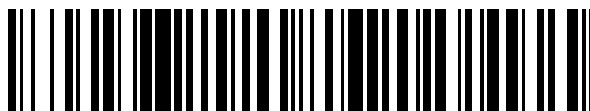


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 042**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2003** **E 09015472 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013** **EP 2177626**

54 Título: **Métodos de detección de potenciadores cognitivos**

30 Prioridad:

19.08.2002 US 404620 P
26.08.2002 US 406405 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
07.05.2014

73 Titular/es:

DART NEUROSCIENCE (CAYMAN) LTD (100.0%)
10 Market Street, PO Box 774, Camana Bay
Grand Cayman KY1-9006, KY

72 Inventor/es:

TULLY, TIMOTHY P.;
SCOTT, RODERICK E. M. y
BOURTCHOULADZE, RUSIKO

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 459 042 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de detección de potenciadores cognitivos

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] Se estima que entre 4 y 5 millones de americanos (un 2 % de todas las edades y un 15 % de los mayores de 65 años) tienen alguna forma o grado de deterioro cognitivo. El deterioro cognitivo (disfunción o pérdida de las funciones cognitivas, proceso por el que el conocimiento se adquiere, se retiene y se utiliza) se produce comúnmente en asociación con condiciones o trastornos del sistema nervioso central (SNC), incluyendo el deterioro de la memoria asociado a la edad, delirio (algunas veces llamado síndrome confusional agudo), demencia (algunas veces clasificada como de tipo Alzheimer o de tipo no Alzheimer), Alzheimer, Parkinson, enfermedad de Huntington (corea), enfermedad cerebrovascular (por ejemplo, apoplejía, isquemia), trastornos afectivos (por ejemplo, depresión), trastornos psicóticos (por ejemplo, esquizofrenia, autismo (Síndrome de Kanner), trastornos neuróticos (por ejemplo, ansiedad, trastorno obsesivo - compulsivo), trastorno por déficit de atención (TDA), hematoma subdural, hidrocefalia de presión normal, tumor cerebral, traumatismo craneal o cerebral.

[0002] La disfunción cognitiva se manifiesta comúnmente por uno o más déficits cognitivos, que incluyen el deterioro de la memoria (deterioro de la capacidad para aprender nueva información o recordar información aprendida previamente), afasia (alteración del lenguaje / habla), apraxia (deterioro de la capacidad para realizar actividades motoras a pesar de que la función motora está intacta), agnosia (deterioro para reconocer o identificar objetos a pesar de mantener intacta la función sensorial), alteración de la función ejecutiva (es decir; planificación, organización, secuenciación, abstracción).

[0003] La disfunción cognitiva provoca un deterioro significativo del funcionamiento social y / o laboral, que puede interferir en la capacidad de un individuo para realizar actividades de la vida diaria y afecta enormemente a la autonomía y calidad de vida de un individuo. De este modo, hay un interés considerable en la identificación de candidatos clínicos para su utilización en la rehabilitación de un animal con cualquier forma de disfunción cognitiva.

30 RESUMEN DE LA INVENCION

[0004] La presente invención se refiere a métodos (ensayos) basados de alto rendimiento en células para identificar o cribar potenciadores cognitivos que actúan aumentando la función de la vía de CREB. La invención permite la identificación de potenciadores cognitivos que tienen poco o ningún efecto en la función de la vía de CREB, aunque actúan para aumentar (potenciar) la función de la vía de CREB en combinación con un agente de estimulación de la función de CREB. Se espera que los potenciadores cognitivos identificados según la invención proporcionen candidatos clínicos eficaces para su utilización en la rehabilitación de un animal con disfunciones cognitivas y para utilizarlos en la potenciación de la memoria o rendimiento cognitivo normal (capacidad o función) en un animal normal. Los "potenciadores cognitivos" se refieren asimismo en la presente como "compuestos capaces de potenciar la función de la vía de CREB" y los "fármacos potenciadores de la vía de CREB". Los "agentes de estimulación" se refieren asimismo en la presente como "agentes que estimulan la función de la vía de CREB". Se entiende que, en ciertos casos, un potenciador cognitivo identificado según la presente invención puede ser un agente de estimulación de la función de CREB. De este modo, puede identificarse un agente de estimulación de la función de CREB como un potenciador cognitivo utilizando los métodos descritos en la presente.

[0005] Como se describe en el presente documento, los métodos de identificación o cribado para potenciadores cognitivos comprenden un cribado primario, un cribado secundario y un cribado terciario. Preferiblemente, el cribado primario es un método basado en células utilizado en la identificación de compuestos candidatos confirmados; y el cribado terciario utiliza un modelo de comportamiento para identificar potenciadores cognitivos.

[0006] El cribado primario comprende: (a) poner en contacto células huésped (particularmente células de origen neuronal (por ejemplo, neuroblastomas, células madre neuronales)) que comprenden un gen indicador operativamente unido a un promotor CRE con un compuesto de ensayo y con una dosis subóptima de un agente de estimulación de la función de CREB (por ejemplo, forskolina); (b) determinar la actividad del indicador en las células huésped que se han puesto en contacto con el compuesto de ensayo y con el agente de estimulación de la función de CREB; (c) comparar la actividad del indicador determinada en el paso (b) con la actividad del indicador en las células de control que se han puesto en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB y que no se han puesto en contacto con el compuesto de ensayo (es decir; células de control que sólo se han puesto en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB); (d) seleccionar el compuesto de ensayo si (1) la actividad del indicador en el paso (b) ha aumentado estadísticamente de forma significativa con respecto a la actividad del indicador en las células de control de el paso (c); y (2) la actividad del indicador en las células de control que no se han puesto en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB y que se han puesto en contacto con el compuesto de ensayo (es decir; células de control que sólo se han puesto en contacto con el compuesto de ensayo) no es significativamente diferente con respecto a la actividad del indicador en las células de control que no se han puesto en contacto ni con el agente de estimulación de la función de CREB ni con compuesto de ensayo (es decir; células de control que no se han puesto en contacto con nada); (e) repetir los pasos (a) – (d)

con diferentes concentraciones (por ejemplo, 2 o más) de los compuestos de ensayos seleccionados en el paso (d); y (f) seleccionar el compuesto de ensayo si (1) la actividad del indicador se incrementa proporcionalmente de manera significativa en las diferentes concentraciones para dicho compuesto de ensayo con respecto a la actividad del indicador en las células de control que se han puesto en contacto sólo con el agente de estimulación de la función de CREB; y (2) la actividad del indicador en las células de control que se han introducido sólo en las diferentes concentraciones del compuesto de ensayo, no es significativamente diferente con respecto a la actividad del indicador en las células de control que no se han puesto en contacto ni con el agente de estimulación de la función de CREB ni con el compuesto de ensayo, en el que el compuesto de ensayo se identifica como un compuesto candidato. En una realización particular, las células huésped se ponen en contacto con el compuesto de ensayo antes de ponerse en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB. En otra realización, el gen indicador codifica la luciferasa. Un gen indicador operativamente unido a un promotor CRE se refiere también en la presente como un gen indicador mediado por CRE. Un gen indicador mediado por CRE es un ejemplo de transgen mediado por CRE.

[0007] Alternativamente, el cribado primario comprende: (a) poner en contacto células huésped (particularmente células de origen neuronal (por ejemplo, neuroblastomas, células madre neuronales)) con un compuesto de ensayo y con una dosis subóptima de un agente de estimulación de la función de CREB (por ejemplo, forskolina); (b) evaluar la expresión génica endógena dependiente de CREB en las células huésped que se han puesto en contacto con el compuesto de ensayo y con el agente de estimulación de la función de CREB; (c) comparar la expresión génica endógena dependiente de CREB evaluada en el paso (b) con la expresión génica endógena dependiente de CREB en las células de control que se han puesto en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB y que no se han puesto en contacto con el compuesto de ensayo (es decir; células de control que sólo se han puesto en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB); (d) seleccionar el compuesto de ensayo si (1) la expresión génica endógena dependiente de CREB determinada en el paso (b) está estadísticamente aumentada de forma significativa con respecto a la expresión génica endógena dependiente de CREB en las células de control de el paso (c); y (2) la expresión génica dependiente de CREB en las células de control que no se han puesto en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB y que se han puesto en contacto con el compuesto de ensayo (es decir; células de control que se han puesto sólo en contacto con el compuesto de ensayo) no es significativamente diferente con respecto a la expresión génica dependiente de CREB en las células de control que no se han puesto en contacto ni con el agente de estimulación de la función de CREB ni con el compuesto de ensayo (es decir; células de control que no se han puesto en contacto con nada); (e) repetir los pasos (a) – (d) con diferentes concentraciones (por ejemplo, 2 o más) de los compuestos de ensayos seleccionados en el paso (d); y (f) seleccionar el compuesto de ensayo si (1) la expresión génica dependiente de CREB se incrementa proporcionalmente de manera significativa en las diferentes concentraciones para dicho compuesto de ensayo con respecto a la expresión génica dependiente de CREB en las células de control que se han puesto en contacto sólo con el agente de estimulación de la función de CREB; y (2) la expresión génica dependiente de CREB en las células de control que se han introducido sólo en las diferentes concentraciones del compuesto de ensayo, no es significativamente diferente con respecto a la expresión génica dependiente de CREB en las células de control que no se han puesto en contacto ni con el agente de estimulación de la función de CREB ni con compuesto de ensayo, en el que el compuesto de ensayo se identifica como un compuesto candidato. En una realización particular, las células huésped se ponen en contacto con el compuesto de ensayo antes de ponerse en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB.

[0008] El cribado secundario comprende: (a) poner en contacto células de origen neuronal (por ejemplo, células primarias del hipocampo)) con un compuesto candidato identificado en el cribado primario y con una dosis subóptima de un agente de estimulación de la función de CREB; (b) evaluar la expresión génica endógena dependiente de CREB en las células huésped que se han puesto en contacto con el compuesto candidato y con el agente de estimulación de la función de CREB; (c) comparar la expresión génica endógena dependiente de CREB evaluada en el paso (b) con la expresión génica endógena dependiente de CREB en las células de control que se han puesto en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB y que no se han puesto en contacto con el compuesto candidato (es decir; células de control que sólo se han puesto en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB). Una diferencia estadísticamente significativa en la expresión génica dependiente de CREB evaluada en el paso (b) comparada a la expresión génica dependiente de CREB en las células de control que sólo se han puesto en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB y no hay diferencias significativas en la expresión génica dependiente de CREB en las células de control que no se han puesto en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB y que se han puesto en contacto con el compuesto candidato (es decir; células de control que no se ponen en contacto ni con el agente de estimulación de la función de CREB ni con el compuesto candidato (es decir; células de control que no se han puesto en contacto con nada), identifica el compuesto candidato como un compuesto candidato confirmado. En una realización particular, las células se ponen en contacto con el compuesto candidato antes de ponerse en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB.

[0009] Alternativamente, el cribado secundario comprende: (a) poner en contacto células de origen neuronal (en particular neuronas primarias (por ejemplo, células primarias del hipocampo)) que comprenden un gen indicador operativamente unido a un promotor CRE con un compuesto candidato identificado en el cribado primario y con una dosis subóptima de un agente de estimulación de la función de CREB; (b) determinar la actividad del indicador en

las células que se han puesto en contacto con el compuesto candidato y con el agente de estimulación de la función de CREB; (c) comparar la actividad del indicador evaluada en el paso (b) con la actividad del indicador en las células que se han puesto en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB y que no se han puesto en contacto con el compuesto candidato (es decir; células de control que sólo se han puesto en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB). Una diferencia estadísticamente significativa en la actividad del indicador determinada en el paso (b) comparada a la actividad del indicador en las células de control que sólo se han puesto en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB y que no se han puesto en contacto con el compuesto candidato (es decir; células de control que sólo se ponen en contacto con un compuesto candidato) con respecto a la actividad del indicador en las células de control que no se han puesto en contacto ni con el agente de estimulación de la función de CREB ni con el compuesto candidato (es decir; células de control que no se pusieron en contacto con nada), identifica el compuesto candidato como un compuesto candidato confirmado. En una realización particular, las células se ponen en contacto con el compuesto candidato antes de ponerse en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB.

[0010] En una realización particular, las células de origen neuronal utilizadas en el cribado secundario son diferentes de las células huésped utilizadas en el cribado primario. En otra realización, el gen endógeno mediado por CRE o el transgen mediado por CRE en el cribado secundario es diferente del transgen mediado por CRE o del gen endógeno mediado por CRE en el cribado primario. Por ejemplo, en una realización, las células huésped del cribado primario son neuroblastomas y las células del cribado secundario no son neuroblastomas. En otra realización, el transgen mediado por CRE del cribado primario es luciferasa (CRE operativamente unido al gen de la luciferasa) y el transgen mediado por CRE en el cribado secundario no es luciferasa. En una realización particular, las células huésped del cribado primario son células proliferativas (como neuroblastomas y células madre neuronales) y las células del cribado secundario no son células proliferativas diferenciadas de origen neuronal (como neuronas o células gliales). En otra realización particular, el gen mediado por CRE del cribado primario es un gen indicador mediado por CRE (un transgen mediado por CRE) y un gen mediado por CRE del cribado secundario es un gen endógeno mediado por CRE.

[0011] En una realización, el cribado terciario es un método de comportamiento para evaluar la formación de la memoria a largo plazo en un animal que comprende: (a) administrar una cantidad eficaz de un compuesto candidato confirmado identificado en el cribado secundario en el animal (por ejemplo, un ser humano, otro mamífero, vertebrado o invertebrado); (b) enseñar al animal administrado con el compuesto candidato confirmado en condiciones apropiadas para producir la formación de la memoria a largo plazo en el animal; (c) evaluar la formación de la memoria a largo plazo en el animal enseñado en el paso (b); y (d) comparar la formación de memoria a largo plazo evaluada en el paso (c) con la formación de la memoria a largo plazo producida en el animal de control al que no se le ha administrado el compuesto candidato confirmado. Si se observa una mejora en la formación de la memoria a largo plazo evaluada en el animal tratado con el candidato compuesto confirmado con respecto a la formación de la memoria a largo plazo evaluada en el animal de control, el compuesto candidato confirmado se identifica como un potenciador cognitivo. Los cribados terciarios con protocolos similares están disponibles utilizando métodos conductuales (modelos) para otras disfunciones cognitivas.

[0012] La invención se refiere también a métodos de evaluación del efecto de un compuesto en una expresión génica dependiente de CREB (expresión génica mediada por CRE) que comprende: (a) poner en contacto células de origen neuronal (en particular neuronas primarias (por ejemplo, células primarias del hipocampo)) con un compuesto que ha de ser evaluado y con una dosis subóptima de un agente de estimulación de la función de CREB; (b) evaluar la expresión génica endógena dependiente de CREB en las células que se han puesto en contacto con el compuesto y con el agente de estimulación de la función de CREB; (c) comparar la expresión génica endógena dependiente de CREB evaluada en el paso (b) con la expresión génica endógena dependiente de CREB en las células de control que se han puesto en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB y que no se han puesto en contacto con el compuesto (es decir; células de control que sólo se han puesto en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB). Una diferencia estadísticamente significativa en la expresión génica dependiente de CREB evaluada en el paso (b) comparada a la expresión génica dependiente de CREB en las células de control que sólo se han puesto en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB y no hay diferencias significativas en la expresión génica dependiente de CREB en las células de control que no se han puesto en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB y que se han puesto en contacto con el compuesto (es decir; células de control que se pusieron en contacto con el compuesto) con respecto a la expresión génica dependiente de CREB en las células de control que no se han puesto en contacto ni con el agente de estimulación de la función de CREB ni con el compuesto (es decir; células de control que no se pusieron en contacto con nada), identifica el compuesto como un compuesto que ha de ser evaluado antes de ponerse en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB. Preferiblemente, el compuesto que ha de ser evaluado es un compuesto candidato identificado en el cribado primario.

[0013] Alternativamente, los métodos de evaluación del efecto de un compuesto en una expresión génica dependiente de CREB comprende: (a) poner en contacto células de origen neuronal (en particular neuronas primarias (por ejemplo, células primarias del hipocampo)) que comprenden un gen indicador operativamente unido a un promotor CRE con un compuesto que ha de ser evaluado y con una dosis subóptima de un agente de estimulación de la función de CREB; (b) determinar la actividad del indicador en las células que se han puesto en

contacto con el compuesto y con el agente de estimulación de la función de CREB; y (c) comparar la actividad del indicador determinada en el paso (b) con la actividad del indicador en las células de control que se han puesto en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB y que no se han puesto en contacto con el compuesto (es decir; células de control que sólo se han puesto en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB). Una diferencia estadísticamente significativa en la actividad del indicador determinada en el paso (b) comparada a la actividad del indicador en las células de control que no se han puesto en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB y que se han puesto en contacto con el compuesto (es decir; células de control que se pusieron en contacto sólo con el compuesto) con respecto a la actividad del indicador en las células de control que no se han puesto en contacto ni con el agente de estimulación de la función de CREB ni con el compuesto (es decir; células de control que no se pusieron en contacto con nada), identifica el compuesto como un compuesto con un efecto en la expresión génica dependiente de CREB. En una realización particular, las células se ponen en contacto con el compuesto que ha de ser evaluado antes de ponerse en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB. Preferiblemente, el compuesto que ha de ser evaluado es un compuesto candidato identificado en el cribado primario.

[0014] En una realización particular, las células utilizadas en los métodos de evaluación del efecto del compuesto en la expresión génica dependiente de CREB son diferentes de las células huésped del cribado primario. En otra realización, el gen endógeno mediado por CRE o el transgen mediado por CRE utilizado en los métodos de evaluación del efecto de un compuesto en la expresión génica dependiente de CREB son diferentes del transgen mediado por CRE o del gen endógeno mediado por CRE del cribado primario.

[0015] La invención se refiere además a métodos para evaluar el efecto de un potenciador cognitivo en la formación de la memoria a largo plazo en un animal que comprende: (a) administrar una cantidad eficaz de un potenciador cognitivo en un animal (por ejemplo, un ser humano, otro mamífero, vertebrado o invertebrado); (b) enseñar al animal al que se le ha administrado el potenciador cognitivo en condiciones apropiadas para producir la formación de la memoria a largo plazo en el animal; (c) evaluar la formación de la memoria a largo plazo en el animal enseñado en el paso (b); y (d) comparar la formación de la memoria a largo plazo evaluada en el paso (c) con la formación de la memoria a largo plazo producida en el animal de control al que no se le ha administrado el potenciador cognitivo. Si se observa una diferencia en la formación de la memoria a largo plazo evaluada en el animal tratado con el potenciador cognitivo con respecto a la formación de la memoria a largo plazo evaluada en el animal de control, el potenciador cognitivo puede definirse como potenciador (mejorado, aumentado) de la formación de la memoria a largo plazo en el animal.

[0016] Los potenciadores cognitivos identificados según la invención pueden utilizarse para reducir la duración y / o el número de sesiones de aprendizaje requeridas para la inducción en un(os) circuito(s) neuronal(es) específico(s) de un patrón de actividad neuronal o para reducir la duración y / o número de sesiones de aprendizaje requerido para inducir el cambio funcional / estructural a largo plazo dependiente de CREB (es decir; de larga duración) entre conexiones sinápticas del circuito neuronal. Los potenciadores cognitivos identificados según la invención pueden utilizarse para reducir el número de sesiones de aprendizaje requeridas para inducir el aumento del rendimiento respecto al obtenido sólo con el aprendizaje o para permitir intervalos de descanso más cortos o sin descanso entre las sesiones de aprendizaje para inducir un aumento del rendimiento o para incrementar el nivel global de rendimiento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0017]

La Figura 1 es un gráfico de barras que muestra los resultados de la mejora de la memoria (parcial) inducida por fármacos en ratones normales mediante rolipram, un inhibidor prototípico de la fosfodiesterasa (PDE). La retentiva de cinco días tras aprendizaje suave (2x) es menor que el aprendizaje fuerte (5x). Sólo la memoria tras el aprendizaje suave es mejorada por inyecciones bilaterales en el hipocampo (1 µl) de rolipram inmediatamente después de el aprendizaje. El rolipram redujo el número de sesiones el aprendizaje requeridas para producir memoria. % de congelación = % del tiempo de observación que pasaron los ratones congelados / inmóviles.

La Figura 2 es un diagrama esquemático que muestra que los cambios dependientes de la experiencia en la actividad neuronal modulan las expresión génica. Algunos de estos cambios en la expresión génica provocaron cambios funcionales y estructurales en las conexiones sinápticas entre neuronas. De esta manera, el circuito neuronal se ajusta constantemente para optimizar las respuestas de percepción, cognición y comportamiento.

La Figura 3 es un gráfico de barras que muestra los resultados de control antisentido de un ácido nucleico bloqueado (ANB) de CREB. Los oligos LNB de CREB se enumeran en el orden en el que fueron designados. Los oligos LNB de CREB que no se cribaron (es decir; CREB 4, 10, 11, 13 y 14) no se muestran.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0018] El factor de transcripción CREB desempeña un papel primordial en la formación de la memoria a largo plazo y en la plasticidad sináptica subyacente de largo plazo. Los estudios del comportamiento genético de aprendizaje olfativo de Pavlov en *Drosophila* ha establecido el CREB como un conmutador central para la conversión de nueva información adquirida desde la memoria a corto plazo hasta la memoria a largo plazo (Tully, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(9): 4239 - 4241 (1997)). El aprendizaje separada tras la tarea de asociación de choque olfativo de Pavlov induce una memoria a largo plazo dependiente de la síntesis proteica (Tully, T. et al., Cell, 79(1): 35 - 47 (1994)), cuya formación está bloqueada específicamente por la expresión inducida de un transgen represor de CREB (Yin, J.C. et al., Cell, 79(1): 49 - 58 (1994)). El aprendizaje y la memoria a corto plazo (previamente) son normales en estas moscas transgénicas (Tully, T. et al., Cell, 79(1): 35 - 47 (1994); y Yin, J.C. et al., Cell, 79(1): 49 - 58 (1994)). Por el contrario, estos resultados sobre la pérdida de la función, la expresión inducida de un transgen activador de CREB potencia la memoria a largo plazo específicamente por derogar los requisitos de las sesiones de aprendizaje repetitivas y para un intervalo de descanso entre cada sesión (Yin, J.C. et al., Cell, 81(1): 107 - 115 (1995)). Una sesión de aprendizaje es suficiente para formar una memoria máxima a largo plazo en moscas transgénicas que sobreexpresan un activador de CREB (Yin, J.C. et al., Cell, 81(1): 107 - 115 (1995)). No se ha producido más memoria a largo plazo. Más bien, se induce memoria a largo plazo con menos práctica.

[0019] El documento WO0213867 analiza el aprendizaje de ratones transgénicos, que llevan un gen indicador dependiente de CRE (betagalactosidasa), en el hipocampo induciendo de ese modo una transcripción genética dependiente de CRE en áreas anatómicas específicas del cerebro de mamíferos. De este modo, la formación de la memoria a largo plazo (MLP) se halla vinculada a la transcripción genética dependiente de CRE en áreas anatómicas específicas del cerebro de mamíferos. A continuación en el documento, la solicitud pone en evidencia el hecho a fin de tratar los déficits cognitivos asociados a trastornos o condiciones del SNC en un animal, se requiere administrar un denominado agente aumentador (denominado a continuación en el texto como “fármacos potenciadores de la vía de CREB”) que mejora la función de la vía de CREB (página 15). Por “mejora de la función de la vía de CREB”, el documento WO0213867 se refiere a la capacidad para potenciar o mejorar la expresión génica dependiente de CREB. La expresión génica dependiente de CREB puede potenciarse o mejorarse incrementando la producción endógena de CREB, por ejemplo estimulando directa o indirectamente el gen endógeno para producir cantidades aumentadas de CREB, o aumentando CREB funcional (descrito en la página 10), especial atención para las reivindicaciones 1 – 27. La forskolina como agente de estimulación de la función de CREB se menciona particularmente en la página 17, segundo y último párrafo y en la página 18.

[0020] Esta mejora de la memoria es también específica en la asociación temporal de dos estímulos. Los elevados niveles del activador de CREB fueron inducidos en todas las células de la mosca debido a la utilización de un promotor de choque térmico con el transgen. Ante la falta de aprendizaje no se observó ningún efecto mensurable en el comportamiento de las moscas. Además, las presentaciones repartidas de olor y el shock, desplazados en el tiempo, fracasaron en la producción de la memoria a largo plazo en moscas en el activador de CREB (las moscas son inducidas para expresar elevados niveles del activador de CREB). Estos resultados sugieren que el aprendizaje asociativo induce una señalización aguas arriba requerida para activar (fosforilar) el conmutador de CREB durante la formación de la memoria a largo plazo olfativa.

[0021] Un creciente grupo de pruebas se extiende a estos resultados desde invertebrados a mamíferos. Por ejemplo, en *Aplysia*, las manipulaciones moleculares de la expresión de CREB, similares a las de las moscas, suprimen o potencian (1) la memoria a largo plazo de una respuesta electrofisiológica facilitadora en una monosinapsis sensoriomotora en el cultivo celular y (2) las conexiones sinápticas entre las neuronas motoras y sensoriales que se producen normalmente tras las aplicaciones repartidas de los estímulos facilitadores (Bartsch, D. et al., Cell, 83(6): 979 - 992 (1995)). En un estudio centrado en una forma de memoria traumática, conocido como condicionamiento del miedo (Bourtchuladze, R. et al., Cell, 79(1): 59 - 68 (1994)), ratones mutante que llevan un *knock – out* parcial de CREB mostraron un aprendizaje normal y una memoria a corto plazo normales aunque se derogó en la memoria a largo plazo. Por el contrario, los ratones normales requieren sólo un ensayo de aprendizaje para formar una memoria a largo plazo de esta experiencia. Estos resultados sugieren que (1) para el experimento del condicionamiento del miedo, la memoria a largo plazo formada en ratones normales era más parecida a la de las moscas del activador de CREB y (2) la mutación de CREB en los ratones fue parcial, reducen la cantidad de isoforma(s) activadora(s) con respecto a la(s) isoforma(s) represora(s). Esto indica que los ratones mutantes de CREB pueden tener un conmutador funcional de CREB que se establece en un nivel similar al de las moscas normales. Como tal, el aprendizaje separado recuperaría el déficit de la memoria a largo plazo en los ratones mutantes de CREB. De hecho, Kogan et al. mostraron que la memoria a largo plazo puede formarse normalmente en ratones mutantes de CREB sometidos a un aprendizaje separado, proporcionando así un fuerte soporte para el modelo de conmutador de CREB (Kogan, J.H. et al., Curr. Biol., 7(1): 1 - 11 (1997)).

[0022] En las ratas, las inyecciones de oligonucleótidos de ARN antisentido en el hipocampo o en las amígdalas bloquean la formación de la memoria a largo plazo de dos tareas diferentes que son dependientes de la actividad en estas regiones anatómicas, respectivamente (Guzowski, J.F. and McGaugh, J.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(6): 2693 - 2698 (1997); y Lamprecht, R. et al., J. Neurosci., 17(21): 8443 - 8450 (1997)). En particular, los experimentos antisentido de ARN revelaron un papel para CREB durante la formación de la memoria a largo plazo de una tarea de

laberinto de agua (dependiente del hipocampo) y una aversión del gusto condicionada (dependiente de la amígdala) en ratas (Guzowski, J.F. and McGaugh, J.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(6): 2693 - 2698 (1997); y Lamprecht, R. et al., J. Neurosci., 17(21): 8443 - 8450 (1997)).

[0023] Experimentos más recientes han expresado un activador de CREB en la amígdala y se ha observado la formación de la memoria mejorada de una respuesta de sobresalto potenciada por el miedo en ratas, con un distintivo de CREB similar a la observada en moscas (Josselyn, S.A. et al., *Society for Neuroscience*, 28th Annual Meeting, Vol. 24, Abstract 365.10 (1998); y Josselyn, S.A. et al., J. Neurosci., 21(7): 2404 - 2412 (2001)).

[0024] Las observaciones celulares en ratones y ratas han reforzado estos resultados conductuales revelando que la función neuronal de CREB (fosforilación o regulación de genes) se modula en un modelo dependiente de la experiencia (Impey, S. et al., Neuron, 16(5): 973 - 982 (1996); Taubenfeld S.M. et al., Nat. Neurosci., 2(4): 309 - 310 (1999); y Taubenfeld, S.M. et al., J. Neurosci., 21(1): 84 - 91 (2001)).

[0025] Además de involucrarse en la formación de la memoria experimental, el CREB aparece también en la función del desarrollo y plasticidad celular de diversas regiones corticales (Ahn, S. et al., Neuron, 23(3): 559 - 568 (1999); Barth, A.L. et al., J. Neurosci., 20(11): 4206 - 4216 (2000); Glazewski, S. et al., Cerebral Cortex, 9(3): 249 - 256 (1999); Pham, T.A. et al., Neuron, 22(1): 63 - 72 (1999); y Pham, T.A. et al., Neuron, 31(3): 409 - 420 (2001)). La actividad neuronal aumenta la actividad del CREB en la corteza (Moore, A.N. et al., J. Biol. Chem., 271(24): 14214 - 14220 (1996)). El CREB también media en la plasticidad del desarrollo en el hipocampo (Murphy, D.D. and Segal, M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(4): 1482 - 1487 (1997)), en la corteza somatosensorial (Glazewski, S. et al., Cerebral Cortex, 9(3): 249 - 256 (1999)), en el cuerpo estriado (Liu, F.C. and Graybiel, A.M., Neuron, 17(6): 1133 - 1144 (1996)) y en la corteza visual (Pham, T.A. et al., Neuron, 22(1): 63 - 72 (1999)). Estos datos apoyan la idea de que el CREB es un conmutador molecular involucrado generalmente en la conversión de la actividad neuronal en cambios estructurales de sinapsis. Como tal, la vía de CREB representa (1) una diana significativa para el descubrimiento de un nuevo fármaco y (2) una cabeza de playa genética para la identificación de genes aguas abajo que participan además en la plasticidad sináptica dependiente de la actividad.

[0026] La presente invención proporciona métodos de identificación o cribado para estos fármacos, también se refiere en la presente como potenciadores cognitivos. La invención proporciona métodos (ensayos) de alto rendimiento basados en células para identificar o cribar potenciadores cognitivos que actúan incrementando la función de la vía de CREB.

[0027] Los potenciadores cognitivos pueden incrementar, potenciar o mejorar la función de la vía de CREB gracias a diversos mecanismos. Por ejemplo, un potenciador cognitivo puede afectar a la vía de transducción de señales que conduce a la inducción de la expresión génica dependiente de CREB. La inducción de la expresión génica dependiente de CREB puede lograrse, por ejemplo, a través del aumento de efectores positivos de la función de CREB y / o la disminución de los efectores negativos de la función de CREB. Los efectores positivos de la función de CREB incluyen adenilato ciclasas y activadores de CREB. Los efectos negativos de la función de CREB incluyen cAMP fosforiestedasa (cAMP PDE) y represores de CREB.

[0028] Un potenciador cognitivo puede incrementar, potenciar o mejorar la función de la vía de CREB actuando bioquímicamente aguas arriba o actuando directamente en una forma activadora o represora de una proteína de CREB y / o en una proteína de CREB que contiene un complejo de transcripción. Por ejemplo, la función de la vía de CREB puede estar afectada transcripcionalmente, post - transcripcionalmente o ambas, aumentando los niveles de la proteína de CREB; modificando la afinidad de la proteína de CREB en otros componentes necesarios del complejo de transcripción como, por ejemplo, la proteína de unión a CREB (proteína CBP); modificando la capacidad de una proteína de CREB que contiene un complejo de transcripción para los elementos sensibles a CREB del ADN en la región promotora; o por el aumento de la inmunidad pasiva o activa de las isoformas de la proteína de CREB. El mecanismo particular por el que los potenciadores aumentan, se potencian o mejoran la función de la vía de CREB no es crítico para la práctica de la invención.

[0029] Por "aumentar función de la vía de CREB" o "potenciar la función de la vía de CREB" se entiende la capacidad para aumentar, potenciar o mejorar la expresión génica dependiente de CREB. Por "modular la función de la vía de CREB" se entiende la capacidad para modular la expresión génica dependiente de CREB. La expresión génica dependiente de CREB puede aumentarse, potenciarse o mejorarse incrementando la producción endógena de CREB, por ejemplo estimulando directa o indirectamente el gen endógeno para producir cantidades aumentadas de CREB, o incrementando el CREB funcional (biológicamente activo). Véanse las Patentes U.S. N° 5.929.223, 6.051.559 y la Publicación Internacional N° WO96/ 11270 (publicada el 18 de abril de 1996). Por "aumentar el CREB funcional (biológicamente activo)" se entiende la inclusión de la capacidad de aumentar la capacidad de unión del ADN, estado de fosforilación, estabilidad proteica, localización subcelular, etc. La expresión génica dependiente de CREB puede modularse incrementando o disminuyendo la producción endógena de CREB, por ejemplo estimulando directa o indirectamente el gen endógeno para producir cantidades aumentadas o disminuidas de CREB, o incrementando o disminuyendo el CREB funcional (biológicamente activo).

[0030] Como se describe en la presente, los métodos de identificación o cribado de potenciadores cognitivos

comprenden un cribado primario, un cribado secundario y un cribado terciario. Preferiblemente, el cribado primario es un método basado en células utilizado para identificar compuestos candidatos; el cribado secundario es un método basado en células para identificar compuestos candidatos confirmados; y el cribado terciario utiliza un modelo conductual para identificar potenciadores cognitivos. Los cribados primario y secundario incluyen métodos de alto rendimiento basados en células.

[0031] El cribado primario comprende: (a) poner en contacto células huésped que comprenden un gen indicador operativamente unido a un promotor CRE con un compuesto de ensayo y con una dosis subóptima de un agente de estimulación que activa las vías de señalización en CREB (por ejemplo; (b) determinar la actividad del indicador en las células huésped que se han puesto en contacto con el compuesto de ensayo y con el agente de estimulación; (c) comparar la actividad del indicador determinada en el paso (b) con la actividad del indicador en las células de control que se han puesto en contacto con el agente de estimulación y que no se han puesto en contacto con el compuesto de ensayo (células de control que sólo se han puesto en contacto con el agente de estimulación); (d) seleccionar el compuesto de ensayo si (1) la actividad del indicador en el paso (b) ha aumentado estadísticamente de forma significativa con respecto a la actividad del indicador en las células de control de el paso (c); y (2) la actividad del indicador en las células de control que no se han puesto en contacto con el agente de estimulación y que se han puesto en contacto con el compuesto de ensayo (células de control que se han puesto sólo en contacto con el compuesto de ensayo) no es significativamente diferente con respecto a la actividad del indicador en las células de control que no se han puesto en contacto ni con el agente de estimulación ni con el compuesto de ensayo (células de control que no se han puesto en contacto con nada); (e) repetir los pasos (a) – (d) con diferentes concentraciones del compuesto de ensayo seleccionado en el paso (d); y (f) seleccionar el compuesto de ensayo si (1) la actividad del indicador se incrementa proporcionalmente de manera significativa en las diferentes concentraciones para dicho compuesto de ensayo con respecto a la actividad del indicador en las células de control que se han puesto en contacto sólo con el agente de estimulación; y (2) la actividad del indicador en las células de control que se han introducido sólo en las diferentes concentraciones del compuesto de ensayo, no es significativamente diferente con respecto a la actividad del indicador en las células de control que no se han puesto en contacto ni con el agente de estimulación ni con el compuesto de ensayo, en el que el compuesto de ensayo se identifica como un compuesto candidato. En una realización particular, el compuesto de ensayo se selecciona en el paso (f) si (1) la actividad del indicador se incrementa proporcionalmente de manera significativa en el rango lineal de las diferentes concentraciones para dicho compuesto de ensayo; y (2) la actividad del indicador en las células de control que se han introducido sólo en las diferentes concentraciones del compuesto de ensayo, no es significativamente diferente con respecto a la actividad del indicador en las células de control que no se han puesto en contacto ni con el agente de estimulación ni con el compuesto de ensayo. En otra realización, las células huésped se ponen en contacto con el compuesto de ensayo antes de ponerse en contacto con el agente de estimulación.

[0032] Alternativamente, el cribado primario comprende: (a) poner en contacto células huésped con un compuesto de ensayo y con una dosis subóptima de un agente de estimulación que activa las vías de señalización en CREB; (b) evaluar la expresión génica endógena dependiente de CREB en las células huésped que se han puesto en contacto con el compuesto de ensayo y con el agente de estimulación; (c) comparar la expresión génica endógena dependiente de CREB evaluada en el paso (b) con la expresión génica endógena dependiente de CREB en las células de control que se han puesto en contacto con el agente de estimulación y que no se han puesto en contacto con el compuesto de ensayo (células de control que sólo se han puesto en contacto con el agente de estimulación); (d) seleccionar el compuesto de ensayo si (1) la expresión génica endógena dependiente de CREB determinada en el paso (b) ha estadísticamente aumentado de forma significativa con respecto a la expresión génica endógena dependiente de CREB en las células de control de el paso (c); y (2) la expresión génica dependiente de CREB en las células de control que no se han puesto en contacto con el agente de estimulación y que se han puesto en contacto con el compuesto de ensayo (células de control que se han puesto sólo en contacto con el compuesto de ensayo), no es significativamente diferente con respecto a la expresión génica dependiente de CREB en las células de control que no se han puesto en contacto ni con el agente de estimulación ni con el compuesto de ensayo (células de control que no se han puesto en contacto con nada); (e) repetir los pasos (a) – (d) con diferentes concentraciones del compuesto de ensayo seleccionado en el paso (d); y (f) seleccionar el compuesto de ensayo si (1) la expresión génica dependiente de CREB ha incrementado proporcionalmente de manera significativa en las diferentes concentraciones para dicho compuesto de ensayo con respecto a la expresión génica dependiente de CREB en las células de control que se han puesto en contacto sólo con el agente de estimulación; y (2) la expresión génica dependiente de CREB en las células de control que se ha introducido sólo en las diferentes concentraciones del compuesto de ensayo, no es significativamente diferente con respecto a la expresión génica dependiente de CREB en las células de control que no se han puesto en contacto ni con el agente de estimulación ni con el compuesto de ensayo, en el que el compuesto de ensayo se identifica como un compuesto candidato. En una realización particular, el compuesto de ensayo se selecciona en el paso (f) si (1) la expresión génica dependiente de CREB ha incrementado proporcionalmente de manera significativa en el rango lineal de las diferentes concentraciones para dicho compuesto de ensayo; y (2) la expresión génica dependiente de CREB en las células de control que se han introducido sólo en las diferentes concentraciones del compuesto de ensayo no es significativamente diferente con respecto a la expresión génica dependiente de CREB en las células de control que no se han puesto en contacto ni con el agente de estimulación ni con el compuesto de ensayo. En otra realización, las células huésped se ponen en contacto con el compuesto de ensayo antes de ponerse en contacto con el agente de estimulación.

[0033] Preferiblemente, el “agente de estimulación que activa las vías de señalización en CREB” utilizado en el cribado primario es un agente de estimulación de la función de CREB. El agente de estimulación de la función de CREB es un agente capaz de estimular la función de la vía de CREB. Por “estimular la función de la vía de CREB” se entiende la capacidad de estimular una expresión génica dependiente de CREB estimulando la expresión endógena de CREB, por ejemplo estimulando directa o indirectamente el gen endógeno para producir cantidades aumentadas de CREB, o incrementando el CREB funcional (biológicamente activo). Véanse, por ejemplo las Patentes U.S. Nº 5.929.223, 6.051.559 y la Publicación Internacional Nº WO96/ 11270 (publicada el 18 de abril de 1996). Los “agentes de estimulación de la función de CREB” incluyen fármacos, compuestos químicos, compuestos iónicos, compuestos orgánicos, ligandos orgánicos, incluyendo cofactores, sacáridos, péptidos recombinantes y sintéticos, proteínas, peptoides, secuencias de ácido nucleico, incluyendo genes, productos de ácido nucleico, y otras moléculas y composiciones. Los agentes de estimulación de la función de CREB pueden ser activadores de la adenilato ciclasa 1 (AC1) (por ejemplo, forskolina); análogos de cAMP de células permeantes (por ejemplo, 8 – bromo cAMP); agentes (neurotransmisores) que afectan al receptor unido a la proteína G, tal como, aunque no se limita a los receptores adrenérgicos, a los receptores opioides y a sus ligandos (por ejemplo, isoproterenol, fenetilaminas); moduladores de la concentración intracelular de calcio (por ejemplo, cloruro potásico, tapsigargina, N – metil – D – aspartato (NMDA) agonistas de los receptores); inhibidores (antagonistas) de las fosfodiesterasas responsables del colapso de cAMP (por ejemplo, rolipram (que inhibe la fosfodiesterasa 4), iso – buto – meto – xantina (IBMX) (que inhibe las fosfodiesterasas 1 y 2)); moduladores (agonistas) de las proteínas quinasas y las proteínas fosfatasa, que median en la activación de la proteína de CREB y en la expresión génica dependiente de CREB. Los agentes de estimulación de la función de CREB pueden ser también compuestos capaces de potenciar la función de CREB en el sistema nervioso central (SNC). Dichos compuestos incluyen, de manera no limitante, compuestos que afectan a la estabilidad y la fluidez de la membrana y a la inmunoestimulación específica.

[0034] Las vías de señalización que se activan en CREB incluyen una vía de señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y la proteína quinasa A (PKA). Por lo tanto, los agentes de estimulación que activan las vías de señalización en CREB incluyen inhibidores de quinasa de MAPK/ Erk (MEK). Otros agentes de estimulación que activan las vías de señalización en CREB son conocidos y fácilmente disponibles para los expertos en la disciplina.

[0035] En otra realización, el cribado primario puede ser reemplazado por un método de cribado utilizando *Drosophila*, en el que el método de cribado comprende: (a) administrar un compuesto de ensayo a *Drosophila* que tiene un gen indicador operativamente unido a un promotor CREB; (b) evaluar la actividad del indicador en *Drosophila* que se ha administrado en el compuesto de ensayo; y (c) comparar la actividad del indicador evaluada en el paso (b) con la actividad del indicador en *Drosophila* de control que no se ha administrado al compuesto de ensayo. Una diferencia estadísticamente significativa en la actividad del indicador en el paso (b) comparada a la actividad del indicador en *Drosophila* de control que no se ha administrado al compuesto de ensayo identifica el compuesto de ensayo como compuesto candidato.

[0036] Las células huésped comprenden un gen indicador operativamente unido al promotor CRE que puede ser fabricado introduciendo en las células un constructo de ADN que comprende un gen indicador operativamente unido al promotor CRE. Los constructos de ADN pueden ser introducidos en células según los métodos conocidos en la disciplina (por ejemplo, transformación, absorción directa, precipitación con fosfato de calcio, electroporación, bombardeo de proyectiles, utilización de liposomas). Dichos métodos se describen con más detalle por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición (New York: Cold Spring Harbor University Press) (1989); y Ausubel, et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (New York: John Wiley & Sons) (1998).

[0037] La *Drosophila* comprende un gen indicador operativamente unido al promotor CRE que puede ser producido como el descrito en Belvin et al., *Neuron*, 22(4): 777 - 787 (1999).

[0038] Los constructos de ADN comprenden un gen indicador operativamente unido al promotor CRE que puede ser fabricado como el descrito, por ejemplo en Ausubel et al., *Current Protocols In Molecular Biology* (New York: John Wiley & Sons) (1998); y Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición (New York: Cold Spring Harbor University Press) (1989).

[0039] Como se utiliza en la presente, el término “promotor” se refiere a una secuencia de ADN, generalmente a aguas arriba (5´) de la región codificadora de un gen estructural, que controla la expresión de la región codificadora proporcionando reconocimiento y sitios de unión para la ARN polimerasa y otros factores que pueden requerirse para la iniciación de la transcripción. Los promotores CRE se conocen en la disciplina.

[0040] El término “gen indicador”, tal y como se utiliza en la presente, se refiere a una secuencia de ácido nucleico cuyo producto puede evaluarse fácilmente, por ejemplo, colorimétricamente como un producto de reacción enzimática, como el gen que codifica la luciferasa. Otros ejemplos de genes indicadores ampliamente utilizados incluyen enzimas codificadoras, como β – galactosidasa, β – glucuronidasa y β – glucosidasa; moléculas luminiscentes, como la proteína verde fluorescente y la luciferasa “firefly”; y marcadores auxotróficos como, His3p e Ura3p. Véase, por ejemplo, Ausubel et al., *Current Protocols In Molecular Biology* (New York: John Wiley & Sons, Inc.), Capítulo 9 (1998)).

[0041] Las células (por ejemplo, las células huésped, las células de origen neuronal, etc) se ponen en contacto con el compuesto de ensayo y / o un agente de estimulación de la función de CREB que iniciará el compuesto de ensayo y / o un agente de estimulación de la función de CREB.

[0042] Por “dosis subóptima del agente de estimulación de la función de CREB” se entiende la cantidad, o dosis del agente de estimulación de la función de CREB que se requiere para estimular (inducir) la función de la vía de CREB a un nivel que es superior a los niveles endógenos (basales), de tal modo que el incremento estadísticamente significativo de la función de la vía de CREB debido a la inducción por un potenciador cognitivo puede ser medido y la medición no es atribuible a las fluctuaciones o variaciones celulares naturales como consecuencia de las fluctuaciones celulares naturales. Una dosis subóptima del agente de estimulación de la función de CREB es que la dosis o concentración donde la cantidad del efecto (actividad del indicador, expresión génica dependiente de CREB) es proporcional a la dosis o concentración y la cantidad del efecto no cambia cuando la dosis o concentración varía. La dosis subóptima del agente de estimulación de la función de CREB se determina empíricamente y variará dependiendo de los factores, incluyendo las características farmacodinámicas de un agente de estimulación de la función de CREB particular y se pueden poner en contacto células particulares. Por ejemplo, la dosis subóptima del agente de estimulación de la función de CREB puede determinarse (a) poniendo en contacto las diferentes muestras de una célula huésped que comprende un gen indicador operativamente unido al promotor CRE con una concentración diferente del agente de estimulación de la función de CREB; y (b) determinando las concentraciones del agente de estimulación de la función de CREB requerido para afectar a la actividad del indicador desde el punto de partida hasta la respuesta máxima evaluando la actividad del indicador en las muestras de la célula huésped. La dosis subóptima del agente de estimulación de la función de CREB será cualquier concentración que proporcione un rendimiento (1) del 50 % o menos de la actividad del indicador máxima y (2) una actividad del indicador por encima de las fluctuaciones celulares naturales. La determinación de la dosis subóptima del agente de estimulación de la función de CREB está dentro de la capacidad de los expertos en la disciplina. Por “dosis subóptima de un agente de estimulación que activa las vías de señalización en CREB” se entiende la cantidad o dosis de un agente de estimulación que se requiere para estimular (inducir) vías de señalización en CREB.

[0043] Por “diferentes concentraciones del compuesto de ensayo” se entiende 2 o más (es decir; 2, 3, 4, 5, etc.) concentraciones diferentes del compuesto de ensayo. Las concentraciones seleccionadas generalmente flanquean la concentración del compuesto de ensayo en el paso (a) del cribado primario. Por “rango lineal de (diferentes) concentraciones” se entienden las concentraciones en las que el efecto (actividad del indicador, expresión génica dependiente de CREB) se incrementa con la concentración, aunque antes de que el efecto no cambie con los cambios de concentración. La selección de concentraciones está dentro de la capacidad de los expertos en la disciplina.

[0044] Por “CREB funcional (biológicamente activo)” se entiende incluir la capacidad de la proteína de unión de ADN, estado de fosforilación, estabilidad proteica, localización subcelular, etc.

[0045] “Expresión génica dependiente de CREB” se refiere también en el presente documento como “expresión génica mediada por CRE”. La expresión génica dependiente de CREB puede determinarse por métodos conocidos en la disciplina (por ejemplo, *Northern blot*, *Western blot*). Dichos métodos se describen con más detalle, por ejemplo, en Ausubel et al., *Current Protocols In Molecular Biology* (New York: John Wiley & Sons) (1998); y Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición (New York: Cold Spring Harbor University Press (1989)).

[0046] “Genes endógenos mediados por CRE” se refieren también en la presente como “genes endógenos dependientes de CRE”. Dichos genes se conocen en la disciplina e incluyen, por ejemplo, c – fos, prodinorfina, tPA y factor neurotrópico derivado del cerebro (FND) (Barco, A. et al., *Cell*, 108(5): 689 - 703 (2002)). Los genes mediados por CRE puede también identificarse por los expertos en la disciplina utilizando métodos conocidos y fácilmente disponibles en la disciplina (véanse, por ejemplo, Ausubel et al., *Current Protocols In Molecular Biology* (New York: John Wiley & Sons) (1998); y Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición (New York: Cold Spring Harbor University Press (1989)).

[0047] El cribado secundario comprende: (a) poner en contacto células de origen neuronal con un compuesto candidato identificado en el cribado primario y con una dosis subóptima de un agente de estimulación que activa las vías de señalización en CREB; (b) evaluar la expresión génica endógena dependiente de CREB en las células que se han puesto en contacto con el compuesto candidato y con el agente de estimulación; (c) comparar la expresión génica endógena dependiente de CREB evaluada en el paso (b) con la expresión génica endógena dependiente de CREB en las células de control que se han puesto en contacto con el agente de estimulación y que no se han puesto en contacto con el compuesto candidato (células de control que sólo se han puesto en contacto con el agente de estimulación). Una diferencia estadísticamente significativa en la expresión génica dependiente de CREB evaluada en el paso (b) comparada a la expresión génica dependiente de CREB en las células de control identifica el compuesto candidato como un compuesto candidato confirmado. Preferiblemente, no hay diferencias significativas en la expresión dependiente de CREB en las células de control que no se han puesto en contacto con el agente de estimulación y que se han puesto en contacto con el compuesto candidato (células de control que sólo se pusieron en contacto con un compuesto candidato con respecto a la expresión génica dependiente de CREB en las células de

control que no se han puesto en contacto ni con el agente de estimulación ni con el compuesto candidato (células de control que no se han puesto en contacto con nada). En una realización particular, las células se ponen en contacto con el compuesto candidato antes de ponerse en contacto con el agente de estimulación.

[0048] Alternativamente, el cribado secundario comprende: (a) poner en contacto células de origen neuronal que comprenden un gen indicador operativamente unido a un compuesto candidato identificado en el cribado primario y con una dosis subóptima de un agente de estimulación que activa las vías de señalización en CREB; (b) determinar la actividad del indicador en las células que se han puesto en contacto con el compuesto candidato y con el agente de estimulación; (c) comparar la actividad del indicador evaluada en el paso (b) con la actividad del indicador en las células que se han puesto en contacto con el agente de estimulación y que no se han puesto en contacto con el compuesto candidato (células de control que sólo se han puesto en contacto con el agente de estimulación). Una diferencia estadísticamente significativa en la actividad del indicador determinada en el paso (b) comparada a la actividad del indicador en las células de control identifica el compuesto candidato como un compuesto candidato confirmado. Preferiblemente, no se obtiene diferencias significativas en la actividad del indicador en las células de control que no se han puesto en contacto con el agente de estimulación y que se han puesto en contacto con el compuesto candidato (células de control que sólo se pusieron en contacto con un compuesto candidato) con respecto a la actividad del indicador en las células de control que no se han puesto en contacto ni con el agente de estimulación ni con el compuesto candidato (células de control que no se han puesto en contacto con nada). En una realización particular, las células se ponen en contacto con el compuesto candidato antes que con el agente de estimulación.

[0049] Preferiblemente, el “agente de estimulación que activa las vías de señalización en CREB” utilizado en el cribado primario es un agente de estimulación de la función de CREB.

[0050] En otra realización, el cribado secundario puede ser reemplazado por un método de cribado utilizando *Drosophila*, en el que dicho método de cribado comprende: (a) administrar un compuesto candidato identificado en el cribado primario en *Drosophila* que tiene un gen indicador operativamente unido a un promotor CRE; (b) evaluar la actividad del indicador en *Drosophila* que ha sido administrado al compuesto candidato; y (c) comparar la actividad del indicador evaluada en el paso (b) con la actividad del indicador en *Drosophila* de control que no se ha administrado al compuesto candidato. Una diferencia estadísticamente significativa en la actividad del indicador de el paso (b) comparada a la actividad del indicador de *Drosophila* de control que no se ha administrado al compuesto candidato identifica el compuesto candidato como un compuesto candidato confirmado.

[0051] En una realización particular, las células utilizadas en un cribado secundario son diferentes de las células huésped utilizadas en el cribado primario. En otra realización, el gen endógeno mediado por CRE o el transgen mediado por CRE en el cribado secundario es diferente del transgen mediado por CRE o del gen endógeno mediado por CRE del cribado primario. Por ejemplo, en una realización, las células huésped del cribado primario son neuroblastomas y las células del cribado secundario no son neuroblastomas. En otra realización, el transgen mediado por CRE en el cribado primario es luciferasa (CRE operativamente unido al gen de la luciferasa) y el transgen mediado por CRE en el cribado secundario no es luciferasa.

[0052] Preferiblemente, las células huésped en el cribado primario son células proliferativas (como neuroblastomas) y las células del cribado secundario no son células proliferativas diferenciadas de origen neuronal (como neuronas (por ejemplo, células primarias del hipocampo) y células gliales). En una realización particular, el gen mediado por CRE del cribado primario es un gen indicador mediado por CRE (un transgen mediado por CRE) y un gen mediado por CRE del cribado secundario es un gen endógeno mediado por CRE.

[0053] Tal y como se utiliza en la presente, una célula se refiere a una célula animal. La célula puede ser una célula madre o una célula somática. Las células animales adecuadas pueden ser, por ejemplo, de origen mamífero. Ejemplos de células de mamíferos incluyen células humanas (como células HeLa), bovinas, ovinas, porcinas, murinas (como ratas, múridos (como células madre embrionarias), conejo etc.) y de mono (como células COS1). Preferiblemente, la célula es de origen neuronal (como un neuroblastoma, neurona, célula madre neuronal, célula glial, etc.). La célula puede ser también una célula embrionaria, una célula madre de médula ósea u otra célula progenitora. Cuando la célula es una célula somática, la célula puede ser, por ejemplo, una célula epitelial, fibroblastos, célula de músculo liso, célula sanguínea (incluyendo una célula hematopoyética, glóbulos rojos, células T, células B, etc), célula tumoral, célula del músculo cardíaco, macrófagos, célula dendrítica, células neuronales (por ejemplo, una célula glial o astrocito), o células infectadas por patógenos (por ejemplo, aquellas infectadas por bacterias, virus, virusoideos, parásitos o priones). Las células pueden obtenerse comercialmente en un depósito u obtenerse directamente de un animal, por ejemplo, gracias a una biopsia.

[0054] En una realización, el cribado terciario es un método conductual para evaluar la formación de la memoria a largo plazo en un animal que comprende: (a) administrar una cantidad eficaz de un compuesto candidato confirmado identificado en el cribado secundario en un animal (por ejemplo, un ser humano, otro mamífero, vertebrado o invertebrado); (b) enseñar al animal al que se ha administrado el compuesto candidato confirmado en condiciones apropiadas para producir una formación de la memoria a largo plazo en el animal; (c) evaluar la formación de la memoria a largo plazo en el animal enseñado en el paso (b); y (d) comparar la formación de la

memoria a largo plazo evaluada en el paso (c) con la formación de la memoria a largo plazo producida en el animal de control al que no se le ha administrado el compuesto candidato confirmado. Si se observa una mejora en la formación de la memoria a largo plazo evaluada en el animal tratado con el candidato compuesto confirmado con respecto a la formación de la memoria a largo plazo evaluada en el animal de control, el compuesto candidato confirmado se identifica como un potenciador cognitivo. Los cribados terciarios con protocolos similares están disponibles utilizando métodos (modelos) conductuales para otras disfunciones cognitivas.

[0055] En una realización particular, el método para identificar o cribar potenciadores cognitivos comprende: (a) poner en contacto células huésped con un gen indicador de luciferasa unido a un promotor CRE con un compuesto de ensayo, produciendo de este modo una muestra de ensayo; (b) poner en contacto la muestra de ensayo del paso (a) con una dosis subóptima de un agente de estimulación de la función de CREB (por ejemplo, forskolina, cloruro de potasio); (c) determinar la actividad de la CRE - luciferasa en las células huésped que han entrado en contacto con el compuesto de ensayo y con el agente de estimulación de la función de CREB; (d) comparar la actividad de la CRE - luciferasa determinada en el paso (c) con la actividad de la CRE - luciferasa en células de control que ha estado en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB y que no han estado en contacto con el compuesto de ensayo (células de control que han estado en contacto únicamente con el agente de estimulación de la función de CREB); (e) seleccionar el compuesto de ensayo si tiene poco o ningún efecto por sí solo y si, además, incrementa los niveles de CRE - luciferasa (actividad) en células huésped que han estado en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB, seleccionando de este modo un compuesto activo "hit"; (f) repetir los pasos (a) a (e) empleando un rango de concentraciones diferentes del compuesto activo "hit" seleccionado en el paso (e); y (g) seleccionar el compuesto activo "hit" si tiene poco o ningún efecto por sí solo y si, además, proporciona cambios en los niveles de CRE - luciferasa (actividad) en células huésped que han estado en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB, para el rango lineal de concentraciones de compuesto activo "hit", seleccionando de ese modo un compuesto "activo confirmado". Las células huésped que comprenden un gen indicador de luciferasa están unidas operablemente a un indicador de CRE (gen indicador de luciferasa dirigido por CRE) pueden generarse mediante la transfección de células con un gen indicador de luciferasa dirigido por CRE. Dichas células también se denominan en la presente células CRE - luci. En una realización particular, las células huésped son células de neuroblastoma humanas. Las células de neuroblastoma humano transfectadas con un gen indicador de luciferasa dirigido por CRE también se denominan en la presente células de neuroblastoma CRE - luci. Un compuesto activo confirmado "hit" también se denomina en la presente como un compuesto candidato.

[0056] Un compuesto activo confirmado (o un compuesto candidato) puede analizarse o evaluarse para su efecto en la expresión génica mediada por CRE endógena (expresión génica endógena dependiente de CREB) (a) poniendo en contacto neuronas (particularmente células del hipocampo) con el compuesto Activo Confirmado (o compuesto candidato), produciendo de este modo una muestra; (b) poniendo en contacto la muestra con una dosis subóptima de un agente de estimulación de la función de CREB; (c) analizando la expresión génica endógena dependiente de CREB en las neuronas que han estado en contacto con el compuesto activo confirmado (o compuesto candidato) y el agente de estimulación de la función de CREB; y (d) comparando la expresión génica endógena dependiente de CREB del paso (c) con la expresión génica endógena dependiente de CREB en neuronas de control que han estado en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB y que no han estado en contacto con el compuesto activo confirmado (o compuesto candidato). Una diferencia estadísticamente significativa en la expresión génica dependiente de CREB analizada en el paso (c) en comparación a la expresión génica dependiente de CREB en células de control identifica que el compuesto activo confirmado (o compuesto candidato) tiene un efecto en la expresión génica dependiente de CREB y en el compuesto candidato confirmado. Preferiblemente, no se obtiene ninguna diferencia significativa en la expresión dependiente de CREB en células de control que no han estado en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB y que no han estado en contacto con el compuesto activo confirmado (o compuesto candidato) (células de control que han estado en contacto con el compuesto activo confirmado (o compuesto candidato) solo) en relación a la expresión génica dependiente de CREB en células de control que no han estado en contacto ni con el agente de estimulación de la función de CREB ni con el compuesto activo confirmado (o compuesto candidato) (células de control que no han estado en contacto con nada).

[0057] El compuesto candidato confirmado puede analizarse o evaluarse en un modelo animal (conductual) de formación de memoria a largo plazo dependiente de CREB para identificar potenciadores cognitivos. Dichos métodos para analizar o evaluar un compuesto candidato confirmado para identificar potenciadores cognitivos comprenden (a) administrar una cantidad efectiva de un compuesto candidato confirmado a un animal; (b) enseñar al animal al que se le ha administrado el compuesto candidato confirmado en condiciones apropiadas para producir formación de memoria a largo plazo en el animal; (c) analizar la formación de memoria a largo plazo en el animal enseñado en el paso (b); y (d) comparar la formación de memoria a largo plazo analizada en el paso (c) con la formación de memoria a largo plazo producida en el animal de control al que no se le ha administrado el compuesto candidato confirmado. Si se nota una mejora estadísticamente significativa en la formación de memoria a largo plazo analizada en el animal tratado con el compuesto candidato confirmado en relación a la formación de memoria a largo plazo analizada en el animal de control, el compuesto candidato confirmado puede categorizarse como que potencia (mejora, aumenta) la formación de memoria a largo plazo en el animal y se identifica como un potenciador cognitivo.

[0058] Como se describe en la presente, los compuestos candidatos confirmados y los potenciadores cognitivos de diversas clases químicas han progresado mediante modelos *in vivo* de formación de memoria.

[0059] Se busca que los compuestos activos no mejoren la función de la vía de CREB por sí mismas, sino tras la coestimulación con un agente de estimulación de la función de CREB. Este requerimiento se introdujo en resultados mímicos a partir de los experimentos originales en moscas: (1) La señalización cAMP está involucrada en la formación de memoria de las moscas y (2) se necesita aprendizaje para mejorar la formación de memoria cuando el activador de CREB está sobreexpresado.

[0060] Los compuestos que se van a analizar o evaluar por su capacidad para incrementar la función de la vía CREB, como agentes farmacéuticos, fármacos, compuestos químicos, compuestos iónicos, compuestos orgánicos, ligando orgánicos, incluyendo cofactores, sacáridos, péptidos recombinantes y sintéticos, proteínas, peptoides, secuencias de ácido nucleico, incluyendo genes, productos de ácido nucleico y otras moléculas y composiciones, pueden cribarse individualmente o pueden probarse uno o más compuestos simultáneamente por su capacidad para incrementar la función de la vía de CREB según los métodos descritos en la presente. Cuando se prueba una mezcla de compuesto, los compuestos seleccionados por los métodos descritos en la presente pueden separarse (según corresponda) e identificarse mediante métodos apropiados (por ejemplo, cromatografía, secuenciación, PCR). La presencia de uno o más compuestos en una muestra de ensayo con la capacidad para incrementar la función de la vía de CREB puede determinarse igualmente según estos métodos. Los compuestos que se criban por su capacidad para incrementar la función de la vía de CREB están, normalmente, a una concentración molar de 10^{-9} a 10^{-3} .

[0061] Pueden probarse numerosas bibliotecas combinatorias de compuestos (por ejemplo, compuestos orgánicos, péptidos recombinantes o sintéticos, peptoides, ácidos nucleicos) producidos mediante síntesis química combinatoria u otros métodos (véase, por ejemplo, Zuckerman, R.N. et al., J. Med. Chem., 37: 2678 - 2685 (1994) y las referencias citadas en la presente; véanse también, Ohlmeyer, M.H.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 10922 - 10926 (1993) y DeWitt, S.H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6909 - 6913 (1993), relacionados con compuestos marcados; Rutter, W.J. et al. patente U.S. Nº 5,010,175; Huebner, V.D. et al., patente U.S. Nº 5,182,366; y Geysen, H.M., patente U.S. Nº 4,833,092). Cuando los compuestos seleccionados de una biblioteca combinatoria llevan marcadores únicos, es posible la identificación de compuestos individuales mediante métodos cromatográficos.

[0062] También pueden probarse (cribarse) las bibliotecas químicas, los caldos microbianos y las bibliotecas de expresión en fagos por la presencia de uno o más compuestos capaces de mejorar la función de la vía de CREB con los métodos descritos en la presente.

[0063] La invención también se relaciona a métodos para evaluar el efecto de un compuesto candidato en la expresión génica dependiente de CREB (expresión génica mediada por CRE) que comprende: (a) poner en contacto células de origen neuronal con el compuesto candidato y con una dosis subóptima de un agente de estimulación de la función de CREB; (b) evaluar la expresión génica endógena dependiente de CREB en las células que han estado en contacto con el compuesto candidato y con el agente de estimulación de la función de CREB; y (c) comparar la expresión génica endógena dependiente de CREB evaluada en el paso (b) con la expresión génica endógena dependiente de CREB en células de control que han estado en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB pero no han estado en contacto con el compuesto candidato. Una diferencia estadísticamente significativa en la expresión génica dependiente de CREB evaluada en el paso (b) en comparación a la expresión génica dependiente de CREB en las células de control identifica que el compuesto candidato tiene un efecto en la expresión génica dependiente de CREB. Preferiblemente, no se obtiene ninguna diferencia significativa en la expresión dependiente de CREB en las células de control que no han estado en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB pero sí han estado en contacto con el compuesto candidato respecto a la expresión génica dependiente de CREB en las células de control que no han estado en contacto ni con el agente de estimulación de la función de CREB ni con el compuesto candidato (células de control que no han estado en contacto con nada). En una realización particular, las células entran en contacto con el compuesto de prueba antes de entrar en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB.

[0064] Alternativamente, los métodos para evaluar el efecto de un compuesto candidato en la expresión génica dependiente de CREB comprende: (a) poner en contacto células de origen neuronal que comprende un gen indicador unido operablemente a un promotor de CREB con el compuesto candidato y con una dosis subóptima de un agente de estimulación de la función de CREB; (b) determinar la actividad del indicador en las células que han estado en contacto con el compuesto candidato y con el agente de estimulación de la función de CREB; y (c) comparar la actividad del indicador determinada en el paso (b) en comparación a la actividad del indicador en células de control que han estado en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB y que no han estado en contacto con el compuesto candidato. Una diferencia estadísticamente significativa en la actividad del indicador dependiente de CREB evaluada en el paso (b) en comparación a la actividad del indicador dependiente de CREB en las células de control identifica que el compuesto candidato tiene un efecto en la expresión génica dependiente de CREB. Preferiblemente, no se obtiene ninguna diferencia significativa en la actividad del indicador en las células de control que no han estado en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB pero

sí han estado en contacto con el compuesto candidato respecto a la actividad del indicador en las células de control que no han estado en contacto ni con el agente de estimulación de la función de CREB ni con el compuesto candidato (células de control que no han estado en contacto con nada). En una realización particular, las células entran en contacto con el compuesto de prueba antes de entrar en contacto con el agente de estimulación de la función de CREB.

[0065] Como sucede con el cribado secundario, en una realización particular, las células empleadas en los métodos para evaluar el efecto de un compuesto candidato en la expresión génica dependiente de CREB son diferentes de las células huésped del cribado primario. En otra realización, el gen endógeno mediado por CRE o el transgen mediado por CRE utilizados en los métodos para evaluar el efecto de un compuesto candidato en la expresión génica dependiente de CREB son diferentes del transgen mediado por CRE o del gen endógeno mediado por CRE del cribado primario. En otra realización, las células empleadas en los métodos para evaluar el efecto de un compuesto candidato en la expresión génica dependiente de CREB son células no proliferativas y diferenciadas de origen neuronal (como neuronas (por ejemplo células primarias del hipocampo) y células gliales). En una realización particular, el gen mediado por CRE en los métodos para evaluar el efecto de un compuesto candidato en la expresión génica dependiente de CREB es un gen endógeno mediado por CRE.

[0066] La mejora de la formación de memoria a largo plazo puede definirse como (a) un incremento en los niveles de rendimiento conductual; (b) un descenso del número de ensayos necesarios para producir un nivel de rendimiento conductual; o (c) un descenso de la duración del resto entre sesiones de ensayo para producir un nivel de rendimiento conductual. En consecuencia, la invención también se refiere a métodos para evaluar el efecto de un potenciador cognitivo en la formación de memoria a largo plazo en un animal que comprenden: (a) administrar una cantidad efectiva de potenciador cognitivo a un animal; (b) enseñar al animal al que se le ha administrado el potenciador cognitivo en condiciones apropiadas para producir formación de memoria a largo plazo en el animal; (c) analizar la formación de memoria a largo plazo en el animal enseñado en el paso (b); y (d) comparar la formación de memoria a largo plazo analizada en el paso (c) con la formación de memoria a largo plazo producida en el animal de control al que no se le ha administrado el potenciador cognitivo. Si se nota una mejora en la formación de memoria a largo plazo analizada en el animal tratado con el potenciador cognitivo en relación a la formación de memoria a largo plazo analizada en el animal de control, el potenciador cognitivo puede categorizarse como un potenciador de la formación de memoria a largo plazo en el animal. Los potenciadores cognitivos identificados como potenciadores de la formación de memoria a largo plazo en el animal pretenden ser candidatos efectivos para su uso en la rehabilitación de un animal con disfunciones cognitivas y para su uso en la mejora de memoria o la rendimiento cognitivo normal (capacidad o función) en un animal normal. Cabe destacar que, en ciertos casos, un potenciador cognitivo identificado según la presente invención puede ser un agente de estimulación de la función de CREB. Por lo tanto, un agente de estimulación de la función de CREB puede identificarse como un potenciador cognitivo según la presente invención.

[0067] Las frases “rendimiento conductual” y “rendimiento cognitivo” son frases reconocidas en la disciplina y se utilizan en la presente según sus significados aceptados en la disciplina.

[0068] El término “animal” utilizado en la presente incluye mamíferos, así como otros animales, vertebrados e invertebrados (por ejemplo aves, peces, reptiles, insectos (por ejemplo las especies *Drosophila*), moluscos (por ejemplo, *Aplysia*). Los términos “mamífero” y “de mamíferos” utilizados en la presente se refieren a cualquier animal vertebrado, incluyendo monotremas, marsupiales y placentarios, que amamantan a sus crías y paren (mamíferos euterios o placentarios) o son ovíparos (mamífero marsupiales o no placentarios). Algunos ejemplos de especies de mamíferos incluyen humanos y primates (por ejemplo monos, chimpancés), roedores (por ejemplo ratas, ratones, cobayas) y rumiantes (por ejemplo vacas, cerdos, caballos).

[0069] El animal puede ser un animal con algún grado o tipo de disfunción cognitiva o un animal con rendimiento cognitivo normal (es decir, un animal sin ningún deterioro cognitivo (disfunción o pérdida de cualquier función cognitiva)).

[0070] Una cantidad efectiva de potenciador cognitivo o compuesto candidato confirmado es la cantidad, o dosis, administrada a un animal que necesita efectuar un cambio (aumentar o disminuir) en la expresión génica dependiente de CREB, particularmente en células de origen neuronal. La dosis administrada a un animal, incluyendo la frecuencia de administración, variará según diversos factores, incluyendo características farmacodinámicas y farmacocinéticas del potenciador cognitivo particular o del compuesto candidato confirmado, del modo y la vía de administración; tamaño, edad, sexo, salud, peso corporal y dieta del receptor; los síntomas naturales y extendidos que se van a tratar o la naturaleza y la extensión de la (s) disfunción (es) que se van a mejorar o modificar, el tipo de tratamiento concurrente, la frecuencia del tratamiento y el efecto deseado.

[0071] El aprendizaje de animales para la formación de memoria a largo plazo se lleva a cabo utilizando métodos normalmente conocidos en la disciplina (véase Josselyn et al., *Society for Neurosci.*, 24: 926, Abstract 365.10 (1998); Casella and Davis, *Physiol. Behav.*, 36: 377 - 383 (1986); Guzowski et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 2693 - 2698 (1997); Lamprecht et al., *J. Neuroscience*, 17(21): 6443 - 6450 (1997); Bourchuladze et al., *Cell*, 79: 59 - 68 (1994); Kogan et al., *Curr. Biol.*, 7:1 - 11 (1996); Tully and Quinn, *J. Comp. Physiol. A Sens. Neural. Behav.*

Physiol., 157: 263 - 277 (1985); Tully et al., Cell, 79: 35 - 47 (1994)). El aprendizaje puede comprender una o varias sesiones de aprendizaje. Por “varias sesiones de aprendizaje” se entienden dos o más sesiones de aprendizaje.

[0072] La invención se refiere, además, a los métodos para evaluar el efecto de un potenciador cognitivo en la formación de memoria olfativa en *Drosophila* que comprenden: (a) administrar una cantidad efectiva de potenciador cognitivo a *Drosophila*; (b) someter a *Drosophila* al condicionamiento clásico y a, al menos, un shock olfativo y eléctrico; y (c) evaluar el índice de rendimiento del condicionamiento clásico, en el que el efecto del potenciador cognitivo tiene lugar cuando el compuesto altera el índice de rendimiento del índice de rendimiento obtenido por *Drosophila* en el paso (a) en ausencia del potenciador cognitivo.

[0073] La invención también se refiere a cada uno de los cribados primarios, secundario y terciario que comprenden los métodos para identificar o cribar los potenciadores cognitivos descritos en la presente.

[0074] La invención anticipa un nuevo tipo de potenciador cognitivo que mejora la función de la vía de CREB y aumenta los efectos cognitivos del aprendizaje cognitivo. Dichos potenciadores cognitivos pueden emplearse como una terapia general para diversos tipos de disfunción cognitiva derivada de herencia, enfermedad, lesión y edad estimulando el proceso molecular contribuyendo a la plasticidad del cerebro y para mejorar la memoria o la rendimiento cognitivo normal (capacidad o función).

[0075] Los potenciadores cognitivos identificados según los métodos de la invención son compuestos con actividad farmacológica e incluyen fármacos, compuestos químicos, compuestos iónicos, compuestos orgánicos, ligando orgánicos, incluyendo cofactores, sacáridos, péptidos recombinantes y sintéticos, proteínas, peptoides, secuencias de ácido nucleico, incluyendo genes, productos de ácido nucleico y otras moléculas y composiciones.

[0076] En el término “modular” se entiende que se incluye la capacidad de inducir, mejorar, potenciar, reducir, bloquear, inhibir (total o parcialmente) y regular una acción o efecto bioquímico o fisiológico. El término “regular” utilizado en la presente se entiende como la capacidad de controlar la velocidad y la extensión a la que tiene lugar un proceso. “Mejora” o “mejorar” se refieren a la capacidad de potenciar, incrementar, mejorar o aumentar, respecto a lo normal, una acción o efecto bioquímico o fisiológico.

[0077] La disfunción cognitiva, comúnmente asociada con disfunción cerebral y trastornos o condiciones del sistema nervioso central (SNC), deriva de herencia, enfermedad, lesión y / o edad. Los trastornos del SNC y las condiciones asociadas con algún tipo y grado de fallo cognitivo (disfunción) incluyen, de manera no limitante, lo siguientes:

- 1) Deterioro de la memoria asociado o dependiente de la edad;
- 2) Retraso mental debido a un defecto hereditario, como, por ejemplo, los asociados a (debido a), anomalías cromosómicas incluyendo el síndrome de Rubinstein – Taybi, síndrome de down, síndrome X frágil, síndrome del maullido de gato, síndrome de Klinefelter, síndrome de Turner, mosaicismo, síndrome de Patau (trisomía en el par 13) y síndrome de Edwards (trisomía en el par 18); anomalías genéticas metabólicas, incluyendo síndrome de Coffin – Lowry, trastornos autosómicos recesivos, como aminoacidurias y acidemias, trastornos peroxisómicos, como galactosemia, enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce y fenilcetonuria, enfermedad lisosómica, como la enfermedad de Gaucher, el síndrome de Hurler (mucopolisacaridosis), enfermedad de Niemann – Pick y enfermedad de Tay – Sachs, trastornos recesivos ligados al cromosoma X, como síndrome de Lesch – Nyhan (hiperuricemia), síndrome de Hunter (una variante de mucopolisacaridosis) y síndrome oculocerebrorenal de Lowe; anomalías neurológicas genéticas, incluyendo trastornos autosómicos dominantes, como distrofia miotónica, neurofibromatosis, esclerosis tuberosa y trastornos autosómicos recesivos, como microcefalia primaria;
- 3) Pérdida dependiente de trauma de función cognitiva, como, por ejemplo, la asociada a (debida a) enfermedades cerebrovasculares, incluyendo apoplejía e isquemia, incluyendo apoplejía isquémica; trauma cerebral, incluyendo hematoma subdural y tumor cerebral; lesión de cabeza;
- 4) Enfermedades neurodegenerativas, como delirio (estado agudo de confusión); demencia, incluyen enfermedad de Alzheimer y demencias de tipo no Alzheimer, como, por ejemplo, demencia de cuerpos de Lewy, demencia vascular, demencia de Binswanger (encefalopatía arterioesclerótica subcortical), demencias asociadas con la enfermedad de Parkinson, parálisis progresiva supranuclear, enfermedad de Huntington (corea), enfermedad de Pick, hidrocefalia de presión normal, enfermedad de Creutzfeldt – Jakob, enfermedad de Gerstmann – Sträussler – Scheinker, neurosífilis (paresia general) o infección por VIH, síndromes de demencia en el lóbulo frontal, demencias asociadas a traumas en la cabeza, incluyendo demencia pugilística, trauma cerebral, hematoma subdural, tumor cerebral, hipotiroidismo, deficiencia de vitamina B₁₂, radiación intracraneal; otras enfermedades y trastornos neurodegenerativos;
- 5) trastornos psiquiátricos, incluyendo trastornos afectivos (trastornos del humor), como, por ejemplo, depresión, incluyendo pseudodemencia depresiva; trastornos psicóticos, como, por ejemplo, esquizofrenia y autismo (síndrome de Kanner); trastornos neuróticos, como, por ejemplo, ansiedad y trastorno obsesivo – compulsivo; trastorno por déficit de atención; y
- 6) Discapacidades del aprendizaje, lenguaje y lectura, particularmente en niños. Por “discapacidades del aprendizaje” se hace referencia a trastornos de los procesos psicológicos básicos que afectan a la manera en

la que un individuo aprende. Las discapacidades del aprendizaje pueden causar dificultades al escuchar, pensar, hablar, leer, escribir, deletrear, en aritmética o en combinaciones de cualquiera de estas. Las discapacidades del aprendizaje incluyen dificultades de percepción, dislexia y afasia de desarrollo.

[0078] Los potenciadores cognitivos y los compuestos candidatos confirmados pueden administrarse directamente a un animal de numerosas maneras. En una realización preferente, los potenciadores cognitivos y los compuestos candidatos confirmados se administran sistémicamente. Otras vías de administración conocidas en la disciplina incluyen la vía intravenosa, incluyendo infusión y / o inyección de bolo, la vía intracerebroventricular, intratecal, parenteral, mucosa, implante, intraperitoneal, oral, intradérmica, transdérmica (por ejemplo en polímeros de liberación lenta), intramuscular, subcutánea, tópica, epidural, etc. Pueden utilizarse otras vías de administración adecuadas, por ejemplo, para conseguir la absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos. También pueden administrarse potenciadores cognitivos y compuestos candidatos confirmados particulares mediante terapia génica, en la que una molécula de ADN que codifica una proteína y un péptido terapéutico particular se administra al animal, por ejemplo, mediante un vector, que causa la expresión y la secreción de la proteína o el péptido particular a niveles terapéuticos *in vivo*.

[0079] Un vector, como se utiliza en la presente, se refiere a un vector de ácido nucleico, por ejemplo, un plásmido de ADN, un virus u otro replicón apropiado (por ejemplo un vector viral). Los vectores virales incluyen retrovirus, adenovirus, parvovirus (por ejemplo virus adeno – asociados), coronavirus, virus ARN monocatenario negativo como ortomixovirus (por ejemplo el virus influenza), rabdovirus (por ejemplo rabia y virus de estomatitis vesicular), paramixovirus (por ejemplo sarampión y Sendai), virus ARN monocatenario positivo como picornavirus y alfavirus, y virus de ADN bicatenario incluyendo adenovirus, herpesvirus (por ejemplo el virus del Herpes simplex de tipos 1 y 2, el virus de Epstein – Barr, citomegalovirus) y poxvirus (por ejemplo vaccinia, viruela aviar y viruela del canario). Otros virus incluyen, por ejemplo, virus Norwalk, togavirus, flavivirus, reovirus, papovavirus, hepadnavirus y virus de la hepatitis. Algunos ejemplos de retrovirus incluyen: leucosis – sarcoma aviar, virus de mamífero de tipo C, tipo B y tipo D, grupo HTLV – BLV, lentivirus, spumavirus (Coffin, J.M., *Retroviridae: The viruses and their replication*, In *Fundamental Virology*, 3ª Ed., B.N. Fields, et al., Eds., Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia, 1996). Otros ejemplos incluyen virus de leucemia murina, virus del sarcoma murino, virus del tumor mamario del ratón, virus de leucemia bovina, virus de leucemia felina, virus del sarcoma felino, virus de leucemia aviar, virus de leucemia de célula T humana, virus endógeno del babuino, virus de la leucemia del Gibón, virus del mono Mason Pfizer, virus de inmunodeficiencia en simios, virus del sarcoma de simios, virus del sarcoma de Rous y lentivirus. Otros ejemplos de vectores se describen, por ejemplo, en McVey et al., patente U. S. Nº 5,801,030.

[0080] El modo de administración es, preferiblemente, en la localización de células diana. En una realización particular, el modo de administración es a células de origen neuronal. Las células de origen neuronal incluyen células troncales neuronales, células de neuroblastoma, neuronas y células gliales.

[0081] Los potenciadores cognitivos y compuestos candidatos confirmados pueden administrarse junto a otros componentes de agentes biológicamente activo, como surfactantes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo glicéridos), excipientes (por ejemplo lactosa), estabilizantes, conservantes, humectantes, emolientes, antioxidantes, portadores, diluyentes y vehículos. Si se desea, pueden añadirse agentes edulcorantes, saborizantes y / o colorantes.

[0082] Los potenciadores cognitivos y compuestos candidatos confirmados pueden formularse como una solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado junto a un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Algunos ejemplos de tales vehículos son agua, solución salina, solución de Ringer, solución de cloruro de sodio isotónico, solución de dextrosa y albúmina humana 5 %. También pueden emplearse liposomas y vehículos no acuoso como aceites fijos. El vehículo o polvo liofilizado puede contener aditivos que mantengan la isotonicidad (por ejemplo cloruro de sodio, manitol) y la estabilidad química (por ejemplo tampones y conservantes). La formulación puede esterilizarse empleando técnicas comúnmente utilizadas. Se describen portadores farmacéuticos aceptables en *Remington Pharmaceutical Sciences*.

[0083] Los potenciadores cognitivos y compuestos candidatos confirmados pueden administrarse en dosis únicas o divididas (por ejemplo una serie de dosis separadas por intervalos de días, semanas o meses), o en forma de liberación controlada, dependiendo de factores como la naturaleza y la extensión de los síntomas, el tipo de tratamiento concurrente y el efecto deseado. Pueden utilizarse otros regímenes terapéuticos o agentes juntos a la presente invención.

[0084] La presente invención se ilustrará a continuación mediante los siguientes ejemplos, que no deben considerarse limitantes en ningún aspecto.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

[0085] A partir del programa de descubrimiento de fármacos descrito en la presente, los compuestos “lead” de

varias clases químicas han progresado mediante modelos *in vivo* de formación de memoria.

Descubrimiento de fármacos

[0086] El programa de descubrimiento de fármacos se guía por dos principios básicos. En primer lugar, se busca que los principios activos no mejores la función de CREB por sí mismos, sino tras la coestimulación con forskolina, un activador de adenilil ciclasa. Esta necesidad se introdujo en los resultados mímicos a partir de experimentos originales *Drosophila*: (1) La señalización cAMP está involucrada en la formación de memoria de las moscas y (2) se necesita aprendizaje para mejorar la formación de memoria cuando el activador de CREB está sobreexpresado. En segundo lugar, CREB parará funcionar de manera similar en neuronas de varias especies vertebradas e invertebradas. Para sacar provecho de esta conservación evolutiva, se desarrolló una vía de progresión de fármacos que incluye ensayos en moscas, roedores y humanos.

Cribado primario

[0087] Se diseñó un cribado de alto rendimiento (HTS por sus siglas en inglés) basado en células para evaluar los efectos en la función de la vía de CREB. Se transfectaron de manera estable células de neuroblastoma humano (SKN – MC) con un constructo indicador, en el que puso luciferasa bajo el control de un promotor CRE. Con este indicador, los incrementos en la función de la vía de CREB se monitorizaron mediante rendimiento fluorescente. Esta línea celular de ensayo se evaluó completamente utilizando activadores de CREB conocidos.

[0088] Para evaluar la actividad del compuesto, la línea de ensayo se preincubó en presencia del compuesto y, a continuación, se estimuló con una dosis subóptima de forskolina antes de la lisis. La concentración y la evolución temporal de la coestimulación con forskolina se calibraron para obtener un 30 % de saturación, proporcionando un alcance del 300 % en los efectos del compuesto. Los compuestos que produjeron ≥ 100 % de incremento en la señal luciferasa respecto a las células de control estimuladas con forskolina continuaron en una segunda serie de cribado para excluir falsos positivos. Finalmente, estos compuestos se evaluaron a 4 concentraciones diferentes con o sin coestimulación con forskolina.

[0089] Hasta la fecha se han cribado 155.000 compuestos con este enfoque, proporcionando unos 180 activos confirmados.

Cribados secundarios

[0090] Se eligieron ochenta y seis de los 180 activos confirmados para analizarse más en profundidad basándose en su estructura y potencia. Para descartar cualquier efecto artificial potencial del constructo del gen indicador, se utilizó una PCR cuantitativa en tiempo real para evaluar los niveles de expresión de genes endógenos dependientes de CREB conocidos en la línea de ensayo. La mayoría de los activos confirmados mostraron perfiles de potencia comparables tanto para la expresión génica indicadora de luciferasa como la expresión génica endógena. Los análisis estructurales de estos 86 activos confirmados revelaron que 10 están relacionados a digitoxigenina, 26 son derivados de feniletamina, 4 son derivados de aminopropanediol, 3 son inhibidores fosfodiesterasa y 3 son análogos de cafeína. Los 40 restantes eran estructuras químicas nuevas con ninguna similitud evidente a otros compuestos. De estos, 11 activos “hit” se eligieron para estudios más en profundidad basados en la potencia, la solubilidad y la facilidad para derivarse. Para estos 11 activos “hit”, la mejora de la expresión génica endógena dependiente de CREB se confirmó en cultivos de neuronas primarias del hipocampo de rata. Análisis funcionales (enzimáticos, de afinidad de unión, etc.) revelaron que 8 eran inhibidores PDE IV y 2 se dirigían a otras moléculas.

Ensayos *in vivo*

[0091] Se alimentó a moscas transgénicas con los 11 activos “hit”, que llevaban un transgén CRE – luciferasa. Experimentos anteriores habían establecido que: (1) la actividad del gen indicador podría cuantificarse a partir de moscas únicas y (2) el indicador CRE – luciferasa mostraba, normalmente, un ciclo circadiano de expresión (Belvin, M. P. et al., *Neuron*, 22 (4) : 777 – 787 (1999)). Estas observaciones revelaron un ensayo inicial *in vivo* eficaz con el que determinar las concentraciones de fármaco necesarias para afectar la expresión de CRE – luciferasa en tejido cerebral de moscas alimentadas con el fármaco. Los 11 candidatos “lead” produjeron un incremento significativo de los niveles de expresión de CRE – luciferasa *in vivo*. Se probó uno de estos compuestos *in vivo* por sus efectos en la formación de memoria olfativa en moscas. Mostró una mejora parcial de la memoria tras el aprendizaje y no se mostró efecto alguno en la memoria tras aprendizaje separado – resultado reminiscente del distintivo de CREB.

[0092] Estos activos “hit” se evaluaron *in vivo* en modelos de roedor de formación de memoria. Para llevarlo a cabo de manera eficaz, se validó un nuevo protocolo de aprendizaje conductual que se vio afectado, lógicamente, por la modulación aguas arriba de la vía de CREB. Durante las fases de adquisición iniciales, los ensayos de aprendizaje repetidos permitieron incrementar los niveles de cAMP. En algún momento, los niveles de cAMP pasaron un umbral, y PKA activada (subunidad catalítica) se translocalizó en el núcleo, donde se fosforila directamente CREB o produce un estado permisivo para la fosforilación de CREB por un cofactor. En este contexto, los inhibidores fosfodiesterasa (PDE) actúan para incrementar los niveles de cAMP más allá del umbral con

ensayos de aprendizaje inferior, produciendo de este modo más memoria a larga duración con un aprendizaje más suave. Se estableció este efecto como pronóstico utilizando el inhibidor PDE prototípico, rolipram (Figura 1).

[0093] Tomados juntos, estos datos indican que PDE es un fármaco diana eficaz para mejorar la función de CREB.

EJEMPLO 2

Método para identificar oligos antisentido funcionales de CREB.

Detección de ARNm de CREB con el ensayo de ADN ramificado.

[0094] Se obtuvieron células de *Mus musculus* Neuro2a de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Cat, N° CCL – 131; Manassas, VA). Las células se cultivaron en medio mínimo esencial de Eagle Modificado (Medio mínimo esencial (Eagle) con 2 mM de L – glutamina y BSS de Earle ajustado para contener 1,5 g / L de bicarbonato de sodio, 0,1 mM aminoácidos no esenciales y 1,0 mM de piruvato sódico, 90 % suero fetal bovino, 10 %) en un formato de 96 micropocillos a 2×10^4 células por pocillo. Las células se mantuvieron a 37 °C y a un 5 % de CO₂ toda la noche antes de transferirlas con oligonucleótidos de ácidos nucleicos bloqueados (ANB) de CREB.

[0095] Las células se transfectaron utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) con modificaciones en las instrucciones del fabricante. Para cada muestra de transfección, el oligonucleótido ANB de CREB correspondiente (véanse las secuencias a continuación) se diluyó con 25 µl de medio de suero reducido Opti – MEM (tampón HEPES, 2.400 mg / L de bicarbonato de sodio, hipoxantina, timidina, piruvato sódico, L – glutamina, oligoelementos, factores de crecimiento y rojo de fenol reducido a 1,1 mg / L (Invitrogen) a una concentración de transfección final de 0,2 µM. La Lipofectamine 2000 (µl) fue de 1 : 3, respectivamente. El oligonucleótido ANB diluido se combinó con la Lipofectamine 2000 diluida y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente para que se formaran los complejos. Se añadieron cincuenta µl de complejos de oligonucleótido ANB – Lipofectamine 2000 a cada pocillo. Las transfecciones se llevaron a cabo por triplicado para cada oligonucleótido ANB de CREB a 0,2 µM. Las células se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 horas. El medio de cultivo se reemplazó tras 5 horas con 100 µl de medio MEME.

[0096] La cuantificación directa de ARN mensajero (ARNm) de CREB que siguió la transfección de oligos antisentido se detectó utilizando el kit QuantiGene Expression según las instrucciones del fabricante (Bayer Corporation; Tarrytown, NY). Veinticuatro horas después las transfecciones de oligonucleótidos ANB antisentido, las células se lisaron con 50 µl de tampón de lisis (Bayer Corporation) con oligonucleótidos Capture Extenders (CE), Label Extenders (LE) y bloqueantes (BL) específicos de CREB. Tras una incubación de 30 minutos, se añadieron 100 µl de la mezcla de lisis de cada pocillo a un pocillo de captura correspondiente (Bayer Corporation). La placa de captura se selló con un Plate Sealer con cara adhesiva (Bayer Corporation) y se incubó toda la noche a 50 °C. Los pocillos se lavaron tres veces con 390 µl de tampón de lavado (0,1 x SSC y 0,03 % Lithium Lauryl Sulfate) en un ELx405 Plate Washer (Biotek Instruments). Se añadieron inmediatamente 100 µl de reactivo amplificador con sonda amplificadora diluida 1: 1000 en diluyente de sonda amplificadora / marcadora (proporcionado por Bayer Corporation) a cada pocillo de la placa de captura, se selló y se incubó a 50 °C durante 60 minutos. Los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado como se describe anteriormente y se añadieron inmediatamente 100 µl de reactivo marcador con una sonda marcadora diluida 1: 1000 en diluyente de sonda amplificadora / marcadora (Bayer Corporation) a cada pocillo de la placa de captura. La placa de captura se selló e incubó a 50 °C durante 60 minutos. Los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado como se describe anteriormente y se añadieron inmediatamente 100 µl de solución de sustrato de trabajo (0,003 % Lithium Lauryl Sulfate en Reactivo de sustrato de trabajo; Bayer Corporation) a cada pocillo de la placa de captura. La placa de captura se selló y se incubó a 50 °C durante 30 minutos. La luminiscencia de cada pocillo se midió en un luminómetro de placa Wallac Victor² V (Perkin Elmer) a 45 °C.

[0097] La Figura 3 muestra los efectos de diversos oligos antisentido de ANB de CREB en los niveles del ARN de CREB en las células Neuro2a 131 tras la transfección, en relación con las células tratadas con el vehículo de control (reactivo de transfección menos cualquier oligo). Cada oligo de ANB de CREB tiene una única secuencia (véase a continuación). Los oligos LNB de CREB se enumeran en el orden en el que fueron designados. Los oligos LNB de CREB que no se cribaron (testaron) por no tener propiedades adecuados (por ejemplo, temperatura de fusión) cuando se analizaron (es decir; CREB 4, 10, 11, 13 y 14) no se muestran.

[0098] Los resultados demuestran que los oligos CREB1 y CREB17 reducen los niveles endógenos de ARN de CREB al menos un 50 %.

[0099] El oligo CREB3 es una secuencia que ha sido utilizada anteriormente para derribar ARN de CREB (como un oligo fosforotioato). Estos resultados de la presente demuestran que el oligo CREB3 reduce también los niveles endógenos de ARN de CREB, aunque en una concentración más elevada (0,5 µM).

Diseño de un oligonucleótido de ácido nucleico bloqueado de CREB

[0100] Los oligonucleótidos antisentido fueron diseñados para CREB utilizando la secuencia del número de acceso de GenBank M95106 con el Vector NTI Suite 8 (InforMax, Frederick, MD). Las secuencias oligonucleótidas del ácido nucleico bloqueado (ANB) (Prologo LLC, Boulder, CO) se resumen a continuación:

- 5 1. CCTCCgCCgCgTCACTCA (SEC ID N° 1)
2. CCACgTAACACACCgCgT (SEC ID N° 2)
3. TggTCATTTAgTTACCggTg (SEC ID N° 3)
4. gCTggTTgTCTgCACCAg (SEC ID N° 4)
5. TTTTCAGCTTCTgTTACA (SEC ID N° 5)
- 10 6. CTgggCTTgAACTgTCAT (SEC ID N° 6)
7. gCTAATgTggCAATCTgT (SEC ID N° 7)
8. TgCTggCATggATACCTg (SEC ID N° 8)
9. gCAgATgATgTTgCATgA (SEC ID N° 9)
10. TgTCTgCCCATTgggCAg (SEC ID N° 10)
- 15 11. gggCCgCCTggATAACgCC (SEC ID N° 11)
12. TTCACCTTCTgCAATAgT (SEC ID N° 12)
13. TCCACAgACTCCTgTgAA (SEC ID N° 13)
14. AAAGgATTTCCCTTCgTT (SEC ID N° 14)
15. CAgAAgATAAgTCATTCA (SEC ID N° 15)
- 20 16. TTCTCAATCCTTggCAC (SEC ID N° 16)
17. TggCACTgTTACAgTggT (SEC ID N° 17)
18. CTgCCCACCTgCTAgTTTg (SEC ID N° 18)
19. gCTCCTCCgTCACTgCTT (SEC ID N° 19)
20. TgCACTAAggTTACAgTg (SEC ID N° 20)

Los oligonucleótidos individuales de ANB se volvieron a suspender en 1 x TE (10 nM de Tris HCl, pH 8,0 y 1 nM de EDTA, pH 8,0) en una concentración de 200 µM.

[0101] Diseño de sonda de ADN ramificado de CREB.

[0102] Las sondas de oligonucleótidos se diseñaron para la captura y amplificación de la señal del ARNm de CREB con QuantiGene ProbeDesigner Software (Bayer Corporation). Las secuencias de oligonucleótidos (Integrated DNA Technologies Inc; Coralville, IA) se resumen a continuación:

- 35 CE ggattcccttcgTTTTgTgTtcttggaaagaaagt (SEC ID N° 21)
- CE caatccttggcaccctggTTTTtcttggaaagaaagt (SEC ID N° 22)
- CE agtctcctctctgactttcttTTTTtcttggaaagaaagt (SEC ID N° 23)
- CE tctccctgggaatggcaTTTTtcttggaaagaaagt (SEC ID N° 24)
- CE ccattgttagccagctgattgcTTTTtcttggaaagaaagt (SEC ID N° 25)
- 40 CE cggctgtagtgagctgTTTTtcttggaaagaaagt (SEC ID N° 26)
- CE gcctgaggcagctgaacaTTTTtcttggaaagaaagt (SEC ID N° 27)
- CE tgctgctctcagcaggctTTTTtcttggaaagaaagt (SEC ID N° 28)
- CE ttacgagcctctcttccgTTTTtcttggaaagaaagt (SEC ID N° 29)
- LE gaatcttcaacttctgcaatagtgaTTTTtaggcataggaccgtgtct (SEC ID N° 30)
- 45 LE aatcagttacatccacagactcctgtTTTTtaggcataggaccgtgtct (SEC ID N° 31)
- LE atgtactgccactgctagtgtgtaTTTTtaggcataggaccgtgtct (SEC ID N° 32)
- LE ggcctgtacccatccgtaTTTTtaggcataggaccgtgtct (SEC ID N° 33)
- LE cattggtcatgtaaatgtctgcaTTTTtaggcataggaccgtgtct (SEC ID N° 34)
- LE gtctgtgcatactgtagaatgtagtacTTTTtaggcataggaccgtgtct (SEC ID N° 35)
- 50 LE agaactgtgtccatccgtgTTTTtaggcataggaccgtgtct (SEC ID N° 36)
- LE gtgcgaatctggtatgtttgtacatcTTTTtaggcataggaccgtgtct (SEC ID N° 37)
- LE acgccataacaactccagggtTTTTtaggcataggaccgtgtct (SEC ID N° 38)
- BL cctgtaggaaggcctcctgaaa (SEC ID N° 39)
- BL gcatcagaagataagtcattcaaaattt (SEC ID N° 40)
- 55 BL tggtagtgaggagggtga (SEC ID N° 41)
- BL aatgggggttgactgttacag (SEC ID N° 42)
- BL acaactggttgctgggact (SEC ID N° 43)
- BL gcaatggtgctagtgggtgct (SEC ID N° 44)
- BL gtgtaggaagtgtggggagg (SEC ID N° 45)

[0103] Las sondas individuales (CE), (LE) y (BL) se volvieron a suspender en 1 x TE, pH 8,0 en una concentración de 100 pmoles / µl. La diana específica (CE), (LE) y (BL) de los grupos de sondas se volvieron a suspender en 1 x TE en una concentración de 50, 200 y 100 fmol / µl, respectivamente.

Efecto de los oligos antisentido de ANB de CREB en la respuesta CRE – Luci en forskolina + HT0712 en las células SK – N – MC.

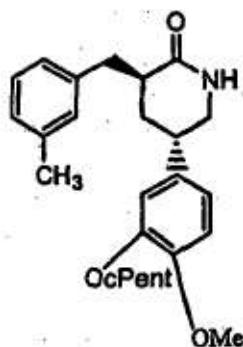
[0104] Las células humanas SK – N – MC (véase el Ejemplo 1), se transfectaron de manera estable con un constructo indicador que consiste en el promotor VIP que contiene 2 elementos de CRE junto a 2 elementos adicionales de CRE del gen de la tirosina aminotransferasa que conduce a la expresión de la luciferasa, se cultivaron en medio de Eagle modificado por Iscoves (IMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA), con 2 nM de L – glutamina, 0,1 nM de aminoácidos no esenciales, 0,1 de nM de HEPES, 10 % de suero fetal bovino con una densidad de 20.000 células por pocillo en un formato de placa de 96 pocillos- Las células se mantuvieron a 37, 5 °C, con un 5 % de CO₂ durante la noche antes de la transfección con 0,2 µM de oligonucleótidos antisentido de ANB de CREB. Los oligos funcionales de CREB se identificaron en el cribado del ADN ramificado descrito anteriormente. Los oligos de ANB de CREB utilizados fueron los siguientes:

CREB1: CCTCCgCCgCgTCACTCA (SEC ID N° 46)
 CREB 3: CCACgTAACACACCgCgT (SEC ID N° 47)
 CREB 17: TggCACTgTTACAgTggT (SEC ID N° 48)

[0105] Los oligos CREB1 y CREB3 tienen una secuencia de homología idéntica en ratones y humanos. CREB17 tiene un único malapareamiento de bases. Los tres oligos de ANB se han mostrado para ser funcionales en el derribo de los niveles de ARN humano de CREB en un ensayo humano de ADN ramificado de CREB.

[0106] Las células se transfectaron con oligos humanos de ANB de CREB utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) con modificaciones según el protocolo del fabricante. Para cada muestra de transfección, el correspondiente oligonucleótidos de ANB de CREB (oligos de CREB 1, 3 y 17) se diluyó con 25 µl de medio de suero reducido Opti – MEM (tampón HEPES, 2.400 mg / L de bicarbonato sódico, hipoxantina, timidina, piruvato de sodio, L – glutamina, elementos de traza, factores de crecimiento y rojo de fenol se redujeron a 1, 1 mg / L; Invitrogen) en una concentración de transfección final de 0, 2 µM. La Lipofectamine 2000 se diluyó también en 25 µl de medio de suero reducido Opti – MEM, de modo que la proporción del oligonucleótido de ANB (µl) en la Lipofectamine 2000 (µl) fue de 1:3, respectivamente. El oligonucleótido diluido de ANB se combinó con la Lipofectamine 2000 diluida y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente para que se formaran los complejos. Se añadió en cada pocillo 50 µl de complejos de oligonucleótidos de ANB – Lipofectamine 2000. Las células se incubaron a 37 °C y con un 5 % de CO₂ durante 16 – 24 horas. El medio de cultivo se reemplazó tras 5 horas con 100 µl de medio IMEM.

[0107] Se añadió 5 µl de HT0712 ((3S, 5S) – 5 - (3 – ciclopentiloxy – 4 – metoxi - fenil) – 3 - (3 – metil - bencil) – piperidina – 2 - ona; también conocido como IPL 455,903)) a las células transfectadas/ tratadas con un vehículo, e incubadas a 37 °C con un 5 % de CO₂ durante 2 horas. HT0712 tiene la siguiente fórmula:



en el que “Me” se refiere a “metil” y “cPente” se refiere a “ciclopentil”. HT0712 puede prepararse utilizando la metodología presentada en la Patente U.S N° 6.458.829B1, cuyas enseñanzas se incorporan en la presente por referencia.

[0108] Se añadió después 2 µM de forskolina, y las células se incubaron otras 6 horas, se lavaron brevemente con TFS, se lisaron en presencia de luciferina y se midió la actividad de la luciferasa utilizando un luminómetro Victor 5.

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar el efecto de la formación de la memoria a largo plazo en un animal no humano que comprende los pasos de:
 - a) administrar a un animal una cantidad eficaz de un compuesto candidato confirmado identificado en un cribado; en el que dicho compuesto candidato se identifica en combinación con una dosis subóptima de un agente de estimulación de la función de CREB y hallado para potenciar la función de la vía de CREB en un ensayo basado en células; y en el que dicho candidato confirmado se identifica en un método que comprende:
 - (i) poner en contacto las células de origen neuronal con dicho compuesto candidato y con una dosis subóptima de un agente de estimulación de la función de CREB;
 - (ii) evaluar la expresión génica endógena dependiente de CREB en las células que se han puesto en contacto con dicho compuesto candidato y con dicho agente de estimulación de la función de CREB; y (iii) comparar la expresión génica endógena dependiente de CREB evaluada en el paso ii) con la expresión génica endógena dependiente de CREB en las células de control que se han puesto en contacto con dicho agente de estimulación de la función de CREB y que no se han puesto en contacto con dicho compuesto candidato, en el que una diferencia de la expresión génica dependiente de CREB evaluada en el paso ii) comparada a la expresión génica dependiente de CREB en las células de control confirma que dicho compuesto es un compuesto candidato para potenciar la función de la vía de CREB, identificando de este modo, dicho compuesto candidato como un compuesto candidato confirmado; y
 - (b) enseñar a dicho animal administrado con dicho compuesto en condiciones apropiadas para producir la memoria a largo plazo en dicho animal
 - (c) evaluar la formación de la memoria a largo plazo en dicho animal enseñado en el paso b); y
 - (d) comparar la formación de la memoria a largo plazo evaluada en el paso c) con la formación de la memoria a largo plazo producida en un animal de control al que se le ha administrado dicho compuesto candidato.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho animal en el paso a) y en el paso d) es un mamífero.
3. El método de la reivindicación 1, en el que dicha formación de la memoria a largo plazo se identifica como un aumento en el nivel del rendimiento conductual, una disminución en el número de ensayos de aprendizaje requeridos para producir un nivel de rendimiento conductual, o una disminución en la duración del descanso entre sesiones de aprendizaje para producir un nivel de rendimiento conductual.
4. El método de la reivindicación 1, en el que dicho animal en el paso a) y en el paso d) es un animal con una disfunción cognitiva.
5. El método de la reivindicación 1, en el que dicho animal en el paso a) y en el paso d) es un animal con un rendimiento cognitivo normal.

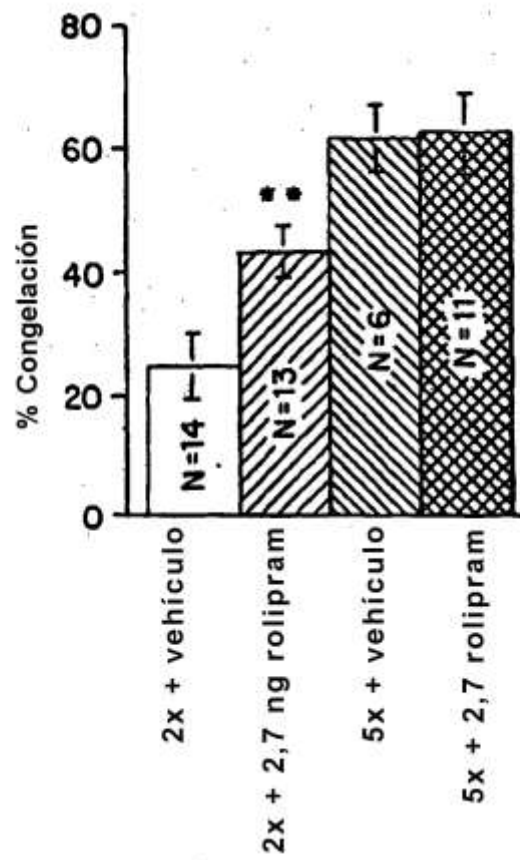


FIG. 1

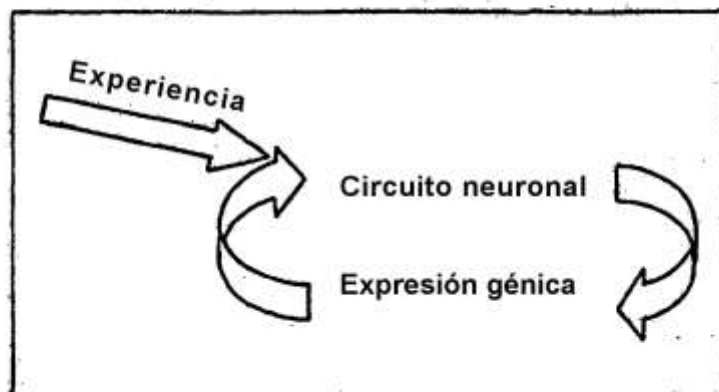
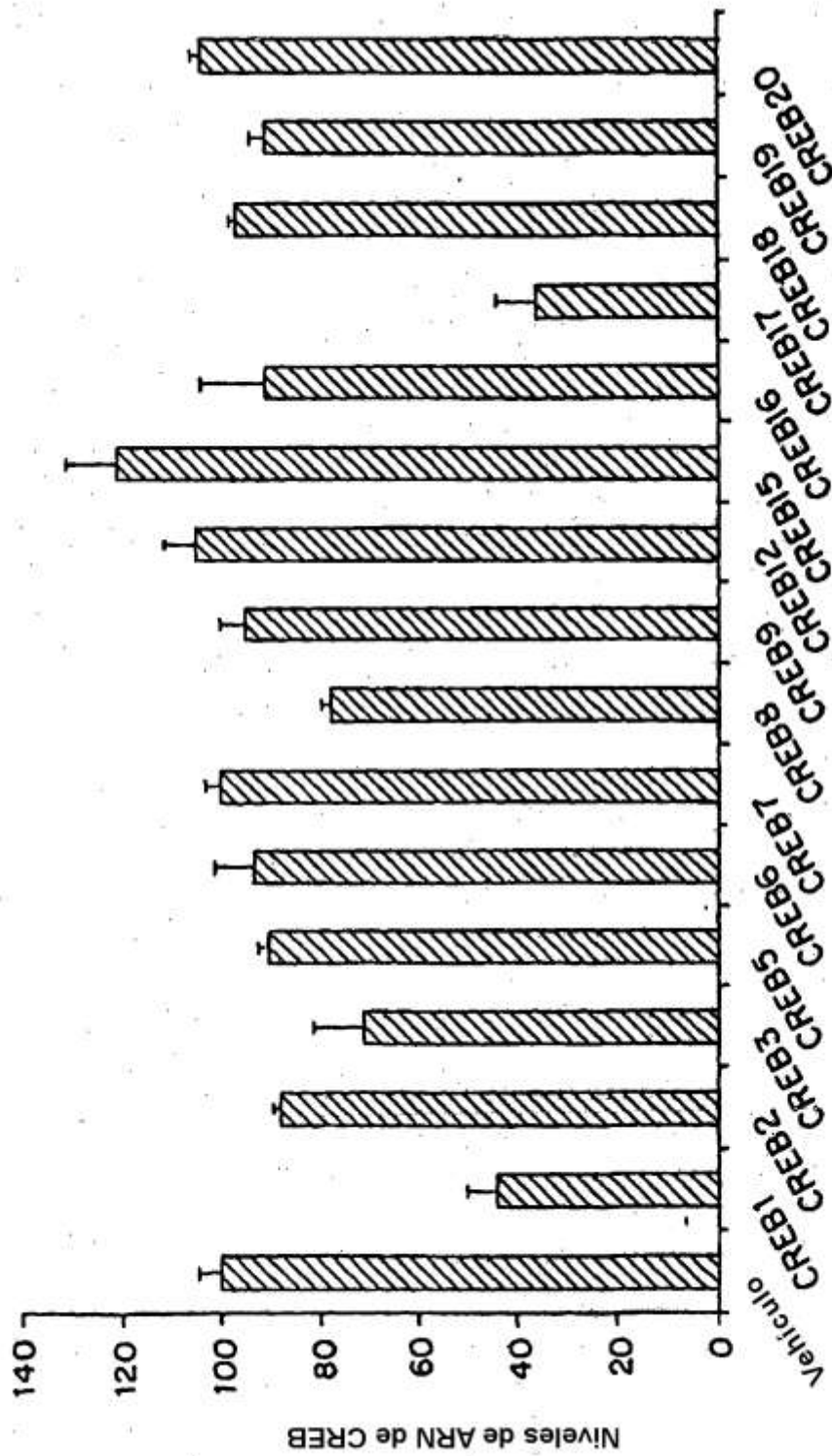


FIG. 2



Olígo de ANB de CREB

FIG. 3