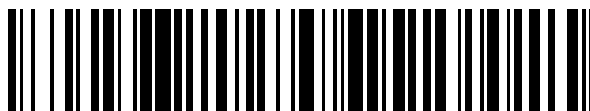


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 880**

51 Int. Cl.:

A61K 38/06 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/41 (2006.01)
A61K 31/401 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A01N 43/64 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2012** **PCT/US2012/000047**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.08.2012** **WO12102832**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2012** **E 12739509 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017** **EP 2667715**

54 Título: **Tratamiento de trastornos del espectro autista usando ácido glicil-L-2-metilprolil-L-glutámico**

30 Prioridad:

27.01.2011 US 201161462141 P
01.06.2011 US 201161492248 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
14.11.2017

73 Titular/es:

NEUREN PHARMACEUTICALS LIMITED (100.0%)
P.O. Box 9923
Newmarket, 1149 Auckland, NZ

72 Inventor/es:

GLASS, LARRY;
BICKERDIKE, MICHAEL JOHN y
SNAPE, MICHAEL FREDERICK

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 641 880 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

Tratamiento de trastornos del espectro autista usando ácido glicil-L-2-metilprolil-L-glutámico

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere, en general, a la terapia de trastornos del espectro autista (ASD), incluyendo autismo, síndrome de X frágil, síndrome de Rett (RTT), trastorno autista, síndrome de Asperger, trastorno disociativo de la infancia y trastorno generalizado del desarrollo no especificado (PDD-NOS), así como evitación de la demanda patológica (PDA). En particular, la presente invención se refiere al tratamiento del funcionamiento social alterado y al comportamiento repetitivo de un ASD usando glicil-2-metil-prolil-glutamato (G-2-MePE).

Antecedentes15 **Descripción de la técnica relacionada**

Los trastornos del espectro autista se están diagnosticando cada vez más. Los trastornos del espectro autista (ASD) son un grupo de trastornos del desarrollo vinculados, caracterizados por anomalías en la interacción social y en la comunicación, intereses restringidos y comportamientos repetitivos. La clasificación actual de los ASD reconoce cinco formas distintas: el autismo clásico o el trastorno autista, el síndrome de Asperger, el síndrome de Rett, el trastorno disociativo de la infancia y el trastorno generalizado del desarrollo no especificado (PDD-NOS). Un sexto síndrome, la evitación de la demanda patológica (PDA), es un trastorno del desarrollo generalizado más específico.

El documento EP 0 366 638 desvela GPE (un tripéptido que consiste en los aminoácidos Gly-Pro-Glu) y sus derivados dipeptídicos Gly-Pro y Pro-Glu. El documento EP 0 366 638 desvela que el GPE es eficaz como neuromodulador y es capaz de afectar a las propiedades eléctricas de las neuronas.

El documento W095/172904 desvela que el GPE tiene propiedades neuroprotectoras y que la administración de GPE puede reducir el daño en el sistema nervioso central (CNS) mediante la prevención o inhibición de la muerte celular neuronal y glial.

El documento WO 98/14202 desvela que la administración de GPE puede aumentar la cantidad eficaz de colina acetiltransferasa (ChAT), ácido glutámico descarboxilasa (GAD) y óxido nítrico sintasa (NOS) en el sistema nervioso central (SNC).

El documento WO9965509 desvela que el aumento de la cantidad eficaz de GPE en el SNC, tal como mediante la administración de GPE, puede aumentar la cantidad eficaz de tirosina hidroxilasa (TH) en el SNC para aumentar la producción de dopamina mediada por TH en el tratamiento de enfermedades tales como la enfermedad de Parkinson.

El documento WO02/16408 desvela ciertos análogos de GPE que tienen sustituciones de aminoácidos y otra cierta modificación que son capaces de inducir un efecto fisiológico equivalente al GPE dentro de un paciente. Las aplicaciones de los análogos de GPE incluyen el tratamiento de la lesión cerebral aguda y enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la lesión o enfermedad en el SNC.

El documento WO 2008/153929 analiza métodos de tratamiento del síndrome de Rett y de otros trastornos de la función y maduración sináptica usando análogo/s de IGF1, (1-3)IGF-1, (1-3)IGF-1 y/o moléculas terapéuticas relacionadas.

La patente de EE.UU. n.º 7.041.314 desvela composiciones de materia y métodos de uso de G-2-MePE.

Sumario

En la actualidad, no existe un tratamiento eficaz del ASD, y el cuidado del paciente se limita al tratamiento de los síntomas.

La presente invención proporciona glicil-2-metil-L-prolil-L-glutamato (G-2-MePE) para su uso en el tratamiento de un síntoma seleccionado del grupo que consiste en el funcionamiento social alterado y el comportamiento repetitivo de un trastorno del espectro autista (ASD) en un animal mediante la administración oral de una cantidad eficaz de G-2-MePE.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se describe haciendo referencia a realizaciones específicas de la misma. Otros aspectos y características de la presente invención se pueden entender con referencia a las figuras, en las que:

La **FIG. 1** es un esquema general para la preparación de análogos sintéticos de GPE.

Las **FIG. 2 y 3** representan esquemas para modificar los restos de glicina en GPE.

Las **FIG. 4 a 9** representan esquemas para modificar los restos de ácido glutámico en GPE.

Las **FIG. 10 y 11** representan esquemas para modificar enlaces peptídicos de GPE.

Las **FIG. 12-15** representan gráficas que resumen los resultados del ensayo de neuronas *in vitro* con GPE o G-2-MePE y ácido okadaico.

La **FIG. 12** representa un gráfico que muestra los efectos de GPE en neuronas corticales lesionadas con ácido okadaico.

La **FIG. 13** representa un gráfico que muestra los efectos de G-2-MePE en neuronas corticales lesionadas con ácido okadaico.

La **FIG. 14** representa un gráfico que muestra los efectos de G-2-MePE, GPE en microexplantes cerebelosos dañados con ácido okadaico.

La **FIG. 15** representa un gráfico que muestra los efectos de G-2-MePE o GPE en células estriadas dañadas con ácido okadaico.

La **FIG. 16** muestra los efectos de la inyección subcutánea de G-2-MePE (a dosis de 0,012, 0,12, 1,2 y 12 mg/kg) sobre el número de neuronas positivas para ChAT en el cuerpo estriado de ratas de 18 meses de vida.

La **FIG. 17** muestra los efectos del tratamiento con G-2-MePE sobre la retención de la memoria espacial en ratas adultas de mediana edad de 12 meses.

Las **FIG. 18A y 18B** muestran los efectos de G-2-MePE en la memoria de trabajo espacial de ratas envejecidas (17 meses) en un laberinto radial de 8 brazos después de 3 semanas de tratamiento y un lavado de nueve días.

La **FIG. 18A** muestra los perfiles de adquisición del laberinto a lo largo de los días para los diferentes grupos. La **FIG. 18B** muestra la proporción de elecciones correctas de laberintos promediadas a lo largo de los días para los grupos.

La **FIG. 19A** muestra los efectos de una sola administración intraperitoneal de 4 dosis de G-2-MePE sobre la proliferación de neuroblastos, evaluada por el número de células positivas en PCNA en la zona subventricular (SVZ) de ratas envejecidas.

La **FIG. 19B** muestra los efectos de una sola administración intraperitoneal de 4 dosis de G-2-MePE en la colocalización de PCNA y tinción con doblecortina en una rata tratada con la dosis más alta de G-2-MePE (panel derecho) en comparación con la rata tratada con vehículo (panel izquierdo).

La **FIG. 19C** muestra los efectos de G-2-MePE en la proliferación de neuroblastos evaluada mediante tinción inmunohistoquímica de PCNA en ratas de mediana edad.

La **FIG. 20A** muestra un aumento significativo en el número de astrocitos reactivos evaluado mediante tinción con GFAP en el hipocampo en ratas envejecidas en comparación con ratas jóvenes (*p < 0,01) y ratas de mediana edad (*p < 0,01).

La **FIG. 20B** muestra una fotografía de una sección de corteza cerebral de una rata envejecida, que muestra astrocitos evaluados con tinción con GFAP, algunos de los cuales están asociados con la formación de capilares (flechas).

La **FIG. 20C** muestra los efectos dependientes de la dosis del tratamiento con G-2-MePE (a dosis de 0,12, 0,12, 1,2 y 12 mg/kg/día) sobre la reducción del número de astrocitos ensayados usando tinción con GFAP en la subregión CA4 del hipocampo en ratas envejecidas.

La **FIG. 20D** muestra los efectos dependientes de la dosis del tratamiento con G-2-MePE (a dosis de 0,12, 0,12, 1,2 y 12 mg/kg/día) sobre la reducción del número de astrocitos ensayados usando tinción con GFAP en la corteza cerebelosa.

La **Fig. 21** muestra las propiedades farmacocinéticas de GPE y G-2-MePE en la circulación de ratas después de la inyección intravenosa.

La **FIG. 22** muestra los efectos de G-2-MePE sobre el aumento de la duración de la supervivencia en ratones deficientes en MeCP2 en comparación con ratones deficientes en MeCP2 tratados con solución salina.

La **FIG. 23** muestra los efectos de G-2-MePE sobre la potenciación a largo plazo del hipocampo medida por la pendiente de fEPSP en ratones deficientes en MeCP2, en comparación con los ratones deficientes en MeCP2 tratados con solución salina.

La **FIG. 24** representa un gráfico que muestra los efectos de G-2-MePE sobre la longitud de la dendrita en función de la distancia desde el soma celular.

Descripción detallada

Definiciones

El término "aproximadamente" con referencia a una dosis o al tiempo se refiere a una variable en particular y a un intervalo alrededor de esa variable que está dentro del error de medición normal o está en un 20 % del valor de la variable. El término "aproximadamente" con referencia a un resultado observado significa que la variación es un 20 % del valor de la variable observada.

El término "animal" incluye a seres humanos y animales no humanos tales como los animales domésticos (gatos, perros y similares) y animales de granja (vacas, caballos, ovejas, cabras, cerdos y similares).

El término "enfermedad" incluye cualquier afección no saludable de un animal, incluyendo, en particular, la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, diabetes, trastornos motores, convulsiones, disfunciones cognitivas debidas al envejecimiento y trastornos del espectro autista incluyendo autismo, síndrome de X frágil, síndrome de Rett (RTT), síndrome autístico, síndrome de Asperger, trastorno disociativo de la infancia y trastorno generalizado del desarrollo no especificado (PDD-NOS) y evitación de la demanda patológica (PDA).

La expresión "factor de crecimiento" significa una molécula de señalización polipeptídica extracelular que simula una célula que crece o prolifera.

El término "lesión" incluye cualquier daño agudo de un animal, incluyendo apoplejía no hemorrágica, lesión cerebral traumática, asfixia perinatal asociada con sufrimiento fetal, tal como después del desprendimiento, oclusión del cordón o asociado con el retraso del crecimiento intrauterino, asfixia perinatal asociada con la insuficiencia de una adecuada reanimación o respiración, lesiones graves del SNC asociadas con un perance próximo al ahogamiento, perance próximo a la muerte súbita, inhalación de monóxido de carbono, intoxicación por amoníaco u otros gases, paro cardíaco, coma, meningitis, hipoglucemia y estado epiléptico, episodios de asfixia cerebral asociados con la cirugía de bypass coronario, episodios de hipotensión y crisis hipertensivas, traumatismo cerebral y lesión tóxica.

"Trastornos de la memoria" o "trastornos cognitivos" son trastornos que se caracterizan por el deterioro o la pérdida de la capacidad de aprender, memorizar o recordar información, permanente o temporal. El trastorno de la memoria puede deberse al envejecimiento normal, lesión en el cerebro, tumores, enfermedades neurodegenerativas, afecciones vasculares, afecciones genéticas (enfermedad de Huntington), hidrocefalia, otras enfermedades (enfermedad de Pick, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, SIDA, meningitis), sustancias tóxicas, deficiencia nutricional, trastornos bioquímicos, disfunciones psicológicas o psiquiátricas. La presencia de trastorno de la memoria en un ser humano se puede establecer a través de un examen del historial del paciente, un examen físico, pruebas de laboratorio, pruebas de imagen y pruebas neuropsicológicas. Las pruebas neuropsicológicas convencionales incluyen, pero sin limitación, breve prueba de memoria visual revisada (BVM-T-R), batería automatizada de el ensayo neuropsicológica de Cambridge (CANTAB), escala de memoria infantil (CMS), prueba de memoria contextual, prueba de memoria de reconocimiento continuo (CMRT) prueba de la asociación de palabras oral controlada y cuestionario de funcionamiento de la memoria, escala de memoria neuropsicológica de Denman, subprueba de escala de dígitos y secuencia de número y letras de la escala de inteligencia de adultos de Wechsler III, evaluación de la memoria de objetos de Fuld (FOME), prueba de memoria para diseños de Graham-Kendall, prueba de memoria de Guild, prueba de aprendizaje cerebral de Hopkins, batería de aprendizaje y memoria (LAMB), escala de autovaloración clínica de evaluación de la memoria (MAC-S), escalas de evaluación de la memoria (MAS), prueba de memoria de Randt, prueba de memoria de reconocimiento (RMT), prueba de aprendizaje auditivo y verbal de Rey (RAVLT), prueba de memoria de comportamiento de Rivermead, versión de la escala de memoria de Wechsler de Russell (RWMS), memoria de trabajo espacial, prueba de memoria y aprendizaje (TOMAL), escala de memoria de Vermont (VMS), escala de memoria de Wechsler, evaluación de memoria y aprendizaje a gran alcance (WRAML).

La expresión "excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que, en general, es segura, no tóxica y deseable, e incluye excipientes que son aceptables para el uso veterinario, así como para el uso farmacéutico humano. Dichos excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos o, en el caso de una composición en aerosol, gaseosos.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal que es farmacéuticamente aceptable y que tiene las propiedades farmacológicas deseadas. Dichas sales incluyen sales que pueden formarse cuando los protones ácidos presentes en los compuestos reaccionan con bases inorgánicas u orgánicas. Las sales inorgánicas adecuadas incluyen las formadas con los metales alcalinos, por ejemplo, sodio y potasio, magnesio, calcio, y aluminio. Las sales orgánicas adecuadas incluyen las formadas con bases orgánicas, tales como aminas, por ejemplo, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, *N*-metilglucamina y similares. Las sales también incluyen sales de adición de ácido formadas por la reacción de un grupo amina o grupos presentes en el compuesto con un ácido. Los ácidos adecuados incluyen ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácidos clorhídrico y bromhídrico) y ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido cítrico, ácido maleico, y ácidos alcanosulfónico y arenosulfónico, tales como ácido metanosulfónico y ácido bencenosulfónico). Cuando hay dos grupos ácidos presentes en un compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable puede ser una monosal monoácido o una disal; y del mismo modo, cuando hay más de dos grupos ácidos presentes, todos o algunos de dichos grupos se pueden salificar. El mismo razonamiento se puede aplicar cuando dos o más grupos amina están presentes en un compuesto.

La expresión "grupo protector" es un grupo que bloquea selectivamente uno o más sitios reactivos en un compuesto multifuncional de manera que puede llevarse a cabo una reacción química selectivamente en otro sitio reactivo no protegido y que el grupo se puede retirar fácilmente una vez completada la reacción selectiva.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de un agente que, cuando se administra a un animal para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar el tratamiento de esa enfermedad medida usando un sistema de ensayo reconocido en la técnica.

El término "tratar" o "tratamiento" de una enfermedad puede incluir la prevención de la aparición de la enfermedad en un animal que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero que todavía no la padece ni muestra síntomas de la enfermedad (tratamiento profiláctico), la inhibición de la enfermedad (ralentizar o detener su desarrollo), el alivio de los síntomas o los efectos secundarios de la enfermedad (incluyendo el tratamiento paliativo), y el alivio de la enfermedad (que causa la regresión de la enfermedad).

La expresión "deficiencia funcional" significa una deficiencia de comportamiento asociado con el daño neurológico. Dichas deficiencias incluyen deficiencias en el andar, observados en pacientes con enfermedad de Parkinson, alteraciones motoras, observadas en pacientes con la enfermedad de Huntington. El déficit funcional también incluye la colocación anormal del pie y trastornos de la memoria descritos en el presente documento.

El término "G-2MePE" o "NNZ-2566" significa L-glicil-2-metil-L-prolil-L-glutamato.

El término "convulsiones" significa un patrón anómalo de la actividad neuronal en el cerebro que da lugar a un déficit motor o a la falta de control motor que da lugar a un movimiento anómalo, incluyendo un movimiento espasmódico. "Convulsiones" incluye anomalías electroencefalográficas, acompañadas o no por una actividad motora anómala.

Los átomos de hidrógeno implícitos (tales como átomos de hidrógeno de un anillo de pirrolidina, etc.) se omiten de las fórmulas para mayor claridad, pero se debe entender que están presentes.

Trastornos del espectro autista

Los trastornos del espectro autista (ASD) son un grupo de trastornos del desarrollo vinculados, caracterizados por anomalías en la interacción social y en la comunicación, intereses restringidos y comportamientos repetitivos. La clasificación actual de los ASD reconoce cinco formas distintas: el autismo clásico o el trastorno autista, el síndrome de Asperger, el síndrome de Rett, el trastorno disociativo de la infancia y el trastorno generalizado del desarrollo no especificado (PDD-NOS). Un sexto síndrome, la evitación de la demanda patológica (PDA), es un trastorno del desarrollo generalizado más específico. Sin embargo, aunque el PDA es cada vez más reconocido como un ASD, aún no forma parte del Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales (DSM-IV), publicado por la Asociación Americana de Psiquiatría, ni forma parte de la revisión propuesta, el DSM-V.

Autismo

El autismo clásico es un trastorno del desarrollo neurológico altamente variable. Se diagnostica normalmente durante la infancia o la primera infancia, con síntomas manifiestos a menudo aparentes a partir de los 6 meses de edad, y se establece hacia los 2-3 años. De acuerdo con los criterios establecidos en el DSM-IV, el diagnóstico del autismo requiere que esté presente una tríada de síntomas, incluyendo (a) deficiencias en la interacción social, (b) deficiencias en la comunicación y (c) intereses y comportamientos restringidos y repetitivos. Otras disfunciones, tales como la alimentación atípica, también son comunes, pero no son esenciales para el diagnóstico. De estas deficiencias, las deficiencias de interacción social son particularmente importantes para el diagnóstico, debiendo estar presentes dos de las siguientes deficiencias para un diagnóstico del autismo:

- (i) deficiencias en el uso de comportamientos no verbales múltiples (por ejemplo, contacto visual) para regular la interacción social;
- (ii) deficiencias en el desarrollo de relaciones entre compañeros adecuadas al nivel de desarrollo;
- (iii) falta de búsqueda espontánea de compartir el goce, los intereses o los logros;
- (iv) falta de reciprocidad social o emocional.

Las deficiencias de comunicación en el autismo pueden manifestarse de una o más de las siguientes maneras: retraso en (o falta total) del desarrollo del lenguaje hablado; deterioro marcado de la capacidad de iniciar o mantener una conversación; uso estereotipado y repetitivo del lenguaje; y/o falta de juego espontáneo. También se requieren patrones de comportamiento restringidos, repetitivos y estereotipados para el diagnóstico, tales como la preocupación por uno o más intereses considerados anormales en intensidad, la adhesión inflexible a rutinas o rituales, los manierismos repetitivos motores y/o el enfoque persistente en partes de objetos.

Por último, para un diagnóstico del autismo, es necesario que el deterioro en el funcionamiento de al menos un área (es decir, interacción social, lenguaje o juego imaginativo) se inicie a menos de 3 años de edad.

El autismo se asocia comúnmente con la epilepsia o la actividad epileptiforme en el electroencefalograma (EEG). Hasta el 60 por ciento de los pacientes con autismo tiene actividad epileptiforme en sus EEG (Spence y Schneider, 2009 *Ped Res* 65: 599-606).

El autismo también está asociado con alteraciones en la función del IGF-1, que se agota en el sistema nervioso central (SNC) en pacientes con autismo (Riikonen *et al.*, 2006 *Devel Med Child Neurol* 48: 751-755). Los niveles de IGF-1 en el aumento del SNC en pacientes con autismo después del tratamiento con agentes que reducen los síntomas como la fluoxetina (Makkonen *et al.*, 2011 *Neuropediatrics* 42:207-209).

Es importante destacar que el autismo comparte las características del síndrome de Rett y el síndrome de X frágil en relación con la conectividad neuronal. Los tres trastornos se caracterizan por defectos en la función sináptica y la conectividad neuronal. Esto se refleja en los estudios de cerebro humano post mortem en estos grupos de pacientes, que muestran todos la incapacidad de formar conexiones sinápticas normales. Esto se refleja en la alteración de las características morfológicas, ya sea una reducción en la densidad de la espina dendrítica neuronal o una mayor densidad de la espina dendrítica, pero asociada con las sinapsis inmaduras. Esto se refleja en modelos animales de autismo, síndrome de Rett y síndrome de X frágil, que se basan en cambios genéticos conocidos por ser patológicos en estos trastornos. En estos modelos animales, se revelan morfológicamente defectos de conectividad neuronal, y también como un fracaso de la potenciación a largo plazo (LTP). Esto es importante, ya que IGF-1, IGF-1[1-3] y G-2-MePE aumentan la formación de sinapsis.

Síndrome de Asperger

El síndrome de Asperger o trastorno de Asperger es similar al autismo, y comparte ciertas características. Al igual que el autismo, el síndrome de Asperger también se caracteriza por el deterioro de la interacción social y este se ve acompañado de intereses y comportamientos restringidos y repetitivos. Así pues, el diagnóstico del síndrome de Asperger se caracteriza por la misma tríada de deficiencias que el autismo. Sin embargo, difiere de los otros ASD en que tiene retraso general en el desarrollo lingüístico o cognitivo y en que no hay déficit de interés en el entorno del sujeto. Además, el síndrome de Asperger normalmente es menos grave en la sintomatología que el autismo clásico, y los pacientes de Asperger pueden funcionar con autosuficiencia y llevar una vida relativamente normal.

Trastorno disociativo de la infancia

El trastorno disociativo de la infancia (CDD), también conocido como síndrome de Heller, es una afección en la que los niños se desarrollan normalmente hasta los 2-4 años (es decir, más tarde que en el autismo y el síndrome de Rett), pero luego demuestran una pérdida grave de comunicación social y otras habilidades. El trastorno disociativo de la infancia es muy parecido al autismo y ambos implican un desarrollo normal seguido de una pérdida significativa de lenguaje, juego social y habilidades motoras. Sin embargo, el trastorno disociativo de la infancia normalmente se produce más tarde que el autismo, implica una pérdida más drástica de las habilidades y es mucho menos común.

El diagnóstico del CDD depende de la pérdida drástica de habilidades previamente adquiridas en dos o más de las siguientes áreas: lenguaje, habilidades sociales, juego, habilidades motoras (como una disminución drástica de la capacidad de caminar, trepar, agarrar, etc.) o el control vesical e intestinal (a pesar de tener previamente control de esfínteres). La pérdida de habilidades de desarrollo puede ser abrupta y tener lugar en el transcurso de días a semanas o puede ser más gradual.

Trastorno generalizado del desarrollo - no especificado (PDD-NOS)

El trastorno generalizado del desarrollo - no especificado (PDD-NOS) es un ASD que describe a pacientes que presentan alguno, pero no todos, de los síntomas asociados con otros ASD bien definidos. Los criterios clave para el diagnóstico de un ASD incluyen la dificultad para socializarse con otros individuos, los comportamientos repetitivos y la sensibilidad aumentada a ciertos estímulos. Todos ellos se encuentran en los ASD descritos anteriormente. Sin embargo, el autismo, el síndrome de Asperger, el síndrome de Rett y el trastorno disociativo de la infancia tienen otras características que permiten su diagnóstico específico. Cuando no se puede realizar el diagnóstico específico de uno de estos cuatro trastornos, pero el ASD es evidente, se realiza un diagnóstico de PDD-NOS. Dicho diagnóstico puede resultar de los síntomas que comienzan en una edad más avanzada de la aplicable para otras afecciones del espectro.

Síndrome de Rett

El síndrome de Rett (RTT) es un trastorno del desarrollo neurológico que afecta casi exclusivamente a las mujeres (1 de cada 10.000 nacidos vivos). El RTT se clasifica como un trastorno del espectro autista (Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales, Cuarta Edición - Revisado (DSM-IV-R). Aproximadamente 16.000 pacientes están afectados por el mismo en EE.UU. (Datos de una investigación fiable sobre el síndrome de Rett). Para un diagnóstico del síndrome de Rett, son característicos los siguientes síntomas: desarrollo alterado desde la 6-18 meses de edad; ralentización de la tasa de crecimiento de la cabeza a partir de entre los 3 meses y los 4 años; lenguaje gravemente dañado; movimientos repetitivos y estereotípicos de las manos; y anomalías de la marcha, por ejemplo, andar de puntillas o caminar inestable con las piernas rígidas. Hay, además, una serie de criterios de apoyo que pueden ayudar a diagnosticar el síndrome de Rett, pero que no son esenciales para un diagnóstico. Estos incluyen dificultades respiratorias, anomalías del EEG, convulsiones, rigidez muscular y espasticidad, escoliosis (curvado de la columna vertebral), rechinar de dientes, manos y pies pequeños en relación con la altura, retraso del crecimiento, disminución de la grasa corporal y la masa muscular, patrones anómalos del sueño, irritabilidad o agitación, dificultades para masticar y/o tragar, mala circulación y estreñimiento.

El inicio del RTT generalmente comienza entre los 6-18 meses de edad, con una desaceleración de las tasas de desarrollo y crecimiento. A esto le sigue una fase de regresión (normalmente, en niños de entre 1 y 4 años de edad),

una fase pseudoestacionaria (2-10 años de edad) y un posterior estado de deterioro motor progresivo tardío. Los síntomas del RTT incluyen la desaceleración súbita del crecimiento y la regresión en el lenguaje y las habilidades motoras, incluyendo movimientos intencionados de la mano que son reemplazados por movimientos estereotípicos, rasgos autistas, ataques de pánico, trastornos del ciclo del sueño, temblores, convulsiones, disfunciones respiratorias (apnea episódica, hiperpnea), apraxia, distonía, discinesia, hipotonía, cifosis progresiva o escoliosis y deterioro cognitivo grave. La mayoría de los pacientes de RTT sobreviven a la edad adulta con discapacidades graves, y requieren atención las 24 horas del día.

Se ha informado que entre el 85 % y el 95 % de los casos de RTT están causados por una mutación del gen *Mecp2* (Amir *et al.* 1999. *Nat Genet* 23:185-188; datos de investigación fiable sobre el síndrome de Rett) - un gen que codifica la proteína 2 de unión a metil-CpG (MeCP2). *Mecp2* se transmite al cromosoma X (localización Xq28) y, por esta razón, las mutaciones del gen en los varones suelen ser letales. Aunque el RTT es un trastorno genético, menos del 1 % de los casos registrados son hereditarios; casi todas las mutaciones de *Mecp2* ocurren *de novo*, estando dos tercios causados por mutaciones en 8 dinucleótidos CpG (R106, R133, T158, R168, R255, R270, R294 y R306) ubicados en el tercer y cuarto exones.

MeCP2 es una proteína que se une a los dinucleótidos CpG metilados para ejercer el silenciamiento de la transcripción del ADN en el SNC. El efecto clave de una reducción o ausencia de MeCP2 parece ser un deterioro del desarrollo de la espina dendrítica y la formación de sinapsis. La expresión de MeCP2 parece correlacionarse temporalmente con la maduración del cerebro, lo que explica por qué los síntomas suelen aparecer alrededor de 18 meses de edad.

Presentación de características comunes a los ASD

Tomando los ASD conjuntamente, es evidente que hay puntos en común en la presentación de los síntomas entre las 5 formas. Estas características comunes son deficiencias en las competencias sociales normales y comportamientos repetitivos. En todos menos en el síndrome de Asperger también hay una presentación uniforme de retraso en el desarrollo intelectual que se manifiesta más comúnmente se como un déficit en las habilidades del lenguaje. La pérdida cognitiva relativa a los parámetros normales para la edad suele ser bastante marcada en el autismo, el síndrome de Rett, el CDD y el PDD-NOS. La presencia de epilepsia o actividad anómala en el EEG también es común en el autismo, el síndrome de X frágil y el síndrome de Rett. La epilepsia surge en situaciones de conectividad neuronal anómala. La alteración de la conectividad neuronal y la función sináptica alterada es una característica común del autismo, del síndrome de X frágil y del síndrome de Rett, y de modelos animales de estas afecciones.

Modelos genéticos del ASD

Para ofrecer validez, los modelos animales de los ASD deben demostrar síntomas similares a las afecciones clínicas y tener un grado razonable de validez aparente con respecto a la etiología de esos síntomas. Se sabe que el autismo clásico puede estar causado por muchas alteraciones genéticas diferentes, y no se cree que haya un solo defecto genético que represente más de un pequeño porcentaje de casos de autismo. De hecho, estudios recientes han revelado numerosas variaciones estructurales *de novo* de las ubicaciones cromosómicas que se cree que subyacen al ASD, además de los raros defectos genéticos heredados (Marshall *et al.*, 2008; Sebat *et al.*, 2007). Por lo tanto, la variación del número de copias (CNV), la translocación y la inversión de secuencias de genes en 20 sitios clave o más, incluyendo 1p, 5q, 7q, 15q, 16p, 17p y Xq, se han asignado como locus de los ASD.

Sin embargo, a pesar del fondo poligénico subyacente al ASD, y la complejidad de la etiología, se sabe que ciertos defectos genéticos pueden producir ASD. Algunos de los defectos mejor caracterizados surgen de aberraciones cromosómicas de los genes que codifican un grupo de proteínas de densidad postsináptica, incluyendo la neuroligina-3 (NLGN3), neuroligina-4 (NLGN4), neurexina-1α (NRXN1) y shank3 (Sebat *et al.*, 2007). Es importante destacar que estos defectos apuntan a la función sináptica alterada y, por tanto, a la conectividad neuronal perturbada como una vía final común en el autismo y en los trastornos relacionados (Minshew y Williams 2007 *Arch Neurol.* 64:945-950; Gilman *et al.*, 2011 *Neuron.* 70:898-907). Dichas deficiencias de conectividad se reflejan en hallazgos morfológicos en el examen post mortem, que revelan una mayor densidad de la espina dendrítica en el autismo (Hutsler y Zhang 2010 *Brain Res.* 1309:83-94).

NLGN3 y NLGN4 son moléculas postsinápticas de adhesión celular presentes en las sinapsis glutamatérgicas. Desempeñan un papel en la coordinación del contacto presináptico con el sitio postsináptico y también interactúan con la proteína almacén postsináptico shank3. Las mutaciones a NLGN3 y NLGN4 se han observado en la población de ASD y representan quizás el 1 % de todos los casos de ASD (Lintas y Persico, 2008). Jamain y colaboradores informaron por primera vez de un sentido erróneo en NLGN3 y un cambio de marco en NLGN4 en dos sujetos no relacionados, resultando en el síndrome de Asperger y el autismo clásico respectivamente (Jamain *et al.*, 2003). Si bien la incidencia de las mutaciones NLGN3 o NLGN4 en la población de ASD es baja (de hecho, no se observaron muchas mutaciones en un estudio de 96 pacientes con ASD en un estudio canadiense, Gauthier *et al.*, 2005), se ha confirmado en estudios preclínicos que las mutaciones de la neuroligina pueden, de hecho, producirse de modelo de síntomas autistas. Por lo tanto, la introducción en ratones de la misma R451C de sentido erróneo a

NLGN3 ha informado clínicamente de resultados en una cepa de ratón mutante mostrando una reducción de la interacción social y el aumento de la transmisión sináptica inhibitoria (Tabuchi *et al.*, 2007).

Por lo tanto, el ratón mutante R451C representa un modelo para el ASD basado en la mutación NLGN3. En este caso, la mutación en la posición R451 de NLGN3 da lugar a una mutación de "ganancia de función".

Por el contrario, la modelización de la mutación clínica de NLGN4 en ratones se logra mediante una mutación de "pérdida de función" de NLGN4 (un modelo de desactivación clásico). En este modelo, los ratones mutantes muestran un déficit de interacción social y la reducción de la vocalización ultrasónica (Jamain *et al.*, 2008). Los déficits de comunicación son centrales en los ASD clínicos y, en los ratones con desactivación de NLGN4, una reducción de las vocalizaciones ultrasónicas de ratones macho expuestos a homólogos femeninos de tipo silvestre apoya la validez aparente de la cepa como modelo del ASD.

Las proteínas neurexinas presinápticas inducen la diferenciación postsináptica en dendritas opuestas a través de interacciones con homólogos de neuroligina postsinápticos. Se han descrito mutaciones del gen de la neurexina-1 α (NRXN1) en numerosos estudios (Sebat *et al.*, 2007, Marshall *et al.*, 2008, Kim *et al.*, 2008, Yan *et al.*, 2008) y se han observado en la forma de variantes del número de copia. Al igual que con las mutaciones de NLGN, cuando se introduce una mutación del gen NRXN1 en ratones (en forma de desactivación génica), se produce una cepa mutante con ciertas características similares al ASD (Eherton *et al.*, 2009). Estos ratones con desactivación de NRXN1 muestran una disminución de la frecuencia de la corriente postsináptica excitadora en miniatura del hipocampo (mEPSC) y una reducción de la relación de entrada-salida de las corrientes evocadas. Estos efectos electrofisiológicos se relacionan con la disminución de la transmisión excitatoria en el hipocampo. Además de la disminución de la neurotransmisión excitatoria, los ratones con desactivación de NRXN1 muestran una disminución en la inhibición pre-pulso, aunque el comportamiento social parece no verse afectado (Eherton *et al.*, 2009).

Compartiendo ciertas características con la construcción trans-sináptica de neurexina-NLGN, la molécula de adhesión celular 1 (CADM1) es una proteína de la familia de las inmunoglobulinas presente tanto pre- y post-sinápticamente que también está implicada en la actividad de adhesión transcelular sináptica (Biederer *et al.*, 2002). Se han detectado mutaciones en el gen CADM1 en pacientes con ASD y parecen representar una posible causa adicional de estas afecciones (Zhiling *et al.*, 2008).

El análisis de los ratones con desactivación de CADM1 revela que estos animales muestran un mayor comportamiento relacionado con la ansiedad, el deterioro de la interacción social y el deterioro de la memoria y del reconocimiento social. Además, los ratones con desactivación de CADM1 demuestran peores habilidades motoras más (Takayanagi *et al.*, 2010). Estas disfunciones están de nuevo en consonancia con la sintomatología del ASD.

El síndrome de eliminación de 22q13 (también conocido como síndrome de Phelan-McDermid) es un trastorno genético raro causado por una microeliminación en el extremo terminal q13.3 del cromosoma 22. Esta microeliminación rara vez se descubre mediante la exploración genética típica, y se recomienda una prueba de hibridación *in situ* fluorescente para confirmar el diagnóstico. Trabajos recientes indican que el síndrome está causado por errores en el gen shank3, una proteína de densidad postsináptica fundamental para el funcionamiento neuronal normal. Curiosamente, los errores en este gen también se han asociado con el ASD, y el síndrome de eliminación de 22q1 puede conducir comúnmente a un diagnóstico del ASD (Durand *et al.*, 2007; Moessner *et al.*, 2007; Sykes *et al.*, 2009). Dada la estrecha asociación del síndrome de eliminación de 22q13 y el diagnóstico consecuente del ASD, se ha desarrollado un modelo mutante de ratón de esta mutación.

El ratón con desactivación de shank3 presenta varias deficiencias que reflejan los síntomas del ASD, incluyendo la reducción de las vocalizaciones ultrasónicas (es decir, la disminución de la comunicación social), así como el deterioro del tiempo de interacción social entre ratones. Además, estos ratones tienen alteración de la transmisión excitatoria de CA1 en el hipocampo, medida por la relación entrada-salida de las corrientes evocadas y la alteración de la potenciación a largo plazo (LTP). Se cree que la LTP es un proceso fisiológico que subyace a la formación y consolidación de la memoria. Por lo tanto, el modelo presenta un fenotipo similar a la desactivación de NLGN4, en consonancia con el ASD.

Como se ha observado, el síndrome de eliminación de 22q13 en sí mismo es muy raro. Sin embargo, proporciona información importante sobre la participación que genes específicos pueden tener en la etiología de los ASD. Además de shank3, este trastorno revela un posible defecto genético adicional en el ASD. De los aproximadamente 50 casos de síndrome de eliminación de 22q13 descritos, todos menos uno tienen una eliminación genética que se extiende más allá de shank3 para incluir un gen adicional, conocido como el gen Islet Brain-2 (IB2) (Sebat *et al.*, 2007). La proteína IB2 interacciona con otras muchas proteínas incluyendo las MAP quinasas y la proteína precursora amiloide, parece influir en el tráfico de proteínas en las neuritas y se encuentra enriquecida a densidades postsinápticas (Giza *et al.*, 2010). Los ratones que carecen de la proteína (ratones con desactivación IB2-/-) muestran una alteración de la interacción social (reducción del olfateo social y el tiempo de interacción), reducción de la exploración, y deficiencias cognitivas y motores (Giza *et al.*, 2010). Este fenotipo de comportamiento se asoció con la reducción de la transmisión excitatoria en las células cerebelosas. Al igual que con la desactivación de knock3, el fenotipo de la mutación de IB2 es, por lo tanto, también compatible con el ASD.

Además de los modelos animales de los defectos de proteínas de densidad postsináptica descritos anteriormente, otros síndromes monogenéticos que comparten diversas características con los ASD pueden conducir al autismo y ofrecen otra vía para el control de los fármacos dirigidos al ASD. Un excelente ejemplo de esto es el síndrome de X frágil.

El Síndrome de X frágil (FXS) está causado por la expansión de una única secuencia de genes trinucleotídicos (CGG) en el cromosoma X que produce la falta de expresión de la proteína codificada por el gen *fmr1*. FMR1 (Retraso mental X frágil 1) es una proteína necesaria para el desarrollo neuronal normal. FXS puede causar que un niño tenga autismo (Hagerman *et al.*, 2010); en el 2-6 % de todos los niños diagnosticados con autismo, la causa es la mutación del gen FXS. Por otra parte, aproximadamente el 30 % de los niños con FXS tienen cierto grado de autismo y otro 30 % son diagnosticados con PDD-NOS (Hagerman *et al.*, 2010). De hecho, el síndrome de X frágil es la causa de autismo más común conocida como de un solo gen. Los ratones con desactivación de FMR1 se han desarrollado como un modelo de FXS y, por lo tanto, como un modelo adicional de ASD. Se ha demostrado que la mutación de desactivación del gen FMR1 produce deficiencias de conectividad neuronal tales como el desarrollo y el recorte anómalos de la espina dendrítica (Comery *et al.*, 1997), junto con una desregulación asociada de las proteínas del armazón dendrítico (incluyendo shank1) y las subunidades del receptor de glutamato en densidades postsinápticas (Schiitt *et al.*, 2009). Estos efectos sobre la morfología dendrítica producen deficiencias en las medidas funcionales de la conectividad, tales como la alteración de la LTP en la corteza y la amígdala (Zhao *et al.*, 2005) y en el hipocampo (Lauterborn *et al.*, 2007), así como el deterioro cognitivo (Kreuger *et al.*) y una mejora en la ansiedad social (Spencer *et al.*, 2005). Estas deficiencias de conectividad se reflejan en pacientes con FXS, que muestran una mejor densidad de la espina dendrítica en los análisis post mortem (Irwin *et al.*, 2000 *Cereb Cortex* 10:1034-1048). Esta densidad de espina dendrítica mejorada está acompañada por sinapsis inmaduras (Klemmer *et al.*, 2011 *J Biol Chem.* 286:25495-25504), es decir, puede representar un estado funcionalmente inmaduro.

En contraste con los ASD de autismo, Asperger, CDD y PDD-NOS, el síndrome de Rett parece tener una base casi monogenética y puede ser modelado en ratones con buena validez aparente. Se cree que el síndrome de Rett está causado, en hasta un 96 % de los casos, por un defecto en el gen *Mecp2* (Zoghbi, 2005). Como resultado de ello, los ratones mutantes con desactivación de *MeCP2* proporcionan un modelo animal con todos los signos distintivos del síndrome de Rett clínico, mostrando un fenotipo algunos solapamientos con los modelos de ASD de desactivación de NLGN4, shank3 e IB2. Por lo tanto, los ratones con desactivación de *MeCP2* muestran un claro deterioro de la LTP en el hipocampo, junto con una disminución correspondiente en la memoria social y espacial (Moretti *et al.*, 2006) y deterioro del reconocimiento de objetos (Schaeviz *et al.*, 2010). Este deterioro en la LTP se ve acompañado de una disminución en la densidad de la espina dendrítica. Los pacientes con el síndrome de Rett muestran una menor densidad de espina dendrítica (Belichenko *et al.*, 1994 *Neuroreport* 5:1509-1513).

Por lo tanto, los ASD en seres humanos comparten muchas características de trastornos cognitivos o del desarrollo en animales, incluyendo roedores. Por lo tanto, los estudios de terapias de los ASD en roedores tales como ratones y ratas son razonablemente predictivos de los resultados obtenidos en seres humanos. Una característica común que se observa en el autismo, en el síndrome de X frágil y en el síndrome de Rett es la presencia de una deficiencia en la conectividad neuronal, que se refleja en la disminución de la densidad de la espina dendrítica o en un aumento de la densidad de la espina dendrítica con sinapsis inmaduras. Las consecuencias funcionales de estos cambios morfológicos son similares en modelos animales de estos trastornos, reflejados como deficiencias en la LTP, por ejemplo.

Tratamiento del ASD clínico y modelos animales del ASD con G-2-MePE

Según lo descrito anteriormente, se observa una patología conservada en los ASD que comprende un deterioro del desarrollo de las neuritas, un deterioro de la conectividad sináptica y una correspondiente alteración del funcionamiento social y cognitivo como resultado. Dichas disfunciones sinápticas se deben a funciones genéticamente alteradas de proteínas de densidad postsináptica. El crecimiento normal de las neuritas y el desarrollo postsináptico pueden ser regulados y aumentados por factores de crecimiento tales como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, Chappelle *et al.*, 2009) y el factor 1 de crecimiento similar a la insulina (IGF-1, Riiikonen *et al.*, 2006, Tropea *et al.*, 2009). De hecho, el IGF-1 es esencial para el crecimiento normal de la espina dendrítica y la formación de sinapsis (Cheng *et al.*, 2003 *J Neurosci Res.* 73:1-9). Por lo tanto, los fármacos que potencian la función del factor de crecimiento son útiles en el tratamiento de trastornos progresivos del desarrollo tales como los ASD. G-2 MePE es un análogo metilado de molécula pequeña del tripéptido terminal de IGF-1, IGF 1 (1-3). Como análogo mimético de IGF-1, G-2-MePE ejerce efectos tróficos y neuroprotectores en diversos modelos animales. Por lo tanto, G-2-MePE es eficaz en el tratamiento de síntomas del ASD tales como los relacionados con las disfunciones sinápticas resultantes de las mutaciones génicas descritas anteriormente.

En términos clínicos, los pacientes con ASD, que presentan autismo, síndrome de Asperger, síndrome de Rett, trastorno disociativo de la infancia y PDD-NOS, así como los pacientes con síndrome de eliminación de 22q13, síndrome de X frágil y evitación de la demanda patológica se tratan con G-2-MePE. Los pacientes presentan deficiencias sociales y de comunicación, así como deficiencia cognitiva. El tratamiento con G-2-MePE, por ejemplo, diariamente y, en otro ejemplo, por vía oral, se observa que induce una mejora en los movimientos repetitivos estereotípicos, un mejor funcionamiento social y un mejor rendimiento cognitivo después del tratamiento con

fármaco.

En modelos animales de los ASD, el tratamiento diario con G-2-MePE por sonda oral o inyección intraperitoneal para ratones con desactivación mejorará los síntomas similares al ASD. El G-2-MePE es eficaz en los siguientes modelos de ratón mutante con ASD: NLGN3 mutante (R451C), desactivación de NLGN4, desactivación de NRXN1, desactivación de CADM1, desactivación de shank3, desactivación de IB2, desactivación de FMR1 y desactivación de MeCP2. Cuando se administra subcrónicamente (1-10 semanas) diariamente, G-2-MePE es eficaz para mejorar la LTP en el hipocampo después de la estimulación por estallido o estimulación de alta frecuencia. De forma similar, G-2-MePE aumenta la neurotransmisión excitatoria medida por las grabaciones electrofisiológicas potenciales postsinápticas extracelulares de campo en la corteza, el hipocampo y el cerebelo. Como resultado de la mejora de la neurotransmisión excitatoria (inversión de la deficiencia observada de neurotransmisión de tipo ASD), se observa que el G-2-MePE mejora las pruebas cognitivas y motoras del rendimiento cognitivo. Por lo tanto, G-2-MePE mejora el rendimiento en el laberinto de agua de Morris y en las pruebas del laberinto de brazo radial. En modelos de interacción social, el G-2-MePE, administrado a ratones mutantes con ASD, aumenta el tiempo que pasan los machos con desactivación en la interacción social con hembras de tipo silvestre. Además, las vocalizaciones ultrasónicas a ratones hembra de tipo silvestre aumentan. En modelos en los que se observa que la longevidad se reduce en ratones mutantes en comparación con los controles de tipo silvestre (tales como el modelo de ratones de desactivación de MeCP2 del síndrome de Rett), el tratamiento con G-2-MePE aumenta la vida útil de los animales.

Se ha encontrado que G-2-MePE inhibe los ataques no convulsivos (NCS) en animales con lesiones hipóxico-isquémicas causadas por la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO, patente de EE.UU. n.º 7.714.020, Lu *et al.*, NNZ-2566, un análogo de gliopromato, atenúa los ataques no convulsivos inducidos por la isquemia cerebral en ratas, (*J. Cerebral Blood Flow metabolism* (2009) 1-9) e inhibe la neuroinflamación en animales con lesión balística penetrante (pTBI; Wei *et al.*, "NNZ-2566 treatment inhibits neuroinflammation and pro-inflammatory cytokine expression induced by experimental penetrating ballistic-like brain injury in rats", *J. Neuroinflammation* (2009) 6:19, 1-10).

Los hallazgos de los presentes inventores de que los G-2-MePE también son eficaces en el tratamiento del síndrome de Rett y los ASD, son completamente inesperados basándose en la técnica anterior. Esto se debe a que el NCS en el modelo de MCAO está causado por hipoxia-isquemia, y la expresión de citoquinas inflamatorias en el modelo de pTBI está causada por traumatismo penetrante, siendo ambas lesiones agudas muy diferentes de los efectos crónicos de MECP2 u otras mutaciones producidas en la maduración sináptica.

Debido a que G-2-MePE se dirige a mecanismos neurológicos subyacentes (por ejemplo, disminuyen la inflamación neuronal mediante la inhibición de la liberación de citoquinas inflamatorias), puede proporcionar más que un tratamiento a corto plazo de los síntomas. Más bien, G-2-MePE puede mejorar la función neuronal, potenciar la migración de células neuronales, potenciar la neurogénesis, potenciar la diferenciación de células madre neuronales, potenciar la excrecencia axonal y dendrítica, y potenciar la transmisión sináptica, aliviando de este modo los síntomas adversos de los ASD.

Farmacología y utilidad

G-2-MePE puede tener efectos antiinflamatorios, antiapoptóticos, antinecróticos y neuroprotectores. Su actividad *in vivo* puede medirse por recuento celular, tinción específica de los marcadores deseados, o mediante métodos tales como los analizados en Klempt N. D. *et al.*: "Hypoxia-ischemia induces transforming growth factor β 1 mRNA in the infant rat brain. *Molecular Brain Research*": 13: 93-101. Su actividad también se puede medir *in vitro* usando métodos conocidos en la técnica o descritos en el presente documento.

Las afecciones que afectan a la función cerebral se vuelven frecuentes en las poblaciones envejecidas. La pérdida de memoria y el deterioro de la memoria son angustiantes para los pacientes afectados y para sus familias. La pérdida o el deterioro de la memoria puede deberse al envejecimiento normal, lesiones en el cerebro, enfermedades neurodegenerativas y disfunciones psicológicas o psiquiátricas. Por lo tanto, es muy beneficioso para los pacientes, para sus familias y para la sociedad que se identifiquen y caractericen nuevos compuestos que mejoren la memoria y/o la función cognitiva, y traten o prevengan la pérdida o el deterioro de la memoria.

Es deseable estudiar los efectos de agentes terapéuticos potenciales en sistemas animales. Uno de estos sistemas útiles es la rata. Se sabe que con el envejecimiento, las ratas y otros animales (incluyendo los seres humanos) pueden presentar síntomas de pérdida de memoria, deterioro de la memoria y otras disfunciones cognitivas. Además, se sabe que los estudios en ratas de agentes terapéuticos son predictivos de los efectos terapéuticos en seres humanos. Por lo tanto, los estudios de los efectos de GPE y G-2-MePE y la función cognitiva en ratas envejecidas son razonablemente predictivos de los efectos terapéuticos de los agentes en seres humanos envejecidos que tienen o son propensos a adquirir deficiencias de memoria u otra disfunción cognitiva. G-2-MePE también puede mejorar la función cognitiva y/o tratar trastornos de la memoria. La actividad estimulante cognitiva y la actividad terapéutica *in vivo* se pueden medir mediante ensayos neuropsicológicos o de comportamiento convencionales conocidos por los expertos en la materia. Dichos ensayos se pueden escoger entre una amplia selección de ensayos disponibles descritas anteriormente, y variarán dependiendo de la función cognitiva que se

vaya a ensayar y del estado del animal.

Los ensayos de comportamiento convencionales útiles para ensayar la función cognitiva en animales de experimentación incluyen, pero sin limitación, el ensayo del laberinto acuático de Morris, el ensayo de respuesta evasiva pasiva, el ensayo de reconocimiento de objetos nuevos, el ensayo de discriminación olfativa, el ensayo de laberinto radial de 8 brazos y el ensayo de laberinto T. Estos ensayos se pueden aplicar directamente a los estudios de los efectos de GPE y G-2-MePE sobre la función cognitiva en ratas envejecidas.

La actividad de G-2-MePE se puede medir mediante los métodos conocidos en la técnica y que se analizan en los documentos citados en el presente documento, y mediante métodos usados para medir la actividad de GPE.

La relación terapéutica de un compuesto se puede determinar, por ejemplo, comparando la dosis que proporciona una actividad antiinflamatoria, antiapoptótica y antinecrótica eficaz en un modelo *in vivo* adecuado, tal como una lesión hipóxico-isquémica (Sirimanne E. S., Guan J., Williams C. E. y Gluckman P. D: "Two models for determining the mechanisms of damage and repair after hypoxic-ischemic injury in the developing rat brain" (*Journal of Neuroscience Methods*: 55: 7-14, 1994) en una especie animal adecuada tal como la rata, dando la dosis efectos secundarios observables significativos en la especie animal de ensayo.

La relación terapéutica de un compuesto también se puede determinar, por ejemplo, comparando la dosis que proporciona un aumento eficaz de la función cognitiva o trata un trastorno de la memoria en un modelo *in vivo* adecuado (Ejemplos 4, 5 y 6 que se presentan a continuación) en una especie animal adecuada tal como la rata, dando la dosis una pérdida de peso significativa (u otros efectos secundarios observables) en la especie animal de ensayo.

Además, según lo descrito de manera más completa más adelante en el presente documento, G-2-MePE para su uso de acuerdo con la presente invención puede ser útil en el tratamiento del síndrome de Rett, incluyendo la prolongación de la vida, el aumento de la actividad neuronal y el tratamiento de las convulsiones asociadas con el síndrome de Rett.

En un estudio del síndrome de Rett en ratones (usando el modelo de desactivación de MeCP2), se encontró que GPE tenía efectos de prolongación de la vida y de aumento de la función neuronal (publicación de EE.UU. n.º 2009/0099077). Sin embargo, como se desvela más adelante, GPE, que es un péptido natural, se degrada rápidamente *in vivo* e *in vitro*, y su utilidad en el tratamiento crónico de pacientes con el síndrome de Rett es, por lo tanto, poco clara.

Composiciones farmacéuticas y administración

En general, G-2-MePE para su uso de acuerdo con la presente invención puede administrarse en cantidades terapéuticamente eficaces por cualquiera de los modos habituales conocidos en la técnica, bien individualmente o en combinación con al menos otro agente terapéutico convencional para la enfermedad que se esté tratando. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar ampliamente dependiendo de la enfermedad o de la lesión, de la gravedad de la enfermedad, de la edad y de la salud relativa del animal que se está tratando, la potencia del/de los compuesto/s, y otros factores. Por ejemplo, las dosis tales como aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg/kg, por ejemplo, 10 mg/kg, son apropiadas para la administración mediante métodos tales como la administración oral. El experto en la materia podrá, sin experimentación excesiva, teniendo en cuenta esa destreza y la presente divulgación, determinar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención para una enfermedad o lesión dada.

En general, G-2-MePE para su uso de acuerdo con la presente invención se puede administrar como composiciones farmacéuticas. Las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos, pastillas, cápsulas, semisólidos, polvos, formulación de liberación sostenida, soluciones, suspensiones, elixires, aerosoles, geles solubles o cualquier otra composición apropiada; y comprenden G-2-MePE en combinación con al menos un excipiente farmacéutica o fisiológicamente aceptable. Los excipientes adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia, y los mismos, y los métodos de formulación de las composiciones, pueden encontrarse en referencias convencionales como Gennaro A. R: "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20ª ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 2000. Los vehículos líquidos adecuados incluyen agua, solución salina acuosa, solución acuosa de dextrosa, glicoles y similares.

G-2-MePE para su uso de acuerdo con presente invención se administra por vía oral, por ejemplo, en comprimidos o cápsulas. En algunas realizaciones, G-2-MePE se puede preparar en emulsiones de agua en aceite en forma de microemulsiones, emulsiones de grano grueso, cristales líquidos o nanocápsulas (solicitud de EE.UU. n.º 12/283.684, ahora patente n.º 7.887.839). Debido a que G-2-MePE puede tener una biodisponibilidad oral sustancial, puede usarse ventajosamente para una administración conveniente y crónica. Además, las composiciones disponibles por vía oral incluyen hidrogeles solubles que contienen compuestos activos, permitiendo así la administración oral de compuestos neuroprotectores sin la necesidad de que un paciente trague un comprimido o una cápsula. Dichos materiales y geles de liberación lenta son conocidos en la técnica.

G-2-MePE también se puede administrar adecuadamente mediante un sistema de liberación sostenida o un material de gel con G-2-MePE incorporado en el mismo. Los ejemplos adecuados de composiciones de liberación sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida incluyen polilactidos (patente de EE.U. n.º 3.773.919; documento EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, 1983), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (Langer *et al.*, 1981), acetato de etilen-vinilo (Langer *et al.*, *supra*) o ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (documento EP 133.988). Además, pueden usarse composiciones de gel basadas en polisacáridos (por ejemplo, carboximetilcelulosa, carboxietilcelulosa, quitosano u otros derivados de celulosa) y derivados de óxido de polietileno (por ejemplo, polietilenglicoles). Estas composiciones de gel son solubles en soluciones acuosas, son biocompatibles, no tóxicas y, por lo tanto, pueden usarse para la administración a cualquier superficie de la mucosa, incluyendo la cavidad oral.

Las composiciones de liberación sostenida también incluyen un compuesto atrapado liposomalmente. Los liposomas que contienen el compuesto se preparan mediante métodos conocidos en sí: documento DE 3.218.121; Epstein *et al.*, 1985; Hwang *et al.*, 1980; documento EP 52322; documento EP 36.676; documento EP 88.046; documento EP 143.949; documento EP 142.641; solicitud de patente 83-118008; patentes de EE.UU. n.º 4.485.045 y 4.544.545; y documento EP 102.324. Habitualmente, los liposomas son del tipo unilamelar pequeño (desde o aproximadamente 200 a 800 Angstroms), en el que el contenido de lípidos es superior al aproximadamente 30 por ciento en moles de colesterol, ajustándose la proporción seleccionada para la terapia más eficaz.

G-2-MePE también se puede unir a polietilenglicol ("PEGilado") para aumentar su vida útil *in vivo*, basándose, por ejemplo, en la tecnología conjugada descrita en el documento WO 95/32003.

Deseablemente, si es posible, cuando se administran como un agente antiinflamatorio, un agente antiapoptótico, un agente antinecrótico o un agente antineurodegenerativo, los compuestos pueden administrarse por vía oral. La cantidad de un compuesto en dicha composición puede variar ampliamente dependiendo del tipo de composición, del tamaño de una dosis unitaria, del tipo de excipientes y de otros factores bien conocidos por los expertos en la materia. En general, la composición final puede comprender del aproximadamente 0,0001 por ciento en peso (% en peso) al aproximadamente 10 % en peso del compuesto, preferentemente del aproximadamente 0,001 % en peso al aproximadamente 1 % en peso, siendo el resto un excipiente o excipientes.

Una composición puede contener opcionalmente, además del compuesto de la presente invención, al menos un agente seleccionado de, por ejemplo, factores de crecimiento y derivados asociados (factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF-I), factor de crecimiento similar a la insulina II (IGF-II), factor de crecimiento transformante β -1, activina, hormona del crecimiento, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), proteína de unión a la hormona del crecimiento, proteínas de unión a IGF (en especial, IGFBP-3), factor de crecimiento básico de fibroblastos, factor de crecimiento ácido de fibroblastos, producto génico hst/Kfgk, FGF-3, FGF-4, FGF-6, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento inducido por andrógenos. Otros miembros adicionales de la familia de FGF incluyen, por ejemplo, int-2, factor 1 homólogo al factor de crecimiento de fibroblastos (FHF-1), FHF-2, FHF-3 y FHF-4, factor 2 de crecimiento de queratinocitos, factor de activación glial, FGF-10 y FGF-16, factor neurotrófico ciliar, factor de crecimiento derivado del cerebro, neurotrofina 3, neurotrofina 4, proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2), factor neurotrófico derivado de la estirpe celular glial, factor neurotrófico dependiente de la actividad, factor inhibidor de la leucemia de citoquinas, oncostatina M, interferón α , β , y o consenso, y TNF- α . Otras formas de agentes terapéuticos neuroprotectores incluyen, por ejemplo, clometiazol; ácido kinurénico, Semax, tacrolimus, L-treo-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolin-1-propanol, análogo de adrenocorticotropina-(4-9) [ORG 2766] y dizolcipina (MK-801), selegilina; antagonistas de glutamato tales como memantina (Namenda) NPS1506, GV1505260, MK-801, GV150526; antagonistas de AMPA tales como 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoiibenzo(f)quinoxalina (NBQX), LY303070 y LY300164; agentes antiinflamatorios dirigidos contra la adreína MAdCAM-1 y/o sus receptores de integrina $\alpha 4$ ($\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$), tales como mAb MECA-367 anti-MAdCAM-1 (ATCC n.º de acceso HB-9478). También puede ser útil la terapia de combinación con antagonistas metabotrópicos del receptor de glutamato tales como fenobam. También, además de un compuesto de la presente invención, una composición puede incluir un inhibidor selectivo de la recaptación de la serotonina tal como la fluoxetina, un inhibidor selectivo de la recaptación de la norepinefrina tal como la viloxazina, o un agente antipsicótico atípico tal como la risperidona. La mayoría de estos agentes, en especial, los péptidos tales como los factores de crecimiento, etc., no son activos por vía oral, y requerirán la administración por inyección o infusión.

Preparación de composiciones

Los materiales de partida y los reactivos usados en la preparación de G-2-MePE están disponibles a partir de proveedores comerciales tales como Aldrich Chemical Company (Milwaukee, Wis.), Bachem (Torrance, Calif.), Sigma (St. Louis, Mo.) o se preparan mediante métodos bien conocidos por el experto habitual en la materia siguiendo procedimientos descritos en referencias tales como "Fieser y Fieser's Reagents for Organic Synthesis", vol. 1-17, John Wiley and Sons, Nueva York, N.Y., 1991; "Rodd's Chemistry of Carbon Compounds", vol. 1-5 y suplementos, Elsevier Science Publishers, 1989; "Organic Reactions", vol. 1-40, John Wiley and Sons, Nueva York, N.Y., 1991; March J; *Advanced Organic Chemistry*, 4ª ed. John Wiley and Sons, Nueva York, N.Y., 1992; y Larock: "Comprehensive Organic Transformations", VCH Publishers, 1989. En la mayoría de los casos, los aminoácidos y

sus ésteres o amidas, y aminoácidos protegidos, están ampliamente disponibles en el mercado; y la preparación de aminoácidos modificados y sus amidas o ésteres se describen extensamente en la bibliografía química y bioquímica y, por lo tanto, son bien conocidos por los expertos habituales en la materia. Por ejemplo, el ácido N-pirrolidinacético se describe en Dega-Szafran Z y Pryzbylak R. "Synthesis, IR, and NMR studies of zwitterionic α -(1-pyrrolidine)alkanocarboxylic acids and their N-methyl derivatives". *J. Mol. Struct.* 436-7, 107-121, 1997; y el ácido N-piperidinacético se describe en Matsuda O., Ito S. y Sekiya M. "Reaction of N-(alkoxymethyl)dialkylamines and N,N'-methylenebisdialkylamines with isocyanides". *Chem. Pharm. Bull.* 23(1), 219-221, 1975.

Los materiales de partida, productos intermedios y G-2-MePE se pueden aislar y purificar usando técnicas convencionales, incluyendo filtración, destilación, cristalización, cromatografía y similares. Pueden caracterizarse usando métodos convencionales, incluyendo constantes físicas y datos espectrales.

G-2-MePE se puede preparar mediante los métodos descritos a continuación y como se dan en los Ejemplos.

En general, G-2-MePE se puede preparar mediante métodos tales como los que ya son bien conocidos por los expertos en la materia de síntesis de péptidos y de péptidos modificados, siguiendo los esquemas de reacción expuestos en las FIG. 1-11 que acompañan a la presente memoria descriptiva, o siguiendo otros métodos bien conocidos por los expertos en la materia de la síntesis de péptidos y análogos.

Convenientemente, la producción sintética de G-2-MePE puede ser de acuerdo con el método sintético en fase sólida descrito por Merrifield *et al.*, "Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide": *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 2149-2156, 1963. Esta técnica es muy conocida y es un método común para la preparación de péptidos. El concepto general de este método depende de la unión del primer aminoácido de la cadena a un polímero sólido por un enlace covalente. Se agregan aminoácidos protegidos sucesivos, uno cada vez (estrategia escalonada) o en bloques (estrategia de segmentos), hasta que se ensambla la secuencia deseada. Finalmente, se retira el péptido protegido del soporte de resina sólida y se escinden los grupos protectores. Mediante este procedimiento, los reactivos y subproductos se eliminan por filtración, eliminando así la necesidad de purificar los productos intermedios.

Los aminoácidos pueden unirse a cualquier polímero adecuado como una resina. La resina debe contener un grupo funcional al que puede unirse el primer aminoácido protegido firmemente por un enlace covalente. Para este fin, son adecuados diversos polímeros, tales como celulosa, alcohol polivinílico, polimetilmetacrilato y poliestireno. Las resinas adecuadas están disponibles en el mercado y son muy conocidas por los expertos en la materia. Los grupos protectores apropiados que se pueden usar en dicha síntesis incluyen *tert*-butiloxicarbonilo (BOC), bencilo (Bzl), *t*-amiloxicarbonilo (Aoc), tosilo (Tos), *o*-bromo-fenilmetoxicarbonilo (BrZ), 2,6-diclorobencilo (BzlCl₂) y fenilmetoxicarbonilo (Z o CBZ). Otros grupos protectores adicionales se identifican en Merrifield, citado anteriormente, así como en McOmie J. F. W.: "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, Nueva York, 1973, ambas referencias se incorporan expresamente en el presente documento.

Los procedimientos generales de preparación de péptidos implican inicialmente la unión de un aminoácido protegido con terminación carboxilo a la resina. Tras la unión, la resina se filtra y se lava, y se retira el grupo protector (deseablemente BOC) del grupo I-amino del aminoácido con terminación carboxilo. La retirada de este grupo protector debe tener lugar, por supuesto, sin romper el enlace entre ese aminoácido y la resina. A continuación, se acopla el siguiente aminoácido, y si es necesario, el aminoácido protegido con cadena lateral, al grupo I-amino libre del aminoácido sobre la resina. Este acoplamiento tiene lugar mediante la formación de un enlace de amida entre el grupo carboxilo libre del segundo aminoácido y el grupo amino del primer aminoácido unido a la resina. Esta secuencia de eventos se repite con sucesivos aminoácidos hasta que todos los aminoácidos se unen a la resina. Finalmente, el péptido protegido se escinde de la resina, y se retiran los grupos protectores para revelar el péptido deseado. Las técnicas de escisión usadas para separar el péptido de la resina y para retirar los grupos protectores dependen de la selección de resina y de los grupos protectores, y son conocidas por los expertos habituales en la materia de la síntesis de péptidos.

Otras técnicas alternativas para la síntesis de péptidos se describen en Bodanszky *et al.*, "Peptide Synthesis", 2ª ed, John Wiley and Sons, Nueva York, 1976. Por ejemplo, G-2-MePE también pueden sintetizarse usando metodologías de síntesis de péptidos en solución convencionales, que implican el acoplamiento por etapas o en bloques de aminoácidos o fragmentos peptídicos usando métodos químicos o enzimáticos de formación de enlaces de amida. (Véase, por ejemplo, H. D. Jakubke en "The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology", Academic Press, Nueva York, 1987, pág. 103-165; J. D. Glass, *ibid.*, pág. 167-184; y patente europea n.º 0324659 A2, que describe métodos de síntesis de péptidos enzimáticas). Estos métodos de síntesis en solución son muy conocidos en la técnica.

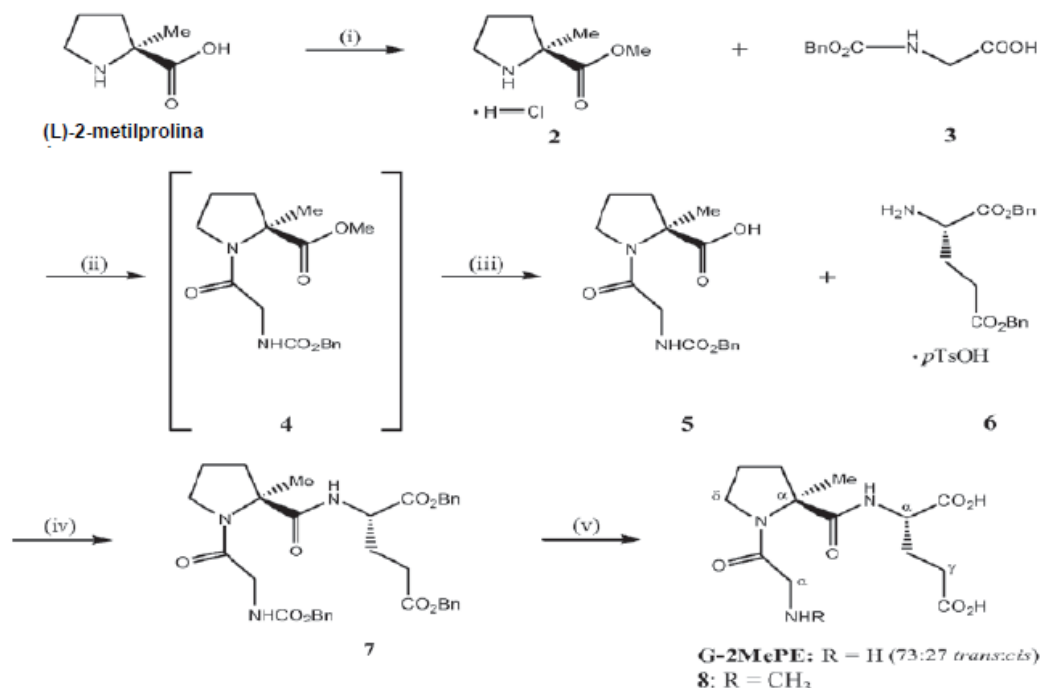
Los sintetizadores de péptidos comerciales, tales como el Modelo 430A de Applied Biosystems, están disponibles para la práctica de estos métodos.

Un experto habitual en la materia no tendrá que realizar una experimentación excesiva, teniendo en cuenta esa destreza técnica y el conocimiento disponible, y de la presente divulgación, en el desarrollo de uno o más métodos sintéticos adecuados para G-2-MePE.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar realizaciones de la presente invención.

5 Ejemplo 1: Síntesis de glicil-L-2-metil-L-prolil-L-glutamato (G-2-MePE)

Ácido glicil-L-2-Metilprolil-L-glutámico (G-2MePE)

Reactivos, condiciones y rendimientos del Esquema 1: (i) SOCl₂, MeOH, 79 °C, N₂, 24 h (104 %); (ii) Et₃N, DCC, CH₂Cl₂, 0 °C a la TA, N₂, 20 h; (iii) NaOH ac. 1 M, 1,4-dioxano, 19 h (60 %, 2 etapas); (iv) Et₃N, BoPCI, CH₂Cl₂, TA, N₂, 17 h (89 %); (v) H₂, Pd/C al 10 %, MeOH-H₂O 91:9, TA, 23 h (86 %).

La L-2-metilprolina y el *p*-toluenosulfonato de éster dibencílico de ácido glutámico se adquirieron en Bachem, la *N*-benciloxycarbonil-glicina, en Acros Organics, y el cloruro bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BoPCI, 97 %), en Aldrich Chem. Co.

Clorhidrato de L-2-metilprolinato de metilo 2

Se añadió cuidadosamente cloruro de tionilo (5,84 cm³, 80,1 mmol) gota a gota a una solución agitada de (L)-2-metilprolina **1** (0,43 g, 3,33 mmol) en metanol anhidro (30 cm³) a -5 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 24 h, y se concentró la solución resultante de color amarillo pálido a sequedad al vacío. Se disolvió el residuo en una mezcla 1: 1 de metanol y tolueno (30 cm³), luego se concentró a sequedad para eliminar el cloruro de tionilo residual. Se repitió este procedimiento dos veces más, proporcionando clorhidrato **2** (0,62 g, 104 %) en forma de un sólido blanquecino higroscópico, espectroscópicamente puro, p.f. = 127-131 °C. [α]_D -59,8 (c 0,24 in CH₂Cl₂); $\nu_{\max}$ (película)/cm⁻¹ 3.579, 3.398 ancho, 2.885, 2.717, 2.681, 2.623, 2.507, 1.743, 1.584, 1.447, 1.432, 1.374, 1.317, 1.294, 1.237, 1.212, 1.172, 1.123, 981, 894, 861 y 764; δ_H (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 1,88 (3H, s, Pro α -CH₃), 1,70-2,30 (3H, m ancho, Pro β -H_AH_B y Pro γ -H₂), 2,30-2,60 (1H, m ancho, Pro β -H_AH_B), 3,40-3,84 (2H, m ancho, Pro δ -H₂), 3,87 (3H, s, CO₂CH₃), 9,43 (1H, s ancho, NH) y 10,49 (1H, s ancho, HCl); δ_C (75 MHz; CDCl₃) 21,1 (CH₃, Pro α -CH₃), 22,4 (CH₂, Pro γ -C), 35,6 (CH₂, Pro β -C), 45,2 (CH₂, Pro δ -C), 53,7 (CH₃, CO₂CH₃), 68,4 (c., Pro α -C) y 170,7 (c., CO); *m/z* (FAB⁺) 323,1745 [M₂•H₃₅Cl•H⁺: (C₇H₁₃NO₂)₂•H³⁵Cl•H requiere 323,1738] y 325,1718 [M₂•H³⁷Cl•H⁺: (C₇H₁₃NO₂)₂•H³⁷Cl•H requiere 325,1708].

N-Benciloxycarbonil-glicil-L-2-metilprolina 5

Se añadió gota a gota trietilamina anhidra (0,45 cm³, 3,23 mmol) a una mezcla de clorhidrato de metil-L-2-metilprolinato **2** (0,42 g, 2,34 mmol) y *N*-benciloxycarbonilglicina (98,5 %) **3** (0,52 g, 2,45 mmol) en cloruro de metileno (16 cm³) a 0 °C, bajo una atmósfera de nitrógeno. Se agitó la solución resultante durante 20 minutos y se

añadió gota a gota una solución de 1,3-diciclohexilcarbodiimida (0,56 g, 2,71 mmol) en cloruro de metileno (8 cm³) a 0 °C, y se calentó la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se agitó durante otras 20 h. Se filtró la mezcla blanca resultante a través de un lecho corto de CeliteTM para retirar parcialmente la 1,3-diciclohexilurea, y se lavó el lecho corto con cloruro de metileno (50 cm³). Se lavó el filtrado sucesivamente con ácido clorhídrico acuoso al 10 % (50 cm³) y bicarbonato sódico acuoso saturado (50 cm³), se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró a sequedad al vacío. La purificación adicional del residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (35 g de SiO₂, 30-70 % de acetato de etilo - hexano, elución en gradiente) proporcionó provisionalmente N-benciloxicarbonil-glicil-L-2-metilprolinato de metilo **4** (0,56 g), que contenía 1,3-diciclohexilurea, en forma de un semisólido blanco: R_f 0,65 (EtOAc); m/z (EI+) 334,1534 (M⁺. C₁₇H₂₂N₂O₅ requiere 334,1529) y 224 (1,3-diciclohexilurea).

A una solución de prolinato impuro **4** (0,56 g, aprox. 1 0,67 mmol) en 1,4-dioxano (33 cm³), se añadió gota a gota hidróxido de sodio acuoso 1 M (10 cm³, 10 mmol), y se agitó la mezcla durante 19 h a temperatura ambiente. A continuación, se añadió cloruro de metileno (100 cm³), y se extrajo la capa orgánica con bicarbonato de sodio acuoso saturado (2 x 100 cm³). Se acidificaron las capas acuosas combinadas cuidadosamente con ácido clorhídrico (32 %), se extrajeron con cloruro de metileno (2 x 100 cm³), y se secaron las capas orgánicas combinadas (MgSO₄), se filtraron y se concentraron a sequedad al vacío. La purificación del residuo resultante (0,47 g) por cromatografía en columna ultrarrápida (17 g de SiO₂, acetato de etilo al 50 % - hexano hasta metanol al 30 % - diclorometano, elución en gradiente) dio el dipéptido N-prottegido **5** (0,45 g, 60 %) en forma de una espuma blanca en dos etapas del clorhidrato **2**. Se demostró que el dipéptido **5** era exclusivamente el confórmero con orientación *trans* mediante análisis de RMN: R_f 0,50 (MeOH al 20 %-CH₂Cl₂); [α]_D -62,3 (c 0,20 en CH₂Cl₂); ν_{max} (película)/cm⁻¹ 3.583, 3.324 ancho, 2.980, 2.942, 1.722, 1.649, 1.529, 1.454, 1.432, 1.373, 1.337, 1.251, 1.219, 1.179, 1.053, 1.027, 965, 912, 735 y 698; δ_H (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 1,59 (3H, s, Proα-CH₃), 1,89 (1H, 6 líneas, J 18,8, 6,2 y 6,2, Proβ-H_AH_B), 2,01 (2H, dt, J 18,7, 6,2 y 6,2, Proγ-H₂), 2,25-2,40 (1H, m, Proβ-H_AH_B), 3,54 (2H, t, J 6,6, Proδ-H₂), 3,89 (1H, dd, J 17,1 y 3,9, Glyα-H_AH_B), 4,04 (1H, dd, J 17,2 y 5,3, Glyα-H_AH_B), 5,11 (2H, s, OCH₂Ph), 5,84 (1H, t ancho, J 4,2, N-H), 7,22-7,43 (5H, m, Ph) y 7,89 (1H, s ancho, -COOH); δ_C (75 MHz; CDCl₃) 21,3 (CH₃, Proα-CH₃), 23,8 (CH₂, Proγ-C), 38,2 (CH₂, Proβ-C), 43,6 (CH₂, Glyα-C), 47,2 (CH₂, Proδ-C), 66,7 (c., Proα-C), 66,8 (CH₂, OCH₂Ph), 127,9 (CH, Ph), 127,9 (CH, Ph), 128,4 (CH, Ph), 136,4 (c., Ph), 156,4 (c., NCO₂), 167,5 (c., Gly-CON) y 176,7 (c., CO); m/z (EI+) 320,1368 (M⁺. C₁₆H₂₀N₂O₅ requiere 320,1372).

N-benciloxicarbonil-glicil-L-2-metilprolil-L-glutamato de dibencilo 7

Se añadió gota a gota trietilamina (0,50 cm³, 3,59 mmol) a una solución del dipéptido **5** (0,36 g, 1,12 mmol) y *p*-toluenosulfonato de éster dibencilico de ácido L-glutámico **6** (0,73 g, 1,46 mmol) en metileno (60 cm³) bajo nitrógeno a temperatura ambiente, y se agitó la mezcla de reacción durante 10 min. Se añadió cloruro de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BoPCI, 97 %) (0,37 g, 1,41 mmol) y se agitó la solución incolora durante 17 h. Se lavó la solución de cloruro de metileno sucesivamente con ácido clorhídrico acuoso al 10 % (50 cm³) y bicarbonato sódico acuoso saturado (50 cm³), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó hasta sequedad al vacío. La purificación del residuo resultante mediante cromatografía en columna rápida repetida (x2) (24 g de SiO₂, acetato de etilo - hexano al 30-70 %, elución en gradiente) produjo el tripéptido **7 totalmente protegido** (0,63 g, 89 %) en forma de un aceite incoloro. El tripéptido **7** mostró ser exclusivamente el conformador con orientación *trans* mediante análisis de RMN. R_f 0,55 (EtOAc); [α]_D -41,9 (c 0,29 en CH₂Cl₂); ν_{max} (película)/cm⁻¹ 3.583, 3.353 ancho, 2.950, 1.734, 1.660, 1.521, 1.499, 1.454, 1.429, 1.257, 1.214, 1.188, 1.166, 1.051, 911, 737 y 697; δ_H (400 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 1,64 (3H, s, Proα-CH₃), 1,72 (1H, dt, J 12,8, 7,6 and 7,6, Proβ-H_AH_B), 1,92 (2H, 5 líneas, J 6,7, Proγ-H₂), 2,04 (1H, 6 líneas, J 7,3 Gluβ-H_AH_B), 2,17-2,27 (1H, m, Gluβ-H_AH_B), 2,35-2,51 (3H, m, Proβ-H_AH_B y Gluγ-H₂), 3,37-3,57 (2H, m, Proδ-H₂), 3,90 (1H, dd, J 17,0 y 3,6, Glyα-H_AH_B), 4,00 (1H, dd, J 17,1 y 5,1, Glyα-H_AH_B), 4,56 (1H, td, J 7,7 y 4,9, Gluα-H), 5,05-5,20 (6H, m, 3 x OCH₂Ph), 5,66-5,72 (1H, m ancho, Gly-NH), 7,26-7,37 (15H, m, 3 x Ph) y 7,44 (1H, d, J 7,2, Glu-NH); δ_C (100 MHz; CDCl₃) 21,9 (CH₃, Proα-CH₃), 23,4 (CH₂, Proγ-C), 26,6 (CH₂, Gluβ-C), 30,1 (CH₂, Gluγ-C), 38,3 (CH₂, Proβ-C), 43,9 (CH₂, Glyα-C), 47,6 (CH₂, Proδ-C), 52,2 (CH, Gluα-C), 66,4 (CH₂, OCH₂Ph), 66,8 (CH₂, OCH₂Ph), 67,1 (CH₂, OCH₂Ph), 68,2 (c., Proα-C), 127,9 (CH, Ph), 128,0 (CH, Ph), 128,1 (CH, Ph), 128,2 (CH, Ph), 128,2 (CH, Ph), 128,3 (CH, Ph), 128,4 (CH, Ph), 128,5 (CH, Ph), 128,5 (CH, Ph), 135,2 (c., Ph), 135,7 (c., Ph), 136,4 (c., Ph), 156,1 (c., NCO₂), 167,3 (c., Gly-CO), 171,4 (c., CO), 172,9 (c., CO) y 173,4 (x., CO); m/z (FAB+) 630,2809 (MH⁺. C₃₅H₄₀N₃O₈ requiere 630,2815).

Ácido glicil-L-2-metilprolil-L-glutámico (G-2-MePE)

Se agitó una mezcla del tripéptido protegido **7** (0,63 g, 1,00 mmol) y 10 % en peso de paladio sobre carbón activado (0,32 g, 0,30 mmol) en metanol-agua 91: 9 (22 cm³) bajo una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente, protegida de la luz, durante 23 h. Se filtró la mezcla de reacción a través de un lecho corto de Celite[®] y se lavó el lecho corto con metanol-agua 75:25 (200 cm³). Se concentró la fracción filtrada a sequedad a presión reducida y se trituró el residuo con éter dietílico anhidro, proporcionando una mezcla 38:1 de G-2-MePE y provisionalmente metilamina **8** (0,27 g, 86 %) en forma de un sólido blanco extremadamente higroscópico. Los estudios analíticos de HPLC en fase inversa sobre la mezcla [columna de Si C₁₈ Altech Econosphere, 150 x 4,6 mm, 5 μm; lavado abundante durante 5 min con H₂O (TFA al 0,05 %) y después gradiente constante durante 25 min a MeCN como eluyente a un caudal de 1 ml/min; detección usando matriz de diodos] indicaron que era una mezcla 38:1 de dos picos de elución con tiempos de retención de 13,64 y 14,44 min a 207 y 197 nm, respectivamente. Se demostró que el G-2-MePE era una mezcla de confórmeros *trans:cis* de 73:27 mediante análisis de RMN de ¹H (la relación se

estimó a partir de las intensidades relativas del doblete doble y el triplete a δ 4,18 y 3,71, asignados a los protones Glu α -H de los confórmeros mayor y menor, respectivamente): p.f.= 144 °C⁰; $[\alpha]_D$ -52,4 (c 0,19 en H₂O); δ_H (300 MHz; D₂O; MeOH interno) 1,52 (3H, s, Pro α -CH₃), 1,81-2,21 (6H, m, Pro β -H₂, Pro γ -H₂ y Glu β -H₂), 2,34 (1,46H, t, J 7,2, Glu γ -H₂), 2,42* (0,54H, t, J 7,3, Glu γ -H₂), 3,50-3,66 (2H, m, Pro δ -H₂), 3,71* (0,27H, t, J 6,2, Glu α -H), 3,85 (1H, d, J 16,6, Gly α -H_AH_B), 3,92 (1H, d, J 16,6, Gly α -H_AH_B) y 4,18 (0,73H, dd, J 8,4 y 4,7, Glu α -H); δ_C (75 MHz; D₂O; MeOH interno) 21,8 (CH₃, Pro α -CH₃), 25,0 (CH₂, Pro γ -C), 27,8* (CH₂, Glu β -C), 28,8 (CH₂, Glu β -C), 32,9 (CH₂, Glu γ -C), 40,8 (CH₂, Pro β -C), 42,7 (CH₂, Gly α -C), 49,5 (CH₂, Pro δ -C), 56,0* (CH, Glu α -C), 56,4 (CH, Glu α -C), 69,8 (c, Pro α -C), 166,5 (c., Gly-CO), 177,3 (c., Pro-CON), 179,2 (c., Glu α -CO), 180,2* (c., Glu γ -CO) y 180,6 (c., Glu γ -CO); m/z (FAB+) 316,1508 (MH⁺. C₁₃H₂₂N₃O₆ requiere 316,1509).

Ejemplo 2: Neuroprotección *in vitro*

Se examinaron los efectos terapéuticos de los análogos de GPE en una serie de experimentos *in vitro* para determinar sus efectos sobre la neurodegeneración de células neuronales de diferente origen. Los sistemas *in vitro* descritos en el presente documento están bien establecidos en la técnica y se sabe que son predictivos de los efectos neuroprotectores observados *in vivo*, incluyendo los efectos en seres humanos que padecen trastornos neurodegenerativos.

Material y métodos

El siguiente protocolo experimental siguió las pautas aprobadas por el Comité de Ética Animal de la Universidad de Auckland.

Preparación de cultivos de astrocitos corticales para la cosecha de sobrenadante de cultivo celular metabolizado

Se usó un hemisferio cortical de una rata postnatal de día 1 y se recogió en 4 ml de DMEM. La trituración se realizó usando una pipeta de vidrio de 5 ml y una aguja de calibre 18. Se tamizó la suspensión de células a través de un filtro de células de 100 μ m, y se lavó en 50 ml de DMEM (centrifugación durante 5 min a 250 g). Se volvió a suspender el sedimento en 20 ml de DMEM + suero fetal de ternera al 10 %. Se añadió la suspensión a dos matraces de 25 cm³ (10 ml por matraz) y se cultivó a 37 °C en presencia de CO₂ al 10 %, seguido de un cambio del medio dos veces por semana. Cuando las células alcanzaron la confluencia, se lavaron tres veces con PBS, se ajustaron a Neurobasal/B27 y se incubaron durante otros 3 días. Este sobrenadante se congeló para un almacenamiento transitorio a -80 °C.

Preparación de tejido cortical y estriado procedente de embriones de rata E18/E19

Se sacrificó una presa mediante tratamiento con CO₂ y luego se preparó para la cesárea. Después de la cirugía, se extrajeron los embriones de sus sacos amnióticos y se decapitaron. Se colocaron las cabezas sobre hielo en medio DMEM/F12 para el cuerpo estriado y en PBS + D-(+)-glucosa al 0,65 % para la corteza.

Procedimiento de extracción de tejido estriado y preparación de células

Se extrajo un cerebro entero del cráneo con el lado ventral hacia arriba en Medio DMEM/F12. Se diseccionó el cuerpo estriado de ambos hemisferios bajo un estereomicroscopio y se colocó el tejido estriado en un tubo de Falcon sobre hielo. Luego se trituró el tejido estriado con una pipeta P1000 en 1 ml de volumen. Se trituró el tejido pipeteando suavemente la solución hacia arriba y hacia abajo en la punta de la pipeta aproximadamente 15 veces, usando la fuerza de cizalla en flujos de salida alternos. Los trozos de tejido se asentaron en el fondo del tubo Falcon en 30 segundos. A continuación, se transfirió el sobrenadante que contenía una suspensión de células individuales disociadas a un nuevo tubo Falcon estéril sobre hielo. Se volvieron a triturar los fragmentos de tejido para evitar el daño excesivo en las células ya disociadas, por triturarlas más. Se añadió 1 mililitro de medio de DMEM/F12 enfriado con hielo a los fragmentos de tejido del primer tubo y se trituraron como antes. Se dejaron sedimentar los fragmentos de tejido y se retiró el sobrenadante a un nuevo tubo Falcon estéril sobre hielo. Se centrifugaron las células a 250 g durante 5 minutos a 4 °C.

Siembra en placas y cultivo de células estriadas

Se sembraron células estriadas en placas de 96 pocillos recubiertas con poli-L-lisina (0,1 mg/ml) (solo 60 pocillos internos) a una densidad de 200.000 células/cm² en medio Neurobasal/B27 (Invitrogen). Se cultivaron las células en presencia de CO₂ al 5 % a 37 °C bajo una humedad del 100 %. Se cambió el medio en los días 1, 3 y 6.

Procedimiento de extracción de tejido cortical y preparación de células

Se extirparon cuidadosamente los dos hemisferios corticales mediante la espátula de todo el cerebro con el lado ventral hacia arriba en una placa de Petri que contenía PBS + D-(+)-glucosa al 0,65 %. Se colocaron fórceps en la parte del rostro (cerca de *B. olfactorius*) de la corteza con el fin de fijar el tejido y se realizaron dos cortes orientados

lateral-sagitalmente para retirar la corteza paraformal y entorinal. Se realizó un corte con orientación frontal en el extremo posterior para retirar la formación del hipocampo. Se realizó un último corte frontal a pocos milímetros del último corte para obtener la zona 17/18 de la corteza visual.

5 Se colocaron las cortezas sobre hielo en PBS + (+)-glucosa al 0,65 % y se centrifugaron a 350 g durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se añadió tripsina/EDTA (0,05 %/0,53 mM) durante 8 min a 37 °C. Se detuvo la reacción añadiendo una cantidad igual de DMEM y suero fetal de ternera al 10 %. Se retiró el sobrenadante por centrifugación seguido de dos lavados posteriores en medio Neurobasal/B27.

10 Se trituraron las células una vez con una pipeta de vidrio Pasteur en 1 ml de medio Neurobasal/B27 y posteriormente dos veces usando una jeringa de insulina de 1 ml con una aguja de calibre 22. Se hizo pasar la suspensión celular a través de un filtro de células de 100 µm y se enjuagó con 1 ml de medio Neurobasal/B27. Se contaron las células y se ajustaron a 50.000 células por 60 µl.

15 **Siembra en placas y cultivo de células corticales**

Se recubrieron placas de 96 pocillos con 0,2 mg/ml de poli-L-lisina y posteriormente se recubrieron con 2 µg/ml de laminina en PBS, después de lo que se añadieron 60 µl de medio condicionado de astrocitos corticales a cada pocillo. Posteriormente, se añadieron 60 µl de suspensión de células corticales. Las células se cultivaron en presencia de CO₂ al 10 % a 37 °C bajo una humedad del 100 %. El día 1, hubo un cambio completo del medio (1:1 - Neurobasal/B27 y medio condicionado de astrocitos) con la adición de 1 µM de citosina-β-D-arabino-furanosida (inhibidor de la mitosis). Los días 2 y 5, se modificaron 2/3 del medio.

25 **Microexplantes cerebelosos de animales P8: Preparación, cultivo y fijación**

Se explantaron cortezas cerebelosas laminadas de los dos hemisferios de una rata P8, se cortaron en trozos pequeños en solución de PBS + D-(+)-glucosa al 0,65 % y se trituraron con una aguja de calibre 23 y, posteriormente, se presionaron a través de un tamiz de tamaño de poro de 125 µm. Se centrifugaron los microexplantes obtenidos (60 g) dos veces (cambio de medio) en medio STARTV suplementado con BSA exento de suero (Biochrom). Para el cultivo, se adhirieron 40 µl de suspensión celular durante 3 horas sobre un cubreobjetos recubierto con poli-L-lisina a 0,1 mg/ml dispuesto en placas de 6 pocillos de 35 mm de tamaño en presencia de CO₂ al 5 % bajo humedad del 100 % a 34 °C. Posteriormente, se añadió 1 ml de medio STARTV junto con las toxinas y fármacos. Se controlaron los cultivos (evaluaron) después de 2-3 días de cultivo en presencia de CO₂ al 5 % bajo una humedad del 100 %. Para el análisis de recuento de células, se fijaron los cultivos a concentraciones crecientes de paraformaldehído (0,4 %, 1,2 %, 3 % y 4 % durante 3 min cada vez) seguido de un lavado en PBS.

Administración de toxinas y fármacos a células neuronales *in vitro* y análisis de datos

40 Para estudiar los efectos neuroprotectores de los análogos de GPE, se llevaron a cabo una serie de experimentos *in vitro* usando ácido okadaico para causar lesiones tóxicas a las células neuronales. El ácido okadaico es una toxina reconocida en la técnica que se sabe que causa daño a las neuronas. Además, la recuperación de las células neuronales o la función de las células neuronales después de la lesión por el ácido okadaico se reconoce que es predictiva de las recuperaciones de las lesiones causadas por otras toxinas.

45 Para causar lesiones tóxicas a las neuronas, se expusieron las neuronas a 1:100 partes de ácido okadaico a concentraciones de 30 nM o 100 nM y ácido 3-nitropropiónico 0,5 mM (solo para microexplantes cerebelosos). Se usó GPE (1 nM-1 mM) o G-2-MePE (1 nM-1 mM) a los 8 días *in vitro* (DIV) para cultivos corticales y 9DIV para cultivos estriados. El tiempo de incubación fue de 24 horas. Se determinó la tasa de supervivencia mediante un ensayo de MTT de punto final colorimétrico a 595 nm en un lector de placas de pocillos múltiples. Para los microexplantes cerebelosos, se seleccionaron cuatro ventanas (campo de 0,65 mm²) con la mayor densidad celular y se contaron las células que presentaban excrecencia de neuritas.

Resultados

55 El análogo de GPE G-2-MePE presentó efectos neuroprotectores comparables dentro de los tres sistemas *in vitro* ensayados (**FIG. 12-15**).

Los cultivos corticales respondieron a concentraciones de 10 µM de GPE (**FIG. 12**) o G-2-MePE (10 µM, **FIG. 13**) con 64 % y 59 % de neuroprotección, respectivamente.

60 Los otros 2 tipos de cultivos mostraron neuroprotección a dosis más bajas de G-2-MePE (microexplantes cerebelosos: **FIG. 14** y células estriadas: **FIG. 15**). Las células estriadas demostraron neuroprotección dentro del intervalo de 1 nM a 1 mM de G-2-MePE (**FIG. 15**), mientras que los microexplantes cerebelosos posnatales demostraron neuroprotección con G-2-MePE en el intervalo de dosis de entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 100 nM (**FIG. 14**). Por lo tanto, los presentes inventores concluyen que G-2-MePE es un agente neuroprotector y puede tener efectos terapéuticos en los seres humanos que padecen de trastornos

neurodegenerativos. Dado que G-2-MePE puede ser neuroprotector cuando se administra directamente a las neuronas en cultivo, ese G-2-MePE puede ser eficaz *in vivo* cuando se administre directamente a los cerebros de animales afectados.

5 Ejemplo de referencia 3: Efectos de G-2-MePE sobre las neuronas colinérgicas estriadas en ratas envejecidas

Para determinar si G-2-MePE puede afectar a las neuronas colinérgicas, se estudiaron ratas envejecidas. La colina acetiltransferasa (ChAT) es una enzima que participa en la biosíntesis del neurotransmisor para los nervios colinérgicos, la acetilcolina. Es bien sabido que la inmunodetección de ChAT puede usarse para determinar el número de nervios colinérgicos presentes en un tejido. También se sabe que el número de nervios colinérgicos presentes está asociado con la función fisiológica de las vías neuronales colinérgicas en el cerebro.

En este experimento, se ensayaron los efectos de G-2-MePE sobre el número de neuronas positivas en ChAT en cerebros de ratas de 18 meses de vida.

Métodos

Las ratas macho de 18 meses de vida recibieron uno de los cinco tratamientos. Se trató un grupo de control con vehículo (solución salina sola (n = 4) y cuatro grupos se trataron con una sola dosis de G-2-MePE. Se administraron dosis de 0,012 (n = 4), 0,12 (n = 5), 1,2 (n = 5) y 12 mg/kg (n = 3), respectivamente, por vía subcutánea. Las ratas se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital 3 días después del tratamiento con fármaco. Se perfundieron los cerebros con solución salina normal y paraformaldehído al 4 % y se fijaron en un fijador de perfusión durante la noche. Los cerebros se almacenaron en sacarosa al 25 % en PBS 0,1 M (pH 7,4) hasta que el tejido se hundió. Se realizaron cortes coronales congelados de estriado con un microtomo y se almacenaron en azida de sodio al 0,1 % en PBS 0,1 M a 4 °C. Se estableció la inmunorreactividad para la colina acetiltransferasa (ChAT) mediante tinción usando un método de sección flotante libre. En resumen, se diluyeron los anticuerpos en suero de cabra al 1 %. Se incubaron los cortes en tritón al 0,2 % en PBS/Triton™ 0,1 M a 4 °C. durante la noche antes de tinción inmunohistoquímica. Se trataron previamente los cortes con H₂O₂ al 1 % en metanol al 50 % durante 20 min. A continuación, se incubaron los cortes con anticuerpos anti-ChAT (1:5000) de conejo (Rb) (los anticuerpos primarios) en 4D en un agitador durante dos días. Se lavaron los cortes usando PBS/Triton™ (15 minutos x 3 d) y luego se incubaron con anticuerpos secundarios biotinilados de cabra anti-conejo (1:1000) a temperatura ambiente durante la noche. Se lavaron los cortes y se incubaron en ExtrAvidin™ (Sigma) (1:1000) durante 3 horas y seguido de H₂O₂ (0,01 %) en tetracloruro de 3,3-diaminobencina (DAB, 0,05 %) para producir un producto de reacción coloreado. Se montaron estas secciones en diapositivas recubiertas de alumbre de cromo, se secaron, se deshidrataron y se cubrieron.

Se contaron las neuronas estriadas de ambos hemisferios que presentaron inmunorreactividades específicas correspondientes a ChAT usando un microscopio óptico y una retícula de 1 mm² x 1000. El tamaño de la región estriada usada para el recuento se midió usando un analizador de imágenes. Se compararon los recuentos totales de neuronas/mm² entre los grupos.

Los datos se analizaron usando una prueba t pareada y se presentaron como la media ± ETM. Los resultados se presentan en la FIG. 16.

Resultados

La FIG. 16A muestra que el número de neuronas inmunopositivas en ChAT aumentó en los cerebros de animales tratados con G-2-MePE. Esto indica claramente que la administración de G-2-MePE es eficaz para aumentar el nivel de ChAT en los cerebros de ratas envejecidas. Debido a que ChAT es una enzima implicada en la síntesis del neurotransmisor colinérgico acetilcolina, los presentes inventores concluyen que G-2-MePE puede aumentar la cantidad de transmisor colinérgico en los cerebros de ratas de mediana edad.

Ejemplo de referencia 4: Efectos de G-2-MePE en la memoria de referencia espacial en ratas

Después de haberse demostrado que G-2-MePE puede aumentar la ChAT y, por lo tanto, que tiene el potencial de mejorar la función neuronal colinérgica, a continuación, se examinó si G-2-MePE puede ser útil en el tratamiento de los cambios relacionados con la edad en la cognición y/o la memoria. Por lo tanto, se llevó a cabo una serie de estudios en ratas usando ensayos bien establecidos para la memoria.

Experimento 1: Ensayo del laberinto acuático de Morris

El ensayo del laberinto acuático de Morris es un ensayo ampliamente reconocido para evaluar la memoria de referencia espacial en ratas.

Sujetos

Se usaron ratas macho Wistar de 12, 8 o 4 meses de vida.

5 Métodos

Entorno y aparato de ensayo

El ensayo del laberinto acuático de Morris se realizó usando una piscina de plástico negra llenada hasta una profundidad de 25 cm con agua coloreada de negro con un tinte no tóxico. La piscina tenía una inserción negra circular para que las paredes también parecieran de un negro uniforme. La piscina estaba dividida en cuatro cuadrantes (norte, sur, este y oeste) por dos líneas perpendiculares imaginarias cruzando por el centro de la piscina. Se colocó una plataforma metálica en el centro geográfico del cuadrante SE a 50 cm del borde de la piscina, de modo que quedaba 2 cm por debajo de la superficie del agua e invisible. La plataforma permaneció en esa posición a lo largo del entrenamiento.

El experimento usó pistas fuera del laberinto (es decir, objetos en la sala que rodeaba a la piscina) que las ratas podrían usar para navegar a la plataforma. Se colgaron carteles o cuadros distintivos en las paredes. Los muebles de la sala no se movieron durante el período de ensayo. La colocación de la piscina permitió al experimentador un fácil acceso a la misma desde todos los lados. La piscina se vació y rellenó diariamente durante el ensayo, con agua a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El punto más lejano del estanque (relativo a la posición del experimentador) fue designado como "norte", y los otros puntos de la brújula "este", "sur" y "oeste" eran los puntos más a la derecha, al fondo y a la izquierda de la piscina, respectivamente. Se marcaron estos puntos con cinta en el exterior de la piscina.

Fase de adquisición

Las ratas de cada grupo fueron entrenadas para nadar hasta la plataforma sumergida. Las ratas recibieron seis ensayos de 60 segundos al día durante cuatro días consecutivos. Un ensayo comenzó colocando a la rata en el agua frente a la pared de la piscina, en uno de los cuatro lugares de inicio (norte, sur, este, oeste). La secuencia de ubicaciones iniciales se seleccionó pseudoaleatoriamente, de modo que la ubicación inicial de cualquier ensayo dado fue diferente de la del ensayo anterior, y no se usó ninguna ubicación inicial más de dos veces durante el entrenamiento diario. Se usó la misma secuencia de ubicaciones para todas las ratas en un día dado, pero varió entre los días. El ensayo terminó cuando la rata hubo encontrado la plataforma, o a los 60 segundos, lo que ocurriera primero. Los ensayos fueron cronometrados con un cronómetro. Si la rata encontraba la plataforma, se le dejaba permanecer allí durante 15 segundos antes de ser retirada a un recipiente de contención. Si no encontraba la plataforma, la rata era guiada manualmente y colocada en la plataforma durante 15 segundos. El intervalo entre ensayos era de 60 segundos. El recipiente de contención estaba cubierto para reducir al mínimo cualquier interferencia entre ensayos. Al completar el ensayo diario para una rata, el animal era secado con una toalla y colocado bajo la lámpara de calor en el recipiente de mantenimiento hasta que se secara. Se obtuvo el tiempo necesario para localizar la plataforma (latencia, segundos) para cada rata en cada ensayo de entrenamiento. Si la rata no encontraba la plataforma en un ensayo dado, su puntuación de latencia era la duración máxima de ese ensayo (60 segundos).

Tratamiento farmacológico

Tres días después de la finalización de la fase de adquisición, se implantaron bombas mini-osmóticas (Alzet) por vía subcutánea bajo anestesia con halotano) para dispensar el fármaco o el vehículo de manera continua durante 1 o 3 semanas. Al completarse la infusión, se retiraron las bombas y se volvieron a suturar las heridas.

Los 5 grupos de tratamiento eran:

1. solución salina, 1 semana (n era originalmente 7, pero se excluyó una rata que perdió peso rápidamente y más tarde se encontró que tenía un tumor pituitario);
2. solución salina, 3 semanas (n = 8);
3. baja dosis de G-2-MePE (0,96 mg/día), 1 semana (n = 8);
4. baja dosis de G-2-MePE (0,96 mg/día), 3 semanas (n = 8);
5. alta dosis de G-2-MePE (4,8 mg/día), 3 semanas (n = 7).

Las ratas de control de cuatro (n = 3) y ocho (n = 9) meses no recibieron tratamiento con fármaco. Las ratas de 12 meses de vida se asignaron a uno de los cinco grupos basándose en sus tiempos de natación durante la adquisición, de manera que los grupos eran aproximadamente equivalentes en su rendimiento medio antes de recibir cualquier fármaco.

Fase de retención (memoria de referencia)

Se ensayó la capacidad de las ratas para recordar o volver a aprender la ubicación original de la plataforma cuatro semanas después del entrenamiento original. Esto significa que el fármaco residual se habría retirado por lavado durante un mínimo de 7 días en el caso de las bombas de 3 semanas y de 21 días en el caso de las bombas de 1 semana. El procedimiento de ensayo de retención fue idéntico al de adquisición. Los estudios farmacocinéticos indican que la concentración en plasma de G-2-MePE administrado por vía subcutánea aumentó hasta un pico y luego disminuyó con un patrón cinético aproximadamente de primer orden, con una semivida en plasma ($t_{1/2}$) de entre aproximadamente 30 y 60 minutos. Por lo tanto, cuando se realizó el estudio de retención, al menos 7 días después de la retirada de las minibombas que contenían G-2-MePE, casi todo el G-2-MePE se había eliminado de la circulación de los animales.

Análisis de datos

Se registró la latencia de nado para cada rata para cada ensayo para cada día de las fases de adquisición y retención, y se examinaron los cambios entre las fases usando un análisis de varianza.

Se compararon el vehículo de 3 semanas y la dosis alta de G-2-MePE de 3 semanas en la adquisición y retención. La dosis alta de G-2-MePE, administrada durante 3 semanas, mejoró la retención de la tarea del laberinto acuático original después de un retraso de 4 semanas.

Resultados

La **FIG. 17** muestra la comparación entre las ratas envejecidas tratadas con una dosis alta (4,8 mg/día) de G-2-MePE y tratadas con dosis baja (0,96 mg/día) y las ratas envejecidas tratadas con solución salina, con los controles de ratas jóvenes (4 meses) usados como controles. Antes del tratamiento con G-2-MePE, no había diferencias entre los grupos de edad (12 meses). Por el contrario, los animales de 4 meses requerían menos tiempo para llegar a la plataforma que los animales más mayores. Después de un período de 3 semanas de ausencia de ensayo, durante el que se administró solución salina o G-2-MePE, los animales que recibieron solución salina solamente no mostraron una mejor capacidad para alcanzar la plataforma, como se indica en los tiempos similares requeridos el día 4 del ensayo de la fase de adquisición y el día 1 del ensayo de la fase de retención. Por el contrario, los animales que recibieron tratamiento con G-2-MePE a dosis alta o baja, habían mejorado la memoria como se refleja en una disminución en el tiempo necesario para llegar a la plataforma en comparación con los controles tratados con solución salina. Además, los animales tratados con G-2-MePE tuvieron un rendimiento similar al de los animales jóvenes de 4 meses de vida (FIG. 17) y los animales de 8 meses de vida (datos no mostrados). Por lo tanto, los presentes inventores concluyen que G-2-MePE puede mejorar la memoria en las ratas de mediana edad que hayan demostrado anteriormente deficiencias de memoria en relación con las ratas jóvenes. Además, debido a que en el momento de volver a realizar el ensayo, el G-2-MePE se había lavado de la circulación, se concluye que los efectos potenciadores de la memoria de G-2-MePE probablemente se debieron a la mejora en la función de las neuronas colinérgicas.

Experimento 2: Ensayo del laberinto radial de 8 brazos

Cinco meses después del experimento original, se volvieron a ensayar las ratas, que en ese momento tenían 17 meses, para determinar la memoria de trabajo espacial en un laberinto de brazo radial.

Métodos**Aparatos**

El aparato consiste en una plataforma central que se comunica con 8 brazos idénticos, cada uno con una taza de comida al final del brazo.

Procedimiento de ensayo

Las ratas fueron parcialmente privadas de comida durante al menos 10 días antes y durante todo el procedimiento de laberinto radial.

Se montó el laberinto y se colocó de manera que el experimentador pudiera observar claramente el comportamiento de las ratas desde un lugar predeterminado. El experimentador numeró los brazos del laberinto de acuerdo con su orientación de uno a ocho en el sentido de las agujas del reloj.

Entrenamiento previo (previo al fármaco)

El primer día, se introdujeron las puertas en los brazos y se confinó cada rata en la plataforma central con 20 microgránulos de alimento durante 5 minutos. Esto continuó una vez al día durante cuatro días, y se observó que

5 todas las ratas consumían algunos de los microgránulos. Al día siguiente, se permitió a las ratas que exploraran durante cinco minutos por todo el laberinto. Todos los brazos fueron cebados con dos microgránulos de comida en la copa de comida ubicada al final de cada brazo, y un microgránulo en la entrada y en la mitad de cada brazo. Esto se repitió durante al menos cinco, pero hasta ocho días para que las ratas que exploraran menos de los ocho brazos en dos sesiones consecutivas. Todas las ratas tuvieron una sesión final el noveno día de entrenamiento previo. En este momento, se decidió que una de las ratas viejas que solo había entrado en un brazo de los ocho los nueve días se debía excluir de los futuros ensayos en este procedimiento. El resto de las ratas se incluyó independientemente de la cantidad de exploración que realizaron en el entrenamiento previo. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de ratas viejas en el número de brazos en el que entraron en la sesión final de entrenamiento previo (Fármaco: $F(2,31) = 0,44$, $p = 0,65$).

Tratamiento farmacológico

15 30 días antes del ensayo (cinco días después del entrenamiento previo), se implantaron en las 17 ratas macho Wistar de un mes de vida (bajo anestesia con halotano) bombas miniosmóticas subcutáneas (Alzet) para dispensar el fármaco de manera continua durante 3 semanas. Al completarse la infusión, se retiraron las bombas y se suturaron las heridas (se permitió el lavado de 9 días).

Los grupos de tratamiento fueron:

1. controles jóvenes (4 meses), $n = 6$;
2. solución salina, $n = 10$;
3. baja dosis de G-2-MePE (2,4mg/kg/día), $n = 13$;
4. alta dosis de G-2-MePE (12,4mg/kg/día), $n=5$.

Los grupos de solución salina y de dosis baja se componen de todas las ratas que recibieron los tratamientos en la fase 1 de este experimento (cuando las ratas tenían 12 meses) independientemente de si tenían el tratamiento de una o de tres semanas. Se retiró una rata de cada uno de los grupos de solución salina y dosis altas debido a tumores de piel. Una de las ratas de dosis baja no participó en este experimento debido al hecho de que no pudo ser entrenada previamente (véase más adelante).

Ensayo (posterior al fármaco)

El ensayo de memoria de trabajo comenzó el noveno día de lavado. Las ratas recibieron 10 sesiones diarias de entrenamiento durante 12 días. El procedimiento fue el mismo que para el entrenamiento previo, pero solo se cebaron las tazas de comida. Las ratas tenían 6 minutos para hacer hasta 16 elecciones de visita de cualquiera de los ocho brazos. Se consideraba elección el tener las cuatro patas dentro de un brazo. El experimentador registró la secuencia de las entradas en los brazos con papel y lápiz. Las sesiones se terminaron después de que hubieran entrado en los ocho brazos, se hubieran realizado 16 elecciones o hubieran transcurrido 6 minutos. Se registró el tiempo necesario para entrar en los ocho brazos, cuando esto ocurrió.

Análisis de datos

Una elección de brazo se consideró correcta cuando la rata entró en un brazo no visitado previamente. El rendimiento se clasificó diariamente de acuerdo con los siguientes parámetros:

- 1) Elección Correcta (EC): 8-12 es el número de elecciones correctas hechas dividido entre el número total de elecciones hechas. Para los animales que no visitaron los 8 brazos en un ensayo, se considera que el denominador de esta proporción es 12;
- 2) Elección Correcta de Trabajo (ECT): 8-12 es la medida a partir de la que se derivan los datos de la memoria de trabajo. Los datos se recogieron como se describe para la EC 8-12 anterior, pero para este parámetro, solo se incluyeron las ratas que entraron en los 8 brazos en una sesión.

Las ratas que hicieron menos de 8 entradas de brazo no se usaron para determinar la memoria de trabajo, porque no podían recordar qué brazos habían visitado anteriormente y, por lo tanto, tenían la memoria tan dañada que no podían completar el ensayo, en oposición con los animales que, por cualquier razón, no exploraron el laberinto.

Resultados

EC8-12: hubo una mejora general de todos los grupos a lo largo de los 10 días ($F(9,324) = 4,01$, $p < 0,0001$), pero no hubo efecto significativo de grupo ($F(3,36) = 1,19$, ns) ni interacción entre Grupo y Días ($F(27,324) = 1,05$, ns) (datos no mostrados).

ECT8-12: La **FIG. 18A** muestra el perfil de adquisición de acuerdo con la calificación ECT8-12 a lo largo de los 10 días de ensayo. Hubo un efecto significativo de Grupo ($F(3,12) = 4,27$; $p = 0,029$) and Días ($F(9,108) = 2,09$, $p = 0,036$), pero la interacción entre estos factores no fue significativa ($F(27,108) = 1,06$, ns). El grupo de dosis alta de

G-2Me-PE mostró la mayor mejora a lo largo de los días, seguido por los controles jóvenes. Hubo muy poca diferencia entre la dosis baja de G-2Me-PE y la solución salina.

La **FIG. 18B** muestra los resultados que indican que las ratas expuestas a la dosis más alta de G-2-MePE ($n = 5$) habían hecho entradas más correctas para obtener los microgránulos de comida en comparación con las ratas tratadas con vehículo (* $p < 0,05$, $n = 10$). Los presentes inventores concluyen a partir de este estudio que G-2-MePE mejora la memoria espacial en ratas envejecidas.

Ejemplo de referencia 5: G-2-MePE aumenta la proliferación de neuroblastos y reduce los astrocitos en los cerebros de ratas envejecidas

Debido a que la degeneración neuronal puede dar lugar a una reducción del número de neuronas, un objetivo terapéutico deseable es aumentar el número de neuronas en el cerebro. Las neuronas se derivan de los neuroblastos, una célula menos diferenciada que una neurona, pero dentro del linaje neuronal. Por lo general, un neuroblasto se expone a condiciones que lo hacen madurar en un fenotipo maduro, teniendo un soma definido, procesos neuronales (axones y dendritas) y, en última instancia, haciendo conexiones con otras neuronas (por ejemplo, sinapsis). Por lo tanto, la medición de la proliferación neuroblástica se ha convertido en un marcador temprano bien conocido para la proliferación de las células nerviosas. Así pues, la detección de un aumento en la proliferación neuroblástica inducida por un agente farmacéutico es un método aceptado para predecir el crecimiento de las células neuronales en animales. Debido a que las ratas y los seres humanos comparten mecanismos similares en la proliferación de las células neuronales, la detección de cambios en la proliferación neuroblástica en ratas *in vivo* es predictiva de efectos similares en seres humanos.

También se sabe que un correlato histológico de la función cognitiva deteriorada es un aumento en el número de células astrocíticas en el cerebro de los animales afectados. Por lo tanto, para determinar si G-2-MePE podría ser útil en la estimulación de la proliferación neuroblástica y en el tratamiento de la astrocitosis, se llevó a cabo una serie de estudios en ratas envejecidas.

Métodos y materiales

Inmunohistoquímica

Para llevar a cabo estos estudios, se fijaron e introdujeron los tejidos en parafina, y se obtuvieron cortes usando métodos convencionales. Se realizaron cortes coronales (6 μ m) que contenían el nivel del hipocampo y se montaron sobre portaobjetos recubiertos con alumbre de cromo para la tinción. Se desparafinaron los cortes en xileno, se deshidrataron en una serie de etanol y se incubaron en solución salina tamponada con fosfato 0,1 M (PBS).

Se usaron anticuerpos primarios contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y el antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA) para marcar las células gliales reactivas y las células sometidas a apoptosis y proliferación, respectivamente. Para el desenmascaramiento del antígeno (tinción con caspasa-3 y PCNA), se calentaron los cortes en tampón de citrato de sodio 10 mM (pH 6,0) durante 1 min a potencia elevada. Todos los cortes se pretrataron con H_2O_2 al 1 % en metanol al 50 % durante 30 min para detener la actividad de la peroxidasa endógena. Después se aplicó suero de caballo normal al 1,5 % o suero de oveja normal al 2,5 % en PBS durante 1 h a temperatura ambiente para bloquear la tinción inespecífica de fondo. A continuación, se incubaron los cortes con los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo anti-GFAP de ratón monoclonal (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU. diluido 1:500); anticuerpo anti-PCNA de ratón (DAK, A/S, Dinamarca, diluido 1:100). Tras la incubación con anticuerpos primarios a 4 °C durante 2 d (excepto para la tinción con PCNA, que se incubaron durante toda la noche), se incubaron los cortes con anticuerpo secundario de caballo anti-ratón o anticuerpo secundario de cabra anti-conejo biotinilados (1:200, Sigma) a 4 °C durante la noche. Se aplicó el ExtrAvidin™ (Sigma, 1:200), que se había preparado 1 h antes de su uso, durante 3 h a temperatura ambiente y después se hizo reaccionar en 3,3-diaminobencidina (DAB) al 0,05 % y PBS para producir un producto de reacción de color marrón. Se deshidrataron los cortes en una serie de alcoholes hasta xileno y se cubrieron con un medio de montaje.

Se realizó tinción inmunohistoquímica en muestras cerebrales tomadas de grupos de control y tratados con G-2-MePE de ratas jóvenes (4 meses de vida), de mediana edad (9 meses) y envejecidas (18 meses).

Los cortes de control se procesaron de la misma manera a excepción de la omisión del anticuerpo primario de la solución de incubación. Se contó el número de células positivas en PCNA en la zona subventricular y se puntuaron las células positivas en GFAP en la corteza cerebral.

Experimento 1: el G-2-MePE estimula la proliferación neuroblástica en cerebros de ratas envejecidas

La zona subventricular (SVZ) y el giro dentado (DG) son dos regiones cerebrales que albergan la neurogénesis adulta. Se ha informado que la reducción de la neurogénesis tanto en la SVZ como en la DG está relacionada con la disminución de la memoria con el envejecimiento, y los efectos del factor de crecimiento nervioso y el factor de crecimiento epidérmico en la mejora de la memoria se deben al aumento de la proliferación de progenitores de la

SVZ. Usando PCNA como un marcador de la proliferación celular, se examinó la proliferación celular en la SVZ mediante el recuento del número de células que son positivas en PCNA. En los animales seleccionados, al menos algunas de las células proliferantes se identificaron como neuroblastos, pues se tiñeron con el agente específico de las células neuronales, la doblecortina.

Se trataron ratas macho de 18 meses de vida por vía intraperitoneal con una sola dosis de G2-MePE (dosis de 0, 0,012, 0,12, 1,2, 12 mg/kg). Los cerebros se recogieron 3 días después de los tratamientos y se realizó la tinción inmunohistoquímica de PCNA y GFAP. Se contó el número de células positivas en PCNA en la SVZ y después se calculó la media del número de células como células/mm dependiendo de la longitud de la pared del ventrículo usada para el recuento (**FIG. 19A**). El grupo tratado con la dosis más alta (12 mg/kg, $n = 5$) mostró un aumento significativo en el número de células positivas en PCNA en comparación con el grupo tratado con vehículo ($*p < 0,05$, $n = 7$). Los datos indicaron un efecto dependiente de la dosis de G-2PE en la mejora de la neurogénesis.

El marcaje doble de fluorescencia indicó la ubicación conjunta de PCNA y la doblecortina, un marcador de neuroblastos. La **FIG. 19B** es una fotografía de una parte del cerebro de una rata que muestra un aumento en PCNA (verde, $\times 20$) y doblecortina (rojo, $\times 20$) en la rata tratada con la dosis más alta de G-2-MePE (panel derecho) en comparación con rata tratada con vehículo (panel izquierdo). Los dos marcadores se situaron conjuntamente de manera clara (**FIG. 19B**, foto, $\times 100$). Los presentes inventores concluyen que G-2-MePE puede estimular la proliferación de las células cerebrales, incluyendo los neuroblastos. Debido a que los neuroblastos son células precursoras de neuronas, se concluye además que G-2-MePE puede aumentar la población de neuronas en los cerebros de los animales tratados con el compuesto de la presente invención.

Experimento 2: el G-2-MePE estimula la proliferación neuroblástica en la SVZ de cerebros de ratas de mediana edad

Se estudiaron los efectos de G-2-MePE (1,2 mg/kg) en un grupo de ratas de mediana edad de 9 meses de vida. Se administró G-2-ePE (1,2 mg/kg) o vehículo por vía intraperitoneal (i.p.). Se examinó la proliferación de células en la SVZ 3 días después del tratamiento usando tinción inmunohistoquímica con PCNA. La **FIG. 19C** muestra un aumento significativo del número de células positivas en PCNA después del tratamiento de G-2-MePE ($**p < 0,005$, $n = 4$). Debido a que algunas de las células proliferantes teñidas con PCNA se identificaron como neuroblastos (véase el Experimento 1 anterior), los presentes inventores concluyen que G-2-MePE puede estimular la proliferación neuroblástica en cerebros de rata de mediana edad.

Experimento 3: Astrocitosis en el envejecimiento de los cerebros

La creciente evidencia sugiere que la disfunción de los astrocitos en edad avanzada puede desencadenar la inflamación, lo que conduce a una mayor degeneración neuronal. Se ha informado mucho de la regulación positiva de los astrocitos activados, y está estrechamente asociada con la disminución de la memoria con el envejecimiento, tal vez a través de la depresión de la neurogénesis endógena.

Usando GFAP como marcador de astrocitos reactivos, se contó el número de células positivas en GFAP en la subregión CA4 del hipocampo de ratas envejecidas tratadas con G-2MeP o vehículo. Se encontró un aumento significativo en los astrocitos reactivos en el hipocampo de animales de envejecidos (**Figura 20A**), y en la corteza cerebral. Algunos de los astrocitos se asociaron con capilares (**Figura 20B** foto, flechas) en ratas envejecidas en comparación con ratas jóvenes ($*p < 0,01$) y de mediana edad ($*p < 0,01$).

Como parte del componente vascular, los astrocitos positivos en GFAP también desempeñan un papel en la angiogénesis (**FIG. 20B**, flechas), que también contribuyen a la respuesta inflamatoria en los cerebros. Por lo tanto, los astrocitos GFAP elevados observados en cerebros envejecidos pueden indicar una etapa crónica de degeneración cerebral.

Experimento 4: G-2-MePE reduce la astrocitosis en los cerebros envejecidos

También se evaluaron los efectos de G-2-MePE en la astrocitosis en la subregión CA4 del hipocampo en ratas envejecidas. Se asignaron ratas Wistar macho de 18 meses de vida a los 5 grupos de tratamiento siguientes: vehículo, 0,12 mg/kg/día, 0,12, 1,2 y 12 mg/kg/día (cada uno $n = 6$).

Se contaron las células positivas en GFAP usando un programa computarizado (Discovery 1). Los resultados se muestran en las **FIG. 20C** y **20D**. Se administró G-2-MePE por vía intraperitoneal y se evaluó el número de células positivas en GFAP 3 días después de la inyección. Usando un sistema de puntuación visual (0 = sin astrocitos, 1 = pocos astrocitos, 2 < 50 %, 3 > 50 %), se estimó el número de astrocitos en 5 regiones corticales diferentes.

El tratamiento con G-2-MePE redujo el número de astrocitos reactivos en la región CA4 del hipocampo en comparación con el grupo tratado con vehículo (**FIG. 20C**; $*p < 0,05$), en particular, los grupos tratados con dosis de 0,12 y 12 mg/kg. Se observó un efecto similar para G-2-MePE en la corteza cerebral (**FIG. 20D**).

Normalmente, hay pocos astrocitos positivos en GFAP situados en la capa profunda de la corteza de los cerebros de rata, y los que hay, por lo general, están en estrecha asociación con las pistas de materia blanca. Sin embargo, los presentes inventores han encontrado que había células positivas en GFAP en la capa media de la corteza, estrechamente asociada con los vasos sanguíneos.

Los resultados de los estudios presentados en el presente documento indican que el envejecimiento se asocia con varios cambios en el cerebro. En primer lugar, hay una pérdida dependiente de la edad de la memoria y de la función cognitiva. En segundo lugar, hay un aumento dependiente de la edad de los astrocitos. Todos estos hallazgos en la rata son consecuentes entre sí y con las funciones conocidas de los nervios colinérgicos en el mantenimiento de la función cognitiva y la memoria en animales de experimentación y en seres humanos.

Inesperadamente, los presentes inventores encontraron que un análogo de GPE, el G-2-MePE, administrado a animales envejecidos revierte al menos parcialmente todos los cambios anteriores asociados con la edad. En primer lugar, G-2-MePE aumenta la cantidad de ChAT presente en las células cerebrales de los animales expuestos a las neurotoxinas ácido okadaico o 3-NP. Este efecto de G-2-MePE imitó el de un agente neuroprotector bien conocido, el GPE. Estos efectos se observaron en células corticales, células cerebelosas y en células estriadas, lo que indica que los efectos se generalizaron en diferentes partes del cerebro. En segundo lugar, G-2-MePE aumentó ChAT en el estriado, lo que indica que las neuronas colinérgicas son sensibles a G-2-MePE. Estos cambios químicos e histológicos observados fueron paralelos a cambios en el comportamiento. Los animales envejecidos tratados con G-2-MePE presentaron una mejora en la memoria en dos sistemas de ensayo bien conocidos en comparación con los controles tratados con vehículo. A continuación, G-2-MePE indujo la proliferación neuroblástica en cerebros envejecidos. Por último, el tratamiento con G-2-MePE invirtió el aumento de los astrocitos observado en el hipocampo y en la corteza de los cerebros envejecidos. Los efectos de G-2-MePE no se debieron a los efectos agudos del agente; porque en muchos de los estudios citados en el presente documento, había transcurrido suficiente tiempo desde el cese de la administración del fármaco hasta el ensayo, siendo probable que hubiera poco o ningún fármaco presente.

Ejemplo de referencia 6: Comparación de la farmacocinética de GPE y G-2-MePE

El fin de estos estudios era comparar los perfiles farmacocinéticos de GPE y G-2-MePE en animales *in vivo* usando métodos farmacocinéticos convencionales.

Métodos

Para determinar la farmacocinética de GPE y G2MePE, se usaron ratas Wistar macho adultas que pesaban entre 180 y 240 g. Para facilitar las inyecciones intravenosas en bolo y el muestreo de sangre, se implantaron en todas las ratas quirúrgicamente una cánula venosa yugular permanente bajo anestesia con halotano tres días antes del experimento. A los grupos de seis ratas, se les administró una sola inyección intravenosa en bolo de 30 mg/kg de GPE o 10 mg/kg de G2MePE disueltos en tampón succinato 0,1 M (pH 6,5). Se recogieron muestras de sangre (aproximadamente 220 µl de cada una) en tubos heparinizados que contenían cóctel de inhibidor de proteasa Sigma para tejidos de mamífero a los 10 y 0 minutos antes de la inyección de GPE o G2MePE, y 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 min después de la inyección de GPE o G2MePE. Las muestras se centrifugaron a 3.000 g durante 15 min a 4 °C y se retiró el plasma y se almacenó a -80 °C hasta su extracción y ensayo mediante radioinmunoensayo (RIA) o HPLC de fase inversa. Los métodos de RIA y HPLC usados fueron convencionales.

La eliminación de fármacos después de una sola inyección en bolo intravenoso resultó ser un proceso de primer orden siguiendo la ecuación $C = C_0 e^{-kt}$, donde C representa la concentración de fármaco en cualquier punto de tiempo, C_0 es la concentración cuando el tiempo (t) es igual a cero y k es la constante de velocidad de primer orden expresada en unidades de concentración por hora. Se calcularon la k y la semivida ($t_{1/2}$) a partir de la pendiente de la línea de regresión lineal en la fase de eliminación del diagrama semilogarítmico de la concentración en plasma frente al tiempo como: $\log C = -kt/2,3 + \log C_0$. Los resultados se expresaron como la media ± error típico.

Resultados

La FIG. 21 muestra un gráfico de las concentraciones en plasma *in vivo* de GPE y G-2-MePE después de la inyección intravenosa (i.v.). Los cuadrados rellenos representan concentraciones de GPE en cada punto de tiempo, y los triángulos rellenos representan concentraciones de G-2-MePE en cada punto de tiempo.

Las concentraciones en plasma de GPE y G-2-MePE se aumentaron notablemente en 1 minuto después de la inyección. Después de la inyección de 30 mg/kg de GPE, se observó una concentración máxima de $40,0 \pm 10,8$ mg/ml. Las concentraciones en plasma de GPE disminuyeron luego rápidamente de acuerdo con un proceso cinético de primer orden. Se encontró que la constante de velocidad de primer orden para GPE era de $0,15 \pm 0,014$ ng/ml/min, se encontró que $t_{1/2}$ era $4,95 \pm 0,43$ min y se encontró que la eliminación estimada de GPE del plasma era de $137,5 \pm 12,3$ ml/hora.

Tras la inyección de 10 mg/kg de G-2-MePE, se encontró que la concentración máxima era de $191 \pm 16,1$ mg/ml. Las concentraciones en plasma de G-2-MePE se redujeron luego de acuerdo con un proceso cinético de primer orden. Se encontró que la constante de velocidad de primer orden para G-2-MePE era de $0,033 \pm 0,001$ ng/ml/min, se encontró que $t_{1/2}$ era de $20,7 \pm 0,35$ min y la eliminación estimada era de $30,1 \pm 0,5$ ml/h.

Tras la inyección, la concentración en plasma máxima de G-2-MePE era aproximadamente 4,8 veces mayor que la concentración en plasma máxima de GPE, a pesar de la mayor dosis de GPE suministrada (30 mg/kg) en comparación con la dosis de G-2-MePE administrada (10 mg/kg).

El hallazgo de mayores concentraciones en plasma de G-2-MePE que de GPE en todos los puntos temporales inferiores a 125 minutos, a pesar de una menor dosis administrada de G-2-MePE, fue totalmente inesperado basándose en las concentraciones en plasma conocidas de GPE. $t_{1/2}$ para G-2-MePE fue más de 4 veces superior que $t_{1/2}$ para GPE.

El hallazgo de un aumento de la semivida de G-2-MePE en comparación con el de GPE fue completamente inesperado basándose en la $t_{1/2}$ de GPE. El aumento de $t_{1/2}$ de G-2-MePE significa que el G-2-MePE se elimina más lentamente de la circulación. Este hallazgo es totalmente inesperado basándose en la tasa de eliminación de GPE..

Los presentes inventores concluyen de estos estudios que G-2-MePE es un potente agente capaz de revertir muchos de los efectos adversos del envejecimiento en el cerebro de los animales, incluyendo los seres humanos. Por lo tanto, los análogos de GPE, incluyendo el G-2-MePE, pueden producir efectos terapéuticos deseables, incluyendo neuroprotección, mejora de la memoria, aumento de la proliferación neuroblástica y reducción de la astrocitosis, y pueden ser valiosos para revertir o mitigar los efectos adversos del envejecimiento en seres humanos.

Aunque la presente invención se ha descrito en términos de ciertas realizaciones preferidas, será evidente para el experto habitual en la materia teniendo en cuenta ese conocimiento y la presente divulgación que se pueden preparar y administrar equivalentes del compuesto de la presente invención para las condiciones descritas en la presente solicitud, y que todos estos equivalentes pretenden estar incluidos dentro de las reivindicaciones de la presente solicitud.

Ejemplo de referencia 7: Tratamiento del síndrome de Rett I

Modelo de los efectos de G-2-MePE sobre el tiempo de vida y la potenciación a largo plazo en el síndrome de Rett (RTT)

Para determinar si el tratamiento con G-2-MePE puede afectar el desarrollo y a la progresión del Síndrome de Rett en un modelo murino del trastorno, se usaron ratones hemicigóticos MeCP2(1lox) macho. El sistema de ratón con desactivación de MeCP2 (MeCP2-KO) es ampliamente aceptado en la técnica, pues imita estrechamente el intervalo y la gravedad de las anomalías fisiológicas y neurológicas características del trastorno humano, el síndrome de Rett.

Todos los experimentos se realizaron en el Centro Médico Southwestern de la Universidad de Texas, y fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales del Centro Médico Southwestern de la Universidad de Texas. G-2-MePE fue sintetizado por Albany Molecular Research Inc. (Albany, NY) y suministrado por Neuren Pharmaceuticals Limited.

Métodos

Tratamiento

Se trataron ratones machos hemicigóticos MeCP2 (1lox) con 20 mg/kg/día de G-2-MePE o solución salina, (BSA al 0,01 %, n = 15 por grupo en el experimento de supervivencia y n = 20 en el experimento de LTP). Los tratamientos se administraron por vía intraperitoneal a partir de las 4 semanas después del nacimiento. Para los experimentos de supervivencia, el tratamiento se mantuvo a lo largo del experimento. Para el experimento de LTP, los ratones se trataron hasta la semana 9, cuando se usaron para la preparación de los cortes.

Supervivencia

Los ratones mutantes deficiente en MeCP2 desarrollan síntomas de RTT a las 4-6 semanas de vida y mueren entre 10-12 semanas (Chen *et al.*, 2001. *Nat Genet* 27: 327-331). Se comparó la supervivencia de los controles de tipo silvestre y los animales deficientes en MeCP2 en los grupos tratados con vehículo y con G-2-MePE. La supervivencia se midió semanalmente desde el inicio del tratamiento (4 semanas), y se usó para producir curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para mostrar la proporción de ratones que sobrevivieron (eje y) en cada intervalo semanal (eje x) (véase la **FIG. 22**).

Potenciación a largo plazo (electrofisiología)

Se ha informado anteriormente que los ratones deficientes en MeCP2 padecen disfunción sináptica funcional y ultraestructural, deterioro significativo de la memoria dependiente del hipocampo y potenciación a largo plazo del hipocampo (LTP) (Ivloretti *et al.*, *The Journal of Neuroscience*. 2006, 26(1):319-327). Para ensayar los efectos del tratamiento con G-2-MePE sobre la función sináptica en el modelo de RTT, se comparó el LTP del hipocampo en animales tratados con vehículo y con G-2-MeP a las 9 semanas de vida. Para ello, se midió la pendiente de fEPSP como un % del potencial inicial en las neuronas deficientes en MeCP2 tratados con solución salina o G-2-MePE (FIG. 23).

Resultados

La FIG. 22 muestra que el tratamiento con G-2-MePE aumentó la supervivencia de los ratones deficientes en MeCP2. Los ratones de tipo silvestre (línea superior) son animales de control y, por tanto, su supervivencia fue del 100 % en cada punto de tiempo. Los ratones deficientes en MeCP2 tratados con solución salina solo murieron mucho más rápidamente (línea punteada) que los ratones de tipo silvestre, de manera que, en aproximadamente 11 semanas, solo sobrevivió el 50 % de los ratones deficientes en MeCP. Sin embargo, en sorprendente contraste, los presentes inventores encontraron inesperadamente que los ratones deficientes en MeCP2 tratados con G-2-MePE sobrevivieron sustancialmente más tiempo que los ratones tratados con solución salina. A las aproximadamente 15 semanas, el 50 % de los animales sobrevivió. Los datos presentados inicialmente mostraron que los ratones con MeCP2 se vieron afectados en términos de supervivencia de manera que el 50 por ciento de los animales murió en 11 semanas en el caso de los no tratados. Los animales tratados con G-2-MePE mostraron una mejor supervivencia, y el 50 % murió a las 16 semanas. En este estudio, los datos de longevidad se vieron comprometidos por procedimientos veterinarios incoherentes, tales como el no limar los dientes de los ratones de forma sistemática - un requisito en los ratones *mecp2* sin reconocer al inicio del experimento. Una consecuencia fue la observación de muertes tempranas de los animales no relacionadas con el síndrome de Rett (particularmente en el grupo de control). El nuevo examen de los datos demostró que el efecto del G-2-MePE persistió cuando se volvió a reanudar el grupo de control, aunque la diferencia en los grupos fue menor (tiempo hasta el 50 por ciento de mortalidad 13,5 semanas en los controles, 16 semanas en el animales tratados con G-2-MePE). No se plantearon problemas de seguridad con el tratamiento con G-2-MePE de los ratones *mecp2*.

Estos resultados demostraron que G-2-MePE puede aumentar sustancialmente la supervivencia de los ratones deficientes en MeCP2. Debido a que los ratones deficientes en MeCP2 son predictivos de la patología y la eficacia terapéutica en seres humanos con síndrome de Rett, los presentes inventores concluyen que G-2-MePE puede aumentar la vida de los seres humanos con síndrome de Rett.

La FIG. 23 muestra los resultados de nuestros estudios para determinar si el tratamiento con G-2-MePE aumentó la potenciación a largo plazo del hipocampo (LTP) medida por la pendiente de fEPSP en animales deficientes en MeCP2 en comparación con los ratones mutantes tratados con solución salina. Como se muestra en la FIG. 23, los presentes inventores encontraron inesperadamente que G-2-MePE aumentó la pendiente de fEPSP en los ratones deficientes en MeCP2 en comparación con los animales tratados solo con solución salina.

Estos resultados demostraron que G-2-MePE puede ser eficaz en el tratamiento de los ratones deficientes en MeCP2 *in vivo*. Debido a que los ratones deficientes en MeCP2 son predictivos de la patología y la eficacia terapéutica en seres humanos con el síndrome de Rett, los presentes inventores concluyen que G-2-MePE puede ser un tratamiento eficaz para las personas con síndrome de Rett.

Ejemplo de referencia 8: G-2-MePE mejora la arborización dendrítica y aumenta la longitud de la espina dendrítica

Se evaluaron los efectos del tratamiento con G-2-MePE en las dendritas. Se administró a ratones transgénicos con desactivación de *mecp2* (n = 15 a 20) se G-2-MePE por vía intraperitoneal a una dosis de 20 mg/kg una vez al día. Tras el sacrificio, se examinaron la densidad de la espina dendrítica, la longitud de la espina y la arborización después de la tinción de Golgi tras nueve semanas, según la siguiente Tabla 1:

Tabla 1: Tamaño de la muestra para todos los análisis morfológicos de las neuronas y de la espina

Análisis	EDAD (Semanas)	MACHO		Tamaño de muestra (número medio de neuronas o dendritas por animal)	
		Tamaño de muestra (n.º de ratones)		KO-vehículo	KO-NNZ-G- 2MePE
Morfología de las neuronas	9	3	3	4	4
Análisis de espina	9	3	3	10	10

Se evaluó la longitud dendrítica por la distancia del soma de las neuronas CA1 del hipocampo representativas de ratones mutantes nulos para *mecp2* macho de 9 semanas tratados con solución salina (3 neuronas analizadas de 3 ratones separados, $n = 9$) o G-2-MePE (20 mg/kg i.p. 1/día, a partir de la semana 4, 3 neuronas analizadas de 3 ratones separados, $n = 9$).

Se observó que G-2-MePE mejoró la arborización dendrítica y aumentó la longitud de la espina dendrítica. La **FIG. 24** muestra los resultados de este estudio. La longitud dendrítica en μm (eje vertical) se representa en función de la distancia (en μm , eje horizontal) del soma de las células. Para las células con dendritas cerca de los somas, las dendritas eran cortas. Sin embargo, a medida que la distancia de los somas aumentó, el tratamiento salino (cuadrados vacíos) produjo longitudes dendríticas que aumentaron hasta un máximo a una distancia de 70 μm del soma y disminuyeron a distancias más alejadas de los somas. Por el contrario, el tratamiento con G-2-MePE (cuadrados rellenos) produjo dendritas más largas en gran parte del intervalo de distancias de los somas.

Ejemplo de referencia 9: Tratamiento del síndrome de Rett en ratones II

Acoplamiento de los ratones y genotipificación

Se usan los ratones de alelo nulo de la línea germinal MeCP2 (Chen *et al.*, 2001). La genotipificación se realiza como en Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2001).

Tratamiento con G-2-MePE

Para las mediciones de la supervivencia, el análisis de actividad nocturna y el análisis de inmunotransferencia, se administró G-2-MePE (sintetizado por Albany Molecular Research Inc. (Albany, NY) y suministrado por Neuren Pharmaceuticals Limited) diariamente a través de inyecciones intraperitoneales (20 mg/kg, vehículo = solución salina, BSA al 0,01 %). El tratamiento comienza en P15 y se mantiene a lo largo de los experimentos. Para los experimentos de fisiología intracelular, se inyectan diariamente a los ratones G-2-MePE (20 mg/kg de peso corporal, vehículo = solución salina, BSA al 0,01 %) durante 2 semanas, de P15 a P28-P32 cuando se usan para preparación aguda de cortes. Para los experimentos de formación de imágenes ópticas, se inyectan a los ratones G-2-MePE (20 mg/kg de peso corporal, vehículo = solución salina, BSA al 0,01 %) diariamente desde el día de la sutura del párpado hasta el día de la formación de imágenes.

Preparación de fisiología de los cortes

Se realizan cortes coronales (300 μm de grosor) en o cerca de la corteza sensoriomotora en ACSF a $< 4^\circ\text{C}$ usando un Vibratome. Se incuban los cortes a 37°C durante 20 minutos después de cortarlos y a temperatura ambiente durante el resto del experimento. Se transfieren los cortes a una cámara de Warner y se toman grabaciones de neuronas piramidales identificadas visualmente situadas en la capa 5. Se ajusta líquido cefalorraquídeo cerebral artificial (ACSF) que contiene NaCl 126 mM, NaHCO_3 25 mM, NaHPO_4 1 mM, KCl 3 mM, MgSO_4 2 mM, CaCl_2 2 mM y dextrosa 14 mM, a 315-320 mOsm, y pH 7,4 y se burbujea con O_2 al 95 %/ CO_2 al 5 %. La solución de pipeta intracelular contenía gluconato de potasio 100 mM, KCl 20 mM, HEPES 10 mM, MgATP 4 mM, NaGTP 0,3 mM y Na-fosfocreatina 10 mM.

Grabaciones intracelulares de células enteras

Se extraen pipetas de borosilicato (3-5 M Ω , WPI) con un extractor Sutter P-80 (Sutter Instruments). Las células se visualizan con una lente de inmersión en agua Achroplan x40 con óptica DIC de infrarrojos (Zeiss) y se detectan con una cámara de infrarrojos (Hamamatsu) que se proyecta hacia un monitor de video. Los experimentos se realizan mediante un software de adquisición personalizada y de análisis en tiempo real creado en Matlab (Mathworks, Natick, Mass.) usando un amplificador Multiclamp 700B (Axon Instruments) conectado a un bloque conector BNC-2110 y a una tarjeta de adquisición de canal dual de serie M (National Instruments). Se realiza el gigasello y la ruptura, y las grabaciones de células enteras se verifican de manera continua para los bajos niveles de fugas y la resistencia en serie. Para cada grabación, se aplica un impulso de ensayo de 5 mV en la pinza de tensión ~10 veces para medir la entrada y la resistencia en serie. A continuación, se aplican en la pinza de corriente ~10 impulsos (500 ms, 40-140 pA a 10 pA) para cuantificar las tasas de disparo suscitadas y la excitabilidad celular. Se verifica que la resistencia de acceso, la fuga y la excitabilidad intrínseca celular son uniformes entre los grupos. Por último, se muestrean las EPSC espontáneas bajo la pinza de tensión a -60 mV a 10 kHz y se filtra a paso bajo a 1 kHz. El análisis se realiza usando un paquete de software personalizado creado en Matlab, con todos los eventos detectados de acuerdo a umbrales automatizados y verificados de forma oculta para cada evento individualmente por el experimentador.

Tinción de Golgi

Se fijan muestras ($< 1\text{ cm}$) de ratones P28 en formalina al 10 % y bicromato de potasio al 3 % durante 24 horas. A continuación, se transfiere el tejido a nitrato de plata al 2 % durante 2 días a oscuras a temperatura ambiente. Se realizan cortes de estas muestras de 50 μm de espesor en agua destilada. Se montan cortes correspondientes a la

corteza motora sobre portaobjetos, se secan al aire durante 10 minutos y luego se deshidratan mediante lavados secuenciales de alcohol al 95 %, alcohol al 100 % y xileno, y luego se sellan con un cubreobjetos. Se adquirieron imágenes a 10 aumentos (célula entera) y 100 aumentos (imagen de la espina) usando un microscopio confocal Zeiss Pascal 5 Exciter.

Formación de imágenes ópticas de señales intrínsecas

Para este experimento, se usan hembras adultas (>P60) de tipo silvestre (SVEV o BL6) y mutantes MeCP2 (+/-) (BL6). El grupo de control de tipo silvestre se compone de dos hembras de la misma edad de tipo silvestre MeCP2 +/- o hembras SVEV de la misma edad de tipo silvestre. Para la privación monocular, los animales se anestesian con Avertin (0,016 ml/g) y se suturan los párpados de un ojo durante 4 días. Antes de la formación de imágenes, se retira la sutura y se vuelve a abrir el ojo privado. Solo se usan los animales en los que las suturas de privación están intactas y el estado del ojo privado parece sano para la sesión de formación de imágenes. Para la activación de la señalización de G-2-MePE, se inyecta por vía intraperitoneal (IP) una solución que contiene G-2-MePE durante todo el período de privación. Para las sesiones de formación de imágenes, se anestesian los ratones con uretano (0,5 g/kg; el 20 % de la dosis completa se administra IP cada 20-30 minutos hasta la dosis final; también se inyectan 0,02 ml de clorproxióxeno al 1 % junto con la primera administración). Se deja el cráneo al descubierto y se pega una placa hecha a medida en la cabeza para minimizar el movimiento. Se adelgaza el cráneo sobre VI con un taladro de dremel y se cubre con una solución de agarosa en solución salina (1,5 %) y un cubreobjetos de vidrio. Durante la sesión de formación de imágenes, el animal está constantemente oxigenado, su temperatura se mantiene con una manta calefactora y los ojos se tratan periódicamente con aceite de silicona; las condiciones fisiológicas se controlan de manera constante. Se coloca el ratón anestesiado delante de un monitor que muestra un estímulo periódico presentado a cualquier ojo, monocularmente; el estímulo consistía en una barra blanca vertical u horizontal de deriva de dimensiones 9° x 72°, que se desvía a 9 s/ciclo, sobre un fondo uniformemente gris. Se ilumina la superficie del cráneo con una luz roja (630 nm), y se captura el cambio de luminancia con una cámara CCD (Cascade 512B, Roper Scientific) a una velocidad de 15 fotogramas/s durante cada sesión de estímulo de 25 minutos. Se emplea un filtro de paso alto temporal (135 fotogramas) para eliminar el ruido de la señal lenta, después de lo que la señal es procesada por ordenador para extraer, en cada píxel, la componente de Transformada Rápida de Fourier (FFT) temporal correspondiente a la frecuencia del estímulo. Se usa la amplitud de FFT para medir la fuerza de la respuesta visual suscitada en cada ojo. El índice de dominancia ocular se deriva de la respuesta de cada ojo (R) en cada píxel como $ODI = (R_{contra} - R_{ipsi}) / (R_{contra} + R_{ipsi})$. La zona binocular se define como la región activada por la estimulación del ojo ipsilateral al hemisferio fotografiado.

Mediciones del ritmo cardiaco

Se mide la frecuencia cardiaca en tiempo real usando un sensor de pinza de cola (Mouse OX Oximeter - Oakmont, PA). Los ratones no se anestesian, sino que se limitan físicamente en un tubo de plástico abierto ajustado. Antes de la sesión de grabación, se coloca el tubo durante la noche en las jaulas en las que se alojan los animales de experimentación para permitir la habituación. La temperatura corporal se mantiene a ~28-29 °C (~82-84 °F) durante todo el tiempo de grabación. Se registraron 3 ensayos de 15 minutos para cada ratón, los ratones tienen 8 semanas de vida y se trataron con vehículo o G-2-MePE de P15.

Mediciones de la actividad nocturna

Se mide la actividad motora espontánea usando una cámara de monitorización del movimiento activada por haz de infrarrojo (Opto-Varimax-MiniA, Columbus Instruments, Columbus, Ohio). Para cada experimento, se coloca un ratón en la cámara al menos 3 h antes de iniciarse las grabaciones. El movimiento se controla durante el ciclo normal de oscuridad de 12 h (7 p.m. a 7 a.m.). Se recoge un ciclo de oscuridad por animal y por punto de tiempo.

Resultados

Para ensayar si el tratamiento con G-2-MePE afectará al desarrollo de las características cardinales de la enfermedad de RTT, se administraron los animales mutantes de 2 semanas inyecciones intraperitoneales diarias en el transcurso de su vida. Las mediciones de la fisiología sináptica, la composición molecular sináptica y la plasticidad cortical se adquieren como se detalla a continuación, junto con mediciones relacionadas con la salud tales como la frecuencia cardiaca, los niveles de actividad locomotora y la esperanza de vida.

Efectos de G-2-MePE sobre la fisiología sináptica de los ratones mutantes MeCP2

Estudios recientes han informado de que las neuronas a través de múltiples regiones cerebrales de ratones MeCP2-/- muestran una profunda reducción en la actividad espontánea (Chang *et al.*, 2006; Chao *et al.*, 2007; Dani *et al.*, 2005; Nelson *et al.*, 2006), un fenotipo que es rescatado por la sobreexpresión de BDNF (Chang *et al.*, 2006). De forma similar, se ha demostrado que la aplicación aguda de un derivado de IGF1 eleva las amplitudes de la corriente postsináptica excitadora suscitada (EPSC) en un 40 % en cultivos de hipocampo de rata (Ramsey *et al.*, 2005; Xing *et al.*, 2007). Para probar la eficacia de G-2-MePE en el rescate del fenotipo fisiológico MeCP2-/-, se adquirieron grabaciones de células enteras intracelulares en cortes cerebrales agudos, midiendo el impulso sináptico excitatorio

(amplitud y frecuencia EPSC espontánea) en las neuronas corticales de la capa 5. En este caso, las EPSC registradas de animales -/y son significativamente reducidas en amplitud en comparación con las EPSC medidas en animales de tipo silvestre. La tendencia se invierte parcialmente en las EPSC registradas de animales MeCP2-/y tratados con G-2-MePE, que son significativamente mayores en amplitud que las EPSC de ratones MeCP2-/y tratados con vehículo. Estas diferencias también se observan al calcular la media entre células. A lo largo de estas mediciones, también se verifica que la resistencia de acceso, la fuga y la excitabilidad intrínseca celular son uniformes entre los grupos. La cuantificación de los intervalos de EPSC también muestra un ligero aumento en el intervalo entre los eventos de EPSC (reducción de la frecuencia de EPSC) entre animales de tipo silvestre y MeCP2-/y ($P = 0,04$, prueba de Kolmogorov-Smirnov). Los presentes hallazgos indican que la reducción del impulso sináptico excitatorio en células corticales de ratones MeCP2-/y su rescate parcial después del tratamiento con G-2-MePE se deben, en parte, a un cambio en la amplitud de EPSC como consecuencia de un cambio en la fuerza de las sinapsis que median en la transmisión excitatoria en esta región.

El tratamiento con G-2-MePE estimula la maduración de la espina cortical

Se usó la tinción de Golgi para marcar las neuronas escasamente y de forma distinta, y se aplicaron imágenes confocales de alta resolución para medir la densidad y la morfología de la espina dendrítica en las células marcadas, restringiendo el análisis a las neuronas piramidales de la capa 5 en cortes de corteza motora de ratones del período crítico (P28).

Aunque la imagen de baja amplificación delimita claramente la extensión de las dendritas de las células piramidales, Se usaron mayores aumentos para el recuento de los contactos sinápticos y determinar la clase morfológica de cada espina. Las espinas se clasificaron como grandes y bulbosas ("champiñón", M), cortas y gruesas ("regordeta", S), cortas y finas ("delgada", T) o filopodias (F). La comparación de la densidad de espinas por rama unitaria muestra una tendencia a disminuir la densidad de la espina en las neuronas con desactivación que se ha mejorado en gran medida en la desactivación con tratamiento.

En conjunto, estos resultados indican el potencial de deficiencias en el número y en el estado de maduración de los contactos dendríticos en la desactivación para sostener defectos funcionales en la transmisión excitatoria, de una manera que se puede tratar después de la administración de G-2-MePE.

La plasticidad de dominancia ocular (OD) en ratones adultos MeCP2+/- se reduce mediante G-2-MePE

Los cambios en el desarrollo de la plasticidad OD se controlan, en parte, por la activación de la vía de IGF-1, y la administración de (1-3)IGF-1 puede reducir la plasticidad OD en ratones jóvenes de tipo silvestre (Tropea *et al.*, 2006). Por lo tanto, se ensayó si el tratamiento con G-2-MePE podría estabilizar la plasticidad OD prolongada observada en adultos mutantes MeCP2. Se privan monocularmente ratones MeCP2+/- hembras, de edad P60 o mayores, durante 4 días y se tratan simultáneamente con G-2-MePE. El tratamiento con G-2-MePE reduce la plasticidad OD en los ratones adultos MeCP2 +/-, lo que indica que G-2-MePE puede inducir rápidamente la estabilización o maduración de la sinapsis.

La bradicardia en ratones MeCP2-/y se trata por G-2-MePE.

Además de examinar la eficacia de G-2-MePE en la mejoría de los síntomas neurofisiológicos, se buscó caracterizar sus efectos sobre la salud general del organismo. La evidencia clínica y experimental muestra disfunciones del sistema autónomo tales como los ritmos respiratorios lábiles y la reducción del tono vagal cardíaco basal en pacientes con síndrome de Rett (Julu *et al.*, 2001). Un control deficiente de los mecanismos de retroalimentación que regulan la homeostasis de la presión sanguínea a través del sistema simpático, por ejemplo, la disminución de la frecuencia cardíaca inducida por hiperventilación, es común en pacientes con síndrome de Rett y puede causar arritmias cardíacas potencialmente mortales (Acampa and Guideri, 2006; Julu *et al.*, 2001).

La patogénesis de la disautonomía cardíaca, aunque no se conoce bien, sugiere que las conexiones neuronales inmaduras en el tronco encefálico podrían ser la causa. Para examinar las anomalías de la frecuencia cardíaca en ratones MeCP2-/y el efecto del tratamiento con G-2-MePE, se controló el pulso cardíaco en tiempo real en animales silvestres no anestesiados y animales MeCP2-/y tratados con vehículo o G-2-MePE. Los ratones de tipo silvestre presentan una distribución regular de las mediciones de frecuencia cardíaca centradas cerca de 750 latidos por minuto. Por el contrario, los ratones MeCP2-/y presentan una frecuencia cardíaca más irregular con una frecuencia media más baja, cuya aparición se reduce significativamente después del tratamiento con G-2-MePE.

La administración de G-2-MePE mejora la actividad locomotora y la esperanza de vida

Los ratones MeCP2-/y desarrollan síntomas de tipo Rett comenzando a las 4-6 semanas de vida cuando se vuelven letárgicos progresivamente, desarrollan ataxia de la marcha y mueren entre las 10 y 12 semanas de vida (Chen *et al.*, 2001). También se registra la actividad locomotora basal en ratones después de 6 semanas contando los episodios nocturnos de cruce de haz infrarrojo dentro de una zona de la jaula. Los ratones con desactivación MeCP2 (KO) presentan niveles de actividad locomotora marcadamente reducidos en comparación con los ratones de tipo

silvestre (WT), pero el tratamiento con G-2-MePE (KO-T) eleva estos niveles.

Por último, en comparación con los compañeros de camada MeCP2 KO, los ratones MeCP2-/- tratados con G-2-MePE también muestran un aumento de la esperanza de vida de ~50 % (un aumento en la tasa de supervivencia de probabilidad 0,5).

También se mide el efecto del tratamiento con G-2-MePE en el tamaño del soma neuronal en el hipocampo. Los ratones se tratan con G-2-MePE como se ha descrito anteriormente para la actividad locomotora. El tamaño del soma en las neuronas de la región CA3 del hipocampo está significativamente deteriorado en los animales MeCP2 KO en relación con animales de tipo silvestre. El tratamiento con G-2-MePE aumenta el tamaño medio del soma en animales KO, pero tiene poco o ningún efecto sobre el tamaño del soma en animales de tipo silvestre.

Ejemplo 10: Efecto de G-2-MePE oral sobre la supervivencia en el síndrome de Rett en ratones

Debido a que el síndrome de Rett es un trastorno crónico debilitante que implica la pérdida de habilidades motoras, es deseable tratar el síndrome de Rett usando preparados que se administren fácilmente. Con este fin, se pueden aprovechar las propiedades terapéuticas y farmacocinéticas inesperadamente beneficiosas de G-2MePE y compuestos relacionados (patentes de EE.UU. n.º 7.041.314, 7.605.177, 7.714.070, 7.863.309 y las solicitudes de EE.UU. n.º 11/315.784 y 12/903.844).

Por lo tanto, se administró G-2-MePE por vía oral a ratones deficientes en MeCP2 como se describe en el documento US [2009/0074865. En resumen, se administra diariamente una solución acuosa, una emulsión de agua en aceite (microemulsión, emulsión de grano grueso o cristal líquido) o una composición de gel que contiene una cantidad farmacéuticamente eficaz de G-2-MePE (20 o 80 mg/kg por animal). En animales de control deficientes en MeCP2, se administra solo solución salina, y se usan animales de tipo silvestre para obtener datos basales similares al diseño de los estudios descritos en el Ejemplo 7 anterior.

En los animales de tipo silvestre, la supervivencia se define como el 100 % en cada punto de tiempo. En los animales deficientes en MeCP2, la supervivencia disminuye sustancialmente. Sin embargo, después de la administración oral de G-2-MePE a ratones deficientes en MeCP2, la supervivencia aumenta sustancialmente.

Ejemplo 11: Efecto de G-2MePE sobre la actividad convulsiva en el síndrome de Rett en ratones

Dado que las convulsiones son un aspecto prominente, peligroso y difícil de tratar del síndrome de Rett, se determinaron los efectos de G-2MePE sobre la actividad convulsiva en animales deficientes en MeCP2. G-2-MePE puede ser eficaz en el tratamiento de la actividad convulsiva en animales con enfermedad neurodegenerativa (patente de EE.UU. n.º 7.714.020). Por lo tanto, se llevaron a cabo experimentos para determinar si G-2-MePE también puede tratar la actividad convulsiva en ratones deficientes en MeCP2.

Se obtienen grabaciones electroencefalográficas de ratones de tipo silvestre y ratones deficientes en MeCP2 tratados con solución salina o con G-2-MePE usando los métodos descritos en la patente de EE.UU. n.º 7.714.020.

Se encontró que el G-2MePE puede ser eficaz para disminuir tanto las convulsiones motoras como los ataques no convulsivos.

Conclusiones

Basándose en los presentes estudios *in vivo* e *in vitro* en animales deficientes en MeCP2, los presentes inventores concluyen que G-2-MePE puede ser una terapia eficaz para el tratamiento de seres humanos con síndrome de Rett. Por otra parte, debido a que G-2-MePE tiene inesperadamente una semivida más larga que un compuesto natural ((1-3)IGF-1, Glicil-Prolil-Glutamato o GPE) (FIG. 21), se concluye que el uso de G-2-MePE tiene ventajas distintas y sustanciales frente a otros agentes farmacológicos, incluyendo el GPE.

Por ejemplo, el G-2-MePE no es degradado por las células gastrointestinales, es absorbido por las células gastrointestinales y es activo en el sistema nervioso central después de la administración oral Wen *et al.*, solicitud de EE.UU. n.º 12/283.684; U.S. 2009/0074865, patente de EE.UU. n.º 7.887.839). Por consiguiente, G-2MePE no necesita ser administrado por vía intravenosa, subcutánea, intraventricular ni parenteral. De hecho, se pueden usar formulaciones orales que comprenden microemulsiones, emulsiones de grano grueso, preparados de cristal líquido, nanocápsulas e hidrogeles en la fabricación de los preparados administrados por vía oral tales como comprimidos, cápsulas y geles que pueden mejorar la función neurológica y tratar enfermedades neurodegenerativas (patente de EE.UU. n.º 7.887.839). G-2-MePE se puede usar en situaciones en las que el funcionamiento motor de un paciente es inferior al necesario para tragar un comprimido o una cápsula. Existen varios tipos de geles solubles para la administración oral de compuestos, y estos pueden usarse para suministrar G-2-MePE a un paciente. Debido a que G-2-MePE puede administrarse fácilmente por vía oral y es eficaz por vía oral en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, incluyendo el síndrome de Rett, los presentes inventores concluyen que G-2-MePE puede ser conveniente y beneficioso para el tratamiento a largo plazo de pacientes con síndrome de Rett.

Además, dado que el Síndrome de Rett comparte características clave con otros trastornos del espectro autista, G-2-MePE puede ser útil para proporcionar beneficios terapéuticos de animales que tienen otros ASD y en seres humanos con autismo, síndrome de Asperger, trastorno disociativo infantil y trastorno generalizado de desarrollo - no especificado (PDD-NOS).

Ejemplo 12: Tratamiento de los ASD

Modelo de ratón deficiente en *Shank3*

En el estudio, se usaron ratones deficientes en *Shank3* como un modelo de síndrome de eliminación de 22q13 asociado con los ASD.

El síndrome de eliminación de 22q13 se ha relacionado con eliminaciones o mutaciones en el gen *Shank3* (Bonaglia *et al.*, 2006). El gen *Shank3* codifica una proteína madre de almacén que forma el almacén en las sinapsis glutamatérgicas (Boeckers *et al.*, 2006). *Shank3* es una parte crucial del núcleo de la densidad postsináptica (PSD) y recluta muchos elementos funcionales clave en el PSD y en la sinapsis, incluyendo los componentes del ácido α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA), glutamato metabotrópico (mGlu) y receptores de glutamato de ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), así como elementos citoesqueléticos. Estudios recientes que exploran la tasa de eliminaciones de 22q13/mutaciones de *Shank3* sugieren que la haploinsuficiencia de *Shank3* puede causar una forma monogénica de ASD con una frecuencia del 0,5 % al 1 % de los casos de ASD (Durand *et al.*, 2007; Moessner *et al.*, 2007; Gauthier *et al.*, 2008).

La generación del modelo de ratón con la expresión alterada de *Shank3* de longitud completa se ha descrito previamente en la técnica (Bozdagi *et al.*, *Molecular Autism* 2010, 1:15, pág. 4). En resumen, se usaron células madre embrionarias Bruce4 C57BL/6 para generar una estirpe de ratón que tenía sitios loxP insertados antes del exón 4 y del exón 9. Se extirpó el alelo floxeado y se mantuvo una estirpe con una eliminación de los exones 4 a 9, es decir, una eliminación completa de los dominios de repetición de ankirina de *Shank3*. Se produjeron ratones de tipo silvestre (+/+), heterocitóticos (+/-) y ratones con desactivación (-/-), con frecuencias mendelianas a partir de cruces heterocigoto-heterocigoto. Se confirmó una reducción del 50 % del ARNm de *Shank3* de longitud completa en heterocigotos (qPCR), así como una expresión reducida de la proteína *Shank3* (por inmunotransferencia con el anticuerpo *Shank3* N69/46).

Los ratones heterocigóticos generados al cruzar ratones de tipo silvestre con heterocigotos se usan en el presente ejemplo para modelizar mejor la haploinsuficiencia de *Shank3*, responsable del síndrome de eliminación de 22q13.

Métodos

Tratamiento farmacológico

Se dividen ratones deficientes en *Shank3* heterocitóticos de tipo silvestre de 1 a 3 meses de vida en 4 grupos de tratamiento: grupo de tipo silvestre tratado con placebo, grupo deficiente en *Shank3* tratado con placebo y dos grupos tratados con G-2-MePE deficientes en *Shank3*. Se administra a los animales placebo (agua) o G-2-MePE formulado en agua administrada por vía oral, dos veces al día durante 14 días. Se administra G-2-MePE a dos dosis: 15 o 60 mg/kg.

Metodología

Se puede encontrar una descripción detallada de la metodología en Bozdagi *et al.* (*Molecular Autism* 2010, 1:15).

Análisis del comportamiento

Las evaluaciones del comportamiento se realizan en varios momentos, e incluyen análisis de interacciones sociales y comunicación social ultrasónica, de acuerdo con la metodología descrita por Bozdagi *et al.* En resumen, se evalúan las interacciones sociales macho-hembra en cada grupo de tratamiento. Los sujetos macho se alojan en grupos y se ensayan individualmente en jaulas limpias con camas limpias. Cada sesión de ensayo dura 5 min. Cada uno de los ratones está emparejado con una hembra C57BL/6J distinta de celo no familiar. Se coloca una cámara digital de circuito cerrado de televisión (Panasonic, Secaucus, NJ, EE.UU.) horizontalmente a 30 cm de la jaula. Se monta un micrófono ultrasónico (cápsula de micrófono de condensador de Avisoft UltraSoundGate CM15, Avisoft Bioacoustics, Berlín, Alemania) 20 cm por encima de la jaula. La frecuencia de muestreo para el micrófono es de 250 kHz, y la resolución es de 16 bits. Mientras que el equipo usado no puede distinguir entre las llamadas emitidas por el sujeto macho y la pareja hembra, la preponderancia de llamadas durante las interacciones macho-hembra en ratones, en general, es emitida por el macho. Todo el aparato está contenido en una cámara ambiental atenuadora del sonido (ENV-018V, Med Associates, St Albans, VT, EE.UU.) iluminada por una sola luz roja de 25 vatios. Posteriormente, los vídeos de los sujetos macho son puntuados por un investigador con ocultación de la información del genotipo del sujeto y del grupo de tratamiento en medidas de olfateo de nariz a nariz, olfateo de nariz a zona anogenital y olfateo de otras partes del cuerpo, usando el software Noldus Observer (Noldus Information

Technology, Leesburg, VA, EE.UU.). Las vocalizaciones ultrasónicas son identificadas manualmente por dos investigadores muy capacitados con ocultación de la información del genotipo/del grupo de tratamiento, y las estadísticas de resumen se calculan usando el paquete de Avisoft. La fiabilidad entre evaluadores es del 95 %. Los datos se analizan usando ensayo t de Student para muestras no relacionadas.

Se realizan ensayos de habituación/deshabituación olfativas en ratones macho y hembra para cada grupo. La metodología es la descrita anteriormente (Silverman *et al.*, 2010, Yang *et al.*, 2009 and Silverman *et al.*, 2010). Se presentan olores no sociales y sociales en una serie de hisopos de algodón introducidos en la jaula secuencialmente, cada uno durante 2 min, en el siguiente orden: agua, agua, agua (agua destilada); almendra, almendra, almendra (extracto de almendra en dilución de 1:100); plátano, plátano, plátano (aroma artificial de plátano en dilución de 1:100); social 1, social 1, social 1 (golpeado desde la parte inferior de una jaula que aloja a ratones B6 del mismo sexo desconocidos); y social 2, social 2, social 2 (golpeado desde el fondo de una segunda jaula que aloja a un grupo diferente de ratones 129/SvImJ del mismo sexo desconocidos). Se realizan ANOVA de medidas repetidas de una vía dentro de cada grupo de tratamiento para cada conjunto de eventos de habituación y cada evento de dishabituación, seguido de un ensayo post hoc de Tukey.

Electrofisiología de cortes del hipocampo

Se preparan cortes de hipocampo agudo post mortem (350 μ m) de ratones usando un cortador de tejidos. Se mantienen los cortes y se realizan los experimentos a 32 °C. Se perfunden los cortes con solución de Ringer que contiene (en mM): NaCl, 125,0; KCl, 2,5; MgSO₄, 1,3; NaH₂PO₄, 1,0; NaHCO₃, 26,2; CaCl₂, 2,5; glucosa, 11,0. Se burbujea solución de Ringer con O₂ al 95 %/CO₂ al 5 %, a 32 °C, durante grabaciones extracelulares (solución de electrodo: NaCl 3 M). Los cortes se mantienen durante 1 hora antes del establecimiento de una línea basal de potenciales postsinápticos excitatorios de campo (fEPSP) registrados en el *stratum radiatum* en la zona CA1, suscitados por estimulación de los aferentes colaterales-comisurales de Schaffer (impulsos de 100 μ s cada 30 s) con electrodos de tungsteno bipolares colocados en la zona CA3. La intensidad del estímulo del ensayo se ajusta para obtener fEPSP con amplitudes que son la mitad de la respuesta máxima. Se determina la pendiente inicial de EPSP (mV/ms) a partir de la forma de onda media de cuatro respuestas consecutivas. Se generan curvas de entrada-salida (I/O) trazando la pendiente de fEPSP frente a la amplitud de la volea de fibra en solución de bajo contenido de Mg²⁺ (0,1 mM). Las relaciones de IO mediadas por receptores de AMPA y mediadas por receptores de NMDA se miden en presencia de antagonistas de receptores de glutamato ionotrópicos: de ácido 2-amino-2-fosfonopentanoico APV (50 μ M) y 6-ciano-7-nitroquinoxalin-2,3-diona CNQX (100 μ M). Las respuestas de impulsos pareados se miden con intervalos entre estímulos de 10 a 200 ms, y se expresan como la proporción de las respuestas medias al segundo impulso de estimulación con respecto al primer impulso de estimulación.

Se induce la LTP bien por un estímulo de alta frecuencia (cuatro trenes de 100 Hz, 1 s de estimulación separado por 5 min) o por la estimulación de ráfaga theta (TBS) (10 ráfagas de cuatro impulsos a 100 Hz separado a por 200 ms) o mediante una sola estimulación de 100 Hz, para ratones de control y ratones genéticamente modificados. Para inducir la depresión a largo plazo (LTD), se estimulan colaterales de Schaffer por un estímulo de baja frecuencia o impulsos emparejados de baja frecuencia (900 impulsos a 1 Hz durante 15 min) para inducir la LTD dependiente del receptor mGlu. Los datos se expresan como las medias $\pm$ DT, y los análisis estadísticos se realizan mediante el análisis de varianza (ANOVA) o el ensayo t del Student, con una significación establecida en un nivel α de 0,05.

Resultados

Comportamiento

La duración acumulada del olfateo social total por los sujetos macho del ensayo es menor en el grupo deficiente en *Shank3* tratado con placebo que en el grupo de tipo silvestre tratado con placebo. Además, el grupo deficiente en *Shank3* tratado con placebo emite menos vocalizaciones ultrasónicas que los controles de tipo silvestre durante las interacciones sociales entre machos y hembras.

El tratamiento con G-2-MePE en los dos grupos deficientes en *Shank3* produce un aumento significativo en la duración acumulada del olfateo social total en comparación con el grupo deficiente en *Shank3* tratado con placebo. Además, los grupos tratados con G-2-MePE muestran un aumento del número de vocalizaciones ultrasónicas en comparación con el grupo mutante tratado con placebo.

En el estudio olfativo de habituación/deshabituación, destinado a confirmar que los ratones son capaces de detectar feromonas sociales, los 4 grupos presentan niveles normales de habituación (indicados por un menor tiempo en oler la secuencia de tres olores iguales) y de deshabituación esperada (indicada por el aumento empleado en oler el olor diferente).

Electrofisiología

La representación de la pendiente del potencial excitatorio postsináptico de campo (fEPSP) frente a la intensidad del estímulo demuestra una reducción en las curvas de I/O en el grupo deficiente en *Shank3* tratado con placebo frente

al grupo de control. En el grupo heterocigótico tratado con placebo también se observa una disminución de los potenciales de campo mediados por el receptor de AMPA, que se refleja en una disminución del 50 % en la pendiente media de la función de I/O en comparación con el grupo de control de tipo silvestre. Por el contrario, cuando se analiza la relación de I/O en presencia del antagonista competitivo del receptor de AMPA/kainato CNQX para medir la función sináptica del receptor de NMDA, no hay diferencia entre los grupos heterocigóticos tratados con placebo y de tipo silvestre. Estos resultados indican que existe una reducción específica en la transmisión basal mediada por el receptor de AMPA en los ratones heterocigóticos para *Shank3*.

El tratamiento con G-2-MePE en ambos grupos heterocigóticos normaliza los potenciales de campo mediados por el receptor de AMPA y provoca un aumento en la pendiente media de la función de I/O en comparación con el grupo deficiente en *Shank-3* tratado con placebo.

El mantenimiento de la LTP en el grupo deficiente en *Shank-3* tratado con placebo está claramente alterado en comparación con el control de tipo silvestre. Los ensayos de la LTP de TBS (10 ráfagas de cuatro impulsos a 100 Hz separados por 200 ms) también muestran una disminución significativa en la potenciación a los 60 min después de TBS en el grupo deficiente en *Shank-3* tratado con placebo. En contraste con la plasticidad sináptica alterada observada con la LTP, la depresión a largo plazo (LTD) no cambió significativamente en el grupo mutante. El tratamiento con G-2-MePE aumentó la potenciación a largo plazo del hipocampo (LTP) y su mantenimiento en el grupo deficiente en *Shank-3* en comparación con el grupo deficiente en *Shank-3* tratado con placebo.

Análisis

Las deficientes competencias sociales y los comportamientos repetitivos son las características comunes y las medidas de diagnóstico clave de todas las formas de ASD. El retraso en el desarrollo intelectual y el subdesarrollo de las destrezas lingüísticas son también una característica común presente en todos los ASD, excluyendo el síndrome de Asperger.

Los modelos animales descritos anteriormente han sido aceptados en la técnica como la demostración de síntomas similares a las condiciones clínicas humanas. Todos los modelos de mutantes descritos anteriormente (NLGN3, NLGN4, CADM1, NRXN1, FMR1, *shank3*) muestran un deterioro de las habilidades sociales o un aumento de la ansiedad social. Se ha identificado una disminución de la transmisión excitatoria en el hipocampo en los modelos animales mutantes NRXN1, *shank3*, MeCP2 y FMR1. En la actualidad, no se han descrito modelos poligénicos o multifactoriales de ASD. Los modelos animales descritos anteriormente, basados en defectos genéticos que se sabe que producen ASD en la población humana, proporcionan la mejor oportunidad para ensayar la eficacia de las terapias de ASD.

Por lo tanto, la eficacia de G-2-MePE en modelos animales de ASD es razonablemente predictiva de su eficacia en un sujeto humano que padece ASD.

Ejemplo 13: El tratamiento con G-2-MePE cambia la morfología de las neuronas en un modelo humano *in vitro* del síndrome de Rett

Para ensayar los efectos de G-2-MePE en la morfología neuronal, se usó un modelo *in vitro* de RTT descrito en Marchetto *et al.*, "A model for neuronal development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells", *Cell* 143:527-539 (2010) (incluyendo información suplementaria). El modelo usa células madre pluripotentes inducidas (iPSC) generadas a partir de fibroblastos de pacientes de RTT humanos portadores de diferentes mutaciones de MeCP2.

Métodos

Cultivo celular e infección por retrovirus

Se generan fibroblastos de RTT (portadores de 4 mutaciones distintas de MeCP2) y fibroblastos de control a partir de explantes de biopsias dérmicas. Se clona ARNhc frente al gen MeCP2 diana en el vector lentivirus LentiLox3.7 (como se describe en Marchetto *et al.*). Se infectan fibroblastos con vectores de reprogramación retrovíricos (Sox2, Oct4, c-Myc y Klf4). Dos días después de la infección, se siembran los fibroblastos en placas sobre fibroblastos embrionarios de ratón inactivados mitológicamente con medio hESC. Después de 2 semanas, se recogen manualmente las colonias de iPSC que emergen del fondo de los fibroblastos y se transfieren a condiciones libres de alimentación en placas recubiertas con matrigel (BD) usando medio de cultivo de células madre embrionarias mTeSR™ (Stem Cell Technologies) y se pasan manualmente. Se miden perfiles de expresión génica de los clones generados usando matrices del genoma humano Affymetrix Gene Chip™ para confirmar que la reprogramación era satisfactoria.

Diferenciación neuronal: NPC y neuronas maduras

Para obtener células progenitoras neuronales (NPC), se forman cuerpos embrioides (EB) por disociación mecánica de grupos de células y se siembran en placas de baja adherencia en medio hESC sin FGF2 durante 5-7 días. Tras ello, se siembran los EB en placas recubiertas de poli-ornitina/laminina en medio DMEM/F12 más N2 (suplemento exento de suero para el crecimiento y la expresión de células postmitóticas). Se recogen las rosetas resultantes después de 7 días y se disocian con acutasa, y se siembran sobre placas recubiertas con medios NPC (DMEM/F12; 0,5 x N2; 0,5 x B27 y FGF2). Las poblaciones homogéneas de NPC se consiguen después de 1-2 pasos con la acutasa en las mismas condiciones. Para obtener neuronas maduras, se tratan EB flotantes con 1 μ M o ácido retinoico durante 3 semanas (dando el tiempo total de diferenciación de 4 semanas). Los EB maduros se disocian con papaína y ADNasa durante 1 h a 37 °C y se siembran en placas recubiertas con poli-ornitina/laminina en medios NPC sin FGF2.

Tratamiento con G-2-MePE

Se tratan cultivos neuronales de RTT con G-2-MePE (1 nM-10 μ M) durante 1 semana.

Inmunocitoquímica y cuantificación de la morfología neuronal

Se fijan células en paraformaldehído al 4 % y se permeabilizan con Triton-X 100 al 0,5 % en PBS. Las células se bloquean después en PBS que contiene Triton-X100 al 0,5 % y suero de burro al 5 % durante 1 h a temperatura ambiente. Las señales fluorescentes se detectan usando un microscopio invertido Zeiss y las imágenes se procesan con Photoshop CS3. Se usaron los siguientes anticuerpos primarios: TRA-1-60, TRA-1-81 (1:100), Nanog y Lin28 (1:500), Nestina humana (1:100), Tuj-1 (1:500), Map2 (1:100); meCP2 (1:1000; VGLUT1 (1:200), Psd95 (1:500), GFP (1:200), Sox1 (1:250), Mushashi1 (1:200) y me3H3K27 (1:500). Se mide tamaño del soma celular usando un software adecuado (p. ImageJ) después de la identificación de las neuronas usando el Syn::EGFPTM. Se estudian las morfologías de las dendritas y espinas neuronales de una proyección individual de las secciones ópticas de las pilas z y se exploran en incrementos de 0,5 μ m que se correlacionan con la resolución valorada en el plano z. Cada sección óptica es el resultado de 3 exploraciones a 500 lps seguidas de filtrado de Kalman. Para la cuantificación de la sinapsis, las imágenes se toman con un paso z de 1 μ m usando el microscopio confocal Biorad radiance 2100TM. La cuantificación de sinapsis se hace con ocultación del genotipo. Solo se cuentan los puncta VGLUT1 junto con los procesos positivos en Map2. La significación estadística se ensaya usando el ensayo ANOVA de dos vías y el ensayo posterior de Bonferroni.

Formación de imágenes de calcio

Se infectan redes neuronales derivadas de iPSC humanas con el vector lentivírico portador de la construcción de informador Syn:DsRed. Se lavan dos veces cultivos celulares con tampón HEPES de Krebs (KHB) esterilizado y se incuban con Fluo-4AMTM 2-5 μ M ((Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA) en KHB durante 40 minutos a temperatura ambiente. Se elimina el exceso de colorante lavando dos veces con KHB, y se realiza una incubación adicional de 20 minutos para equilibrar la concentración de colorante intracelular y permitir la desesterificación. Se adquieren secuencias de imágenes en lapso de tiempo (ampliación x100) de 5.000 fotogramas a 28 Hz con una región de 336 x 256 píxeles, usando una cámara digital ORCA-ERTM de Hamamatsu (Hamamatsu Photonics K.K., Japón) con un filtro de 488 nm (FITC) en un microscopio confocal de fluorescencia invertida Olympus 1X81 (Olympus Optical, Japón). Las imágenes se adquieren con MetaMorph 7,7TM (MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA). Las imágenes se procesan posteriormente usando ImageJTM y rutinas escritas de manera personalizada en Matlab 7.2TM (Mathworks, Natick, MA).

Electrofisiología

Se realizan grabaciones de pinza de parche de células enteras a partir de células cultivadas junto con astrocitos después de 6 semanas de diferenciación. Se perfunde el baño de manera constante con solución salina recién preparada tamponada con HEPES (véanse los métodos suplementarios para la receta). Se llenan micropipetas de registro (resistencia de la punta de 3 a 6 M Ω) con la solución interna descrita en los materiales suplementarios. Las grabaciones se realizan con el amplificador Axopatch 200BTM (Axon Instruments). Las señales se filtran a 2 kHz y se muestrean a 5 kHz. La capacitancia de la célula completa está totalmente compensada. La resistencia en serie no está compensada, pero se monitoriza durante el experimento por la amplitud de la corriente capacitiva en respuesta a un impulso de 10 mV. Todas las grabaciones se realizan a temperatura ambiente y los productos químicos se adquieren en Sigma. Se miden la frecuencia y la amplitud de las corrientes postsinápticas espontáneas con el software Mini Analysis ProgramTM (Synaptosoft, Leonia, NJ).

Resultados

Las neuronas derivadas de iPSC RTT se caracterizan por un menor número de sinapsis glutamatérgicas, una menor densidad de la espina y un tamaño de soma más pequeño. Las neuronas RTT también muestran ciertos defectos electrofisiológicos, es decir, una disminución significativa de la frecuencia y la amplitud de las corrientes sinápticas

espontáneas en comparación con los controles. Las neuronas RTT muestran una disminución de la frecuencia de los transitorios intracelulares de calcio.

Se ensaya G-2-MePE en el modelo anterior para ensayar si se podía atenuar alguna de las patologías del fenotipo RTT.

El tratamiento de los cultivos celulares con cada concentración de fármaco mejora todos los parámetros morfológicos y fisiológicos de los cultivos de células RTT tratados en comparación con los controles RTT no tratados. En concreto, se observa un aumento significativo del número de sinapsis glutamatérgicas en las células RTT tratadas con G-2-MePE. Todas las concentraciones de tratamiento de G-2-MePE aumentan el número de puncta VGLUT1 en las neuronas derivadas de RTT. El tratamiento con G-2-MePE normaliza la frecuencia y la amplitud de las corrientes postsinápticas espontáneas, así como la frecuencia de los transitorios de calcio generados por la actividad sináptica de las neuronas RTT tratadas con G-2-MePE.

En el presente modelo *in vitro* de RTT humano, las iPSC derivadas de pacientes con RTT y neuronas diferenciadas de las mismas se caracterizan por anomalías en la expresión de MeCP2. Como se describe en la anterior descripción detallada de la invención, la gran mayoría de los casos de RTT están asociados con mutaciones del gen MeCP2. Por lo tanto, la eficacia de G-2-MePE en el presente modelo *in vitro* de RTT humano es razonablemente predictiva de su eficacia en un sujeto humano que padece RTT.

Ejemplo 14: Efectos de G-2-MePE en seres humanos con síndrome de Rett

Métodos

Se reclutan treinta sujetos con síndrome de Rett. Los sujetos son mujeres y de edades comprendidas entre 16 y 29 años (Media = 12,1; DT = 4,4). Todos los sujetos tienen un IQ < 60 y mutaciones del gen MECP2. Los sujetos también muestran la actividad del pico de éter en el EEG o un aumento en las bandas de frecuencia más bajas del EEG como se detecta por Transformada de Fourier Rápida (FFT). Se indica a los sujetos que los medicamentos concomitantes deben ser estables durante al menos seis semanas antes del estudio. Los sujetos que reciben medicamentos para tratar signos de falta de atención son ensayados por la mañana y se les instruye para que tomen su medicación por la tarde. Se excluye a los sujetos con intervalo QTc > 451 ms.

El estudio es un estudio aleatorizado con ocultación doble controlado con placebo paralelo con tres dosis de bien placebo, 10 mg/kg tres veces al día de G-2-MePE oral durante cinco días o 30 mg/kg tres veces al día de G-2-MePE oral.

Los sujetos se analizaron al inicio usando los siguientes instrumentos: la historia natural/escala de gravedad clínica del síndrome de Rett, la edición de la comunidad de la lista de control del comportamiento aberrante (ABC), escala de Vineland, la impresión clínica global de la gravedad (CGI-S), y sus cuidadores completaron el cuestionario del cuidador (CSQ).

Los sujetos se llevan a la clínica como pacientes hospitalizados para permitir los registros iniciales de EEG, ECG y frecuencia respiratoria de manera continua durante 24 horas usando tecnología de polisomnografía. También se registran los movimientos de las manos usando el Q-Sensor™. Las medidas derivadas del EEG incluyen: picos por unidad de tiempo en el EEG, potencia total de las bandas de frecuencia del EEG, QTc y variabilidad de la frecuencia cardíaca (HRV) e irregularidades respiratorias.

También se registran los eventos adversos usando las medidas de seguridad convencionales y la elicitación de eventos adversos SMURF.

A nivel estadístico, se analiza el efecto del tratamiento con G-2-MePE mediante la realización de un análisis repetido de la covarianza (ANCOVA) sobre el efecto del tratamiento sobre el cambio de las puntuaciones de referencia.

Resultados

El tratamiento con G-2-MePE no produce más eventos adversos que los presentes durante el tratamiento con placebo, siendo todos los eventos adversos de corta duración y gravedad leve. No se informa de eventos adversos graves. No se informa de casos de aumentos en QTc.

No se observan efectos sobre la frecuencia respiratoria ni la variabilidad de la frecuencia cardíaca.

El tratamiento con G-2-MePE produce una reducción global significativa de los picos por unidad de tiempo en el EEG. El tratamiento con 30 mg/kg de G-2-MePE oral tres veces al día disminuye la actividad del pico en comparación con el placebo. Esta dosis de G-2-MePE también disminuye la potencia de la banda delta del EEG en comparación con el placebo.

El tratamiento con G-2 ePE también reduce los movimientos totales de la mano por período de veinticuatro horas contados usando el dispositivo Q-Sensor™. Este efecto es significativo para la dosis de 30 mg/kg tres veces al día en comparación con el placebo.

- 5 El tratamiento con G-2-MePE no tiene un efecto significativo global sobre la historia natural/escala de gravedad clínica del síndrome de Rett. Sin embargo, 30 mg kg de G-2-MePE oral tres veces al día, en comparación con el placebo, produce efectos significativos en las siguientes subescalas: "comunicación no verbal en esta visita por examen"; "epilepsia/convulsiones en esta visita: y "uso de la mano".

10 Conclusiones

El tratamiento con G-2-MePE produce mejoras significativas en la función del sistema nervioso central en el presente estudio. A pesar del tratamiento a corto plazo, se reducen las anomalías en la actividad eléctrica del cerebro, una clara señal de eficacia. Este efecto es dependiente de la dosis, observado después del tratamiento con 15 30 mg kg de G-2-MePE oral tres veces al día. Estos efectos reflejan las mejoras en la función del SNC observadas en el modelo de ratón transgénico con desactivación de *mecp2* del síndrome de Rett después de la administración de G-2-MePE.

También se observan efectos dependientes de la dosis en el uso de las manos, evaluado por un dispositivo de conteo objetivo y de clasificación subjetiva. Esto es de interés debido a que los apretones de manos sin sentido son característicos del fenotipo clínico del síndrome de Rett y exclusivos de este trastorno.

La clasificación de la comunicación no verbal de la historia natural/escala de gravedad clínica del síndrome de Rett se mejora mediante el tratamiento. Esta medida evalúa principalmente el contacto visual. Esto plantea la perspectiva de que el tratamiento a largo plazo con G-2-MePE puede mejorar la relación social en la población.

G-2-MePE es bien tolerado en esta población. No se observan efectos en las medidas convencionales ni en las áreas de preocupación específicas de la población de pacientes, tales como la prolongación del intervalo QTc o la apnea.

30

Ejemplo 15: Efectos de G-2MePE-MePE en seres humanos con trastornos del espectro autista

Métodos

35 Para determinar si G-2-MePE puede tratar los síntomas de ASD, se llevó a cabo un estudio en seres humanos con ASD. Se reclutan 20 sujetos con un trastorno del espectro autista. Los sujetos son varones y tienen entre 16 y 65 años (Media = 18,1; DT = 3,4). Todos los sujetos tienen un IQ > 60 y diagnóstico estricto del DSM-IV-TR de trastorno autista o trastorno de Asperger. Los sujetos también cumplen los criterios de un trastorno del espectro autista según los instrumentos ADI-R y ADOS-G, y cumplen con los criterios de DSM-V propuestos para el trastorno del espectro 40 autista. Se indica a los sujetos que los medicamentos concomitantes deben ser estables durante al menos seis semanas antes del estudio. Los sujetos que reciben medicación para tratar signos de falta de atención son examinados por la mañana y se les indica que tomen su medicación por la tarde. Se excluyen los sujetos mejor tratados con medicamentos antipsicóticos atípicos indicados para el autismo. Los sujetos se evalúan para detectar trastornos genéticos conocidos, y se excluyen aquellos con síndrome de X frágil o esclerosis tuberosa. Se excluyen 45 los sujetos con epilepsia no controlada.

El estudio es un estudio cruzado con ocultación doble controlado con placebo de tres fases. Los sujetos entran en cada fase del cruce en un orden aleatorio. En las fases del ensayo, los sujetos reciben placebo, 10 mg/kg de G-2-MePE oral tres veces al día durante cinco días o 30 mg/kg de G-2-MePE oral tres veces al día. Cada fase del cruce 50 está separada por un período de lavado de catorce días.

Los sujetos se evalúan al inicio usando los siguientes instrumentos: Wechsler IQ, edición de la comunidad de la lista de control de comportamiento aberrante (ABC), Escala de Vineland, subescala de compulsión de la escala del comportamiento obsesivo-compulsivo de Yale-Brown (YBOCS), escala de receptividad social (SRS), la impresión 55 clínica global de la gravedad (CGI-S), y sus cuidadores completan el cuestionario del cuidador (CSQ).

Se administra a los sujetos dos tareas: la lectura de la mente en el ensayo ocular - revisada (RMET) y una tarea de seguimiento de los ojos (ET), así como la impresión clínica global de la mejoría (CGI-I). Las tareas comienzan dos horas después de la administración del placebo o de cualquiera de las dosis de G-2-MePE. La RMET es una tarea 60 informática que evalúa la capacidad de un individuo de leer las emociones de los ojos de expresiones faciales afectivas sutiles, y es un ensayo ampliamente usado de reconocimiento de las emociones en pacientes con autismo (2001). Es importante destacar que la RMET es capaz de detectar mejoras incluso con una sola dosis de un agente farmacológico (Guastella *et al.*, 2010). Los problemas del seguimiento ocular son característicos de los pacientes con autismo, que pasan menos tiempo mirando a los ojos de las fotografías de caras humanas. Una vez más, una 65 sola administración de una intervención farmacológica puede mejorar un seguimiento ocular deficiente en el autismo (Andari *et al.*, 2010).

También se registran los eventos adversos usando las medidas de seguridad convencionales.

A nivel estadístico, se analiza el efecto del tratamiento con G-2-MePE mediante la realización de un análisis repetido de la covarianza (ANCOVA) sobre el efecto del tratamiento en el cambio de las puntuaciones de referencia.

Resultados

El tratamiento con G-2-MePE no produce más eventos adversos que los presentes durante el tratamiento con placebo, siendo todos los eventos adversos de corta duración y gravedad leve. No se informa de eventos adversos graves.

El tratamiento con G-2-MePE produce una mejora global significativa en el rendimiento del ensayo de RMET. El tratamiento con 30 mg/kg de G-2-MePE oral tres veces al día aumenta el porcentaje de respuestas correctas en la RMET.

El tratamiento con G-2-MePE produce una mejora significativa en el tiempo dedicado a observar la región ocular en el ensayo de ET. Las puntuaciones de CGI-I al final de los períodos de tratamiento muestran una diferencia significativa. Los efectos positivos del tratamiento se correlacionan con las puntuaciones de referencia de CSQ.

Conclusiones

El tratamiento con G-2-MePE produce mejoras significativas en el rendimiento de la lectura de la mente en el ensayo ocular - Revisada, y en el rendimiento de una tarea de seguimiento de los ojos. Este efecto depende de la dosis, observado después del tratamiento de 30 mg/kg de G-2-MePE oral tres veces al día.

La mejora de estas medidas refleja una mejora en el procesamiento de la información social. Las deficiencias de interacción social son un diagnóstico de síntoma básico para los trastornos del espectro autista, y se trata, por tanto, un hallazgo clave.

G-2-MePE también produce una mejoría general en la función según lo indexado por la impresión clínica global de la mejoría. La anotación de texto libre de los formularios del informe de casos del estudio indica este efecto relacionado con una mejora en la relación social. Esto implica que los cambios observados en la tarea de RMET y ET pueden tener relevancia para la actividad social en la vida diaria.

G-2-MePE es bien tolerado en esta población.

Ejemplo 16: Modelos animales de determinación de los efectos de G-2-MePE en los trastornos del espectro autista

Los efectos de G-2-MePE se ensayan además en los siguientes modelos genéticos de ASD: el ratón heterocigótico para *Tbx1*, el ratón con desactivación de *Cntnap2* y el ratón con desactivación de *Slc9a6*. G-2-MePE también se ensaya en el modelo de ratones con desactivación de *fmr1* del síndrome de X frágil.

Tbx1. Las mutaciones del gen *TBX1* están asociadas con trastornos del espectro autista (Paylor *et al.*, 2006). Los ratones *Tbx1* transgénicos tienen afectada selectivamente la interacción social, la vocalización ultrasónica, los comportamientos repetitivos y la memoria de trabajo (Hiramoto *et al.*, 2011).

Cntnap2. Dos tercios de los pacientes con mutaciones del gen 2 de tipo proteína asociado a la contactina (*CNTNAP2*) son diagnosticados con un trastorno del espectro autista (Alarcon *et al.*, 2008; Arking *et al.*, 2008; Bakaloglu *et al.*, 2008; Strauss *et al.*, 2006; Vernes *et al.*, 2008). Los ratones con desactivación (KO) de *Cntnap2* presentan fenotipos relacionados con el ASD en el comportamiento social, la vocalización ultrasónica y los comportamientos repetitivos (Penagarikano *et al.*, 2011).

Slc9a6. Este gen se ha implicado en el ASD síndromico y codifica el intercambiador de sodio-hidrógeno 6 (NHE6). Las mutaciones en *SLC9A6* están asociadas con la discapacidad intelectual (Gilfillan *et al.*, 2008) y el comportamiento autista (Garbern *et al.*, 2010). Los ratones *Slc9a6* KO presentan hiperactividad motora y disfunción cerebelosa (Stromme *et al.*, 2011).

Fmr1. El silenciamiento del gen *FMR1* produce el síndrome de X frágil, cuyo fenotipo incluye el autismo; dos tercios de los pacientes con síndrome de X frágil cumplen los criterios de selección para un trastorno del espectro autista (Harris *et al.*, 2008). Los pacientes pediátricos con síndrome de X frágil también muestran un umbral de convulsiones más bajo. El ratón con desactivación de *fmr1* replica gran parte del fenotipo del síndrome del Frágil X, incluyendo la susceptibilidad a las convulsiones juveniles (Yan *et al.*, 2004).

Métodos

Los animales de cada uno de los modelos anteriores se generan de acuerdo con la metodología descrita en la bibliografía citada. También se obtienen equivalentes de tipo silvestre para cada modelo genético. Los animales de cada modelo se dividen en tres grupos ($n = 10$ a $n = 20$): ratones de tipo silvestre tratados con placebo, grupo tratado con G-2-MePE mutante y grupo de control mutante tratado con placebo. Los tratamientos se administran por vía intraperitoneal: placebo (solución salina) o 20 mg/kg/día de G-2-MePE. Se toman medidas de las características clave del ASD que se muestran en cada modelo de acuerdo con la literatura citada.

Resultados

El tratamiento con G-2-MePE mejora significativamente todas las medidas asociadas con el fenotipo de ASD.

Referencias

- Alarcon, M., Abrahams, B. S., Stone, J. L., Duvall, J. A., Perederiy, J. V., Bomar, J. M., Sebat, J., Wigler, M., Martin, C. L., Ledbetter, D. H., Nelson, S. F., Cantor, R. M., and Geschwind, D. H. (2008). "Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene". *Am. J. Hum. Genet.* 82, 150-159.
- Amir R. E., Van den Veyver I. B., Wan M., Tran C. Q., Francke U., Zoghbi H. Y. "Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2". *Nat Genet.* 1999 23:185-188.
- Andari E., Duhamel J. R., Zalla T., Herbrecht E., Leboyer M., Sirigu A. (2010) "Promoting social behavior with oxytocin in high-functioning autism spectrum disorders". *PNAS* 107:4389-4394.
- Arking, D. E., Cutler, D. J., Brune, C. W., Teslovich, T. M., West, K., Ikeda, M., Rea, A., Guy, M., Lin, S., Cook, E. H., y Chakravarti, A. (2008). "A common genetic variant in the neurexin superfamily member CNTNAP2 increases familial risk of autism". *Am. J. Hum. Genet.* 82, 160-164.
- Bakkaloglu, B., O'Roak, B. J., Louvi, A., Gupta, A. R., Abelson, J. F., Morgan, T. M., Chawarska, K., Klin, A., Ercan-Sencicek, A. G., Stillman, A. A., Tanriover, G., Abrahams, B. S., Duvall, J. A., Robbins, E. M., Geschwind, D. H., Biederer, T., Gunel, M., Lifton, R. P. y State M. W. (2008). "Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders".
- Bakkaloglu, B., O'Roak, B. J., Louvi, A., Gupta, A. R., Abelson, J. F., Morgan, T. M., Chawarska, K., Klin, A., Ercan-Sencicek, A. G., Stillman, A. A., Tanriover, G., Abrahams, B. S., Duvall, J. A., Robbins, E. M., Geschwind, D. H., Biederer, T., Gunel, M., Lifton, R. P. y State MW (2008). "Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders". *Am. J. Hum. Genet.* 82, 165-173.
- Baron-Cohen S., Wheelwright S., Hill J., Raste Y., Plumb I. (2001) "The "Reading the Mind in the Eyes" test, revised version: A study with normal adults, and adults with Asperger's syndrome or high-functioning autism". *J Child Psychol Psychiatry* 42:241-251.
- Belichenko P. V., Oldfors A., Hagberg B., Dahlström A. "Rett syndrome: 3-D confocal microscopy of cortical pyramidal dendrites and afferents". *Neuroreport.* 1994 5:1509-1513.
- Biederer T., Sara Y., Mozhayeva M., Atasoy D., Liu X., Kavalali E. T., Südhof T C. (2002) "SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly". *Science* 297(5586): 1525-1531.
- Chapleau C. A., Larimore J. L., Theibert A., Pozzo-Miller L. (2009) "Modulation of dendritic spine development and plasticity by BDNF and vesicular trafficking: fundamental roles in neurodevelopmental disorders associated with mental retardation and autism". *J. Neurodev. Disord.* 1: 185-196.
- Cheng C. M., Mervis R. F., Niu S. L., Salem N. Jr, Witters L. A., Tseng V., Reinhardt R., Bondy C. A. "Insulin-like growth factor 1 is essential for normal dendritic growth". *J Neurosci Res.* 2003 73:1-9.
- Comery T. A., Harris J. B., Willems P. J., Oostra B. A., Irwin S. A., Weiler I. J., Greenough W. T. (1997) "Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits". *Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU.* 94: 5401-5404.
- Durand C. M., Betancur C., Boeckers T. M., Bockmann J., Chaste P., Fauchereau F., Nygren G., Rastam M., Gillberg I. C., Anckarsäter H., Sponheim E., Goubran-Botros H., Delorme R., Chabane N., Mouren-Simeoni M. C., de Mas P., Bieth E., Rogé B., Héron D., Burglen L., Gillberg C., Leboyer M., Bourgeron T. (2007) "Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders". *Nat Genet.* 39: 25-27.

Etherton M. R., Blaiss C. A., Powell C. M., Südhof T. C. (2009) Mouse neurexin-1 α deletion causes correlated electrophysiological and behavioural changes consistent with cognitive impairments". *Proc. Nat. Acad. Sci.* 106: 17998-18003.

Garbern, J. Y., Neumann, M., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., Feldman, G., Norris, J. W., Friez, M. J., Schwartz, C. E., Stevenson, R. y Sima, A. A. (2010). "A mutation affecting the sodium/proton exchanger, SLC9A6, causes mental retardation with tau deposition". *Brain* 133, 1391-1402.

Gauthier J., Bonnel A., St-Onge J., Karemera L., Laurent S., Mottron L., Fombonne E., Joobor R., Rouleau G. A. (2005) "NLGN3/NLGN4 gene mutations are not responsible for autism in the Quebec population". *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 132B(1): 74-75.

Gilfillan, G. D., Selmer, K. K., Roxrud, I., Smith, R., Killerman, M., Eiklid, K., Kroken, M., Mattingsdal, M., Egeland, T., Stenmark, H., Sjöholm, H., Server, A., Samuelsson, L., Christianson, A., Tarpey, P., Whibley, A., Stratton, M. R., Futreal, P. A., Teague, J., Edkins, S., Gecz, J., Turner, G., Raymond, F. L., Schwartz, C., Stevenson, R. E., Undlien, D. E. y Stromme, P. (2008). "SLC9A6 mutations cause X-linked mental retardation, microcephaly, epilepsy, and ataxia, a phenotype mimicking Angelman syndrome". *Am. J. Hum. Genet.* 82, 1003-1010.

Gilman S. R., Iossifov I., Levy D., Ronemus M., Wigler M., Vitkup D. "Rare de novo variants associated with autism implicate a large functional network of genes involved in formation and function of synapses". *Neuron.* 2011 70:898-907.

Giza J., Urbanski M. J., Prestori F., Bandyopadhyay B., Yam A., Friedrich V., Kelley K., D'Angelo E., Goldfarb M. (2010) "Behavioural and cerebellar transmission deficits in mice lacking autism-linked gene Islet Brain-2". *J. Neurosci.* 30: 14805-14816.

Guastella A. J., Einfeld S. L., Gray K. M., Rinehart N. J., Tonge B. J., Lambert T. J., Hickie I. B. (2010) "Intranasal oxytocin improves emotion recognition for youth with autism spectrum disorders". *Biol Psychiatry.* 67:692-694.

Hagerman R., Hoem G., Hagerman P. (2010) "Fragile X and autism: Intertwined at the molecular level leading to targeted treatments". *Mol. Autism* 1: 12-24.

Harris S. W., Hessel D., Goodlin-Jones B., Ferranti J., Bacalman S., Barbato I., Tassone F., Hagerman P. J., Herman H., Hagerman R. J. (2008) "Autism profiles of males with fragile X syndrome". *Am J Ment Retard.* 113:427-438.

Hiramoto T., Kang G., Suzuki G., Satoh Y., Kucherlapati R., Watanabe Y., Hiroi N. (2011) "Tbx1: identification of a 22q11, 2 gene as a risk factor for autism spectrum disorder in a mouse model". *Hum Mol Genet.* 2011 20:4775-4785.

Hutsler J. J., Zhang H. "Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders". *Brain Res.* 2010 1309:83-94.

Irwin S. A., Galvez R., Greenough W. T. "Dendritic spine structural anomalies in fragile-X mental retardation syndrome". *Cereb Cortex.* 2000 10:1038-1044.

Jamain S., Quach H., Betancur C., Rastam M., Colineaux C., Gillberg I. C., Soderstrom H., Giros B., Leboyer M., Gillberg C., Bourgeron T.; Paris Autism Research International Sibpair Study. (2003) "Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism". *Nat. Genet.* 34: 27-29.

Jamain S., Radyushkin K., Hammerschmidt K., Granon S., Boretius S., Varoqueaux F., Ramanantsoa N., Gallego J., Ronnenberg A., Winter D., Frahm J., Fischer J., Bourgeron T., Ehrenreich H., Brose N. (2008) "Reduced social interaction and ultrasonic communication in a mouse model of monogenic heritable autism". *Proc. Nat. Acad. Sci.* 105: 1710-1715.

Kim H. G., Kishikawa S., Higgins A. W., Seong I. S., Donovan D. J., Shen Y., Lally E., Weiss L. A., Najm J., Kutsche K., Descartes M., Holt L., Braddock S., Troxell R., Kaplan L., Volkmar F., Klin A., Tsatsanis K., Harris D. J., Noens I., Pauls D. L., Daly M. J., MacDonald M. E., Morton C. C., Quade B. J., Gusella J. F. (2008) "Disruption of neurexin 1 associated with autism spectrum disorder". *Am. J. Hum. Genet.* 82: 199-207.

Klemmer P., Meredith R. M., Holmgren C. D., Klychnikov O. I., Stahl-Zeng J., Loos M., van der Schors R. C., Wortel J., de Wit H., Spijker S., Rotaru D. C., Mansvelder H. D., Smit A. B., Li K. W. "Proteomics, ultrastructure, and physiology of hippocampal synapses in a fragile X syndrome mouse model reveal presynaptic phenotype". *J Biol Chem.* 2011 286:25495-25504.

Krueger D. D., Osterweil E. K., Chen S. P., Tye L. D., Bear M. F. (2011) "Cognitive dysfunction and prefrontal synaptic abnormalities in a mouse model of fragile X syndrome". *Proc. Natl Acad. Sci.* EE.UU. 108: 2587-2592.

Lauterborn J. C., Rex C. S., Kramár E., Chen L. Y., Pandeyarajan V., Lynch G., Gall C. M. (2007) "Brain-derived neurotrophic factor rescues synaptic plasticity in a mouse model of fragile X syndrome". *J. Neurosci.* 27: 10685-10694.

Lintas C., Persico A. M. (2009) "Autistic phenotypes and genetic testing: state-of-the-art for the clinical geneticist". *J. Med. Genet.* 46: 1-8.

Makkonen I., Kokki H., Kuikka J., Turpeinen U., Riikonen R. "Effects of fluoxetine treatment on striatal dopamine transporter binding and cerebrospinal fluid insulin-like growth factor-1 in children with autism". *Neuropediatrics.* 2011 42:207-209.

Marchetto *et al.* (2010) "A model for neuronal development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells". *Cell* 143:527-539 (incluyendo información suplementaria).

Marshall C. R., Noor A., Vincent J. B., Lionel A. C., Feuk L., Skaug J., Shago M., Moessner R., Pinto D., Ren Y., Thiruvahindrapuram B., Fiebig A., Schreiber S., Friedman J., Ketelaars C. E., Vos Y. J., Ficicioglu C., Kirkpatrick S., Nicolson R., Sloman L., Summers A., Gibbons C. A., Teebi A., Chitayat D., Weksberg R., Thompson A., Vardy C., Crosbie V., Luscombe S., Baatjes R., Zwaigenbaum L., Roberts W., Fernandez B., Szatmari P., Scherer S. W. (2008) "Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder". *Am J Hum Genet.* 82: 477-488.

Minshew N. J., Williams D. L. "The new neurobiology of autism: cortex, connectivity, and neuronal organization". *Arch Neurol.* 2007 64:945-950.

Moessner R., Marshall C. R., Sutcliffe J. S., Skaug J., Pinto D., Vincent J., Zwaigenbaum L., Fenandez B., Roberts W., Szatmari P., Scherer S. W. (2007) "Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder". *Am. J. Hum. Genetics* 81: 1289-1297.

Moretti P., Levenson J. M., Battaglia F., Atkinson R., Teague R., Antalffy B., Armstrong D., Arancio O., Sweatt J. D., Zoghbi H. Y. (2006) "Learning and memory and synaptic plasticity are impaired in a mouse model of Rett syndrome". *J. Neurosci.* 26: 319-327.

Pailor, R., Glaser, B., Mupo, A., Ataliotis, P., Spencer, C., Sobotka, A., Sparks, C., Choi, C. H., Oghalai, J., Curran, S., Murphy, K. C., Monks, S., Williams, N., O'Donovan, M. C., Owen, M. J., Scambler, P. J. y Lindsay, E. (2006). *PNAS* 103, 7729-7734.

Penagarikano, O., Abrahams, B. S., Herman, E. I., Winden, K. D., Gdalyahu, A., Dong, H., Sonnenblick, L. I., Gruver, R., Almajano, J., Bragin, A., Golshani, P., Trachtenberg, J. T., Peles, E. y Geschwind, D. H. (2011). "Absence of CNTNAP2 Leads to Epilepsy, Neuronal Migration Abnormalities, and Core Autism-Related Deficits". *Cell* 147, 235-246.

Riikonen R., Makkonen I., Vanhala R., Turpeinen U., Kuikka J., Kokki H. (2006) "Cerebrospinal fluid insulin-like growth factors IGF-1 and IGF-2 in infantile autism". *Dev. Med. Child Neurol.* 48: 751-755.

Sebat J., Lakshmi B., Malhotra D., Troge J., Lese-Martin C., Walsh T., Yamrom B., Yoon S., Krasnitz A., Kendall J., Leotta A., Pai D., Zhang R., Lee Y. H., Hicks J., Spence S. J., Lee A. T., Puura K., Lehtimäki T., Ledbetter D., Gregersen P. K., Bregman J., Sutcliffe J. S., Jobanputra V., Chung W., Warburton D., King M. C., Skuse D., Geschwind D. H., Gilliam T. C., Ye K., Wigler M. (2007) "Strong association of de novo copy number variation mutations with autism". *Science* 316(5823): 445-449.

Schaevitz L. R., Moriuchi J. M., Nag N., Mellot T. J., Berger-Sweeney J. (2010) "Cognitive and social functions and growth factors in a mouse model of Rett syndrome". *Physiol. Behav.* 100: 255-263.

Schütt J., Falley K., Richter D., Kreienkamp H. J., Kindler S. (2009) "Fragile X mental retardation protein regulates the levels of scaffold proteins and glutamate receptors in postsynaptic densities". *J. Biol. Chem.* 284: 25479-25487.

Silverman JL, Turner SM, Barkan CL, Tolu SS, Saxena R, Hung AY, Sheng M, Crawley JN: Sociability and motor functions in Shank1 mutant mice. *Brain Res* 2010.

Silverman J. L., Yang M., Lord C., Crawley J. N: "Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism". *Nat Rev Neurosci* 2010, 11:490-502.

- Spence S. J., Schneider M. T. "The role of epilepsy and epileptiform EEGs in autism spectrum disorders". *Pediatr Res.* 2009 65:599-606.
- 5 Spencer C. M., Alekseyenko O., Serysheva E., Yuva-Pailor L. A., Pailor R. (2005) "Altered anxiety-related and social behaviors in the Fmr1 knockout mouse model of fragile X syndrome". *Genes Brain Behav.* 4: 420-430.
- 10 Strauss, K. A., Puffenberger, E. G., Huentelman, M. J., Gottlieb, S., Dobrin, S. E., Parod, J. M., Stephan, D. A. y Morton, D. H. (2006). "Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant contactin-associated protein-like 2". *N. Engl. J. Med.* 354, 1370-1377.
- 15 Stromme, P., Dobrenis, K., Sillitoe, R. V., Gulinello, M., Ali, N. F., Davidson, C., Micsenyi, M. C., Stephney, G., Ellekog, L., Klungland, A. y Walkley, S. U. (2011). "X-linked Angelman-like syndrome caused by Slc9a6 knockout in mice exhibits evidence of endosomal-lysosomal dysfunction". *Brain.* 134:3369-3383.
- 20 Sykes N. H., Toma C., Wilson N., Volpi E. V., Sousa I., Pagnamenta A. T., Tancredi R., Battaglia A., Maestrini E., Bailey A. J., Monaco A. P.; International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (IMGSAC). (2009) "Copy number variation and association analysis of SHANK3 as a candidate gene for autism in the IMGSAC collection". *Eur. J. Hum. Genet.* 17: 1347-1353.
- 25 Tabuchi K., Blundell J., Etherton M. R., Hammer R. E., Liu X., Powell C. M., Südhof T. C. (2007) "A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice". *Science* 318(5847): 71-76.
- 30 Takayanagi Y., Fujita E., Yu Z., Yamagata T., Momoi M. Y., Momoi T., Onaka T., (2010) "Impairment of social and emotional behaviors in Cadm1-knockout mice". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396: 703-708.
- 35 Tropea D., Giacometti E., Wilson N. R., Beard C., McCurry C., Fu D. D., Flannery R., Jaenisch R., Sur M. (2009) "Partial reversal of Rett Syndrome-like symptoms in MeCP2 mutant mice". *Proc. Natl Acad. Sci.* EE.UU. 106: 2029-2034.
- 40 Vernes, S. C., Newbury, D. F., Abrahams, B. S., Winchester, L., Nicod, J., Groszer, M., Alarcon, M., Oliver, P. L., Davies, K. E., Geschwind, D. H., Monaco, A. P. y Fisher, S. E. (2008). "A functional genetic link between distinct developmental language disorders". *N. Engl. J. Med.* 359, 2337-2345.
- 45 Yan J., Noltner K., Feng J., Li W., Schroer R., Skinner C., Zeng W., Schwartz C. E., Sommer S. S. (2008) "Neurexin 1alpha structural variants associated with autism". *Neurosci Lett.* 438: 368-370.
- 50 Yan Q. J., Asafo-Adjei P. K., Arnold H. M., Brown R. E., Bauchwitz R. P., (2004) "A phenotypic and molecular characterization of the fmr1-tm1Cgr fragile X mouse". *Genes Brain Behav.* 3:337-359.
- Yang M., Crawley J. N: "Simple behavioural assessment of mouse olfaction". *Curr Protoc Neurosci* 2009, Capítulo 8 (Unidad 8):24.
- 45 Zhiling Y., Fujita E., Tanabe Y., Yamagata T., Momoi T., Momoi M. Y. (2008) "Mutations in the gene encoding CADM1 are associated with autism spectrum disorder". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 926-929.
- 50 Zhao M. G., Toyoda H., Ko S. W., Ding H. K., Wu L. J., Zhuo M. (2005) "Deficits in trace fear memory and long-term potentiation in a mouse model for fragile X syndrome". *J. Neurosci.* 25: 7385-7392, (Errata en: *J Neurosci.* 2005, 25: 8112).
- 50 Zoghbi H. Y., (2005) "MeCP2 dysfunction in humans and mice". *J Child Neurol.* 20: 736-740.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Glicil-2-metil-L-prolil-L-glutamato (G-2-MePE) para su uso en el tratamiento de un síntoma seleccionado del grupo que consiste en el funcionamiento social alterado y el comportamiento repetitivo de un trastorno del espectro autista (ASD) en un animal mediante la administración oral de una cantidad eficaz de G-2-MePE.
- 10 2. El G-2-MePE para el uso de la reivindicación 1, en el que dicho tratamiento produce una mejoría de dicho síntoma evaluado por uno o más ensayos del comportamiento seleccionados del grupo que consiste en la historia natural/escala de gravedad clínica del síndrome de Rett, la edición de la comunidad de la lista de control del comportamiento aberrante (ABC), escala de Vineland, la impresión clínica global de la gravedad (CGI-S), y el cuestionario del cuidador (CSQ), o uno o más ensayos fisiológicos seleccionados del grupo que consiste en la frecuencia de picos del electroencefalograma (EEG), la potencia global de las bandas de frecuencia de un EEG, el movimiento de las manos, QTc y variabilidad de la frecuencia cardíaca (HRV) e irregularidades respiratorias en comparación con los animales de control que no padecen dicho síntoma.
- 15 3. El G-2-MePE para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho ASD se selecciona del grupo que consiste en autismo, síndrome de X frágil, síndrome de Rett (RTT), trastorno autista, síndrome de Asperger, trastorno disociativo de la infancia y trastorno generalizado del desarrollo no especificado (PDD-NOS), y evitación de la demanda patológica (PDA).
- 20 4. El G-2-MePE para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, estando dicha cantidad eficaz de G-2-MePE en el intervalo de 1 mg/kg a 100 mg/kg.
- 25 5. El G-2-MePE para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el segundo agente terapéutico se selecciona de un grupo que consiste en: factor de crecimiento similar a la insulina-I (IGF-I), factor de crecimiento similar a la insulina II (IGF-II), glicil-prolil-glutamato (GPE), factor de crecimiento transformante β -1, activina, hormona del crecimiento, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), proteína de unión a la hormona del crecimiento, proteínas de unión a IGF (en especial, IGFBP-3), factor de crecimiento básico de fibroblastos, factor de crecimiento ácido de fibroblastos, producto génico hst/Kfgk, FGF-3, FGF-4, FGF-6,
- 30 factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento inducido por andrógenos, int-2, factor 1 homólogo al factor de crecimiento de fibroblastos (FHF-1), FHF-2, FHF-3 y FHF-4, factor 2 de crecimiento de queratinocitos, factor de activación glial, FGF-10 y FGF-16, factor neurotrófico ciliar, factor de crecimiento derivado del cerebro, neurotrofina 3, neurotrofina 4, proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2), factor neurotrófico derivado de la estirpe celular glial, factor neurotrófico dependiente de la actividad, factor inhibidor de la leucemia de citoquinas, oncostatina M, interleucina, interferón α , β , y γ o consenso, TNF- α , clometiazol; ácido kinurénico, Semax, tacrolimus, L-treo-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolin-1-propanol, análogo de andrenocorticotropina-(4-9) [ORG 2766] y dizolcipina (MK-801), selegilina; antagonistas de glutamato tales como memantina (Namenda) NPS1506, GV1505260, MK-801, GV150526;
- 35 antagonistas de AMPA tales como 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoilbenzo(f)quinoxalina (NBQX), LY303070 y LY300164; agentes antiinflamatorios dirigidos contra la adhesina MAdCAM-1 y/o sus receptores de integrina α 4 (α 4 β 1 y α 4 β 7), tales como mAb MECA-367 anti-MAdCAM-1 (ATCC n.º de acceso HB-9478), fenobam, un inhibidor selectivo de la recaptación de la serotonina tal como la fluoxetina o un agente antipsicótico atípico tal como la risperidona, se administra al animal.
- 40 6. El G-2-MePE para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la dosis de dicho compuesto es de 10 mg/kg tres veces al día o de 30 mg/kg tres veces al día.
- 45 7. El G-2-MePE para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho animal es un ser humano.

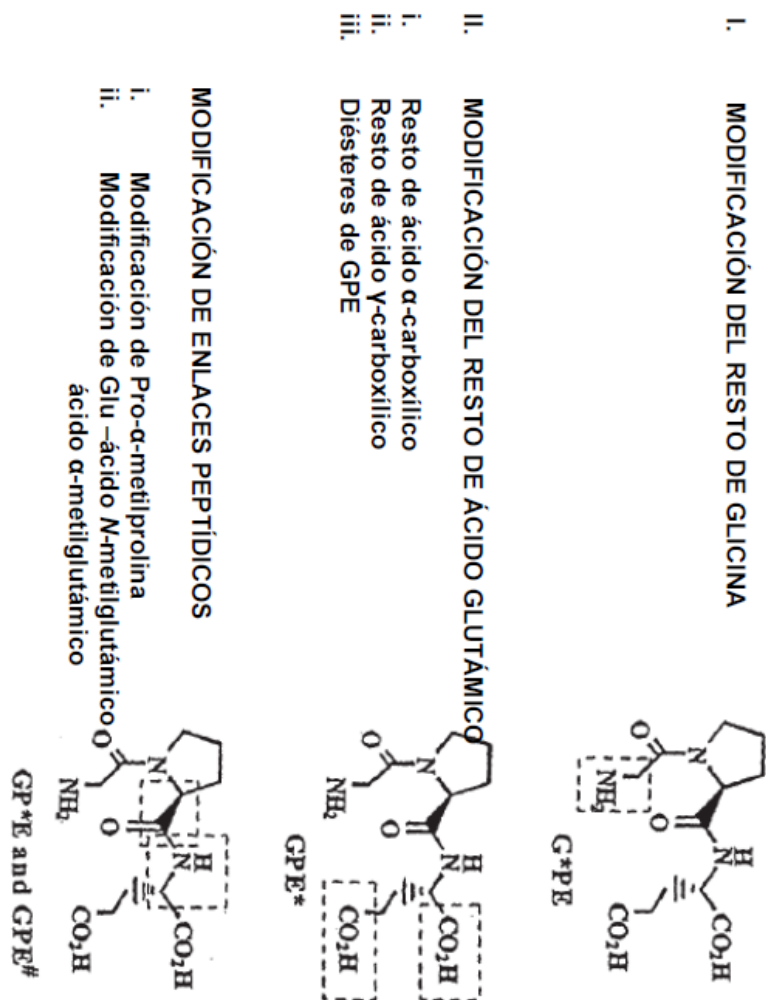


Figura 1

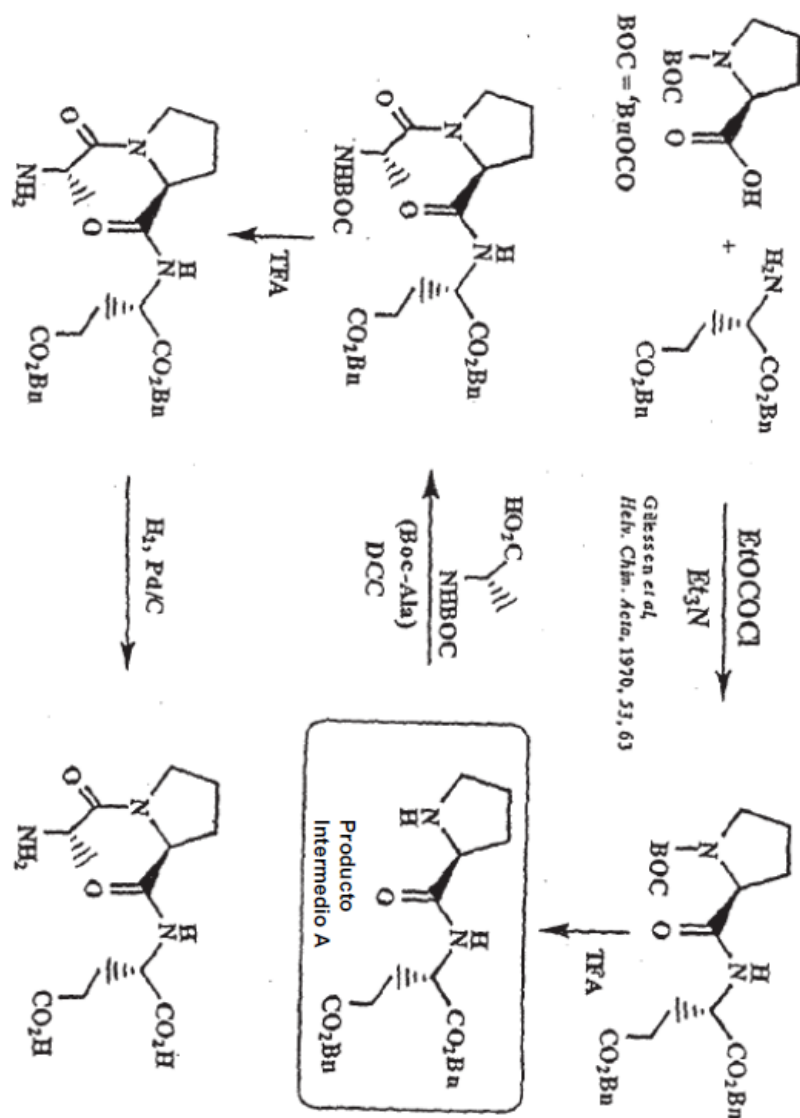


Figura 2

De manera similar:

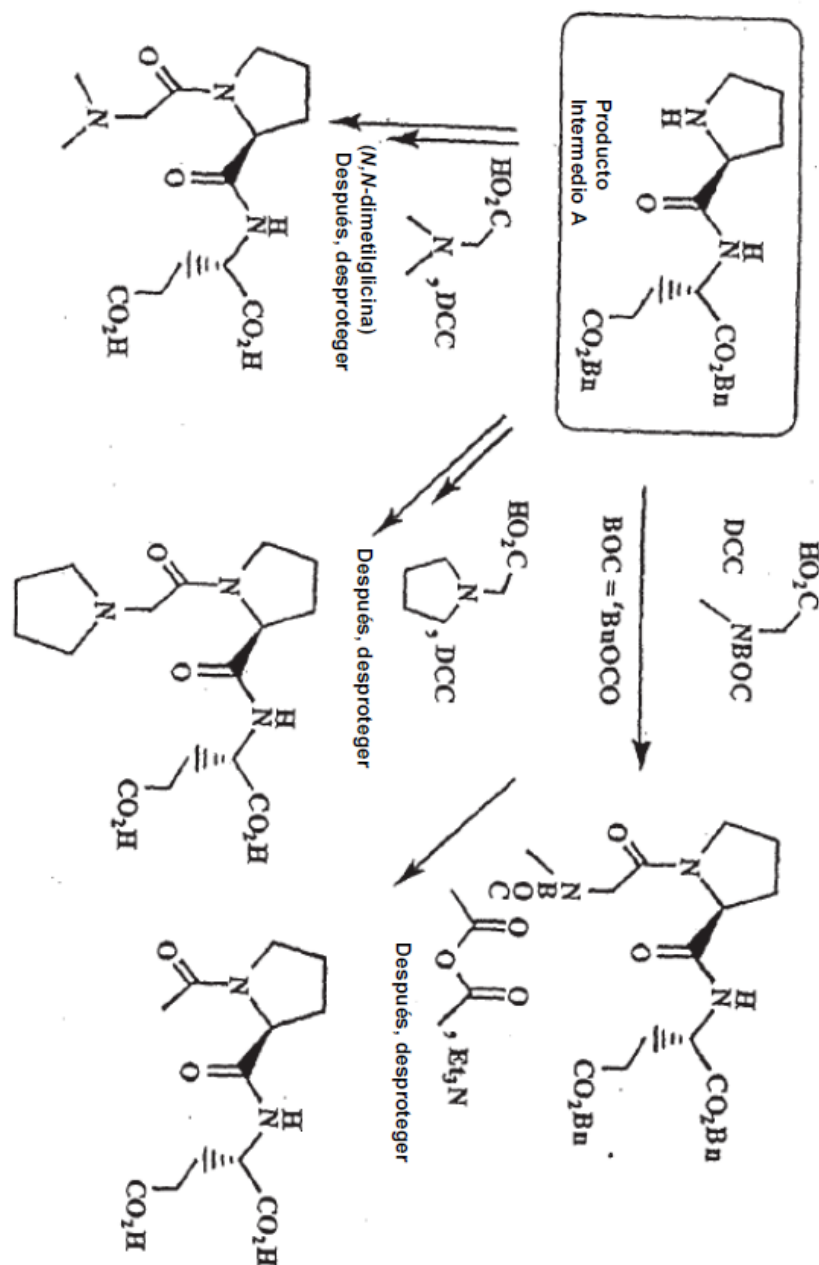


Figura 3

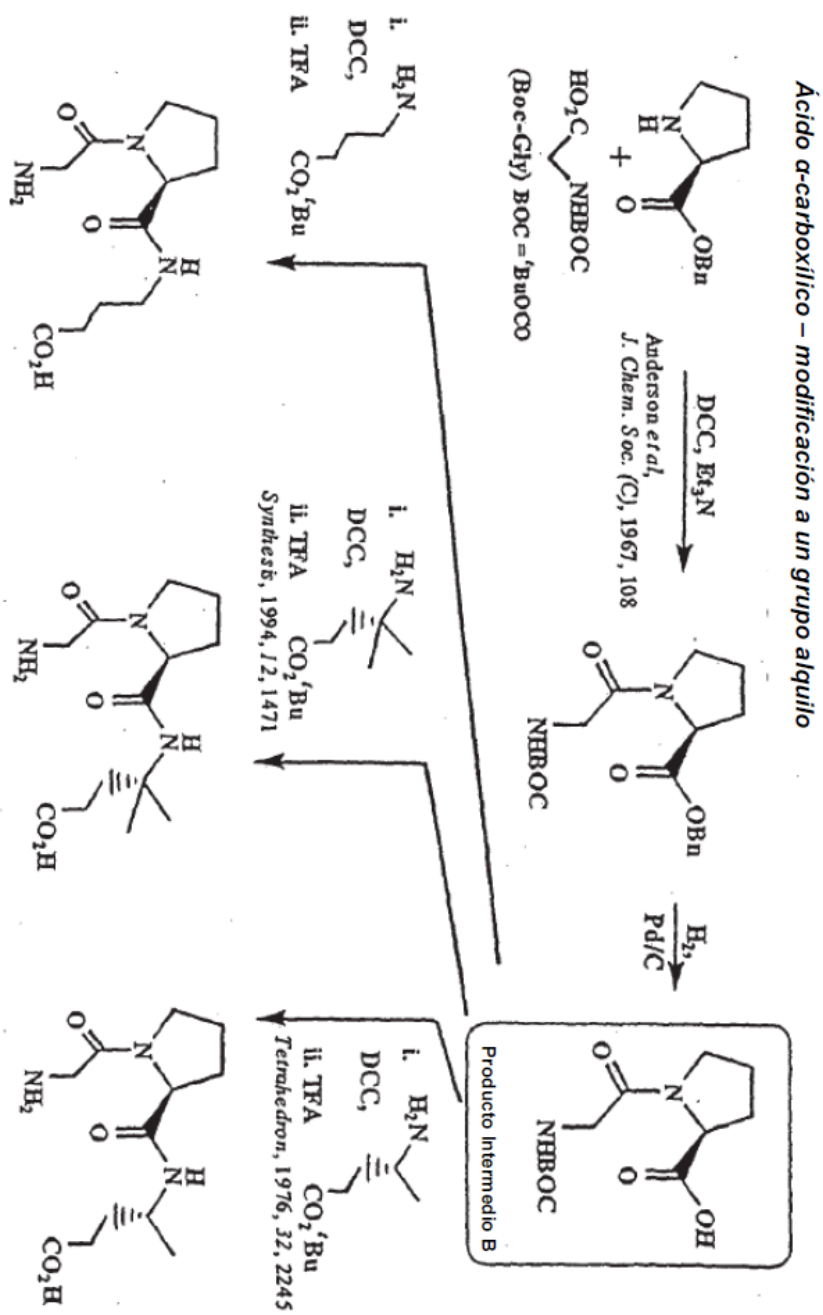
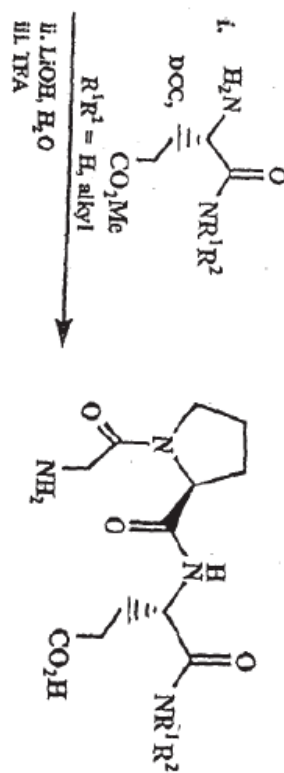
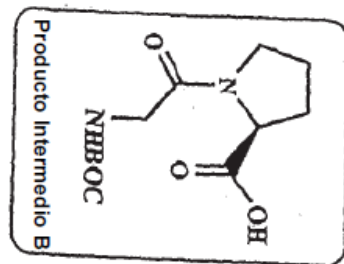


Figura 4

Ácido α-carboxílico – modificación a una amida



Síntesis de amida

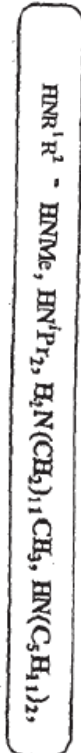
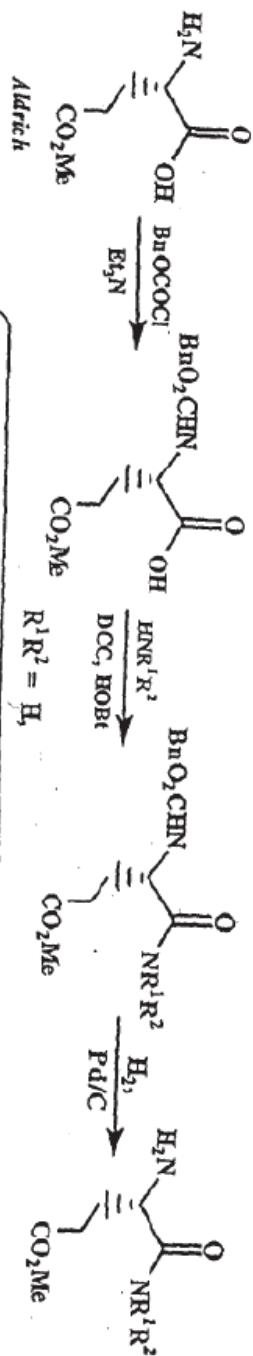


Figura 5

Reducción de ácido γ-carboxílico – profármaco de lactona

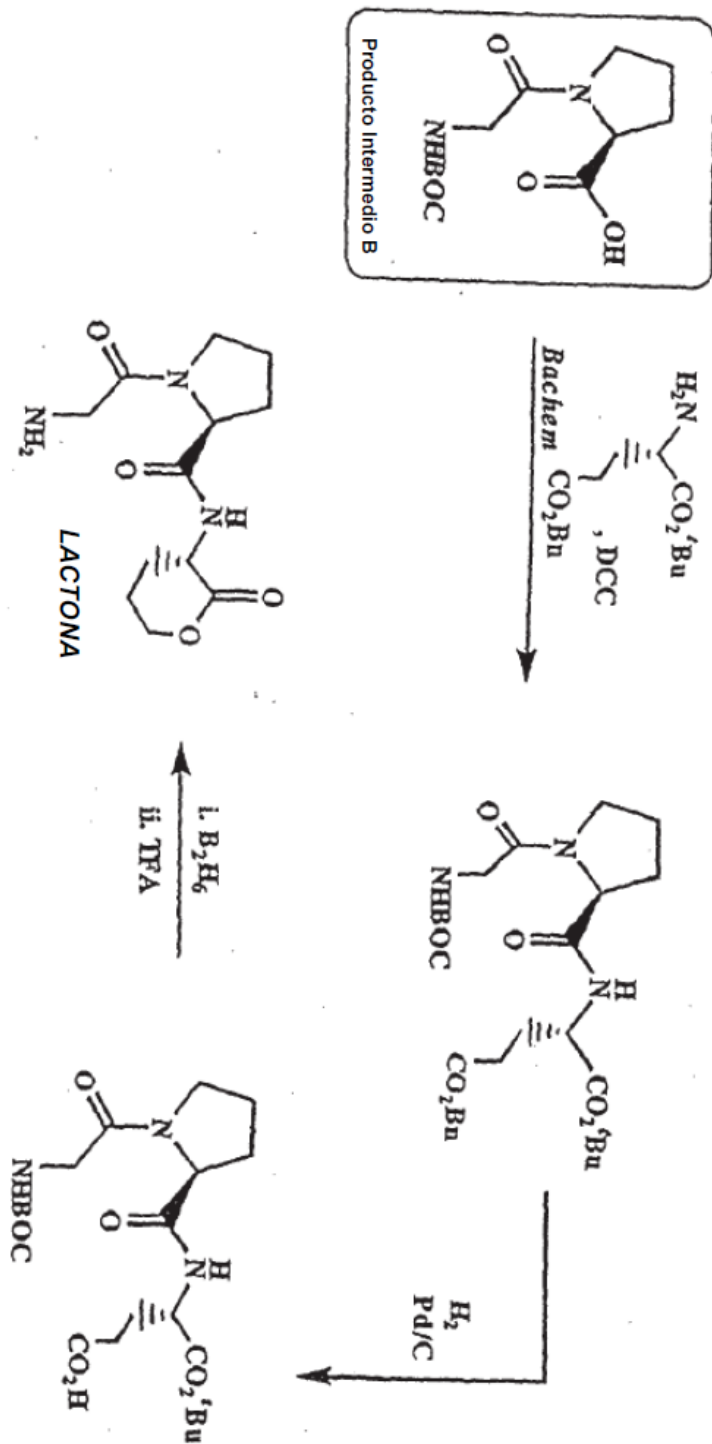


Figura 6

Ácido γ-carboxílico – modificación a un grupo alquilo

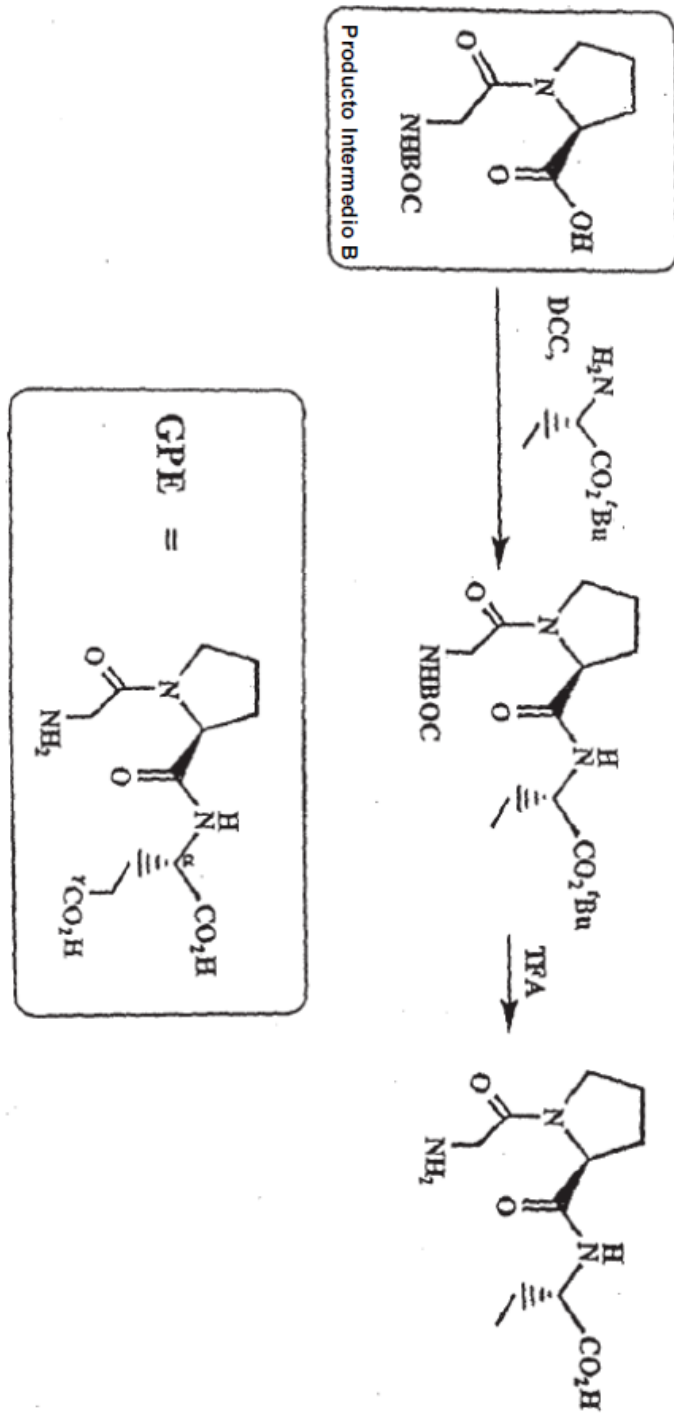
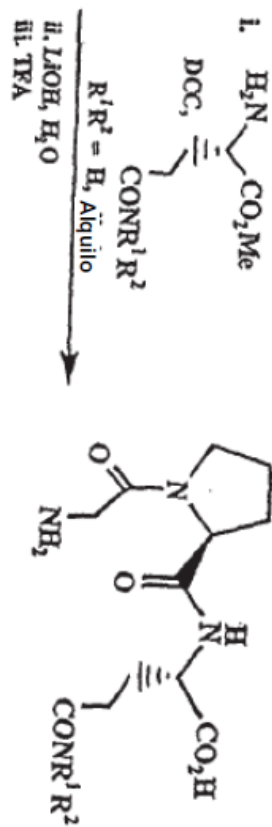
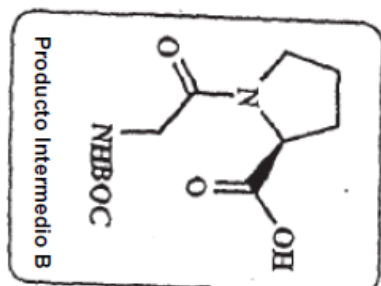


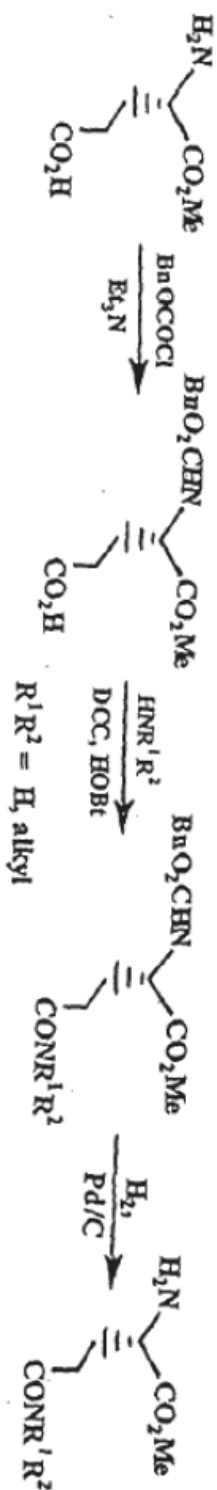
Figura 7

Ácido γ-carboxílico – modificación a una amida



$\text{NR}^1\text{R}^2 = \text{NH}_2$ (metiléster de L-glutamina)

Síntesis de amida



Por ejemplo, $\text{HNR}^1\text{R}^2 = \text{HN}(\text{CH}_2\text{Ph})_2, \text{NEt}_2,$

Figura 8

Reducción de ácido γ-carboxílico – profármaco de lactona

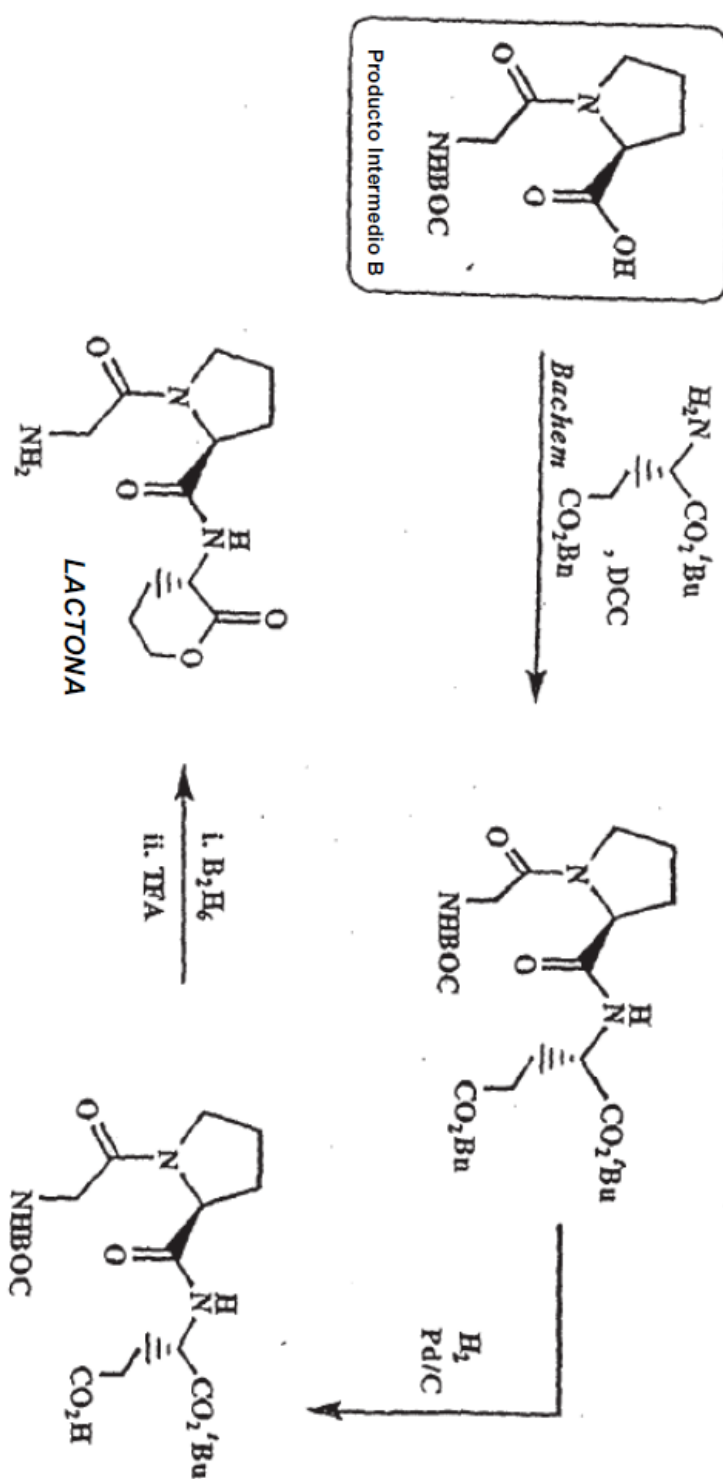
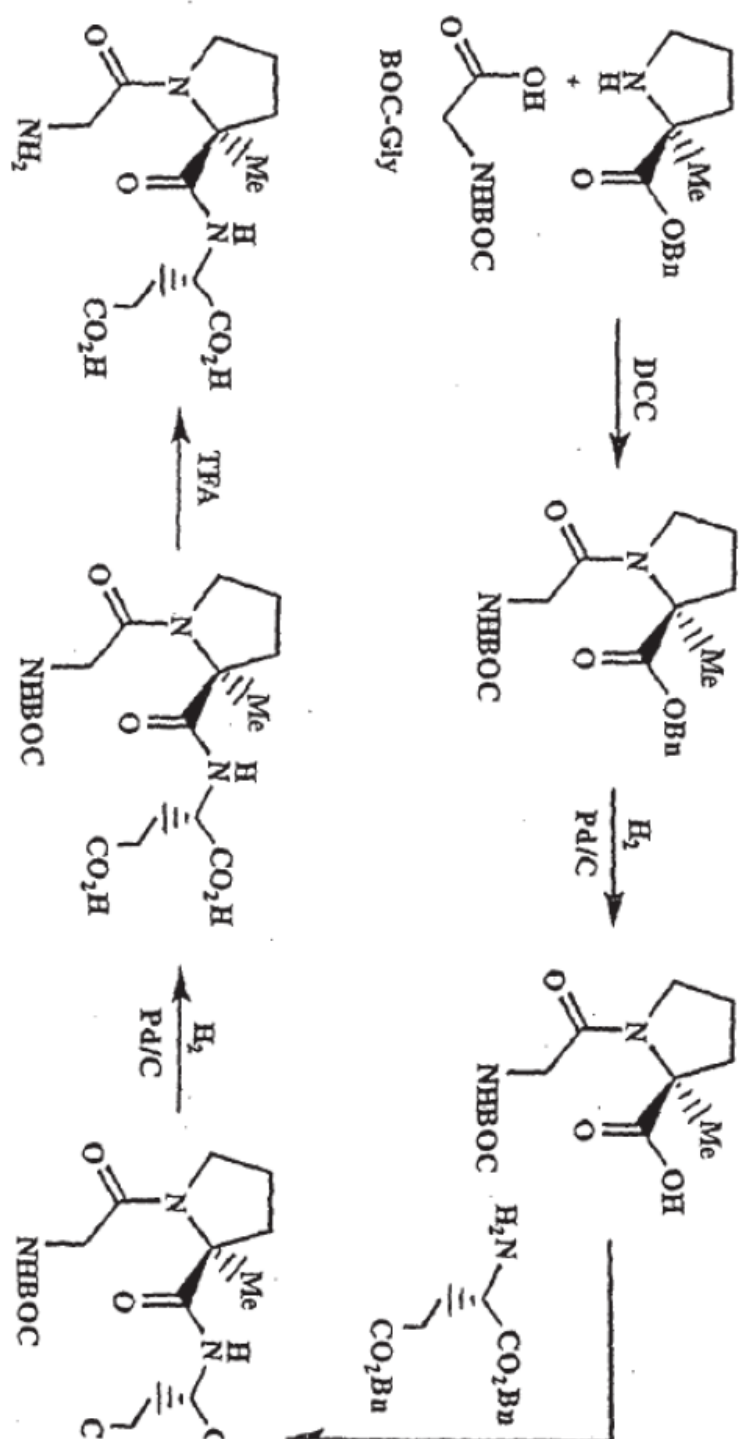


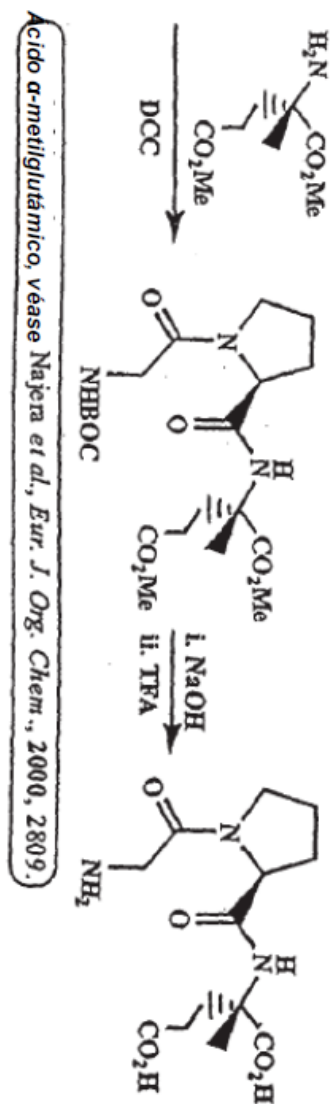
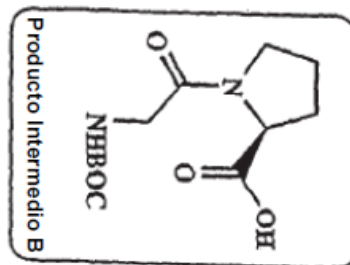
Figura 9

(S)- α -metilprolina

\alpha-metilprolina, véase: Seebach *et al.*, *Org. Synth.*, 1995, 72, 62.

Figura 10

Ácido (S)-α-metilglutâmico



Ácido N-metilglutâmico

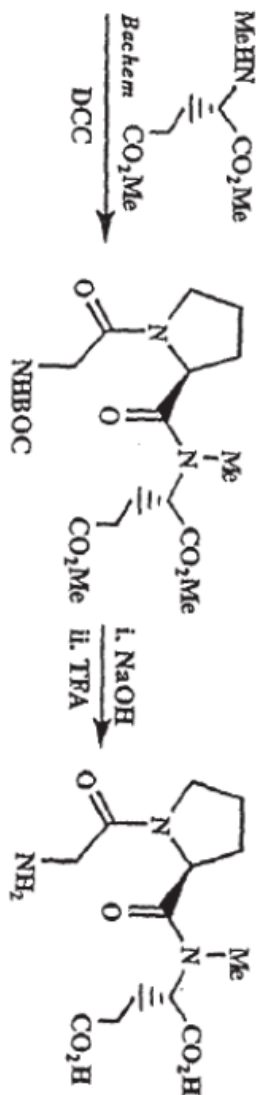
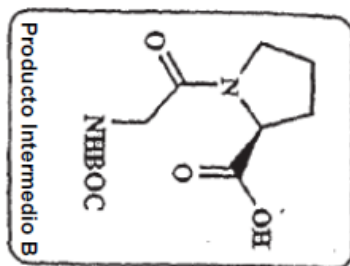


Figura 11

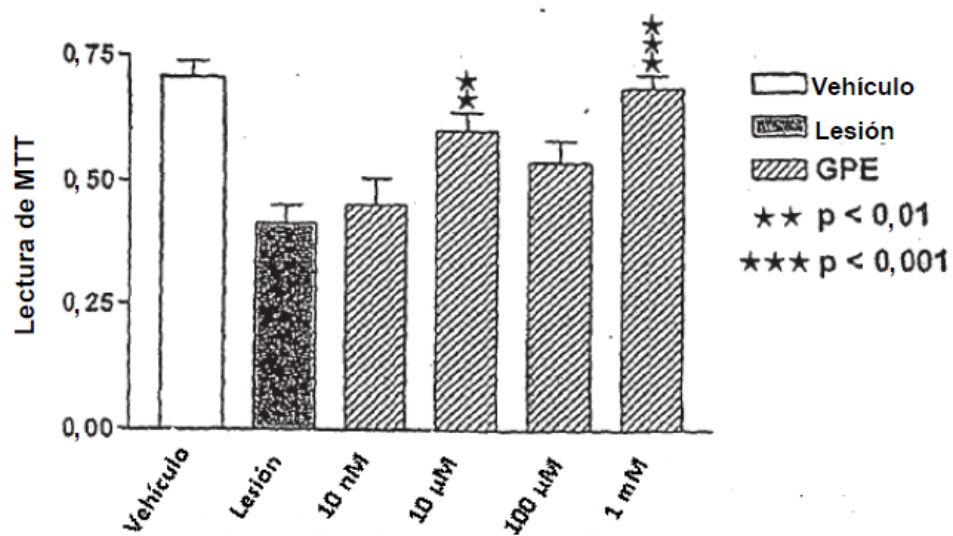


Figura 12

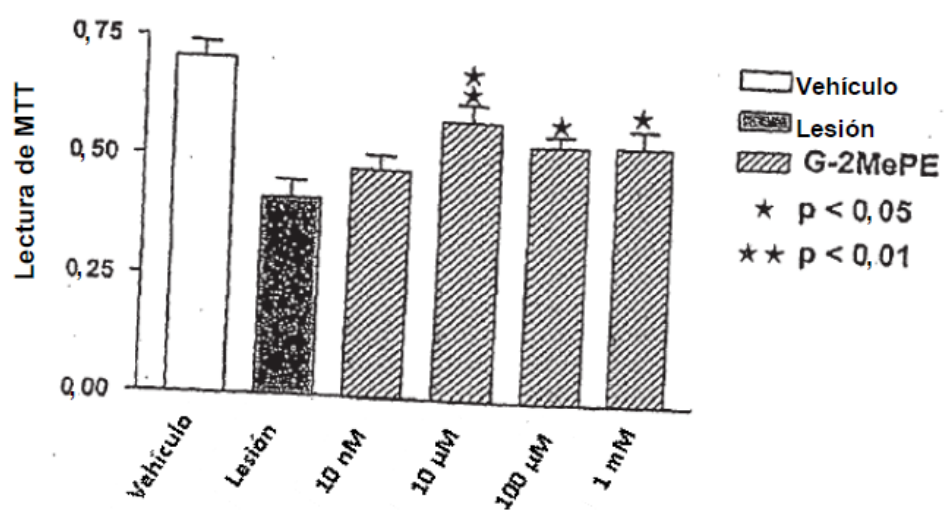
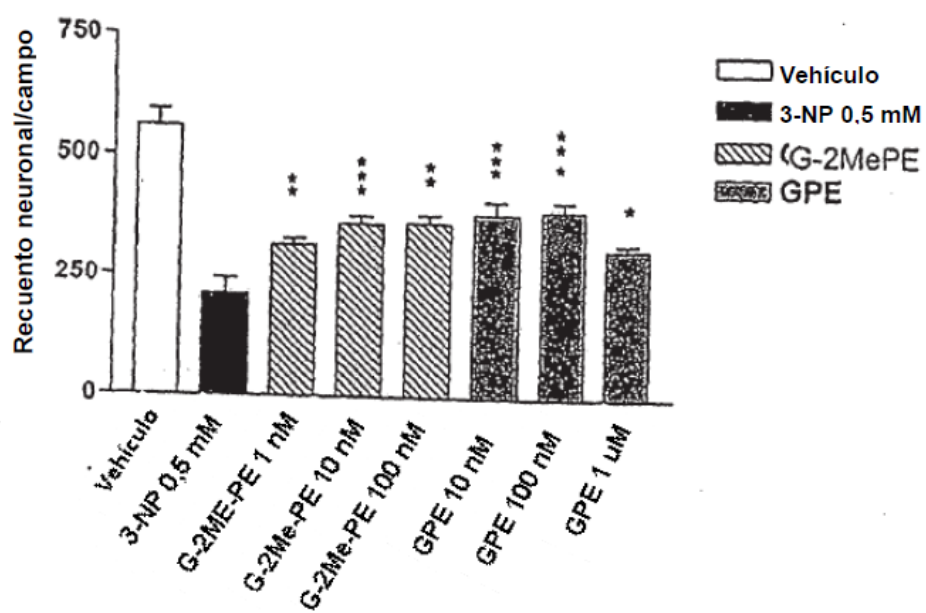


Figura 13

**Figura 14**

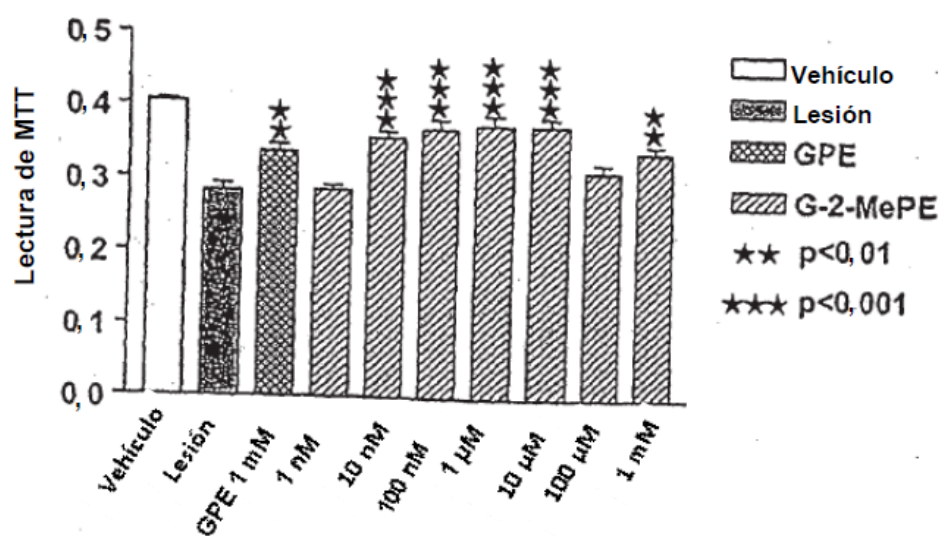


Figura 15

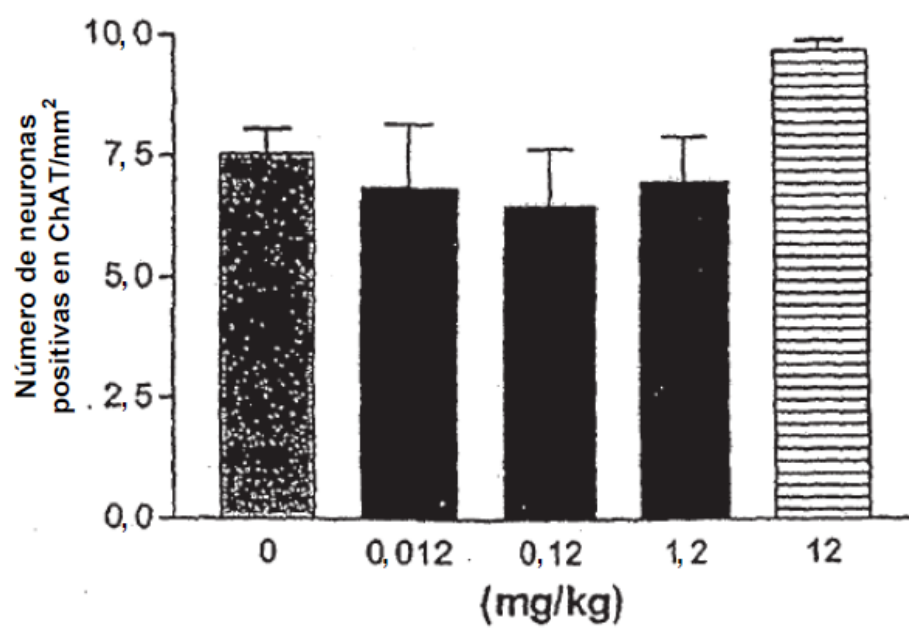


Figura 16

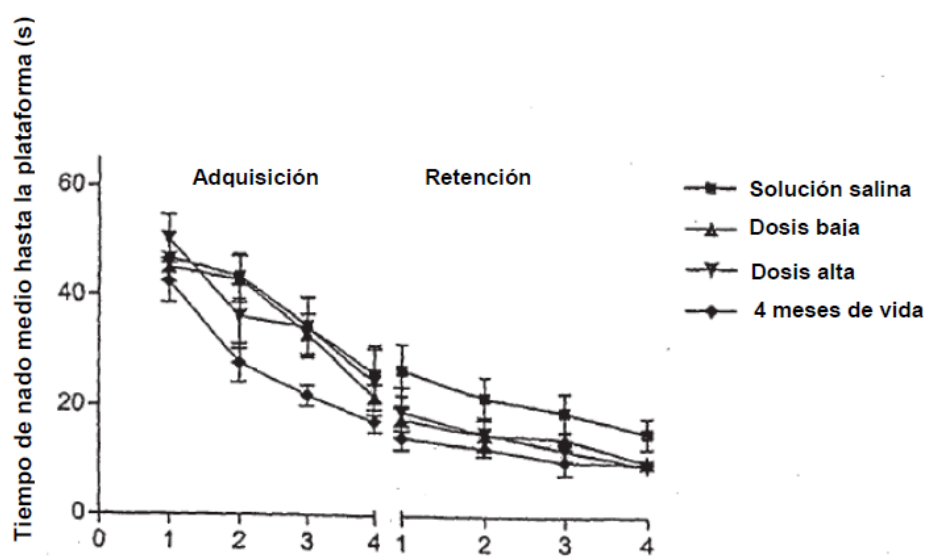


Figura 17

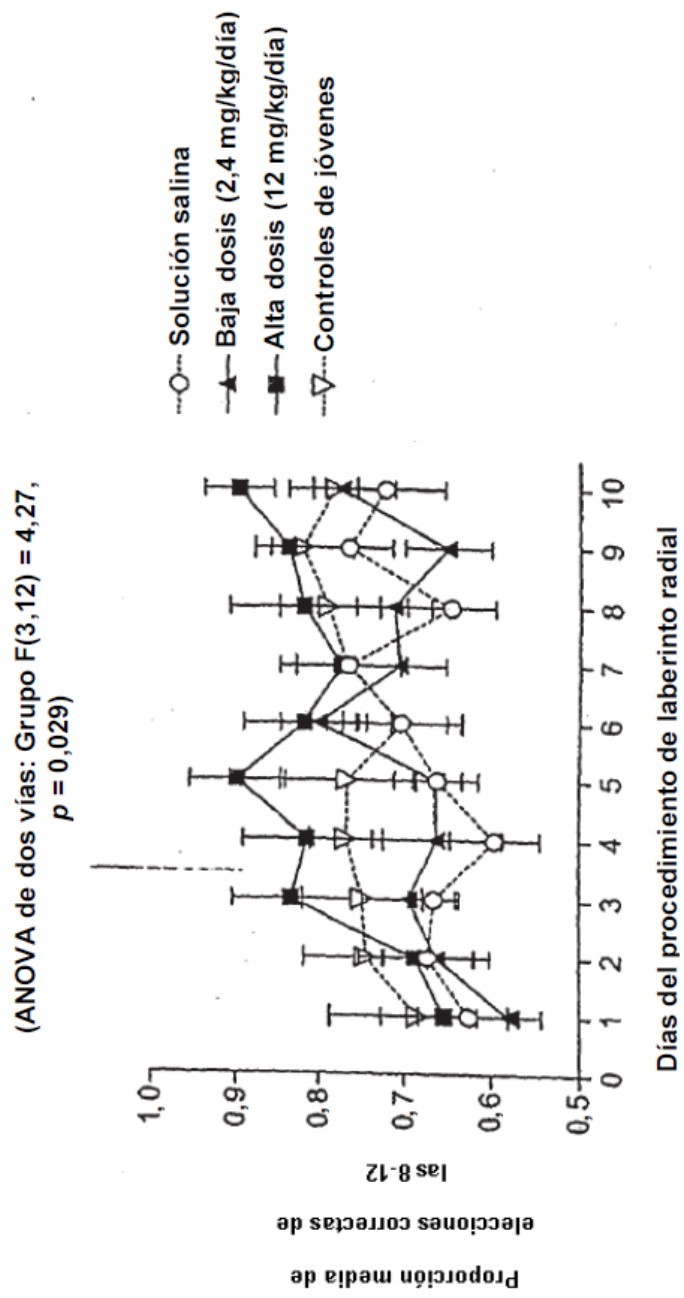


Figura 18A

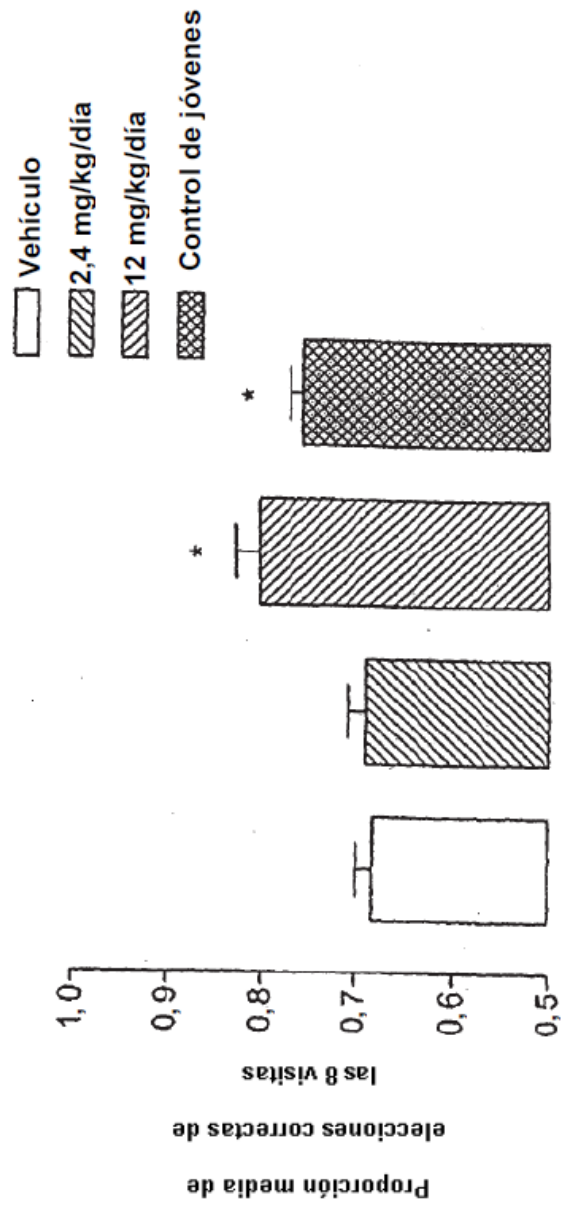


Figura 18B

**G-2MePE potencia la proliferación
celular en la SVZ de ratas
envejecidas**

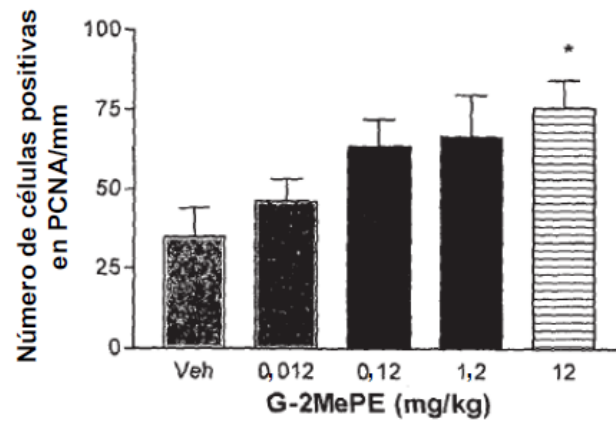


Figura 19A

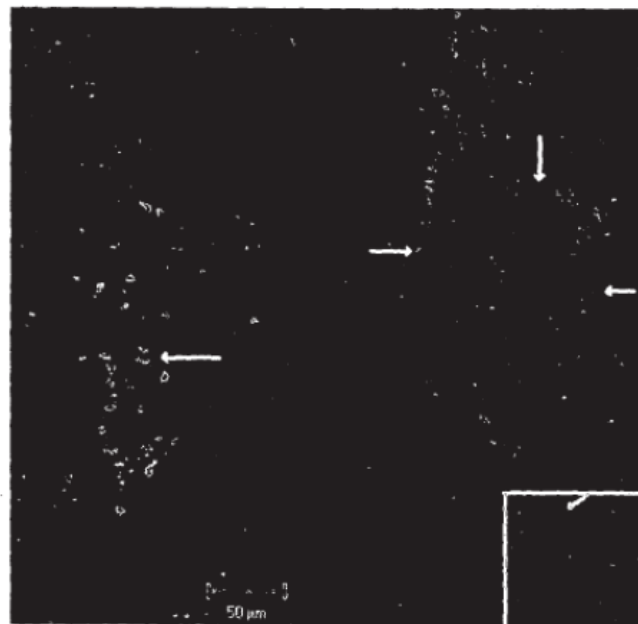


Figura 19B

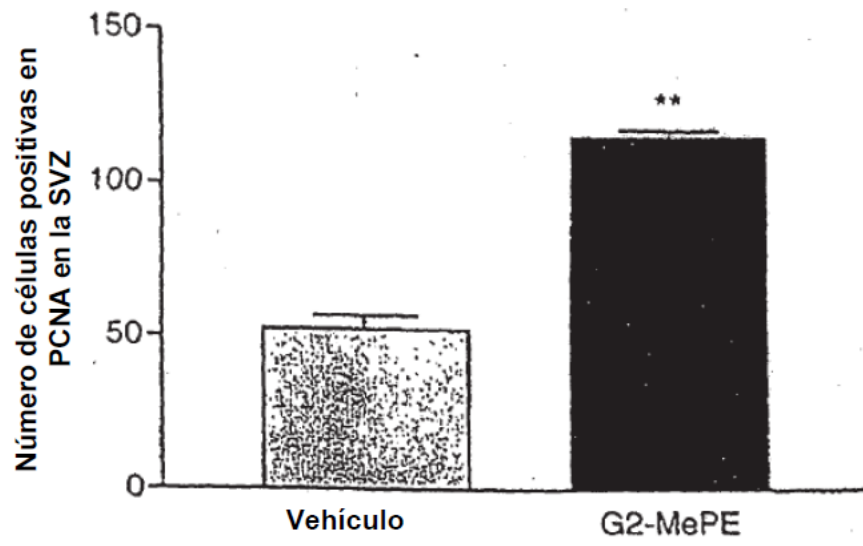


Figura 19C

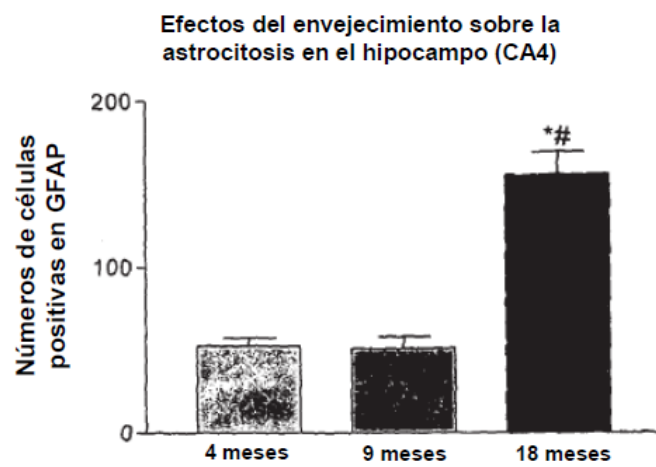


Figura 20A



Figura 20B

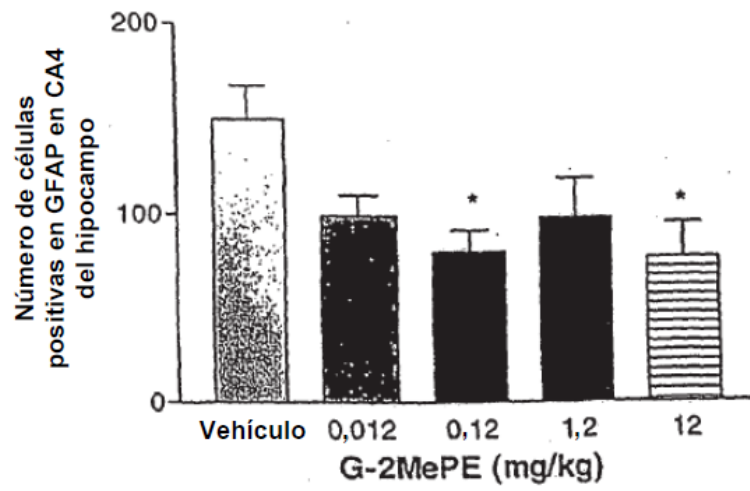


Figura 20C

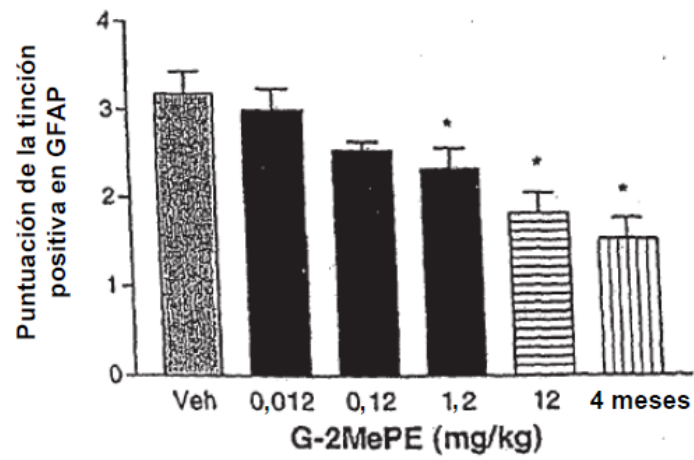


Figura 20D

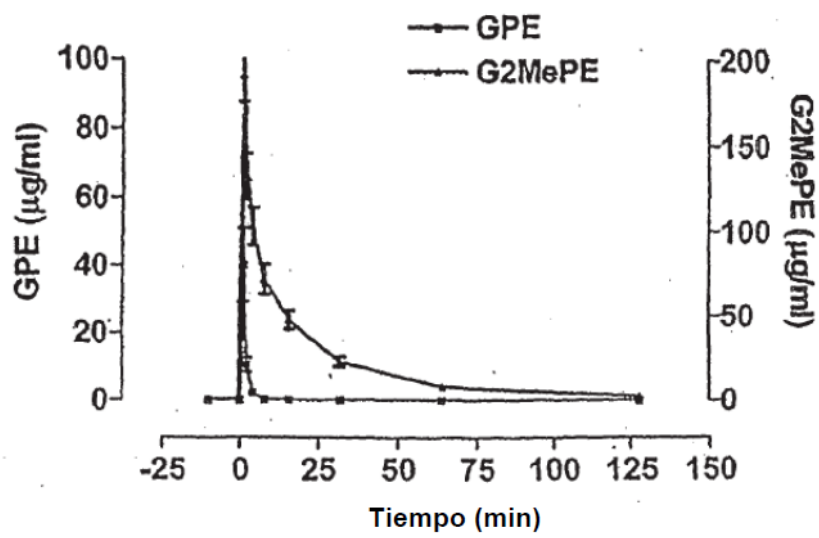


Figura 21

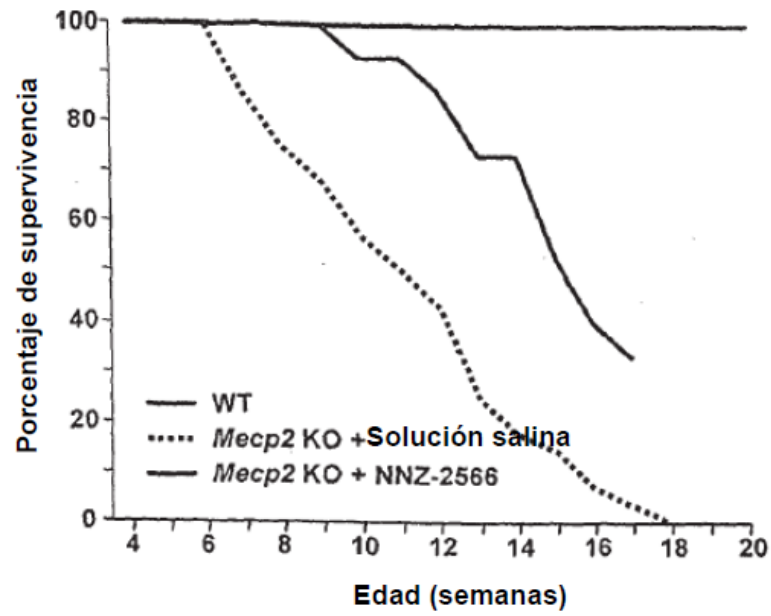


Figura 22

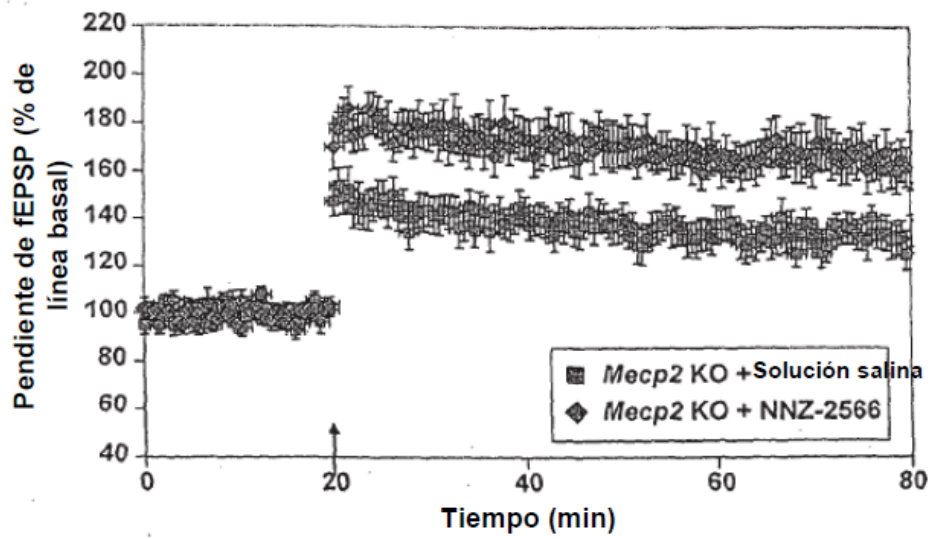


Figura 23

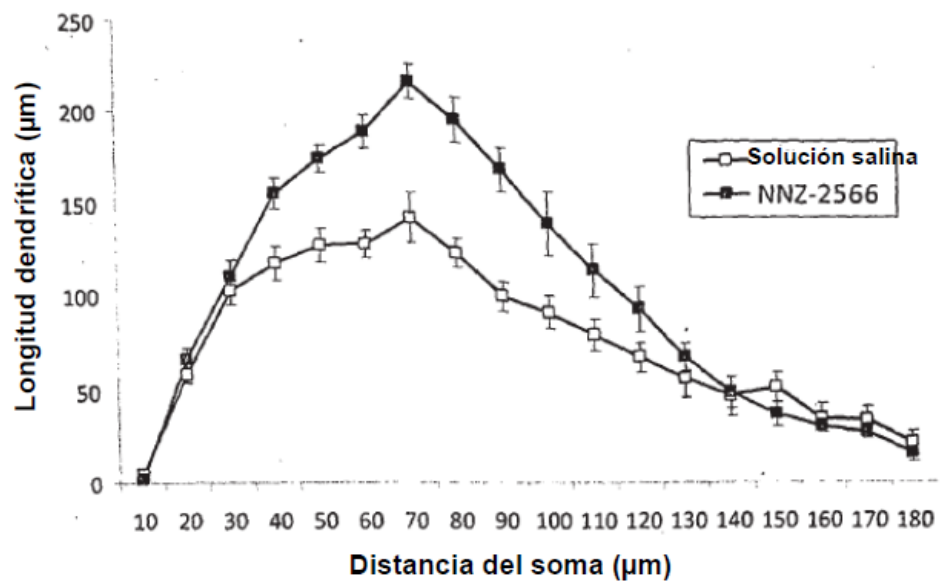


Figura 24