

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 914**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/195** (2006.01)  
**A61K 31/135** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)  
**G01N 33/00** (2006.01)  
**A61K 31/196** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.01.2011 PCT/EP2011/050394**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2011 WO11086126**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2011 E 11700533 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2523661**

54 Título: **Inhibidores de NKCC para el tratamiento del autismo**

30 Prioridad:

**15.01.2010 EP 10305047**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.08.2017**

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)**  
**101, rue de Tolbiac**  
**75013 Paris, FR;**  
**UNIVERSITÉ D'AIX MARSEILLE (33.3%) y**  
**CHU DE BREST (33.3%)**

72 Inventor/es:

**BEN-ARI, YEHEZKEL y**  
**LEMONNIER, ERIC**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 627 914 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Inhibidores de NKCC para el tratamiento del autismo

Campo de la invención:

5 La invención se refiere a un compuesto que inhibe la importación de cloro en las neuronas o un compuesto que mejora la salida de cloro de las neuronas para uso en el tratamiento del autismo.

Antecedentes de la invención:

10 Los trastornos del síndrome autístico infantil (ASD) incluyen una amplia gama de anomalías que incluyen una incapacidad genuina para organizar relaciones afectivas, anomalías de comportamiento en interacciones sociales recíprocas, comunicación verbal y no verbal, un interés limitado en el entorno natural asociado con movimientos estereotipados y juegos repetitivos (Kanner, 1943; Levy and Hyman, 1993; Levy and Hyman, 2005; Adrien et al., 2001; Blanc et al., 2005; Bourreau et al., 2009). La investigación hasta la fecha indica que una predisposición genética puede jugar un papel en la enfermedad, pero uno o más factores ambientales deben estar en su lugar para que los síntomas ocurran, incluyendo contaminantes ambientales y posiblemente exposiciones maternas durante la gestación (Persico and Bourgeron, 2006; Bourgeron, 2009; Patterson, 2002). Se sugiere que los riesgos genéticos y ambientales alterarán los programas de desarrollo que conducen a malformaciones corticales y/o subcorticales y la formación de conjuntos neuronales mal colocados/mal conectados. Los primeros síntomas ocurren antes de los 3 años con un probablemente con un origen precoz. Algunos estudios han sugerido el uso de algunos compuestos para el tratamiento del autismo. En particular, Bradstreet et al. (Medical hypotheses 2006 68(5):979-987) describe el uso de espirolactona, un diurético ahorrador de potasio.

20 Actualmente no existe un tratamiento biológico/farmacéutico eficaz para los ASD.

25 La maduración del cerebro se asocia con una expresión secuencial de desarrollo de canales conducidos por sinapsis de receptores, activados por voltaje, y patrones cerebrales (Spitzer et al., 1994; Ben Ari et al., 2007). Los cambios en el desarrollo de las acciones del transmisor inhibitor GABA no son más que un ejemplo de estos cambios. Las neuronas inmaduras tienen una mayor concentración intracelular de cloro (Cl<sup>-</sup>) que los adultos, lo que conduce a acciones excitatorias paradójicas de GABA (Ben Ari, 2002; Ben Ari et al., 2007). Esto se debe a una expresión temprana del cotransportador de NKCC1 que importa cloro y una operación tardía de KCC2 que exporta cloro forma neuronas (Kahle and Staley, 2008; Rivera et al., 1999; Dzhalala et al., 2005; Delpire et al., 1999; Delpire, 2000; Li et al., 2002). Además, la regulación de (Cl<sup>-</sup>) es dinámica y alterada incluso por breves episodios de actividad mejorada (Balena and Woodin, 2008; Fiumelli et al., 2005; Fiumelli and Woodin, 2007; Woodin et al., 2003) y más persistentemente por una variedad de insultos, lesiones, convulsiones y trastornos neurológicos (Khalilov et al., 2003; Khalilov et al., 2005; Cohen et al., 2002; Huberfeld et al., 2006; Huberfeld et al., 2007). En consecuencia, los agentes diuréticos que reducen (Cl<sup>-</sup>) constituyen agentes antiepilépticos y neuroprotectores novedosos (Dzhalala et al., 2005; Nardou et al., 2009; Kahle et al., 2008; Payne et al., 2003). En consonancia con esto, actualmente se están realizando ensayos clínicos con ese objetivo en epilepsias infantiles. De acuerdo con lo anterior, las solicitudes de patente revelan el uso de un agente diurético para tratar el dolor neuropático y los trastornos neuropsiquiátricos, incluyendo los trastornos epilépticos y de ansiedad (US2006/089350; WO2010/085352).

40 La bumetanida (Bum) (Cohen, 1981; Feit, 1981) es un diurético clásico que antagoniza selectivamente el cotransportador de NKCC1 - reduciendo así (Cl<sup>-</sup>) (Delpire et al., 1999; Delpire and Mount, 2002). Bum ha sido ampliamente utilizado en adultos desde 1975 y en niños desde 1986 y su farmacocinética en adultos y niños y sus efectos secundarios son bien conocidos (Lopez-Sambblas et al., 1997; Sullivan et al., 1996; Witte et al., 1986; Marshall et al., 1998). Bum se usa en casos agudos (edema después de un traumatismo craneal) y afecciones a largo plazo, incluyendo displasia broncopulmonar, síndromes nefríticos o congestiones cardíacas (O'Donnell et al., 2004; Mackie et al., 1986; Sullivan et al., 1996) y recientemente se ha informado de que reduce la gravedad de las convulsiones en un informe de un caso (Kahle et al., 2009). El uso de Bum es seguro siempre que se acompañe de una continua vigilancia clínica y biológica, especialmente en niños.

50 Los inventores han investigado ahora en 5 bebés autistas los efectos de bum con vigilancia clínica y biológica en curso. Fueron seleccionados sin a priori de un gran grupo de niños con trastornos del espectro autista (ASD) colocados en instituciones o en el hogar para proporcionar una variedad de casos. Se administró diurético (1 mg/24h, 0.5 mg dos veces al día) y el tratamiento continuó durante 3 meses, una duración mínima considerada suficiente para evaluar los efectos sobre el síndrome del autismo infantil (IAS). Presentamos una mejora significativa de las manifestaciones del IAS en los 5 niños. Estas observaciones requieren una amplia gama de selección del uso de Bum en el IAS y, más generalmente, en el autismo.

Resumen de la invención:

55 Los inventores han hecho la hipótesis de que un antagonista del cotransportador de NKCC que inhibe la importación de cloro en las neuronas y reduce así las concentraciones intracelulares puede ser útil para el tratamiento del autismo.

De este modo, la invención se refiere a un compuesto que inhibe la importación de cloro en neuronas y un compuesto que mejora la salida de cloro de las neuronas para su uso en el tratamiento del autismo.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica para uso en el tratamiento del autismo que comprende un compuesto según la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

- 5 Un objeto de la presente invención es un compuesto que disminuye la concentración intracelular de cloro dentro de las neuronas para uso en el tratamiento del autismo, en el que dicho compuesto inhibe el cotransportador de Na-K-Cl (NKCC).

En una realización de la invención, dicho compuesto es un inhibidor de NKCC1.

En otra realización de la invención, dicho compuesto es un diurético.

- 10 En otra realización de la invención, dicho compuesto es bumetanida o un análogo de la misma seleccionado de: bumetanida aldehído, bumetanida dibencilamida, bumetanida dietilamida, éster morfolinoetílico de bumetanida, éster de 3-(dimetilaminopropil) bumetanida, éster de N,N-dietilglicolamida bumetanida, éster de dimetilglicolamida bumetanida, éster de pivaxetil bumetanida, éster de metoxi(polietilenooxi)<sub>n-1</sub>-etil bumetanida, sal de benciltrimetilamonio bumetanida, y sal de cetiltrimetilamonio bumetanida.

- 15 Otro objeto de la presente invención es una composición farmacéutica para uso en el tratamiento del autismo que comprende dicho compuesto y un portador farmacéuticamente aceptable.

Descripción detallada de la invención:

Definiciones

A lo largo de la memoria descriptiva, se emplean varios términos y se definen en los párrafos siguientes.

- 20 Como se usa en este documento, el término "autismo" indica una familia de trastornos del desarrollo neural que se caracteriza por alteración de la interacción y comunicación social, comportamiento restringido y repetitivo acompañado de otros déficits. Todos estos signos comienzan antes de que el niño tenga tres años. El autismo afecta el procesamiento de información en el cerebro al alterar cómo las células nerviosas y sus sinapsis se conectan y se organizan; no se entiende bien cómo ocurre esto. Los otros dos trastornos del espectro autista (ASD) son el síndrome de Asperger, que carece de retrasos en el desarrollo cognitivo y el lenguaje, autismo atípico, diagnosticado cuando no se cumplen los criterios completos para los otros dos trastornos y PDD-NOS cuando el trastorno generalizado del desarrollo no se especifica.

- 25 Como se usa en este documento, NKCC para "cotransportador de Na-K-Cl" indica una proteína que ayuda al transporte activo de sodio, potasio y cloro dentro y fuera de las células. Hay varias variedades, o isoformas, de esta proteína de transporte de membrana, notablemente NKCC1 y NKCC2. NKCC1 está ampliamente distribuido en todo el cuerpo, pero también en el cerebro y en particular en el desarrollo del cerebro animal y humano. Actúa para aumentar el cloro intracelular en las neuronas y por lo tanto para hacer GABA más excitatorio. Extensas investigaciones indican que el bloqueo de NKCC1 reduce el cloro intracelular con lo que aumentan las acciones inhibitorias de GABA. Los estudios in vivo e in vitro han indicado ahora que el bloqueo genético y/o farmacológico de NKCC1 reduce la actividad de red temprana.

- 30 Como se usa en este documento, el término KCC para "cotransportador de cloruro de potasio" indica un cotransportador de cloro. Hay varias variedades, o isoformas, notablemente KCC2. KCC2 se encuentra en muchos órganos, especialmente en el cerebro actúa para eliminar el cloro intracelular y, por tanto, para aumentar las acciones inhibitorias de GABA. Los bloqueadores de KCC2 transforman GABA en excitativos y facilitan la generación de convulsiones y la invalidación genética de KCC2 es letal en ratones. KCC2 también se expresa relativamente tarde en el desarrollo en paralelo con el cambio de las acciones de GABA de excitador a inhibitorio. También, una amplia gama de insultos y convulsiones eliminan KCC2 funcional, lo que conduce a acciones excitatorias persistentes de GABA y otras convulsiones.

- 35 Como se usa en este documento, el término "diurético" indica cualquier fármaco que eleve la velocidad de micción y, por lo tanto, proporciona un medio de diuresis forzada. Hay varias categorías de diuréticos. Todos los diuréticos aumentan la excreción de agua de los cuerpos, aunque cada clase lo hace de una manera distinta.

Como se usa en este documento, el término "diuréticos de bucle" indica diuréticos que actúan sobre el bucle ascendente de Henle en el riñón.

- 40 Como se usa en este documento, el término "tratar" o "tratamiento", indica invertir, aliviar, inhibir el progreso o prevenir el trastorno o afección a la que se aplica dicho término, o revertir, aliviar, inhibir el progreso o prevenir uno o más síntomas del trastorno o afección a la que se aplica dicho término.

Antagonista y sus usos

Un primer objeto de la invención se refiere a un compuesto que inhibe la importación de cloro en neuronas o un compuesto que mejora la salida de cloro de las neuronas para uso en el tratamiento del autismo.

En una realización preferida, el compuesto según la invención inhibe el cotransportador de NKCC o activa el cotransportador de KCC.

- 5 En otra realización preferida, el compuesto según la invención es un antagonista del cotransportador de NKCC o un agonista del cotransportador de KCC.

En una realización, dicho antagonista de NKCC o agonista de KCC puede ser un antagonista de bajo peso molecular, por ejemplo, una molécula orgánica pequeña (natural o no).

- 10 El término "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula (natural o no) de un tamaño comparable a las moléculas orgánicas generalmente usadas en productos farmacéuticos. El término excluye macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Las moléculas orgánicas pequeñas preferidas tienen un intervalo de tamaños de hasta aproximadamente 5000 Da, más preferiblemente hasta 2000 Da, y lo más preferiblemente hasta aproximadamente 1000 Da.

- 15 En otra realización, el antagonista de NKCC o agonista de KCC de la invención puede consistir en un anticuerpo que inhibe NKCC o active KCC o un fragmento de anticuerpo que inhibe NKCC o activa KCC.

- 20 Los anticuerpos dirigidos contra NKCC o KCC pueden ser elevados de acuerdo con métodos conocidos administrando el antígeno o epítipo apropiado a un animal huésped seleccionado, por ejemplo, de cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros. Se pueden usar diversos adyuvantes conocidos en la técnica para mejorar la producción de anticuerpos. Aunque los anticuerpos útiles en la práctica de la invención pueden ser policlonales, se prefieren los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales contra NKCC o KCC se pueden preparar y aislar usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Las técnicas para la producción y el aislamiento incluyen, pero no se limitan a, la técnica del hibridoma descrita originalmente por Kohler and Milstein (1975); la técnica de hibridoma de células B humanas (Cote et al., 1983); y la técnica EBV-hibridoma (Cole et al., 1985). Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos 4,946,778) se pueden adaptar para producir anticuerpos anti-NKCC o anti-KCC de cadena sencilla. Los antagonistas de NKCC o agonistas de KCC útiles en la práctica de la presente invención también incluyen fragmentos de anticuerpo anti-NKCC o fragmento de anticuerpo anti-KCC que incluye, pero no se limita a fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, que se pueden generar por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo intacta, y fragmentos Fab, que se pueden generar reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Alternativamente, se pueden construir bibliotecas de expresión de Fab y/o scFv para permitir la identificación rápida de fragmentos que tienen la especificidad deseada para NKCC o KCC.

- 35 También se pueden preparar anticuerpos anti-NKCC humanizados o anticuerpos anti-KCC y fragmentos de anticuerpos de los mismos de acuerdo con técnicas conocidas. Los "anticuerpos humanizados" son formas de anticuerpos quiméricos no humanos (por ejemplo, roedores) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de marco (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Además de esto, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos al menos uno y, por lo general, dos dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todas las FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), por lo general de una inmunoglobulina humana. Los métodos para preparar anticuerpos humanizados se describen, por ejemplo, por Winter (la Patente de los Estados Unidos 5,225,539) y Boss (Celltech, la Patente de los Estados Unidos 4,816,397).

- 50 En aún otra realización, los antagonistas de NKCC o agonistas de KCC se pueden seleccionar de aptámeros. Los aptámeros son una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos u oligopéptidos con la capacidad de reconocer virtualmente cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Tales ligandos se pueden aislar a través de evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencia aleatoria, como se describe en Tuerk C. and Gold L., 1990. La biblioteca de secuencias aleatorias se puede obtener mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado químicamente, de una secuencia única. Las posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas se han revisado en Jayasena S.D., 1999. Los aptámeros de péptidos consisten en una región variable de anticuerpo conformacionalmente restringida mostrada por una proteína de plataforma, tal como Thioredoxin A de E. coli que se seleccionan de bibliotecas combinatorias por dos métodos híbridos (Colas et al., 1996).

Los ARN inhibidores pequeños (ARNip) también pueden funcionar como inhibidores de la expresión de genes cotransportadores de NKCC para su uso en la presente invención. La expresión del gen cotransportador de NKCC se puede reducir poniendo en contacto un sujeto o célula con un ARN de doble cadena pequeño (ARNdc), o un vector o construcción que provoca la producción de un ARN de doble cadena pequeño, de tal manera que la expresión del gen cotransportador de NKCC sea específicamente (esto es, interferencia de ARN o ARNi). Los métodos para seleccionar un vector que codifica ARNdc o ARNdc apropiado son bien conocidos en la técnica para genes cuya secuencia es conocida (por ejemplo, véase Tuschl, T. et al. (1999); Elbashir, S. M. et al. (2001); Hannon, G.J. (2002); McManus, MT. et al. (2002); Brummelkamp, TR. et al. (2002); las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,573,099 y 6,506,559; y las Publicaciones de las Patentes Internacionales Nos. WO 01/36646, WO 99/32619, y WO 01/68836).

Las ribozimas también pueden funcionar como inhibidores de la expresión del gen cotransportador de NKCC para su uso en la presente invención. Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica del ARN. El mecanismo de la acción de la ribozima implica la hibridación específica de la secuencia de la molécula de ribozima con el ARN diana complementario, seguido de escisión endonucleolítica. Las moléculas de ribozima con motivo de horquilla o de cabeza de martillo diseñadas que catalizan específica y eficientemente la escisión endonucleolítica de las secuencias de ARNm del cotransportador de NKCC, son por tanto útiles dentro del alcance de la presente invención. Los sitios de escisión específicos de ribozimas dentro de cualquier blanco de ARN potencial se identifican inicialmente explorando la molécula diana para sitios de escisión de ribozimas, que por lo general incluyen las siguientes secuencias, GUA, GUU y GUC. Una vez identificados, se pueden evaluar secuencias cortas de ARN de entre aproximadamente 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del gen diana que contiene el sitio de escisión para las características estructurales pronosticadas, tales como estructura secundaria, que pueden hacer que la secuencia oligonucleotídica sea inadecuada. La idoneidad de los objetivos candidatos también se puede evaluar probando su accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios, utilizando, por ejemplo, ensayos de protección con ribonucleasa.

Tanto los oligonucleótidos antisentido como los ribozimas útiles como inhibidores de la expresión del gen cotransportador de NKCC se pueden preparar por métodos conocidos. Éstos incluyen técnicas para síntesis química tales como, por ejemplo, mediante síntesis química de fosforamada en fase sólida. Alternativamente, se pueden generar moléculas de ARN antisentido por transcripción in vitro o in vivo de secuencias de ADN que codifican la molécula de ARN. Tales secuencias de ADN se pueden incorporar en una amplia variedad de vectores que incorporan promotores de ARN polimerasa apropiados tales como los promotores de polimerasa T7 o SP6. Se pueden introducir diversas modificaciones en los oligonucleótidos de la invención como un medio para aumentar la estabilidad intracelular y la semivida. Las posibles modificaciones incluyen, pero no se limitan a, la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula o el uso de enlaces fosforotioato o 2'-O-metilo en lugar de fosfodiesterasa dentro del esqueleto oligonucleotídico.

Los oligonucleótidos antisentido ARNip y ribozimas de la invención se pueden administrar in vivo solo o en asociación con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia del ARNip del oligonucleotídico antisentido o ácido nucleico de ribozima a las células y preferiblemente células que expresan el cotransportador de NKCC. Preferiblemente, el vector transporta el ácido nucleico a células con degradación reducida en relación con el grado de degradación que daría lugar a la ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la invención incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, fagémidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes víricas o bacterianas que han sido manipulados mediante la inserción o incorporación de las secuencias de ARNip o ribozima del oligonucleotídico antisentido. Los vectores virales son un tipo preferido de vector e incluyen, pero no se limitan a secuencias de ácidos nucleicos de los siguientes virus: retrovirus, tales como virus de leucemia murina de moloney, virus de sarcoma murino de harvey, virus de tumor mamario murino, y virus de sarcoma de rouse; adenovirus, virus adenoasociado; virus de tipo SV40; virus de polioma; virus de Epstein-Barr; virus del papiloma; virus herpes; virus vaccinia; virus de la poliomielitis; y virus de ARN tal como un retrovirus. Se pueden emplear fácilmente otros vectores no nombrados, pero conocidos en la técnica.

En la realización preferida, el compuesto que inhibe el cotransportador de NKCC es un diurético.

En otra realización preferida, el diurético es un diurético de bucle.

En una realización preferida, el compuesto según la invención es un antagonista de NKCC1.

En otra realización preferida, el compuesto según la invención es bumetanida.

En una realización preferida, el compuesto según la invención se selecciona entre furosemida, ácido etacrínico, torsemida, azosemida, muzolimina, piretanida, tripamida y similares; tiazida y diuréticos similares a tiazida, tales como bendroflumetiazida, benzotiazida, clorotiazida, hidroclorotiazida, hidroflumetiazida, metilclotiazida, politiazida, triclorometiazida, clortalidona, indapamida, metolazona y quinetazona; y análogos y derivados funcionales de tales compuestos.

En una realización preferida, un análogo según la invención puede tener una fórmula como se describe en la solicitud de patente WO2006110187.

- En una realización preferida, el análogo puede ser bumetanida aldehído, bumetanida dibencilamida, bumetanida dietilamida, éster morfolinoetílico de bumetanida, éster de 3-(dimetilaminopropil) bumetanida, éster de N,N-dietilglicolamida bumetanida, éster de dimetilglicolamida bumetanida, éster de pivaxetil bumetanida, éster de metoxi(polietilenooxi)<sub>n-1</sub>-etil bumetanida, sal de benciltrimetilamonio bumetanida, y sal de cetiltrimetilamonio bumetanida.
- 5 En otra realización preferida, el análogo puede ser furosemida aldehído, éster etílico de furosemida, éster cianometílico de furosemida, éster bencílico de furosemida, éster morfolinoetílico de furosemida, éster de 3-(dimetilaminopropil) furosemida, N,N-dietilglicolamida éster de furosemida, dibencilamida de furosemida, sal de benciltrimetilamonio de furosemida, sal de cetiltrimetilamonio furosemida, éster de N,N-dimetilglicolamida furosemida, metoxi(polietilenooxi)<sub>n-1</sub>-etil éster de furosemida, éster de pivaxetil furosemida y éster de propaxetil furosemida.
- 10 En otra realización preferida, el análogo puede ser piretanida aldehído, éster metílico de piretanida, éster cianometílico de piretanida, éster bencílico de piretanida, éster morfolinoetílico de piretanida, éster de 3-(dimetilaminopropil) piretanida, éster de N,N-dietilglicolamida piretanida, dietilamida de piretanida, dibencilamida de piretanida, sal de benciltrimetilamonio piretanida, sal de cetiltrimetilamonio piretanida, éster de N,N-dimetilglicolamida piretanida, éster de metoxi(polietilenooxi)<sub>n-1</sub>-etil piretanida, éster de pivaxetil piretanida y/o éster de propaxetil piretanida.
- 15 En otra realización preferida, el análogo puede ser azosemidas sustituidas con tetrazolilo (tales como azosemidas sustituidas con metoximetil tetrazolilo, azosemidas sustituidas con metiltiometil tetrazolilo y azosemidas sustituidas con N-mPEG350-tetrazolilo), sal de benciltrimetilamonio de azosemida y/o sal de cetiltrimetilamonio de azosemida.
- En otra realización preferida, el análogo puede ser sales de amonio cuaternario de torsemida sustituida con piridina o las correspondientes sales internas (zwitteriones). Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, sales de torsemida de metoximetilpiridinio, sales de torsemida de metiltiometilpiridinio y sales de torsemida de N-mPEG350-piridinio.
- 20 En una realización preferida, el compuesto según la invención es un agonista de KCC2.
- En una realización preferida, el compuesto según la invención es un compuesto que inhibe el nivel de la proteína NKCC en la superficie celular o mejora el nivel de la proteína KCC en la superficie celular.
- En otra realización preferida, la célula es una neurona.
- 25 Otro objeto de la invención se refiere a un método para tratar el autismo que comprende administrar a un sujeto que lo necesite con un compuesto que inhibe la importación de cloro en neuronas o un compuesto que mejora la salida de cloro a partir de las neuronas.
- En un aspecto, la invención se refiere a un método para tratar el autismo que comprende administrar a un sujeto que lo necesite un antagonista de NKCC como se ha descrito anteriormente.
- 30 Los compuestos de la invención se pueden administrar en forma de una composición farmacéutica, como se define a continuación.
- Preferiblemente, dicho compuesto que inhibe la importación de cloro en las neuronas o que mejora la salida de cloro de las neuronas, preferiblemente dicho antagonista de NKCC o dicho agonista de KCC, se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz.
- 35 Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad suficiente de compuesto para tratar y/o prevenir enfermedades como se ha descrito anteriormente.
- Se entenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención será decidido por el médico tratante dentro del alcance de un juicio médico acertado. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores incluyendo el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la ruta de administración y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidentes con el polipéptido específico empleado; y factores similares bien conocidos en las artes médicas. Por ejemplo, está bien dentro de la habilidad de la técnica para iniciar dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y para aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado. Por ejemplo, está dentro de la técnica de iniciar dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y para aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos se puede variar en una amplia gama de 0.01 a 1,000 mg por adulto por día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100, 250 y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente que se va a tratar. Un medicamento contiene por lo general de aproximadamente 0.01 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo, preferiblemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Normalmente se suministra una cantidad eficaz del fármaco a un nivel de dosificación de 0.0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal al día, especialmente de aproximadamente 0.001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal al día.
- 40
- 45
- 50

Los compuestos según la invención se pueden usar para la preparación de una composición farmacéutica para uso en el tratamiento del autismo.

5 Por consiguiente, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una dosis eficaz de un compuesto que inhibe el cotransportador de NKCC; preferiblemente un antagonista de NKCC o que activa el cotransportador de KCC, según la invención.

Cualquier agente terapéutico de la invención se puede combinar con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

10 "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción inapropiada cuando se administra a un mamífero, especialmente un humano, según sea apropiado. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un material de relleno, diluyente, material encapsulante, o agente auxiliar de formulación, no tóxico, sólido, semisólido o líquido, de cualquier tipo.

15 La forma de las composiciones farmacéuticas, la ruta de administración, la dosificación y el régimen dependen naturalmente de la afección que se va a tratar, de la gravedad de la enfermedad, de la edad, peso y sexo del paciente, etc.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular para una administración tópica, oral, intranasal, parenteral, intraocular, intravenosa, intramuscular o subcutánea y similares.

20 Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Estas pueden ser en particular soluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato monosódico o disódico, cloro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas que después de la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.

25 Las dosis utilizadas para la administración se pueden adaptar en función de diversos parámetros y, en particular, en función del modo de administración utilizado, de la patología relevante, o alternativamente de la duración deseada del tratamiento.

30 Además, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; cápsulas de liberación en el tiempo; y se puede utilizar cualquier otra forma actualmente. La composición farmacéutica según la invención puede contener también otros compuestos, que pueden ser biológicamente activos o inactivos. Por ejemplo, uno o más agentes de tratamiento de la presente invención pueden combinarse con otro agente, en una combinación de tratamiento, y administrarse de acuerdo con un régimen de tratamiento de la presente invención. Tales combinaciones se pueden administrar como composiciones separadas, combinadas para suministrarse en un sistema de suministro complementario, o formuladas en una composición combinada, tal como una mezcla o un compuesto de fusión. Adicionalmente, la combinación de tratamiento mencionada anteriormente puede incluir un potenciador de la permeabilidad de BBB y/o un agente hiperosmótico.

35 Alternativamente, los compuestos de la invención que inhiben el cotransportador de NKCC o activan el cotransportador de KCC pueden identificarse adicionalmente mediante métodos de selección como se describe a continuación.

#### Métodos de selección

40 Otro objeto de la invención se refiere a un método para seleccionar un compuesto que inhibe el cotransportador de NKCC o activa el cotransportador de KCC.

En particular, la invención proporciona un método para seleccionar un antagonista de NKCC o un agonista de KCC para el tratamiento del autismo.

45 Por ejemplo, el método de selección puede medir la unión de un compuesto candidato a NKCC o KCC o a células o membranas que llevan NKCC o KCC o una proteína de fusión del mismo por medio de un marcador asociado directa o indirectamente con el compuesto candidato. Alternativamente, un método de selección puede implicar la medición o, cualitativa o cuantitativamente, la detección de la competencia de unión de un compuesto candidato al receptor con un competidor marcado (por ejemplo, un antagonista).

50 Además, los métodos de selección pueden probar si el compuesto candidato da como resultado una señal generada por un antagonista de NKCC o un agonista de KCC, utilizando sistemas de selección apropiados para las células que llevan el receptor.

En una realización particular, el método de selección de la invención comprende la etapa que consiste en:

a) proporcionar neuronas que expresan NKCC o KCC en su superficie;

- b) incubar dichas células con un compuesto candidato;
- c) determinar si dicho compuesto candidato se une e inhibe NKCC o se une y activa KCC; y
- d) seleccionar el compuesto candidato que se une e inhibe NKCC o se une y activa KCC.

5 En una realización, el cotransportador de NKCC o el cotransportador de KCC usado en el método de selección pueden ser sus ortólogos y derivados como se define en la presente invención.

En general, tales métodos de selección implican proporcionar células apropiadas que expresan NKCC o KCC, sus ortólogos y derivados de los mismos en su superficie. En particular, se puede emplear un ácido nucleico que codifica NKCC o KCC para transfectar células para expresar así el receptor de la invención. Dicha transfección se puede realizar por métodos bien conocidos en la técnica.

10 En una realización particular, las células se seleccionan del grupo que consiste en células gliales, células neuronales, neuronas, líneas celulares transfectadas para investigaciones o células renales de cualquier especie (ratón, humanos ...).

15 El método de selección de la invención se puede emplear para determinar un antagonista o agonista poniendo en contacto dichas células con compuestos que se van a seleccionar y determinar si dicho compuesto inhibe o activa el cotransportador.

La determinación de la inhibición de NKCC se puede evaluar determinando la viabilidad celular. Se considera que un compuesto disminuye la viabilidad celular si es negativo en uno cualquiera de los métodos descritos a continuación como ejemplos de actividad de rescate celular.

20 De acuerdo con una realización de la invención, el compuesto candidato se puede seleccionar de una biblioteca de compuestos previamente sintetizados, o una biblioteca de compuestos para los cuales la estructura se determina en una base de datos, o de una biblioteca de compuestos que han sido sintetizados de compuestos nuevos o naturales.

25 El compuesto candidato se puede seleccionar del grupo de (a) proteínas o péptidos, (b) ácidos nucleicos y (c) compuestos orgánicos o químicos (naturales o no). Ilustrativamente, se pueden obtener bibliotecas de ácidos nucleicos candidatos preseleccionados realizando el método SELEX tal como se describe en los documentos US 5,475,096 y US 5,270,163. Además, ilustrativamente, el compuesto candidato se puede seleccionar del grupo de anticuerpos dirigidos contra NKCC o KCC.

Tal método se puede usar para seleccionar antagonistas de NKCC o agonistas de KCC según la invención.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes tablas y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben ser interpretados en modo alguno como limitativos del alcance de la presente invención.

30 Tabla 1

Resumen de los pacientes incluidos en el estudio. 4 niñas y un niño entre 3 años y 8 meses a 11 años y 5 meses con signos autistas clásicos (F84.0 de la ICD 10).							
	Edad	sexo	diagnóstico	ADI1	ADI2	ADI3	ADI4
1	8 años 11 meses	M	F84.00	18 (10)	13 (8)	5 (3)	5 (1)
2	3 años 8 meses	F	F84.00	20 (10)	8 (7)	4 (3)	5 (1)
3	8 años 7 meses	M	F84.00	21 (10)	8 (7)	5 (3)	4 (1)
4	11 años 5 meses	M	F84.00	24 (10)	14 (7)	4 (3)	5 (1)
5	10 años 1 meses	M	F84.00	17 (10)	20 (8)	4 (3)	3 (1)

Tabla 2

Resultados resumidos de los efectos de la bumetanida en los cinco pacientes (C = controles antes del tratamiento, Bum = 3 meses después de la bumetanida).										
	1		2		3		4		5	
	C	Bum								

## ES 2 627 914 T3

CARS total	38,5	28	40,5	36	38	30	53,5	49	32	28
CARS nb ítem sup a 3	7	1	7	4	9	4	14	11	3	1
ABC total	84	57	79	49	89	62	93	79	46	36
ABC1	20	17	9	3	20	12	15	15	18	17
ABC2	9	1	19	11	12	5	26	19	10	7
ABC3	12	6	10	6	13	3	15	12	3	1
ABC4	39	28	41	29	32	33	37	33	15	11
ABC5	4	5	0	0	12	9	0	0	0	0
CGI1	5	5	7	7	5	5	7	7	4	4
CGI2		3		3		3		3		3
CGI3		3.00		3.00		2.00		2.00		3.00
RDEG total	49	28	60	48	39	37	75	69	49	40
Desregulación de RDEG	30	20	37	34	29	31	50	45	32	25
Lentitud de RDEG	12	5	14	8	6	5	15	14	10	9
RRB total	51	32	69	26	63	31	46	40	46	38
RRB F1	21	15	21	13	12	6	16	14	11	9
RRB F2	1	1	12	0	20	7	2	2	8	9
RRB F3	17	6	18	9	19	9	18	16	5	5
RRB F4	10	8	14	4	9	8	8	6	18	12

Ejemplo:

### Material y Métodos

- 5 Los inventores han investigado en 5 lactantes autistas los efectos de bum con la vigilancia clínica y biológica en curso. Fueron seleccionados sin a priori de un gran grupo de niños con IAS colocados en instituciones o en el hogar para proporcionar una variedad de casos. El diurético se administró (1mg/24h, 0.5mg dos veces al día) y el tratamiento continuó durante 3 meses, una duración mínima considerada suficiente para una evaluación de los efectos sobre el IAS. Se reporta una mejora de las manifestaciones de IAS en los 5 niños. Estas observaciones requieren una amplia gama de selección del uso de Bum en IAS.
- 10 Los niños fueron diagnosticados por un psiquiatra clínico experimentado usando criterios estrictos de ICD-10 (OMS, 1993) para el trastorno autista. Estos niños no tenían antecedentes de enfermedad neurológica (EEG normal). Las pruebas genéticas realizadas sistemáticamente fueron negativas, indicando que no había mutación identificable (cariotipo y X frágil). Se recogió la ADI-R (Le Couteur et al., 1989; Lord et al., 1994) para todos los participantes para confirmar los diagnósticos. Un examen clínico y biológico demostró que ninguno de los lactantes tenía una
- 15 contraindicación para bum (incluyendo ionograma sanguíneo, transaminasas, fosfatasa alcalinas, uremia, creatinemia, aclaramiento de creatinina, yGT, glicemia notablemente). Debido a que la hipopotasemia puede inducir una arritmia por ráfaga de ondas, se realizó un ECG para asegurar que ninguno de los pacientes tenía un alargamiento del intervalo QT debido a que tienen una mayor propensión a generar arritmia. Se realizó una vigilancia clínica semanal durante el
- 20 primer, segundo y tercer mes después del inicio del tratamiento, incluyendo sodio y potasio en sangre una semana y 2 meses después del inicio del tratamiento. Ninguno de los lactantes tenía trastornos neurológicos asociados y ninguno estaba bajo otro tratamiento desde al menos tres meses.

Para determinar la posible eficacia del índice terapéutico, se basó en 5 determinaciones de comportamiento clásico de la gravedad de IAS incluyendo:

- 25 i) La escala de evaluación del autismo infantil (CARS) es una escala de calificación de 15 ítems que se utiliza como instrumento de selección y para evaluar los cambios en los síntomas del autismo con el tiempo. Estos ítems

comprenden una amplia gama de síntomas de autismo y se clasifican en una escala de 1 a 4, con 1 indicando un comportamiento normal y 4 denotando comportamiento severamente anormal y/o inapropiado. La puntuación total se determina sumando los 15 ítems. El número de ítems con una escala igual o superior a 3 es una indicación fuerte de la gravedad del síndrome, mientras que una disminución en la puntuación total después del tratamiento y/o en el número de ítems igual o superior a 3, indica mejoría en la gravedad de las características autistas (Rogers et al., 1993). Este instrumento fue desarrollado para ayudar al proceso de diagnóstico, pero también es sensible a los cambios en el desarrollo de los síntomas autistas (Schopler et al., 1980, Mesibov et al., 1989) y se puede usar para determinar alteraciones producidas por un tratamiento (Di Lalla and Rogers 1994 también véase la versión francesa de B. Rogé 1989). La notación se obtuvo durante una sesión cuando los niños fueron colocados en un juego y animó la discusión con los padres sobre el comportamiento del niño durante la última semana.

ii) La ABC (lista de verificación de comportamiento aberrante) es un cuestionario que el médico tratante llena durante una discusión con los padres (Aman et al., 1985; Rojahn and Hinsel 1991). Es ampliamente utilizada en ensayos terapéuticos para evaluar el impacto de las moléculas en el comportamiento. ABC es un problema estandarizado de 58 ítems con una lista de verificación de comportamiento que permite la clasificación de ítems en una escala de 4 puntos de 0 (que no ocurre en absoluto) a 3 (grave). Las preguntas de la lista de verificación comprenden 5 subescalas: irritabilidad (ABC1), retracción social (ABC2), estereotipia (ABC3), hiperactividad (ABC4) y discurso excesivo (ABC5). ABC ha sido validado en gran escala en los Estados Unidos y se adapta a estudios de poblaciones infantiles. Una versión francesa se ha utilizado en el presente estudio (Bouvard et al., 2000).

iii) Las impresiones clínicas globales (CGI) se utilizan ampliamente en la mayoría de los ensayos clínicos para examinar la gravedad de la enfermedad. Se escala de 0 a 7, siendo 1 el valor normal y se considera una buena estimación de la situación global del paciente. Se pide al clínico que haga una cita de la enfermedad en función de su experiencia con otros pacientes incluidos en la investigación. La segunda impresión proporciona una estimación de la mejora global del paciente y mejoramiento en comparación con el inicio de la prueba. Hay 7 niveles; cero indica que no hay evolución. La tercera impresión es la más útil, ya que se refiere al índice terapéutico y requiere una estimación única que indique tanto los efectos terapéuticos como los secundarios. Esto se utiliza en la investigación sobre la nueva generación de agentes psicóticos con pocos efectos secundarios (Guy 1976).

iv) RDEG la grilla de evaluación del trastorno de regulación es una escala de actividad francesa (96) que permite detectar el nivel de desregulación y la lentitud de respuesta de los lactantes (Adrien 1996; Adrien et al. 2001, Blanc et al. 2005). El cuestionario es llenado por los padres y se refiere al comportamiento de los niños durante la última semana.

v) La escala de comportamiento repetitivo y restringido (RRB) (Bourreau et al 2009) es una lista de verificación estandarizada de 35 ítems que permite calificar el ítem en una escala de 5 puntos de 0 -el comportamiento nunca es expresado por la persona- a 4 - el comportamiento es severamente expresado y característico de la persona). El análisis factorial produce cuatro factores clínicos significativos, es decir, los estereotipos sensoriomotores (F1), la reacción al cambio (F2), los comportamientos restringidos (F3) y la insuficiencia de modulación (F4).

### 35 Resultados

En la tabla 1 se muestra un resumen de los pacientes. 3 niños utilizaron un lenguaje funcional, mientras que el resto de los niños y niñas no lo hicieron. Las puntuaciones de ADI-R están por encima del umbral que confirma el diagnóstico clínico. Los niños 1, 3, 5 siguen una escuela tradicional acompañada por una persona auxiliar. Durante el año, el niño 1 y el niño 2 son seguidos por un psicólogo que usa el método ABA una vez por semana para el niño 1 y 3 veces por semana para el niño 2). El niño 2 también tiene 2 sesiones semanales de ortofonía dependiendo del sistema de comunicación de intercambio de imágenes (PECS). El niño 3 tiene un tratamiento ortofónico semanal y el niño 5 no tiene tratamiento. El niño 4 es tratado en una institución médica especializada en niños con retraso mental. La prueba de bum se hizo durante las vacaciones de verano, cuando la terapia conductual y la escuela fueron interrumpidas.

La tabla 2 muestra las puntuaciones de las diferentes escalas usadas y las obtenidas antes y después de tres meses de tratamiento. Antes del tratamiento, 4 niños (1, 2, 3, 4) tenían una puntuación CARS superior a 36, indicando un IAS severo. El niño 5 mostró un grado medio de autismo. Los resultados muestran una mejora de las puntuaciones totales de CARS, ABC, RDEG y RRB para todos los niños tres meses después del tratamiento. CGI1 no se alteró significativamente, pero esta prueba se refiere a la gravedad de la enfermedad que en esta etapa no revela cambios significativos. También se observó un pequeño progreso global de CGI2 para los 5 niños. Los pacientes 1, 2 y 5 tenían un índice de 3 en CGI3 indicando una acción moderada sin efectos secundarios. Los pacientes 3 y 4 tenían un índice de 2 indicando una acción mínima sin efectos secundarios. El número de ítems iguales o por encima de 3 con CARS se redujo por el tratamiento en los cinco niños. La subpuntuación de ABC5, no fue alterado por el tratamiento. En los cinco niños, ABC2, ABC3, ABC4, desregulación de RDEG, lentitud de RDEG, RRB F4; RRB F1 se mejoraron a un grado variable. En contraste, los resultados de ABC1, RRB F2, RRB F3 son heterogéneos.

55 Iniciando una semana después del tratamiento y una vez al mes, se realizó una vigilancia clínica que incluía investigación de deshidratación, hipotensión ortostática, hipersensibilidad, calambres, astenia, diarrea, mialgia, artralgia, náuseas, mareos. Los niveles de sodio y potasio se mantuvieron estables (pruebas realizadas una semana y 2 meses después del inicio del tratamiento, no se encontró ningún efecto adverso.

## Discusión

Los resultados actuales sugieren que la bumetanida mejora los aspectos de comportamiento del IAS sugiriendo que el diurético tiene una acción global. Hasta donde sabemos, este es el primer informe que plantea la posibilidad de alteraciones del cloro en el autismo.

5 Las conclusiones derivadas de estas observaciones se ven obstaculizadas por varias limitaciones, incluyendo la falta de investigaciones aleatorias doble ciego y placebo, debido al número limitado de casos. Los efectos del placebo son más frecuentes en los niños que en los adultos (Rheims et al., 2008), esto también se aplica al autismo (Sandler 2005). Claramente, las investigaciones a gran escala son necesarias para confirmar o informar las observaciones. Se es consciente de estas limitaciones para demostrar los efectos positivos de la bumetanida e involucrar sus acciones en IAS. Sin embargo, las observaciones indican que la bumetanida no tiene efectos secundarios con una tolerancia general al diurético. También, se nos animó a presentar estas observaciones por la dramática mejoría del comportamiento sugerida por los resultados y la insistencia de los padres de que sus hijos están más presentes y su deseo de seguir el tratamiento hablando en favor de una acción significativa de bum. A pesar de la dificultad de traducir esta noción subjetiva, es interesante resaltar que el mismo término de presencia fue utilizado por todos los padres.

15 En la actualidad no es posible determinar si la bumetanida ejerce una acción preferencial sobre un aspecto de la sintomatología. Se espera que la falta de efectos de la bumetanida en ABC5 - discurso inapropiado y excesivo fuera de contexto- sea probable porque no es probable que mejore en 3 meses de habla. En contraste, casi todas las puntuaciones fueron mejoradas a grados variables, haciendo hincapié en la acción general de la bumetanida. La alteración del comportamiento cognitivo y emocional es una característica básica del IAS (Kanner, 1943; Hill and Frith, 2003; Hill, 2004; Bieberich and Morgan, 2004) y el hecho de que la bumetanida permite una mejor regulación cognitiva tal vez esté correlacionada con la mejor presencia reportada por los padres. Los resultados de las subescalas de ABC sugieren un progreso de los estados de vigilancia y las interacciones sociales, los movimientos estereotípicos y la hiperactividad de nuevo en consonancia con la noción de regulación cognitiva. La farmacodinámica de la bumetanida ha sido investigada en neonatos humanos (Sullivan et al., 1996; Lopez-Sambblas et al., 1997) y un reciente informe sugiere que la bumetanida reduce la severidad de la convulsión en un niño epiléptico (Kahle et al., 2009). Una amplia gama de investigaciones experimentales sugiere que la bumetanida reduce la severidad de las convulsiones (Kahle and Staley, 2008; Kahle et al., 2008; Nardou et al., 2009). Actualmente se está investigando la bumetanida como un nuevo tratamiento para las convulsiones neonatales (EU FP7 Nemo project).

30 Las observaciones son compatibles con la hipótesis de trabajo de que la bumetanida mejora la eficacia de los procesos integradores neuronales reduciendo el cloro intracelular y reforzando las acciones inhibitorias de GABA. El marco conceptual básico de estas investigaciones es que las neuronas que no respetan el programa de desarrollo mantener las características inmaduras, incluyendo posiblemente alta (Cl<sup>-</sup>), y otras propiedades eléctricas y de arquitectura (Ben-Ari, 2008). Otras observaciones sugieren un vínculo entre las señales GABAérgicas y el autismo (Minshew, 1997; Hussman, 2001; Schmitz et al., 2005). También, varias observaciones de imágenes cerebrales indican una pérdida significativa de receptores de GABA/benzodiazepinas en el autismo, especialmente en el hipocampo, el cerebelo y diversas estructuras límbicas (Garreau et al., 1993; Oblak et al., 2009; Guptill et al., 2007; Blatt, 2005).

40 En conclusión, una serie emergente de estudios sugiere que el cloro se acumula durante la maduración del cerebro en relación con diversas malformaciones de desarrollo. Las observaciones actuales sugieren que un diurético convencional que reduce esta acumulación y actúa para restablecer las acciones inhibitorias de GABA puede ejercer acciones beneficiosas en el autismo que requieren estudios clínicos y experimentales más detallados sobre los enlaces entre GABA(Cl<sup>-</sup>) e IAS.

## Referencias:

A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica al que pertenece esta invención. Las descripciones de estas referencias se incorporan aquí por referencia en la presente descripción.

45 Adrien JL, Rossignol-Deletang N, Martineau J, Couturier G, Barthelemy C (2001) Regulation of cognitive activity and early communication development in young autistic, mentally retarded, and young normal children. *Dev Psychobiol* 39:124-136.

Adrien J.-L (1996) *Autisme du jeune enfant: développement psychologique et regulation de l'activité*. Paris: Expansion scientifique Française.

50 Aman MG, Singh NN, Stewart AW et al. (1985) The Aberrant Behavior Checklist: a behaviour rating scale for assessment of treatment effects. *American Journal of Mental Deficiency* 89 (5): 485-491.

Balena T, Woodin MA (2008) Coincident pre- and postsynaptic activity downregulates NKCC1 to hyperpolarize E(Cl) during development. *Eur J Neurosci* 27:2402-2412.

55 Ben Ari Y (2002) Excitatory actions of GABA during development: The nature of the nurture. *Nature Reviews Neuroscience* 3:728-739.

- Ben Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, Khazipov R (2007) GABA: A Pioneer Transmitter That Excites Immature Neurons and Generates Primitive Oscillations. *Physiol Rev* 87:1215-1284.
- Ben-Ari Y (2008) Neuro-archaeology: pre-symptomatic architecture and signature of neurological disorders. *Trends Neurosci* 31:626-636.
- 5 Bieberich AA, Morgan SB (2004) Self-regulation and affective expression during play in children with autism or Down Syndrome: a short-term longitudinal study. *J Autism Dev Disord* 34:439-448.
- Blanc R, Adrien JL, Roux S, Barthelemy C (2005) Dysregulation of pretend play and communication development in children with autism. *Autism* 9:229-245.
- 10 Blatt GJ (2005) GABAergic cerebellar system in autism: a neuropathological and developmental perspective. *Int Rev Neurobiol* 71:167-178.
- Bourgeron T (2009) A synaptic trek to autism. *Curr Opin Neurobiol* 19:231-234.
- Bourreau Y., Roux S., Gomot M., Bonnet-Brilhault F., Barthélémy C. (2009) Validation of the repetitive and restricted behaviour scale in autism spectrum disorders. *European Child and adolescent psychiatry*, Nov 18(11): 675-682.
- 15 Bourreau Y, Roux S, Gomot M, Barthelemy C (2009) [Repetitive and restricted behaviours (RRB) in autism: clinical evaluation]. *Encephale* 35:340-346.
- Bouvard M (2000) Liste des comportements aberrants- version traduite, Issy les moulineaux, EAP/ECPA.
- Cohen I, Navarro V, Clemenceau S, Baulac M, Miles R (2002) On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science* 298:1418-1421.
- Cohen M (1981) Pharmacology of bumetanide. *J Clin Pharmacol* 21:537-542.
- 20 Delpire E (2000) Cation-Chloride Cotransporters in Neuronal Communication. *News Physiol Sci* 15:309-312.
- Delpire E, Lu J, England R, Dull C, Thorne T (1999) Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter. *Nat Genet* 22:192-195.
- Delpire E, Mount DB (2002) Human and murine phenotypes associated with defects in cation-chloride cotransport. *Annu Rev Physiol* 64:803-843.
- 25 DiLalla D.L., Rogers S.J. (1994) Domains of the Childhood Autism Rating Scale: relevance for diagnosis and treatment. *J. Autism Dev Disord.* Apr 24(2):115-28.
- Dzhala VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumback AC, Mathews GC, Benke TA, Delpire E, Jensen FE, Staley KJ (2005) NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med* 11:1205-1213.
- Feit PW (1981) Bumetanide--the way to its chemical structure. *J Clin Pharmacol* 21:531-536.
- 30 Fiumelli H, Cancedda L, Poo MM (2005) Modulation of GABAergic transmission by activity via postsynaptic Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of KCC2 function. *Neuron* 48:773-786.
- Fiumelli H, Woodin MA (2007) Role of activity-dependent regulation of neuronal chloride homeostasis in development. *Current Opinion in Neurobiology* 17:81-86.
- 35 Garreau B, Herry D, Zilbovicius M, Samson Y, Guerin P, Lelord G (1993) Theoretical aspects of the study of benzodiazepine receptors in infantile autism. *Acta Paedopsychiatr* 56:133-138.
- Guptill JT, Booker AB, Gibbs TT, Kemper TL, Bauman ML, Blatt GJ (2007) [3H]-flunitrazepam-labeled benzodiazepine binding sites in the hippocampal formation in autism: a multiple concentration autoradiographic study. *J Autism Dev Disord* 37:911-920.
- 40 Guy W. ECDEU (1976) Assessment Manual for psychopharmacology, National institute of Mental Health (Ed.). (Early Clinical Drug Evaluation Unit).
- Hill EL (2004) Executive dysfunction in autism. *Trends Cogn Sci* 8:26-32.
- Hill E.L., Frith U. (2003) Understanding autism: insights from mind and brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* Feb 28; 358 (1430): 281-9.
- 45 Hussman JP. (2001) Suppressed gabaergic inhibition as a common factor in suspected etiologies of autism, *J of Autism and Developmental Disorders.* 31 (2): 247-248.

- Huberfeld G, Wittner L, Clemenceau S, Baulac M, Kaila K, Miles R, Rivera C (2006) Perturbed Cl<sup>-</sup>-homeostasis and gabaergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 47:20.
- Huberfeld G, Wittner L, Clemenceau S, Baulac M, Kaila K, Miles R, Rivera C (2007) Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 27:9866-9873.
- 5 Kahle KT, Barnett SM, Sassower KC, Staley KJ (2009) Decreased seizure activity in a human neonate treated with bumetanide, an inhibitor of the Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-2Cl<sup>(-)</sup> cotransporter NKCC1. *J Child Neurol* 24:572-576.
- Kahle KT, Staley KJ (2008) The bumetanide-sensitive Na-K-2Cl cotransporter NKCC1 as a potential target of a novel mechanism-based treatment strategy for neonatal seizures. *Neurosurg Focus* 25:E22.
- 10 Kahle KT, Staley KJ, Nahed BV, Gamba G, Hebert SC, Lifton RP, Mount DB (2008) Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. *Nat Clin Pract Neurol* 4:490-503.
- Kanner L. (1943) Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child* 2: 217-50.
- Khalilov I, Holmes GL, Ben Ari Y (2003) In vitro formation of a secondary epileptogenic mirror focus by interhippocampal propagation of seizures. *Nat Neurosci* 6:1079-1085.
- 15 Khalilov I, Le Van QM, Gozlan H, Ben Ari Y (2005) Epileptogenic Actions of GABA and Fast Oscillations in the Developing Hippocampus. *Neuron* 48:787-796.
- Le Couteur A, Rutter M, Lord C, Rios P, Robertson S, Holdgrafer M, McLennan J (1989) Autism diagnostic interview: a standardized investigator-based instrument. *J Autism Dev Disord* 19:363-387.
- Levy SE, Hyman SL (1993) Pediatric assessment of the child with developmental delay. *Pediatr Clin North Am* 40:465-477.
- 20 Levy SE, Hyman SL (2005) Novel treatments for autistic spectrum disorders. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 11:131-142.
- Li H, Tornberg J, Kaila K, Airaksinen MS, Rivera C (2002) Patterns of cation-chloride cotransporter expression during embryonic rodent CNS development. *Eur J Neurosci* 16:2358-2370.
- 25 Lopez-Sambas AM, Adams JA, Goldberg RN, Modi MW (1997) The pharmacokinetics of bumetanide in the newborn infant. *Biol Neonate* 72:265-272.
- Lord C, Rutter M, Le Couteur A (1994) Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord* 24:659-685.
- Mackie K, DePasquale M, Cserr HF (1986) Increased permeability of a glial blood-brain barrier during acute hyperosmotic stress. *Am J Physiol* 251:R1186-R1192.
- 30 Marshall JD, Wells TG, Letzig L, Kearns GL (1998) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of bumetanide in critically ill pediatric patients. *J Clin Pharmacol* 38:994-1002.
- Mesibov GB, Schopler E, Caison W (1989) The Adolescent and Adult Psychoeducational Profile: assessment of adolescents and adults with severe developmental handicaps. *J Autism Dev Disord* 19:33-40.
- 35 Minshew NI. (1997) In vivo brain chemistry of autism: 31P Magnetic resonance spectroscopy studies, in Bauman ML and Kemper TL, *The neurobiology of autism*, Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Nardou R, Ben-Ari Y, Khalilov I (2009) Bumetanide, an NKCC1 antagonist, does not prevent formation of epileptogenic focus but blocks epileptic focus seizures in immature rat hippocampus. *J Neurophysiol* 101:2878-2888.
- O'Donnell ME, Lam TI, Tran L, Anderson SE (2004) The role of the blood-brain barrier Na-K-2Cl cotransporter in stroke. *Adv Exp Med Biol* 559:67-75.
- 40 Oblak A, Gibbs TT, Blatt GJ (2009) Decreased GABA<sub>A</sub> receptors and benzodiazepine binding sites in the anterior cingulate cortex in autism. *Autism Res* 2:205-219.
- Patterson PH (2002) Maternal infection: window on neuroimmune interactions in fetal brain development and mental illness. *Curr Opin Neurobiol* 12:115-118.
- 45 Payne JA, Rivera C, Voipio J, Kaila K (2003) Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci* 26:199-206.
- Persico AM, Bourgeron T (2006) Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environmental clues. *Trends Neurosci* 29:349-358.

- Rheims S, Cucherat M, Arzimanoglou A, Ryvlin P (2008) Greater response to placebo in children than in adults: a systematic review and meta-analysis in drug-resistant partial epilepsy. *PLoS Med* 5:e166.
- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K (1999) The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397:251-255.
- 5 Rogé B. (1989) Echelle d'évaluation de l'autisme infantile-version traduite (CARS-T). Issy les moulineaux, EAP/ECPA.
- Rogers SJ, Ozonoff S, Maslin-Cole C (1993) Developmental aspects of attachment behavior in young children with pervasive developmental disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 32:1274-1282.
- Rojahn J, Hessel WJ (1991) The Aberrant Behavior Checklist with children and adolescents with dual diagnosis. *J Autism Dev Disord* 21:17-28.
- 10 Sandler A. (2005) Placebo Effects in Developmental Disabilities: Implications for Research and Practice, *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 11: 164-170.
- Schmitz C, van K, I, Hof PR, van EH, Patterson PH, Steinbusch HW (2005) Autism: neuropathology, alterations of the GABAergic system, and animal models. *Int Rev Neurobiol* 71:1-26.
- 15 Schopler E, Reichler RJ, De Vellis RF, Dally K. (1980) Toward Objective Classification of Childhood Autism: Childhood Autism Rating Scale (CARS), *J. of Autism and Developmental disorders* 10 (1): 91-103.
- Spitzer NC, Gu X, Olson E (1994) Action potentials, calcium transients and the control of differentiation of excitable cells. *Curr Opin Neurobiol* 4:70-77.
- Sullivan JE, Witte MK, Yamashita TS, Myers CM, Blumer JL (1996) Pharmacokinetics of bumetanide in critically ill infants. *Clin Pharmacol Ther* 60:405-413.
- 20 The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural disorders: Diagnostic criteria for research (1993), World Health Organization.
- Witte MK, Stork JE, Blumer JL (1986) Diuretic therapeutics in the pediatric patient. *Am J Cardiol* 57:44A-53A.
- Woodin MA, Ganguly K, Poo Mm (2003) Coincident Pre- and Postsynaptic Activity Modifies GABAergic Synapses by Postsynaptic Changes in Cl<sup>-</sup> Transporter Activity. *Neuron* 39:807-820.
- 25

Reivindicaciones

1. Un compuesto que disminuye la concentración intracelular de cloro dentro de las neuronas para uso en el tratamiento del autismo, en el que dicho compuesto inhibe el cotransportador de Na-K-Cl (NKCC).
2. Un compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto es un inhibidor de NKCC1.
- 5 3. Un compuesto para uso según la reivindicación 1 o 2, en el que el compuesto es un diurético.
4. Un compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el compuesto es bumetanida o un análogo del mismo seleccionado de: bumetanida, bumetanida aldehído, bumetanida dibencilamida, bumetanida dietilamida, éster morfolinoetílico de bumetanida, éster de 3-(dimetilaminopropil) bumetanida, éster de N,N-dietilglicolamida bumetanida, éster de dimetilglicolamida bumetanida, éster de pivaxetil bumetanida, éster de metoxi(polietilenooxi)<sub>n-1</sub>-etil bumetanida, sal de benciltrimetilamonio bumetanida, y sal de cetiltrimetilamonio bumetanida.
- 10 5. Un compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el compuesto es bumetanida.
6. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento del autismo que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un portador farmacéuticamente aceptable.