sonda de ADNc correspondiente al dominio catalítico central (Repaske *et al.*, 1992, *J Biol Chem* 267:18683-18688). La transcripción esperada de aproximadamente 3,0 kb se observa en ratones WT (del inglés *wild type*, de tipo silvestre) y los PDE1B +/- solo (parte superior). Las bandas de ribosomas manchados con azul de metileno en el mismo Northern blot muestra la misma carga de ARN (parte superior). Véase la sección 6 para más detalles.

[0061] FIG. 2. Actividad horizontal. Se muestra la media \pm EEM (error estándar de la media) de actividad horizontal para ratones PDE1B *-/-*, PDE1B +/- y WT (machos y hembras combinados). Una flecha indica el momento de administración de metanfetamina (1 mg/kg). Los conteos representan el número total de interrupciones de haz luminoso por intervalos de 3 min. Los ratones PDE1B *-/-* eran hiperactivos comparados con ratones WT tanto antes ($F_{(2,120)} = 8,55$; $p < 0.0003$) y después ($F_{(2,120)} =$

11,18; $p < 0.0001$) de la exposición a anfetamina. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. $n = +/+$, 71; +/-, 114; -/-, 49. Véase la sección 6 para más detalles.

[0062] FIGS. 3A-B. Diferencias de género en la distancia total. Se muestra la media \pm EEM de distancia recorrida por ratones macho (parte superior) y ratones hembra (parte inferior en el sistema de actividad en bloques de 3 min. La flecha indica el momento de administración de metanfetamina (1 mg/kg). Los ratones hembra PDE1B -/-, aunque no los ratones macho PDE1B -/-, eran hiperactivos comparados con los ratones WT durante el periodo anterior a la exposición a anfetamina ($F_{(2,120)} = 3.07$; $p < 0,05$); esta diferencia de género no continuó en el periodo posterior a la exposición. $n = +/+$, 71; +/-, 114; -/-, 49. Véase la sección 6 para más detalles.

[0063] FIGS. 4A-D. Fosforilación de sustratos mediados por PKA en ratones WT y PDE1B -/-. A, Inmunoblot que muestra el nivel de fosfo-Thr 34 de DARPP-32 en cortes de núcleo estriado de control (Con) y en cortes tratados con forskolina activadora de adenilil ciclasa (For) de ratones WT y PDE1B -/-; B, Factor de aumento en fosfo-Thr 34 de DARPP-32 en respuesta a forskolina (* $p < 0,05$ comparado con forskolina en WT; la prueba U de Mann-Whitney; $n = 3$ ratones por grupo de tratamiento). C, Inmunoblot que muestra los niveles de fosfo-Thr 34 y DARPP-32 total (izquierda) y fosfo-Ser 845 y GluR1 total (derecha) en cortes de núcleo estriado sin tratar (Con) y tratados con agonista de D1 (D1) de ratones WT y PDE1B -/-. D, Media \pm EEM de aumento en los niveles de fosfo-Thr 34 de DARPP-32 (izquierda) y fosfo-Ser 845- GluR1 (derecha) en la incubación con el agonista de D1 (* $p < 0,05$ comparado con los cortes de control sin tratar; $tp < 0,05$ comparado con los cortes de WT tratados con D1; prueba U de Mann-Whitney; $n = 3$ ratones por grupo de tratamiento). Véase la sección 6 para más detalles.

[0064] FIGS. 5A-B. Aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris. +, Longitud de trayectoria (media EEM) para alcanzar la plataforma para los ratones de cada genotipo. Los ratones PDE1B -/- y PDE1B +/- mostraron una longitud de trayectoria significativamente aumentada comparada con los ratones WT ($F_{(2,112)} = 9,19$; $p < 0,0002$). B, Distancia acumulativa desde la plataforma (media \pm EEM) para ratones de cada genotipo. Los ratones PDE1B -/- y PDE1B +/- mostraron una distancia acumulativa significativamente aumentada comparada con ratones WT ($F_{(2,112)} = 8,38$; $p < 0,0004$). Se muestran los datos para la media de las cuatro pruebas por día promediado a través de los 6 d. ** $p < 0,01$ comparado con ratones de tipo silvestre. $n = +/+$, 55; +/-, 101; -/-, 66. Véase la sección 6 para más detalles.

[0065] FIGS. 6. Aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris: obtención de la tarea de la plataforma escondida. Se muestran los datos para la media de las cuatro pruebas por día para cada uno de los tres genotipos. Los ratones PDE1B -/- y PDE1B +/- mostraron una longitud de trayectoria significativamente aumentada comparada con los ratones WT en los días 3-6 (genotipo por día por interacción de plataforma; $F_{(10,560)} = 2,01$; $p < 0,04$). * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ comparado con ratones WT. Diamantes rellenos, +/+ ($n = 55$); cuadrados sombreados, +/- ($n = 101$); triángulos vacíos, -/- ($n = 66$). Véase la sección 6 para más detalles.

[0066] FIGS. 7A-B. Aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris: actuación de la prueba de sonda. La longitud de trayectoria (media \pm EEM) se expresa como porcentaje del tiempo de nado total en el anillo diana (A) y en el anillo externo (B) promediado a través de dos pruebas de sonda y género. * $p < 0,01$ comparado con ratones de tipo silvestre. Véase la sección 6 para más detalles.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0067] La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento, por parte de los inventores, de que la actividad de fosfodiesterasa (PDE), en concreto, la actividad de fosfodiesterasa 1B (PDE1B), funciona en el tejido cerebral como un regulador de la actividad locomotora y el aprendizaje y la memoria. De acuerdo con la invención, PDE1B puede usarse como diana terapéutica para la regulación de las vías de señalización intracelulares, preferiblemente en el sistema nervioso, incluyendo, sin carácter limitativo, una vía de señalización intracelular de receptor de dopamina D1, receptor de dopamina D2, óxido nítrico, norepinefrina, neurotensina, CCK, VIP, serotonina, glutamato (p. ej., receptor NMDA, receptor AMPA), GABA, acetilcolina, adenosina (p. ej., receptor A2A), receptor cannabinoide, péptido natriurético (p. ej., ANP, BNP, CNP) o endorfina. En modos preferidos, PDE1B puede usarse como diana terapéutica para el tratamiento de, p. ej., un trastorno relacionado con PDE1B o un trastorno de la vía intracelular del receptor de dopamina D1. En un modo específico, PDE1B puede usarse como diana terapéutica para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

[0068] La activación de dopamina (AD) *per se* y los agentes que aumentan la neurotransmisión dopaminérgica actúan en los receptores de superficie de la célula. Sin intención de limitarse a ninguna teoría en concreto, en un aspecto de la invención, los receptores de dopamina D1 median la fosforilación de DARPP-32 a través de las vías de señalización intracelular del receptor de dopamina D1. Por consiguiente, la activación del receptor de dopamina D1 lleva a la activación de adenilil ciclasa (y cAMP aumentado). cAMP activa la proteína quinasa A (PKA; proteína quinasa dependiente del cAMP) que fosforila (o modula la fosforilación de) elementos posteriores en la vía de señalización intracelular, incluyendo, pero sin carácter limitativo, DARPP-32 (fosfoproteína-32 regulada por cAMP y dopamina), ARPP-16 (DARPP-16), ARPP-19 (DARPP-19), ARPP-21 (DARPP-21), proteína que une el elemento de respuesta de cAMP (CREB), receptor AMPA (p. ej., receptor AMPA GluR1), cAMP, cGMP, CK1, CK2, Cdk5, PKA, PKG, PP-2C, PP-2B y PP-1. Estas vías de señalización se infrarregulan o antagonizan con fosfodiesterasas (PDE), que incluyen, pero sin carácter limitativo, PDE1B, que hidrolizan cAMP a sus 5'-monofosfatos.

[0069] Como antecedentes, la activación del receptor de dopamina D2 lleva a la inhibición de adenilil ciclasa (y cAMP disminuido). La concentración intracelular de cGMP también queda igual o inhibida tras la activación del receptor D2. cGMP activa la proteína quinasa G (PKG; proteína quinasa dependiente del cGMP) que fosforila los elementos posteriores de la vía de transducción de señal, incluyendo, pero sin carácter limitativo, elementos posteriores en las vías de señalización intracelular, que incluyen, sin carácter limitativo, DARPP-32 (fosfoproteína-32 regulada por cAMP y dopamina), ARPP-16 (DARPP-16), ARPP-19 (DARPP-19), ARPP-21 (DARPP-21), proteína que une el elemento de respuesta de cAMP (CREB), receptor AMPA (p. ej., receptor AMPA GluR1), cAMP, cGMP, CK1, CK2, Cdk5, PKA, PKG, PP-2C, PP-2B y PP-1.

[0070] Como antecedentes, PDE1B regulado por calcio es una interfaz para regular la actividad entre vías de señalización intracelulares reguladas por dopamina y otras vías de señalización intracelulares, incluyendo, sin carácter limitativo, vías de señalización intracelular de óxido nítrico, norepinefrina, neurotensina, CCK, VIP, serotonina, glutamato (p. ej., receptor NMDA, receptor AMPA), GABA, acetilcolina, adenosina (p. ej., receptor A2A), receptor cannabinoide, péptido natriurético (p. ej., ANP, BNP, CNP) o endorfina. En otro modo, PDE1B regula la señalización a partir de otros estímulos

unidos a cAMP o cGMP (A2a, D2, opiáceo, óxido nítrico, glutamato, etc.) que modulan la fosforilación de DARPP-32. Además, en determinados modos, PDE1B regula la señalización independiente de DARPP-32 a partir del receptor D I, así como otros estímulos unidos a cAMP o cGMP (A2a, D2, opiáceo, óxido nítrico, glutamato, etc.) modulando la fosforilación directa, mediante PKA y PKG, de proteínas del criterio de valoración que incluyen, sin carácter limitativo, el receptor AMPA, canales de calcio, Na/K ATPasa, receptor NMDA y CREB. Por lo tanto, en consecuencia, el aumento de la señalización de cAMP por inactivación de la hidrólisis nucleótida cíclica mediada por PDE1B tiene un papel importante en la función dopaminérgica a través de la regulación de la actividad de DARPP-32 y estas vías de señalización intracelular relacionadas. Así, en consecuencia la modulación de la actividad de PDE1B debería también modular la actividad de estas vías de señalización intracelular interrelacionadas.

[0071] Para mayor claridad de la revelación, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en las subdivisiones establecidas a continuación y ha de entenderse que algunas partes de la instrucción se presentan simplemente con fines de referencia.

5.1 MÉTODOS PARA MODULAR LA ACTIVIDAD DE PDE1B

[0072] La presente invención muestra un método para modular la actividad PDE1B en una célula o tejido que comprende poner en contacto dicha célula o tejido con una cantidad de un compuesto suficiente para cambiar la actividad de una vía de señalización intracelular, incluyendo, sin carácter limitativo, la señalización intracelular del receptor de dopamina D1, donde el contacto de dicha célula o tejido con el compuesto tiene como resultado la modulación de la actividad de PDE1B.

[0073] En determinados modos, el compuesto modula la actividad de PDE1B uniéndose a PDE1B. El enlace puede medirse bajo cualquier condición fisiológica convencional conocida en la técnica, de acuerdo con métodos ya conocidos en la técnica.

[0074] En otros modos, la fosforilación de fosfo-Thr34 de DARPP-32 o fosfo-Ser845 del receptor AMPA GluR1 se modula mediante la modulación de PDE1B.

[0075] En otros modos, la fosforilación de un elemento posterior en una vía de señalización intracelular, incluyendo, sin carácter limitativo, un canal de calcio, Na/K ATPasa, receptor NMDA y CREB, se modula mediante la modulación de PDE1B.

[0076] Como antecedentes, la presente invención también muestra un método para modular la actividad de una molécula de señalización intracelular, incluyendo, pero sin carácter limitativo, DARPP-32 (fosfoproteína-32 regulada por cAMP y dopamina), ARPP-16 (DARPP-16), ARPP-19 (DARPP-19), ARPP-21 (DARPP-21), proteína que une el elemento de respuesta de cAMP (CREB), receptor AMPA (p. ej., receptor AMPA GluR1), cAMP, cGMP, CK1, CK2, Cdk5, PKA, PKG, PP-2C, PP-2B y PP-1, canales de calcio, Na/K ATPasa y receptor NMDA, que consiste en administrar (por ejemplo, a un sujeto, paciente o animal) una cantidad de un compuesto suficiente para cambiar la actividad de una vía de señalización intracelular, incluyendo, sin carácter limitativo, una vía de señalización intracelular de receptor de dopamina D1, receptor de dopamina D2, óxido nítrico, norepinefrina, neurotensina, CCK, VIP, serotonina, glutamato (p. ej., receptor NMDA, receptor AMPA), GABA, acetilcolina, adenosina (p. ej., receptor A2A), receptor cannabinoide, péptido natriurético (p. ej., ANP, BNP, CNP) o endorfina. En determinados modos, el compuesto es un compuesto

identificado por los métodos de la invención, donde el compuesto modula la actividad de PDE1B y donde la modulación de la actividad de PDE1B tiene como resultado un cambio en la actividad de dicha molécula de señalización intracelular en una célula o tejido. En un modo específico, el compuesto se une a PDE1B. En otro modo específico, el compuesto cambia la expresión de PDE1B.

5 En determinados modos, la molécula de señalización intracelular es posterior en una vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1.

[0077] En un modo específico, la molécula de señalización intracelular es una célula excitable, p. ej., una neurona.

[0078] En modos específicos de la invención, la actividad de PDE1B aumenta. En otros modos específicos, la actividad de PDE1B disminuye. En determinados modos, la actividad de PDE1B incluye la expresión de PDE1B. La expresión (p. ej., la expresión del gen, expresión de una proteína) puede medirse con cualquier método comúnmente conocido en la técnica.

[0079] Como antecedentes, en otro modo, la invención muestra un método para regular la activación dependiente de la fosforilación de una molécula de señalización intracelular, incluyendo, sin carácter limitativo, DARPP-32 (fosfoproteína-32 regulada por cAMP y dopamina), ARPP-16 (DARPP-16), ARPP-19 (DARPP-19), ARPP-21 (DARPP-21), proteína que une el elemento de respuesta de cAMP (CREB), receptor AMPA (p. ej., receptor AMPA GluR1), cAMP, cGMP, CK1, CK2, Cdk5, PKA, PKG, PP-2C, PP-2B y PP-1, canales de calcio, Na/K ATPasa y receptor NMDA, en una célula o tejido, que consiste en administrar una cantidad de un compuesto suficiente para modular la actividad de PDE1B, donde la modulación de la actividad de PDE1B tiene como resultado un cambio en la activación dependiente de la fosforilación de dicha molécula en la célula o tejido.

[0080] Por consiguiente, una célula o tejido puede incluir, pero sin carácter limitativo: una célula excitable, p. ej., una neurona sensorial, motoneurona o interneurona; células gliales; un cultivo primario de células, p. ej., un cultivo primario de células gliales o neuronales; célula(s) derivada(s) de una línea de células gliales o neuronales; célula(s) disociada(s); célula(s) completa(s) o intacta(s); célula(s) permeabilizada(s); preparación celular rota; una preparación celular purificada y/o aislada; una preparación de enzima purificada o extracto celular; un tejido u órgano, p. ej., cerebro, estructura cerebral, corte cerebral, médula espinal, corte de médula espinal, sistema nervioso central, sistema nervioso periférico o nervio; cortes de tejido y un animal entero.

[0081] En determinados modos, la estructura cerebral es el núcleo estriado, ganglios basales, núcleo accumbens o sus equivalentes anatómicos y/o funcionales en otras especies mamíferas.

[0082] En otro modo de realización, se presenta un método para modular la actividad de PDE1B en células o tejidos de interés *in vitro*.

[0083] En otro modo, la actividad de PDE1B en células o tejidos de interés se modula *in situ* o *in vivo*. Las aplicaciones *in vitro*, *in situ* e *in vivo* pueden incluir, sin carácter limitativo, modular la actividad en cualquiera de las células o tejidos revelados anteriormente.

5.2 MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE COMPUESTOS QUE MODULAN LA ACTIVIDAD DE PDE1B

[0084] La presente invención presenta, *in vitro*, métodos para identificar un agente, fármaco o compuesto para modular la actividad de PDE1B en una célula o tejido. En un aspecto, el método

comprende identificar un agente que ha de analizarse por su capacidad de tratar un trastorno, que incluye, sin carácter limitativo, un trastorno relacionado con PDE1B y un trastorno de la vía de señalización intracelular de dopamina D1. Dichos métodos pueden usarse solos o junto con otro. En un modo de realización, la invención presenta un método de un método *in vitro* para identificar un compuesto que modula la fosforilación de Thr34 de DARPP-32 en una célula o tejido que consiste en:

- (c) poner en contacto dicha célula o tejido con un compuesto de ensayo; y
- (d) determinar un nivel de actividad de PDE1B en dicha célula o tejido;

donde una diferencia en dicho nivel y un nivel de control de la actividad de PDE1B en una célula o tejido comparable que no ha entrado en contacto con el compuesto de ensayo es indicativo de la capacidad de dicho compuesto para modular la fosforilación de Thr34 de DARPP-32.

[0085] De acuerdo con la invención, un nivel de control significa un nivel de referencia separado medido en una célula o tejido comparable que no se ha puesto en contacto con un compuesto de ensayo o un nivel que se ha medido en una célula o tejido antes de ponerlo en contacto con un compuesto de ensayo.

[0086] Como entenderá claramente una persona especializada en la técnica, cualquiera y/o todos los modos aquí revelados para identificar un agente, fármaco o compuesto que puede modular la actividad de PDE1B, incluyendo dichos procedimientos que incorporan diseño farmacológico racional, tal como aquí se revela, pueden combinarse para formar exámenes e informes farmacológicos adicionales, los cuales se contemplan en la presente invención.

[0087] Puesto que PDE1B juega un papel importante a la hora de controlar los niveles de cAMP y puesto que la vía cAMP-PKA interactúa con muchas otras vías de señalización en el cerebro, la modulación de PDE1B mejorará, en determinados modos, los síntomas y/o podrá usarse en el tratamiento de trastornos que incluyen, sin carácter limitativo, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, trastorno por déficit de atención (TDA), trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), enfermedad neurodegenerativa, síndrome de Tourette, tic nervioso, síndrome de Lesch-Nyhan, dolor, distonías, abuso de drogas o sustancias, esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo, depresión, trastorno afectivo, trastorno bipolar, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno de la conducta alimentaria, vómito, trastorno de pánico, trastorno de ansiedad, migraña, mioclonos, síndrome premenstrual (SPM), trastorno por estrés postraumático, síndrome carcinoide, enfermedad de Alzheimer, derrame cerebral, epilepsia, trastorno del ritmo circadiano o del sueño (p. ej. insomnio), disfunción sexual, trastorno por estrés, hipertensión y cáncer.

[0088] De acuerdo con los métodos de la invención, los patrones y/o niveles de la fosforilación de DARPP-32 y o la fosforilación del receptor AMPA GluR1 pueden determinarse tanto antes como después del tratamiento de las células o tejidos con un compuesto de ensayo.

[0089] Un experto entenderá que, de acuerdo con la invención, una vez que un compuesto se ha identificado como capaz de producir, p. ej., patrones y/o niveles cambiados de la fosforilación de DARPP-32 y, de forma opcional, la fosforilación del receptor AMPA GluR1 similar a compuestos beneficiosos conocidos, el compuesto puede usarse para tratar un trastorno relacionado con PDE1B, un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1, así como otras enfermedades en la que se vean implicados los sistemas dopaminérgicos. Dichas enfermedades incluirían, sin carácter limitativo, un trastorno relacionado con PDE1B y un trastorno de la vía de

señalización intracelular del receptor de dopamina D1. En el contexto de la presente invención, los compuestos identificados se administrarían como una dosis o cantidad eficaz que puede determinar un experto en la técnica basándose en los datos de estudios tal como los presentados en esta especificación. Dichos datos incluirían, sin carácter limitativo, resultados de determinaciones CI50.

5 **[0090]** En otro modo, se usa un animal experimental para determinar el efecto de un agente potencial sobre un trastorno relacionado con PDE1B y un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1. Puede elegirse un modulador potencial que mejora el trastorno.

[0091] Por ejemplo, en determinados modos de realización, una respuesta de aprendizaje de comportamiento o locomotora de un animal puede determinarse en presencia o ausencia del agente. En un modo de realización específico, la actividad locomotora del animal, p. ej., un ratón, puede medirse en un monitor de actividad como se revela en la sección 6. En un modo de realización específico, puede usarse una prueba de comportamiento, p. ej., una prueba para el comportamiento exploratorio durante la actividad locomotora horizontal, una prueba para la actividad locomotora tras la administración de un tratamiento con metanfetamina o un laberinto acuático de Morris, tal como se revela en la sección 6.

[0092] Los métodos para analizar un agente terapéutico potencial (p. ej., un modulador potencial, fármaco candidato, etc.) en animales o modelos animales son ya conocidos en la técnica. Por lo tanto, los agentes terapéuticos pueden usarse para tratar animales completos. Los moduladores potenciales pueden administrarse mediante una variedad de formas que incluyen, de forma tópica, oral, subcutánea o intraperitoneal (tal como una inyección intraperitoneal) dependiendo del uso propuesto. La dosis óptima se definirá de forma empírica. Los animales pueden sacrificarse, por ejemplo, mediante irradiación centrada de haces de microondas.

[0093] La eficacia potencial de estos compuestos a la hora de aliviar los síntomas patológicos de un trastorno relacionado con PDE1B y un trastorno de la vía de señalización intracelular de dopamina D1 puede evaluarse en modelos animales para la enfermedad. Por ejemplo, animales que expresen de forma ectópica la forma que causa la enfermedad humana del gen de la enfermedad de Huntington (EH) muestran síntomas neurológicos similares a los de los pacientes con EH. Modelos como estos pueden usarse para evaluar la eficacia de cualquier agente terapéutico potencial como se revela a continuación. Generalmente, al menos se usan dos grupos de animales en el análisis, donde al menos un grupo es un grupo de control en el que el vehículo de administración se administra sin el modulador potencial.

[0094] En un modo de realización, la invención presenta un método para elegir un agente terapéutico potencial para usarlo en el tratamiento de un trastorno relacionado con PDE1B o un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1, que consiste en:

- (a) administrar un agente terapéutico potencial a un animal;
- (b) medir la respuesta de dicho animal a dicho agente terapéutico potencial;
- (c) comparar la respuesta de dicho animal con la de un animal de control al que no se le ha administrado el agente terapéutico potencial; y
- 40 (d) elegir un agente terapéutico potencial basándose en la diferencia en las respuestas observadas entre dicho animal y dicho animal de control.

Un método para elegir un agente terapéutico potencial para usarlo en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, trastorno por déficit de atención (TDA), trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), enfermedad neurodegenerativa, síndrome de Tourette, tic nervioso, síndrome de Lesch-Nyhan, dolor, distonías, abuso de drogas o sustancias, esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo, depresión, trastorno afectivo, trastorno bipolar, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno de la conducta alimentaria, vómito, trastorno de pánico, trastorno de ansiedad, migraña, mioclonos, síndrome premenstrual (SPM), trastorno por estrés posttraumático, síndrome carcinoide, enfermedad de Alzheimer, derrame cerebral, epilepsia, trastorno del ritmo circadiano o del sueño (p. ej. insomnio), disfunción sexual, trastorno por estrés, hipertensión y cáncer, que consiste en:

- (a) determinar un primer nivel de actividad de PDE1B y de fosforilación de Thr34 de DARPP-32 en un animal no humano;
- (b) administrar un agente terapéutico potencial a dicho animal;
- (c) determinar un segundo nivel de actividad de PDE1B y de fosforilación de Thr34 de DARPP en dicho animal;
- (d) comparar la respuesta de dicho animal con la de un animal de control al que no se le ha administrado el agente terapéutico potencial.
- (e) elegir un agente terapéutico potencial basándose en la diferencia en las respuestas observadas y en los niveles de actividad de PDE1B y de fosforilación de Thr32 de DARPP-32 entre dicho animal y dicho animal de control.

[0095] En un modo preferido, el animal es un ratón.

[0096] Los agentes terapéuticos potenciales se seleccionan basándose en si existe una importancia estadística entre una respuesta de ensayo y una respuesta normal (es decir, del tipo silvestre o sin tratamiento previo). Se seleccionan los agentes terapéuticos potenciales que muestren un cambio significativo de forma estadística en la característica medida/determinada. En un modo preferido, la respuesta de un animal del tipo silvestre en presencia de un agente terapéutico es característicamente diferente de la respuesta de un animal de tipo silvestre al que no se le ha administrado el agente.

[0097] Otro modo adicional de la invención es un método para elegir un agente terapéutico para un posible uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con PDE1B y un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1, que consiste en administrar un posible agente terapéutico a un modelo animal para un trastorno y medir y/o determinar el efecto del supuesto agente terapéutico en cualquiera de las características fenotípicas señaladas anteriormente que se cree pueden estar relacionadas con dicho trastorno.

[0098] En otros modos, el agente se administra junto con un agonista del receptor D1. A continuación, se determina la cantidad (y/o índice) de modulación de la actividad de PDE1B. Puesto que la administración de p. ej., un agonista del receptor D1, en ausencia del agente, debería tener como resultado un aumento en la actividad del receptor AMP GluR1, DARPP-32 y PDE1B, un agente se identifica como capaz de modular la actividad de PDE1B cuando la cantidad (y/o índice) de activación aumenta o disminuye de forma significativa en presencia del agente en relación con la ausencia del agente.

[0099] En otros modos, el agente se administra junto con un antagonista del receptor D1. A continuación, se determina la cantidad (y/o índice) de modulación de la actividad de PDE1B. Puesto que la administración de un antagonista del receptor D1 en ausencia del agente debería tener como resultado una disminución en la actividad del receptor AMP GluR1, DARPP-32 y PDE1B, un agente se identifica como capaz de modular la actividad de PDE1B cuando la cantidad (y/o índice) de activación aumenta o disminuye de forma significativa en presencia del agente en relación con la ausencia del agente.

[0100] En determinados modos, las bibliotecas combinatorias de compuestos químicos, basadas en diferentes esqueletos estructurales (p.ej., purinas), así como compuestos no relacionados que se dan de forma natural, pueden analizarse como candidatos farmacológicos. En un modo preferido de este tipo, el análisis se lleva a cabo usando tecnología de alto rendimiento con tecnología robótica automatizada como aquí se revela. Los resultados positivos (“aciertos”) representan tanto la actividad aumentada como reducida de PDE1B, comparada con las reacciones de control (en las que el candidato farmacológico no se incluye en el análisis).

[0101] Una vez se ha elegido el candidato farmacológico, pueden analizarse las variantes estructurales del candidato farmacológico. Estos compuestos pueden también examinarse y modificarse con parámetros como la permeabilidad de la membrana, especificidad de los efectos y toxicidad. Los compuestos elegidos (p. ej., los más potentes) de esta detección secundaria pueden evaluarse *in situ* y en modelos animales (véase la sección 5.5) con el fin de determinar si los compuestos elegidos cambian la actividad de PDE1B y/o inducen alteraciones de comportamiento predichas sin efectos secundarios o mínimos. Dichas anormalidades de comportamiento pueden incluir, pero sin carácter limitativo, analizar la actividad locomotora o el aprendizaje y la memoria, como aquí se revela (véase también, p. ej., Kosten *et al.*, *J. Pharmacol., Exp. Ther.* 269:137-144 (1994); las solicitudes de patente estadounidenses nº 09/419,379, por Bibb *et al.*, titulada “Methods of Identifying Agents That Regulate Phosphorylation/Dephosphorylation in Dopamine Signaling”, presentada el 15 de octubre, 1999, y 09/687,959, por Bibb *et al.*, titulada “Methods of Identifying Agents That Regulate Phosphorylation/Dephosphorylation in Dopamine Signaling”, presentada el 13 de octubre, 2000); y/o la autoadministración de fármacos seleccionados o en inhibición prepulso (véase, p. ej., la patente estadounidense nº 5.777.195 publicada el 7 de julio, 1998). En modos de realización específicos, pueden usarse métodos para analizar la eficacia antidepressiva comúnmente conocidos en la técnica, p. ej., una prueba de suspensión de la cola del roedor.

[0102] Ensayos con humanos en estudios clínicos pueden seguir entonces a estas pruebas. De forma alternativa, en determinados modos de realización, los ensayos con humanos en estudios clínicos pueden llevarse a cabo sin la prueba animal. Los compuestos que afectan a las dianas que no sean PDE1B pueden detectarse de forma similar, usando dianas alternativas ejemplificadas a continuación.

[0103] De forma alternativa, los moduladores (p. ej., activadores o inhibidores) de la actividad de PDE1B puede obtenerse mediante detección, p. ej., una biblioteca de péptidos al azar producidos mediante bacteriófago recombinante (véase, p. ej., Scott y Smith, *Science* 249:386-390 (1990); Cwirla *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382 (1990); Devlin *et al.*, *Science* 249:404-406 (1990)) o una biblioteca química. Usando el “método fago” pueden crearse bibliotecas muy grandes (106-108

entidades químicas). Un segundo enfoque puede ser usar métodos químicos, de entre los cuales son ejemplos el método de Geysen (Geysen *et al.*, *Molecular Immunology* 23:709-715 (1986); Geysen *et al. J. Immunologic Method* 102:259-274 (1987)) y el método de Fodor *et al.* (*Science* 251:767-773 (1991)). Furka *et al.* (*14th international Congress of Biochemistry*, Volume 5, Abstract FR: 013 (1988); Furka, *Int. J. Peptide Protein Res.* 37:487-493 (1991)), Houghton (patente estadounidense nº 4.631.211, publicada en diciembre 1986) y Rutter *et al.* (patente estadounidense nº 5.010.175, publicada el 23 de abril, 1991) revelan métodos para producir una mezcla de péptidos. Dichos péptidos pueden probarse como moduladores potenciales de la actividad de PDE1B.

[0104] En otro modo, pueden usarse bibliotecas sintéticas (Needels *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10700-4 (1993); Ohlmeyer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10922-10926 (1993); Lam *et al.*, publicación de patente internacional nº WO 92/00252; Kocis *et al.*, publicación de patente internacional nº WO 94/28028) y similares para detectar moduladores de la activación de PDE1B, de acuerdo con la presente invención. Una vez se ha identificado un modulador potencial, pueden elegirse análogos químicos ya sea de una biblioteca de químicos que están disponibles de forma comercial (p. ej., de Chembridge Corporation, San Diego, CA o Evotec OAI, Abingdon, RU) o sintetizados de forma alternativa *de novo*. El agente prospectivo (fármaco) puede colocarse en cualquier análisis convencional para probar su efecto en la actividad de la activación de PDE1B. A continuación, se elige un fármaco que module la actividad de la activación de PDE1B.

[0105] La presente invención también contempla la detección de pequeñas moléculas, análogas de estas, así como la detección de moduladores naturales de PDE1B, tal como esas moléculas a las que se unen, p. ej., a receptores D1 o PDE1B *in vivo* y los inhiben o activan. De forma alternativa, las bibliotecas de productos naturales pueden detectarse usando análisis de la invención para moléculas que modulan, la actividad de, p. ej., receptores D1 o PDE1B.

[0106] En un ensayo concreto, la diana, p. ej., PDE1B, puede fijarse a un soporte sólido. Los métodos para colocar dichas dianas en el soporte sólido son bien conocidos en la técnica e incluyen procesos como unir biotina a la diana y unir avidina al soporte sólido. El soporte sólido puede lavarse para eliminar las especies que no han reaccionado. Una solución de un modulador potencial marcado (p. ej., un inhibidor) puede ponerse en contacto con el soporte sólido. El soporte sólido se lava de nuevo para eliminar el modulador potencial que no se ha unido al soporte. Puede determinarse la cantidad de modulador potencial marcado que queda con el soporte sólido y, por tanto, unido a la diana. De forma alternativa, o de forma adicional, puede determinarse la constante de disociación entre el modulador potencial marcado y la diana, por ejemplo. Los marcajes adecuados tanto para la diana como para el modulador potencial se revelan aquí.

[0107] En otro modo de la presente invención, puede analizarse un modulador potencial por su capacidad para modular la fosforilación de Thr34 de DARPP-32 mediante PKA o su desfosforilación mediante PP2B y, de forma opcional, la fosforilación de Ser845 del receptor AMPA GluR1 mediante PKA o la desfosforilación de Ser845 del receptor AMPA GluR1, ya sea de forma independiente o posterior a un análisis de unión como aquí se revela. En dicho modo, se determina la cantidad y/o índice de fosforilación o desfosforilación de Thr34 de DARPP-32 o un fragmento de este que comprende el residuo de Thr34. En otro modo, se determina la cantidad y/o índice de fosforilación o desfosforilación de Ser845 del receptor AMPA GluR1 o un fragmento de este que comprende el

residuo de Ser845. Dichos análisis son conocidos en la técnica. En determinados modos, se usan los métodos revelados en las solicitudes de patente estadounidenses nº 09/419,379, por Bibb *et al.*, titulada “Methods of Identifying Agents That Regulate Phosphorylation/Dephosphorylation in Dopamine Signaling”, presentada el 15 de octubre, 1999, y 09/687,959, por Bibb *et al.*, titulada “Methods of Identifying Agents That Regulate Phosphorylation/Dephosphorylation in Dopamine Signaling”, presentada el 13 de octubre, 2000 o por Yan *et al.* (1999, *Nature Neurosci.* 3:13-17). En otro modo, pueden usarse los métodos de Yan *et al.* (1999, *Nature Neurosci.* 3:13-17) para analizar la actividad del receptor AMPA. Por lo tanto, de acuerdo con los métodos de la invención, a continuación, se elige un modulador de la actividad de PDE1B que modula la actividad de una molécula de señalización intracelular.

[0108] En otro modo, puede añadirse un modulador potencial a un corte de tejido de núcleo estriado (como se revela en la sección 6). Las muestras de tejido pueden tratarse con varias concentraciones de un modulador potencial y, a continuación, la muestra puede analizarse para la actividad de PDE1B. Los moduladores potenciales de la actividad de PDE1B pueden analizarse, por ejemplo, en neuronas intactas *in situ* mediante el tratamiento de cortes del núcleo estriado preparados intensamente incubadas en una solución amortiguadora de bicarbonato de Krebs que contiene el reactivo. Los efectos de estos compuestos pueden analizarse definiendo de forma empírica la concentración óptima y el tiempo de incubación. En un modo específico, los homogenados de un tejido del núcleo estriado están sujetos a un análisis inmunoblot.

5.2.1 ENSAYOS ENZIMÁTICOS PARA FOSFODIESTERASAS

[0109] De acuerdo con los métodos de la invención, los inhibidores y activadores de PDE1B pueden detectarse y aislarse usando métodos conocidos comúnmente en la técnica y/o identificarse mediante un análisis directo de la enzima aislada. Dichos análisis son ya conocidos por los expertos en la técnica.

[0110] Por ejemplo, en un modo, pueden usarse los métodos de Thompson *et al.* (1971, Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from rat brain. *Biochemistry* 10: 311-316) para analizar la actividad de PDE. En otro aspecto, puede usarse tanto cAMP o cGMP como un sustrato en el análisis. En determinados modos, el tejido se homogeneiza primero en una solución amortiguadora que contiene una mezcla de inhibidores de proteasa, p. ej., como los descritos por Swinnen *et al.*, (1989, *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:8197-8201).

[0111] PDE1B puede inmunoprecipitarse a partir de un homogenado cerebral usando los métodos convencionales, usando, p. ej., un anticuerpo comercial, p. ej., el anticuerpo purificado por afinidad de fosfodiesterasa 1B1 dependiente de Ratón anti Calmodulina AB-1655 (Chemicon).

[0112] En otro modo, PDE1B puede aislarse de cerebro bovino usando una cromatografía de intercambio iónico y una cromatografía de inmunoafinidad sobre Calmodulina-Sepharose ((Sharma, R. K., T. H. Wang, *et al.* (1980). “Purification and properties of bovine brain calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase”. *J Biol Chem* 255(12): 5916-23).

[0113] En otro modo, puede usarse una copia de ADNc clonado de un ARNm de CaM-PDE para expresar la enzima marcada con epítipo en baculovirus y esta enzima puede purificarse por afinidad de extractos de células de insectos. Sonnenburg *et al.* describieron este procedimiento para la enzima

PDE1A (Sonnenburg, W. K., D. Seger, *et al.* (1995). "Identification of inhibitory and calmodulin-binding domains of the PDE1A1 and PDE1A2 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases". *J Biol Chem* 270 (52): 30989-1000) y puede adaptarse fácilmente para PDE1B.

[0114] Las fosfodiesterasas de mamíferos también pueden expresarse en levadura deficiente en PDE (Engels, P., M. Sullivan, *et al.* (1995). "Molecular cloning and functional expression in yeast of a human cAMP-specific phosphodiesterase subtype (PDE IV-C)". *FEBS Lett* 358(3): 305-10; Atienza, J. M. and J. Colicelli (1998). "Yeast model system for study of mammalian phosphodiesterases". *Methods* 14(1): 35-42). La expresión de CaM-PDE en levadura recombinante también puede llevarse a cabo de acuerdo con los métodos descritos por Loughney *et al.* (1996, "Isolation and characterization of cDNAs corresponding to two human calcium, calmodulin-regulated, 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases". *J Biol Chem* 271(2): 796-806).

[0115] La sobreexpresión de un CaM-PDE puede llevarse a cabo de acuerdo con los métodos comúnmente conocidos en la técnica. En un modo, la sobreexpresión de un CaM-PDE se lleva a cabo en células de mamífero transfectadas usando vectores como pcDNA3. En un aspecto de este modo, la sobreexpresión de CaM-PDE proporciona un medio para estudiar la inhibición de la enzima clonada, comparando las células transfectadas y no transfectadas. (Yan, C., A. Z. Zhao, *et al.* (1996). "The calmodulin-dependent phosphodiesterase gene PDE1C encodes several functionally different splice variants in a tissue-specific manner". *J Biol Chem* 271(41): 25699-706).

[0116] La actividad de CaM-PDE puede analizarse de acuerdo con métodos comúnmente conocidos en la técnica. La segmentación de fosfodiesterasa de cAMP o cGMP marcada de forma radiactiva puede usarse para detectar inhibidores de fosfodiesterasa. En un modo, el análisis de la actividad de fosfodiesterasa depende de la recuperación de adenosina marcada siguiendo un análisis bioquímico de dos pasos. En un primer paso, fosfodiesterasa hidroliza [³H]AMP cíclico a [³H]5'-AMP. En un segundo paso, se añade veneno de serpiente 5'-nucleotidasa para convertir el [³N]5'-AMP en [³H]adenosina. La adenosina marcada se separa de [³H]AMP cíclico mediante cromatografía de intercambio de aniones o de inmunoafinidad y, a continuación, se detecta mediante contador de centelleo líquido. Dicho análisis ha sido descrito para fosfodiesterasa PDE4 específica de cAMP por Hansen y Beavo (1982, "Purification of two calcium/calmodulin-dependent forms of cyclic nucleotide phosphodiesterase by using conformation-specific monoclonal antibody chromatography". *Proc Natl Acad Sci USA* 79(9): 2788-92) y modificado para un alto rendimiento por Daniels y Alvarez (1996, "A semiautomated method for the assay of cyclic adenosine 5'-monophosphate phosphodiesterase". *Anal Biochem* 236(2): 367-9).

[0117] Estos análisis pueden modificarse, de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica, para detectar inhibidores de la enzima PDE1B dependiente de calcio/calmodulina. Por ejemplo, en un modo, se añade al análisis CaCl₂ (0,2 mM) y calmodulina (4 µg/ml). La actividad de PDE1B en mezclas semipurificadas puede detectarse comparando la actividad de fosfodiesterasa en presencia de calcio y calmodulina con la actividad medida en presencia de 1 mM EGTA.

[0118] En otro modo, puede usarse un método de alto rendimiento para llevar a cabo el análisis de CaM-PDE, por ejemplo, usando los métodos de Daniels y Alvarez ((1996, "A semiautomated method for the assay of cyclic adenosine 5'-monophosphate phosphodiesterase". *Anal Biochem* 236(2): 367-9). Dicho análisis también puede modificarse, en determinados modos, con un procedimiento de un

paso. En el procedimiento de un paso, se omite la conversión de ^3H -AMP a adenosina usando fosfodiesterasa de veneno de serpiente. En su lugar, se separa ^3H -AMP de [^3H]AMP cíclico mediante cromatografía de inmunoafinidad usando resina de boronato o aluminio en pH alcalino (Smith, B. J., M. R. Wales, *et al.* (1993). "A phosphodiesterase assay using alumina microcolumns". *Anal Biochem* 214(1): 355-7; Duplantier, A. J., C. J. Andresen, *et al.* (1998).

[0119] "7-Oxo-4,5,6,7-tetrahydro-1H-pyrazolo[3,4-c]pyridines as novel inhibitors of human eosinophil phosphodiesteras.". *J Med Chem* 41(13): 2268-77; Burnouf, C., E. Auclair, *et al.* (2000). "Synthesis, structure-activity relationships, and pharmacological profile of 9-amino-4-oxo-1-phenyl-3,4,6,7-tetrahydro[1,4]diazepino[6, 7,1-hi]indoles: discovery of potent, selective phosphodiesterase type 4 inhibitors". *J Med Chem* 43(25): 4850-67.).

5.2.2. ENSAYOS ENZIMÁTICOS PARA QUINASAS Y FOSFATASAS

[0120] Las actividades de quinasa pueden controlarse mediante una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica, p. ej., métodos revelados en Parker, Law, *et al.*, 2000, "Development of high throughput screening assays using fluorescence polarization: nuclear receptor-ligand-binding and kinase/phosphatase assays", *J. Biomolec. Screening* 5(2): 77-88; Bader *et al.* (2001, *Journal of Biomolecular Screening* 6(4): 255-64); Liu, F., X. H. Ma, *et al.* (2001). "Regulation of cyclin-dependent kinase 5 and casein kinase 1 by metabotropic glutamate receptors". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(20): 11062-8; Evans, D. B., K. B. Rank, *et al.* (2002). "A scintillation proximity assay for studying inhibitors of human tau protein kinase II/Cdk5 using a 96-well format". *Journal of Biochemical & Biophysical Methods* 50(2-3): 151-61.

[0121] Usando dichos métodos, las muestras que contienen quinasa de interés están expuestas bajo las condiciones adecuadas a ATP radioactiva y a un sustrato de péptidos sintético de la composición adecuada con el fin de proporcionar un sitio para la fosforilación. A continuación, se mide el fosfato radioactivo recientemente asociado al péptido. La adición de una fracción química, tal como biotina unida de forma covalente al péptido del sustrato, permite la unión del péptido del sustrato mediante una microesfera revestida de estreptavidina. El péptido unido a la microesfera puede aislarse y se puede medir la radioactividad asociada, o, preferiblemente, puede medirse directamente la radioactividad asociada al péptido del sustrato usando una microesfera adecuada para análisis de proximidad por centelleo.

[0122] Las actividades de fosfatasa de proteína pueden controlarse mediante una variedad de métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica, p. ej., los métodos revelados en Cohen *et al.* (1988, "Protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A from rabbit skeletal muscle", *Methods Enzymol* 159:390-408) o Stewart y Cohen (1988, Protein phosphatase-2B from rabbit skeletal muscle: a Ca^{2+} -dependent, calmodulin-stimulated enzyme, *Methods Enzymol* 159:409-16).

[0123] Los moduladores de PDE1B pueden también identificarse mediante la detección para moduladores de la fosforilación de DARPP-32, es decir, fosforilación de Ser137 de DARPP-32 (CK1), fosforilación de Thr75 de DARPP-32 (Cdk5) o fosforilación de Thr34 de DARPP-32 (PKA, PP2B, PP1). Dichos métodos se revelan en las solicitudes de patente estadounidense n° 09/419.379, por Bibb *et al.*, titulada "Methods of Identifying Agents That Regulate Phosphorylation/Dephosphorylation in Dopamine Signaling", presentada el 15 de octubre, 1999, y 09/687,959, por Bibb *et al.*, titulada

"Methods of Identifying Agents That Regulate Phosphorylation/Dephosphorylation in Dopamine Signaling", presentada el 13 octubre, 2000; y en la patente estadounidense nº 5.777.195, por Fienberg *et al.*, publicada el 7 de julio, 1998.

5 5.2.3. OTROS ANÁLISIS DE FOSFORILACIÓN

[0124] La fosforilación de un sustrato de péptidos puede también detectarse mediante unión directa de anticuerpos fosfoespecíficos o midiendo el desplazamiento de un anticuerpo fosfoespecífico de un fosfopéptido competidor (véase, p. ej., Parker, Law *et al.*, 2000, "Development of high throughput screening assays using fluorescence polarization: nuclear receptor-ligandbinding and
10 kinase/phosphatase assays", *J. Biomolec. Screening* 5(2): 77-88). Los métodos de fluorescencia como transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) o la polarización de fluorescencia (FP) pueden usarse para detectar los complejos de anticuerpos de fosfopéptidos específicos. Estos métodos tienen la ventaja de que emplean la detección "homogénea" que no depende del aislamiento de las especies unidas, sino que depende de los cambios en la fluorescencia
15 que se dan debido a la unión específica en solución.

[0125] Los métodos para producir anticuerpos fosfoespecíficos son ya conocidos en la técnica. En un modo de realización, los métodos revelados en las solicitudes de patente estadounidenses nº 09/419.379, por Bibb *et al.*, titulada "Methods of Identifying Agents That Regulate Phosphorylation/Dephosphorylation in Dopamine Signaling", presentada el 15 de octubre, 1999, y
20 09/687.959, por Bibb *et al.*, titulada "Methods of Identifying Agents That Regulate Phosphorylation/Dephosphorylation in Dopamine Signaling," presentada el 13 de octubre, 2000, se usan para producir anticuerpos con un estado de fosforilación específico que tiene la especificidad para, p. ej., Thr34 de DARPP-32 fosforilado.

[0126] Los anticuerpos con un estado de fosforilación específico contra fosfoserina, fosfotreonina o
25 fosfotirosina están disponibles comercialmente. Estos anticuerpos son útiles para determinar si las proteínas se fosforilan en general y en qué residuo. Dichos anticuerpos están disponibles a partir de fuentes comerciales (véase, p. ej., Smith, *The Scientist* 15[4]:24, feb. 19, 2001 para la lista de fuentes comerciales, incluyendo Santa Cruz Biotechnology Inc., Sigma RBI, Stratagene, Upstate Biotechnology y Zymed).

[0127] La transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, o FRET, se usa en gran medida
30 para análisis homogéneos capaces de detectar la unión específica de las macromoléculas. FRET depende de la capacidad de las moléculas fluorescentes excitadas "donantes" (fluoróforos) para transferir su energía a los fluoróforos "aceptantes" cercanos en lugar de emitir luz. Por lo tanto, cuando se juntan los dos fluoróforos en el espacio para unirlos a una diana del sustrato, la
35 fluorescencia emitida en la longitud de onda donante normal se reduce y la fluorescencia emitida por el fluoróforo aceptante aumenta. Puede usarse tanto la disminución en la fluorescencia donante como el aumento en la fluorescencia aceptante para medir el evento de unión.

[0128] En un modo, los métodos revelados en Bader *et al.* (2001, "A cGMP-dependent protein kinase
40 assay for high throughput screening based on time-resolved fluorescence resonance energy transfer", *Journal of Biomolecular Screening* 6(4): 255-64) se usan para determinar la actividad de, p. ej., una fosfodiesterasa, quinasa o proteína fosfatasa. Bader *et al.* revela un análisis de proteína quinasa

dependiente de cGMP para una detección de alto rendimiento basada en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) resuelta en el tiempo, que, como entenderá un experto en la técnica, puede adaptarse para análisis de una fosfodiesterasa o proteína fosfatasa. Las muestras que contienen la quinasa de interés se exponen a ATP y a un sustrato de péptidos sintético con un lugar de fosforilación específico de quinasa y una fracción de biotina amino-terminal. Se detecta el péptido fosforilado usando estreptavidina marcada con alofococianina, un anticuerpo fosfopéptido específico y un anticuerpo secundario marcado con europio-quelante. La unión simultánea de la estreptavidina y el anticuerpo fosfoespecífico a una molécula de sustrato fosforilado hace que el “donante” europio quelante en el anticuerpo secundario esté lo suficientemente cerca al aceptante fluoróforo alofococianina para que tenga lugar la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia medible como una disminución en la emisión de europio en 615 nm y un aumento en la emisión de alofococianina en 665 nm de la longitud de onda. El par donante-aceptante europio-alofococianina se usa normalmente con el fin de sacar provecho de la larga duración de fluorescencia de europio excitado, por tanto, la señal está “resuelta en el tiempo”.

[0129] Se pueden usar otros pares de fluoróforos, tal como isotiocianato de fluoresceína y cumarina. Los pares de dichas moléculas que pueden emplearse en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) se denominan pares FRET. Para que tenga lugar la transferencia de energía, las moléculas del donante y aceptante normalmente deben estar cerca (hasta 70 a 100 Å (Clegg, 1992, *Methods Enzymol.* 211:353-388; Selvin, 1995, *Methods Enzymol.* 246: 300-334). La eficacia de la transferencia de energía cae rápidamente con la distancia entre las moléculas del donante y el aceptante. Las moléculas que se usan normalmente en FRET incluyen fluoresceína, 5-carboxifluoresceína (FAM), 2'7'-dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), rodamina, 6-carboxirrodamina (R6G), N,N,N',N'-tetrametilo-6-carboxirrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 4-(4'dimetilaminofenilazo), ácido benzoico (DABCYL) y 5-(2'aminoetil)aminonaftaleno-1-ácido sulfónico (EDANS). Si un fluoróforo es un donante o un aceptante se define mediante sus espectros de emisión y excitación y el fluoróforo con el que forma el par. Por ejemplo, FAM se excita de forma más eficaz mediante luz con una longitud de onda de 488 nm y emite luz con un espectro de 500 a 650 nm y una emisión máxima de 525 nm. FAM es un fluoróforo donante adecuado para usarse con JOE, TAMRA y ROX (los cuales tienen su excitación máxima en 514 nm).

[0130] Las medidas de polarización de fluorescencia también pueden usarse para medir la actividad de una fosfodiesterasa, proteína quinasa o una fosfatasa (véase, p. ej., Parker, Law *et al.*, 2000, “Development of high throughput screening assays using fluorescence polarization: nuclear receptor-ligand-binding and kinase/phosphatase assays”, *J. Biomolec. Screening* 5(2): 77-88; Turek *et al.*, 2001, *Anal. Biochem.* 299: 45-53). Unir un gran anticuerpo específico a un pequeño fosfopéptido fluorescente ralentiza su índice de caída y aumenta la señal de polarización de fluorescencia. Por lo tanto, la polarización de fluorescencia es proporcional a la cantidad de fosfopéptido fluorescente unido. Este análisis puede usarse en un modo competitivo, en el que se añade a la muestra biológica, una concentración fija de péptido fluorescente y un anticuerpo y la presencia de un fosfopéptido o fosfoproteína no fluorescente se registra como una disminución en la señal. También puede usarse en un modo de unión directa, en el que la adición (mediante, p. ej., una quinasa) o la eliminación (mediante, p. ej., una fosfatasa) de fosfato modula la unión del anticuerpo y, por tanto, la señal de

polarización. En un modo específico, se lleva a cabo un análisis de polarización de fluorescencia usando los métodos de Turek *et al.* (2001, *Anal. Biochem.* 299: 45-53), en el que se usa un anticuerpo específico del péptido antifosforilado (p. ej., antifosfo-serina) específico del producto.

5 **[0131]** En otro modo, se usa un análisis basado en células para la fosforilación. En un modo específico, la transducción de señal basada en la fosforilación de proteína se visualiza *in vivo*, p. ej., en células vivas individuales usando indicadores fluorescentes, usando métodos como los revelados en Sato *et al.* (2002, "Fluorescent indicators for imaging protein phosphorylation in single living cells", *Nature Biotechnology* 20(3): 287-94). Dichos sensores constan de dos moléculas de proteína fluorescentes, separados por un enlace flexible. El péptido de enlace comprende un lugar de
10 fosforilación y un elemento de reconocimiento de fosfoproteína. La fosforilación del enlace provoca un cambio conformacional que hace que las dos proteínas fluorescentes estén más juntas, lo que permite que tenga lugar FRET y cambia el resultado fluorescente del sistema.

5.3. AGENTES QUE MODULAN LA ACTIVIDAD DE PDE1B

15 **[0132]** La presente invención también muestra las composiciones para modular la actividad de PDE1B que incluyen, sin carácter limitativo, los siguientes agentes, fármacos, compuestos o pequeñas moléculas reveladas a continuación. La invención también muestra composiciones para modular la actividad de DARPP-32 o el receptor AMPA GluR1 mediante la modulación de la actividad de PDE1B, incluyendo, sin carácter limitativo, los siguientes agentes, fármacos, compuestos o
20 pequeñas moléculas reveladas a continuación. La invención también muestra composiciones para usarse en métodos de tratamiento de un trastorno, incluyendo, sin carácter limitativo, un trastorno relacionado con PDE1B y un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1, donde las composiciones modulan la actividad de PDE1B, incluyendo, sin carácter limitativo, los siguientes agentes, fármacos, compuestos o pequeñas moléculas reveladas a continuación.

25 **[0133]** Como se revela anteriormente, sin intención de limitarse a ninguna teoría en concreto, en un aspecto de la invención, los receptores de dopamina D1 median la fosforilación de DARPP-32 a través de las vías de señalización intracelular del receptor de dopamina D1. Por consiguiente, la activación del receptor de dopamina D1 lleva a la activación de adenilil ciclasa (y cAMP aumentado). cAMP activa la proteína quinasa A (PKA; proteína quinasa dependiente del cAMP) que fosforila
30 elementos posteriores en la vía de transducción de señal, como DARPP-32 y CREB. Estas vías de señalización se infrarregulan o antagonizan con fosfodiesterasas (PDE), que incluyen, pero sin carácter limitativo, PDE1B, que hidroliza cAMP a sus 5'-monofosfatos.

[0134] En otro modo de la invención, PDE1B regulado por calcio es una interfaz para regular la actividad entre una vía de señalización intracelular regulada por dopamina y otra vía de señalización
35 intracelular, incluyendo, sin carácter limitativo, una vía de señalización intracelular de receptor de dopamina D1, receptor de dopamina D2, óxido nítrico, norepinefrina, neurotensina, CCK, VIP, serotonina, glutamato (p. ej., receptor NMDA, receptor AMPA), GABA, acetilcolina, adenosina (p. ej., receptor A2A), receptor cannabinoide, péptido natriurético (p. ej., ANP, BNP, CNP) o endorfina.

[0135] Por lo tanto, cualquier compuesto identificado de acuerdo con los métodos de la invención
40 que afecte a las interacciones descritas anteriormente en una vía de señalización intracelular de dopamina D1 también puede utilizarse como base de un tratamiento terapéutico para un trastorno

relacionado con PDE1B o un trastorno de la vía de señalización intracelular de dopamina D1 y, por lo tanto, todas las proteínas que participan en dichas interacciones pueden también usarse en análisis como los que aquí se describen.

[0136] Un experto entenderá que una vez que se ha identificado como capaz de modular la actividad de PDE1B en los métodos de la presente invención, el compuesto puede usarse de forma terapéutica para modular la actividad de PDE1B en células, p. ej., neuronas, con el fin de tratar problemas en los que pueda estar involucrada la actividad de PDE1B. Dichos problemas incluyen, sin carácter limitativo, una vía de señalización intracelular de dopamina D1.

[0137] La presente invención muestra además métodos para llevar a cabo el diseño farmacológico racional para desarrollar fármacos que puedan modular la actividad de PDE1B y, por lo tanto, mejoren un trastorno, incluyendo, sin carácter limitativo un trastorno relacionado con PDE1B y un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1. Tal diseño farmacológico racional puede llevarse a cabo usando compuestos que hayan sido identificados como inhibidores (o activadores) de PDE1 como punto inicial. Por lo tanto, la presente invención muestra detecciones y análisis que permite que se identifiquen inhibidores (o activadores) más específicos. Dichos métodos de diseño farmacológico racional son ya conocidos en la técnica. En un modo de realización específico, los métodos de diseño farmacológico racional revelados en las solicitudes de patente estadounidense nº 09/419.379, por Bibb *et al.*, titulada "Methods of Identifying Agents That Regulate Phosphorylation/Dephosphorylation in Dopamine Signaling", presentada el 15 de octubre, 1999, y 09/687.959, por Bibb *et al.*, titulada "Methods of Identifying Agents That Regulate Phosphorylation/Dephosphorylation in Dopamine Signaling", presentada el 13 de octubre, 2000.

[0138] De hecho, los moduladores potenciales pueden examinarse a través del uso del modelado por ordenador usando un programa de acoplamiento como GRAM, DOCK o AUTODOCK (Dunbrack *et al.*, *Folding & Design* 2:27-42 (1997)), con el fin de identificar moduladores potenciales de PDE1B. Estos moduladores pueden probarse a continuación para conocer su efecto en la actividad de PDE1B. Este procedimiento puede incluir acople por ordenador de moduladores potenciales al complejo de PDE1B para conocer cómo se unirá la forma y la estructura química del modulador potencial a PDE1B (véase, p. ej., Bugg *et al.*, 1993, *Scientific American* (dic.) 269(6):92-98; West *et al.*, *TIPS*, 16:67-74 (1995)). Los programas por ordenador también pueden utilizarse para estimar la atracción, repulsión e impedimento estérico de las subunidades con un modulador/inhibidor. Generalmente cuanto más ajustado sea el acople, menores serán los impedimentos estéricos y cuanto mayores sean las fuerzas de atracción, más potente será el modulador potencial puesto que estas propiedades son consistentes con una constante de unión más justa. Además, cuanto más específico sea el diseño de un fármaco potencial, será más probable que el fármaco no interactúe también con otras proteínas. Esto minimizará los posibles efectos secundarios debido a las interacciones no deseadas con otras proteínas.

[0139] Inicialmente, los compuestos que se sabe que se unen a PDE1B pueden modificarse de forma sistemática mediante programas de modelado por ordenador hasta que se identifique uno o más análogos posiblemente potenciales. Además, la modificación sistemática de análogos seleccionados puede, entonces, modificarse de forma sistemática mediante programas de modelado por ordenador hasta que se identifique uno o más análogos potenciales. Dichos análisis son

conocidos para aquellos expertos en la técnica y se ha mostrado que son eficaces en el desarrollo de, p. ej., inhibidores de la proteasa del VIH (véase, p. ej., Lam *et al.*, *Science* 263:380-384 (1994); Wlodawer *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.* 62:543-585 (1993); Appelt, *Perspectives in Drug Discovery and Design* 1:23-48 (1993); Erickson, *Perspectives in Drug Discovery and Design* 1:109-128 (1993)).

5 **[0140]** Puede marcarse cualquiera de los agentes potenciales o dianas para los agentes potenciales (p. ej., PDE1B o DARPP-32). Los marcajes adecuados incluyen enzimas (p. ej., fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano), fluoróforos (p. ej., isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrin (PE), Texas Red (TR), rodamina, sales de series de lantánidos quelados o libres, especialmente Eu³⁺, por nombrar algunos fluoróforos), cromóforos, radioisótopos, agentes quelantes, colorantes, oro coloidal,
10 partículas de látex, ligandos (p. ej., biotina), agentes quimioluminescentes, microesferas magénticas o marcaje de imágenes por resonancia magnética. Cuando se emplea un marcador de control, se pueden usar los mismos marcajes o diferentes para el receptor y el marcador de control.

[0141] En modos de realización en los que se usa un marcaje radioactivo, como los isótopos ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I y ¹⁸⁶Re, pueden utilizarse procedimientos de recuento
15 estándar conocidos en la técnica.

[0142] En modos de realización en los que el marcaje es una enzima, la detección puede conseguirse mediante cualquier técnica colorimétrica, espectrofotométrica, fluoroespectrofotométrica, amperométrica o gasométrica usada actualmente y conocida en la técnica.

[0143] Un marcaje directo es un ejemplo de un marcaje que puede usarse de acuerdo con los
20 métodos de la presente invención. Un marcaje directo es una entidad que, en su estado natural, es visible fácilmente, ya sea a simple vista (por ejemplo, mediante inspección visual a través de un microscopio estereoscópico o compuesto) o con la ayuda de un filtro óptico y/o estimulación aplicada, p. ej., luz UV con el fin de promover la fluorescencia. Ejemplos de marcajes coloreados que pueden usarse de acuerdo con los métodos de la presente invención incluyen partículas de soluciones
25 metálicas, por ejemplo, partículas de soluciones de oro tal como las reveladas por Leuving (patente estadounidense 4.313.734); partículas de soluciones de colorantes como las reveladas por Gribnau *et al.* (patente estadounidense 4.373.932) y May *et al.* (WO 88/08534); látex teñido como revela May *et al.* (WO 88/08534), Snyder (EP-A 0280 559 y 0 281 327); o colorantes encapsulados en liposomas como revela Campbell *et al.* (patente estadounidense 4.703.017).

30 **[0144]** Otros marcajes directos incluyen un radionucleótido, una fracción luminescente o una fracción fluorescente que incluye, sin carácter limitativo, p. ej., una quimera de fusión/modificada de proteína verde fluorescente (como se revela en la patente estadounidense 5.625.048, publicada el 29 de abril, 1997, y WO 97/26333, publicada el 24 de julio, 1997).

[0145] Además de estos dispositivos de marcaje directo, los marcajes indirectos que comprenden
35 enzimas pueden usarse también de acuerdo con la presente invención. Varios tipos de inmunoanálisis enlazados a enzimas son ya conocidos en la técnica, por ejemplo, inmunoanálisis enlazado a enzimas usando fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano, lisozima, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa o ureasa. Este y otros análisis similares son ya conocidos en la técnica y se revelan, p. ej., en Engvall (1980, "Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT", en
40 *Methods in Enzymology*, 70: 419-439) y en la patente estadounidense 4.857.453.

[0146] En determinados modos, las proteínas pueden marcarse mediante marcaje metabólico. El

marcaje metabólico tiene lugar durante la incubación *in vitro* de las células que expresan la proteína en presencia de un medio de cultivo complementado con un marcaje metabólico, tal como [³⁵S]-metionina o [³²P]-ortofosfato. Además del marcaje metabólico (o biosintético) con [Cl²]-metionina, la invención también contempla el marcaje con [¹⁴C]-aminoácidos y [³H]-aminoácidos (con tritio sustituido en posiciones no lábiles) (véase, p. ej., las patentes estadounidenses n° 09/419,379, por Bibb *et al.*, titulada "Methods of Identifying Agents That Regulate Phosphorylation/Dephosphorylation in Dopamine Signaling", presentada el 15 de octubre, 1999, y 09/687.959, por Bibb *et al.*, titulada "Methods of Identifying Agents That Regulate Phosphorylation/Dephosphorylation in Dopamine Signaling", presentada el 13 de octubre, 2000).

10

5.4. DIAGNÓSTICO Y MÉTODOS TERAPÉUTICOS

[0147] Tal como aquí se revela, la invención muestra agentes, fármacos, compuestos y composiciones que modulan la actividad o expresión de PDE1B. La invención también muestra un método para tratar un trastorno, incluyendo, sin carácter limitativo, un trastorno relacionado con PDE1B y un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1, en un paciente que lo necesite, que consiste en administrar al paciente un agente que cambia la actividad de PDE1B, donde la actividad de PDE1B modula la fosforilación de DARPP-32 y/o el receptor AMPA GluR1.

[0148] La presente invención muestra métodos para tratar un trastorno, incluyendo, sin carácter limitativo, un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 o relacionado con PDE1B, en un individuo (p. ej., un paciente) o un sujeto animal administrando una cantidad efectiva de un compuesto de la invención con el fin de modular la actividad de PDE1B. En un modo, el agente promueve o aumenta la actividad de PDE1B. En otro modo, el agente inhibe o disminuye la actividad de PDE1B. En determinados modos, el agente promueve (o aumenta) o inhibe (o disminuye) la actividad de una vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 mediante la modulación de la actividad de PDE1B.

[0149] En determinados modos, la invención proporciona un método para tratar un trastorno, incluyendo sin carácter limitativo, un trastorno relacionado con PDE1B y una vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1, en un paciente que lo necesite, que consiste en administrar al paciente un agente que modula la actividad de PDE1B, donde se modula la fosforilación de DARPP-32 en Thr34, y/o la fosforilación del receptor AMPA GluR1 en Ser845. En modos concretos, el agente modula la actividad de PDE1B uniéndose a PDE1B.

[0150] En un modo, a un sujeto que necesite dicho tratamiento se le administra una cantidad de un compuesto de la presente invención suficiente para modular la actividad de PDE1B y modular la actividad de DARPP-32, la actividad del receptor AMPA GluR1 y/o la actividad de una vía de señalización intracelular incluyendo, sin carácter limitativo, una vía de señalización intracelular de un receptor de dopamina D1, un receptor de dopamina D2, óxido nítrico, norepinefrina, neurotensina, CCK, VIP, serotonina, glutamato (p. ej., receptor NMDA, receptor AMPA), GABA, acetilcolina, adenosina (p. ej., receptor A2A), receptor cannabinoide, péptido natriurético (p. ej., ANP, BNP, CNP) o endorfina.

40

[0151] La invención muestra métodos para administrar un agente (o fármaco o compuesto) de la

invención que pueda mejorar un síntoma de un trastorno, incluyendo, sin carácter limitativo, un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 o relacionado con PDE1B, en un paciente o sujeto que muestra el síntoma. En determinados modos, la invención muestra métodos para administrar un agente identificado mediante los métodos aquí revelados, que pueden mejorar un síntoma de dicho trastorno en un paciente o sujeto que muestre el síntoma.

[0152] En otro modo, la invención muestra un método para tratar un trastorno, incluyendo, sin carácter limitativo, un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 o relacionado con PDE1B, en un paciente que lo necesite, que consiste en administrar al paciente un agente que modula la actividad de PDE1B, donde se modula la fosforilación de DARPP-32 y/o del receptor AMPA GluR1. En un modo concreto, se inhibe la actividad de PDE1B.

[0153] En otro modo, la invención muestra un método para tratar un trastorno que incluye, sin carácter limitativo, un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 o relacionado con PDE1B, en un paciente que lo necesite, que consiste en administrar al paciente un agente que modula la actividad de PDE1B y modula la fosforilación de Thr34 de DARPP-32 fosforilado.

[0154] En otro modo, la invención muestra un método para tratar un trastorno caracterizado por un aumento o una disminución en la activación dependiente de la fosforilación de los receptores AMPA GluR1 que consiste en administrar una cantidad eficaz de un compuesto que modula la actividad de PDE1B.

[0155] En un modo concreto, se usa un método de la invención para tratar un trastorno, que incluye, sin carácter limitativo, un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 o relacionado con PDE1B, que está relacionado con un síntoma y/o estado de la enfermedad característico de un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 y/o relacionado con PDE1B.

[0156] En un modo concreto, la invención muestra un método para tratar la enfermedad de Parkinson en un paciente que lo necesite, que consiste en administrar al paciente un agente que inhibe la actividad de PDE1B, donde se aumenta la fosforilación de Thr34 de DARPP-32 y/o Ser845 del receptor AMPA GluR1.

[0157] Preferiblemente, el agente, compuesto o composición administrada en el método del tratamiento puede cruzar la barrera hematoencefálica en suficientes cantidades y con un índice suficiente como para permitir el tratamiento del trastorno y, por lo tanto, la enfermedad o trastorno. En dicho modo de realización, el agente se administra de forma intravenosa. En otro modo de realización, el agente se administra de forma oral. Más preferiblemente, el agente puede cruzar la barrera hematoencefálica sin un transportador (para métodos y vías de administración, véase la sección 5.6).

[0158] La invención también muestra un método para diagnosticar un trastorno incluyendo, sin carácter limitativo, un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 o relacionado con PDE1B, en un sujeto que puede que tenga dicho trastorno, método que consiste en determinar el nivel de actividad de PDE1B en una muestra de dicho sujeto, donde un mayor nivel de actividad de PDE1B en la muestra de dicho sujeto en relación a un nivel de control de actividad de PDE1B en una muestra de control de un sujeto que no tiene dicho trastorno indica que dicho sujeto

tiene dicho trastorno. En modos específicos, el sujeto es un ser humano.

[0159] En determinados modos, el nivel de actividad de PDE1B se determina midiendo la fosforilación de fosfo-Thr34 de DARPP-32 y de forma opcional fosfo-Ser845 del receptor AMPA GluR1. En otros modos, el nivel de actividad de PDE1B incluye un nivel de ARNm PDE1B y dicho nivel de ARNm PDE1B se determina mediante métodos conocidos en la técnica, p. ej., mediante hibridación *in situ*. En otros modos, el nivel de actividad de PDE1B incluye un nivel de proteína PDE1B y dicho nivel de proteína se determina mediante métodos ya conocidos en la técnica, p. ej., mediante inmunoblot.

[0160] La invención también muestra un método para detectar un trastorno, incluyendo, sin carácter limitativo, un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 o relacionado con PDE1B, *in vivo* en un sujeto que puede tener dicho trastorno, método que consiste en:

(a) administrar un agente que se une de forma específica a PDE1B, siendo dicho agente conjugado a un marcaje detectable por un método de escaneo;

(b) tras dicha administración, esperar el tiempo suficiente para que dicho agente se una de forma específica a PDE1B en dicho sujeto y para que el agente suelto despeje los niveles de referencia en dicho sujeto; y

(c) a continuación, escanear dicho sujeto con dicho método de escaneo con el fin de detectar los niveles de PDE1B en dicho sujeto.

[0161] En determinados modos, el sujeto es humano.

5.5. MODELOS ANIMALES

[0162] De acuerdo con los métodos de la presente invención, se puede usar un modelo animal para analizar los compuestos identificados mediante los métodos de detección de la presente invención, donde se analiza la utilidad funcional del compuesto usando el modelo animal. De acuerdo con los métodos de la invención, un modelo animal puede ser un animal de tipo silvestre (como modelo, p. ej., para un estado de comportamiento o fisiológico de tipo silvestre o normal). De forma alternativa, el modelo animal puede ser un modelo para una enfermedad o trastorno, incluyendo, sin carácter limitativo, un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 o relacionado con PDE1B. Dichos modelos animales pueden usarse en análisis para detectar compuestos que modulan la actividad de PDE1B o que mejoran los síntomas de una enfermedad o trastorno. Dichos animales pueden ser ratones, ratas, hámsteres, ovejas, cerdos, ganado, etc. y son preferiblemente mamíferos no humanos.

[0163] De acuerdo con la invención, los modelos animales que pueden usarse tienen, en determinados modos de realización, una regulación fisiológica cambiada del sistema nervioso de forma que el animal o los tejidos derivados de este pueden utilizarse para la detección de agentes terapéuticos potenciales y/o regímenes terapéuticos que actúan en el nivel intracelular, especialmente en el nivel de las vías de señalización intracelular, incluyendo, sin carácter limitativo, una vía de señalización intracelular de óxido nítrico, norepinefrina, neurotensina, CCK, VIP, serotonina, glutamato, GABA, acetilcolina, adenosina, péptido natriurético (p. ej., ANP, BNP, CNP) o endorfina. Los fármacos que pueden anular cualquiera de los defectos mostrados por dicho modelo animal

actúan en algún punto en la cascada de señalización intracelular y, por lo tanto, tienen un uso terapéutico potencial. De forma adicional, puesto que algunos defectos tienen lugar en el nivel de comportamiento, la afectación o cambio de estos puede tener un alto valor predictivo para el uso terapéutico en la modificación de dichos comportamientos.

5 **[0164]** De acuerdo con los métodos de la invención, por lo tanto, los modelos animales pueden usarse como herramientas de detección con el fin de dilucidar los mecanismos de los diferentes pasos de fosforilación de proteína que se dan tanto en poblaciones de pacientes enfermos como en la población común. Por lo tanto, por ejemplo, un modelo animal puede utilizarse para evaluar la respuesta a una variedad de estrategias y agentes terapéuticos potenciales que pueden, por lo tanto,
10 usarse en el tratamiento de pacientes que padecen una variedad de enfermedades y trastornos neurológicos.

[0165] Al usar modelos animales, se pueden detectar diferentes fármacos de pequeñas moléculas para posibles efectos ventajosos, incluyendo una potencia mejorada así como la minimización de los efectos secundarios. Los candidatos típicos para dicha detección pueden obtenerse de varias
15 bibliotecas farmacológicas disponibles comercialmente.

[0166] Las enfermedades neurológicas y de comportamiento específicas para las que puede utilizarse un modelo animal incluyen, sin carácter limitativo, trastornos relacionados con PDE1B y trastornos de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1, como aquí se revela. Al utilizar las diferentes respuestas características de un animal a agentes endógenos y exógenos y al
20 comparar estas respuestas a un animal tratado con un agente terapéutico potencial, puede realizarse una valoración de la utilidad del agente potencial terapéutico en un estado de la enfermedad concreto. Por ejemplo, el agente terapéutico potencial puede administrarse a un modelo animal para una enfermedad o trastorno concreto y se puede controlar su respuesta a dopamina. Por lo tanto, la comparación con la respuesta a dopamina en un ratón de tipo silvestre, normal, puede proporcionar
25 una indicación del valor del agente terapéutico potencial.

[0167] Otro modo de la invención incluye un método para seleccionar un agente terapéutico para su posible uso en el tratamiento de un trastorno que incluye, sin carácter limitativo, un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 o relacionado con PDE1B, que consiste en administrar un posible agente terapéutico a un modelo animal y medir y/o determinar el supuesto
30 efecto del agente terapéutico sobre cualquier característica fenotípica que se crea que esté relacionada con dicho trastorno.

[0168] En un modo, un posible agente terapéutico se administra a un modelo animal y se mide una respuesta de ensayo a dopamina para el modelo animal, donde la respuesta normal del modelo animal en ausencia del agente terapéutico es característicamente diferente a la de los animales de
35 tipo silvestre. Los agentes terapéuticos potenciales se eligen basándose en el hecho de que exista un significado estadístico entre la respuesta de ensayo y la respuesta normal. Se eligen los agentes terapéuticos potenciales que muestran un cambio estadísticamente significativo en la característica medida/determinada. En un modo de realización preferido, la respuesta del modelo animal en ausencia de un agente terapéutico es característicamente diferente a la de los animales de tipo
40 silvestre a los que no se les ha administrado el agente terapéutico potencial.

[0169] También otro modo de la presente invención es un método para elegir un agente terapéutico

para su posible uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson que consiste en administrar un posible agente terapéutico a un modelo animal y medir y/o determinar el supuesto efecto del agente terapéutico en cualquiera de las características fenotípicas que se cree que puedan estar relacionadas con la enfermedad de Parkinson.

5 **[0170]** Los modelos animales que pueden usarse de acuerdo con los métodos de la invención incluyen, sin carácter limitativo, los modelos animales revelados a continuación.

[0171] En un modo de realización, puede usarse un ratón *knockout* homocigoto PDE1B, como aquí se revela, en una prueba o análisis adicional con el fin de validar o confirmar que un agente candidato modula la actividad de PDE1B como aquí se revela. En un modo de realización, la invención
10 proporciona un modelo animal que es un ratón deficiente en PDE1B, p. ej., nulo o “*knockout*”, que comprende una alteración homocigótica en el gen PDE1B endógeno, donde dicha alteración impide la expresión de una proteína PDE1B funcional y donde, además, el fenotipo de dicho ratón *knockout* en relación a un ratón que tiene un gen PDE1B de tipo silvestre comprende la ausencia de actividad enzimática de PDE1B cuando se analiza por hidrólisis cGMP o cAMP. En determinados modos de
15 realización, la alteración comprende una alteración dirigida del sitio catalítico de PDE1B. En otros modos de realización, la alteración comprende una inserción en la región de codificación del gen PDE1B.

[0172] El ratón *knockout* contiene un alelo no funcional para el gen que normalmente codifica y expresa PDE1B funcional. Por lo tanto, un ratón *knockout* que contiene dos alelos no funcionales
20 para el gen que normalmente codifica y expresa PDE1B funcional no puede expresar PDE1B funcional.

[0173] Los alelos no funcionales pueden generarse de varias formas ya conocidas en la técnica, las cuales pueden usarse en la presente invención. En modos de realización preferidos, un alelo no funcional se vuelve defectuoso mediante una inserción o sustitución de ADN externo en el alelo
25 PDE1B de la región de codificación, preferiblemente la región de codificación para el dominio catalítico. En algunos modos de realización, la inserción contiene una señal para finalizar la transcripción anterior a la transcripción de una región del alelo que codifica PDE1B. En dichos modos de realización, se prefiere aún más eliminar una parte de ADN de la región de codificación para el dominio catalítico de PDE1B y reemplazarlo con la inserción anterior.

30 **[0174]** El ratón *knockout* PDE1B de la invención tiene el fenotipo que comprende una respuesta aumentada a dopamina y/o hiperactividad, como se revela en la sección 6. En otros modos de realización, la respuesta aumentada ante dopamina se evidencia mediante la fosforilación aumentada de DARPP-32 en Thr34 y/o del receptor AMPA GluR1 en Ser845.

[0175] En otros modos de realización, el fenotipo del ratón *knockout* PDE1B en relación al ratón que
35 tiene un gen PDE1B de tipo silvestre comprende además un fenotipo elegido del grupo que consiste en: exhibición del comportamiento considerablemente más exploratorio durante los primeros 30 minutos de un periodo de prueba para la actividad locomotora horizontal, exhibición de considerablemente más hiperactividad tras la administración del tratamiento de metanfetamina, exhibición de la longitud de trayectoria considerablemente más larga en la adquisición de un laberinto acuático de Morris, exhibición en cortes del núcleo estriado de dicho ratón de niveles aumentados de
40 fosfo-Thr34 o fosfo-Ser845 tras la administración de un agonista del receptor D1 y exhibición en

cortes del núcleo accumbens de dicho ratón de niveles aumentados de fosfo-Thr34 o fosfo-Ser845 tras la administración de un agonista del receptor D1. Un experto en la técnica entenderá que un ratón de tipo silvestre en el que se inhibe de forma experimental PDE1B, p. ej., mediante la administración de un compuesto de la invención, puede, en determinados modos de realización, mostrar algunas y/o todas las características fenotípicas descritas anteriormente de un ratón *knockout* PDE1B.

[0176] Tal como aquí se revela, el animal *knockout* PDE1B de la invención es preferiblemente un ratón, puesto que los ratones ofrecen diferentes ventajas como animales de investigación de laboratorio. Sin embargo, se reconoce que cualquier animal que tenga la proteína PDE1B será tratable a los métodos de la presente invención. Dichos animales pueden ser ratones, ratas, hámsteres, ovejas, cerdos, ganado, etc. y son preferiblemente mamíferos no humanos.

[0177] Los métodos para producir ratones *knockout* son ya conocidos en la técnica. El método consiste en obtener ADN genómico que codifica PDE1B, crear un vector que contiene dicho ADN genómico y un gen marcador, donde dicho gen marcador se coloca en el exón de dicho ADN genómico. A continuación, el vector se electropora en células madre embrionarias y se elige una célula madre embrionaria que tiene el vector integrado en su genoma, donde la célula elegida tiene el gen marcador integrado en el sitio endógeno del gen para PDE1B en el genoma del ratón. A continuación, se inyecta la célula en un blastocisto de ratón, que se reimplanta posteriormente en una hembra de ratón pseudoembarazada, que da a luz a un ratón quimérico que contiene un alelo defectuoso para PDE1B en su línea germinal. El ratón quimérico se cruza con un ratón de una línea endocriada estándar con el fin de generar un ratón *knockout* heterocigoto. Después, se cruzan dos ratones heterocigotos que generan una cría de ratón *knockout* homocigoto.

[0178] Los métodos para generar células que tienen modificaciones del gen diana a través de recombinación homóloga son ya conocidos en la técnica (véase, p. ej., Chappel, patente estadounidense nº 5.272.071; y publicación PCT Nº WO 91/06667, publicada el 16 de mayo, 1991; patente estadounidense 5.464.764; Capecchi *et al.*, publicada el 7 de noviembre, 1995; patente estadounidense 5.627.059, Capecchi *et al.* Publicada el 6 de mayo, 1997; patente estadounidense 5.487.992, Capecchi *et al.*, publicada el 30 de enero, 1996). Los métodos para crear vectores de recombinación homólogos y animales recombinantes homólogos se describen en más detalle en Thomas y Capecchi, 1987, *Cell* 51: 503; Bradley, 1991, *Curr. Opin. Bio/Technol.* 2: 823-29; y las publicaciones PCT Nº WO 90/11354, WO 91/01140, y WO 93/04169.

[0179] En un modo, la invención muestra un ratón *knockout* PDE1B que se genera al:

- (a) obtener ADN genómico que codifica un parte de PDE1B;
- (b) crear un vector que contiene dicho ADN genómico y un gen marcador, donde el gen marcador se inserta en un exón de dicho ADN genómico;
- (c) introducir dicho vector en células madre embrionarias de ratón mediante electroporación;
- (d) elegir una célula que tiene un gen PDE1B alterado debido a la integración de dicho vector en su genoma mediante recombinación homóloga en el gen PDE1B endógeno;
- (e) inyectar dicha célula en un blastocisto de ratón, formando así un blastocisto quimérico;
- (f) implantar dicho blastocisto quimérico resultante en un ratón pseudoembarazado donde el ratón pseudoembarazado da a luz a un ratón quimérico que contiene un gen PDE1B mutante en

su línea germinal;

(g) cruzar dicho ratón quimérico para generar un ratón heterocigoto que comprende un gen PDE1B alterado, generando así un ratón heterocigoto para dicho gen PDE1B alterado; y

(h) cruzar un ratón macho y uno hembra que sean heterocigotos para dicho gen PDE1B alterado y elegir progenie que sea homocigota para dicho gen PDE1B alterado.

[0180] En otro modo, se usa un modelo de ratón de la enfermedad de Parkinson (Uhl *et al.*, 1985, *Lancet* 1:956-57; Mokry, 1995, "Experimental models and behavioral tests used in the study of Parkinson's Disease", *Physiol. Res.* 44: 143-50.; Du, 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 14669-14674). Dicho sistema de modelo animal puede usarse para detectar compuestos útiles en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson debido a su efecto en las vías de señalización intracelular de dopamina D1. En un modo de realización alternativo, se usa un modelo de rata de la enfermedad de Parkinson. En un modo de realización específico, a las ratas se les inyecta de forma unilateral (es decir, en un hemisferio) 6-OHDA (6-hidroxidopamina; una neurotoxina dopaminérgica) de acuerdo con los métodos convencionales. Las neuronas dopaminérgicas toman de forma selectiva el 6-OHDA y mata a las neuronas. Dichos animales lesionados por 6-OHDA se consideran un modelo animal de la enfermedad de Parkinson (véase la sección 6).

[0181] En otro modo, se usa un modelo de ratón de esquizofrenia (Sipes *et al.*, 1995, "8-OH-DPAT disruption o prepulse inhibition in rats: reversal with (+)WAY 100,135 and localization of site of action", *Psychopharmacology (Berl)* 117(1): 41-8; Cao *et al.*, 2002, *Brain Research* 937: 32-40). Dicho sistema de modelo animal puede usarse para detectar compuestos útiles en el tratamiento de esquizofrenia debido a su efecto en las vías de señalización intracelular de dopamina D1.

[0182] En otros modos, se usa un modelo de rata para el trastorno por déficit de atención (TDA) o trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) (véase, p. ej., Hansen *et al.*, 1999, "Alcohol responsiveness, hyperreactivity and motor restlessness in an animal model for attention-deficit hyperactivity disorder", *Psychopharmacology* 146: 1-9; Russell, 2002, *Behavioral Brain Res.* 130: 191-196). Russell, por ejemplo, revela un modelo de rata hipertensa de forma espontánea que es un modelo genético para TDAH. Dicho sistema de modelo animal puede usarse para detectar compuestos útiles en el tratamiento de TDAH debido a su efecto en las vías de señalización intracelular de dopamina D1.

[0183] En otro modo, se usa un modelo de ratón de dolor (p. ej., O'Callaghan *et al.*, 1975, "Quantification of the analgesic activity of narcotic antagonists by a modified hot-plate procedure", *J. Pharmacol Exp Ther* 192: 497-505; Guarna *et al.*, 2002, *J. Neurochem.* 80:271-277; Menéndez *et al.*, 2002, "Unilateral hot plate test: a simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice", *J. Neurosci. Methods* 113:91-97). Guarna *et al.* revelan un modelo de ratón para hiperalgesia periférica y central. Menéndez *et al.* revelan un modelo de ratón para hiperalgesia periférica y central. Dicho sistema de modelo animal puede usarse para detectar compuestos útiles en el tratamiento del dolor debido a su efecto en las vías de señalización intracelular de dopamina D1.

[0184] En otro modo, se usa un modelo de rata de adicción (p. ej., adicción a la cocaína) (Caine y Koob, 1995, "Pretreatment with the dopamine agonist 7-OH-DPAT shifts the cocaine self-administration dose-effect function to the left under different schedules in the rat", *Behav. Pharmacol* 6: 333-347; Orsini *et al.*, 2002, *Brain Research* 925:133-140). Dicho sistema de modelo animal puede

usarse para detectar compuestos útiles en el tratamiento del abuso o adicción a las drogas debido a su efecto en las vías de señalización intracelular de dopamina D1.

[0185] En otro modo, se usa un modelo animal o de tejido de epilepsia (véase, p. ej., Paschoa *et al.*, 1997, "Seizure patterns in kindling and cortical stimulation models of experimental epilepsy", *Brain Res.* 770: 221-227; Kokaia, 1995, *Exper. Neurol.* 133:215-224; Merlin, 1999, *J. Neurophysiol.* 82: 1078-1081; Merlin, 2001, *J. Neurophysiol.* 87:621-625). Kokaia (1995, *Exper. Neurol.* 133:215-224) revela un modelo de ratón de epilepsia. Merlin (1999, *J. Neurophysiol.* 82: 1078-1081; 2001, *J. Neurophysiol.* 87:621-625) revela un modelo de un corte de hipocampo de conejillo de Indias de epilepsia. Dicho sistema de modelo animal puede usarse para detectar compuestos útiles en el tratamiento de epilepsia debido a su efecto en las vías de señalización intracelular de dopamina D1.

[0186] En otro modo, el modelo animal es un ratón *knockout* DARPP-32 homocigoto (véase la patente estadounidense nº 5.777.195, por Fienberg *et al.*, publicada el 7 de julio, 1998; patente estadounidense nº 6.013.621, por Nishi *et al.*, publicada el 11 de enero, 2000; y Fienberg *et al.*, 1998, *Science* 281:838-842). En un modo de realización, puede usarse el ratón *knockout* DARPP-32 homocigoto, en una prueba o análisis adicional, con el fin de validar o confirmar que un agente candidato modula la actividad de PDE1B. En un modo específico, la validación puede llevarse a cabo de acuerdo con los métodos descritos en Nishi *et al.* (patente estadounidense nº 6.013.621, publicada el 11 de enero, 2000). Cuando se ha identificado dicho agente que modula la actividad de PDE1B, la presencia o administración del agente en el ratón *knockout* DARPP-32 debería disminuir la magnitud de activación de la proteína que une el elemento de respuesta de cAMP (CREB), receptor AMPA (p. ej., receptor AMPA GluR1), cAMP, cGMP, PKA, PKG, PP-2B y PP-1, canales de calcio, Na/K ATPasa y receptor NMDA, en relación a la ausencia o no administración del agente.

5.6. COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y FORMULACIONES

[0187] La presente invención también muestra composiciones farmacéuticas de los agentes (fármacos o compuestos) de la invención aquí revelada. La invención muestra composiciones farmacéuticas para regular la actividad de PDE1B y para tratar un trastorno que incluye, sin carácter limitativo, un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 o relacionado con PDE1B. Puesto que, en determinados modos, una disminución de la función normal puede tener como resultado el desarrollo de un fenotipo de las enfermedades o trastornos antes mencionados (p. ej., enfermedad de Parkinson), un aumento en la actividad de PDE1B o la activación de un elemento posterior en la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 facilita la mejora de un síntoma en sujetos que muestran un síntoma de dicho trastorno.

[0188] En un modo, la invención presenta métodos para administrar un agente que puede mejorar un síntoma de un trastorno relacionado con PDE1B o un trastorno de la vía de señalización intracelular del receptor de dopamina D1 en un paciente o sujeto que muestra el síntoma. En determinados modos de realización, los síntomas de un tratamiento determinado (p. ej., enfermedad de Parkinson) pueden mejorarse al disminuir los niveles de actividad de PDE1B. En otros modos de realización, los síntomas del trastorno pueden mejorarse aumentando los niveles de actividad de PDE1B.

[0189] La presente invención muestra composiciones farmacéuticas de los agentes, fármacos o compuestos de la invención revelados anteriormente. El agente, fármaco o compuesto, o sus sales o

solvatos aceptables fisiológicamente, puede formularse para administrarse mediante inyección, o administración oral, tópica, nasal, inhalación, insuflación (ya sea por la boca o por la nariz) bucal, parenteral, rectal u otras formas de administración. La invención presenta composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades eficaces de un(os) agente(s) de la invención con diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes, excipientes y/o transportadores farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones incluyen diluyentes de varios contenidos de solución amortiguadora (p. ej., Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica; aditivos como detergentes y agentes solubilizantes (p. ej., Tween 80, Polisorbato 80), antioxidantes (p. ej., ácido ascórbico, metabisulfito sódico), conservantes (p. ej., Thiomersal, alcohol bencílico) y sustancias de carga (p. ej., lactosa, manitol).

[0190] Las composiciones pueden también ser incorporadas a preparaciones de partículas de compuestos poliméricos como el ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc. o liposomas. También puede usarse ácido hialurónico. Los polímeros absorbibles biocompatibles pueden elegirse del grupo que consiste en copolímeros, poliésteres alifáticos y mezclas, que incluyen, sin carácter limitativo, homopolímeros y copolímeros de láctida (que incluyen ácido D-,L-láctico, y D-, L- y meso láctida), glicólido (incluyendo ácido glicólico), épsilo-caprolactona, p-dioxanona (1,4-dioxan-2-ona, que se revela en la patente estadounidense nº 4.052.988), derivados de alquilo sustituido de p-dioxanona (es decir, 6,6-dimetilo-1,4-dioxan-2-ona que se revela en la patente estadounidense nº 5.703.200), carbonato trietilo (1,3-dioxan-2-ona), derivados de alquilo sustituido de 1,3-dioxanona (que se revelan en la patente estadounidense nº 5.412.068), delta-valerolactona, beta-butirolactona, gamma-butirolactona, épsilon-decalatona, hidroxibutirato, hidroxivalerato, 1,4-dioxepan-2-ona (revelado en la patente estadounidense nº 4.052.988 y su dímero 1,5,8,12-tetraoxaciclotetradecano-7,14 diona), 1,5-dioxepan-2-ona y mezclas de polímeros de estos.

[0191] Dichas composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la tasa de liberación *in vivo* y la tasa de eliminación *in vivo* de las proteínas y derivados presentes. Véase, p. ej., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18 ed., (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) páginas 1435-1712. Las composiciones pueden prepararse en forma líquida o secarse en polvo, como en forma liofilizada.

[0192] Aquí se contemplan para su uso formas de dosificación sólida y oral, que se revelan generalmente en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18 Ed.1990 (Mack Publishing Co. Easton PA 18042) en el capítulo 89. Las formas de dosificación sólida incluyen tabletas, cápsulas, pastillas, comprimidos o píldoras, obleas o gránulos. Asimismo, puede usarse encapsulación proteinoide o liposomal para formular las presentes composiciones (como, por ejemplo, las microesferas proteinoideas presentadas en la patente estadounidense nº 4.925.673). Puede usarse la encapsulación liposomal y los lipomas pueden derivarse con varios polímeros (p. ej., la patente estadounidense nº 5.013.556). Marshall, K. ofrece una descripción de posibles formas de dosificación sólida en "Modern Pharmaceutics editado por G.S. Banker y C.T. Rhodes Chapter 10, 1979. En general, la formulación incluirá el agente y los ingredientes inertes (que permiten la protección contra el ambiente del estómago y la liberación de material activo biológicamente en el intestino).

[0193] Con el fin de asegurar una completa resistencia gástrica es útil un revestimiento impermeable hasta al menos 5.0 pH. Ejemplos de más ingredientes inertes comunes que se usen como

revestimientos entéricos son acetato trimelitato de celulosa (CAT), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, acetato ftalato de polivinilo (PVAP), Eudragit L3OD, Aquateric, acetato ftalato de celulosa (CAP), Eudragit L, Eudragit S y Shellac. Estos revestimientos pueden usarse como películas mixtas.

5 **[0194]** También puede usarse un revestimiento o mezcla de revestimientos en las tabletas, que no estén destinados a la protección contra el estómago. Esto puede incluir recubrimientos con azúcar o revestimientos que hacen que la tableta sea más fácil de tragar. Las cápsulas pueden estar formadas por una carcasa dura (como gelatina) para la entrega del agente terapéutico seco, es decir, polvo; para formas líquidas, puede usarse una carcasa de gelatina suave. El material de la carcasa de las
10 obleas puede ser almidón grueso o cualquier otro papel comestible. Para las píldoras, pastillas, tabletas moldeadas o triturado de tableta, pueden usarse técnicas de distribución de masa húmeda.

[0195] El terapéutico puede incluirse en la formulación como multipartículas finas en forma de gránulos o bolitas. La formulación del material para la administración de la cápsula puede ser también polvo, tapones ligeramente comprimidos o incluso como tabletas. El terapéutico también puede
15 prepararse mediante compresión.

[0196] Pueden incluirse todos los agentes saborizantes y colorantes. Por ejemplo, puede formularse (mediante encapsulación de microesfera o liposoma, por ejemplo) la proteína (o derivado) y, a continuación, estar contenida además dentro de un producto comestible, tal como una bebida refrigerada que contiene los agentes saborizantes y colorantes.

20 **[0197]** Uno puede diluir o aumentar el volumen del terapéutico con un relleno o material inerte. Estos diluyentes o rellenos pueden incluir carbohidratos, especialmente manitol, α -lactosa, lactosa anhidra, celulosa (p. ej., celulosa microcristalina), sacarosa, dextranos modificados por fosfato hidrógeno cálcico y almidón. También se pueden usar determinadas sales inorgánicas como relleno entre los que se encuentran trifosfato de calcio, carbonato de magnesio y cloruro de sodio. Algunos diluyentes
25 disponibles comercialmente son Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress y Avicell.

[0198] Los disgregantes pueden estar incluidos en la formulación del terapéutico en forma de dosificación sólida. Los materiales usados como disgregante incluyen, sin carácter limitativo, almidón (p. ej., almidón de patata o el disgregante comercial con base de almidón, Explotab). Se puede usar almidón glicolato de sodio, Amberlite, carboximetilcelulosa de sodio, ultramilopectina, alginato de
30 sodio, gelatina, cáscara de naranja, carboximetilcelulosa ácida, esponja natural y bentonita. Otra forma de disgregantes son las resinas de intercambio catiónico insolubles. Se pueden emplear gomas en polvo como disgregantes y como aglutinantes, y éstos incluyen gomas en polvo, tales como agar, Karaya o tragacanto. El ácido algínico y su sal sódica también son útiles como disgregantes.

[0199] Pueden emplearse aglutinantes para mantener unido el agente terapéutico con el fin de
35 formar una tableta dura e incluyen materiales procedentes de productos naturales, tales como goma arábica, tragacanto, almidón (p. ej., almidón de maíz pregelatinizado) y gelatina. Otros incluyen metilcelulosa (MC), etilcelulosa (EC) y carboximetilcelulosa (CMC). Se puede emplear polivinilpirrolidona (PVP) e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) en disoluciones alcohólicas para granular el producto terapéutico.

40 **[0200]** Puede incluirse un agente antifricción en la formulación del producto terapéutico para evitar que se pegue durante el proceso de formulación. Se pueden emplear lubricantes como una capa

entre el producto terapéutico y la pared del troquel, y éstos pueden incluir sin carácter limitativo, ácido esteárico, incluyendo sus sales magnésicas y cálcicas, politetrafluoroetileno (PTFE), parafina líquida, aceites vegetales y ceras, talco y sílice. También se pueden usar lubricantes solubles, tales como laurilsulfato de sodio, laurilsulfato de magnesio, polietilenglicol de diversos pesos moleculares, Carbowax 4000 y 6000.

[0201] Se pueden añadir deslizantes que pueden mejorar las propiedades de flujo del fármaco durante la formulación y que pueden ayudar a la redistribución durante la compresión. Los deslizantes pueden incluir almidón, talco, sílice pirógena, y silicoaluminato hidratado.

[0202] Para ayudar a la disolución del terapéutico en el medio acuoso, puede añadirse un tensioactivo como agente humectante. Los tensioactivos pueden incluir detergentes aniónicos, tales como laurilsulfato de sodio, dioctilsulfosuccinato de sodio y dioctilsulfonato de sodio. Se pueden emplear detergentes catiónicos y pueden incluir cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio. La lista de detergentes no iónicos potenciales que pueden incluirse en la formulación como tensioactivos son lauromacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino de polioxietileno hidrogenado 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65 y 80, éster de ácido graso de sacarosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. Estos tensioactivos pueden estar presentes en la formulación de la proteína o derivados por sí solos o como una mezcla en diferentes proporciones.

[0203] Los aditivos que potencialmente mejoran la captación del agente son, por ejemplo, los ácidos grasos ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico.

[0204] Puede resultar deseable una formulación de liberación controlada. El agente puede incorporarse en una matriz inerte que permite la liberación mediante mecanismos de difusión o lixiviación; por ejemplo, gomas. También pueden incorporarse matrices de degeneración lenta en la formulación. Algunos revestimientos entéricos también tienen un efecto de liberación retrasada.

[0205] Otra forma de liberación controlada de este terapéutico es mediante un método basado en el sistema terapéutico Oros (Alza Corp.), es decir, el fármaco se encierra en una membrana semipermeable que permite la entrada de agua y empuja al fármaco a través de un único pequeño orificio debido a efectos osmóticos.

[0206] Se pueden emplear otros revestimientos para la formulación. Éstos incluyen una diversidad de azúcares que pueden aplicarse en una bandeja de revestimiento. El agente terapéutico también puede presentarse en una tableta revestida con película y los materiales utilizados en este caso se dividen en dos grupos. El primero son los materiales no entéricos e incluye metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, providona y los polietilenglicoles. El segundo grupo consiste en los materiales entéricos que son, habitualmente, ésteres del ácido ftálico.

[0207] Puede emplearse una mezcla de materiales para proporcionar el revestimiento con película óptimo. El revestimiento con película puede realizarse en un aparato de revestimiento de bandeja o en un lecho fluidificado o mediante revestimiento por compresión.

[0208] Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, disoluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para constituirse con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como

agentes de suspensión (p. ej., jarabe de sorbitol, derivados de la celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (p. ej., lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (p. ej., aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados) y conservantes (p. ej., p-hidroxibenzoatos de metilo o de propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden
5 contener sales amortiguadoras, agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes según sea adecuado.

[0209] También se contempla la administración nasal del agente. La administración nasal permite el paso de la proteína a la corriente sanguínea directamente después de la administración del producto terapéutico a la nariz, sin la necesidad de que el producto se deposite en el pulmón.

10 **[0210]** Para la administración por inhalación, los compuestos que han de usarse de acuerdo con la presente invención, se suministran convenientemente en forma de una presentación de pulverizador de aerosol a partir de envases a presión o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol a presión, la unidad de dosificación puede determinarse
15 proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de p. ej., gelatina para usarse en un inhalador o insuflador pueden formularse para contener una mezcla de polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

[0211] Los compuestos pueden formularse para la administración parenteral por inyección, p. ej., mediante inyección en bolo o por infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden
20 presentarse en forma de unidosis, p. ej., en ampollas o recipientes multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar la forma de suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos acuosos o aceitosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. De forma alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, p. ej., agua estéril libre de pirógenos,
25 antes de su uso.

[0212] Los compuestos también pueden formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, p. ej., que contienen bases de supositorio convencionales como manteca de cacao u otros glicéridos.

[0213] Además de las formulaciones reveladas anteriormente, los compuestos también pueden
30 formularse como una preparación de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo, de forma subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, en forma de emulsión en un aceite aceptable) o en resinas de intercambio iónico, o como derivados muy poco solubles, por ejemplo, en forma de sal muy
35 poco soluble.

[0214] Si se desea, las composiciones pueden presentarse en un paquete o un dispositivo dosificador que puede contener una o más formas de unidades de dosificación que contienen el ingrediente activo. El paquete puede, por ejemplo, comprender un envoltorio de plástico o metal, tal como un blíster. El paquete o dispositivo dispensador puede estar acompañado de las instrucciones
40 para la administración.

5.6.1. DETERMINACIONES DE DOSIFICACIÓN

[0215] La toxicidad y eficacia terapéutica de dichos compuestos puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, p. ej., para determinar

5 [0216] DL50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y el ED50 (la dosis terapéutica eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL50/ED50. Se prefieren los compuestos que muestran grandes índices terapéuticos. Aunque pueden usarse compuestos que muestran efectos secundarios tóxicos, se debería tener cuidado a la hora de diseñar un sistema de distribución que
10 dirige dichos compuestos al lugar del tejido afectado con el fin de minimizar el posible daño a células no afectadas, reduciendo así los efectos secundarios.

[0217] Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivos celulares y estudios animales pueden usarse a la hora de formular una variedad de dosificaciones para usarlas con seres humanos. La dosificación de dichos compuestos recae preferiblemente en una variedad de concentraciones
15 circulantes que incluyen ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir una variedad de concentración de plasma circulante que incluye
20 CI50 (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que consigue la mitad de la inhibición máxima de los síntomas) como se determina en el cultivo celular. Dicha información puede usarse más adecuadamente para determinar las dosis útiles en seres humanos. Los niveles de plasma pueden medirse mediante, por ejemplo, cromatografía líquida de alta resolución.

25 5.6.2. RUTAS DE ADMINISTRACIÓN

[0218] El componente o componentes de una composición terapéutica de la invención puede introducirse de forma parenteral, tópica o transmucosa, p. ej., de forma oral, nasal o rectal, o transdérmica. Preferiblemente, la administración es parenteral, p. ej., por inyección intravenosa y
30 también incluyendo, sin carácter limitativo, administración intraarterial, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular e intracraneal. En modos de realización preferidos, el componente o componentes de una composición terapéutica de la invención se introducen de forma oral o parenteral.

[0219] En modos preferidos de la invención, un agente (o fármaco o compuesto) puede cruzar y más preferiblemente pasar fácilmente a través de la barrera hematoencefálica, lo que permite, p. ej., una
35 administración oral, parenteral o intravenosa. De forma alternativa, el agente puede modificarse o cambiarse de otro modo de forma que pueda cruzar o ser transportado a través de la barrera hematoencefálica. Existen muchas estrategias conocidas en la técnica para que las moléculas crucen la barrera hematoencefálica, entre las que se encuentran, sin carácter limitativo, aumentar la naturaleza hidrófoba de una molécula, introducir la molécula como un conjugado a un transportador,
40 como trasladar, dirigido a un receptor en la barrera hematoencefálica o a un ácido docosaheptaénico, etc.

[0220] En otro modo, un agente de la presente invención se administra mediante el procedimiento estándar de perforar un pequeño agujero en el cráneo para administrar el agente.

[0221] En otro modo, la molécula puede administrarse de forma intracraneal o, más preferiblemente, intraventricular. En otro modo, puede usarse una alteración osmótica de la barrera hematoencefálica con el fin de distribuir de forma eficaz el agente al cerebro (Nilaver *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9829-9833 (1995)). En otro modo de realización más, puede administrarse un agente en un liposoma dirigido a la barrera hematoencefálica. La administración de agentes farmacéuticos en liposomas es conocida (véase Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat *et al.*, en *Liposomes in the Therapy of infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 317-327 y 353-365 (1989)). Todos estos métodos se tienen en cuenta en la presente invención. Aunque se han hecho algunas predicciones en relación a la capacidad de las moléculas para atravesar la barrera hematoencefálica, estas predicciones son, en el mejor de los casos, especulativas. Generalmente, se considera que la velocidad y alcance de entrada de un compuesto en el cerebro están determinados por el coeficiente de partición, la(s) constante(s) de ionización y el tamaño molecular. No ha aparecido ningún sistema de disolventes de partición única como modelo aplicable universalmente para penetrar el cerebro, aunque el sistema de agua octanol ha recibido especial atención y Hansch y compañeros han sugerido que un coeficiente de partición en este sistema de aproximadamente 100 es óptimo para la entrada en el sistema nervioso central (SNC) (Glave y Hansch, *J. Pharm. Sci.* 61:589 (1972); Hansch *et al.*, *J. Pharm. Sci.* 76:663 (1987)). En la práctica, el sistema de partición agua-octanol solo proporciona una indicación cualitativa de la capacidad de un compuesto para cruzar la barrera hematoencefálica. Por ejemplo, las comparaciones entre los conocidos antagonistas del receptor histamina H2 sugieren que no existe dicha relación simple entre la penetración en el cerebro y los coeficientes de partición agua-octanol (Young *et al.*, *J. Med. Chem.* 31:656 (1988)). Otros factores, además de la partición agua-octanol, influyen en la propensión a cruzar la barrera hematoencefálica. La comparación de la capacidad de los antagonistas de los receptores histamina H2 para cruzar la barrera hematoencefálica sugiere que la penetración en el cerebro puede aumentar al disminuir la capacidad total de unión a hidrógeno del compuesto (Young *et al.*, *J. Med. Chem.* 31:656 (1988)). Begley *et al.* (*J. Neurochem.* 55:1221-1230 (1990)) revela la capacidad de ciclosporina A para cruzar la barrera hematoencefálica. La metodología tal como la usa Beley *et al.* Incluye: (1) medir el índice de absorción del cerebro (BUI por el inglés *brain uptake index*) con la ecuación para un compuesto de agente tritiado:

$$\text{BUI} = [({}^3\text{H cerebral} / {}^{14}\text{C cerebral}) / ({}^3\text{H inyectado} / {}^{14}\text{C inyectado})] \times 100$$

donde el compuesto de referencia ${}^{14}\text{C}$ es butanol ${}^{14}\text{C}$ o un disolvente análogo; (2) estudios de perfusión del cerebro; (3) estudios de inyección en bolo intravenoso y (4) estudios con endotelio capilar cerebral cultivado.

[0222] En otro modo, el compuesto terapéutico puede distribuirse en una vesícula, en concreto, un liposoma (véase Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat *et al.*, en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss: New York, pp. 317-327 y 353-365 (1989)). Con el fin de reducir los efectos secundarios sistémicos, este puede ser un método preferido para introducir el agente.

[0223] En otro modo, el compuesto terapéutico puede distribuirse en un sistema de liberación

controlado. Por ejemplo, el agente puede administrarse usando una infusión intravenosa, una bomba osmótica implantable, un parche transdérmico, liposomas u otros modos de administración. En un modo de realización, puede usarse una bomba (véase Langer, supra; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald *et al.*, *Surgery* 88:507 (1980); Saudek *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989)). En otro modo de realización, se pueden usar materiales poliméricos (véase *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), CRC Press: Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen y Ball (eds.), Wiley: New York (1984); Ranger y Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61 (1983); véase también Levy *et al.*, *Science* 228:190 (1985); During *et al.*, *Ann. Neurol.* 25:351 (1989); Howard *et al.*, *J. Neurosurg.* 71:105 (1989)). En otro modo de realización más, puede colocarse un sistema de liberación controlado cerca de la diana terapéutica, es decir, el cerebro, lo que requiere, por tanto, solo una fracción de la dosis sistemática (véase, p. ej., Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Se tratan otros sistemas de liberación controlada en el análisis de Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)).

[0224] Los siguientes ejemplos experimentales se ofrecen a modo de ejemplo y no como limitación.

6. EJEMPLO 1: RATONES *KNOCKOUT* FOSFODIESTERASA 1B (PDE1B) MUESTRAN HIPERACTIVIDAD LOCOMOTORA EXAGERADA Y FOSFORILACIÓN DE DARPP-32 EN RESPUESTA A AGONISTAS DE DOPAMINA Y PRESENTAN APRENDIZAJE ESPACIAL DISMINUIDO

[0225] Este ejemplo demuestra que la mejora de la señalización nucleótida cíclica mediante inactivación de la hidrólisis nucleótida cíclica mediada por PDE1B juega un papel importante en la función dopaminérgica a través de DARPP-32 y las vías de transducción relacionadas.

[0226] Al usar una recombinación homóloga, se generaron ratones que carecían de actividad de hidrólisis nucleótida cíclica mediada por fosfodiesterasa (PDE1B). Los ratones PDE1B ^{-/-} (“nulos”) mostraban hiperactividad exagerada tras la administración aguda de D-metanfetamina. Los cortes del núcleo estriado de ratones PDE1B ^{-/-} mostraron niveles aumentados de fosfo-Thr34 de DARPP-32 y fosfo-Ser845 de GluR1 tras la estimulación de forskolina o el agonista del receptor de dopamina D1. Los ratones PDE1B ^{-/-} y PDE1B ^{+/-} (heterocigotos) también mostraron déficits de aprendizaje espacial del laberinto acuático de Morris.

6.1. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.1 RATÓN *KNOCKOUT* PDE1B

[0227] Se obtuvieron dos clones coexistentes, TRC2 y TRC4, correspondientes a los exones 2-13 del gen PDE1B, detectando una biblioteca genómica de ratón I-129/SvJ Lambda Dash II como se describe (Reed, T.R. *et al.* 1998. *Mamm. Gen.* 9:571-576). Se unieron los extremos romos de un fragmento de XbaI de 0,8 kb que contiene los exones 4 y 5 y una pequeña parte del sitio de clonación múltiple de pBluescript II KS(-) (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) en el lugar de BamHI del vector dirigido. Se unieron los extremos romos de un fragmento de AccI/KpnI de 5 kb que contiene el ADN genómico 3' del exón 9, incluyendo 2,4 kb de secuencia no codificadora 3' al exón 13 en el lugar de ClaI del vector dirigido (véase la FIG. 1A). La estructura principal del vector dirigido pGKKOV ha sido

descrita por Li *et al.* (1996. *EMBO J.* 15:714-724). Este vector se deriva de pBluescript II SK(+) con un marcador seleccionable HSV-TK y un marcador seleccionable PGK-HPRT insertado en los lugares de KpnI y HindIII, respectivamente, del lugar de clonación múltiple. La orientación de las inserciones se determinó mediante secuenciación.

5 **[0228]** El vector dirigido (50 µg) se linealizó con NotI y se galvanizó en $9,3 \times 10^6$ células madre embrionarias E14TG2a. Las células madre embrionarias se colocaron en diez placas de cultivo de tejido de 100 cm sobre $2,2 \times 10^6$ fibroblastos embrionarios de ratón tratados con mitomicina C en 10 ml de DMEM por placa que contiene 15 % de suero fetal bovino cualificado de células madre embrionarias (Life Technologies, Carlsbad, CA), 0,3 mM de L-glutamina, 75.000 unidades de Pen/Strep, 60 unidades de LIF y 0,009 % de β-mercaptoetanol complementado con 2 µM Cytovene y
10 1X HAT (Life Technologies, Carlsbad, CA) para el proceso de selección. Tras 5 días de selección, se eligieron 302 clones de células madre embrionarias y se expandieron en placas de 24 pocillos. Los clones se detectaron mediante el análisis Southern Blot. Las células de dos clones positivos se inyectaron en los blastocistos C57B1/6 y se implantaron en hembras pseudoembarazadas. Las crías
15 quiméricas se cruzaron con los ratones C57B1/6 (Charles River, Wilmington, MA) con el fin de producir crías heterocigotas que se cruzaron con los ratones C57B1/6 para dos generaciones adicionales y así tener un total de 3 retrocruzamientos. Las crías resultantes de entrecruzar la generación F₃ se usaron para el análisis de comportamiento.

[0229] Para el análisis de comportamiento, se usó la generación F4 nulípara de ratones deficientes
20 en PDE1B y sus compañeros de camada de tipo silvestre. Los animales usados para bioquímica fueron las crías de la tercera y cuarta generación de retrocruzamientos. Se marcó a los ratones en la oreja en el día 7 tras nacer (P7) y se pesaron semanalmente empezando en P7 y terminando en P112. Las biopsias de la cola se obtuvieron en P21 o P42. Las camadas se destetaron en P28. Se metió a los ratones en jaulas, los del mismo género en cada jaula, con 2 a 4 ratones por jaula. Los
25 ratones individuales se excluyeron del análisis si no había compañeros de camada del mismo género o si existían defectos oculares visibles. Todos los procedimientos los llevó a cabo el mismo experimentador que no conoció los genotipos hasta el final del experimento.

6.1.2. ANÁLISIS SOUTHERN BLOT

30 **[0230]** El análisis Southern blot se llevó a cabo como describe Reed (1998, *Mamm. Gen.* 9:571-576) en ADN digerido por NdeI/KpnI o StuI purificado a partir de células madre embrionarias y biopsias de la cola. En resumen, la prehibridación y la hibridación se llevaron a cabo a 65 C en 1 % SDS, 1 M NaCl y 10 % sulfato dextrano. Las transferencias se detectaron con una sonda generada por PCR de 347 pb correspondiente al exón 3 de ratón PDE1B y 164 pb de secuencia de intrón flanqueadora. Los
35 cebadores para PCR usados fueron 5'-GACACTAAGTGGGTATAGCTGGGT-3' (SEQ ID NO: 5) y 5'-GTGGGAATAAGTCTCAGGGTAGG-3' (SEQ ID NO: 6). Se radiomarcaron veinticinco ng de sonda con ³²P-dCTP mediante cebador aleatorio con el kit Prime-It II (Stratagene, Inc.), hervidos con 5 mg/500 µl de ADN de esperma de salmón durante 5 minutos y añadidos a 30 ml de solución amortiguadora de hibridación. Las transferencias se hibridaron durante 12-16 horas y el lavado de
40 poshibridación final fue en 2X SSC + 1 % SDS a 65 C. La sonda está fuera de la región diana del gen PDE1B. Los casos de recombinación homóloga tuvieron como resultado cambios en el tamaño a

partir de 3,7 a 2,2 kb (Stul) (veáanse las FIGS. 1A, B) y a partir de 3,7 a 10,6 kb (NdeI/KpnI) (véase la FIG. 1A).

6.1.3. ANÁLISIS NORTHERN BLOT

5 **[0231]** El ARN cerebral total se aisló usando el método TriReagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH). El ARN (10 µg) se fraccionó en un 1 % de gel de agarosa desnaturizante y se transfirió durante 24 horas a una membrana de nailon usando 20X SSC. La transferencia se prehibridó en 10 ml de solución formada por 50 % formamida, 50 mM NaPO₄, 5X SSC, 5X Denhardt's, 0,5 % SDS y 1 % glicina con 250 µl de 10 mg/ml de ADN de esperma de salmón a 42 C

10 durante 4 horas. La transferencia se hibridó con la sonda K-17 marcada con ³²P, un ADNc de ratón PDE1B parcial de 348 pb correspondiente al dominio catalítico central como describe Repaske *et al.* (1992. *J. Biol. Chem.* 267:18683-18688). La sonda se hirvió durante 5 minutos con 100 µl de 10 mg/ml de ADN de esperma de salmón, se añadió a los 10 ml de solución amortiguadora de hibridación de 50 % formamida, 20 mM NaPO₄, 5X SSC, 1X Denhardt's, 0,5 % SDS y 10 % sulfato de

15 dextrano y se incubó a 42 °C durante 21 horas. El lavado final de poshibridación fue en 0,1X SSC + 0,1 % SDS a 55 °C.

6.1.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA

[0232] En P50, P51 o P52, se midió la actividad locomotora en un sistema Digiscan de 30,5 cm x

20 30,5 cm que contiene dieciséis pares de fotodetectores LED a lo largo del eje X y dieciséis pares a lo largo del eje Y (Modelo RXY2Z, Accuscan Electronics, Columbus, OH). La actividad de preexposición se registró en intervalos de 3 minutos sobre un periodo de una hora. Se expuso a los ratones a una inyección subcutánea de 1 mg/kg clorhidrato de d-metanfetamina (de base libre) mezclado en solución salina para producir un volumen de inyección de 5 ml/kg de peso corporal y la actividad se

25 registró durante dos horas adicionales con intervalos de tres minutos. El registro se realizó durante el ciclo ligero. Se midió la actividad horizontal y la distancia total, del centro y del margen.

6.1.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA Y COMPORTAMIENTOS DE APRENDIZAJE CON UN LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS

30 **[0233]** En P50, se administró a los animales de una camada cuatro ensayos programados en un canal de agua recto de 15 x 244 cm con una escalera de cable en un extremo. El canal se creó sobre material PVC y se llenó con agua entre 27 a 29 °C con una profundidad de 35 cm. Los sujetos se colocaron en el canal en el extremo opuesto de la escalera y se les dio un máximo de 60 segundos para encontrar la escalera y escapar. Estos ensayos se utilizaron para medir su capacidad para nadar

35 y la motivación para escapar de agua antes de los ensayos con el laberinto acuático de Morris. Se excluyeron dos camadas de ratones para ensayos adicionales de comportamiento debido a su pobre actuación nadando.

[0234] El laberinto acuático de Morris se usó con modificaciones para ratones (Upchurch, M. y J.M. Wehner. 1988. *Behav. Gen.* 18:55-68). El laberinto era un perímetro circular de acero inoxidable de

40 122 cm de diámetro rodeado por un tanque exterior con un diámetro de 162 cm. El perímetro interno se cubrió con pintura blanca lisa. La plataforma acrílica despejada era 10 x 10 cm y se sumergió 1 cm

por debajo de la superficie del agua. La pintura blanca no tóxica se añadió al agua para camuflar la plataforma. La temperatura del agua se mantuvo entre 27 a 29 °C. Las camadas se dividieron en dos grupos para mantener el equilibrio de la posición de la plataforma. Los ensayos comenzaron en P51 y continuaron durante 18 días con 6 días cada uno para la obtención de la plataforma oculta e inversa (moviendo la plataforma para el cuadrante opuesto) y seguido de aprendizaje por estímulos. Para la obtención de la plataforma oculta, se colocó la plataforma en el cuadrante SE o NW y se cambiaron las posiciones iniciales (N, S, E o W) en cada ensayo en una secuencia aleatoria. Se hicieron cuatro ensayos cada día con un tiempo límite de 60 segundos y un intervalo entre pruebas de 30 segundos. Los ratones que no encontraron la plataforma en 60 segundos se colocaron en la plataforma para el intervalo de 30 segundos entre pruebas. Los ensayos de sondas (60 segundos) se dieron en el día 3 antes de los ensayos de obtención y el día 6 tras el último ensayo de obtención sin la plataforma. Para la fase inversa, se siguió el mismo procedimiento con la plataforma cambiada al cuadrante opuesto. Para el aprendizaje por estímulos, se prepararon cortinas negras alrededor del laberinto para ocultar las pistas distales y se marcó la plataforma mediante un cilindro sólido negro (5 x 7 cm) montado en una varilla de latón de 14 cm sobre la plataforma. Se dieron cuatro ensayos por día con las plataformas y las posiciones iniciales ubicadas aleatoriamente para cada ensayo. Los ratones se colocaron en una caja de retención durante el intervalo entre pruebas de 30 segundos mientras que la plataforma se colocó para el siguiente ensayo. Se registraron los datos para las fases de obtención e inversa usando un sistema de seguimiento por video (San Diego Instruments, San Diego, CA). Las latencias en la recogida de datos se registraron con un cronómetro manual y se observó en un monitor de circuito cerrado.

6.1.6. ORIENTACIÓN OLFATIVA

[0235] En P9, P11 y P13, se analizaron todas las crías de cada camada para la orientación olfativa al aroma de su jaula-hogar como describió previamente (Acuff-Smith *et al.*, 1992. *Psychopharmacology* 109:255-263). Se cambió el lecho de cada camada en P7. El lecho no se cambió de nuevo hasta después de que el ensayo hubiera finalizado en P14 y se usó cada día de ensayo y, a continuación, se devolvió a su jaula-hogar. Antes de cada ensayo individual, se retiró a las crías de la madre y se colocaron en una jaula de retención sobre una almohadilla térmica para mantener la temperatura corporal.

6.1.7. PREPARACIÓN Y TRATAMIENTO DE LOS CORTES DEL NÚCLEO ESTRIADO

[0236] Se prepararon los cortes del núcleo estriado a partir de los ratones macho C57/BL6 (de 6-7 semanas) de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica (Nishi, A. *et al.* 1997. *J. Neurosci.* 17:8147-8155).

[0237] Se decapitaron los ratones macho PDE1B ^{-/-} (nulos) y WT (de 8-12 semanas). Se transfirió el cerebro rápidamente a una superficie helada, se bloqueó y fijó a la superficie de corte de un Vibratomo (Ted Pella, Redding, CA) mantenido a 4 °C. El cerebro se sumergió en una solución amortiguadora de bicarbonato de Krebs oxigenada (95 % O₂/5 % CO₂) y fría de la siguiente composición (en mM): 125 NaCl, 5 KCl, 26 NaHCO₃, 1,5 CaCl₂, 1,5 MgSO₄ y 10 glucosa, pH 7,4. Las secciones de cerebro de ratón coronarias (400 μm de grosor) se cortaron y juntaron en una solución

amortiguadora fría. Los cortes de núcleo estriado o del núcleo accumbens se cortaron a partir de las secciones coronarias bajo un microscopio de disección. Los cortes individuales se preincubaron en una solución amortiguadora fresca durante 15 minutos a 30 °C; se reemplazó la solución amortiguadora y continuó la preincubación durante 30 minutos adicionales. Al final de este segundo periodo de preincubación, se reemplazó la solución amortiguadora con solución de Krebs o solución amortiguadora que contenía las sustancias de ensayo durante 5 minutos. Los cortes se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta que se analizaron.

6.1.8. INMUNOBLOT

[0238] Los cortes congelados se sometieron a ultrasonidos en una solución amortiguadora de homogenización que contenía 1 % SDS. Se retuvieron pequeñas alícuotas del homogenado para la determinación de proteína mediante análisis convencionales usando albúmina de suero bovino como la norma. Se cargaron las mismas cantidades de proteína (50 µg) en 10 % de geles acrilamida, separadas por SDS/PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa mediante un método descrito por Tobin *et al.* (1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354). Se le realizó el inmunoblot a las membranas con los siguientes anticuerpos: un antisuero que detecta la forma fosforilada por Ser845 de GluR1 (Kameyama, K. *et al.* 1998. *Neuron* 21:1163-1175), un antisuero que detecta la región C-terminal de GluR1 independientemente del estado de fosforilación (Pharmingen, Inc.), mAb23 que es un anticuerpo específico de fosforilación que detecta un péptido DARPP-32 que contiene fosfo-Thr34 (Snyder, G.L. *et al.* 1992. *J. Neurosci.* 12:3071-3083), el sitio fosforilado mediante PKA o C24-5a que es un anticuerpo monoclonal que detecta DARPP-32 independientemente del estado de fosforilación (Hemmings, H.C. y P. Greengard. 1986. *J. Neurosci.* 6:1469-1481).

[0239] La unión de anticuerpos se demuestra mediante incubación tanto con TgG unido a peroxidasa de rábano de cabra anticonejo y un IgG unido a peroxidasa de rábano de cabra antirratón y el sistema de detección de inmunoblot por electroquimioluminiscencia (ECL). (Amersham Biosciences). La quimioluminiscencia se detectó mediante autorradiografía y las bandas se cuantificaron mediante análisis de imágenes escaneadas usando el software NIH Image 1.52. Puesto que la variedad lineal para la cuantificación de las señales de ECL mediante densitometría es limitada, se obtuvieron varias exposiciones de película para cada conjunto de muestras con el fin de asegurar que las señales estaban dentro de una variedad de densidad que permitiera una cuantificación adecuada.

6.1.9. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

[0240] Los datos se analizaron mediante ANOVA (modelo lineal general). Para los datos que tenían componentes de medición repetidos, se usaron gráficos separados de ANOVA, donde el día y el ensayo se trataban como factores intraindividuales en los análisis (Kirk, 1995). Los datos se promediaron en una camada para cada genotipo que tuviera más de un sujeto del mismo sexo (Holson y Pearce, 1992). Las interacciones significantes se analizaron además usando ANOVA efecto simple. Se realizaron comparaciones del grupo posteriormente mediante el método de Duncan. Los análisis para interacciones dependientes del tiempo se realizaron sobre los datos de la actividad, usando los análisis de tendencias mediante descomposición ortogonal. Se usó χ^2 para analizar si la

proporción de ratones de cada genotipo emparejado predecía las proporciones mendelianas. Los datos de los cortes del núcleo estriado se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney, como se indica, con importancia definida como $p < 0,05$.

5 6.2. RESULTADOS Y DEBATE

[0241] Se desarrolló un modelo de ratón en el que la enzima PDE1B se volvió inactiva mediante la alteración dirigida del dominio catalítico. Estos ratones “*knockout*” se usaron en estudios para identificar la importancia funcional de la actividad de PDE1B *in vivo* en el cerebro. Para hacer que los ratones fueran deficientes en la actividad de PDE1B, se creó un vector dirigido con el fin de alterar las
10 secuencias que codifican el dominio catalítico de PDE1B en el ADN genómico de las células madres embrionarias de ratón mediante recombinación homóloga (FIG. 1A). De las 302 colonias de células madre embrionarias que sobrevivieron la selección de Cytovene y HAT, se analizaron 26 mediante Southern blot usando una sonda correspondiente al exón 3 PDE1b y la secuencia de intrón flanqueadora. El gen alterado estaba presente en 9 de los clones.

15 [0242] Dos líneas de células madre embrionarias recombinantes se microinyectaron en blastocistos E3.5 C57B1/6 del día y se implantaron en hembras pseudoembarazadas. Se generaron veintiocho quimeras (17 machos y 11 hembras) y 8 o 29 % de una línea de células madre embrionarias demostraron la transmisión de la línea germinal cuando se cruzó con ratones C57B1/6. La tercera generación de ratones heterocigotos se entrecruzaron dando como resultado 178 ratones de tipo
20 silvestre (27 %), 309 ratones heterocigotos (47 %), 157 ratones nulos de PDE1B (24 %) y 13 ratones que murieron antes de ser genotipados (2 %). Estas proporciones no se diferenciaban de forma significativa de la proporción mendeliana de 1:2:1 mediante 2 análisis. Un Southern blot que demuestra los genotipos F4 se muestra en la FIG. 1B.

[0243] La apariencia física y el comportamiento general de los ratones heterocigotos y nulos en
25 PDE1B eran idénticos a sus compañeros de camada de tipo silvestre. No existían diferencias significantes tanto en los pesos antes del destetamiento como después entre los tres genotipos. Murieron más ratones nulos en PDE1B (6 %) y ratones heterocigotos (6 %) en la semana después del nacimiento en comparación con los ratones de tipo silvestre (2 %). Un análisis de Northern blot de ANR cerebral total sondeado con K-17, un ADNc de ratón de PDE1B parcial de 348 pares de bases
30 dentro del dominio dirigido (Repaske, D.R. *et al.* 1992. *J. Biol. Chem.* 267:18683-18688), demostró una reducción en ARNm PDE1B en los ratones heterocigotos y la ausencia de ARNm PDE1B en ratones nulos, lo que confirma la producción exitosa de los ratones *knockout* para el gen PDE1B (FIG. 1 C). Además, los niveles de ARNm PDE1B disminuyeron en los ratones sin aparente regulación del alelo normal en los ratones heterocigotos. La inmunoprecipitación de PDE1B a partir de todo el
35 cerebro de ratón demostró la ausencia de la actividad enzimática de PDE1B en los ratones nulos cuando se analizó por hidrólisis cAMP. Los ratones heterocigotos demostraron el 50 % del nivel de actividad visto en ratones de tipo silvestre.

[0244] Con el fin de examinar la importancia funcional del gen PDE1B y su expresión en el tejido cerebral, se estudió la actividad locomotora de los ratones *knockout* usando una serie de pruebas de
40 actividad locomotora convencionales en ratones, pruebas que se usan normalmente para definir los efectos de las condiciones de las pruebas o terapéuticos en la locomoción y, a continuación, para

extrapolar los resultados de los resultados esperados en humanos. Dichas pruebas son una parte estándar del proceso de desarrollo de fármacos.

[0245] Se estudió tanto la actividad estimulada por metanfetamina como exploratoria en ratones de tipo silvestre, heterocigotos y nulos (*knockout*). El efecto predominante del genotipo se observó en la actividad locomotora horizontal donde existían diferencias significativas entre los ratones en cuanto a la actividad exploratoria de preexposición como a la actividad exploratoria de posexposición. También existía un genotipo significativo por la interacción de intervalo observada tanto en preexposición como posexposición para las pruebas de actividad horizontal. Los análisis ANOVA revelaron que los ratones heterocigotos antes de la exposición mostraban niveles de actividad comparables a los de los ratones de tipo silvestre (FIG. 2), mientras que los ratones nulos en PDE1B (ratones *knockout*) mostraban un comportamiento significativamente más exploratorio, especialmente durante los primeros 30 minutos del periodo de ensayo. De 30 a 60 minutos, los ratones nulos en PDE1B se acostumbraron frente a los niveles de actividad del tipo silvestre pero aún eran ligeramente más activos. El análisis ANOVA y las comparaciones grupales de la actividad horizontal tras la exposición revelaron que los ratones heterocigotos eran ligeramente diferentes, aunque no de forma significativa, de los ratones de tipo silvestre en cuanto a los niveles de actividad. Por el contrario, los ratones nulos en PDE1B eran significativamente más activos que los ratones de tipo silvestre. La respuesta de hiperactividad estimulada duraba 90 minutos tras el tratamiento con metanfetamina. Esto puede verse en la FIG. 2 mediante el aumento más puntiagudo en la actividad sobre el mismo periodo de tiempo en ratones PDE1B *-/-* tras METH de lo que ocurrió en ratones WT.

[0246] Con el fin de determinar si la respuesta estimulada de los ratones nulos en PDE1B era diferente tanto de forma cualitativa como cuantitativa a la respuesta de ratón de control de tipo silvestre, se llevó a cabo un análisis tendencial usando la descomposición ortogonal. Las comparaciones de tipo nulo a silvestre mostraron tendencias cúbicas, cuadráticas y lineares significativas para el genotipo mediante interacción de intervalo; las interacciones de tipo heterocigoto a silvestre no mostraron ningún efecto significativo. En la comparación de tipo nulo a silvestre, la tendencia cuadrática encajaba mejor en los datos, lo que revelaba que los ratones nulos no solo eran más activos sino que tenían una mayor velocidad de cambio que los ratones de tipo silvestre en respuesta a la metanfetamina, lo que indica una mayor velocidad de respuesta en los ratones.

[0247] Cuando se examinó el punto final de la distancia total, se obtuvo como resultado el mismo patrón de respuestas que se vieron con la actividad horizontal. Por lo que respecta a las mediciones de la actividad horizontal, existía un efecto principal significativo del genotipo tanto antes de la exposición como después. Los ratones nulos en PDE1B viajaban mayores distancias en comparación con los ratones de tipo silvestre tanto en los periodos anteriores a la exposición como posteriores. También se observó un genotipo mediante interacción de intervalo tanto antes de la exposición como después y el patrón era idéntico al que se había visto con las mediciones de la actividad horizontal. Existía una diferencia en los resultados identificada para las mediciones de la actividad total en comparación con los resultados de la actividad horizontal. Esta era que existía un genotipo por interacción sexual que se había visto en el periodo de preexposición. Las hembras nulas solo mostraron una respuesta hiperactiva en relación a la actividad total mientras que los machos nulos no mostraron un aumento significativo en la actividad total de posexposición (FIG. 3). Sin embargo, tras

la exposición a metanfetamina, tanto hembras como machos nulos mostraron hiperactividad estimulada en comparación con los ratones de tipo silvestre. Parecía que existía una respuesta total ligeramente mayor en los ratones macho nulos, aunque los resultados no eran estadísticamente significativos. Los ratones heterocigotos macho también mostraron una respuesta intermedia a la exposición de metanfetamina que aunque no era estadísticamente diferente de la de los ratones macho de tipo silvestre sugería un sutil efecto dosis-gen. Los datos de la distancia se analizaron también en cuanto a la actividad del margen y central; ambos análisis mostraron los mismos efectos e interacciones significativas que se observaron con las mediciones de la distancia total.

[0248] A continuación, se analizó la actividad locomotora en el canal recto y la recogida de datos de un laberinto acuático de Morris. En los ensayos del canal recto, usados para determinar el rendimiento nadando, no existían diferencias significativas entre los tres genotipos, donde todos los ratones mostraban la misma capacidad nadando y motivación para escapar. De forma similar, no existían efectos o interacciones halladas para el aprendizaje por estímulos cuando los estímulos próximos estaban presentes y los estímulos distantes se eliminaban del laberinto acuático de Morris.

[0249] Posteriormente, la memoria y el aprendizaje espacial se analizaron en una prueba del laberinto acuático de Morris con plataforma oculta. Los resultados mostraron que, en la obtención del laberinto acuático de Morris, tanto ratones heterocigotos como ratones nulos en PDE1B tenían una longitud de trayectoria significativamente mayor que los ratones de tipo silvestre (FIG. 5A). También se halló un día significativo por genotipo mediante interacción de plataforma. Aunque los ratones de tipo silvestre probados con la plataforma en ambos cuadrantes tenían una longitud de trayectoria más corta que los ratones heterocigotos o nulos en PDE1B, la interacción era el producto del hecho de que el efecto era mayor de los días 3 al 6 (en el cuadrante sureste). También se observó un ensayo significativo por genotipo mediante efectos de sexo en la longitud de trayectoria pero la contribución al género parecía ser menor. Se vio el mismo patrón cuando se examinó la latencia. Por lo que respecta a las otras mediciones, el efecto era mayor para un cuadrante objetivo que para el otro (sureste). Los ratones heterocigotos y nulos tenían latencias significativamente mayores que los ratones de tipo silvestre en los días 3 y 4. Se observó una prueba por genotipo por interacción de sexo, pero como anteriormente, la contribución del sexo fue menor.

[0250] Cuando se examinaron las curvas de aprendizaje para la prueba, los patrones para la latencia y distancia acumulativa eran similares entre los grupos (FIGS. 5 y 6). Todos los grupos mostraron un comportamiento similar el día 1, lo que indica que no existían diferencias anteriores en el comportamiento entre los genotipos. En días posteriores, los ratones de tipo silvestre mostraron una mejora constante, necesitando trayectorias más cortas para el objetivo en cada día de prueba consecutivo. Por el contrario, los ratones heterocigotos y nulos mostraron menos mejoras cada día que los de tipo silvestre de referencia, lo que tuvo como resultado diferencias en las pruebas de los días 3 al 6. Incluso después de 24 pruebas en el día 6, los ratones heterocigotos y nulos no tenían el mismo comportamiento en comparación con los ratones de tipo silvestre.

[0251] Las medidas de las pruebas de sonda de la longitud de trayectoria y el tiempo de parada en la zona objetivo se analizaron de dos formas. En primer lugar, estos datos se analizaron mediante anillos: un anillo que contiene los sitios de la plataforma diana, uno fuera del borde externo de la plataforma y otro dentro del borde interno de la plataforma. En segundo lugar, se analizaron los datos

de las pruebas de sonda dividiendo el laberinto en cuatro cuadrantes iguales. En general, los ratones heterocigotos y nulos nadaron bastante menos en el anillo diana que los ratones de tipo silvestre (FIG. 7A). Se halló un genotipo significativo mediante interacción de la ubicación de la plataforma tanto en el anillo diana como en el anillo externo. Una vez más, los ratones heterocigotos y nulos nadaron menos en el anillo diana, un efecto que era más pronunciado en la condición sureste comparado con los ratones de tipo silvestre. En cambio, los ratones heterocigotos y nulos nadaron bastante más en el anillo externo que los ratones de tipo silvestre (FIG. 7B). No se halló una diferencia significativa en la longitud de trayectoria dentro del anillo interno, los tiempos de detención o el cruce de plataformas. Se halló una interacción significativa del día por genotipo mediante la ubicación de la plataforma para la distancia media desde el objetivo en el que los ratones heterocigotos estaban significativamente más lejos del sitio objetivo que los ratones de tipo silvestre. Además, los ratones heterocigotos tenían tiempos de detención significativamente más cortos que los ratones de tipo silvestre. No existían diferencias de tiempo o distancia debido a los cuadrantes.

[0252] Para el análisis inverso, no se hallaron diferencias significativas para las medidas de la longitud de trayectoria o la distancia acumulativa. Se observó una prueba por interacción de genotipo para la latencia en la que los ratones nulos tenían latencias significativamente más largas que los ratones de tipo silvestre en la prueba 24 del análisis. No existían diferencias significativas en las pruebas de sonda inversa. Además, no se hallaron diferencias significativas entre los tres genotipos en cuanto a orientación olfativa.

[0253] A continuación se llevaron a cabo los experimentos para determinar si los ratones que carecían del gen PDE1B (ratones nulos en PDE1B) mostrarían una mejora funcional de la fosforilación de proteína mediada por PKA. Los cortes cerebrales del núcleo estriado se prepararon a partir de ratones macho de tipo silvestre y ratones nulos en PDE1B. Los cortes se expusieron al agonista del receptor de tipo dopamina D1, SKF81297 (10 μ M), durante 10 minutos. El efecto del tratamiento en la fosforilación de DARPP-32 en Thr34 y el receptor AMPA GluR1 en Ser845 se midió usando anticuerpos específicos del estado de fosforilación (FIGS. 4C, D); se ha mostrado que estos sustratos se regulan mediante activación de los receptores D1 y PKA (Greengard, P. *et al.* 1999. *Neuron* 23:435-447). El tratamiento del agonista del receptor de dopamina aumentó los niveles de fosfo-Thr34 de DARPP-32 de 4 a 5 veces en los cortes de núcleo estriado de los ratones de tipo silvestre en comparación con los ratones control (sin tratamiento con agonista), mientras el tratamiento con agonista aumentó los niveles de fosfo-Ser845 también de 4 a 5 veces en comparación con los ratones de control (sin tratamiento con agonista) (FIG. 4D). Cuando los cortes de núcleo estriado de los ratones de tipo silvestre y los ratones nulos en PDE1B fueron tratados con el agonista del receptor D1, tanto los niveles de fosfo-Thr34 como fosfo-Ser845 aumentaron de forma significativa en los ratones nulos en PDE1B en comparación con los ratones de control (aumento 15 veces mayor para fosfo-Thr34 y aumento 13 veces mayor para fosfo-Ser845) (FIG. 4D). Además, existía una fosforilación mejorada mediada por D1 que se observó en los cortes de núcleo accumbens de los ratones nulos en PDE1B en comparación con los ratones de tipo silvestre. Resulta interesante que no existieran diferencias significativas en los niveles basales de fosfo-Thr34, fosfo-Ser845 o los niveles totales de DARPP-32 o GluR1 cuando los cortes de núcleo estriado o accumbens sin tratar de los ratones nulos en PDE1B se compararon con cortes de núcleo estriado o accumbens de ratones

de tipo silvestre.

[0254] También se usó forskolina (10 μ M), un activador directo de adenilil ciclasa, para aumentar los niveles de cAMP en los cortes de núcleo estriado de ratones de tipo silvestre y nulos en PDE1B (FIG. 4A). El tratamiento con forskolina provocó un aumento significativamente mayor en los niveles de fosfo-Thr34 de DARPP-32 y fosfo-Ser345 de GluR1 en cortes de núcleo estriado de ratones nulos en PDE1B (aumento 65 veces mayor) cuando se comparó con ratones de tipo silvestre (aumento 21 veces mayor) (FIG. 4B).

[0255] Estos datos han demostrado que los ratones que carecen de actividad PDE1B tienen una actividad locomotora espontánea inducida por metanfetamina significativamente mayor en comparación con los ratones heterocigotos y de tipo silvestre. Los presentes datos bioquímicos demuestran que estos cambios en el comportamiento de ratones deficientes en PDE1B son probablemente una consecuencia de una alteración de las vías del núcleo estriado en el cerebro, vías que son los reguladores predominantes de la actividad locomotora en los animales, entre los que se encuentran los seres humanos. Los cambios de comportamiento observados en los ratones deficientes en PDE1B se observaron en respuesta a un medio innovador (exploración) y en respuesta a una exposición aguda a un fármaco (metanfetamina). Además, los datos mostraron que los ratones deficientes en PDE1B se acostumbraron al medio antes de la exposición a metanfetamina como muestra el hecho de que no existiera diferencia significativa de los animales de tipo silvestre en los últimos 15 minutos del periodo anterior a la exposición. Por lo tanto, los ratones deficientes en PDE1B mostraron un nivel aumentado de actividad en respuesta a la exposición de metanfetamina que no se debía a niveles previos de actividad anteriores a la exposición.

[0256] Está ya establecido que la actividad locomotora es un método convencional para analizar los efectos de neurotóxicos y psicoestimulantes. Se ha mostrado que muchas drogas, como la cocaína y las anfetaminas afectan a la actividad locomotora a través de la regulación de la señalización dopaminérgica en el cerebro (Traficante, L. *et al.* 1976. *Life Sci.* 19:1061-1066). Se sabe que estas drogas se unen al transportador de dopamina en el cerebro, lo que tiene como resultado un exceso de dopamina y una unión de ligandos aumentada a los receptores de dopamina, lo que a su vez tiene como resultado la activación de adenilil ciclasa y un aumento en los niveles intracelulares de cAMP (Giros, B. *et al.* 1996. *Nature* 379: 606-612). Los niveles intracelulares aumentados de cAMP activan a su vez PKA para fosforilar las proteínas celulares incluyendo proteínas como DARPP-32 y CREB (Cunningham, S. y A. Kelley. 1993. *J. Neurosci.* 13:2342-2350; Konradi, C. *et al.* 1994. *J. Neurosci.* 14:5623-5634; Misrendino, M. y E Nestler. 1995. *Brain Res.* 674:299-306). La dopamina unida a los receptores D1 también aumenta los niveles intracelulares de cGMP y lleva a la activación de PKG y la fosforilación de DARPP-32 así como de otras proteínas (Altar, C. *et al.* 1990. *Eur. J. Pharmacol.* 181:17-21; Tsou, K. *et al.* 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3462-3465). Los cambios en esta vía provocan cambios en los niveles de la actividad locomotora como se ha mostrado en numerosos estudios que incluyen ratones que carecen de dopamina, receptores de dopamina, transportador de dopamina o DARPP-32.

[0257] Con los presentes datos que muestran que los ratones deficientes en PDE1B (nulos) tenían niveles aumentados de actividad en comparación con los ratones de tipo silvestre e incluso mayores aumentos en actividad con una exposición aguda a metanfetamina, así como los datos bioquímicos,

se ha demostrado que al eliminar la capacidad de hidrolizar el nucleótido cíclico PDE1B, se ha aumentado la magnitud y la duración de los aumentos generados por el receptor de dopamina en los nucleótidos cíclicos.

[0258] Considerando todo esto, estos datos han demostrado que la actividad de PDE1B está implicada en la locomoción por la actividad en las vías del núcleo estriado del cerebro, así como en el aprendizaje. Los efectos importantes vistos en ratones deficientes en PDE1B indican que PDE1B es un importante regulador de la actividad locomotora así como del aprendizaje en el cerebro. Los datos bioquímicos demuestran que la fosforilación basal no se ve afectada en los ratones *knockout* PDE1B, mientras que la fosforilación mediada por el receptor D1 de DARPP-32 y GlurR1 mejorada en los ratones *knockout* o deficientes en PDE1B apoya el hallazgo de que PDE1B está relacionada con el aprendizaje y la locomoción a través de cambios en la vía de señalización de PDE1B.

[0259] Basándonos en el conocimiento de que PDE1B tiene un papel en la señalización de dopamina en el cerebro, específicamente en áreas que se sabe están asociadas a la locomoción y el aprendizaje, de acuerdo con la presente invención, PDE1B representa una diana innovadora para el desarrollo de nuevos fármacos que podrían usarse para tratar una variedad de enfermedades que incluirían sin carácter limitativo, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, trastorno por déficit de atención (TDA), trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), enfermedad neurodegenerativa, síndrome de Tourette, tic nervioso, síndrome de Lesch-Nyhan, dolor, distonías, abuso de drogas o sustancias, esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo, depresión, trastorno afectivo, trastorno bipolar, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno de la conducta alimentaria, vómito, trastorno de pánico, trastorno de ansiedad, migraña, mioclonos, síndrome premenstrual (SPM), trastorno por estrés postraumático, síndrome carcinoide, enfermedad de Alzheimer, derrame cerebral, epilepsia, trastorno del ritmo circadiano o del sueño (p. ej. insomnio), disfunción sexual, trastorno por estrés, hipertensión y cáncer.

6.3. REFERENCIAS

[0260]

Abel T, Nguygen PV, Barad M, Deuel TA, Kandel ER, Bourtchuladze R (1997) "Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP, in hippocampus-based long-term memory". *Cell* 88:615-626.

Acuff-Smith KD, George M, Lorens SA, Vorhees CV (1992) "Preliminary evidence for methamphetamine-induced behavioral and ocular effects in rat offspring following exposure during early organogenesis". *Psychopharmacology* 109:255-263.

Altar C, Boyar W, Kim H (1990) "Discriminatory roles for D1 and D2 dopamine receptor subtypes in the in vivo control of neostriatal cyclic GMP". *Eur J Pharmacol* 181:17-21.

Bach ME, Hawkins RD, Osman M, Kandel ER, Mayford M (1995) "Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with selective loss of hippocampal LTP in the range of the theta frequency". *Cell* 81:905-915.

Balk J-H, Picetti R, Salardi A, Thirlet G, Dierich A, Depaulis A, LeMeur M, Borrelli E (1995) "Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors". *Nature* 377:424-428.

- Borisy FF, Ronnett GV, Cunningham AM, Julifs D, Beavo JA, Snyder SH (1992) "Calcium/calmodulin-activated phosphodiesterase expressed in olfactory receptor neurons". *J Neurosci* 12:915-923.
- 5 Bourtchuladze R, Frenguelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G, Silva AJ (1994) "Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein". *Cell* 79:59-68.
- Cunningham S, Kelley A (1993) "Hyperactivity and sensitization to psychostimulants following cholera toxin infusion into the nucleus accumbens". *J Neurosci* 13:2342-2350.
- Davis RL, Cherry J, Dauwalder B, Han P-L, Skoulakis E (1995) "The cyclic AMP system and
10 *Drosophila* learning". *Mol Cell Biochem* 149-150:271-278.
- Devan BD, White NM (1999) "Parallel information processing in the dorsal striatum: relation to hippocampal function". *J Neurosci* 19:2789-2798.
- Devan BD, Goad EH, Petri HL (1996) "Dissociation of hippocampal and striatal contributions to spatial navigation in the water maze". *Neurobiol Learn Mem* 66:305-323.
- 15 Devan BD, McDonald RJ, White NM (1999) "Effects of medial and lateral caudate-putamen lesions on place- and cue-guided behaviors in the water maze: relation to thigmotaxis". *Behav Brain Res* 100:5-14.
- D'Hooge R, De Deyn PP (2001) "Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory". *Brain Res Rev* 36:60-90.
- 20 Drago J, Gerfen C, Lachowicz J, Steiner H, Hollon T, Love P, Ooi G, Grinberg A, Lee E, Huang S, Bartlett P, Jose P, Sibley D, Westphal H (1994) "Altered striatal function in a mutant mouse lacking D1A dopamine receptors". *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12564-12568.
- Engels P, Abdel'A1 S, Hulley P, Lubbert H (1995) "Brain distribution of four rat homologues of the *Drosophila dunce* cAMP phosphodiesterase". *J Neurosci Res* 41:169-178.
- 25 Emeux C, VanSande J, Miot F, Cochaux P, Decoster C, Dumont J (1985) "A mechanism in the control of intracellular cAMP level: the activation of a calmodulin-sensitive phosphodiesterase by a rise of intracellular free calcium". *Cell Endocrinol* 43 :123-134.
- Fienberg AA, Hiroi N, Mermelstein PG, Song WJ, Snyder GL, Nishi A, Chermay A, O'Callaghan JP, Miller DB, Cole DG, Corbett R, Haile CN, Cooper DC, Onn SP, Grace AA, Ouimet CC, White
30 FJ, Hyman SE, Surmeier DJ, Girault J-A, *et al.* (1998) "DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission". *Science* 281:838-842.
- Furtado JCS, Mazurek MF (1996) "Behavioral characterization of quinolinate-induced lesions of the medial striatum: relevance for Huntington's disease". *Exp Neurol* 138:158-168.
- Furuyama T, Iwashashi Y, Tano Y, Takagi H, Inahaki S (1994) "Localization of 63 kDa calmodulin-stimulated phosphodiesterase mRNA in the rat brain by in situ hybridization
35 histochemistry". *Mol Brain Res* 26:331-336.
- Gally JA, Montague PR, Reeke GNJ, Edelman GM (1990) "The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system". *Proc Natl Acad Sci USA* 87:3547-3551.
- 40 Garthwaite J (1991) "Glutamate, nitric oxide, and cell-cell signaling in the nervous system". *Trends Neurosci* 14:60-67.

- Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG (1996) "Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter". *Nature* 379:606-612.
- Greengard P, Allen PB, Nairn AC (1999) "Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade". *Neuron* 23:435-447.
- 5 Guzewski JF, McGaugh JL (1997) "Antisense oligodeoxynucleotide mediated disruption of hippocampal cAMP response element binding protein levels impairs consolidation of memory for water maze training". *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2693-2698.
- Hemmings HC, Greengard P (1986) "DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5' - monophosphate-regulated phosphoprotein: regional, tissue, and phylogenetic distribution". *J*
- 10 *Neurosci* 6:1469-1481.
- Hiroi N, Fienberg A, Haile C, Alburges M, Hanson G, Greengard P, Nestler E (1999) "Neuronal and behavioural abnormalities in striatal function in DARPP-32 mutant mice". *Eur J Neurosci* 11:1114-1118.
- Holson RR, Pearce B (1992) "Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species". *Neurotoxicol Teratol* 14:221-228.
- 15 Houslay MD, Sullivan M, Bolger GB (1998) "The multienzyme PDE4 cyclic adenosine monophosphate-specific phosphodiesterase family: intracellular targeting, regulation, and selective inhibition by compounds exerting anti-inflammatory and antidepressant actions". *Adv Pharmacol* 44:225-342.
- 20 Jarrard LE (1993) "On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat." *Behav Neural Biol* 60:9-26.
- Kameyama T, Lee H-K, Bear MF, Huganir RL (1998) "Involvement of a postsynaptic protein kinase A substrate in the expression of homosynaptic long-term depression". *Neuron* 21:1163-1175.
- 25 Kirk RE (1995) *Experimental design: procedures for the behavioral sciences*. Pacific Grove, CA: Brooks/Cole.
- Ko GY, Kelly PT (1999) "Nitric oxide acts as a postsynaptic signaling molecule in calcium/calmodulin-induced synaptic potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons". *J Neurosci* 19:6784-6794.
- 30 Konradi C, Cole R, Heckers S, Hyman S (1994) "Amphetamine regulates gene expression in rat striatum via transcription factor CREB". *J Neurosci* 14:5623-5634.
- Kotter R (1994) "Postsynaptic integration of glutamatergic and dopaminergic signals in the striatum". *Prog Neurobiol* 44:163-196.
- Krinks M, Haiech J, Rhoads A, Klee C (1984) "Reversible and irreversible activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase: separation of the regulatory and catalytic domains by limited proteolysis". En: *Advances in cyclic nucleotide and protein phosphorylation research* (Strada SJ, Thompson W, eds), pp 31-47. New York: Raven.
- 35 Laemmli UK (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* 227:680-685.
- 40 Lal S, Sharma RK, McGregor C, Macaulay RJB (1999) "Immunohistochemical localization of calmodulin-dependent cyclic phosphodiesterase in the human brain". *Neurochem Res* 24:43-49.

- Li H, Zeitler PS, Valerius MT, Small K, Potter SS (1996) "GsH-1, an orphan Hox gene, is regulated for normal pituitary development". *EMBO J* 15:714-724.
- Livingstone MS, Sziber PP, Quinn WG (1984) "Loss of calcium/calmodulin responsiveness in adenylate cyclase of rutabaga, a *Drosophila* learning mutant". *Cell* 37:205-215.
- 5 Ludvig N, Burkmeister V, Jobe PC, Kincaid RL (1991) "Electron microscopic immunocytochemical evidence that the calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase is localized predominantly at postsynaptic sites in the rat brain". *Neuroscience* 44:491-500.
- Malenka RC, Nicoll RA (1999) "Long-term potentiation-a decade of progress?" *Science* 285:1870-1874.
- 10 Mansuy IM, Mayford M, Jacob B, Kandel ER, Bach ME (1998) "Restricted and regulated overexpression reveals calcineurin as a key component in the transition from short-term to long-term memory". *Cell* 92:39-49.
- Mayer B, Koesling D, Bohme E (1993) "Characterization of nitric oxide synthase, soluble guanylyl cyclase, and C2 /calmodulin-stimulated cGMP phosphodiesterase as components of neuronal signal transduction". En: *Advances in second messenger phosphodiesterase research* (Brown BL, Dobson PRM, eds), pp 111-119. New York: Raven.
- 15 Mayford M, Wang J, Kandel ER, O'Dell TJ (1995) "CaMKII regulates the frequency-response function of hippocampal synapses for the production of both LTD, LTP". *Cell* 81:891-904.
- Miserendino M, Nestler E (1995) "Behavioral sensitization to cocaine: modulation by the cyclic AMP system in the nucleus accumbens". *Brain Res* 674:299-306.
- 20 Monsma F, Mahan L, McVittie L, Gerfen C, Sibley D (1990) "Molecular cloning and expression of a D1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation". *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6723-6727.
- Polli JW, Kincaid RL (1994) "Expression of a calmodulin-dependent phosphodiesterase isoform (PDE1B1) correlates with brain regions having extensive dopaminergic innervation". *J Neurosci* 14:1251-1261.
- 25 Qui Y, Davis RL (1993) "Genetic dissection of the learning/memory gene *dunce* of *Drosophila melanogaster*". *Genes Dev* 7:1447-1458.
- Rafales L (1986) "Assessment of locomotor activity". En: *Neurobehavioral toxicology* (Annau Z, ed), pp 54-68. Baltimore: Johns Hopkins UP.
- 30 Reed TM, Browning JE, Blough RI, Vorhees CV, Repaske DR (1998) "Genomic structure and chromosome location of the murine PDE1B phosphodiesterase gene". *Mamm Genome* 9:571-576.
- Repaske DR, Swinnen JV, Jin S-L, VanWyk JJ, Conti M (1992) "A polymerase chain reaction strategy to identify and clone cyclic nucleotide phosphodiesterase cDNAs". *J Biol Chem* 267:18683-18688.
- 35 Saucier D, Hargreaves EL, Boon F, Vanderwolf CH, Cain DP (1996) "Detailed behavioral analysis of water maze acquisition under systemic NMDA or muscarinic antagonism: nonspatial pretraining eliminates spatial learning deficits". *Behav Neurosci* 110:103-116.
- 40 Schenk F (1985) "Development of place navigation in rats from weaning to puberty". *Behav Neural Biol* 43:69-85.

- Sharma RK, Wang J (1985) "Differential regulation of bovine brain calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes by cyclic AMP-dependent protein kinase and calmodulin-dependent phosphatase". *Proc Natl Acad Sci USA* 82:2603-2607.
- 5 Sharma RK, Wang J (1986) "Calmodulin and Ca²⁺-dependent phosphorylation and dephosphorylation of 63 kDa subunit containing bovine brain calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme". *J Biol Chem* 261:1322-1328.
- Skoulakis EMC, Kalderon D, Davis RL (1993) "Preferential expression in mushroom bodies of the catalytic subunit of protein kinase A, its role in learning and memory". *Neuron* 11:197-208.
- Snyder GL, Girault J-A, Chen JYC, Czernik AJ, Keabian JW, Nathanson JA, Greengard P
10 (1992) "Phosphorylation of DARPP-32 and protein phosphatase inhibitor-1 in rat choroid plexus: regulation by factors other than dopamine". *J Neurosci* 12:3071-3083.
- Snyder GL, Fienberg AA, Haganir RL, Greengard P (1998) "A dopamine/ D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated phosphorylation (Mr 32 kDa)/protein phosphatase-1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor". *J Neurosci* 18:10297-10303.
- 15 Soderling SH, Bayuga SJ, Beavo JA (1999) "Isolation and characterization of a dual-substrate phosphodiesterase gene family: PDE10A". *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7071-7076.
- Surmeier DJ, Bargas J, Hemmings HC, Nairn AC, Greengard P (1995) "Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/ phosphatase cascade in rat neostriatal neurons". *Neuron* 14:385-397.
- 20 Towbin H, Staehlin T, Gordon J (1979) "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications". *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354.
- Traficante L, Friedman E, Oleshansky M, Gerson S (1976) "Dopaminesensitive adenylate cyclase and cAMP phosphodiesterase in substantia nigra and corpus striatum of rat brain". *Life Sci*
25 19:1061-1066.
- Tsou K, Snyder G, Greengard P (1993) "Nitric oxide/cGMP pathway stimulates phosphorylation of DARPP-32, a dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, in the substantia nigra". *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3462-3465.
- Upchurch M, Wehner JM (1988) "Differences between inbred strains of mice in Morris water
30 maze performance". *Behav Genet* 18:55-68.
- Wu J, Wang Y, Rowan MJ, Anwyl R (1998) "Evidence for involvement of the cGMP-protein kinase G signaling system in the induction of longterm depression, but not long-term potentiation, in the dentate gyrus". *J Neurosci* 18:3589-3596.
- Xu M, Moratalla R, Gold L, Hiroi N, Koob G, Graybiel A, Tonegawa S (1994) "Elimination of
35 cocaine-induced hyperactivity and dopaminemediated neurophysiological effects in dopamine D1 receptor mutant mice". *Cell* 79:945-955.
- Yan C, Bentley JK, Sonnenburg WK, Beavo JA (1994) "Differential expression of the 61 kDa and 63 kDa calmodulin-dependent phosphodiesterases in the mouse brain". *J Neurosci* 14:973-984.
- Yan C, Zhao AZ, Bentley JK, Loughney K, Ferguson K, Beavo JA (1995) "Molecular cloning and
40 characterization of a calmodulindependent phosphodiesterase enriched in olfactory sensory neurons". *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9677-9681.

Yan C, Zhao AZ, Bentley JK, Beavo JA (1996) "The calmodulin dependent phosphodiesterase gene PDE1C encodes several functionally different splice variants in a tissue-specific manner". *J Biol Chem* 271:25699-25706.

5 Yan Z, Surmeier D (1997) "D5 dopamine receptors enhance Zn²⁺ - sensitive GABAA currents in striatal cholinergic interneurons through a PKA/PP1 cascade". *Neuron* 19:1115-1126.

Yin JCP, Wallach JS, Del Vecchio M, Wilder EL, Zhou H, Quinn WG, Tully T (1994) "Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*". *Cell* 79:49-58.

10 Yuasa K, Kanoh Y, Okumura K, Omori K (2001) "Genomic organization of the human phosphodiesterase PDE11A gene. Evolutionary relatedness with other PDEs containing GAF domains". *Eur J Biochem* 268:168-178.

Zhou Q-Y, Palmiter RD (1995) "Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic, and aphagic". *Cell* 83:1197-1209.

15 Zola-Morgan S, Squire LR (1993) "Neuroanatomy of memory". *Annu Rev Neurosci* 16:547-563.

[0261] La cita de cualquier publicación se presenta para su divulgación anterior a la fecha de presentación y no debería interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a preceder dicha publicación debido a la invención anterior.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

[0262]

<110> Rockefeller University Children's Hospital Medical Center

<120> ACTIVIDAD DE FOSFODIESTERASA Y REGULACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN EN EL CEREBRO MEDIADA POR FOSFODIESTERASA 1B

25 <130> 11181-010-228

<140> Para asignarse

<141> 2002-09-03

<150> 60/316,320

<151> 2001-08-30

30 <160> 7

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 204

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 429 132 T3

Met Asp Pro Lys Asp Arg Lys Lys Ile Gln Phe Ser Val Pro Ala Pro
 1 5 10 15
 Pro Ser Gln Leu Asp Pro Arg Gln Val Glu Met Ile Arg Arg Arg Arg
 20 25 30
 Pro Thr Pro Ala Met Leu Phe Arg Leu Ser Glu His Ser Ser Pro Glu
 35 40 45
 Glu Glu Ala Ser Pro His Gln Arg Ala Ser Gly Glu Gly His His Leu
 50 55 60
 Lys Ser Lys Arg Pro Asn Pro Cys Ala Tyr Thr Pro Pro Ser Leu Lys
 65 70 75 80
 Ala Val Gln Arg Ile Ala Glu Ser His Leu Gln Ser Ile Ser Asn Leu
 85 90 95
 Asn Glu Asn Gln Ala Ser Glu Glu Glu Asp Glu Leu Gly Glu Leu Arg
 100 105 110
 Glu Leu Gly Tyr Pro Arg Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Asp
 115 120 125
 Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Ser Gln Ala Glu Val Leu Lys Val
 130 135 140
 Ile Arg Gln Ser Ala Gly Gln Lys Thr Thr Arg Gly Leu Gly Leu Glu
 145 150 155 160
 Gly Pro Trp Glu Arg Pro Pro Pro Leu Asp Glu Ser Glu Arg Asp Gly
 165 170 175
 Gly Ser Glu Asp Gln Val Glu Asp Pro Ala Leu Ser Glu Pro Gly Glu
 180 185 190
 Glu Pro Gln Arg Pro Ser Pro Ser Glu Pro Gly Arg
 195 200

<210> 2

<211> 201

5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

ES 2 429 132 T3

Met Asp Pro Lys Asp Arg Lys Lys Ile Gln Phe Ser Val Pro Ala Pro
 1 5 10 15
 Pro Ser Gln Leu Asp Pro Arg Gln Val Glu Met Ile Arg Arg Arg
 20 25 30
 Pro Thr Pro Ala Leu Leu Phe Arg Val Ser Glu His Ser Ser Pro Glu
 35 40 45
 Glu Glu Glu Glu Glu Ala Ser Pro His Gln Arg Thr Ser Gly Glu Gly
 50 55 60
 His His Pro Lys Ser Lys Arg Pro Asn Pro Cys Ala Tyr Thr Pro Pro
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Ala Val Arg Arg Leu Gln Thr Ile Ser Asn Leu Ser Glu
 85 90 95
 Asn Gln Ala Ser Glu Glu Glu Asp Glu Leu Gly Glu Leu Arg Glu Leu
 100 105 110
 Gly Tyr Pro Gln Glu Asp Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu Asp
 115 120 125
 Glu Glu Glu Asp Ser Gln Ala Glu Val Leu Lys Gly Ser Arg Gly Thr
 130 135 140
 Val Gly Gln Lys Leu Leu Val Ala Gly Val Trp Arg Gly Pro Gly Ser
 145 150 155 160
 Ala His Leu Leu Trp Met Ser Pro Arg Glu Met Glu Thr Leu Arg Thr
 165 170 175
 Lys Trp Lys Ala Glu Gln His Glx Val Ser Leu Glu Arg Asn Leu Ser
 180 185 190
 Ile Pro Ala Pro Pro Glu Pro Gly Thr
 195 200

<210> 3

<211> 205

5

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 3

ES 2 429 132 T3

Met Asp Pro Lys Asp Arg Lys Lys Ile Gln Phe Ser Val Pro Ala Pro
 1 5 10 15
 Pro Ser Gln Leu Asp Pro Arg Gln Val Glu Met Ile Arg Arg Arg
 20 25 30
 Pro Thr Pro Ala Leu Leu Phe Arg Val Ser Glu His Ser Ser Pro Glu
 35 40 45
 Glu Glu Ser Ser Pro His Gln Arg Thr Ser Gly Glu Gly His His Pro
 50 55 60
 Lys Ser Lys Arg Pro Asn Pro Cys Ala Tyr Thr Pro Pro Ser Leu Lys
 65 70 75 80
 Ala Val Gln Arg Ile Ala Glu Ser His Leu Gln Thr Ile Ser Asn Leu
 85 90 95
 Ser Glu Asn Gln Ala Ser Glu Glu Glu Asp Glu Leu Gly Glu Leu Arg
 100 105 110
 Glu Leu Gly Tyr Pro Asn Glu Asp Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu Asp
 115 120 125
 Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Asp Ser Gln Ala Glu Val Leu Lys Gly
 130 135 140
 Ser Arg Gly Thr Ala Gly Asn Lys Leu Thr Ser Gly Gln Gly Leu Glu
 145 150 155 160
 Gly Pro Trp Glu Arg Pro Pro Pro Leu Asp Glu Pro Gln Arg Asp Gly
 165 170 175
 Asn Ser Glu Asp Gln Gly Glu Gly Arg Ala Thr Gln Ser Glu Pro Gly
 180 185 190
 Glu Glu Pro Arg His Pro Thr Pro Pro Glu Ser Gly Thr
 195 200 205

<210> 4

<211> 203

5

<212> PRT

<213> bovino

<400> 4

ES 2 429 132 T3

Met Asp Pro Lys Asp Arg Lys Lys Ile Gln Phe Ser Val Pro Ala Pro
 1 5 10 15
 Pro Ser Gln Leu Asp Pro Arg Gln Val Glu Met Ile Arg Arg Arg Arg
 20 25 30
 Pro Thr Pro Ala Met Leu Phe Arg Leu Ser Glu His Ser Ser Pro Glu
 35 40 45
 Glu Glu Ala Ser Pro His Gln Arg Ala Ser Gly Glu Gly His His Leu
 50 55 60
 Lys Ser Lys Arg Pro Asn Pro Cys Ala Tyr Thr Pro Pro Ser Leu Lys
 65 70 75 80
 Ala Val Gln Arg Ile Ala Glu Ser His Leu Gln Ser Ile Ser Asn Leu
 85 90 95
 Gly Glu Asn Gln Ala Ser Glu Glu Glu Asp Glu Leu Gly Glu Leu Arg
 100 105 110
 Glu Leu Gly Tyr Pro Arg Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp
 115 120 125
 Glu Glu Glu Glu Glu Asp Ser Gln Ala Glu Val Leu Lys Gly Ser Arg
 130 135 140
 Gly Ser Ala Gly Gln Lys Thr Thr Tyr Gly Gln Gly Leu Glu Gly Pro
 145 150 155 160
 Trp Glu Arg Pro Pro Pro Leu Asp Gly Pro Gln Arg Asp Gly Ser Ser
 165 170 175
 Glu Asp Gln Val Glu Asp Pro Ala Leu Asn Glu Pro Gly Glu Glu Pro
 180 185 190
 Gln Arg Met Pro Ala His Pro Glu Pro Gly Thr
 195 200

<210> 5

<211> 24

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> cebador para PCR

<400> 5

gacactaagt gggatatagct gggg 24

10 <210> 6

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Cebador para PCR

<400> 6

ES 2 429 132 T3

gtggaataa gtctcagggt agg 23

<210> 7

<211> 906

<212> PRT

5

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met	Gln	His	Ile	Phe	Ala	Phe	Phe	Cys	Thr	Gly	Phe	Leu	Gly	Ala	Val
1				5					10					15	
Val	Gly	Ala	Asn	Phe	Pro	Asn	Asn	Ile	Gln	Ile	Gly	Gly	Leu	Phe	Pro
			20					25					30		
Asn	Gln	Gln	Ser	Gln	Glu	His	Ala	Ala	Phe	Arg	Phe	Ala	Leu	Ser	Gln
		35					40					45			
Leu	Thr	Glu	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Pro	Gln	Ile	Asp	Ile	Val	Asn	Ile
	50					55					60				
Ser	Asp	Ser	Phe	Glu	Met	Thr	Tyr	Arg	Phe	Cys	Ser	Gln	Phe	Ser	Lys
65					70					75					80
Gly	Val	Tyr	Ala	Ile	Phe	Gly	Phe	Tyr	Glu	Arg	Arg	Thr	Val	Asn	Met
				85					90					95	
Leu	Thr	Ser	Phe	Cys	Gly	Ala	Leu	His	Val	Cys	Phe	Ile	Thr	Pro	Ser
			100					105					110		
Phe	Pro	Val	Asp	Thr	Ser	Asn	Gln	Phe	Val	Leu	Gln	Leu	Arg	Pro	Glu
		115					120					125			
Leu	Gln	Asp	Ala	Leu	Ile	Ser	Ile	Ile	Asp	His	Tyr	Lys	Trp	Gln	Lys

ES 2 429 132 T3

	130					135						140			
Phe	Val	Tyr	Ile	Tyr	Asp	Ala	Asp	Arg	Gly	Leu	Ser	Val	Leu	Gln	Lys
145					150					155					160
Val	Leu	Asp	Thr	Ala	Ala	Glu	Lys	Asn	Trp	Gln	Val	Thr	Ala	Val	Asn
				165					170					175	
Ile	Leu	Thr	Thr	Thr	Glu	Glu	Gly	Tyr	Arg	Met	Leu	Phe	Gln	Asp	Leu
			180					185					190		
Glu	Lys	Lys	Lys	Glu	Arg	Leu	Val	Val	Val	Asp	Cys	Glu	Ser	Glu	Arg
		195					200				205				
Leu	Asn	Ala	Ile	Leu	Gly	Gln	Ile	Ile	Lys	Leu	Glu	Lys	Asn	Gly	Ile
	210					215					220				
Gly	Tyr	His	Tyr	Ile	Leu	Ala	Asn	Leu	Gly	Phe	Met	Asp	Ile	Asp	Leu
225					230					235					240
Asn	Lys	Phe	Lys	Glu	Ser	Gly	Ala	Asn	Val	Thr	Gly	Phe	Gln	Leu	Val
				245					250					255	
Asn	Tyr	Thr	Asp	Thr	Ile	Pro	Ala	Lys	Ile	Met	Gln	Gln	Trp	Lys	Asn
			260					265					270		
Ser	Asp	Ala	Arg	Asp	His	Thr	Arg	Val	Asp	Trp	Lys	Arg	Pro	Lys	Tyr
		275					280					285			
Thr	Ser	Ala	Leu	Thr	Tyr	Asp	Gly	Val	Lys	Val	Met	Ala	Glu	Ala	Phe
	290					295					300				
Gln	Ser	Leu	Arg	Arg	Gln	Arg	Ile	Asp	Ile	Ser	Arg	Arg	Gly	Asn	Ala
305					310					315					320
Gly	Asp	Cys	Leu	Ala	Asn	Pro	Ala	Val	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Ile	Asp
				325					330					335	
Ile	Gln	Arg	Ala	Leu	Gln	Gln	Val	Arg	Phe	Glu	Gly	Leu	Thr	Gly	Asn
			340					345					350		
Val	Gln	Phe	Asn	Glu	Lys	Gly	Arg	Arg	Thr	Asn	Tyr	Thr	Leu	His	Val
		355					360					365			
Ile	Glu	Met	Lys	His	Asp	Ser	Ile	Arg	Lys	Ile	Gly	Tyr	Trp	Asn	Glu
	370					375					380				
Asp	Asp	Lys	Phe	Val	Pro	Ala	Ala	Thr	Asp	Ala	Gln	Ala	Gly	Gly	Asp
385					390					395					400
Asn	Ser	Ser	Val	Gln	Asn	Arg	Thr	Tyr	Ile	Val	Thr	Thr	Ile	Leu	Glu
			405						410					415	
Asp	Pro	Tyr	Val	Met	Leu	Lys	Lys	Asn	Ala	Asn	Gln	Phe	Glu	Gly	Asn
			420					425					430		
Asp	Arg	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Cys	Val	Glu	Leu	Ala	Ala	Glu	Ile	Ala	Lys
		435					440					445			
His	Val	Gly	Tyr	Ser	Tyr	Arg	Leu	Glu	Ile	Val	Ser	Asp	Gly	Lys	Tyr
	450					455					460				
Gly	Ala	Arg	Asp	Pro	Asp	Thr	Lys	Ala	Trp	Asn	Gly	Met	Val	Gly	Glu

ES 2 429 132 T3

465					470					475					480
Leu	Val	Tyr	Gly	Arg	Ala	Asp	Val	Ala	Val	Ala	Pro	Leu	Thr	Ile	Thr
				485					490					495	
Leu	Val	Arg	Glu	Glu	Val	Ile	Asp	Phe	Ser	Lys	Pro	Phe	Met	Ser	Leu
			500					505					510		
Gly	Ile	Ser	Ile	Met	Ile	Lys	Lys	Pro	Gln	Lys	Ser	Lys	Pro	Gly	Val
		515					520					525			
Phe	Ser	Phe	Leu	Asp	Pro	Leu	Ala	Tyr	Glu	Ile	Trp	Met	Cys	Ile	Val
	530					535					540				
Phe	Ala	Tyr	Ile	Gly	Val	Ser	Val	Val	Leu	Phe	Leu	Val	Ser	Arg	Phe
545					550					555					560
Ser	Pro	Tyr	Glu	Trp	His	Ser	Glu	Glu	Phe	Glu	Glu	Gly	Arg	Asp	Gln
				565					570					575	
Thr	Thr	Ser	Asp	Gln	Ser	Asn	Glu	Phe	Gly	Ile	Phe	Asn	Ser	Leu	Trp
			580					585					590		
Phe	Ser	Leu	Gly	Ala	Phe	Met	Gln	Gln	Gly	Cys	Asp	Ile	Ser	Pro	Arg
		595					600					605			
Ser	Leu	Ser	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Val	Trp	Trp	Phe	Phe	Thr	Leu
	610					615					620				
Ile	Ile	Ile	Ser	Ser	Tyr	Thr	Ala	Asn	Leu	Ala	Ala	Phe	Leu	Thr	Val
625					630					635					640
Glu	Arg	Met	Val	Ser	Pro	Ile	Glu	Ser	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Lys	Gln
				645					650					655	
Thr	Glu	Ile	Ala	Tyr	Gly	Thr	Leu	Glu	Ala	Gly	Ser	Thr	Lys	Glu	Phe
			660					665					670		
Phe	Arg	Arg	Ser	Lys	Ile	Ala	Val	Phe	Glu	Lys	Met	Trp	Thr	Tyr	Met
		675					680					685			
Lys	Ser	Ala	Glu	Pro	Ser	Val	Phe	Val	Arg	Thr	Thr	Glu	Glu	Gly	Met
	690					695					700				
Ile	Arg	Val	Arg	Lys	Ser	Lys	Gly	Lys	Tyr	Ala	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ser
705					710					715					720
Thr	Met	Asn	Glu	Tyr	Ile	Glu	Gln	Arg	Lys	Pro	Cys	Asp	Thr	Met	Lys
				725					730					735	
Val	Gly	Gly	Asn	Leu	Asp	Ser	Lys	Gly	Tyr	Gly	Ile	Ala	Thr	Pro	Lys
			740					745					750		
Gly	Ser	Ala	Leu	Arg	Asn	Pro	Val	Asn	Leu	Ala	Val	Leu	Lys	Leu	Asn
		755					760					765			
Glu	Gln	Gly	Leu	Leu	Asp	Lys	Leu	Lys	Asn	Lys	Trp	Trp	Tyr	Asp	Lys
	770					775					780				
Gly	Glu	Cys	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Asp	Ser	Lys	Asp	Lys	Thr	Ser	Ala
785					790					795					800
Leu	Ser	Leu	Ser	Asn	Val	Ala	Gly	Val	Phe	Tyr	Ile	Leu	Ile	Gly	Gly

ES 2 429 132 T3

				805					810					815		
Leu	Gly	Leu	Ala	Met	Leu	Val	Ala	Leu	Ile	Glu	Phe	Cys	Tyr	Lys	Ser	
			820					825					830			
Arg	Ser	Glu	Ser	Lys	Arg	Met	Lys	Gly	Phe	Cys	Leu	Ile	Pro	Gln	Gln	
		835					840					845				
Ser	Ile	Asn	Glu	Ala	Ile	Arg	Thr	Ser	Thr	Leu	Pro	Arg	Asn	Ser	Gly	
	850					855					860					
Ala	Gly	Ala	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Glu	Asn	Gly	Arg	Val	Val	Ser	
865					870					875					880	
His	Asp	Phe	Pro	Lys	Ser	Met	Gln	Ser	Ile	Pro	Cys	Met	Ser	His	Ser	
				885					890					895		
Ser	Gly	Met	Pro	Leu	Gly	Ala	Thr	Gly	Leu							
			900					905								

Reivindicaciones

1. Método *in vitro* para identificar un compuesto que modula la fosforilación de Thr34 de DARPP-32 en una célula o tejido que consiste en:
 - (a) poner en contacto dicha célula o tejido con un compuesto de ensayo; y
 - (b) determinar un nivel de actividad de PDE1B de dicha célula o tejido;
 donde una diferencia en dicho nivel y un nivel de control de la actividad de PDE1B en una célula o tejido comparable que no ha entrado en contacto con el compuesto de ensayo es indicativo de la capacidad de dicho compuesto para modular la fosforilación de Thr34 de DARPP-32.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la fosforilación de Ser845 del receptor AMPA GluR1 también se modula.
3. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2 donde la diferencia en la actividad de PDE1B es indicativo de la capacidad de dicho compuesto de ensayo para modular la activación dependiente de la fosforilación de DARPP-32 o DARPP-32 y Ser845 del receptor AMPA GluR1.
4. Método para elegir un agente terapéutico potencial para usarlo en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, trastorno por déficit de atención (TDA), trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), enfermedad neurodegenerativa, síndrome de Tourette, tic nervioso, síndrome de Lesch-Nyhan, dolor, distonías, abuso de drogas o sustancias, esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo, depresión, trastorno afectivo, trastorno bipolar, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno de la conducta alimentaria, vómito, trastorno de pánico, trastorno de ansiedad, migraña, mioclonos, síndrome premenstrual (SPM), trastorno por estrés postraumático, síndrome carcinoide, enfermedad de Alzheimer, derrame cerebral, epilepsia, trastorno del ritmo circadiano o del sueño (p. ej. insomnio), disfunción sexual, trastorno por estrés, hipertensión y cáncer, que consiste en:
 - (a) determinar un primer nivel de actividad de PDE1B y de fosforilación de Thr34 de DARPP-32 en un animal no humano;
 - (b) administrar un agente terapéutico potencial a dicho animal;
 - (c) determinar un segundo nivel de actividad de PDE1B y de fosforilación de Thr34 de DARPP-32 en dicho animal;
 - (d) comparar la respuesta de dicho animal con la de un animal de control al que no se le ha administrado el agente terapéutico potencial.
 - (e) elegir un agente terapéutico potencial basándose en la diferencia en las respuestas observadas y en los niveles de actividad de PDE1B y de fosforilación de Thr-32 de DARPP-32 entre dicho animal y dicho animal de control.
5. Método de acuerdo con la reivindicación 4 donde el animal es un ratón.
6. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 4 o 5 en el que el trastorno es la enfermedad de Parkinson.

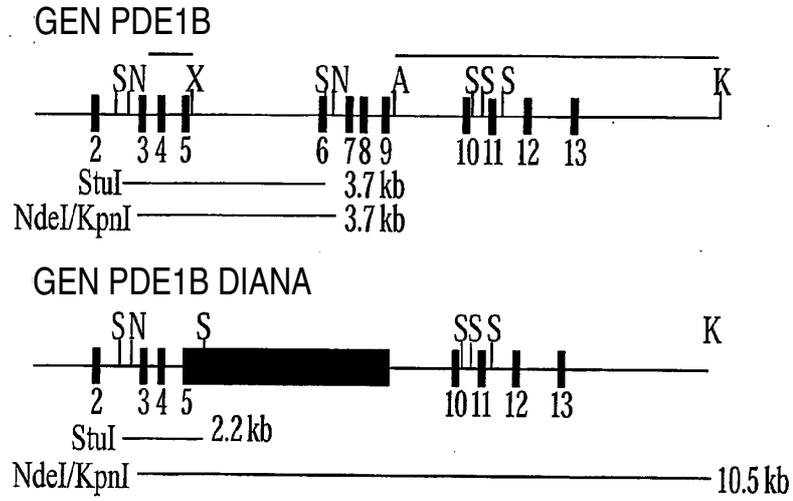
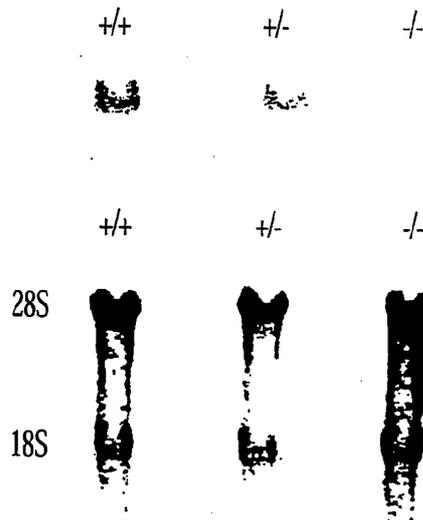


Fig. 1A

Fig. 1B



Fig. 1C



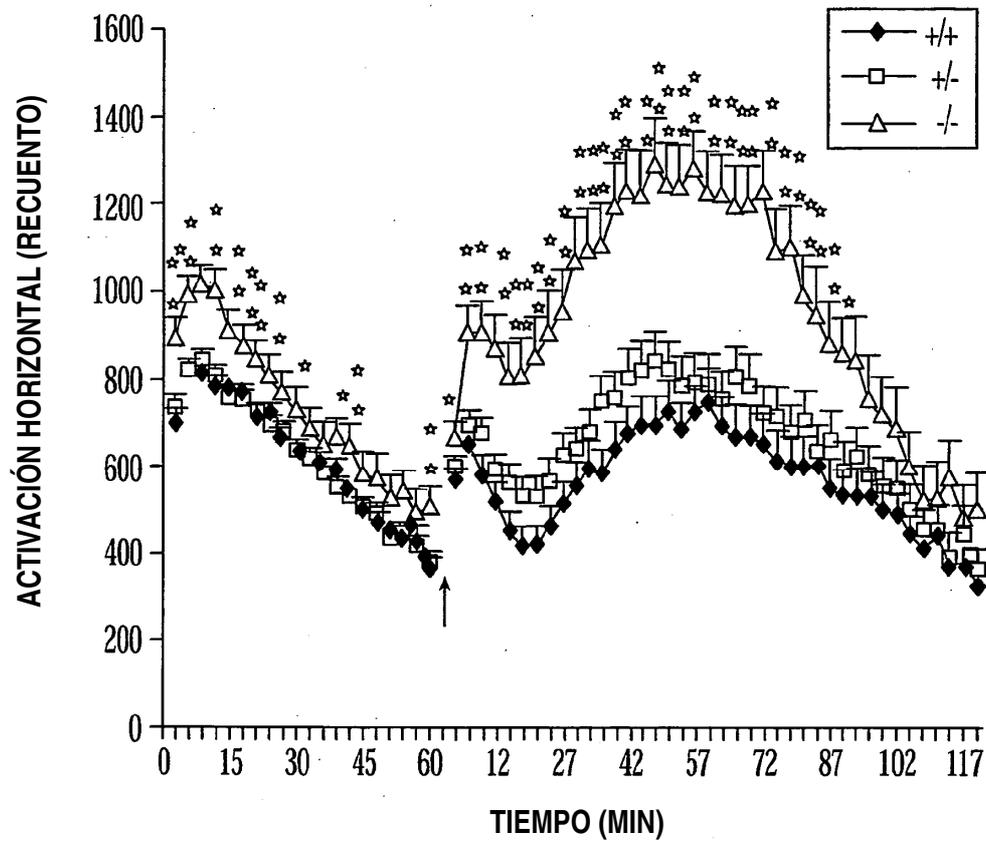


Fig. 2

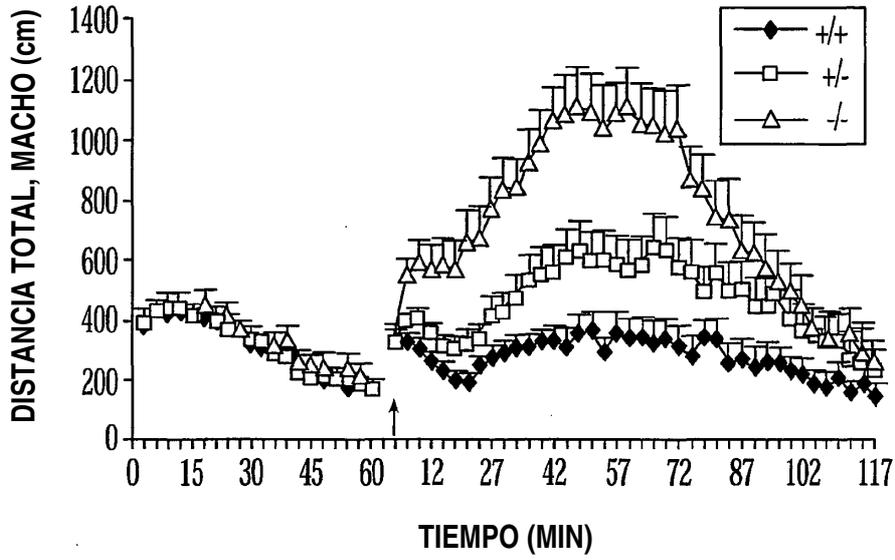


Fig. 3A

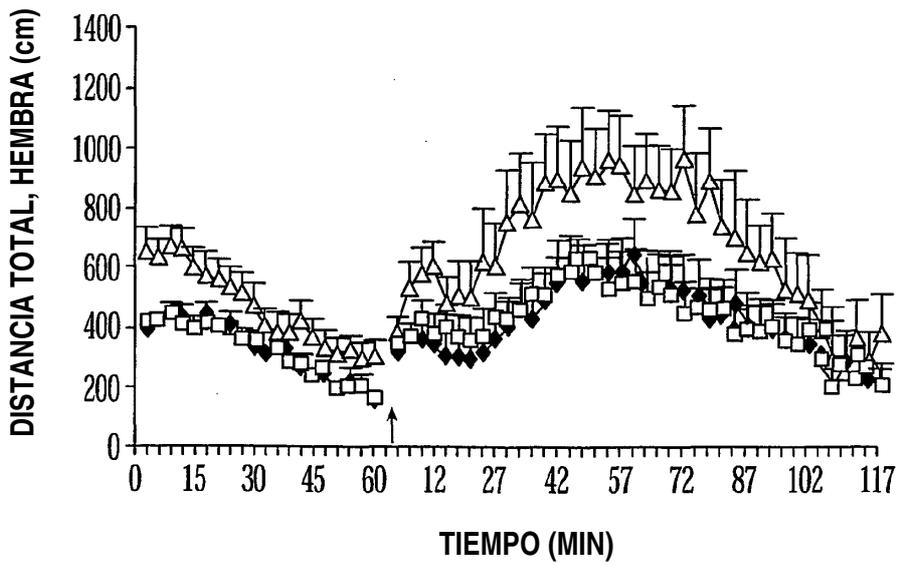


Fig. 3B

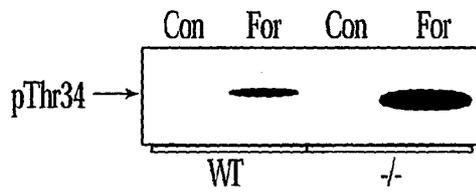


Fig. 4A

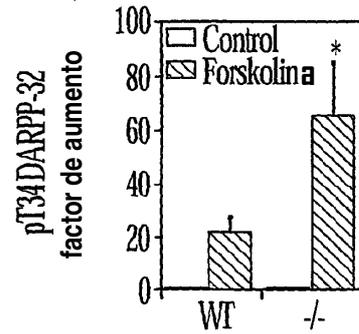


Fig. 4B

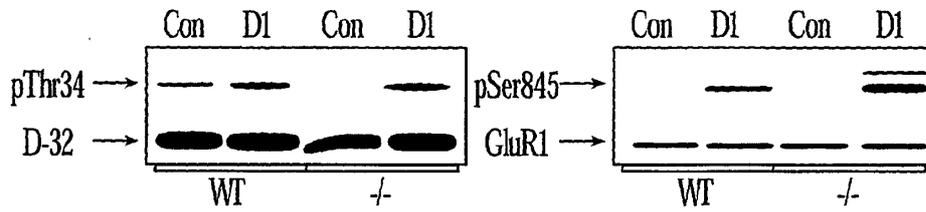


Fig. 4C

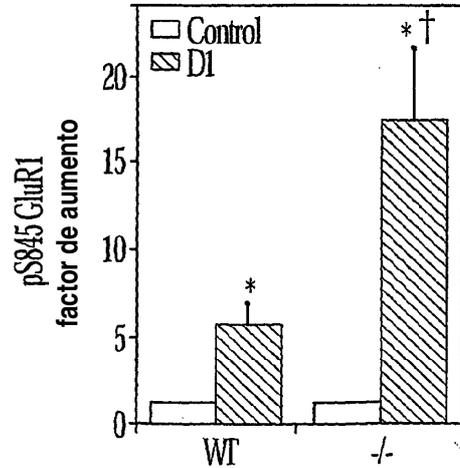
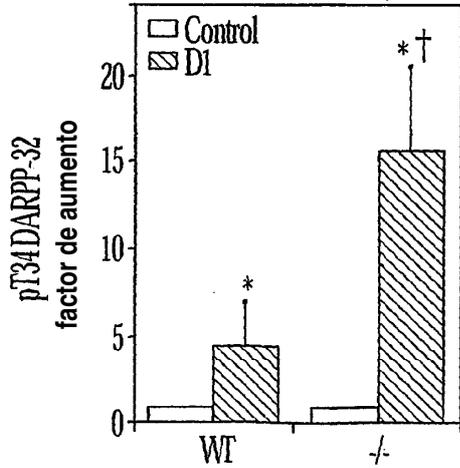


Fig. 4D

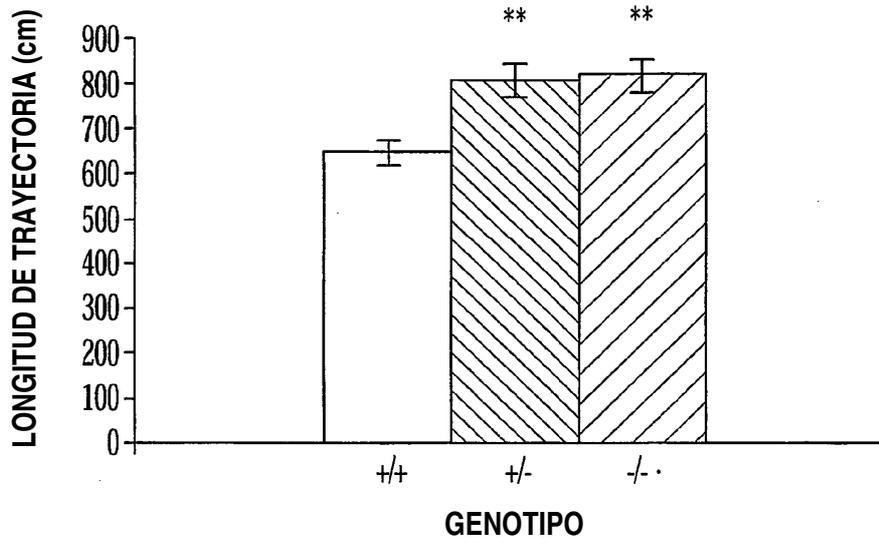


Fig. 5A

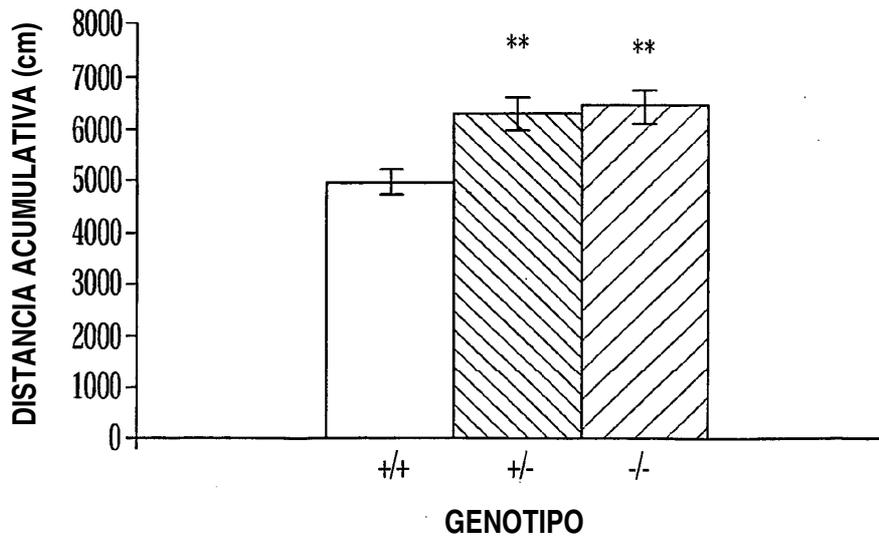


Fig. 5B

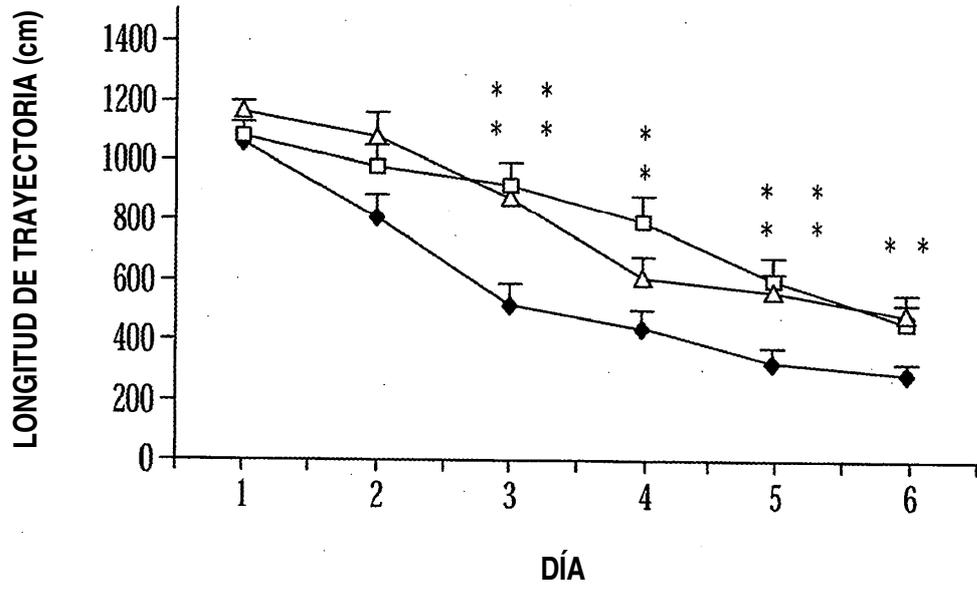


Fig. 6

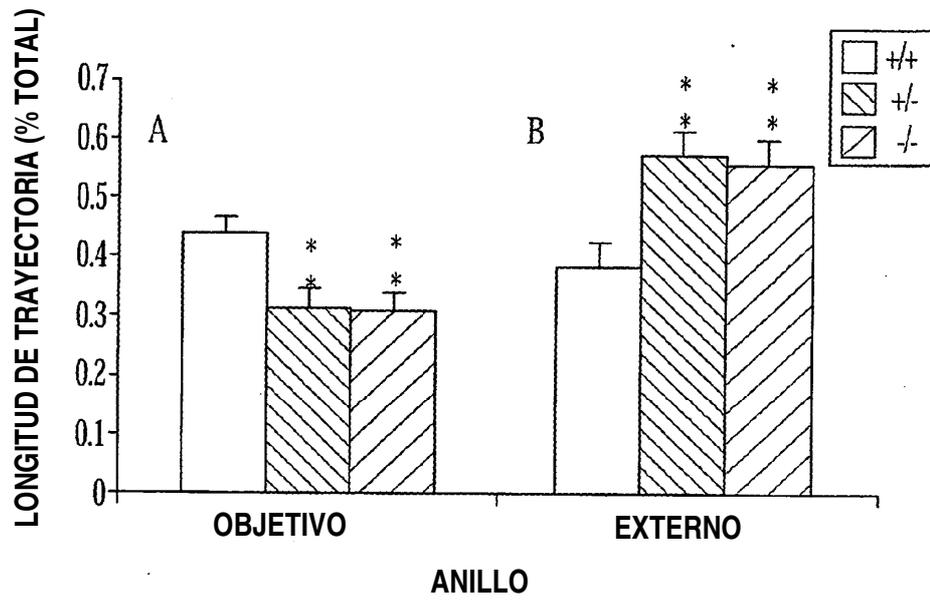


Fig. 7