

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 797 374**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/499** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.07.2014** **PCT/US2014/047801**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2015** **WO15013397**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2014** **E 14829224 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020** **EP 3024463**

54 Título: **Compuestos bicíclicos neuroprotectores y métodos para su uso en el tratamiento de trastornos del espectro autista y trastornos del neurodesarrollo**

30 Prioridad:

**25.07.2013 US 201361958329 P**

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

**02.12.2020**

73 Titular/es:

**NEUREN PHARMACEUTICALS LIMITED (100.0%)  
Level 15 PWC Tower, 188 Quay Street  
Auckland 1141, NZ**

72 Inventor/es:

**GLASS, LAWRENCE IRWIN;  
BICKERDIKE, MICHAEL JOHN;  
SNAPE, MICHAEL FREDERICK y  
DE COGRAM, PATRICIA PEREZ**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 797 374 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

Compuestos bicíclicos neuroprotectores y métodos para su uso en el tratamiento de trastornos del espectro autista y trastornos del neurodesarrollo

### Reivindicación de prioridad

- 5 Esta solicitud de patente Internacional reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos No. 61/958,329 presentada el 25 de julio de 2013 titulada "Neuroprotective Bicyclic Compounds and Methods for Their Use in Treating Autism Spectrum Disorders and Neurodevelopmental Disorders", inventores Lawrence Irwin Glass, Michael John Bickerdike, Michael Fredrick Snape y Patricia Pérez de Cogram.

### Campo de la invención

- 10 La presente invención se refiere a nuevos compuestos bicíclicos estructuralmente relacionados con dicetopiperazinas y a métodos para su uso terapéutico. En particular, esta invención se refiere a la actividad neuroprotectora de tales compuestos. Más particularmente, esta invención se refiere al uso de glicilprolina cíclica ("cPG") y análogos de la misma, incluyendo glicil-2-alilprolina cíclica ("G-2-AlilP cíclica" o "cG-2-AlilP" o "NNZ 2591") y sus composiciones farmacéuticas en el tratamiento de trastornos del espectro autista (ASD) y trastornos del neurodesarrollo (NDD), tales como el síndrome de X frágil (FSX).

### Antecedentes

- Los trastornos del espectro autista (ASD) se diagnostican cada vez más. Los ASDs son una colección de trastornos asociados al desarrollo, caracterizados por anomalías en la interacción social y la comunicación, intereses restringidos y comportamientos repetitivos. Además del autismo clásico o trastorno autista, la quinta edición del Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5) de la American Psychiatric Association (APA) reconoce el síndrome de Asperger, el trastorno desintegrativo infantil y el trastorno generalizado del desarrollo no especificado de otra manera (PDD-NOS) como ASDs.

- Los trastornos del neurodesarrollo (NDDs) incluyen el síndrome de X frágil (FXS), el síndrome de Angelman, el complejo de esclerosis tuberosa, el síndrome de Phelan McDermid, el síndrome de Rett, las mutaciones de CDKL5 (que también están asociadas con el síndrome de Rett y el trastorno de espasmo infantil ligado a X) y otros. Muchos, pero no todos los NDDs son causados por mutaciones genéticas y, como tales, a veces se denominan trastornos monogénicos. Algunos pacientes con NDDs exhiben comportamientos y síntomas de autismo.

- Como ejemplo de un NDD, el síndrome de X frágil es un trastorno genético ligado a X en el que las personas afectadas tienen una discapacidad intelectual en diversos grados y muestran una variedad de síntomas psiquiátricos asociados. Clínicamente, el síndrome de X frágil se caracteriza por discapacidad intelectual, hiperactividad y problemas de atención, síntomas del espectro autista, labilidad emocional y epilepsia (Hagerman, 1997a). La epilepsia observada en el síndrome de X frágil se presenta con mayor frecuencia en la infancia, pero luego remite gradualmente hacia la edad adulta. La hiperactividad está presente en aproximadamente el 80 por ciento de los hombres afectados (Hagerman, 1997b). Las características físicas tales como orejas y mandíbulas prominentes e hiperextensibilidad de las articulaciones están frecuentemente presentes, pero no son diagnósticas. La discapacidad intelectual es la característica más común que define el fenotipo. En general, los hombres se ven más gravemente afectados que las mujeres. Las primeras impresiones de que las mujeres no se ven afectadas han sido reemplazadas por una comprensión de la presencia de dificultades de aprendizaje específicas y otras características neuropsiquiátricas en las mujeres. La discapacidad de aprendizaje presente en los hombres se vuelve más definida con la edad, aunque es más probable que este efecto longitudinal sea un reflejo de un aplanamiento de las trayectorias del desarrollo en lugar de un proceso neurodegenerativo explícito.

- El compromiso de la función cerebral que se observa en el síndrome de X frágil es paralelo a los cambios en la estructura cerebral en seres humanos. Los estudios de exploración mediante imágenes por resonancia magnética revelan que el síndrome de X frágil está asociado con volúmenes cerebrales más grandes de lo que cabría esperar en los controles compatibles y que este cambio se correlaciona con la expansión de trinucleótidos en la región promotora de FMRP (Jakala et al., 1997). A nivel microscópico, los seres humanos con síndrome de X frágil muestran anomalías de la estructura dendrítica neuronal, en particular, un número anormalmente alto de espinas dendríticas inmaduras (Irwin *et al.*, 2000).

- Los tratamientos disponibles actualmente para los NDDs son sintomáticos (centrándose en el tratamiento de los síntomas) y de apoyo, requiriendo un enfoque multidisciplinario. La capacitación y las terapias de habilidades educativas y sociales se implementan temprano para abordar problemas centrales de retraso del aprendizaje y discapacidades sociales. A menudo se requieren servicios académicos, sociales, vocacionales y de apoyo especiales. La medicación, la psicoterapia o la terapia conductual se pueden usar para controlar la ansiedad concurrente, el trastorno por déficit de atención con hiperactividad ("TDAH"), la depresión, los comportamientos desadaptativos tales como la agresión y los problemas para dormir. Se pueden usar medicamentos antiepilépticos para controlar las convulsiones.

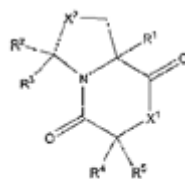
## Sumario

Hemos mostrado previamente en la solicitud de patente PCT/US2004/02830 presentada el 31 de agosto, 2004, que la glicilprolina cíclica ("cPG") y los análogos de la misma, que incluyen, pero no se limitan a ciclopentil-G-2-MeP cíclica y "cG-2-AlilP" cíclica, son neuroprotectores y neuroregeneradores. Actualmente no existe un tratamiento efectivo de los ASDs o NDDs, y la atención al paciente se limita al tratamiento de los síntomas, usando predominantemente intervenciones sociales y conductuales. Los inventores han descubierto ahora que la G-2-AlilP cíclica y otros compuestos bicíclicos descritos aquí pueden ser efectivos en el tratamiento de ASDs y NDDs, y en particular para normalizar el comportamiento social anormal.

Descubrimos inesperadamente que la cG-2-AlilP tiene un efecto terapéutico robusto sobre la ansiedad, la hiperactividad, la memoria, el aprendizaje y el comportamiento social anormal típico de la especie y el comportamiento repetitivo en animales que tienen síndrome de X frágil ("FXS") u otros ASDs. Además, encontramos que los cambios en la fosforilación de ERK1/2 y Akt en animales con *fmr1* inactivado tratados con cG-2-AlilP, proporciona una evaluación de diagnóstico in vitro de los ASDs y respalda la hipótesis de que los fenotipos del síndrome de X frágil son el resultado de la expresión alterada de mGluR. Además, la administración de cG-2-AlilP redujo significativamente el número de espinas neuronales en ratones con el *fmr1* inactivado.

Debido a que los animales con el *fmr1* inactivado usados para los estudios in vivo aquí descritos tienen la misma mutación genética que los seres humanos con síndrome de X frágil, la administración de compuestos de glicilprolina cíclica ("cGP") de esta invención, incluyendo cG-2-AlilP, puede ser útil en el tratamiento de los síntomas de los trastornos del espectro autista, trastornos del neurodesarrollo y síndrome de X frágil en seres humanos. Además, descubrimos inesperadamente que las cGPs de esta invención pueden tratar eficazmente comportamientos sociales adversos y comportamientos repetitivos en animales con ASDs, restaurando de este modo interacciones sociales más normales.

De este modo, un aspecto de esta invención proporciona nuevos compuestos cíclicos que tienen las fórmulas estructurales y los sustituyentes que se describen a continuación.



**Fórmula 1**

En algunos aspectos, los compuestos de Fórmula 1 incluyen sustituyentes en los que:

X<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste en NR<sup>1</sup>, O y S;

X<sup>2</sup> se selecciona del grupo que consiste en CH<sub>2</sub>, NR<sup>1</sup>, O y S;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OR', -SR', -NR'R', -NO<sub>2</sub>, -CN, -C(O)R', -C(O)OR', -C(O)NR'R', -C(NR')NR'R', trihalometilo, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heteroarilalquilo y heteroarilalquilo sustituido; cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, alquilo, heteroalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo y heteroarilalquilo; o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> tomados conjuntamente son -CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>- en la que n es un número entero de 0 a 6; o R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> tomados conjuntamente son -CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>- en la que n es un número entero de 0 a 6; con la condición de que cuando R<sup>1</sup>= metilo y R<sup>2</sup>= R<sup>3</sup>= R<sup>4</sup>= H entonces R<sup>5</sup> ≠ bencilo y; cuando R<sup>1</sup> = H, por lo menos uno de R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> ≠ H.

En aspectos adicionales, esta invención proporciona un compuesto de Fórmula 1 o una sal, estereoisómero o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R<sup>1</sup> = alilo, R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = R<sup>4</sup> = R<sup>5</sup> = H, X<sup>1</sup> = NH, X<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub> (glicil-2-alilprolina cíclica).

En otros aspectos más, esta invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un excipiente farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente efectiva de G-2AlilP cíclica.

En aspectos adicionales, esta invención proporciona métodos para tratar un animal que tiene un deterioro cognitivo, que comprende administrar a ese animal una cantidad efectiva de una composición que comprende G-2-AlilP cíclica.

En otros aspectos, el animal a tratar es un ser humano.

## Breve descripción de los dibujos

Esta invención se describe con referencia a realizaciones específicas de la misma. Se pueden apreciar otros

aspectos de esta invención con referencia a los dibujos, en los que:

La **FIG. 1A** es un gráfico que muestra los efectos del tratamiento con G-2-AlilP cíclica en el rendimiento en la fase de adquisición (días 1-4) del ensayo del laberinto acuático de Morris (MWM) después del tratamiento con escopolamina. La **FIG. 1B** es un gráfico que muestra los efectos del tratamiento con G-2-AlilP cíclica en la latencia al cuadrante de la plataforma en el ensayo de investigación (día 5) del MWM. La **FIG. 1C** es un gráfico que muestra el tiempo necesario para encontrar la plataforma el día 4 de la fase de adquisición para animales en 3 grupos: (1) tratados con vehículo, (2) tratados con escopolamina y cG-2-AlilP y (3) tratados con escopolamina.

La **FIG. 2** es un gráfico que muestra la diferencia en el tiempo dedicado a explorar el objeto familiar versus nuevo durante el ensayo de investigación en los días 25 posteriores al tratamiento. Los puntos de datos para objetos familiares reflejan el promedio de tiempo dedicado a la exploración de 3 objetos familiares. Los puntos de datos para el reconocimiento de nuevos objetos es el tiempo real dedicado a explorar el nuevo objeto.

La **FIG. 3** es un gráfico que muestra una correlación entre la tinción del receptor 1 de glutamato AMPA de la región CA1 del hipocampo y la relación de tiempo dedicado a la investigación de un nuevo objeto a un objeto familiar en la fase de ensayo del NORT en el día 24.

La **FIG. 4** es un gráfico que muestra los efectos de cG-2-AlilP (t) sobre la densidad de GluR1 de AMPA en la capa de células granulares de CA1 en los días 6 y 24 en comparación con el vehículo (veh).

La **FIG. 5** es un gráfico que muestra los efectos de la cG-2-AlilP (t) sobre la densidad de GluR1 de AMPA en estratos de CA1 en el día 24 después del tratamiento.

La **FIG. 6** es un gráfico que muestra el efecto de la cG-2-AlilP en la tendencia a aumentar la densidad de la tinción presináptica en la región CA3 del hipocampo en el día 24 posterior al tratamiento.

La **FIG. 7** es un gráfico que muestra el efecto de cG-2-AlilP sobre la tendencia a aumentar la densidad de la tinción presináptica en el estrato oriens de la región CA1 el día 24 después del tratamiento.

La **FIG. 8** es un gráfico que muestra el efecto de la cG-2-AlilP para incrementar la densidad de la tinción presináptica en el estrato radiado de la región CA1 el día 24 después del tratamiento.

Las **FIGs. 9A, B, C** son gráficos que muestran el efecto del tratamiento con cG-2-AlilP sobre la densidad del NMDAR-1 en CA1 y CA3.

La **FIG. 10** es un gráfico que muestra los efectos de la cG-2-AlilP sobre la densidad de la tinción de Krox24 en la CA1-2 del hipocampo.

La **FIG. 11** es un gráfico que muestra los efectos de la cG-2-AlilP en el número de vesículas en un cuadrado de 200 nm<sup>2</sup> que se yuxtaponen a la densidad postsináptica en las subregiones CA3 y CA1 del hipocampo de ratas de mediana edad (n = 2 en cada grupo).

La **FIG. 12** es un gráfico que muestra los efectos de la G-2-AlilP cíclica en la supervivencia neuronal en animales después del estrés oxidativo excitotóxico.

La **FIG. 13** es un gráfico que muestra los efectos de la ciclopentilG-2-MeP cíclica en la supervivencia neuronal en animales después del estrés oxidativo excitotóxico.

La **FIG. 14** es un gráfico que muestra los efectos neuroprotectores la de G-2-AlilP cíclica en animales sometidos a isquemia cerebral global.

La **FIG. 15** es un gráfico que muestra los efectos de diferentes dosis de G-2-AlilP cíclica en la neuroprotección en animales sometidos a isquemia cerebral global.

Las **FIGs. 16A-D** representan una cámara (**FIG. 16A**) usada para estudios in vitro de neuronas del hipocampo. La **FIG. 16B** representa una fotografía de las neuronas del hipocampo después de 17 días en cultivo. La **FIG. 16C** representa neuronas del hipocampo con Fmr1 inactivado marcadas con GFP. La **FIG. 16D** representa una fotografía de neuronas del hipocampo de ratones con Fmr1 inactivado con cG-2-2AlilP.

La **FIG. 17** representa una fotografía de un dispositivo de ensayo de campo abierto usado para ensayar los efectos de cG-2-AlilP de esta invención.

La **FIG. 18** representa el gráfico del tiempo que T1 pasado en el ensayo de campo abierto de animales no modificados y animales con fmr1 inactivado tratados con vehículo o con cG-2-AlilP.

La **FIG. 19** representa un gráfico de resultados de memoria a corto plazo en un ensayo de campo abierto de animales no modificados y animales con fmr1 inactivado con vehículo o cG-2-AlilP. La **FIG. 20** representa un gráfico de los resultados de la memoria a largo plazo en un ensayo de campo abierto de animales no modificados y

animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo o cG-2-AlilP. La **FIG. 21** representa un gráfico de resultados de un ensayo de callejones sucesivos en animales no modificados y animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo.

5 La **FIG. 22** representa un gráfico de resultados de un ensayo de callejones sucesivos en animales no modificados y animales con *fmr1* inactivado tratados con cG-2-AlilP.

La **FIG. 23** representa una fotografía de un laberinto en cruz elevado usado en estudios de los efectos de cG-2-AlilP de esta invención en ratones no modificados y ratones con *fmr1* inactivado.

La **FIG. 24** representa un gráfico de resultados en un ensayo de brazo cerrado de laberinto en cruz elevado en animales no modificados y animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo o cG-2-AlilP.

10 La **FIG. 25** representa un gráfico de resultados en un ensayo de brazo abierto de laberinto en cruz elevado en animales no modificados y animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo o cG-2-AlilP.

La **FIG. 26** representa un gráfico de resultados en un ensayo de centro de Laberinto en cruz elevado en animales no modificados y animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo o cG-2-AlilP.

15 La **FIG. 27** representa una fotografía de un dispositivo usado para estudiar los efectos de cG-2-AlilP sobre el condicionamiento del miedo en ratones no modificados y con *fmr1* inactivado.

La **FIG. 28** representa un gráfico de resultados en un ensayo de acondicionamiento del miedo en animales no modificados y animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo o cG-2-AlilP.

20 Las **FIGs. 29A-E** representan fotografías de puntuaciones de anidación usadas en la evaluación de los efectos de cG-2-AlilP sobre el comportamiento de anidación de ratones no modificados y ratones con *fmr1* inactivado. La **FIG. 29A** representa una puntuación de 1, La **FIG. 29B** representa una puntuación de 2, la **FIG. 29C** representa una puntuación de 3, la **FIG. 29D** representa una puntuación de 4 y la **FIG. 29E** representa una puntuación de 5.

La **FIG. 30** representa un gráfico de resultados en un ensayo de sociabilidad de animales no modificados y animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo o cG-2-AlilP.

25 La **FIG. 31** representa un gráfico de resultados de los niveles de expresión de pERK en animales no modificados y animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo o cG-2-AlilP.

La **FIG. 32** representa un gráfico de resultados de los niveles de expresión de pAKT en animales no modificados y animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo o cG-2-AlilP.

30 Las **FIGs. 33A a 33F** representan gráficos de resultados de los efectos de PBBI y cG-2-AlilP en la expresión de los mediadores inflamatorios interleucina 1-beta ("IL1-beta") e interleucina 6 ("IL-6"). Las **FIGs. 33A - 33C** representan resultados para IL1-beta y las **FIGs. 33D - 33F** representan resultados para IL-6.

Las **FIG. 34A a 34H** representan gráficos de resultados de los efectos de PBBI y cG-2-AlilP en la expresión de BAX y BCL-2. Las **FIGs. 34A - 34C** representan resultados para la expresión de BAX. Las **FIGs 34D - 34H** representan resultados para la expresión de BCL2.

35 Las **FIG. 35A a 35C** representan gráficos de resultados de los efectos de PBBI y cG-2-AlilP en la expresión de ATF3 en tres puntos de tiempo diferentes.

Las **FIGs. 36A** hasta el final representan gráficos de resultados de los efectos de PBBI y cG-2-AlilP en la expresión de varios marcadores genéticos relacionados con la neuroplasticidad.

## Descripción detallada

### Definiciones

40 "Alquenilo" se refiere a un radical hidrocarbonado insaturado de cadena lineal o ramificada o cíclico que tiene por lo menos un doble enlace carbono-carbono. El radical puede estar en la conformación cis o trans alrededor del enlace o enlaces dobles. Los ejemplos de grupos alquenilo incluyen alilo, etenilo, propenilo, isopropenilo, butenilo, isobutenilo, ciclopentenilo y similares. En algunas realizaciones, los grupos alquenilo son alquenilo de C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, y en otras realizaciones, el alilo puede ser particularmente útil.

45 "Alquilo" se refiere a un radical hidrocarbonado saturado de cadena lineal o ramificada o cíclico. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, isopropilo, ciclopropilo, terc-butilo, ciclopropilmetilo, hexilo y similares. En algunas realizaciones, los grupos alquilo son alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

50 "Alquinilo" se refiere a un radical hidrocarbonado insaturado de cadena lineal o ramificada o cíclico que tiene por lo menos un triple enlace carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alquinilo incluyen etinilo, propinilo, butinilo, isobutinilo y similares. En algunas realizaciones, el grupo alquinilo es alquinilo de C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>.

"Arilo" se refiere a un radical hidrocarbonado cíclico insaturado con un sistema de electrones  $\pi$  conjugado. Los grupos arilo ejemplares incluyen fenilo, naftilo y similares. En algunas realizaciones, el grupo arilo es arilo de C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>.

"Arilalquilo" se refiere a un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo de cadena lineal en el que uno de los átomos de hidrógeno unidos al carbono terminal se reemplaza con un grupo arilo. Los ejemplos de grupos arilalquilo incluyen bencilo, naftilmetilo, bencilideno y similares.

El deterioro cognitivo se puede observar en pacientes con ASDs, NDDs, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy y otros trastornos, así como en animales de edad avanzada, incluidos los seres humanos.

"Que comprende" y "Comprende" quiere decir que incluye, pero no está limitado a, los elementos enumerados.

El "factor de crecimiento" se refiere a un polipéptido extracelularmente activo que estimula una célula a crecer o proliferar al interactuar con un receptor en la célula.

"Heteroalquilo" se refiere a un resto alquilo en el que uno o más átomos de carbono se reemplazan con otro átomo tal como N, P, O, S, etc. Los grupos heteroalquilo ejemplares incluyen pirrolidina, morfolina, piperidina, piperazina, imidazolidina, pirazolidina, tetrahidrofurano, aminas de C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> sustituidas, tioéteres de C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> y similares.

"Heteroarilo" se refiere a un resto arilo en el que uno o más átomos de carbono se reemplazan con otro átomo tal como N, P, O, S, etc. Los grupos heteroarilo ejemplares incluyen carbazol, furano, imidazol, indazol, indol, isoquinolina, purina, pirazina, pirazol, piridazina, piridina, pirrol, tiazol, tiofeno, triazol y similares.

"Lesión" incluye cualquier daño agudo o crónico de un animal que da como resultado degeneración, disfunción o muerte de células en el sistema nervioso. Tales células incluyen células neuronales y células no neuronales. La lesión incluye apoplejía, apoplejía no hemorrágica, lesión cerebral traumática, asfixia perinatal asociada con sufrimiento fetal, tal como después del desprendimiento, oclusión del cordón umbilical o asociada con retraso del crecimiento intrauterino, asfixia perinatal asociada con fallo de reanimación o respiración adecuada, lesiones severas del SNC asociadas con casi ahogamiento, casi muerte súbita del lactante, inhalación de monóxido de carbono, amoníaco u otra intoxicación gaseosa, paro cardíaco, coma, meningitis, hipoglucemia, estado epiléptico, episodios de asfixia cerebral asociados con cirugía de derivación coronaria, episodios hipotensos y crisis hipertensivas, y trauma cerebral. Se debe entender que los ejemplos anteriores son solo a modo de ilustración, y no pretenden ser una lista completa de lesiones capaces de ser tratadas por los compuestos y métodos de esta invención.

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

Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que es farmacéuticamente aceptable y tiene las propiedades farmacológicas deseadas. Tales sales incluyen sales que se pueden formar en las que los protones ácidos presentes en los compuestos son capaces de reaccionar con bases inorgánicas u orgánicas. Las sales inorgánicas apropiadas incluyen aquellas formadas con los metales alcalinos, por ejemplo, sodio y potasio; magnesio, calcio y aluminio. Las sales orgánicas apropiadas incluyen aquellas formadas con bases orgánicas tales como las bases de amina, por ejemplo, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina y similares. Tales sales también incluyen sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácidos clorhídrico y bromhídrico) y ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido cítrico, ácido maleico y los ácidos alcano- y areno-sulfónico como el ácido metanosulfónico y el ácido bencenosulfónico). Cuando hay dos grupos ácidos presentes, una sal farmacéuticamente aceptable puede ser una mono-sal monoácida o una sal diácida; y de manera similar donde hay presentes más de dos grupos ácido, algunos o todos de tales grupos pueden estar presentes como sales.

Un "grupo protector" tiene el significado convencionalmente asociado con él en síntesis orgánica, es decir, un grupo que bloquea selectivamente uno o más sitios reactivos en un compuesto multifuncional de tal manera que una reacción química se puede llevar a cabo selectivamente en otro sitio reactivo sin protección y de tal manera que el grupo se puede retirar fácilmente después de que se complete la reacción selectiva.

Un "estereoisómero" es una molécula que tiene la estructura de G-2-Alilprolina cíclica, pero que tiene un centro quiral. La expresión "G-2-alilprolina cíclica" incluye todos los estereoisómeros.

"Sustituido" se refiere a cuando uno o más de los átomos de hidrógeno en un radical alquilo, heteroalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo o arilalquilo se reemplazan independientemente con otro sustituyente. Los sustituyentes incluyen -R', -OR', -SR', -NR'R', -NO<sub>2</sub>, -CN, -C(O)R', -C(O)OR', -C(O)NR'R', -C(NR')NR'R', -NR'-C(NR')-OR', -NR'-C(NR')-SR', NR'-C(NR')-NR'R', trihalometilo y halógeno en los que cada R' es independientemente -H, alquilo, heteroalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo.

- "Síntoma" o "síntomas" quiere decir uno o más de deterioro cognitivo o disfunción cognitiva, uno o más signos o síntomas de pérdida de memoria, pérdida de orientación espacial, disminución de la capacidad de aprender, disminución de la capacidad de formar memoria a corto o largo plazo, disminución de la memoria episódica, disminución de la capacidad para consolidar la memoria, disminución de la memoria espacial, disminución de la sinaptogénesis, disminución de la estabilidad sináptica, déficit en la función ejecutiva, déficit en el mapeo cognitivo y la memoria de la escena, déficit en la memoria declarativa y relacional, disminución de la adquisición rápida de asociaciones configuracionales o conjuntivas, disminución de la codificación específica del contexto y recuperación de eventos específicos, disminución de la memoria episódica y/o de tipo episódico, ansiedad, condicionamiento anormal del miedo, comportamiento social anormal, comportamiento repetitivo, comportamiento nocturno anormal, actividad convulsiva, locomoción anormal, expresión anormal de Phospho-ERK1/2 y Phospho-Akt, y bradicardia.
- Una "cantidad terapéuticamente efectiva" quiere decir la cantidad que, cuando se administra a un animal para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar el tratamiento de una enfermedad o una lesión. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" quiere decir una cantidad que disminuye los síntomas o hallazgos adversos, promueve síntomas o hallazgos deseables, y/o trata un trastorno subyacente, y/o es curativa.
- "Tratar" o "tratamiento" de una enfermedad incluye prevenir que la enfermedad ocurra en un animal que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no experimenta o exhibe síntomas de la enfermedad (tratamiento profiláctico), inhibir la enfermedad (ralentizar o detener su desarrollo), proporcionar alivio de los síntomas o efectos secundarios de la enfermedad (incluido el tratamiento paliativo) y aliviar la enfermedad (causando la regresión de la enfermedad).
- Los átomos de hidrógeno implícito (tales como los hidrógenos en el anillo de pirrol, etc.) se omiten de las fórmulas para mayor claridad, pero se debe entender que están presentes.
- "ATF3" quiere decir factor de transcripción activador 3
- "BAX" quiere decir el regulador de apoptosis BAX también conocido como proteína similar a bcl-2
- "BLC2 alfa" quiere decir el linfoma-2 de células B
- "IL1-beta" quiere decir interleucina 1-beta.
- "IL-6" quiere decir interleucina-6.
- "BDNF" quiere decir factor neurotrópico derivado del cerebro.
- "Cdh2" quiere decir Cadherina-2
- "Cebpb" quiere decir proteína beta de unión al potenciador/CCAAT
- "Crem" quiere decir unión de elemento de respuesta de AMP cíclico
- "Egr1" quiere decir proteína de respuesta temprana al crecimiento 1
- "Gria 4" quiere decir receptor de glutamato ionotrópico AMPA 4
- "Grm5" quiere decir receptor metabotrópico de glutamato 5
- "Mapk 1" quiere decir proteína quinasa activada por mitógeno 1
- "MeCP2" quiere decir la proteína de unión a metil cPp 2
- "Nr4a1" quiere decir el miembro 1 del Grupo A de la Subfamilia 4 de Receptores Nucleares, también conocido como Factor de Crecimiento Nervioso IB
- "Ntf3" quiere decir neurotrofina 3
- "Ntf4" quiere decir neurotrofina 4
- "Pcdh8" quiere decir protocadherina-8
- "Plm1" quiere decir proteína de fuga pre-ARNm 1
- "Ppp3ca" quiere decir proteína fosfatasa 3, subunidad catalítica, alfa
- "Tnf" quiere decir factor de necrosis tumoral.

#### **Trastornos del espectro autista**

- Los trastornos del espectro autista (ASDs) son una colección de trastornos vinculados al desarrollo, caracterizados

por anomalías en la interacción social y la comunicación, intereses restringidos y comportamientos repetitivos. Además del autismo clásico o el trastorno autista, la quinta edición del Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5) de la American Psychiatric Association (APA) reconoce el síndrome de Asperger, el trastorno desintegrativo infantil y el trastorno generalizado del desarrollo no especificado de otra manera (PDD-NOS) como ASDs.

Los trastornos del neurodesarrollo (NDDs) incluyen el síndrome de X frágil (FXS), el síndrome de Angelman, el complejo de esclerosis tuberosa, el síndrome de Phelan McDermid, el síndrome de Rett, las mutaciones de CDKL5 (que también están asociadas con el síndrome de Rett y el trastorno de espasmo infantil ligado a X) y otros. Muchos, pero no todos los NDDs son causados por mutaciones genéticas y, como tales, a veces se denominan trastornos monogénicos. Algunos pacientes con NDDs exhiben comportamientos y síntomas de autismo.

### Herramientas clínicas para evaluar ASDs y NDDs

Los ASDs y NDDs se pueden evaluar usando uno o más ensayos clínicos, por ejemplo, The Rett Syndrome Natural History / Clinical Severity Scale, Aberrant Behavior Checklist Community Edition (ABC), Aberrant Behavior Checklist (Stereotypy), Vinelands, Clinical Global Impression of Severity (CGI-S), el Caregiver Strain Questionnaire (CSQ), Children's Yale-Brown OC Scale (CYBOCS-PDD), Child Autism Rating Scale, Interview of Repetitive Behaviors, Nisonger Child Behavior Rating Scale, Pervasive Developmental Disorder Behav Inventory, Stereotyped Behav Scale, Repetitive Behavior Scale, Rossago Scale, Repetitive Behavior Questionnaire, y Stereotyped Behavior Scale, o uno o más ensayos fisiológicos seleccionados del grupo que consiste en frecuencia de pico de electroencefalograma (EEG), potencia general en bandas de frecuencia de un EEG, movimiento de la mano, QTc y variabilidad de la frecuencia cardíaca (VFC) e irregularidades respiratorias en comparación con los animales de control que no padecen dicho trastorno. La fiabilidad y relevancia de algunas de estas herramientas como se muestra en la **tabla 1** a continuación.

Como se usa en esta sección, el término "apropiada" quiere decir una herramienta que mide un resultado clínicamente relevante con una fiabilidad y validez de buena a excelente con información disponible en todas las categorías relevantes. La expresión "apropiada con condiciones" quiere decir una herramienta que mide un "resultado clínicamente relevante para el cual solo ciertas subescalas son relevantes", o puede ser "solo relevante para un intervalo de edades más joven". Los términos "prometedor" y "potencialmente apropiado" quieren decir una herramienta que mide "un resultado clínicamente relevante pero que está emergiendo, o tiene una fiabilidad y validez inconsistentes (por ejemplo, fiabilidad/validez de buena a excelente, pero los datos no están disponibles en todas las categorías, pero por lo menos 2, adecuado en todas las categorías".

**Tabla 1**

| <b>Herramientas clínicas consideradas "apropiadas" o "apropiadas con condiciones" para comportamientos restringidos y repetitivos en ASDs y NDDs</b> |                      |                        |                              |                                           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------|------------------------------|-------------------------------------------|
| <b>Medida</b>                                                                                                                                        | <b>Tipo</b>          | <b>Fiable y válida</b> | <b>Sensible al cambio</b>    | <b>Condición</b>                          |
| <b>CYBOCS-PDD</b>                                                                                                                                    | Clínico (entrevista) | si                     | si                           | Elemento de resistencia: no relevante     |
| ABC Stereotypy                                                                                                                                       | Informante           | si                     | si                           | Solo 7 artículos                          |
| Repetitive Behavior Scale                                                                                                                            | Informante           | si                     | sí (por lo menos un estudio) | ? Subescalas vs. puntuación total         |
| Stereotyped Behav Scale                                                                                                                              | Informante           | si (adultos)           | no mostrada                  | Se adapta para un funcionamiento inferior |
| Repetitive Behav Questionnaire                                                                                                                       | Informante           | si                     | no mostrada                  | Puntuación atípica                        |

La ansiedad se puede evaluar usando una o más medidas que incluyen Anxiety, Depression and Mood Scale (ADAMS), Child and Adolescent Symptom Inventory (CASI), Child Behavior Checklist (CBCL), Multidimensional Anxiety Scale for Children (MASC), Pediatric Autism Rating Scale (PARS), Revised Child Anxiety and Depression Scale (RCAD), Screen for Child Anxiety Related Disorders (SCARED). Nisonger Child Behavior Rating Form, y Anxiety Diagnostic Interview Scale (ADIS). La fiabilidad y relevancia de algunas de estas herramientas se presenta a continuación en la **Tabla 2**.



**Tabla 2**

| <b>Herramientas clínicas consideradas "apropiadas con condiciones" para evaluar la ansiedad</b> |                          |                   |                                 |                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Medida</b>                                                                                   | <b>Tipo</b>              | <b>Fiabilidad</b> | <b>y Sensibilidad al cambio</b> | <b>Condición</b>                  |
| CASI-Anxiety                                                                                    | Informante               | si                | sí (datos piloto en ASD)        | cobertura incompleta              |
| Multidimensional Anxiety Scale for Children (MASC)                                              | Informante y autoinforme | si                | sí (uso limitado en ASD)        | ↑ dependencia del lenguaje        |
| Pedi. Anxiety Rating Scale (PARS)                                                               | Clínico (entrevista)     | si                | sí (uso limitado en ASD)        | ↑ ↑ dependencia del lenguaje      |
| Anxiety Diagnostic Interview Scale                                                              | Clínico (entrevista)     | si                | sí (uso limitado en ASD)        | individuos de alto funcionamiento |

Las herramientas clínicas potencialmente apropiadas para evaluar la ansiedad en ASDs y NDDs se muestran a continuación en la **Tabla 3**.

**5 Tabla 3**

| <b>Herramientas clínicas "potencialmente apropiadas" para evaluar la ansiedad en ASDs y NDDs</b> |                          |                   |                             |                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------|-----------------------------|----------------------------------------------|
| <b>Medida</b>                                                                                    | <b>Tipo</b>              | <b>Fiabilidad</b> | <b>y Sensible al cambio</b> | <b>Comentario</b>                            |
| SCARED                                                                                           | Informante y autoinforme | si                | sí (uso limitado en ASD)    | ↑ dependencia del lenguaje                   |
| ADAMS                                                                                            | Informante               | si                | no mostrada                 | estado de ánimo y ansiedad; datos en adultos |
| RCADS                                                                                            | Informante y autoinforme | si                | no mostrada                 | estado de ánimo y ansiedad                   |

La comunicación social se puede evaluar usando herramientas clínicas, por ejemplo, puntuaciones de dominio ABAS-II, Aberrant Behavior Checklist (ABC) - Lethargy/Social Withdrawal, ADI-R, Autism Diagnostic Observation Scale-Generic (ADOS-G) -nuevas puntuaciones de severidad, Autism Impact Measure, Autism Spectrum Rating Scales, Autism Spectrum Rating Scales, Autism Treatment Evaluation Checklist (ATEC), Ball Toss Game, Behavior Assessment Scale (BAS), Behavior Assessment System for Children 2nd edition BASC-2 (subescalas relevantes para lo social), Behavior Rating Inventory of Executive Function, California Verbal Learning Task-Children's Version (VLT-C) y VLT-C modificado (MVLT-C), Caregiver-Child Interaction, Jahromi 2009, CGI, Childhood Autism Rating Scale (CARS), Children's Social Behavior Questionnaire, Clinical Evaluation of Language Fundamentals (CELF-3 and 4)-Pragmatics Profile, Communication and Symbolic Behavior Scales (CSBS), Comprehension of affective Speech Task, General Trust Scale, Gilliam Autism Rating Scale (GARS), Joint Attention Measure from ESCS (JAMES), Let's Face It!, Observational Assessment of Spontaneous Expressive Language (OSEL), Parent Questionnaire, Nagaraj et al. 2006, Parent's Rating Questionnaire, Chan et al., 2009, Pervasive Developmental Disorder Behavior Inventory (PDD-BI) (versión corta disponible: PDD-BI-Screening Version), Reading the Mind in Films-Adult, Reading the Mind in Films-Child, Reading the mind in the Eyes Task-Revised (RMET-R) - Adult, Reading the mind in the Eyes Task-Revised (RMET-R) - Child, Reading the mind in Voice-Adult, Social Communication Questionnaire (SCQ), Social Responsiveness Scale, Social Skills Improvement System (SSiS), Theory of Mind Test y VABS-Socialization and Comunicación.

De las herramientas usadas para evaluar la comunicación social, las siguientes se consideran "Apropiadas con condiciones": Aberrant Behavior Checklist (ABC): Lethargy/Social Withdrawal subscale: BASC-2: habilidades sociales, aislamiento, subescala funcional, CSBS, ESCS, JAMES, SSiS, subescalas de socialización y comunicación de Vineland Adaptive Behavior Scales. Las herramientas consideradas "potencialmente apropiadas" incluyen ABAS-II: dominios conceptuales y sociales, puntuaciones de severidad ADGS, escalas de evaluación del espectro autista: comunicación social, CSBQ: subescalas de comprensión y PDD-BI.

## Autismo

El autismo clásico es un trastorno del desarrollo neurológico muy variable. Por lo general, se diagnostica durante la infancia o la primera infancia, con síntomas evidentes a menudo aparentes a partir de los 6 meses y consolidándose entre 2 y 3 años. De acuerdo con los criterios establecidos en el DSM-5 el diagnóstico de Autismo requiere que están presentes una tríada de síntomas, que incluyen (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, y dos de las siguientes deficiencias deben estar presentes para un diagnóstico de autismo:

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

Las deficiencias de comunicación en el autismo se pueden manifestar de una o más de las siguientes formas: retraso (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 de fantasía. También se requieren patrones de conducta restringidos, repetitivos y estereotipados para el diagnóstico, tales como la preocupación por uno o más intereses considerados anormales en intensidad, adherencia inflexible a rutinas o rituales, gestos motores repetitivos y/o enfoque persistente en partes de objetos.

Por último, para un diagnóstico de autismo, es necesario que el deterioro en el funcionamiento de por lo menos un área (es decir, interacción social, lenguaje o juego imaginativo) tenga un inicio a menos de 3 años de edad.

## Síndrome de Asperger

El síndrome de Asperger es similar al autismo y comparte ciertas características. Al igual que el autismo, el síndrome de Asperger también se caracteriza por una deficiencia en la interacción social, y esto se acompaña de intereses y comportamientos restringidos y repetitivos. De este modo, el diagnóstico del síndrome de Asperger se caracteriza por la misma tríada de deficiencias que el autismo. Sin embargo, difiere de los otros ASDs al no tener un retraso general en el lenguaje o el desarrollo cognitivo y no hay déficit de interés en el entorno del sujeto. Además, el síndrome de Asperger es típicamente menos grave en sintomatología que el autismo clásico y los pacientes de Asperger pueden funcionar con autosuficiencia y llevar vidas relativamente normales.

## Trastorno desintegrativo infantil

El trastorno desintegrativo infantil (CDD), también conocido como síndrome de Heller, es una afección en la cual los niños se desarrollan normalmente hasta la edad de 2 a 4 años (es decir, más tarde que en el autismo y el síndrome de Rett), pero luego demuestran una pérdida severa de la comunicación social, y otras habilidades. El trastorno desintegrativo infantil se parece mucho al autismo, y ambos implican un desarrollo normal seguido de una pérdida significativa de lenguaje, juego social y habilidades motoras. Sin embargo, el trastorno desintegrativo infantil generalmente ocurre más tarde que el autismo, implica una pérdida más dramática de 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 (tal como una disminución drástica de la capacidad de caminar, trepar, agarrar, etc.), control de intestino o vejiga (a pesar de haber sido previamente entrenado para ir al baño). La pérdida de habilidades de desarrollo puede ser abrupta y tener lugar en el transcurso de días o semanas o puede ser más gradual.

## Trastorno generalizado del desarrollo - no especificado de otra manera (PDD-NOS)

El trastorno generalizado del desarrollo - no especificado de otra manera (PDD-NOS) es un ASD que describe pacientes que presentan algunos, pero no todos, los síntomas asociados con otros ASDs bien definidos. Los criterios clave para el diagnóstico de un ASD incluyen dificultad para socializar con otros, comportamientos repetitivos y sensibilidades elevadas a ciertos estímulos. Todos estos se pueden encontrar en los ASDs descritos anteriormente. Sin embargo, el autismo, el síndrome de Asperger, el síndrome de Rett y el CDD tienen todas otras características que permiten su diagnóstico específico. Cuando no se puede hacer un diagnóstico específico de uno de estos cuatro trastornos, pero el ASD es evidente, se hace un diagnóstico de PDD-NOS. Tal diagnóstico puede ser el resultado de síntomas que comienzan a una edad posterior que son aplicables a otras afecciones en el espectro.

## Síndrome de Rett

El síndrome de Rett (RTT) es un trastorno del neurodesarrollo que afecta casi exclusivamente a las mujeres (1 de cada 10000 nacimientos vivos). Hasta hace poco, el RTT se clasificó como un trastorno del espectro autista (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Revised (DSM-IV-R). Aproximadamente 16000 pacientes están actualmente afectados por él en los EE.UU. (Rett Syndrome Research Trust Data). Para un diagnóstico del síndrome de Rett, los siguientes síntomas son característicos: desarrollo deteriorado desde los 6-18 meses de edad; ralentización de la tasa de crecimiento de la cabeza a partir de entre 3 meses y 4 años de edad; lenguaje gravemente deteriorado; movimientos repetitivos y estereotipados de la mano; y anomalías de la marcha, por ejemplo, caminar con los dedos de los pies o caminar inestable con las piernas rígidas. Además, hay varios criterios de apoyo que pueden ayudar al diagnóstico del síndrome de Rett, pero no son esenciales para un diagnóstico. Estos incluyen dificultades para respirar, anomalías en el EEG, convulsiones, rigidez y espasticidad muscular, escoliosis (curvatura de la columna), 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 anormales de sueño, irritabilidad o agitación, dificultades para masticar y/o tragar, mala circulación y estreñimiento.

El inicio del RTT usualmente comienza entre los 6 y los 18 meses de edad con una desaceleración de las tasas de desarrollo y crecimiento. Esto es seguido por una fase de regresión (típicamente en niños de 1 a 4 años de edad), una fase pseudoestacionaria (de 2 a 10 años de edad) y un subsecuente estado progresivo de deterioro motor tardío. Los síntomas de RTT incluyen la desaceleración repentina del crecimiento y la regresión en el lenguaje y las habilidades motoras que incluyen los movimientos intencionales de las manos que se reemplazan por movimientos estereotípicos, características 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 severo. La mayoría de los pacientes con RTT sobreviven hasta la edad adulta con discapacidades graves y requieren atención las 24 horas del día.

Se dice que entre 85% y 95% de los casos de RTT son causados por una mutación del gen *Mecp2* (Amir et al. 1999. Nat Genet 23: 185-188; Rett Syndrome Research Trust): un gen que codifica la proteína de unión a metil-CpG 2 (MeCP2). El *Mecp2* se asigna al cromosoma X (localización Xq28) y, por esta razón, las mutaciones del gen en los machos suelen ser letales. Si bien el RTT es un trastorno genético, menos del 1% de los casos registrados se heredan; casi todas las mutaciones de *Mecp2* ocurren de novo, con dos tercios causadas por mutaciones en 8 dinucleótidos CpG (R106, R133, T158, R168, R255, R270, R294 y R306) localizados en el tercer y cuarto exones.

La MeCP2 es una proteína que se une a los dinucleótidos CpG metilados para ejercer silenciamiento transcripcional 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 generalmente aparecen alrededor de los 18 meses de edad.

## Presentación de características comunes a los ASDs

Tomando los ASDs conjuntamente, está claro que hay aspectos comunes en la presentación de síntomas entre las 5 formas. Estas características comunes son deterioros en las competencias sociales normales y comportamientos repetitivos. En todos los casos, excepto en el Síndrome de Asperger, también hay una presentación consistente del desarrollo intelectual retrasado que se manifiesta con mayor frecuencia como un déficit en las habilidades del lenguaje. La pérdida cognitiva en relación con los parámetros normales para la edad a menudo es bastante marcada en autismo, síndrome de Rett, CDD y PDD-NOS.

## Modelos genéticos de ASDs

Para ofrecer validez, los modelos animales de ASDs 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 ser causado por muchas alteraciones genéticas diferentes y se cree que ningún defecto genético individual da cuenta de más de un pequeño porcentaje de los casos de autismo. De hecho, estudios recientes han revelado numerosas variaciones estructurales de novo de localizaciones de cromosomas que se cree subyacen al ASD, además de los defectos genéticos hereditarios raros (Marshall et al., 2008; Sebat et al., 2007). De este modo, la variación del número de copias (CNV), la translocación y la inversión de secuencias de genes en 20 sitios clave o más, incluidos 1p, 5q, 7q, 15q, 16p, 17p y Xq, se han situado como loci de ASD.

Sin embargo, a pesar del fondo poligénico que subyace al ASD y de 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 genes que codifican un grupo de proteínas de densidad postsináptica, que incluyen neuroligina-3 (NLGN3), neuroligina-4 (NLGN4), neurexina-1α (NRXN1) y shank3 (Sebat et al., 2007).

La NLGN3 y NLGN4 son moléculas postsinápticas de adhesión celular presentes en las sinapsis glutamatérgicas. Desempeñan una función de coordinación del contacto presináptico con el sitio postsináptico y también interaccionan con la proteína estructural postsináptica shank3. Se han observado mutaciones en NLGN3 y NLGN4 en la población con ASD y dan cuenta quizás del 1% de todos los casos de ASD (Lintas y Persico, 2008). Jamain y

sus colegas publicaron primero una falta de sentido de NLGN3 y un cambio de marco de NLGN4 en dos sujetos no relacionados, lo que dio como resultado síndrome de Asperger y autismo clásico, respectivamente (Jamain et al., 2003). Si bien la incidencia de mutaciones de NLGN3 o NLGN4 en la población con ASD es ciertamente baja (de hecho, no se observaron tales mutaciones en un estudio de 96 pacientes con ASD en un estudio canadiense; Gauthier et al., 2005), se ha confirmado en estudios preclínicos que se pueden producir de hecho mutaciones de neurologina del modelo de síntomas autistas. De ese modo, la introducción en ratones de la misma R451C con cambio de sentido en NLGN3 que se ha publicado clínicamente da como resultado una cepa mutante de ratón que muestra una interacción social reducida y una transmisión sináptica inhibitoria mejorada (Tabuchi et al., 2007).

El ratón mutante R451C, por lo tanto, representa un modelo para ASD basado en la mutación de NLGN3. En este caso, la mutación en la posición R451 de NLGN3 da como resultado una mutación de 'ganancia de función'.

Por el contrario, el modelado de la mutación clínica de NLGN4 en ratones se logra mediante una mutación de 'pérdida de función' de NLGN4 (un modelo clásico de inactivación). En este modelo, los ratones mutantes muestran un déficit de interacción social y vocalización ultrasónica reducida (Jamain et al., 2008). Los déficits de comunicación son fundamentales para los ASDs clínicos y en los ratones con inactivación de NLGN4, una reducción de las vocalizaciones ultrasónicas de los ratones macho expuestos a sus homólogos hembras no modificados respalda la validez aparente de la cepa como modelo de ASD.

Las proteínas de neurexina presináptica inducen la diferenciación postsináptica en las dendritas yuxtapuestas por medio de interacciones con homólogos de neurologina postsináptica. Se han publicado mutaciones del gen neurexin-1 $\alpha$  (NRXN1) en numerosos estudios (Sebat et al., 2007; Marshall et al., 2008; Kim et al., 2008; Yan et al., 2008) y estas se han observado en forma de variantes de número de copia. Al igual que con las mutaciones de NLGN, cuando se introduce una mutación del gen NRXN1 en ratones (en forma de inactivación de genes), se produce una cepa mutante con ciertas características similares a ASD (Etherton et al., 2009). Estos ratones con NRXN1 inactivado muestran una disminución en la frecuencia de la corriente postsináptica excitadora en miniatura del hipocampo (mEPSC) y una relación de entrada-salida disminuida de las corrientes evocadas. Estos efectos electrofisiológicos se relacionan con una disminución de la transmisión excitadora en el hipocampo. Además de la disminución de la neurotransmisión excitadora, los ratones con NRXN1 inactivado exhiben una disminución de la inhibición previa al pulso, aunque el comportamiento social parece no verse afectado (Etherton et al., 2009).

Compartiendo ciertas características con la construcción trans-sináptica neurexina-NLGN, la molécula de adhesión celular 1 (CADM1) es una proteína de la familia de inmunoglobulinas presente tanto pre- como 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 CADM1 inactivado revela que estos animales muestran un mayor comportamiento relacionado con la ansiedad, deterioro de la interacción social y memoria y reconocimiento social deteriorados. Además, los ratones con CADM1 inactivado demuestran habilidades motoras más pobres (Takayanagi et al., 2010). Estas disfunciones son nuevamente consistentes con la sintomatología de ASD.

El síndrome de delección de 21q13 (también conocido como síndrome de Phelan-McDermid), es un trastorno genético raro causado por una microdelección en el extremo terminal q13.3 del cromosoma 22. Esta microdelección rara vez se descubre mediante un examen genético típico y se recomienda un ensayo de hibridación in situ por fluorescencia para confirmar el diagnóstico. Trabajos recientes indican que el síndrome es causado por errores en el gen shank3 que codifica una proteína de densidad postsináptica crítica para el funcionamiento neuronal normal. Curiosamente, los errores en este gen también se han asociado con ASD y el síndrome de delección de 22q13 comúnmente puede conducir a un diagnóstico de ASD (Durand et al., 2007; Moessner et al., 2007; Sykes et al., 2009). Dada la estrecha asociación del síndrome de delección de 22q13 y el diagnóstico consecuente de ASD, se ha desarrollado un modelo de ratón mutante de esta mutación.

El ratón con shank3 inactivado exhibe varios déficits que reflejan los síntomas de ASD, que incluyen las vocalizaciones ultrasónicas reducidas (es decir, la comunicación social disminuida), así como el tiempo de interacción social deteriorado entre ratones. Además, estos ratones también tienen una transmisión excitadora del hipocampo CA1 deteriorada, medida por la relación entrada-salida de las corrientes evocadas y la potenciación a largo plazo (LTP) deteriorada. Se cree que la LTP es un proceso fisiológico que subyace a la formación y consolidación de la memoria. De este modo, el modelo exhibe un fenotipo similar al del NLGN4 inactivado, consistente con ASD.

Como se ha observado, el síndrome de delección de 22q13 en sí mismo es muy raro. Sin embargo, proporciona información importante de que la participación de genes específicos puede tener un papel definitivo en la etiología de los ASDs. Además de shank3, este trastorno revela un posible defecto genético adicional en ASD. De los aproximadamente 50 casos de síndrome de delección de 22q13 descritos, todos menos uno tienen una delección genética que se extiende más allá de shank3 para incluir un gen adicional, conocido como el gen Islet Brain-2 (EB2) (Sebat et al., 2007). La proteína IB2 interacciona con muchas otras proteínas, incluidas las MAP quinasas y la proteína precursora amiloide, parece influir en el tráfico de proteínas en las neuritas y está enriquecida en las

densidades postsinápticas (Giza et al., 2010). Los ratones que carecen de la proteína (ratones con IB2- inactivado) exhiben una interacción social alterada (tiempo de olfateo e interacción social reducidos), exploración reducida y déficits cognitivos y motores (Giza et al., 2010). Este fenotipo conductual se asoció con una transmisión excitadora reducida en las células cerebelosas. Al igual que con el shank3 inactivado, el fenotipo de la mutación IB2 también es consistente con ASD.

Además de los modelos animales de defectos de la proteína de densidad postsináptica descritos anteriormente, otros síndromes monogenéticos que comparten diversas características con los ASDs pueden llevar al autismo a ofrecer otra vía para el tratamiento farmacológico de ASD.

Recientemente, el síndrome de X frágil ha sido asignado a otra familia de trastornos, llamados trastornos del neurodesarrollo (NDDs). Las descripciones aquí no hacen distinción basado en la clasificación oficial del trastorno. Si, en el futuro, uno u otro ASD o NDD se reclasifica, estas descripciones y divulgaciones aquí se aplicarán a esas nuevas clasificaciones, independientemente de su (s) nombre (s).

### Síndrome de X frágil

El síndrome de X frágil (FXS) es causado por la expansión de una sola secuencia de gen trinucleotídico (CGG) en el cromosoma X que da como resultado la incapacidad de expresar la proteína codificada por el gen *fmr1*. La FMR1 (retraso mental X frágil 1) es una proteína necesaria para el desarrollo neuronal normal. El síndrome de X frágil puede hacer que un niño tenga autismo (Hagerman et al., 2010); en 2-6% de todos los niños diagnosticados con autismo, la causa es la mutación del gen FMR1. Además, aproximadamente el 30% de los niños con FXS tienen algún grado de autismo y un 30% más son diagnosticados con PDD-NOS (Hagerman et al., 2010). De hecho, el síndrome de X frágil es la causa de un solo gen más conocida del autismo. Se han desarrollado ratones con FMR1 inactivado como un modelo de FXS y, por lo tanto, como un modelo adicional, se ha mostrado que una mutación del gen *fmr1* da como resultado un desarrollo y poda anormal de la espina dendrítica (Comery et al., 1997), junto con una desregulación asociada de proteínas estructurales dendríticas (incluyendo shank1) y subunidades de receptores de glutamato en las densidades postsinápticas (Schütt et al., 2009). Estos efectos de la morfología de la dendrita dan como resultado un LTP deteriorado en la corteza y la amígdala (Zhao et al., 2005) y el hipocampo (Lauterborn et al., 2007), así como una cognición deteriorada (Kreuger et al., 2011) y un aumento de la ansiedad social (Spencer et al., 2005).

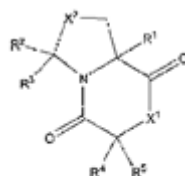
### Síndrome de Rett

En contraste con el 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 es causado, hasta en un 96% de los casos, por un defecto en el gen *Mecp2* (Zoghbi, 2005). Como resultado, los ratones mutantes con MeCP2 inactivado proporcionan un modelo animal con todas las características del síndrome de Rett clínico, con un fenotipo que muestra cierto solapamiento con los modelos de NLGN4, shank3 e IB2 inactivados de ASD. De este modo, los ratones con MeCP2 inactivado muestran un claro deterioro de la LTP en el hipocampo junto con una disminución correspondiente de la memoria social y espacial (Moretti et al., 2006) y el reconocimiento de objetos deteriorado (Schaevitz et al., 2010).

De este modo, los ASDs en seres humanos comparten muchas características de los trastornos cognitivos o del desarrollo en animales, incluidos los roedores. Por lo tanto, los estudios de terapias de ASDs en roedores como ratones y ratas son razonablemente predecibles de los resultados obtenidos en seres humanos.

### Compuestos de la invención

Ciertas realizaciones de esta invención incluyen nuevos derivados de Prolil-Glutamato cíclico ("cPG") que tienen las estructuras que se describen a continuación.



**Fórmula 1**

En ciertas realizaciones, los compuestos de Fórmula 1 incluyen sustituyentes en los que:

X<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste en NR', O y S;

X<sup>2</sup> se selecciona del grupo que consiste en CH<sub>2</sub>, NR', O y S;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OR', -SR', -NR'R', -NO<sub>2</sub>, -CN,

-C(O)R', -C(O)OR', -C(O)NR'R', -C(NR')NR'R', trihalometilo, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heteroarilalquilo y heteroarilalquilo sustituido; cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, alquilo, heteroalquilo, alqueno, alquino, arilo, arilalquilo, heteroarilo y heteroarilalquilo;

o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> tomados conjuntamente son -CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>- en la que n es un número entero de 0 a 6;

o R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> tomados conjuntamente son -CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>- en la que n es un número entero de 0 a 6;

con la condición de que cuando R<sup>1</sup>= metilo y R<sup>2</sup>= R<sup>3</sup>= R<sup>4</sup>= H entonces R<sup>5</sup> ≠ bencilo y;

cuando R<sup>1</sup> = H, por lo menos uno de R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> ≠ H.

10 En realizaciones adicionales, los compuestos de Fórmula 1 incluyen sustituyentes en los que:

R<sup>1</sup>= metilo, R<sup>2</sup>= R<sup>3</sup>= R<sup>4</sup>= R<sup>5</sup>= H, X<sup>1</sup>= NH, X<sup>2</sup>= CH<sub>2</sub>;

R<sup>1</sup>= alilo, R<sup>2</sup>= R<sup>3</sup>= R<sup>4</sup>= R<sup>5</sup>= H, X<sup>1</sup>-NH, X<sup>2</sup>= CH<sub>2</sub>;

R<sup>1</sup>= R<sup>2</sup>= R<sup>3</sup>= H, R<sup>4</sup>= R<sup>5</sup>= metilo, X<sup>1</sup>= NH, X<sup>2</sup>= CH<sub>2</sub>;

R<sup>1</sup>= R<sup>4</sup>= R<sup>5</sup>= H, R<sup>2</sup>= R<sup>3</sup>= metilo, X<sup>1</sup>-NH, X<sup>2</sup>= CH<sub>2</sub>.

15 En otras realizaciones de la invención, los compuestos de Fórmula 1 incluyen sustituyentes en los que;

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> tomados conjuntamente son -CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>- y:

R<sup>1</sup>= metilo, R<sup>2</sup>= R<sup>3</sup>= H, n = 0, X<sup>1</sup>= NH, X<sup>2</sup>= CH<sub>2</sub>;

R<sup>1</sup>=metilo, R<sup>2</sup>= R<sup>3</sup>= H, n = 2, X<sup>1</sup>= NH, X<sup>2</sup>= CH<sub>2</sub>;

R<sup>1</sup>= alilo, R<sup>2</sup>= R<sup>3</sup>= H, n = 0, X<sup>1</sup>-NH, X<sup>2</sup>= CH<sub>2</sub>;

20 R<sup>1</sup>= alilo, R<sup>2</sup>= R<sup>3</sup>= H, n = 2, X<sup>1</sup>= NH, X<sup>2</sup>= CH<sub>2</sub>.

R<sup>1</sup>= metilo, R<sup>2</sup>= R<sup>3</sup>= H, n = 3, X<sup>1</sup>= NH, X<sup>2</sup>= CH<sub>2</sub>;

R<sup>1</sup>= alilo, R<sup>2</sup>= R<sup>3</sup>= H, n = 3, X<sup>1</sup>= NH, X<sup>2</sup>= CH<sub>2</sub>.

En otras realizaciones más de la invención, los compuestos de Fórmula 1 incluyen sustituyentes en los que R<sup>1</sup>= metilo o alilo, R<sup>2</sup>= R<sup>3</sup>= R<sup>4</sup>= H y R<sup>5</sup> se selecciona del grupo que consiste en las cadenas secundarias de los aminoácidos: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina, norvalina, norleucina, citrulina, ornitina, homocisteína, homoserina, aloisoleucina, isovalina, sarcosina y similares.

En otras realizaciones adicionales de la invención, los compuestos de Fórmula 1 incluyen sustituyentes en los que:

R<sup>1</sup>= metilo, R<sup>2</sup>= R<sup>3</sup>= metilo, R<sup>4</sup>= R<sup>5</sup>= H, X<sup>1</sup>= NH y X<sup>2</sup>= S;

30 R<sup>1</sup>= alilo, R<sup>2</sup>= R<sup>3</sup>= metilo, R<sup>4</sup>= R<sup>5</sup>= H, X<sup>1</sup>= NH y X<sup>2</sup>= S.

Las personas de experiencia en la técnica apreciarán que las representaciones estructurales anteriores pueden contener centros quirales, cuyo número dependerá de los diferentes sustituyentes. La quiralidad puede ser R o S en cada centro. Los dibujos estructurales pueden representar solo una de las posibles formas tautómeras, conformacionales diastereoméricas o enantioméricas, y se debe entender que la invención incluye cualquier forma tautómera, conformacional isomérica diastereomérica o enantiómera, que exhibe actividad biológica o farmacológica como se describe aquí.

### Farmacología y utilidad

La glicil-2-alil-prolina cíclica (cG-2-AlilP) se describe en la solicitud de utilidad de EE.UU. No.: 11/399974 presentada el 7 de abril de 2006, titulada "Cyclic G-2Allyl Proline in Treatment of Parkinson Disease", ahora patente de EE.UU. 7,776,876, otorgada el 17 de agosto de 2010, solicitud de utilidad de EE.UU. No.: 10/570,395, presentada el 2 de marzo de 2006 titulada "Neuroprotective Bicyclic Compounds and Methods for Their Use", ahora patente de EE.UU. No. 8,067,425, solicitud de patente internacional PCT No: PCT/US2004/028308, titulada "Neuroprotective Bicyclic Compounds and Methods for Their Use", solicitud de patente provisional de EE.UU. No. de serie: 60/499,956 presentada el 3 de septiembre de 2003, titulada "Neuroprotective Bicyclic Compounds and Methods for Their Use" y la solicitud de patente de EE.UU. No. 13/043,215 presentada el 8 de marzo de 2011, titulada "Cyclic Glycyl-2-AlilProline Improves Cognitive Performance in Impaired Animals".

Ciertos aspectos de esta invención incluyen el uso de G-2-AlilP cíclica en el tratamiento del deterioro cognitivo asociado con el envejecimiento con afecciones neurodegenerativas o en situaciones en las que se encuentra deterioro cognitivo sin neurodegeneración aparente.

- 5 La escopolamina se usa comúnmente en modelos animales de hipofunción colinérgica asociada con la enfermedad de Alzheimer. Los déficits funcionales observados después del tratamiento con escopolamina incluyen los encontrados en pacientes humanos con enfermedad de Alzheimer. De este modo, el tratamiento con escopolamina es razonablemente predictivo del deterioro cognitivo que se encuentra en las enfermedades humanas. Adicionalmente, el tratamiento con escopolamina imita la disfunción cognitiva en seres humanos que no tienen trastornos neurodegenerativos.
- 10 La cG-2-AlilP administrada a animales tratados con disfunción cognitiva inducida por escopolamina produce una mejoría clínica en esos animales, similar a la mejora terapéutica observada en personas que padecen hipofunción colinérgica. Por ejemplo, la hipofunción colinérgica asociada con la enfermedad de Alzheimer. De este modo, los estudios de los efectos de los animales tratados con escopolamina cíclica G-2-AlilP son razonablemente predictivos de los efectos observados en seres humanos que padecen disfunción colinérgica.
- 15 Se pueden administrar otros agentes junto con un compuesto de esta invención. Tales otros agentes se pueden seleccionar del grupo que consiste, por ejemplo, en factores de crecimiento y derivados asociados, por ejemplo, factor I de crecimiento similar a insulina (IGF-I), factor II de crecimiento similar a insulina (IGF-II), el tripéptido GPE, factor de crecimiento transformante  $\beta 1$ , activina, hormona del crecimiento, factor de crecimiento nervioso, proteína de unión a hormona del crecimiento y/o proteínas de unión a IGF. Los compuestos adicionales incluyen glicil-2-metilprolil-glutamato y/u otros compuestos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. No: 10/155,864, ahora patente de EE.UU. No. 7,041,314, otorgada el 9 de mayo de 2006.

#### Aplicaciones terapéuticas

- 25 Las composiciones y métodos de la invención encuentran uso en el tratamiento de animales, tales como pacientes humanos, que padecen deterioro cognitivo y síntomas asociados con ASDs y NDDs. Aún más en general, las composiciones y métodos de la invención encuentran uso en el tratamiento de mamíferos, tales como pacientes humanos, que padecen deterioro de la memoria, discapacidad intelectual, interacción social deteriorada, problemas en la comunicación, intereses restringidos y repetitivos y comportamientos y convulsiones.

#### Composiciones Farmacéuticas y Administración

- 30 La G-2-AlilP cíclica se puede administrar como parte de un medicamento o preparación farmacéutica. Esto puede implicar combinar un compuesto de la invención con cualquier vehículo, adyuvante o excipiente farmacéuticamente apropiado. La selección del vehículo, adyuvante o excipiente dependerá, por supuesto, de la ruta de administración a emplear.

- 35 En general, los compuestos de esta invención se administrarán en cantidades terapéuticamente efectivas por cualquiera de los modos habituales conocidos en la técnica, individualmente o en combinación con otros agentes terapéuticos convencionales para la enfermedad que se está tratando. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede variar ampliamente dependiendo de la enfermedad o lesión, su gravedad, la edad y la salud relativa del animal que se está tratando, la potencia del (de los) compuesto (s) y otros factores. Como agentes antiapoptóticos, antiinflamatorios y antinecróticos, las cantidades terapéuticamente efectivas de G-2-AlilP cíclica pueden variar de 0.001 a 100 miligramos por kilogramo de masa del animal, siendo apropiadas dosis más bajas, tales como de 0.001 a 0.1 mg/kg para la administración a través del fluido cefalorraquídeo, tal como la administración intracerebroventricular, y siendo apropiadas dosis más altas como de 1 a 100 mg/kg para la administración mediante métodos tales como la administración oral, sistémica (por ejemplo, transdérmica) o parenteral (por ejemplo, intravenosa). Una persona de experiencia media en la técnica podrá, sin experimentación indebida, teniendo en cuenta esa experiencia y esta descripción, determinar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de esta invención para una enfermedad o lesión dada.

- 50 La G-2-AlilP cíclica y otros compuestos relacionados con cGP se pueden administrar periféricamente vía cualquier ruta periférica conocida en la técnica. Estas pueden incluir rutas parenterales, por ejemplo, inyección en la circulación periférica, subcutánea, intraorbital, oftálmica, intraespinal, intracisternal, tópica, infusión (usando, por ejemplo, dispositivos de liberación lenta o minibombas tales como bombas osmóticas o parches cutáneos), implante, aerosol, inhalación, escarificación, intraperitoneal, intracapsular, intramuscular, intranasal, oral, bucal, transdérmica, pulmonar, rectal o vaginal. Las composiciones se pueden formular para la administración parenteral a seres humanos u otros mamíferos en cantidades terapéuticamente efectivas (por ejemplo, cantidades que eliminan o reducen la afección patológica del paciente) para proporcionar terapia para las enfermedades neurológicas descritas anteriormente.

- 55 Deseablemente, si es posible, cuando se administra como agente antiapoptótico, antiinflamatorio y antinecrótico, la G-2-AlilP cíclica se puede administrar por vía oral. La cantidad de un compuesto de esta invención en la composición puede variar ampliamente dependiendo del tipo de composición, tamaño de una dosis unitaria, tipo de excipientes y otros factores bien conocidos por las personas de experiencia media en la técnica. En general, la

composición final puede comprender de 0.0001 por ciento en peso (% en peso) a 10% en peso del compuesto de esta invención, preferentemente de 0.001% en peso a 1% en peso, siendo el resto el excipiente o excipientes.

Otras rutas de administración convenientes incluyen la inyección subcutánea (por ejemplo, disuelto en un vehículo fisiológicamente compatible tal como el cloruro de sodio al 0.9%) o la administración directa al SNC. Usando dispositivos estereotácticos y mapas precisos del SNC de un animal, se puede inyectar un compuesto directamente en un sitio de daño neuronal. Tales rutas de administración pueden ser especialmente deseadas en situaciones en las que la perfusión de esa localización se ve comprometida ya sea por una disminución de la perfusión vascular o por una disminución del flujo de líquido cefalorraquídeo (CSF) a esa área. Los ejemplos incluyen la administración mediante inyección cerebroventricular lateral o mediante una derivación insertada quirúrgicamente en el cerebroventrículo lateral del cerebro del paciente, por vía intravenosa, inyección directa en la localización deseada, ya sea directa o indirectamente vía la circulación u otras rutas.

Por "directa o indirectamente vía la circulación" queremos decir administración de cG-2-AlilP a cualquier tejido que tenga flujo sanguíneo suficiente para administrar el agente a la circulación. Ejemplos no limitantes incluyen la piel, nariz, faringe, tracto gastrointestinal u otro tejido similar. Cuando se administra a tal tejido, el agente es absorbido por el tejido, donde el agente entra en el líquido intersticial del tejido, y subsecuentemente es absorbido por las vénulas, capilares, arteriolas o conductos linfáticos. A continuación, el agente se transporta a la circulación sistémica general, donde se puede administrar al sitio afectado, incluido el cerebro. Cuando el agente se administra subcutáneamente o peritonealmente, el agente es absorbido por un tejido adyacente, y el agente entra a la circulación localmente, y subsecuentemente se administra a la circulación general, donde puede ser transportado al cerebro. Cuando el agente se acerca a la barrera hematoencefálica, el agente a continuación se puede difundir en el cerebro, ya sea al tejido neural o al líquido cefalorraquídeo, donde se puede administrar a los tejidos neurales.

La cantidad efectiva de compuesto en el SNC se puede incrementar mediante la administración de una forma profármaco de un compuesto, que comprende un compuesto de la invención y un vehículo, en el que el vehículo se une a un compuesto de la invención mediante una unión que es susceptible de escisión o digestión dentro del paciente. Se puede emplear cualquier unión apropiada que se escindirá o digerirá después de la administración.

Sin embargo, los solicitantes no tienen intención de excluir otras formas de administración.

En realizaciones adicionales de la invención, restaurar la función nerviosa en un animal puede comprender administrar una cantidad terapéutica de G-2-AlilP cíclica en combinación con otro agente neuroprotector, seleccionado, por ejemplo, de factores de crecimiento y derivados asociados (factor de crecimiento similar a la insulina-I (IGF-I), factor de crecimiento similar a la insulina-II (IGF-II), factor de crecimiento transformante  $\beta$ -1, activina, hormona de crecimiento, factor de crecimiento nervioso, proteína de unión a hormona de crecimiento, proteínas de unión a IGF (especialmente IGFBP-3), factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor de crecimiento de fibroblastos ácido, el producto del gen hst/Kfgk, FGF-3, FGF-4, FGF-6, factor de crecimiento de queratinocitos y factor de crecimiento inducido por andrógenos. Los miembros adicionales de la familia FGF incluyen, para ejemplo, int-2, factor homólogo 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (FHF-1), FHF-2, FHF-3 y FHF-4, factor de crecimiento de queratinocitos 2, factor de activación glial, FGF-10 y FGF-16, factor neurotrófico ciliar, factor de crecimiento derivado del cerebro, neurotrofina 3, neurotrofina 4, morfogenética ósea proteína 2 (BMP-2), factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales, factor neurotrófico dependiente de la actividad, factor inhibidor de la leucemia de citoquinas, oncostatina M, interleucina),  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - o consenso-interferón, y TNF- $\alpha$ . Otras formas de agentes terapéuticos neuroprotectores incluyen, por ejemplo, clometiazol; ácido cinurénico, Semax, tacrolimus, L-treo-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol, análogo de andrenocorticotropina-(4-9) (ORG 2766) y dizolcipina (MK-801), selegilina; antagonistas de glutamato tales como, NPS1506, GV1505260, MK-801, GV150526; 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  $\alpha 4$  ( $\alpha 4\beta 1$  y  $\alpha 4\beta 7$ ), tales como anti-MAdCAM-1mAb MECA-367 (número de acceso de la ATCC HB-9478).

La G-2-AlilP cíclica y otros compuestos relacionados con cGP se administran apropiadamente mediante un sistema de liberación sostenida. Los ejemplos apropiados de composiciones de liberación sostenida incluyen matrices de polímero semipermeable en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida incluyen polilactidas (Patente de EE.UU. No. 3,773,919; EP 58,481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman et al., 1983, Biopolymers: 22: 547-56), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res.: 15: 267), etileno-acetato de vinilo (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res.: 15: 267), o poli-D-(-)-ácido 3-hidroxibutírico (EP 133,988). Las composiciones de liberación sostenida también incluyen un compuesto atrapado en liposomas. Los liposomas que contienen el compuesto se preparan por métodos conocidos per se: documentos DE 3218121, EP 52322, EP 36,676, EP 88,046, EP 143,949, EP 142,641, solicitud de patente japonesa 83-118008, patentes de EE.UU. Nos. 4,485,045 y 4,544,545 y EP 102,324. Normalmente, los liposomas son del tipo unilamellar pequeño (de alrededor de 200 a 800 Angstroms) en los que el contenido de lípidos es mayor que alrededor de 30 por ciento en moles de colesterol, ajustándose la proporción seleccionada para la terapia más eficaz.

Para la administración parenteral, en una realización, la G-2-AlilP cíclica se puede formular generalmente mezclando cada uno con el grado de pureza deseado, en una forma inyectable de dosificación unitaria (disolución, suspensión o



emulsión), con un vehículo farmacéutica o parenteralmente aceptable, es decir, uno que no es tóxico para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas y es compatible con otros ingredientes de la formulación.

Para la administración de un compuesto de esta invención a un tejido de la mucosa, se puede incorporar el compuesto en una formulación de gel. Una vez administrado a la mucosa (por ejemplo, cavidad oral, tracto gastrointestinal, recto), el agente se puede difundir fuera del gel, o el gel se puede degradar, liberando por ello el agente en el tejido, donde puede ser absorbido en la circulación. Las formulaciones de gel ejemplares pueden incluir aquellas preparadas con carboxipolisacáridos tales como carboximetilcelulosa, carboxietilcelulosa, quitina, quitosano, almidón, celulosa, proteínas tales como ácido hialurónico u otros polímeros, tales como polivinilpirrolidina, poli(alcoholes vinílicos), así como otros materiales de gel conocidos en la técnica.

Generalmente, las formulaciones se preparan poniendo en contacto G-2-AlilP cíclica con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos. A continuación, si es necesario, el producto se conforma con la formulación deseada. Preferentemente, el vehículo es un vehículo parenteral, más preferentemente una disolución que es isotónica con la sangre del receptor. Los ejemplos de tales vehículos portadores incluyen agua, disolución salina, disolución de Ringer, una disolución tamponada y disolución de dextrosa. Los vehículos no acuosos tales como aceites fijos y oleato de etilo también son útiles aquí.

Un vehículo contiene apropiadamente cantidades menores de aditivos, tales como sustancias que mejoran la isotonicidad y la estabilidad química. Tales materiales no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, succinato, ácido acético y otros ácidos orgánicos o sus sales; antioxidantes tales como el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente diez residuos), por ejemplo, poliarginina o tripéptidos; proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; glicina; aminoácidos tales como ácido glutámico, ácido aspártico, histidina o arginina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen celulosa o sus derivados, glucosa, manosa, trehalosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones como sodio; tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos, poloxámeros o polietilenglicol (PEG); y/o sales neutras, por ejemplo, NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, etc.

La G-2-AlilP cíclica y otros compuestos de cGP típicamente se formulan en tales vehículos a un pH de alrededor de 4.5 a 8. Se entenderá que el uso de algunos de los excipientes, vehículos o estabilizadores anteriores dará como resultado la formación de sales del compuesto. La preparación final puede ser un líquido estable o un sólido liofilizado.

Las formulaciones de G-2-AlilP cíclica en composiciones farmacéuticas también pueden incluir adyuvantes. Los adyuvantes típicos que se pueden incorporar en comprimidos, cápsulas y similares son un aglutinante tal como acacia, almidón de maíz o gelatina; un excipiente tal como celulosa microcristalina; un agente desintegrante como el almidón de maíz o el ácido alginico; un lubricante tal como estearato de magnesio; un agente edulcorante tal como sacarosa o lactosa; un agente saborizante como la menta, la gaulteria o la cereza. Cuando las formas de dosificación son comprimidos, las composiciones de G-2-AlilP cíclica pueden incluir aglutinantes y, opcionalmente, un revestimiento liso. Cuando la forma de dosificación es una cápsula, además de los materiales anteriores, también puede contener un vehículo líquido tal como un aceite graso. Se pueden usar otros materiales de diversos tipos como revestimientos o como modificadores de la forma física de la unidad de dosificación. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, un edulcorante tal como sacarosa, conservantes como propilparabeno, un agente colorante y un agente saborizante tal como la cereza. Las composiciones estériles para inyección se pueden formular según la práctica farmacéutica convencional. Por ejemplo, se puede desear la disolución o suspensión del compuesto activo en un vehículo tal como agua o aceite vegetal natural como aceite de sésamo, cacahuete o de semilla de algodón o un vehículo graso sintético como oleato de etilo o similares. Se pueden incorporar tampones, conservantes, antioxidantes y similares según la práctica farmacéutica aceptada.

Para inyección, administración intraventricular y otras rutas invasivas de administración, la G-2-AlilP cíclica debe ser estéril. La esterilidad se puede lograr mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, filtración a través de membranas de filtración estériles (por ejemplo, membranas de 0.2 micrómetros). Las composiciones terapéuticas generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de disolución intravenosa que tiene un tapón que se puede perforar con una aguja de inyección hipodérmica.

Una formulación farmacéutica que contiene G-2-AlilP cíclica normalmente se almacenará en recipientes unitarios o multidosis, por ejemplo, en ampollas o viales sellados, como una disolución acuosa o como una formulación liofilizada para la reconstitución. Como ejemplo de una formulación liofilizada, se llenan viales de 10 ml con 5 ml de disolución acuosa de compuesto al 1% (peso/v) esterilizada y la mezcla resultante se liofiliza. La disolución de infusión se prepara reconstituyendo el compuesto liofilizado usando agua para inyección bacteriostática. Se puede apreciar fácilmente que se pueden usar otras formas de dosificación y tipos de preparaciones, y todos se consideran parte de esta invención.

### Preparación de los compuestos

Los materiales de partida y los reactivos usados en la preparación de G-2-AlilP cíclica están disponibles en

proveedores comerciales tales como Aldrich Chemical Company (Milwaukee, Wisconsin), Bachem (Torrance, California), Sigma (St. Louis, Missouri) o se preparan por métodos bien conocidos por la persona de experiencia media en la técnica siguiendo los procedimientos descritos en referencias tales como Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, vols 1-17, John Wiley and Sons, Nueva York, N.Y., 1991; Rodd's Chemistry of Carbon Compounds, vols. 1-5 and supplements, Elsevier Science Publishers, 1989; Organic Reactions, vols. 1-40, John Wiley and Sons, Nueva York, N.Y., 1991; March J; Advanced Organic Chemistry, 4<sup>th</sup> 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 los aminoácidos protegidos, están ampliamente disponibles comercialmente; y la preparación de aminoácidos modificados y sus amidas o ésteres se describen ampliamente en la bibliografía química y bioquímica y, de este modo, son bien conocidos por las personas de experiencia media en la técnica.

Los materiales de partida, productos intermedios y productos finales de esta invención se puede aislar y purificar usando técnicas convencionales, que incluyen filtración, destilación, cristalización, cromatografía y similares. Se pueden caracterizar usando métodos convencionales, que incluyen constantes físicas y datos espectrales.

La G-2-AlilP cíclica es un dipéptido cíclico (2,5-dicetopiperazina bicíclica) y es miembro de la clase de compuestos conocidos como GPx cíclica ("cGP"). En general, los cGP y la G-2-AlilP cíclica se pueden preparar por métodos tales como los ya bien conocidos por las personas de experiencia media en la técnica de síntesis de péptidos y péptidos modificados, siguiendo los esquemas de reacción descritos en las Figuras a continuación de esta memoria descriptiva, o siguiendo otros métodos bien conocidos por las personas de experiencia media en la técnica de la síntesis de péptidos y análogos. Véase, por ejemplo, Bodanzsky: Principles of Peptide Synthesis, Berlín, New York: Springer-Verlag 1993.

La síntesis de los compuestos de dicetopiperazina de esta invención se puede realizar mediante síntesis en fase de disolución como se discute en los Ejemplos o vía el método de síntesis en fase sólida ejemplificado por Merrifield et al. 1963 J. Amer. Chem Soc.: 85, 2149-2156. La síntesis en fase sólida se puede realizar usando sintetizadores de péptidos comerciales, tales como el Modelo 430A de Applied Biosystems, usando los protocolos establecidos para el instrumento.

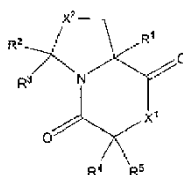
Se pueden encontrar ejemplos específicos de síntesis de dicetopiperazina en los siguientes ejemplos y, por ejemplo, en Fischer, 2003, J. Peptide Science: 9: 9-35 y referencias en el mismo. Una persona de experiencia media en la técnica no tendrá dificultades, teniendo en cuenta esa experiencia y el conocimiento disponible, y de esta descripción, en el desarrollo de uno o más métodos sintéticos apropiados para los compuestos de esta invención.

La elección de los grupos protectores apropiados para el método elegido (fase sólida o fase de disolución), y de sustratos apropiados si se usa la síntesis en fase sólida, estará dentro de la experiencia de una persona de experiencia media en la técnica. Los grupos protectores apropiados para la síntesis de péptidos incluyen *t*-butiloxicarbonilo (Boc), fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), bencilo (Bzl), *t*-amiloxicarbonilo (Aoc), tosilo (Tos), benciloxicarbonilo (Z o Cbz), *o*-bromo-benciloxicarbonilo (BrZ) y similares. Los grupos protectores adicionales se identifican en Goodman M. (ed.), "Synthesis of Peptides and Peptidomimetics" en Methods of organic chemistry (Houben-Weyl) (Workbench Edition, E22a, b, c, d, e; 2004; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York).

La elección del agente de copulación para el método elegido también estará dentro de la experiencia de una persona de experiencia media en la técnica. Los agentes de copulación apropiados incluyen DCC (N,N'-diciclohexilcarbodiimida), Bop (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)-fosfonio), PyBop (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio), BopCl (cloruro bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico), hexafluorofosfato de 2-cloro-1,3-dimetilimidazolidinio (CIP) y similares. Se pueden usar otros compuestos en la síntesis, por ejemplo, para prevenir la racemización, tales como HOBt (N-Hidroxibenzotriazol) y HOAt (1-Hidroxí-7-azabenzotriazol).

## Realizaciones

Realización 1. Un método para tratar un síntoma de un trastorno del espectro autista (ASD) o trastorno del neurodesarrollo (NDD) en un animal que padece tal trastorno, que comprende administrar al animal un compuesto que tiene la fórmula:



o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que

X<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste en NR', O y S;

$X^2$  se selecciona del grupo que consiste en  $CH_2$ ,  $NR'$ , O y S;

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OR', -SR', -NR'R', -NO<sub>2</sub>, -CN, -C(O)R', -C(O)OR', -C(O)NR'R', -C(NR')NR'R', trihalometilo, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heteroarilalquilo y heteroarilalquilo sustituido; cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, alquilo, heteroalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo y heteroarilalquilo;

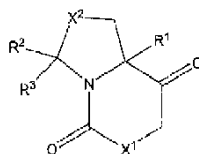
o  $R^4$  y  $R^5$  tomados conjuntamente son  $-CH_2-(CH_2)_n-CH_2-$  en la que n es un número entero de 0 a 6;

o  $R^2$  y  $R^3$  tomados conjuntamente son  $-CH_2-(CH_2)_n-CH_2-$  en la que n es un número entero de 0 a 6;

con la condición de que cuando  $R^1 = \text{metilo}$  y  $R^2 = R^3 = R^4 = H$  entonces  $R^5 \neq \text{bencilo}$  y;

cuando  $R^1 = H$ , por lo menos uno de  $R^2$  y  $R^3 \neq H$ .

Realización 2. Un método para tratar un síntoma de un trastorno del espectro autista (ASD) o trastorno del neurodesarrollo (NDD) en un animal que padece tal trastorno, que comprende administrar al animal un compuesto que tiene la fórmula:



o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que

$X^1$  se selecciona del grupo que consiste en  $NR'$ , O y S;

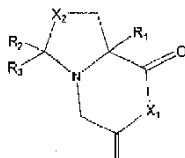
$X^2$  se selecciona del grupo que consiste en  $CH_2$ ,  $NR'$ , O y S;

$R^1$ ,  $R^2$  y  $R^3$  se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un grupo que consiste en -H, -OR', -SR', -NR'R', -NO<sub>2</sub>, -CN, -C(O)R', -C(O)OR', -C(O)NR'R', -C(NR')NR'R', trihalometilo, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heteroarilalquilo y heteroarilalquilo sustituido; cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, alquilo, heteroalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo y heteroarilalquilo;

o  $R^2$  y  $R^3$  tomados conjuntamente son  $-CH_2-(CH_2)_n-CH_2-$  en la que n es un número entero de 0 a 6;

con la condición de que por lo menos un R  $\neq H$ .

Realización 3. Un método para tratar un síntoma de un trastorno del espectro autista (ASD) o trastorno del neurodesarrollo (NDD) en un animal que padece tal trastorno, que comprende administrar al animal un compuesto que tiene la fórmula:



o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que

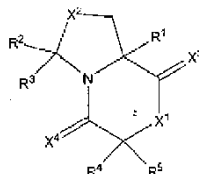
$X^1$  se selecciona del grupo que consiste en  $NR'$ , O y S;

$X^2$  se selecciona del grupo que consiste en  $CH_2$ ,  $NR'$ , O y S;

$R^1$ ,  $R^2$  y  $R^3$  se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un grupo que consiste en -H, -OR', -SR', -NR'R', -NO<sub>2</sub>, -CN, -C(O)R', -C(O)OR', -C(O)NR'R', -C(NR')NR'R', trihalometilo, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heteroarilalquilo y heteroarilalquilo sustituido; cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, alquilo, heteroalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo y heteroarilalquilo;

o  $R^2$  y  $R^3$  tomados conjuntamente son  $-CH_2-(CH_2)_n-CH_2-$  en la que n es un número entero de 0-6.

Realización 4. Un método para tratar un síntoma de un trastorno del espectro autista (ASD) o un trastorno del neurodesarrollo (NDD) en un animal que padece tal trastorno, que comprende administrar al animal un compuesto de la fórmula:



5 o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que

$X^1$ ,  $X^3$  y  $X^4$  se seleccionan independientemente del grupo que consiste en S, O y NH;

$X^2$  se selecciona del grupo que consiste en S, O,  $CH_2$  y NH;

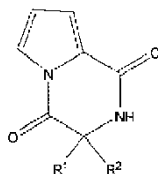
10  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OR', -SR', -NR'R', -NO<sub>2</sub>, -CN, -C(O)R', -C(O)OR', -C(O)NR'R', -C(NR')NR'R', trihalometilo, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heteroarilalquilo y heteroarilalquilo sustituido; cada R 'se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, heteroalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo y heteroarilalquilo;

o  $R^4$  y  $R^5$  tomados conjuntamente son  $-CH_2-(CH_2)_n-CH_2-$  en la que n es un número entero de 0 a 6;

15 o  $R^2$  y  $R^3$  tomados conjuntamente son  $-CH_2-(CH_2)_n-CH_2-$  en la que n es un número entero de 0 a 6;

con la condición de que por lo menos un R  $\neq$  H y que ambos  $X^3$  y  $X^4 \neq$  O.

Realización 5. Un método para tratar un síntoma de un trastorno del espectro autista (ASD) o trastorno del neurodesarrollo (NDD) en un animal que padece tal trastorno, que comprende administrar al animal un compuesto de la fórmula:



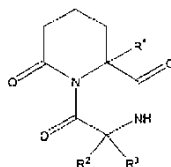
20

o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que

25  $R^1$  y  $R^2$  se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un grupo que consiste en -H, -OR', -SR', -NR'R', -NO<sub>2</sub>, -CN, -C(O)R', -C(O)OR', -C(O)NR'R', -C(NR')NR'R', trihalometilo, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heteroarilalquilo y heteroarilalquilo sustituido; cada R 'se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, alquilo, heteroalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo y heteroarilalquilo;

o  $R^1$  y  $R^2$  tomados conjuntamente son  $-CH_2-(CH_2)_n-CH_2-$  en la que n es un número entero de 0-6.

30 Realización 6. Un método para tratar un síntoma de un trastorno del espectro autista (ASD) o trastorno del neurodesarrollo (NDD) en un animal que padece tal trastorno, que comprende administrar al animal un compuesto de la fórmula:



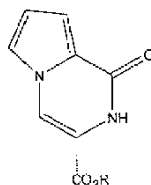
o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que

35  $R^1$ ,  $R^2$  y  $R^3$  se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un grupo que consiste en -H, -OR', -SR', -NR'R', -NO<sub>2</sub>, -CN, -C(O)R', -C(O)OR', -C(O)NR'R', -C(NR')NR'R', trihalometilo, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heteroarilalquilo y heteroarilalquilo

sustituido; cada R 'se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, alquilo, heteroalquilo, alqueno, alquino, arilo, arilalquilo, heteroarilo y heteroarilalquilo;

o R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> tomados conjuntamente son -CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>- en la que n es un número entero de 0-6.

- 5 Realización 7. Un método para tratar un síntoma de un trastorno del espectro autista (ASD) o trastorno del neurodesarrollo (NDD) en un animal que padece tal trastorno, que comprende administrar al animal un compuesto de la fórmula:



o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que

- 10 R se selecciona del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heteroarilalquilo y heteroarilalquilo sustituido.

Realización 8. El método de cualquiera de las realizaciones 1 a 4 o 6 en el que R<sup>1</sup> = metilo

Realización 9. El método de cualquiera de las realizaciones 1 a 4 o 6 en el que R<sup>1</sup> = alilo

Realización 10. El método de cualquiera de las realizaciones 1 a 4 en el que R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = metilo y X<sup>2</sup> = S.

- 15 Realización 11. El método de la realización 1 en el que R<sup>1</sup> = alilo, R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = R<sup>4</sup> = R<sup>5</sup> = H, X<sup>1</sup> = NH, X<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>.

Realización 12. El método de la realización 1 en el que R<sup>1</sup> = metilo, R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> tomados conjuntamente son -CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-, X<sup>1</sup> = NH, X<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>.

Realización 13. El método de la realización 1 en el que R<sup>1</sup> = metilo, R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> tomados conjuntamente son -CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, X<sup>1</sup> = NH, X<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>.

- 20 Realización 14. El método de cualquiera de las realizaciones 1 a 13, que comprende además administrar un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Realización 15. El método de cualquiera de las realizaciones 1 a 13, que comprende además administrar un excipiente farmacéuticamente aceptable y un aglutinante.

- 25 Realización 16. El método de cualquiera de las realizaciones 1 a 13, que comprende además administrar un excipiente farmacéuticamente aceptable y una cápsula.

Realización 17. El método de cualquiera de las realizaciones 1 a 13, que comprende además administrar por lo menos otro agente antiapoptótico, antinecrótico o neuroprotector.

- 30 Realización 18. El método de la realización 17 en el que el otro agente antiapoptótico o neuroprotector se selecciona de entre factores de crecimiento y derivados asociados (factor de crecimiento similar a insulina-I [IGF-I], factor de crecimiento similar a insulina-II [IGF-II], factor de crecimiento transformante β1, activina, hormona de crecimiento, factor de crecimiento nervioso, proteína de unión a hormona de crecimiento, proteínas de unión a IGF [especialmente IGFBP-3], factor de crecimiento de fibroblasto básico, factor de crecimiento de fibroblasto ácido, el producto del gen hst/Kfgk, FGF-3, FGF-4, FGF-6, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento inducido por andrógenos, int-2, factor-1 homólogo del factor de crecimiento de fibroblasto (FHF-1), FHF-2, FHF-3 y FHF-4, factor de crecimiento de queratinocitos 2, 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 línea de células gliales, factor neurotrófico dependiente de la actividad, factor inhibidor de la leucemia de citoquinas, oncostatina M, una interleucina, α-interferón, β-interferón, γ-interferón, interferón consenso, TNF-α, clometiazol; ácido quinurénico, Semax, tacrolimus, L-treo-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol, análogo de adrenocorticotropina-(4-9) [ORG 2766], dizolcipina [MK-801], selegilina, un antagonista de glutamato, un antagonista de AMPA y un agente antiinflamatorio.

Realización 19. El método de la realización 18 en el que dicho antagonista de glutamato se selecciona del grupo que consiste en NPS1506, GV1505260, MK-801 y GV150526.

- 45 Realización 20. El método de la realización 18 en el que dicho antagonista de AMPA se selecciona del grupo que consiste en 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoilbenzo(f)quinoxalina (NBQX), LY303070 y LY300164.

Realización 21. El método de la realización 18, en el que dicho agente antiinflamatorio se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-MAdCAM-1 y un anticuerpo contra un receptor de integrina  $\alpha 4\beta 1$  y un receptor de integrina  $\alpha 4\beta 7$ .

Realización 22. El método de la realización 21 en el que dicho anticuerpo anti-MAdCAM-1 es MECA-367.

5 Realización 23. El método de la realización 1, en el que dicho compuesto es G-2-AlilP cíclica.

Realización 24. El método de la realización 1, en el que dicho compuesto es ciclohexil-G-2MeP cíclica.

Realización 25. El método de la realización 1, en el que dicho compuesto es ciclopentil-G-2MeP cíclica.

10 Realización 26. Un método para tratar un síntoma de un trastorno del espectro autista (ASD) o trastorno del neurodesarrollo (NDD) en un animal que padece dicho trastorno, que comprende administrar al animal una cantidad farmacéuticamente efectiva de glicil-2-alil-prolina cíclica (cG-2-AlilP) a dicho mamífero.

Realización 27. El método de la realización 26, en el que dicha cG-2-AlilP comprende una disolución acuosa y uno o más excipientes, aditivos, vehículos o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

Realización 28. El método de la realización 26, que comprende además uno o más excipientes, vehículos, aditivos, adyuvantes o aglutinantes en un comprimido o cápsula.

15 Realización 29. El método de cualquiera de las realizaciones 1 a 28, en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en trastorno autista, síndrome de Asperger, trastorno desintegrativo infantil y trastorno generalizado del desarrollo no especificado de otra manera (PDD-NOS), y evitación de la demanda patológica (PDA).

20 Realización 30. El método de cualquiera de las realizaciones 1 a 28, en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en síndrome de X frágil (FXS), síndrome de Angelman, complejo de esclerosis tuberosa, síndrome de Phelan McDermid, síndrome de Rett, mutaciones de CDKL5 y trastorno de espasmo infantil ligado a X.

Realización 31. El método de cualquiera de las realizaciones 1 a 30, en el que el compuesto se administra directa o indirectamente vía la circulación.

25 Realización 32. El método de cualquiera de las realizaciones 1 a 31, en el que dicho compuesto se administra vía una ruta oral, intraperitoneal, intravascular, circulación periférica, subcutánea, intraorbital, oftálmica, intraespinal, intracisternal, tópica, infusión, implante, aerosol, inhalación, escarificación, intraperitoneal, intracapsular, intramuscular, intranasal, bucal, transdérmica, pulmonar, rectal o vaginal.

Realización 33. El método de cualquiera de las realizaciones 1 a 32, en el que dicha cantidad efectiva tiene un límite inferior de alrededor de 0.001 miligramos por kilogramo de masa (mg/kg) del animal y un límite superior de aproximadamente 100 mg/kg.

30 Realización 34. El método de cualquiera de las realizaciones 1 a 33, en el que la evaluación de la eficacia es vía la medida de ERK fosforilada (pERK) o Akt fosforilada (pAkt) en linfocitos del animal, donde la normalización de pERK o pAkt indica una reducción en la severidad de dicho trastorno.

35 Realización 35. El método de cualquiera de las realizaciones 1 a 33, en el que dicho tratamiento produce una mejora en un síntoma de ASD o NDD según se evalúa usando uno o más ensayos clínicos seleccionados del grupo que consiste en la The Rett Syndrome Natural History / Clinical Severity Scale, Aberrant Behavior Checklist Community Edition (ABC), Vineland Adaptive Behavior Scales, Clinical Global Impression of Severity (CGI-S), Clinical Global Impression Improvement (CGI-I), el Caregiver Strain Questionnaire (CSQ), o uno o más ensayos fisiológicos seleccionados del grupo que consiste en frecuencia de pico de electroencefalograma (EEG), potencia general en bandas de frecuencia de un EEG, coherencia hemisférica de frecuencias de EEG, movimiento estereotípico de la mano, QTc y variabilidad de la frecuencia cardíaca (HRV), expresión celular anormal de Phospho-ERK1/2 y Fosfo-Akt, expresión anormal de la proteína 43 asociada al crecimiento (GAP-43), expresión anormal de la sinaptofisina (SYN), irregularidades respiratorias y acoplamiento de función cardíaca y respiratoria en comparación con los animales de control que no padecen dicho trastorno.

45 Realización 36. El método de cualquiera de las realizaciones 1-35, en el que dicho síntoma de ASD es deterioro cognitivo o disfunción cognitiva, uno o más signos o síntomas de pérdida de memoria, pérdida de orientación espacial, disminución de la capacidad de aprender, disminución de la capacidad de formar memoria de corto o largo plazo, disminución de la memoria episódica, disminución de la capacidad para consolidar la memoria, disminución de la memoria espacial, disminución de la sinaptogénesis, disminución de la estabilidad sináptica, déficits en la función ejecutiva, déficits en el mapeo cognitivo y la memoria de la escena, déficits en la memoria declarativa y relacional, adquisición rápida disminuida de asociaciones de configuración o conjuntivas, disminución de la codificación específica del contexto y recuperación de eventos específicos, disminución de la memoria episódica y/o de tipo episódico, ansiedad, condicionamiento anormal del miedo, comportamiento social anormal, comportamiento repetitivo, comportamiento nocturno anormal, actividad convulsiva, locomoción anormal, expresión celular anormal de Phospho-ERK1/2 y Phospho-Akt, y bradicardia.

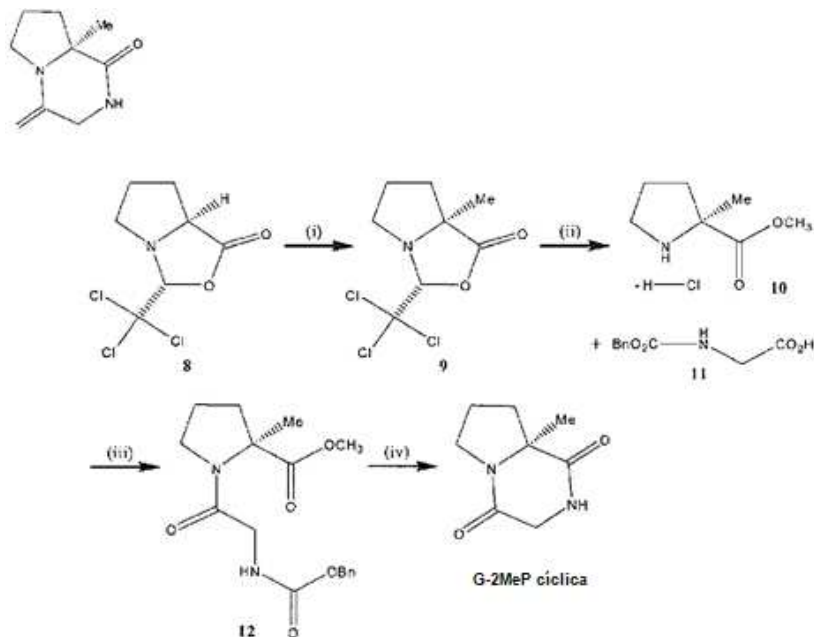
- Realización 37. Un método para detectar la presencia, la gravedad o la evaluación de la eficacia terapéutica de cualquiera de las realizaciones anteriores, que comprende medir la expresión de Phospho-ERK1/2 o Phospho-Akt en un linfocito periférico de un sujeto con un ASD en comparación con el expresión de Phospho-ERK1/2 o Phospho-Akt en un linfocito periférico de un grupo de sujetos que no tienen un ASD, o la expresión de Phospho-ERK1/2 o Phospho-Akt en un linfocito periférico del sujeto antes del tratamiento.

### Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se ofrecen solo a modo de ilustración y no se pretenden que limiten el alcance de la invención.

### Métodos generales de síntesis de compuestos

- 10 Se realizó cromatografía flash usando gel de sílice Scharlau 60 (malla de 40-60  $\mu$ ). La cromatografía analítica en capa fina se llevó a cabo en placas de gel de sílice pre-revestidas de 0.20 mm (ALUGRAM® SIL G/UV<sub>254</sub>) y los compuestos se visualizaron mediante fluorescencia UV, o calentamiento de las placas sumergidas en permanganato de potasio en disolución alcalina.
- 15 Los puntos de fusión en grados Celsius ( $^{\circ}$ C) se determinaron en un aparato para puntos de fusión Electrothermal® y no están corregidos.
- Las rotaciones ópticas se midieron a 20 $^{\circ}$ C en un polarímetro Perkin Elmer 341 usando celdas de 10 cm de longitud de recorrido y se dan en unidades de 10<sup>-1</sup>degcm<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>. Las muestras se prepararon en el disolvente indicado a la concentración especificada (medida en g/100 cm<sup>3</sup>). Los espectros IR se registraron en un espectrómetro Perkin Elmer Spectrum One FT-IR. Las muestras se prepararon como películas delgadas en discos de cloruro de sodio o como sólidos en discos de bromuro de potasio. Una señal ancha indicada por br. Las frecuencias ( $\square$ ) como máximos de absorción se dan en números de onda (cm<sup>-1</sup>).
- 20 Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Bruker AVANCE DRX400 (<sup>1</sup>H, 400 MHz; <sup>13</sup>C, 100 MHz) o un Bruker AVANCE 300 (<sup>1</sup>H, 300 MHz; <sup>13</sup>C, 75 MHz) a temperatura ambiente. Para <sup>1</sup>H RMN, los datos de desplazamientos químicos se describen en partes por millón campo abajo de SiMe<sub>4</sub> y se dan consecutivamente como posición ( $\delta$ <sub>H</sub>), integral relativa, multiplicidad (s = singlete, d = doblete, t = triplete, dd = doblete de dobletes, m = multiplete, br = ancho), constante de acoplamiento (J/Hz) y asignación. Para los datos de <sup>13</sup>C RMN, los desplazamientos químicos se describen en partes por millón en relación con CDCl<sub>3</sub> y se dan consecutivamente como posición ( $\delta$ <sub>C</sub>), grado de hibridación determinado por experimentos DEPT y asignación. Los espectros de <sup>1</sup>H RMN se referenciaron internamente usando SiMe<sub>4</sub> ( $\delta$  0.00) o CDCl<sub>3</sub> ( $\delta$  7.26). Los espectros de <sup>13</sup>C RMN se referenciaron internamente usando CDCl<sub>3</sub> ( $\delta$  77.0). Cuando surgen dos conjuntos de picos en los espectros de RMN debido a diferentes conformaciones alrededor del enlace amida de glicina-prolina, el desplazamiento químico para el conformero cis menor se marca con un asterisco (\*).
- 25 Se registraron medidas de masa precisas en un espectrómetro de masas VG-70SE.
- 30 El hexano y el diclorometano se destilaron antes de su uso. El metanol se secó usando virutas de magnesio y yodo, y se destiló en nitrógeno. La trietilamina se secó sobre hidruro de calcio y se destiló en nitrógeno.
- 35

**Ejemplo 1: síntesis de (8aS)-Metil-hexahidropirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona (G-2MeP cíclica)**

**Esquema 1: reactivos, condiciones y rendimientos:** (i) LDA, THF, -78°C, yodometano, -78 → -50°C, 2 h (63%); (ii) SOCl<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>OH, reflujo, N<sub>2</sub>, 2.5 h (98%); (iii) Et<sub>3</sub>N, BoPCl, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, N<sub>2</sub>, 20.5 h (78%); (iv) 10% Pd/C, CH<sub>3</sub>OH, RT, 15 h (98%).

**(2R, 5S)-4-metil-2-triclorometil-1-aza-3-oxabicyclo[3.3.0]octan-4-ona 9**

Se añadió n-BuLi (1.31 M, 4.68 cm<sup>3</sup>, 6.14 mmol) gota a gota a una disolución agitada de diisopropilamina (0.86 cm<sup>3</sup>, 6.14 mmol) en tetrahidrofurano seco (10 cm<sup>3</sup>) a -78°C en una atmósfera de nitrógeno. La disolución se agitó durante 5 minutos, se calentó a 0°C y se agitó durante 15 minutos. La disolución se añadió a continuación gota a gota a una disolución de oxazolidinona **8** (1.00 g, 4.09 mmol) en tetrahidrofurano seco (20 cm<sup>3</sup>) a -78°C durante 20 min (se volvió de un color marrón oscuro), se agitó durante 30 min más y a continuación se añadió yodometano (0.76 cm<sup>3</sup>, 12.3 mmol) gota a gota durante 5 min. La disolución se calentó a -50°C durante 2 h. Se añadió agua (15 cm<sup>3</sup>) y la disolución se calentó a temperatura ambiente y se extrajo con cloroformo (3 x 40 cm<sup>3</sup>). Los extractos orgánicos combinados se secaron (MgSO<sub>4</sub>), filtraron y evaporaron a sequedad a vacío para dar un semisólido marrón oscuro. La purificación del residuo por cromatografía flash en columna (15% de acetato de etilo-hexano) proporcionó oxazolidinona **9** (0.67 g, 63%) en forma de un sólido amarillo pálido: pf. 55-57°C (bibl., 57-60°C);  $\delta_H$  (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 1.53 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.72-2.02 (3H, m, Pro $\beta$ -H y Pro $\gamma$ -H<sub>2</sub>), 2.18-2.26 (1H, m, Pro $\beta$ -H), 3.15-3.22 (1H, m, Pro $\delta$ -H), 3.35-3.44 (1H, m, Pro $\delta$ -H) y 4.99 (1H, s, NCH).

**Hidrocloreto de metil L-2-metilprolinato 10****a) Usando cloruro de acetilo**

Se disolvió oxazolidinona **9** (0.60 g, 2.33 mmol) en metanol seco (15 cm<sup>3</sup>) en una atmósfera de nitrógeno y se añadió cloruro de acetilo (0.33 cm<sup>3</sup>, 4.66 mmol) gota a gota a la disolución enfriada con hielo. La disolución se calentó a reflujo durante 4.5 h, a continuación se retiró el disolvente a presión reducida para dar un aceite marrón que se purificó por cromatografía flash en columna (CH<sub>3</sub>OH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 10%) dando el hidrocloreto **10** (0.2 g, 48%) en forma de un sólido blanco escamoso: p.f. 107-109°C (bibl., 106-108°C);  $\delta_H$  (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 1.81 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.93-2.14 (3H, m, Pro $\beta$ -H<sub>A</sub>H<sub>B</sub> y Pro $\gamma$ -H<sub>2</sub>), 2.33-2.39 (1H, m, Pro $\beta$ -H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 3.52-3.56 (2H, m, Pro $\delta$ -H<sub>2</sub>) y 3.82 (3H, s, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**b) Usando cloruro de tionilo**

Una disolución de oxazolidinona enfriada con hielo. **9** (53 mg, 0.21 mmol) en metanol seco (1 cm<sup>3</sup>) se trató gota a gota con cloruro de tionilo (0.045 cm<sup>3</sup>, 0.62 mmol). La disolución se calentó a reflujo durante 2.5 h, se enfrió y el disolvente se retiró a presión reducida para dar un aceite marrón. El aceite se disolvió en tolueno (5 cm<sup>3</sup>), se concentró a sequedad para retirar el cloruro de tionilo residual y el metanol y a continuación se purificó por cromatografía flash en columna (CH<sub>3</sub>OH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 10%) para dar el hidrocloreto **10** (16 mg, 43%) en forma de un sólido blanco escamoso. Las asignaciones de <sup>1</sup>H RMN estaban de acuerdo con las dadas anteriormente.

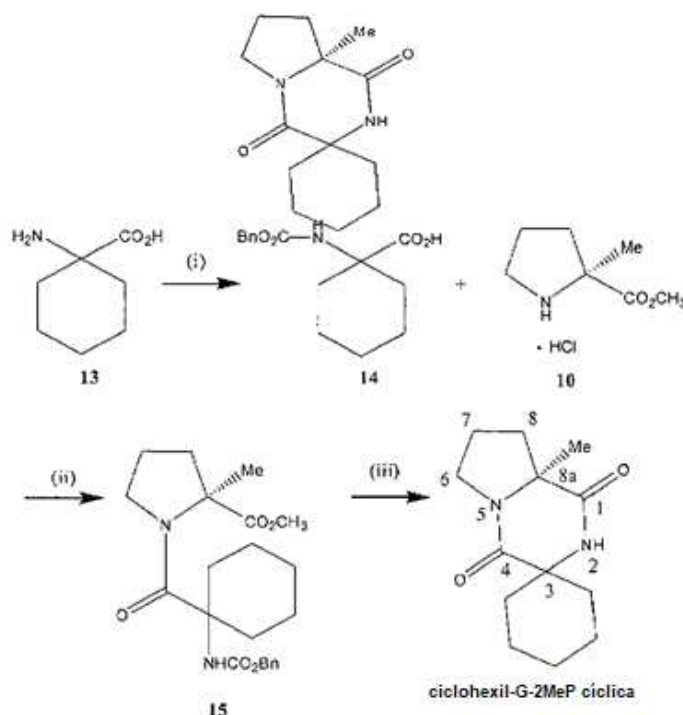


Metil-N-benciloxycarbonil-glicil-L-2-metilprolinato **12**

Se añadió trietilamina seca (0.27 cm<sup>3</sup>, 1.96 mmol) gota a gota a una disolución de hidrocloreto **10** (0.11 g, 0.61 mmol) y *n*-benciloxycarbonil-glicina **11** (98.5%) (0.17 g, 0.79 mmol) en diclorometano seco (35 cm<sup>3</sup>) en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción se agitó durante 10 min. Se añadió cloruro de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BoPCI, 97%) (0.196 g, 0.77 mmol) y la disolución incolora resultante se agitó durante 20.5 h. La disolución se lavó sucesivamente con ácido clorhídrico acuoso al 10% (30 cm<sup>3</sup>) e hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado (30 cm<sup>3</sup>), se secó (MgSO<sub>4</sub>), filtró y evaporó a sequedad al vacío. La purificación del residuo resultante por cromatografía flash en columna (50-80% acetato de etilo-hexano; gradiente de elución) dio dipéptido **12** (0.18 g, 92%) en forma de un aceite incoloro. Se mostró que la amida **12** existe en forma de una mezcla 98:2 trans:cis de conformeros por análisis de <sup>13</sup>C RMN (la relación se estimó a partir de las intensidades relativas de las resonancias a  $\delta$  20.8 y 23.5 asignadas a los átomos de Proy-C de los conformeros menores y mayores, respectivamente): [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> -33.0 (c 1.0 en MeOH);  $\nu_{\text{max}}$  (película)/cm<sup>-1</sup> 3406, 2952, 1732, 1651, 1521, 1434, 1373, 1329, 1310, 1284, 1257, 1220, 1195, 1172, 1135, 1107, 1082, 1052, 1029, 986, 965, 907, 876, 829, 775, 738 y 699;  $\delta_{\text{H}}$  (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 1.49 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.77-2.11 (4H, m, Pro $\beta$ -H<sub>2</sub> y Proy-H<sub>2</sub>), 3.43-3.48 (2H, m, Pro $\delta$ -H<sub>2</sub>), 3.61 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.85-3.89 (2H, m, Gly $\alpha$ -H<sub>2</sub>), 5.04 (2H, s, PhCH<sub>2</sub>), 5.76 (1H, br s, N-H) y 7.21-7.28 (5H, s, ArH);  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 13.8\* (CH<sub>3</sub>, Pro $\alpha$ -CH<sub>3</sub>), 21.1 (CH<sub>3</sub>, Pro $\alpha$ -CH<sub>3</sub>), 20.8\* (CH<sub>2</sub>, Proy-C), 23.5 (CH<sub>2</sub>, Proy-C), 38.0 (CH<sub>2</sub>, Prop-C), 40.8\* (CH<sub>2</sub>, Prop-C), 43.3 (CH<sub>2</sub>, Gly $\alpha$ -C), 45.5\* (CH<sub>2</sub>, Gly $\alpha$ -C), 46.6 (CH<sub>2</sub>, Pro $\delta$ -C), 48.7\* (CH<sub>2</sub>, Pro $\delta$ -C), 51.9\* (CH<sub>3</sub>OCH<sub>3</sub>), 52.1 (CH<sub>3</sub>OCH<sub>3</sub>), 60.0\* (quat., Pro $\alpha$ -C), 66.0 (quat., Pro $\alpha$ -C), 66.3 (CH<sub>2</sub>PhCH<sub>2</sub>), 68.6\* (CH<sub>2</sub>PhCH<sub>2</sub>), 127.5 (CH, Ph), 127.6 (CH, Ph), 127.9\* (CH, Ph), 128.1 (CH, Ph), 128.3\* (CH, Ph), 136.2 (quat., Ph), 155.9 (quat., NCO<sub>2</sub>), 166.0 (quat., Gly-CON), 169.4\* (quat., Gly-CON) y 173.6 (quat., CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); *m/z* (EI +) 334.1535 (M<sup>+</sup>. C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> requiere 334.1529).

(8aS)-Metil-hexahidropirrollo[1,2-a]pirazina-1,4-diona (**G-2MeP** cíclica)

A una disolución de dipéptido **12** (0.167 g, 0.51 mmol) en metanol (8.0 cm<sup>3</sup>) se añadió Pd al 10% sobre carbón activado (8.1 mg, 0.076 mmol) y el recipiente se lavó con hidrógeno gaseoso. La suspensión resultante se agitó vigorosamente en una atmósfera de hidrógeno durante 15 h. A continuación, la mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celite y a continuación un tapón corto de gel de sílice con metanol, y el disolvente se retiró a presión reducida para producir **G-2MeP** cíclica (83 mg, 98%) en forma de un sólido amarillo: p.f. 133-135°C; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> -128.1 (c 0.52 en MeOH);  $\delta_{\text{H}}$  (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 1.36 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.87-2.01 (3H, m, Pro $\beta$ -H<sub>A</sub>H<sub>B</sub> y Proy-H<sub>2</sub>), 2.07-2.21 (1H, m, Pro $\beta$ -H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 3.45-3.64 (2H, m, Pro $\delta$ -H<sub>2</sub>), 3.82 (1H, dd, *J* 17.1 y 4.1, CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>NH), 3.99 (1H, d, *J* 17.1, CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>NH) y 7.66 (1H, br s, N-H);  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 20.2 (CH<sub>2</sub>, Proy-C), 23.2 (CH<sub>3</sub>, Pro $\alpha$ -CH<sub>3</sub>), 35.0 (CH<sub>2</sub>, Pro $\beta$ -C), 44.7 (CH<sub>2</sub>, Pro $\delta$ -C), 45.9 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>NH), 63.8 (quat., Pro $\alpha$ -C), 163.3 (quat., NCO) y 173.3 (quat., CONH); *m/z* (EI+) 168.08986 (M<sup>+</sup>. C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requiere 168.08988).

**Ejemplo 2: síntesis de (8aS)-Metil-espiro[ciclohexano-1,3(4H)-tetrahidropirrollo[1,2-a]pirazina]-1,4(2H)-diona (ciclohexil-G-2-MeP cíclica)**

**Esquema 2: reactivos, condiciones y rendimientos:** (i)  $\text{BnO}_2\text{CCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ -dioxano (3: 1), 19 h, 96%; (ii)  $\text{Et}_3\text{N}$ , HOAt, CIP, 1,2-dicloroetano, reflujo,  $\text{N}_2$ , 19 h (23%); (iii) 10% Pd/C,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , RT, 17 h (65%).

**Ácido N-benciloxicarbonil-1-aminociclohexano-1-carboxílico (14)**

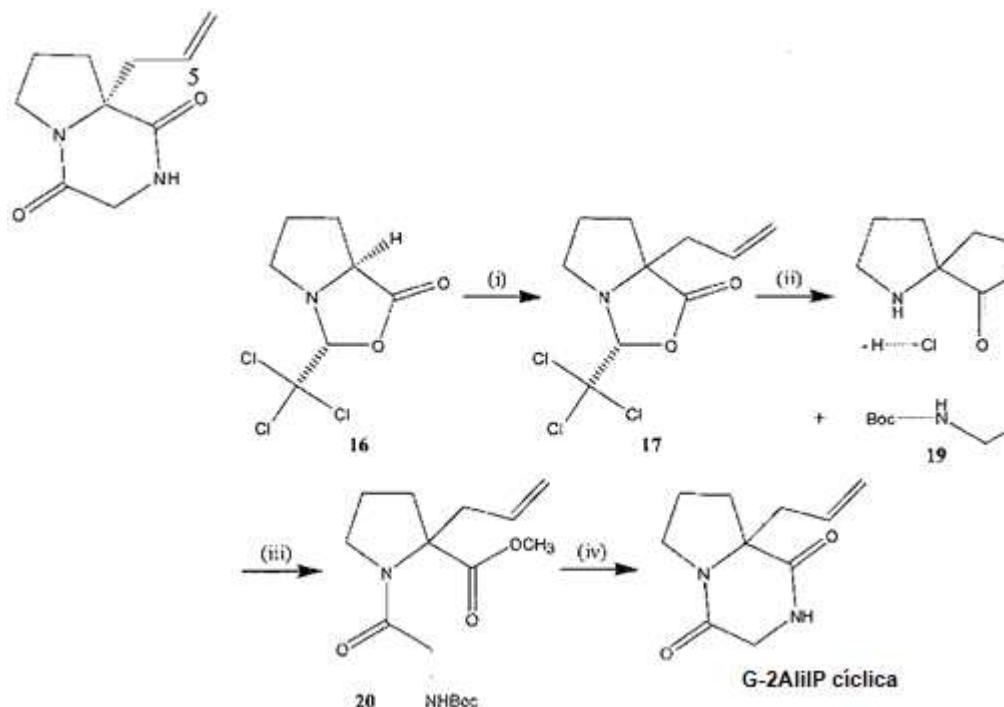
A una suspensión de ácido 1-aminociclohexanocarboxílico **13** (0.72 g, 5.02 mmol) y carbonato de sodio (1.6 g, 15.1 mmol) disueltos en agua-dioxano (21  $\text{cm}^3$ , 3:1) se añadió cloroformiato de bencilo (0.79  $\text{cm}^3$ , 5.52 mmol) gota a gota y la disolución se agitó a temperatura ambiente durante 19.5 h. La capa acuosa se lavó con éter dietílico (60  $\text{cm}^3$ ), se acidificó con HCl 2M y se extrajo con acetato de etilo (2 x 60  $\text{cm}^3$ ). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ), se filtraron y se evaporaron a presión reducida para producir un aceite incoloro, que se solidificó al reposar para dar carbamato **14** (1.23 g, 88%) en forma de un sólido blanco: p.f. 152-154°C (bibl., 148-150°C);  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 1.27-1.56 (3H, m, 3 x ciclohexil-H), 1.59-1.73 (3H, m, 3 x ciclohexil-H), 1.85-1.91 (2H, m, 2 x ciclopentil-H), 2.05-2.09 (2H, m, 2 x ciclopentil-H), 5.02 (1H, br s, NH), 5.12 (2H, s,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ) y 7.27-7.36 (5H, s, Ph);  $\delta_{\text{C}}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 21.1 ( $\text{CH}_2$ , 2 x ciclohexil-C), 25.1 ( $\text{CH}_2$ , 2 x ciclohexil-C), 32.3 ( $\text{CH}_2$ , ciclohexil-C), 59.0 (quat., 1-C), 67.1 ( $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 128.1 (CH, Ph), 128.2 (CH, Ph), 128.5 (CH, Ph), 136.1 (quat., Ph), 155.7 (quat.,  $\text{NCO}_2$ ) y 178.7 (quat.,  $\text{CO}_2\text{H}$ )

**Metil-N-benciloxicarbonil-ciclohexil-glicil-L-2-metilprolinato (15)**

Se añadió trietilamina seca (0.21  $\text{cm}^3$ , 1.5 mmol) gota a gota a una disolución de hidrocloreuro **10** (84.0 mg, 0.47 mmol), ácido carboxílico **14** (0.17 g, 0.61 mmol) e 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (16 mg, 0.12 mmol) en 1,2-dicloroetano seco (26  $\text{cm}^3$ ) en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción se agitó durante 10 min. Se añadió hexafluorofosfato de 2-cloro-1,3-dimetilimidazolidinio (0.13 g, 0.47 mmol) y la disolución resultante se calentó a reflujo durante 21 h, a continuación, se lavó sucesivamente con ácido clorhídrico acuoso al 10% (30  $\text{cm}^3$ ) e hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado (30  $\text{cm}^3$ ), se secó ( $\text{MgSO}_4$ ), filtró y evaporó a sequedad al vacío. La purificación del residuo resultante por cromatografía flash en columna (40-50% acetato de etilo-hexano; gradiente de elución) dio amida **15** (16 mg, 9%) en forma de un sólido blanco. Se mostró que la amida **15** existe en forma de una mezcla 11:1 trans:cis de conformeros por análisis de  $^{13}\text{C}$  RMN (la relación se estimó a partir de las intensidades relativas de las resonancias a  $\delta$  41.3 y 48.2 asignadas a los átomos de  $\text{Pro}\delta\text{-C}$  de los conformeros menores y mayores, respectivamente): p.f. 219-222°C;  $[\alpha]_{\text{D}} -44.9$  (c 1.31 en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ );  $\nu_{\text{max}}$ (película)/ $\text{cm}^{-1}$  3239, 2927, 1736, 1707, 1617, 1530, 1450, 1403, 1371, 1281, 1241, 1208, 1194, 1165, 1150, 1132, 1089, 1071, 1028, 984, 912, 796, 749, 739 y 699;  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 1.24-2.10 (17H, m,  $\text{Pro}\alpha\text{-CH}_3$ ,  $\text{Pro}\beta\text{-H}_2$ ,  $\text{Pro}\gamma\text{-H}_2$  y 5 x ciclohexil- $\text{H}_2$ ), 3.25-3.48 (1H, br m,  $\text{Pro}\delta\text{-H}_A\text{H}_B$ ), 3.61-3.87 (4H, br m,  $\text{OCH}_3$  y  $\text{Pro}\delta\text{-H}_A\text{H}_B$ ), 4.92-5.19 (3H, m, N-H y  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ) y 7.35-7.37 (5H, s, Ph);  $\delta_{\text{C}}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 21.26 ( $\text{CH}_2$ , ciclohexil-C), 21.33 ( $\text{CH}_2$ , ciclohexil-C), 21.7 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{Pro}\alpha\text{-CH}_3$ ), 24.8 ( $\text{CH}_2$ , ciclohexil-C), 25.0 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{Pro}\gamma\text{-C}$ ), 29.4 \* ( $\text{CH}_2$ , ciclohexil-C), 29.7 \* ( $\text{CH}_2$ , ciclohexil-C), 31.1 ( $\text{CH}_2$ , ciclohexil-C), 31.6 ( $\text{CH}_2$ , ciclohexil-C), 31.9 \* ( $\text{CH}_2$ , ciclohexil-C), 32.2 \* ( $\text{CH}_2$ , ciclohexil-C), 32.8 \* ( $\text{CH}_2$ , ciclohexil-C), 37.3 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{Pro}\beta\text{-C}$ ), 41.4 \* ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{Pro}\delta\text{-C}$ ), 48.2 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{Pro}\delta\text{-C}$ ), 52.1 ( $\text{CH}_3\text{OCH}_3$ ), 59.1 (quat.,  $\text{Gly}\alpha\text{-C}$ ), 66.7 ( $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 67.3 \* ( $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 67.4 (quat.,  $\text{Pro}\alpha\text{-C}$ ), 128.0 \* (CH, Ph), 128.1 \* (CH, Ph), 128.3 (CH, Ph), 128.5 (CH, Ph), 128.7 (CH, Ph), 136.6 (quat., Ph), 153.7 (quat.,  $\text{NCO}_2$ ), 171.0 (quat.,  $\text{Gly-CO}$ ) y 174.8 (quat.,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ );  $m/z$  (EI +) 402.2151 ( $\text{M}^+$ .  $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5$  requiere 402.2155).

**(8aS)-Metil-espiro[ciclohexano-1,3(4H)-tetrahidropirrollo[1,2-a]pirazina]-1,4(2H)-diona (ciclohexil-G-2MeP cíclica)**

A una disolución de amida **15** (40 mg, 0.01 mmol) en metanol (3.3  $\text{cm}^3$ ) se añadió Pd al 10% sobre carbón activado (1.6 mg, 0.015 mmol) y el recipiente se lavó con hidrógeno gaseoso. La suspensión resultante se agitó vigorosamente en una atmósfera de hidrógeno durante 61.5 h, a continuación, se filtró a través de una almohadilla Celite™ con metanol (15  $\text{cm}^3$ ). El filtrado se concentró a sequedad a presión reducida para producir un semisólido amarillo que se purificó por cromatografía flash en columna de C18 de fase inversa (gradiente de elución : 0-10%  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ) para producir **ciclohexil-G-2MeP cíclica** (19 mg, 81%) en forma de un sólido blanco: p.f. 174-177°C;  $[\alpha]_{\text{re}} -63.8$  (c 1.13 en  $\text{Cl}_2$ );  $\nu_{\text{max}}$  (película)/ $\text{cm}^{-1}$  3215, 2925, 2854, 1667, 1646, 1463, 1427, 1276, 1232, 1171, 1085, 1014, 900, 868, 818, 783, 726 y 715;  $\delta_{\text{H}}$ , (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 1.31-1.89 (12H, m, 9 x ciclohexil-H y 8a- $\text{CH}_3$ ), 1.94-2.15 (4H, m, 7- $\text{H}_2$  y 8- $\text{H}_2$ ), 2.26 (1H, td,  $J$  13.7 y 4.5, 1 x ciclohexil-H), 3.44-3.51 (1H, m, 6- $\text{H}_A\text{H}_B$ ), 3.79-3.86 (1H, m, 6- $\text{H}_A\text{H}_B$ ) y 6.40 (1H, br s, N-H);  $\delta_{\text{C}}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 19.5 ( $\text{CH}_2$ , 7-C), 20.6 ( $\text{CH}_2$ , ciclohexil-C), 20.8 ( $\text{CH}_2$ , ciclohexil-C), 24.5 ( $\text{CH}_2$ , ciclohexil-C), 25.0 ( $\text{CH}_3$ , 8a- $\text{CH}_3$ ), 33.7 ( $\text{CH}_2$ , ciclohexil-C), 36.3 ( $\text{CH}_2$ , 8-C), 36.5 ( $\text{CH}_2$ , ciclohexil-C), 44.7 ( $\text{CH}_2$ , 6-C), 59.5 (quat., 8a-C), 64.0 (quat., 3-C), 168.1 (quat., 4-C) y 171.6 (quat., 1-C);  $m/z$  (EI +) 236.15246 ( $\text{M}^+$ .  $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$  requiere 236.15248).

**Ejemplo 3: síntesis de (8aS)-Alil-hexahidropirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona (G-2-AlilP cíclica)**

Esquema 3: Reactivos, condiciones y rendimientos: (i) LDA, THF, -78°C, bromuro de alilo, -78 → -30°C, N<sub>2</sub>, 4 h (60%); (ii) cloruro de acetilo, CH<sub>3</sub>OH, reflujo, N<sub>2</sub>, 24 h (63%); (iii) Et<sub>3</sub>N, BoPCl, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, N<sub>2</sub>, 19.5 h (45%); (iv) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1 h, a continuación Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 23 h (37%).

**(2R, 5S)-4-Alil-2-triclorometil-1-aza-3-oxabicyclo[3.3.0]octan-4-ona **17****

Se añadió n-BuLi (1.31 M, 9.93 cm<sup>3</sup>, 13.0 mmol) gota a gota a una disolución agitada de diisopropilamina (1.82 cm<sup>3</sup>, 13.0 mmol) en tetrahidrofurano seco (20 cm<sup>3</sup>) a -78°C en una atmósfera de nitrógeno. La disolución se agitó durante 5 minutos, se calentó a 0°C, se agitó durante 15 minutos y a continuación se añadió gota a gota a una disolución de pro-oxazolidinona **16** (2.12 g, 8.68 mmol) en tetrahidrofurano seco (40 cm<sup>3</sup>) a -78°C durante 20 min y la mezcla de reacción se agitó durante 30 min más y a continuación se añadió bromuro de alilo (2.25 cm<sup>3</sup>, 26.0 mmol) gota a gota durante 5 min. La disolución se calentó lentamente a -30°C durante 4 h, se desactivó con H<sub>2</sub>O (30 cm<sup>3</sup>) y la mezcla se calentó a temperatura ambiente y se extrajo con cloroformo (3 x 80 cm<sup>3</sup>). Los extractos orgánicos combinados se secaron (MgSO<sub>4</sub>), filtraron y evaporaron a sequedad a vacío para producir un semisólido marrón oscuro que se purificó por cromatografía flash en columna (gradiente de elución: 10-20% de acetato de etilo-hexano) para producir oxazolidinona **17** (1.48 g, 60%) en forma de un aceite naranja que solidificó a 0°C, para el que los datos de RMN estaban de acuerdo con los dados en la bibliografía: δ<sub>H</sub> (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 1.58-1.92 (2H, m, Proγ-H<sub>2</sub>), 1.96-2.14 (2H, m, Proβ-H<sub>2</sub>), 2.50-2.63 (2H, m, Proδ-H<sub>2</sub>), 3.12-3.23 (2H, m, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 4.97 (1H, s, NCH), 5.13-5.18 (2H, m, CH=CH<sub>2</sub>) y 5.82-5.92 (1H, m, CH=CH<sub>2</sub>); δ<sub>C</sub> (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 25.1 (CH<sub>2</sub>, Proγ-C), 35.1 (CH<sub>2</sub>, Proβ-C), 41.5 (CH<sub>2</sub>, Proδ-C), 58.3 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 71.2 (quat., Proα-C), 100.4 (quat., CCl<sub>3</sub>), 102.3 (CH, NCH), 119.8 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 131.9 (CH, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>) y 176.1 (quat., C=O); m/z (CI +) 284.0009 [(M + H)<sup>+</sup>, C<sub>10</sub>H<sub>13</sub><sup>35</sup>Cl<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> requiere 284.0012], 285.9980 [(M + H)<sup>+</sup>, C<sub>10</sub>H<sub>13</sub><sup>35</sup>Cl<sub>2</sub><sup>37</sup>ClNO<sub>2</sub> requiere 285.9982], 287.9951 [(M + H)<sup>+</sup>, C<sub>10</sub>H<sub>13</sub><sup>35</sup>Cl<sup>37</sup>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub> requiere 287.9953] y 289.9932 [(M + H)<sup>+</sup>, C<sub>10</sub>H<sub>13</sub><sup>37</sup>Cl<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> requiere 289.9923].

**Hidrocloreto de L-2-alilprolinato de metilo **18****

Una disolución de oxazolidinona enfriada con hielo. **17** (0.64 g, 2.24 mmol) en metanol seco (15 cm<sup>3</sup>) se trató gota a gota con una disolución de cloruro de acetilo (0.36 cm<sup>3</sup>, 5.0 mmol) en metanol (5 cm<sup>3</sup>). La disolución se calentó a reflujo durante 24 h, a continuación, se enfrió y el disolvente se retiró a presión reducida. El aceite marrón resultante se disolvió en tolueno (40 cm<sup>3</sup>) y se concentró a sequedad para retirar el cloruro de tionilo residual y el metanol, a continuación se purificó por cromatografía flash en columna (gradiente de elución: 5-10% de CH<sub>3</sub>OH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para dar hidrocloreto **18** (0.29 g, 63%) en forma de un sólido verde para el que los datos de RMN estaban de acuerdo con los dados en la bibliografía: δ<sub>H</sub> (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 1.72-2.25 (3H, m, Proβ-H<sub>A</sub>H<sub>B</sub> y Proγ-H<sub>2</sub>), 2.32-2.52 (1H, m, Proβ-H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 2.72-3.10 (2H, m, Proδ-H<sub>2</sub>), 3.31-3.78 (2H, m, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 3.84 (3H, s, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5.20-5.33 (2H, m, CH=CH<sub>2</sub>), 5.75-5.98 (1H, m, CH=CH<sub>2</sub>) y 8.06 (1H, br s, N-H); m/z (CI +) 170.1183 [(M + H)<sup>+</sup>, C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>2</sub> requiere 170.1181].

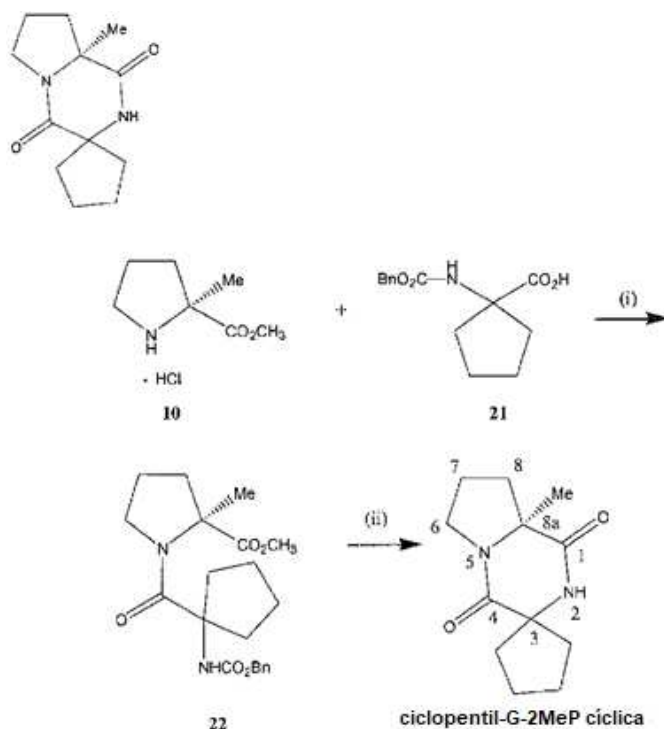
Metil-N-terc-butiloxycarbonil-glicil-L-2-alilprolinato **20**

Se añadió trietilamina seca (0.28 cm<sup>3</sup>, 2.02 mmol) gota a gota a una disolución de hidrocloreto **18** (0.13 g, 0.63 mmol) y N-terc-butiloxycarbonilglicina **19** (0.14 g, 0.82 mmol) en diclorometano seco (35 cm<sup>3</sup>) en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción se agitó durante 10 min. Se añadió cloruro de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BoPCl, 97%) (0.20 g, 0.80 mmol) y la disolución se agitó durante 19.5 h, a continuación se lavó sucesivamente con ácido clorhídrico acuoso al 10% (35 cm<sup>3</sup>) e hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado (35 cm<sup>3</sup>), se secó (MgSO<sub>4</sub>), filtró y evaporó a sequedad al vacío. La purificación del residuo resultante por cromatografía flash en columna (40% acetato de etilo-hexano) dio dipéptido **20** (0.09 g, 45%) en forma de un aceite amarillo claro: [α]<sub>D</sub> +33.8 (C 0.83 en Cl<sub>2</sub>); *v*<sub>max</sub> (película)/cm<sup>-1</sup> 3419, 3075, 2977, 2930, 2874, 1739, 1715, 1656, 1499, 1434, 1392, 1366, 1332, 1268, 1248, 1212, 1168, 1122, 1051, 1026, 1003, 943, 919, 867, 830, 779, 739, 699 y 679; δ<sub>H</sub> (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 1.42 [9H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 1.93-2.08 (4H, m, Proβ-H<sub>2</sub> y Proγ-H<sub>2</sub>), 2.59-2.67 (1H, m, CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 3.09-3.16 (1H, m, CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 3.35-3.44 (1H, m, Proδ-H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 3.56-3.62 (1H, m, Proδ-H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 3.70 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.89 (2H, d, *J* 4.2, Glyα-H<sub>2</sub>), 5.06-5.11 (2H, m, CH=CH<sub>2</sub>), 5.42 (1H, br s, Gly-NH) y 5.58-5.72 (1H, m, CH=CH<sub>2</sub>); δ<sub>C</sub> (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 23.7 (CH<sub>2</sub>, Proγ-C), 28.3 [CH<sub>3</sub>, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 35.0 (CH<sub>2</sub>, Prop-C), 37.6 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 43.3 (CH<sub>2</sub>, Glyα-C), 47.5 (CH<sub>2</sub>, Proδ-C), 52.5 (CH<sub>3</sub>OCH<sub>3</sub>), 68.8 (quat., Proα-C), 79.5 [quat., C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 119.4 (CH<sub>2</sub>, CH=CH<sub>2</sub>), 132.9 (CH, CH=CH<sub>2</sub>), 155.7 (quat., NCO<sub>2</sub>), 166.9 (quat., Gly-CON) y 173.8 (quat., CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); *m/z* (EI +) 326.1845 (M<sup>+</sup>. C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> requiere 326.1842).

(8aS)-Alil-hexahidropirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona (**G-2AlilP** cíclica)

A una disolución de dipéptido **20** (0.09 g, 0.28 mmol) en diclorometano (9 cm<sup>3</sup>) a temperatura ambiente se añadió ácido trifluoroacético (1 cm<sup>3</sup>, 0.013 mmol) gota a gota y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h en una atmósfera de nitrógeno. La disolución se evaporó a presión reducida para dar un aceite incoloro que se disolvió en diclorometano (10 cm<sup>3</sup>), se añadió trietilamina seca (0.096 cm<sup>3</sup>, 0.69 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 4.5 h, después de lo cual se añadió más trietilamina (0.096 cm<sup>3</sup>, 0.69 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante la noche, se concentró a sequedad para dar un aceite verde que se purificó por cromatografía flash en columna (10% de CH<sub>3</sub>OH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para producir **G-2AlilP** cíclica (20 mg, 37%) en forma de un sólido blanquecino: p.f. 106-109 °C; [α]<sub>D</sub> -102.7 (C 0.95 en Cl<sub>2</sub>); *v*<sub>max</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)/cm<sup>-1</sup> 3456, 3226, 2920, 1666, 1454, 1325, 1306, 1299, 1210, 1133, 1109, 1028, 1010, 949, 928, 882, 793, 761 y 733; δ<sub>H</sub> (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 1.92-2.01 (2H, m, Proγ-H<sub>2</sub>), 2.09-2.16 (2H, m, Proβ-H<sub>2</sub>), 2.39-2.56 (2H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub>), 3.46-3.53 (1H, m, Proδ-H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 3.78-3.87 (2H, m, Proδ-H<sub>A</sub>H<sub>B</sub> y Glyα-H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 4.09 (1H, d, *J* 17.2, Glyα-H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 5.16-5.20 (2H, m, CH=CH<sub>2</sub>), 5.73-5.84 (1H, m, CH=CH<sub>2</sub>) y 7.17 (1H, br s, N-H); δ<sub>C</sub> (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 20.1 (CH<sub>2</sub>, Proγ-C), 34.1 (CH<sub>2</sub>, Prop-C), 41.7 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub>), 44.9 (CH<sub>2</sub>, Proδ-C), 46.4 (CH<sub>2</sub>, Glyα-C), 67.2 (quat., Proα-C), 120.9 (CH<sub>2</sub>, CH=CH<sub>2</sub>), 131.0 (CH, CH=CH<sub>2</sub>), 163.4 (quat., NCO) y 171.7 (quat., CONH); *m/z* (EI +) 195.1132 (M<sup>+</sup>. C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requiere 195.1134).

Ejemplo 4: síntesis de (8aS)-Metil-espiro[ciclopentano-1,3(4H)-tetrahidropirrol[1,2-a]pirazina]-1,4(2H)-diona (ciclopentil-G-2-MeP cíclica)



Esquema 4: Reactivos, condiciones y rendimientos: (i) Et<sub>3</sub>N, HOAt, CIP, 1,2-dicloroetano, 83°C, N<sub>2</sub>, 19 h (23%); (ii) 10% Pd/C, CH<sub>3</sub>OH, RT, 17 h (65%).

#### Ácido N-benciloxicarbonil-1-aminociclopentano-1-carboxílico **21**

Una disolución de cloroformiato de bencilo (0.290 g, 1.1 mmol) en dioxano (2.5 cm<sup>3</sup>) se añadió gota a gota a una disolución de ácido 1-aminociclopentanocarboxílico (Fluka) (0.2 g, 1.54 mmol) y carbonato de sodio (0.490 g, 4.64 mmol) en agua (5 cm<sup>3</sup>) a 0°C. La agitación continuó a temperatura ambiente durante la noche y la mezcla de reacción se lavó con éter. La capa acuosa se acidificó con ácido clorhídrico 2 M, se extrajo con acetato de etilo, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se retiró el disolvente para dar carbamato **21** (0.253 g, 62%) en forma de un aceite que se solidificó en reposo. Se mostró que el carbamato **21** era una mezcla de confórmers 70:30 por análisis de <sup>1</sup>H RMN (la relación se estimó a partir de la integración de las resonancias a δ 5.31 y 7.29-7.40, asignadas a los protones N-H de los confórmers mayores y menores, respectivamente): p.f. 70-80°C (bibl.<sup>1</sup> 82-86°C, acetato de etilo, éter de petróleo); δ<sub>H</sub> (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si) 1.83 (4H, br s, 2 x ciclopentil-H<sub>2</sub>), 2.04 (2H, br s, ciclopentil-H<sub>2</sub>), 2.20-2.40 (2H, m, ciclopentil-H<sub>2</sub>), 5.13 (2H, br s, OCH<sub>2</sub>Ph), 5.31 (0.7H, br s, N-H) y 7.29-7.40 (5.3H, m, Ph y N-H \*); δ<sub>C</sub> (100 MHz; CDCl<sub>3</sub>) 24.6 (CH<sub>2</sub>, ciclopentil-C), 37.5 (CH<sub>2</sub>, ciclopentil-C), 66.0 (quat., ciclopentil-C), 66.8 (CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>Ph), 128.0 (CH, Ph), 128.1 (CH, Ph), 128.4 (CH, Ph), 136.1 (quat, Ph), 155.8 (quat., NCO<sub>2</sub>) y 179.5 (quat., CO<sub>2</sub>H)

#### N-benciloxicarbonilciclopentil-glicil-L-2-metilprolinato de metilo **22**

Se añadió trietilamina seca (0.19 cm<sup>3</sup>, 1.4 mmol) gota a gota a una disolución de hidrócloruro **10** (78 mg, 0.43 mmol), ácido carboxílico **21** (0.15 g, 0.56 mmol) y 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (Acros) (15 mg, 0.11 mmol) en 1,2-dicloroetano seco (24 cm<sup>3</sup>) en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción se agitó durante 10 min. Se añadió hexafluorofosfato de 2-cloro-1,3-dimetilimidazolidinio (CIP) (Aldrich) (0.12 g, 0.43 mmol) y la disolución resultante se calentó a reflujo durante 19 h, a continuación, se lavó sucesivamente con ácido clorhídrico acuoso al 10% (30 cm<sup>3</sup>) e hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado (30 cm<sup>3</sup>), se secó (MgSO<sub>4</sub>), filtró y evaporó a sequedad al vacío. La purificación del residuo resultante por cromatografía flash en columna (60% acetato de etilo-hexano) dio amida **22** (39 mg, 23%) en forma de un sólido blanco. Se mostró que la amida **22** existe en forma de una mezcla 3:1 trans:cis de confórmers de carbamato por análisis de <sup>13</sup>C RMN (la relación se estimó a partir de las intensidades relativas de las resonancias a δ 154.1 y 155.7 asignadas a los átomos de C del carbonilo del carbamato de los confórmers mayores y menores, respectivamente): p.f. 200-203°C; [α]<sub>D</sub> -54.5 (c 1.52 en Cl<sub>2</sub>); ν<sub>max</sub> (película)/cm<sup>-1</sup> 3432, 3239, 3042, 2953, 1736, 1712, 1627, 1540, 1455, 1417, 1439, 1374, 1282, 1256, 1216, 1194, 1171, 1156, 1136, 1100, 1081, 1042, 1020, 107, 953, 917, 876, 756 y 701; δ<sub>H</sub> (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 1.33-1.53 (3H, br m, Proα-CH<sub>3</sub>), 1.62-2.20 (11H, m, Proβ-H<sub>2</sub>, Proγ-H<sub>2</sub> y 7 x ciclopentil-H), 2.59-2.71 (1H, br m, 1 x ciclopentil-H), 3.31-3.42 (1H, br m, Proδ-H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 3.58-3.79 (4H, br m, OCH<sub>3</sub> y Proδ-H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 4.92-5.17 (3H, m, N-H y OCH<sub>2</sub>Ph) y 7.27-7.42 (5H, s, Ph); δ<sub>C</sub> (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 21.7 (CH<sub>3</sub>, Proα-CH<sub>3</sub>), 24.1 \* (CH<sub>2</sub>, ciclopentil-C), 24.2 (CH<sub>2</sub>, ciclopentil-C), 24.4 (CH<sub>2</sub>, Proγ-C), 24.5 (CH<sub>2</sub>, ciclopentil-C), 36.4 (CH<sub>2</sub>, ciclopentil-C), 37.1 (CH<sub>2</sub>, ciclopentil-C), 37.2 \* (CH<sub>2</sub>, ciclopentil-C), 37.7 (CH<sub>2</sub>, Proβ-C), 38.2 \* (CH<sub>2</sub>, ciclopentil-C), 48.5 (CH<sub>2</sub>, Proδ-C), 52.1 (CH<sub>3</sub>OCH<sub>3</sub>), 66.6 (CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>Ph), 66.9 (quat., Proα-C), 67.2 (quat., Glyα-C), 127.8 (CH, Ph), 128.2 (CH, Ph), 128.4 (CH, Ph), 136.6 (quat., Ph), 154.1 (quat., NCO<sub>2</sub>), 155.7 \* (quat., NCO<sub>2</sub>), 170.5 (quat., Gly-CO) y 174.7 (quat., CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); m/z (EI +) 388.1991 (M<sup>+</sup>. C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> requiere 388.1998).

\* denota resonancia asignada a un confórmer menor.

#### (8aS)-Metil-1,3(4H)-tetrahidropirrol[1,2-a]pirazina-1,4(2H)-diona (**ciclopentil-G-2MeP cíclica**)

A una disolución de amida **22** (54 mg, 0.14 mmol) en metanol (4.6 cm<sup>3</sup>) se añadió Pd al 10% sobre carbón activado (2.2 mg, 0.021 mmol) y el recipiente se lavó con hidrógeno gaseoso. La suspensión resultante se agitó vigorosamente en una atmósfera de hidrógeno durante 17 h, a continuación, se filtró a través de una almohadilla de Celite<sup>TM</sup> con metanol (15 cm<sup>3</sup>). El filtrado se concentró hasta sequedad a presión reducida para dar un semisólido amarillo que se purificó por cromatografía flash en columna de C18 de fase inversa (gradiente de elución; 0-10% CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) para dar **ciclopentil-G-2MeP cíclica** (20 mg, 65%) en forma de un sólido amarillo: p.f. 160-163°C; [α]<sub>D</sub> -97.9 (c 1.61 en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); ν<sub>max</sub> (película)/cm<sup>-1</sup> 3429, 2956, 2928, 2856, 1667, 1643, 1463, 1432, 1373, 1339, 1254, 1224, 1175, 1086, 1048, 976, 835, 774 y 730; δ<sub>H</sub> (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 1.47 (3H, br s, 8a-CH<sub>3</sub>), 1.56-2.19 (11H, m, 8-H<sub>2</sub>, 7-H<sub>2</sub> y 7 x ciclopentilo), 2.58-2.67 (1H, br m, 1 x ciclopentilo), 3.48-3.56 (1H, m, 6-H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 3.72-3.82 (1H, m, 6-H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>) y 6.56 (1H, br s, N-H); δ<sub>C</sub> (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 19.9 (CH<sub>2</sub>, 7-C), 24.6 (CH<sub>2</sub>, ciclopentilo), 24.92 (CH<sub>3</sub>, 8a-CH<sub>3</sub>), 24.93 (CH<sub>2</sub>, ciclopentilo), 36.0 (CH<sub>2</sub>, 8-C), 38.7 (CH<sub>2</sub>, ciclopentilo), 41.9 (CH<sub>2</sub>, ciclopentilo), 44.8 (CH<sub>2</sub>, 6-C), 64.3 (quat., 8a-C), 66.8 (quat., 3-C), 168.3 (quat., 4-C) y 172.2 (quat., 1-C); m/z (EI +) 222.1369 (M<sup>+</sup>. C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requiere 222.1368).

#### Ensayos in vitro e in vivo

Los siguientes estudios farmacológicos demuestran la eficacia de la G-2-AlilP cíclica en la atenuación del deterioro cognitivo. No se pretende que sean limitantes, y se pueden desarrollar otras composiciones y métodos de esta invención sin experimentación excesiva. Todas esas composiciones y métodos se consideran parte de esta invención. Todos los siguientes experimentos se llevaron a cabo usando protocolos desarrollados bajo pautas aprobadas por el Comité de Ética Animal de la Universidad de Auckland u organismos reguladores comparables.

La eficacia de los fármacos nootrópicos se puede ensayar convenientemente usando modelos de hipofunción

colinérgica. Se ha demostrado que la hipofunción colinérgica contribuye al deterioro cognitivo relacionado con la demencia y sigue siendo un objetivo de intervención terapéutica para la enfermedad de Alzheimer (Hunter 2004). El modelo de hipofunción colinérgica también es aplicable a otras afecciones. Por ejemplo, se ha mostrado que la hipofunción colinérgica inducida por escopolamina puede afectar selectivamente a la precisión de reconocimiento de las expresiones faciales de disgusto y enojo, lo que hace que el efecto de la escopolamina en el reconocimiento de emociones sea similar a los encontrados en pacientes con enfermedad de Huntington (Kamboy 2006). La escopolamina se ha usado comúnmente para inducir la hipofunción colinérgica, y es un modelo bien conocido para la enfermedad de Alzheimer humana, el envejecimiento y otros trastornos de la función cognitiva (Liskowsky et al., Int. J. Dev. Neurosci, 24 (2-3): 149-156 (2006), Lindner et al., Psychopharmacology (Berl.) 27 de septiembre (2006)), Bouger et al., Eur. Neuropsychopharmacol 15 (3): 331-346 (2005), Ebert et al., Eur. J. Clin. Invest., 28 (11): 944-949 (1998), Barker et al., Int. J. Geriatr. Psychiatry, 13 (4): 244-247 (1998)), G. Smith, Brain Res. 471 (2): 103-118 (1998), Flood et al., Behav. Neural. Biol. 45 (2): 169-184 (1986)).

#### **Ejemplo 5: modelo de aprendizaje y memoria del laberinto acuático de Morris (MWM) usado para evaluar los efectos de la G-2-AlilP cíclica en la función cognitiva**

El propósito del estudio fue investigar la G-2AlilP cíclica en modos de déficit cognitivo y estado afectivo (ansiedad).

#### **Métodos**

La primera parte del estudio incluyó el ensayo intensivo de cG-2-AlilP en el modelo de memoria del laberinto acuático de Morris (MWM). El ensayo del MWM es uno de los ensayos usados más frecuentemente para evaluar la memoria espacial en ratas y es bien reconocido que predice con precisión los efectos de la enfermedad y el tratamiento en la memoria espacial en general. Por lo tanto, el ensayo del MWM refleja los efectos de la enfermedad y el tratamiento en sujetos humanos.

Se siguió el procedimiento estándar para el MWM. Usamos una piscina circular (80 cm de profundidad x 150 cm de diámetro) llena de agua opaca, manteniendo la temperatura a 20°C. Una plataforma estaba oculta 1 cm por debajo de la superficie del agua, con una bandera blanca (10 cm x 10 cm) localizada 20 cm por encima de la plataforma para la señal visual y en posición a las 3 en punto con relación a la localización inicial para una señal espacial. En los días 1 a 4 del experimento, las ratas se sometieron a ensayos de adquisición de memoria con 6 pruebas (60 segundos cada una) en cada día de ensayo (fase de habituación). Se registró la latencia para llegar a la plataforma y se usó la reducción diaria de la latencia media para medir la capacidad de aprender dónde estaba la plataforma oculta.

En el día 5 del experimento, las ratas Wistar no envejecidas normales se dividieron en grupos para recibir disolución salina (n = 28) o escopolamina (0.5 mg/kg, i.p., n = 27) para inducir un déficit de memoria. La escopolamina se administró media hora antes de que comenzara el ensayo de investigación.

10 min después del tratamiento con escopolamina, la G-2AlilP cíclica se administró por vía oral a 30 mg/kg (n = 31) administrando el diluyente a los animales tratados con vehículo mediante sonda nasogástrica usando un protocolo de tratamiento idéntico (n = 24).

Los efectos agudos de la cG-2-AlilP se ensayaron a continuación en animales con deterioro de la memoria inducido por escopolamina y en animales de control de la misma edad sin deterioro de la memoria para determinar cualquier efecto farmacológico directo en el procesamiento de la memoria. Los grupos experimentales se detallan en el **Tabla 4** a continuación.

**Tabla 4: animales usados para ensayar los efectos de cG-2-AlilP en la memoria**

|            | Escopolamina | Vehículo |
|------------|--------------|----------|
| Vehículo   | N = 12       | N = 12   |
| cG-2-AlilP | N = 15       | N = 16   |

El día 5, el ensayo de investigación del MWM se realizó con la plataforma retirada. Hubo 6 ensayos, cada uno con una duración máxima de 60 segundos, por lo menos 5 minutos de descanso entre los ensayos. La cantidad de tiempo que las ratas pasan nadando cerca de la plataforma proporcionó una medida de cuánto confiaron en la señal visual y espacial para localizar la plataforma, en lugar de usar una estrategia no espacial. Los datos se recogieron y analizaron usando el software Any-maze (v4.2).

Los datos generados a partir de los ensayos de comportamiento se analizaron usando ANOVA unidireccional para determinar la diferencia entre los grupos de edad. Se usó ANOVA de dos vías para examinar el progreso de los resultados de comportamiento con los puntos de tiempo tratados como factores dependientes. Se usó GraphPad Prism versión 3.02 para el análisis de datos.

## Resultados

El tratamiento con escopolamina perjudicó significativamente la adquisición de memoria espacial en los animales tratados (tiempo hasta la plataforma de aproximadamente el 208% del control en el día 4). La G-2-AlilP cíclica (30 mg/kg; diariamente) revirtió significativamente el deterioro cognitivo inducido por la escopolamina (**FIGs. 1A, 1B, 1C**).

### 5 **Ejemplo 6: la cG-2-AlilP mejora la plasticidad sináptica y la pérdida de memoria relacionada con el envejecimiento**

#### Métodos

Las ratas envejecidas (ratas Wistar macho, de 18-20 meses de edad) se dividieron en cuatro grupos: dos tratados con vehículo (grupos 1 y 3) y dos tratados con G-2-AlilP (grupos 2 y 4) (todos los grupos n = 6-8). La G-2-AlilP cíclica fue sintetizada por el Departamento de Química Medicinal y disuelta en disolución salina normal antes del tratamiento. El día 1, se administró una dosis única de G-2-AlilP cíclica centralmente (20 ng/animal, i.c.v.) a los animales en los grupos 2 y 4; se administró disolución salina a los grupos 1 y 3. Los ensayos de memoria usando el ensayo de reconocimiento de objetos nuevos (Novel Object Recognition Test) comenzaron el día 3 (grupos 1 y 2) o 24 (grupos 3 y 4) después del tratamiento. Al finalizar el NORT, las ratas se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital de sodio y se perfundieron transcardiacamente con disolución salina normal seguido de formalina al 10%. Se recogieron los tejidos en el día 7 en los grupos 1 y 2, y en el día 28 de los grupos 3 y 4. Los cerebros se mantuvieron en el mismo fijador durante un mínimo de 2 días antes de procesarse usando un procedimiento estándar de inclusión en parafina. Brevemente, se fijaron pequeños bloques (10x10x3 mm) de tejido durante hasta 24 horas. Los bloques a continuación se infiltraron e incluyeron en parafina y se cortaron en forma de cintas y se montaron en portaobjetos. Los portaobjetos se almacenaron a continuación hasta que se inició la inmunotinción. La sinaptogénesis en el tejido cerebral se examinó mediante tinción inmunohistoquímica.

#### Ensayo de reconocimiento de objetos nuevos (NORT)

La actividad exploratoria es un comportamiento de aprendizaje típico que muestran los animales, incluidos los seres humanos y las ratas, en entornos novedosos. La actividad exploratoria disminuye con el tiempo cuando lo nuevo se vuelve familiar y se produce la habituación. En entornos familiares, la actividad exploratoria se puede reactivar mediante la introducción de un nuevo objeto. El incremento del comportamiento de exploración una vez que se modifica el entorno después de una habituación proporciona una medida de la memoria para la familiaridad y el reconocimiento de la novedad.

En este ejemplo, llevamos a cabo dos NORTs, uno en los días 3-6 y el otro en los días 24-27. A las ratas se les permitió familiarizarse con el campo de ensayo (90 x 60 x 40 cm) en el primer día del NORT. En los siguientes dos días de cada ensayo, se colocaron cuatro objetos nuevos en el campo de ensayo y las ratas tuvieron 2 pruebas cada día (cada una de 15 minutos de duración y 2 horas de diferencia). El tiempo dedicado a explorar los objetos se redujo una vez que el animal ensayado aprendió acerca de los objetos (fase de entrenamiento). En el último día (día 4 de cada ensayo), un objeto familiar fue reemplazado por un objeto nuevo antes de la segunda prueba (ensayo 6, fase de ensayo). El tiempo medio dedicado a explorar los 3 objetos familiares y el tiempo dedicado a la exploración del objeto novedoso se usó como una medida para el recuerdo de la familiaridad y el reconocimiento de la novedad.

#### Efectos de la cG-2-AlilP en la expresión de receptores NMDA, receptores AMPA, rKrox-24 y ARNm de sinaptofisina en el hipocampo

Se acepta que las formaciones del hipocampo en seres humanos y animales juegan un papel crucial en varios tipos de memoria (Morris et al. 2006 Europ. J. Neurosci. 23, 2829). La funcionalidad específica sigue en disputa, pero se entiende que el hipocampo desempeña un papel clave en la codificación automática y el almacenamiento inicial de las experiencias asistidas (formación de memoria episódica), consolidación de la memoria y detección de novedades. El primer aspecto, la codificación y el almacenamiento a corto plazo de los recuerdos, depende de la plasticidad sináptica y la transmisión sináptica, las cuales están relacionadas con la neurotransmisión glutaminérgica.

La transmisión glutaminérgica se ve facilitada por dos tipos de receptores de glutamato: receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAR) y receptores de ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxalonapropiónico AMPA o receptores no NMDA.

La subunidad GluR1 del receptor APMA es un receptor post-sináptico y se ha usado comúnmente para medir la memoria. Se cree que GluR1 media la entrada de calcio y tiene una función vital en la plasticidad sináptica relacionada con el aprendizaje. Se ha sugerido previamente (Hayashi et al., 2000) que la incorporación de GluR1 en las sinapsis podría ser importante para la potenciación a largo plazo (LTP), que es esencial para el aprendizaje y la memoria.

Se había demostrado que la subunidad NR1 del receptor NMDA es crucial para la formación de la memoria espacial. En los modelos inactivados en los que la subunidad R1 del receptor NMDA en las células piramidales de la región CA1 fue inactivada selectivamente, se mostró que la potenciación a largo plazo se suprimió (Tsien 1996).

La sinaptofisina es una proteína vesicular presináptica. Su detección cuantitativa se establece como un marcador molecular de densidad sináptica.

- 5 La tinción del factor de transcripción neuronal Krox24 se usa como marcador de plasticidad neuronal. Los productos proteicos de la familia Krox24 (así como por el factor neurotrófico derivado del cerebro, BDNF) se han relacionado recientemente con las modificaciones sinápticas estabilizadoras que ocurren durante el LTP y LTD hipocámpales mediados por el receptor NMDA. (Dragunow 2006. Behaviour genetics. 23; 293).

### Tinción inmunohistoquímica

- 10 Se usaron técnicas convencionales de desparafinación y rehidratación para permitir que los tampones y anticuerpos a base de agua penetren en los cortes de tejido. La recuperación de antígeno se usó solo antes de la tinción del receptor AMPA (GluR1), es decir, los cortes se colocaron en tampón de citrato hirviendo y se dejaron enfriar.

Se usaron los siguientes anticuerpos:

- i) anticuerpo primario de conejo contra la subunidad NR1 de NMDA, a una concentración de 1:200 en tampón, incubado durante 48 horas (Chemicon - AB1516), seguido de anticuerpo secundario fluorescente Sigma (alexaFluor 594), a dilución 1:200, incubado durante 24 horas a 40°C.
- 15 ii) anticuerpo primario contra la subunidad GluR1 de AMPA, a una concentración de 1:50 en tampón, incubado durante 48 horas (Chemicon -AB1504) seguido de 3,3'-diaminobencidina (DAB) a una dilución 1:200, incubado durante 24 horas a 40°C.
- iii) anticuerpo primario contra mSinaptofisina (Sigma -S5768), a una concentración de 1:200 en tampón, seguido de DAB a una dilución de 1:200, incubado durante 24 horas a 40°C.
- 20 iv) anticuerpo primario contra rKrox-24 (Santa Cruz - número de catálogo SC-189) a una concentración 1:200 en el tampón, seguido de anticuerpo secundario anti-conejo a una concentración de dilución 1:200, incubado durante 24 horas a 40°C.

(e) Los anticuerpos se detectaron usando microscopía óptica.

### Resultados

#### 25 NORT

Se observó una tendencia a mejorar el reconocimiento de la novedad en los grupos tratados con cG-2-AlilP después de 27 días (**FIG. 2**), pero no 6 días después del tratamiento (sin figura). Concluimos que el tratamiento con cG-2AlilP mejoró el reconocimiento de la novedad en los animales tratados con el fármaco a los 27 días.

Tinción del receptor-1 de glutamato AMPA

- 30 Se tiñeron cortes de hipocampo de las regiones CA1 (capa de células granulares, estratos oriens y radiado) y CA3 (capa de células piramidales) para GluR1 de receptores AMPA.

En CA3 no hubo cambios en el número de receptores en cada región en los días 7 o 28. Sin embargo, hubo un aumento significativo en el número de receptores AMPA en CA1 (capa de células granulares) (**FIG. 4**) y estrato oriens de CA1 (**FIG. 5**) y el día 28.

- 35 Ese cambio histológico se correlacionó con el rendimiento mejorado en el ensayo de reconocimiento de objetos nuevos. La memoria mejorada (**FIG. 2**) se correlacionó con el receptor-1 de glutamato AMPA elevado (**FIG. 3**). Concluimos que la cG-2-AlilP mejoró la neurotransmisión glutaminérgica (GluR1) a nivel post-sináptico.

- 40 Observamos que el tratamiento con cG-2-AlilP dio como resultado un incremento a largo plazo en la tinción de GluR1 en las post-sinapsis e incrementó la densidad de las vesículas presinápticas. Como la mayoría de las vesículas en el hipocampo son vesículas glutámicas, concluimos que la mejora de la memoria a largo plazo estaba asociada con un incremento de la neurotransmisión glutámica.

Tinción de sinaptofisina

Subsecuentemente analizamos el efecto de cG-2AllyP sobre los niveles de tinción de sinaptofisina en las regiones CA3 y CA1 del hipocampo.

- 45 En todas las áreas analizadas hubo un incremento significativo (CA3) o una clara tendencia hacia (CA1 - estratos oriens y radiado) el incremento de la densidad de tinción de sinaptofisina a los 28 días después del tratamiento. Ese incremento es un marcador de la plasticidad sináptica incrementada y una clara indicación de sinaptogénesis, que es la causa más probable de la mejora en el rendimiento de los grupos tratados en los ensayos de memoria aplicados.



## Tinción del preceptor 1 NMDA

Si bien hay una mejora significativa en los receptores AMPA después del tratamiento, los cambios en los receptores NMDA no son tan pronunciados (**FIGs. 9A, 9B y 9C**).

## Tinción de Krox24

- 5 Analizamos la densidad de la tinción de Krox24 en las regiones CA1-2 del hipocampo. Observamos una tendencia hacia el incremento de la densidad en el grupo de tratamiento en comparación con el grupo tratado con vehículo. Concluimos que los resultados de tinción de Krox24 se correlacionan positivamente con una función de memoria mejorada (**FIG. 10**).

10 **Ejemplo 7: la cG-2-AlilP incrementa el número de vesículas pre-sinápticas en el hipocampo de ratas de mediana edad**

**Métodos**

- 15 Cuatro ratas macho Wistar de mediana edad (12 meses) se dividieron en dos grupos: uno tratado con vehículo (n = 2) y otro tratado con cG-2-AlilP (n = 2). Las ratas se trataron por vía subcutánea con 3 mg/kg/día de disolución salina o cG-2-AlilP durante 7 días. El día 21 del experimento se sacrificaron los animales y se recogió el tejido del hipocampo. Secciones semidelgadas del tejido se fijaron con OsO<sub>4</sub> y se incluyeron en resina. Secciones de estrato oriens de CA1 y de CA3 se cortaron en rodajas ultrafinas de 80 nm y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se analizaron aproximadamente 50 sinapsis por animal, se clasificó el tipo de sinapsis y se midió la densidad de las vesículas usando AnalySIS®.

- 20 Se usó microscopía electrónica de transmisión para contar el número total de vesículas en los portaobjetos. La densidad media se calculó midiendo el área total (usando el software AxioVision) y usando el número de vesículas. Seguimos el protocolo en Yoshida et al. 97, Journal of Neurochemistry para calcular la densidad de vesículas en un cuadrado de 200nm x 200nm yuxtapuesta a la densidad post-sináptica (PSD).

**Resultados**

- 25 La **FIG. 6** es un gráfico que muestra el efecto de la cG-2-AlilP sobre la tendencia a incrementar la densidad de la tinción presináptica en la región CA3 del hipocampo el día 24 después del tratamiento.

La **FIG. 7** es un gráfico que muestra el efecto de la cG-2-AlilP sobre la tendencia a incrementar la densidad de la tinción presináptica en el estrato oriens de la región CA1 el día 24 después del tratamiento.

La **FIG. 8** es un gráfico que muestra el efecto de la cG-2-AlilP para incrementar la densidad de la tinción presináptica en el estrato radiado de la región CA1 el día 24 después del tratamiento.

- 30 El número de vesículas presinápticas en las subregiones CA1 y C3 del hipocampo se incrementó después del tratamiento con cG-2-AlilP (3 mg/kg/día x 7 días, s.c.) en comparación con los animales tratados con vehículo a los 21 días después del tratamiento. (**FIG. 11**).

- 35 Concluimos de estos estudios que el tratamiento con escopolamina puede disminuir la función cognitiva en animales, y que estos cambios pueden imitar el deterioro cognitivo en seres humanos con una o más de una variedad de afecciones neurológicas. Además, concluimos que la cG-2-AlilP puede mejorar la función cognitiva en animales tratados con escopolamina y en animales con deterioro cognitivo normal relacionado con el envejecimiento. Además, concluimos que la cG-2-AlilP puede incrementar la sinaptogénesis, incrementar los receptores de AMPA, incrementar la plasticidad neural, puede estabilizar las modificaciones sinápticas y puede incrementar el reconocimiento de la novedad.

- 40 Por lo tanto, estos estudios respaldan el uso de cG-2-AlilP como un agente farmacológico efectivo para tratar una variedad de deterioros cognitivos en animales, incluidos los seres humanos que padecen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y otros trastornos neuronales crónicos, así como el deterioro cognitivo asociado con el envejecimiento.

45 **Ejemplo 8: efectos de la G-2-AlilP cíclica y la ciclopentil-G-2MeP cíclica sobre los explantes de células cerebelosas**

- 50 Para determinar los efectos de la cG-2-AlilP y ciclopentil-G-2-MeP cíclica sobre las células neuronales in vitro, se llevaron a cabo una serie de estudios usando explantes cerebelosos de ratas adultas. Los sistemas in vitro son apropiados para estudiar la proliferación neuronal, el crecimiento de neuritas, la formación de haces nerviosos y los efectos de las toxinas en las células neurales, efectos que son similares a los efectos observados in vivo. De este modo, los resultados de los estudios usando explantes cerebelosos in vitro predicen los efectos de las intervenciones in vivo.

En una primera serie de estudios, se determinaron los efectos del glutamato en los explantes cerebelosos. A

concentraciones fisiológicas, el glutamato es un neurotransmisor en el SNC de los mamíferos, incluidos los seres humanos. Sin embargo, a concentraciones suficientemente altas, el glutamato es neurotóxico, lo que da como resultado la muerte celular neuronal. Debido a que el glutamato es un neurotransmisor natural en el SNC de los mamíferos, incluidos los seres humanos, y debido a que la neurotoxicidad del glutamato se reconoce en la técnica como un reflejo de la neurotoxicidad en general, e incluye la muerte y la degeneración celular, es una herramienta valiosa útil para identificar y caracterizar agentes efectivos en el tratamiento de la neurodegeneración y muerte de células neurales.

### Materiales y métodos

Se colocaron cubreobjetos en una placa Petri grande y se lavaron en alcohol al 70% durante 5 minutos, a continuación, se lavaron con H<sub>2</sub>O Millipore. Los cubreobjetos se secaron al aire y se revistieron con poli-D-lisina (disolución patrón de 1 mg/ml en PBS, 90-100 µl) durante 2 horas a 34°C.

### Extracción de tejido cerebeloso

Se usaron ratas Wistar del día 8 postnatal para el estudio. Las ratas se sacrificaron y se colocaron en hielo durante 1 minuto, se decapitaron y el cerebelo se retiró y se colocó en hielo. Se colocó tejido de cerebelo en 1 ml de PBS suplementado con glucosa al 0.65% (10 µl 65% de patrón D (+) glucosa/1 ml de PBS) en una placa Petri grande, se cortó en secciones más pequeñas y se trituró con una jeringa de insulina de 1 ml vía una aguja 23 G (0.4 mm) y a continuación se roció nuevamente en la disolución de glucosa en la gran placa Petri. El tejido se tamizó (gasa de tamaño de poro de 125 µm) y se centrifugó (2 minutos a 60 g) dos veces para intercambiar el medio a medio START V suplementado con BSA sin suero (Biochrom, Alemania). La segunda etapa de centrifugación se realizó con 1 ml de medio START V. Los microexplantes se reconstituyeron en 500 µl de medio START V y se pusieron en hielo.

### Cultivo de células cerebelosas

Dos horas después del revestimiento PDL, los portaobjetos se lavaron con H<sub>2</sub>O de Millipore y secaron al aire. Cada portaobjetos se colocó en una pequeña placa Petri (diámetro: 35 mm) y se añadieron 40 µl de START V/suspensión celular. El tejido se incubó durante 2 horas a 34°C (período de asentamiento). A continuación, se añadió medio V (1 ml) a la placa Petri y se cultivó a 34°C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub> en aire al 100% de humedad durante 48 horas.

### Aplicación de fármaco

Para el estudio, ciertos cultivos de explante se expusieron solo al vehículo (PBS). En el primer estudio (Estudio 1) 10 µl de toxina 1 (L-glutamato- 100 mM en agua de Millipore; concentración final: 1 mM) y 10 µl de toxina 2 (ácido 3-nitropropiónico- 50 mM- pH 7- en agua de Millipore, concentración final: 0.5 mM) se aplicó simultáneamente con el fármaco a analizar (disolución patrón 10 mM preparada en PBS y diluida a concentraciones finales entre 1-100 nM). En cada caso, los fármacos se dejaron en contacto con los explantes durante la duración del estudio.

### Métodos para determinar los efectos del fármaco

Después de que los explantes se expusieron a los fármacos durante el período de estudio, las células a continuación se lavaron en PBS y a continuación se fijaron en concentraciones crecientes de paraformaldehído (se aplicaron 500 µl de 0.4% de PFA; a continuación 1.2% de PFA; a continuación 3% de PFA y finalmente 4% de PFA (cada etapa de fijación: 2-3 minutos). Finalmente, los microexplantes se lavaron en PBS.

Las neuronas en los explantes se evaluaron a continuación para determinar la morfología (presencia de neuritas) y se contaron como células vivas por campo microscópico. Se contaron cuatro campos que muestran la densidad celular más alta por cubreobjetos y los datos se presentaron como media ± error estándar de la media (SEM); n = 4 cada uno. La significación estadística se evaluó mediante el uso del test de la t de Student no pareada.

### Resultados

#### G-2-AliiP cíclica

Los resultados del estudio se muestran en la **FIG. 12**. El tratamiento con glutamato (1 mM; barra rellena) dio como resultado una pérdida de alrededor del 85% de las neuronas cerebelosas que tienen neuritas en comparación con los controles tratados con vehículo (barra no rellena). Por el contrario, la cG-2-AliiP incrementó significativamente el número de células que tienen neuritas de una manera dependiente de la dosis cuando se administró simultáneamente con glutamato (barras sombreadas). El tratamiento con dosis bajas de cG-2-AliiP (de 100 pm a 10 nm) mostró una disminución significativa de la neurotoxicidad inducida por glutamato.

#### Ciclopentil-G-2-MeP cíclica

Los resultados del estudio se muestran en la **FIG. 13**. La ciclopentil-G-2MeP cíclica incrementó significativamente el número de células que tienen neuritas cuando se administró simultáneamente con glutamato (barras ligeramente sombreadas). El tratamiento con dosis bajas de ciclopentil-G-2MeP cíclica mostró una disminución significativa de la neurotoxicidad inducida por glutamato.

## Conclusiones

Tanto la cG-2-AlilP como la ciclopentyl-G-2-MeP cíclica disminuyeron o previnieron independientemente la neurotoxicidad inducida por glutamato, lo que indica que ambos fármacos son neuroprotectores y se pueden usar para inhibir la degeneración neuronal o la muerte celular.

### 5 Ejemplo 9: efectos de la cG-2-AlilP sobre la lesión hipóxico-isquémica I

#### Materiales y métodos

Para determinar si la cG-2-AlilP podría prevenir la lesión neuronal en respuesta a un accidente cerebrovascular, cirugía de injerto de derivación arterial cardíaca (CABG) u otras lesiones hipóxicas, se llevaron a cabo una serie de estudios en ratas que habían estado expuestas a una lesión hipóxico-isquémica (HI)

10 Se usaron ratas adultas (Wistar, 280-310 g, macho). Se usó la preparación del modelo Levine modificado y los procedimientos experimentales (Rice et al., 1981, Ann. Neurol.: 9: 131-141; Guan et al. J., 1993, Cereb. Blood Flow Metab.: 13 (4): 609-16). En resumen, estos procedimientos consisten en una lesión HI inducida por ligadura unilateral de la arteria carótida seguida de asfixia por inhalación en los animales con una cánula ventricular lateral implantada. Se colocó una cánula guía estereotáxicamente en la parte superior de la duramadre 1.5 mm a la  
15 derecha de la línea media y 7.5 mm anterior al plano cero interaural bajo anestesia de halotano. La arteria carótida derecha se ligó dos veces dos días después de la canulación. Después de 1 hora de recuperación de la anestesia, cada una de las ratas se colocó en una incubadora donde la humedad ( $90 \pm 5\%$ ) y la temperatura ( $31^\circ \pm 0.5^\circ\text{C}$ ) se controlaron durante otra hora, a continuación, se expusieron a hipoxia (6% de oxígeno) durante 10 min. Los animales se mantuvieron en la incubadora durante 2 horas adicionales antes del tratamiento.

20 Nueve pares de ratas fueron tratadas intracerebro-ventricularmente (icv) con cG-2-AlilP (2 ng) o su vehículo (disolución salina normal) 2 horas después de la lesión hipóxico-isquémica. Las ratas en cada grupo se infundieron simultáneamente con cG-2-AlilP o su vehículo bajo anestesia ligera (1.5% de halotano) 2 horas después de la lesión. Se infundió un volumen total de 20  $\mu\text{l}$  (icv) durante 20 minutos mediante una bomba de microinfusión.

25 El examen histológico se realizó en ratas 5 días después de la lesión hipóxico-isquémica. Las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital de sodio y se perfundieron transcardiacamente con disolución salina normal seguido de formalina al 10%. Los cerebros se mantuvieron en el mismo fijador durante un mínimo de 2 días antes de ser procesados usando un procedimiento estándar de inclusión en parafina.

30 Se cortaron secciones coronales de 8  $\mu\text{m}$  de grosor del cuerpo estriado, la corteza cerebral y el hipocampo, y se tiñeron con tionina y fucsina ácida. El resultado histológico se evaluó en tres niveles: (1) el nivel medio del cuerpo estriado, (2) donde apareció por primera vez el hipocampo completo y (3) el nivel donde solo aparece el asta ventral del hipocampo. La gravedad del daño tisular se puntuó en el cuerpo estriado, la corteza y la CA1-2, CA3, CA4 y la circunvolución dentada del hipocampo. El daño tisular se identificó como pérdida neuronal (citoplasma acidófilo (rojo) y núcleos contraídos), pannecrosis y reacciones celulares. El daño tisular se puntuó usando el siguiente sistema de puntuación: 0: el tejido no mostró daño tisular, 1: <5% de tejido dañado, 2: <50% de tejido dañado, 3: >50% de tejido  
35 dañado y 4: >95% de tejido dañado.

#### Resultados y conclusión

Los resultados de este estudio se muestran en la **FIG. 14**. La **FIG. 14** muestra que la lesión hipóxico-isquémica (barras izquierda de cada conjunto) dio como resultado puntuaciones de daño significativo en cada una de las áreas del cerebro estudiadas. La **FIG. 14** también muestra que la administración central de una dosis relativamente baja de  
40 cG-2-AlilP (barras derecha de cada conjunto; 2 ng) redujo significativamente el daño tisular en cada región cerebral examinada en comparación con el grupo tratado con vehículo ( $p < 0.001$ ).

Se puede ver que la cG-2-AlilP puede ser neuroprotectora contra el daño neural causado por la lesión hipóxico-isquémica, incluso cuando se administra después de una lesión hipóxico-isquémica. Este sorprendente hallazgo indica que la cG-2-AlilP es un agente útil para tratar una variedad de afecciones caracterizadas por la degeneración  
45 neural o la muerte celular.

### Ejemplo 10: efectos de la cG-2-AlilP sobre la lesión hipóxico-isquémica II

#### Materiales y métodos

Se usaron materiales y métodos descritos en el Ejemplo 9 y se incrementó el número de grupos de tratamiento. Las ratas se dividieron en 5 grupos de tratamiento tratados intracerebro-ventricularmente (icv) con una de las 4 dosis de  
50 cG-2-AlilP o con su vehículo (disolución salina normal) 2 horas después del ataque hipóxico-isquémico (1: n = 10, 2ng; 2: n = 9, 4 ng; 3: n = 9, 20 ng; 4: n = 10, 100 ng; y 5: n = 9, vehículo).

#### Resultados

La **FIG. 15** muestra que la hipoxia sola (vehículo) produce puntuaciones de daño neuronal en todas las áreas del

cerebro estudiadas. En animales tratados con cG-2-AlilP, la hipoxia tuvo menos efecto, aunque el agente se administró después de la lesión hipóxico/isquémica. El efecto neuroprotector se observó para todas las dosis de cG-2-AlilP, excepto para la dosis más alta (100 ng) administrada al cuerpo estriado. Sin embargo, en todos los otros sitios y con todas las demás dosis, la cG-2-AlilP disminuyó los efectos del daño neural de la hipoxia/isquemia. Además, la cG-2-AlilP tuvo una mayor eficacia en las regiones del cerebro que experimentaron lesiones progresivas asociadas con la muerte celular retardada, tal como la asociada con la apoptosis. En regiones del cerebro, tales como el giro dentado y la corteza cerebral, que son más resistentes a la lesión por HI, se sabe que la progresión de la lesión es más lenta y grave que en las regiones del cerebro que son más sensibles a la lesión por HI, tales como el cuerpo estriado y las subregiones CA1-2, CA3 y CA4 del hipocampo. Este resultado muestra que la cG-2-AlilP puede ser beneficiosa en el tratamiento de trastornos neurológicos crónicos.

#### **Ejemplo 11: efectos de la cG-2-AlilP en el síndrome de X frágil I. Métodos generales**

Los experimentos se realizaron de acuerdo con la United Kingdom Animals (Scientific Procedures) Act de 1986. Los ratones Fmr1-KO2 y los compañeros de camada no modificados (WT) se generaron en un fondo C57BL/6J y se retrocruzaron repetidamente en un fondo C57BL/6J durante más de ocho generaciones y se enviaron a Chile por el laboratorio de Jackson. Los ratones se alojaron por grupos (4-6 por jaula) y todos los animales recibieron ad libitum comida y agua a menos que se indique lo contrario. Los ratones se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (luces apagadas de 19:00 a 7:00) en un ambiente con temperatura controlada ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ).

Las tareas se realizaron en el orden descrito con no más de una tarea realizada por día. Todos los experimentos fueron ciegos para el investigador que realizaba los ensayos y la persona que inyecta a los ratones.

Los datos paramétricos se analizaron usando ANOVA de dos vías (genotipo y sexo como factores entre sujetos). Cuando los datos violaron los supuestos de normalidad o igualdad de varianza, se utilizaron transformaciones ( $\log_{10}$  o raíz cuadrada). Para los ANOVA de medidas repetidas, se ensayó la homogeneidad de la varianza usando el test de esfericidad de Mauchly, y cuando se violaba esto, se usaron las correcciones de Huyn-Feldt. Los datos no paramétricos se analizaron usando tests U de Mann-Whitney. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo en todo momento.

No se han observado casos de toxicidad. Los animales fueron inspeccionados para detectar diferencias en la apariencia del pelaje, si hay presencia de piloerección, estado de los ojos (ojos llorosos o porfiria, ptosis), apariencia de la marcha, temblor, tono de cola, reactividad al manejo, etc.

#### **Ejemplo 12: efectos de la cG-2-AlilP en las neuronas del hipocampo de animales con síndrome de X frágil**

Para determinar si la cG-2-AlilP puede afectar a las neuronas, llevamos a cabo una serie de estudios sobre neuronas in vitro de ratones no modificados o ratones con fmr1 inactivado.

#### **Métodos**

Se prepararon cultivos de células del hipocampo de ratones fetales no modificados y con fmr1 inactivado (14-16 días de gestación). Brevemente, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical bajo anestesia con cloroformo, y las células del hipocampo disociadas se depositaron en placas en vasos multipocillo de 15 mm (Falcon Primaria). Se usó un medio de deposición de sales de MEM-Eagle (suministradas sin glutamina) suplementado con suero bovino fetal al 10%. Los cultivos se mantuvieron a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  humidificado. Después de 3d in vitro se añadió proteína fluorescente verde (GFP) para monitorizar la morfogénesis de la espina dendrítica durante el transcurso del tiempo del cultivo (Ethell and Yamaguchi, 1999; Ethell et al., 2001; Henkemeyer et al., 2003). Las espinas dendríticas generalmente se forman entre 7 y 14 días in vitro (DVI). Para el 14 DIV, la mayoría de las protuberancias dendríticas eran espinas. La densidad media ( $\pm$  DE) de espinas se midió como el número de espinas por micrómetro y los experimentos se realizaron por triplicado.

#### **Resultados**

Los resultados de estos estudios se muestran en Las **FIGs. 16A-16D**. La **FIG. 16A** representa una cámara de cultivo de partición para medir la morfología neuronal. La **FIG. 16B** muestra una fotomicrografía de neuronas del hipocampo tratadas con cG-2-AlilP ("NNZ 2591") a una concentración de 0.5 nM. No observamos cambios estadísticamente significativos (media  $\pm$  DE, de  $n = 3$  experimentos independientes:  $0.36 \pm 0.02$ ).

Por el contrario, la **FIG. 16C** muestra una fotomicrografía de neuronas del hipocampo cultivadas tratadas con cG-2-AlilP a una concentración de 5 nM ( $0.25 \pm 0.03$ ). Observamos efectos estadísticamente significativos en comparación con los cultivos de control ( $0.26 \pm 0.04$ ).

La **FIG. 16D** muestra una microfotografía de neuronas del hipocampo cultivadas tratadas con cG-2-AlilP. Se observó un efecto significativo de reducción de espinas en cultivos tratados con cG-2-AlilP a una concentración de 50 nM ( $0.27 \pm 0.10$ ). No observamos diferencias estadísticamente significativas de los animales no modificados ( $0.26 \pm 0.05$ ).

Concluimos de estos estudios que la cG-2-AlilP reduce las espinas dendríticas in vitro y este resultado indica que la

cG-2-AlilP puede mejorar el desarrollo y la función neurológicos in vivo, y por lo tanto puede ser útil en el tratamiento del síndrome de X frágil en ratones. Debido a que el modelo murino para el Síndrome de X frágil tiene la misma mutación genética que se encuentra en seres humanos con síndrome de X frágil, la cG-2-AlilP puede ser efectiva en el tratamiento de seres humanos con síndrome de X frágil.

### 5 **Ejemplo 13: efectos de la cG-2-AlilP sobre el comportamiento en animales con síndrome de X frágil I: ansiedad y memoria**

Para determinar si la cG-2-AlilP tiene un efecto beneficioso en animales con síndrome de X frágil, realizamos una serie de estudios sobre memoria o habituación in vivo en animales no modificados y con *fmr1* inactivado.

#### **Métodos**

#### 10 **Animales**

Los ratones 2 con *fmr1* inactivado (fondo C57BL/6) se agruparon en grupos del mismo genotipo en una habitación con temperatura y humedad controladas con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h (luzes de 7 a.m. a 7 p.m.). Los ensayos se realizaron durante la fase de luz. La comida y el agua estaban disponibles ad libitum. Los ensayos se realizaron en ratones con *fmr1* inactivado y sus compañeros de camada no modificados. Los experimentos se

15 realizaron de acuerdo con los requisitos de la United Kingdom Animals (Scientific Procedures) Act, 1986.

Los grupos estudiados (n = 10 cada uno) se crearon según lo siguiente.

1. Con *fmr1* inactivado (KO) tratados con vehículo
2. No modificado (Wt) tratados con vehículo
3. Con *fmr1* inactivado (KO) tratados con cG-2-AlilP ("NNZ-2591")
- 20 4. No modificado (Wt) tratados con cG-2-AlilP.

#### **Ensayo de campo abierto para la ansiedad**

El ensayo de campo abierto (OF) es un ensayo combinado que se usa para determinar la ansiedad/hiperactividad y para la habituación a un entorno novedoso, una de las formas más elementales de aprendizaje, en el que la exploración disminuida en función de la exposición repetida al mismo entorno se toma como un índice de memoria.

25 Esto normalmente se estudia en dos sesiones de exposición al campo abierto, una sesión de habituación de 10 minutos y otra de 24 horas.

La **FIG. 17** representa una fotografía del dispositivo usado para estos estudios. El campo abierto es un espacio expuesto en el que se puede seguir el movimiento.

El dispositivo usado para este estudio es un recinto cerrado de PVC gris de 50 x 30 cm dividido en cuadrados de 10 cm. Los ratones se llevan a la sala experimental 5-20 min antes del ensayo. Se coloca un ratón en un cuadrado de esquina mirando hacia la esquina y se observa durante 3 minutos. Se cuenta el número de cuadrados en los que entra (todo el cuerpo) y las sentadas (ambas patas delanteras fuera del suelo, pero no como parte del aseo). También se observa la latencia hasta la primera sentada. El movimiento del ratón alrededor del campo se grabó con un dispositivo de seguimiento de video durante 300 segundos (vNT4.0, Viewpoint). Se registró la latencia hasta que el ratón entra en la parte central más brillante del campo, el tiempo total de permanencia en esta región central y la actividad total (en términos de longitud de la ruta en centímetros).

30 El dispositivo usado para este estudio es un recinto cerrado de PVC gris de 50 x 30 cm dividido en cuadrados de 10 cm. Los ratones se llevan a la sala experimental 5-20 min antes del ensayo. Se coloca un ratón en un cuadrado de esquina mirando hacia la esquina y se observa durante 3 minutos. Se cuenta el número de cuadrados en los que entra (todo el cuerpo) y las sentadas (ambas patas delanteras fuera del suelo, pero no como parte del aseo). También se observa la latencia hasta la primera sentada. El movimiento del ratón alrededor del campo se grabó con un dispositivo de seguimiento de video durante 300 segundos (vNT4.0, Viewpoint). Se registró la latencia hasta que el ratón entra en la parte central más brillante del campo, el tiempo total de permanencia en esta región central y la actividad total (en términos de longitud de la ruta en centímetros).

El ensayo de campo abierto (OF) es un ensayo usado para caracterizar el comportamiento exploratorio, la ansiedad o la hiperactividad en animales habituados a la manipulación diaria en condiciones nuevas y familiares. Durante la exposición al campo abierto, los ratones se habituarán al medio ambiente y, de este modo, explorarán menos, disminuyendo la cantidad de movimiento que muestran con el tiempo.

40 El ensayo de campo abierto (OF) es un ensayo usado para caracterizar el comportamiento exploratorio, la ansiedad o la hiperactividad en animales habituados a la manipulación diaria en condiciones nuevas y familiares. Durante la exposición al campo abierto, los ratones se habituarán al medio ambiente y, de este modo, explorarán menos, disminuyendo la cantidad de movimiento que muestran con el tiempo.

En el presente experimento, registramos el movimiento y la sentada durante una exposición inicial (T1), durante una segunda exposición después de 10 minutos (T2) y durante una tercera exposición después de 24 horas (T3). La falta de reducción de la locomoción o la sentada a los 10 minutos y 24 horas indican déficits en la memoria a corto y largo plazo, respectivamente.

#### 45 **Resultados**

##### **La cG-2-AlilP disminuye la ansiedad en animales con síndrome de X frágil**

La **FIG. 18** muestra gráficos de resultados del ensayo de OF en el que se representa el número de cuadrados en los que entran (eje vertical) para cada uno de los grupos de tratamiento. Los animales no modificados tratados con vehículo (barra izquierda) recorrieron una distancia total de alrededor de 80 cuadrados durante el período de ensayo T1. De manera similar, los animales no modificados tratados con cG-2-AlilP ("NNZ 2591") (tercera barra desde la

50 T1. De manera similar, los animales no modificados tratados con cG-2-AlilP ("NNZ 2591") (tercera barra desde la

izquierda) entraron en alrededor del mismo número de cuadrados durante este período de ensayo.

Por el contrario, los animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo (segunda barra desde la izquierda) entraron en más cuadrados durante el mismo período de tiempo ( $p < 0.001$ ). La magnitud de este efecto era estadísticamente significativa y sustancial, entrando estos animales en alrededor de 150 cuadrados durante el período de ensayo T1. Sin embargo, inesperadamente encontramos que la cG-2-AlilP ("NNZ 2591") redujo significativamente el comportamiento exploratorio de animales con *fmr1* inactivado (barra derecha), con resultados comparables a los observados en animales no modificados tratados con vehículo y tratados con cG-2-AlilP (tercera barra desde la izquierda).

Concluimos de este resultado que la cG-2-AlilP disminuye la ansiedad en animales con *fmr1* inactivado. Debido a que los ratones con *fmr1* inactivado usados en este estudio tienen la misma mutación genética que los seres humanos con síndrome de X frágil, concluimos que la cG-2-AlilP puede disminuir la ansiedad en seres humanos con síndrome de X frágil.

### La cG-2-AlilP mejora la memoria a corto plazo en animales con síndrome de X frágil

La **FIG. 19** muestra gráficos de resultados del ensayo de OF en el período de tiempo T2 (10 minutos), en la que se representa el número de cuadrados en los que entran (eje vertical) para cada uno de los grupos de tratamiento. Como con los resultados en T1 (**FIG. 18**), los animales no modificados tratados con vehículo (barra izquierda) y los animales no modificados tratados con cG-2-AlilP ("NNZ 2591") (tercera barra desde la izquierda) demostraron un comportamiento exploratorio normal, cada grupo entró en alrededor de 45 cuadrados durante el período de tiempo T2. La distancia recorrida en el período de ensayo T2 fue menor que la distancia recorrida durante T1, lo que indica que los animales se habían habituado por lo menos parcialmente al ensayo de OF en este momento.

Los animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo (segunda barra desde la izquierda) mostraron un comportamiento sustancialmente más exploratorio que cualquiera de los dos primeros grupos de animales ( $p < 0.001$ ). De hecho, la magnitud del incremento fue de alrededor de 2 veces, hasta alrededor de 100 cuadrados.

Por el contrario, encontramos inesperadamente que la cG-2-AlilP disminuyó el comportamiento exploratorio de animales con *fmr1* inactivado (barra derecha) y, de hecho, normalizó la magnitud de su comportamiento al de los animales no modificados.

Concluimos de estos resultados que: (1) el síndrome de X frágil en ratones disminuyó la memoria o habituación a corto plazo, y (2) la cG-2-AlilP mejoró la memoria o habituación a corto plazo en animales con *fmr1* inactivado. Debido a que los ratones con *fmr1* inactivado usados en este estudio tienen la misma mutación genética que los seres humanos con síndrome de X frágil, concluimos que la cG-2-AlilP puede mejorar la memoria a corto plazo en seres humanos con síndrome de X frágil.

### La cG-2-AlilP mejora la memoria a largo plazo en animales con síndrome de X frágil

La **FIG. 20** muestra gráficos de resultados del ensayo de OF en el período de tiempo T3, en el que se representa el número de cuadrados en los que entran (eje vertical) para cada uno de los grupos de tratamiento. Como con los resultados en T1 (**FIG. 18**) y T2 (**FIG. 19**), los animales no modificados tratados con vehículo (barra izquierda) y los animales no modificados tratados con cG-2-AlilP ("NNZ 2591") (tercera barra desde la izquierda) demostraron un comportamiento exploratorio normal, entrando cada grupo en alrededor de 25-30 cuadrados durante T3. La distancia recorrida en el período de ensayo T3 fue menor que la distancia recorrida durante T2, y disminuyó aún más en comparación con la observada en T1, lo que indica que los animales se habían habituado progresivamente y tenían una mejor memoria a largo plazo para el ensayo OF por el período de tiempo T3.

Por el contrario, los animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo (segunda barra desde la izquierda) mostraron un comportamiento sustancialmente más exploratorio ( $p < 0.001$ ) que los grupos tratados con vehículo o tratados con cG-2-AlilP. De hecho, la magnitud del incremento fue de alrededor de 2 veces, a alrededor de 100 cuadrados. Curiosamente, en los animales con *fmr1* inactivado, la habituación no se incrementó con el tiempo y la exposición al dispositivo de OF. El número de cuadrados en los que entraron en el período de tiempo T3 fue similar al encontrado en los períodos de tiempo T2 o T1.

Encontramos inesperadamente que como con la memoria a corto plazo, en animales con *fmr1* inactivado, la cG-2-AlilP disminuyó sustancialmente (segunda barra desde la izquierda), y de hecho, el comportamiento exploratorio normalizado en T3 en comparación con los animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo, que indica que la memoria a largo plazo o habituación habían vuelto a la normalidad.

### Conclusiones

Concluimos de estos resultados que: (1) los ratones con *fmr1* inactivado exhibieron disminución de la memoria o habituación a largo plazo, y (2) la cG-2-AlilP mejoró la memoria o habituación a largo plazo en animales con *fmr1* inactivado. Debido a que los ratones con *fmr1* inactivado usados en este estudio tienen la misma mutación genética que los seres humanos con síndrome de X frágil, concluimos que la cG-2-AlilP puede normalizar la memoria a largo

plazo o la habituación en seres humanos con síndrome de X frágil.

#### **Ejemplo 14: efectos de la cG-2-AlilP sobre el comportamiento en animales con síndrome de X frágil II: hiperactividad**

Para determinar si la cG-2-AlilP tiene un efecto beneficioso sobre la hiperactividad en animales con síndrome de X frágil, llevamos a cabo una serie de estudios in vivo en ratones con *fmr1* inactivado.

#### **Métodos**

##### **Animales**

Los ratones con *fmr1* inactivado (KO2) (fondo C57BL/6) se alojaron en grupos del mismo genotipo en una habitación con temperatura y humedad controladas con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h (luces de 7 a.m. a 7 p.m.). Los ensayos se realizaron durante la fase de luz. La comida y el agua estaban disponibles ad libitum. Los ensayos se realizaron en ratones con *fmr1* inactivado y sus compañeros de camada no modificados. Los experimentos se realizaron de acuerdo con los requisitos de la United Kingdom Animals (Scientific Procedures) Act, 1986. Los animales se dividieron en cuatro grupos:

No modificados tratados con vehículo

Con *fmr1* inactivado tratados con vehículo;

No modificados tratados con cG-2-AlilP; y

Con *fmr1* inactivado tratados con cG-2-AlilP.

##### **Ensayo de callejones sucesivos**

En un estudio, usamos un dispositivo de "ensayo de callejones sucesivos". Este dispositivo consta de cuatro callejones sucesivos, cada vez más ansiogénicos conectados linealmente. Cada callejón sucesivo estaba pintado de un color más claro, tenía paredes más bajas y/o era más angosto que el callejón anterior. Los animales se colocaron en el extremo cerrado del callejón 1 (A1), mirando hacia el extremo de la pared. La latencia para ingresar primero a cada callejón (A2, A3 y/o A4), la cantidad de tiempo pasado en cada callejón y el número de entradas en cada callejón se registraron durante un tiempo de ensayo total de 300 segundos.

Para un ensayo de callejones sucesivos, medimos el número de entradas en el callejón 1 (A1), el callejón 2 (A2), el callejón 3 (A3) y el callejón 4 (A4) para cada uno de los 4 grupos de animales descritos anteriormente.

#### **Resultados**

Las **FIGs. 21 y 22** representan los resultados del ensayo de callejones sucesivos. La **FIG. 21** representa un gráfico de resultados obtenidos en animales tratados con vehículo. La **FIG. 22** representa un gráfico de resultados obtenidos en animales tratados con cG-2-AlilP ("NNZ 2591"). Se muestra el número de entradas (eje vertical) para cada uno de los grupos de tratamiento y se muestra la entrada en cada callejón (A1-A4). En la **FIG. 21**, los animales tratados con vehículo mostraron un comportamiento exploratorio, mostrando los animales con *fmr1* inactivado un mayor número de entradas que los animales no modificados. Los animales no modificados tratados con vehículo entraron en los brazos A1 (WT-A1) y A2 (WT-A2) alrededor de 3-4 veces durante el período de ensayo, y no entraron en los brazos A3 (WT-A3) o A4 (WT-A4) ) significativamente.

Por el contrario, los ratones con *fmr1* inactivado tratados con vehículo tuvieron un tiempo de latencia significativamente más corto para ingresar al primer callejón abierto ( $p < 0.001$ ) y pasaron significativamente más tiempo en los callejones abiertos ( $p < 0.001$ ). Estos animales entraron en los brazos A1 (KO-A1) y A2 (KO-A2) alrededor de 10 veces durante el período de ensayo. El tiempo que los animales con *fmr1* inactivado entraron en los brazos A1 y A2 más del doble del número de veces de lo que lo hicieron los animales no modificados, lo que indica un nivel significativamente más alto de hiperactividad que los animales no modificados tratados con vehículo. Los animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo también realizaron más cruces entre callejones en los brazos A3 (KO-A3) y A4 (KO-A4) ( $p < 0.0001$ ).

Concluimos de estos resultados que los ratones con *fmr1* inactivado exhibieron mayor ansiedad que los animales no modificados.

La **FIG. 22** muestra los resultados del ensayo de callejones sucesivos en animales tratados con cG-2-AlilP ("NNZ 2591"). Los animales no modificados tratados con cG-2-AlilP entraron en el brazo A1 (WT-A1) alrededor de 2 veces durante el período de ensayo, y entraron en el brazo A2 (WT-A2) alrededor de 4 veces durante el período de ensayo. Estos resultados son comparables a los resultados obtenidos para animales no modificados tratados con vehículo que se muestran en la **FIG. 21**.

Por el contrario, los animales con *fmr1* inactivado tratados con cG-2-AlilP mostraron una reducción significativa de

las entradas en brazo abierto ( $p < 0.001$ ), así como el tiempo pasado en el centro ( $p < 0.005$ ), lo que indica una reducción de la hiperactividad en comparación con los animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo. La magnitud del efecto de la cG-2-AlilP fue sustancial, con los animales con *fmr1* inactivado tratados con cG-2-AlilP entrando al brazo A1 (KO-A1) alrededor de 4 veces en comparación con alrededor de 8 veces para los animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo mostrado en la **FIG. 21**. Del mismo modo, los animales con *fmr1* inactivado tratados con cG-2-AlilP entraron al brazo A2 (KO-A2) alrededor de 4 veces en comparación con alrededor de 10 veces para los animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo mostrado en la **FIG. 21**. Los animales con *fmr1* inactivado tratados con cG-2-AlilP entraron en el brazo A3 (KO-A3) alrededor de 4 veces en comparación con alrededor de 9 veces para los animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo mostrado en la **FIG. 21**. Finalmente, los animales con *fmr1* inactivado tratados con cG-2-AlilP entraron en el brazo A4 (KO-A4) alrededor de 3 veces en comparación con alrededor de 4 veces para los animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo mostrado en la **FIG. 21**.

## Conclusiones

Concluimos de este estudio que la cG-2-AlilP disminuyó la ansiedad en ratones con *fmr1* inactivado en estas condiciones. Debido a que los ratones con *fmr1* inactivado usados en este estudio tienen la misma mutación genética que los seres humanos con síndrome de X frágil, concluimos que la cG-2-AlilP puede ser eficaz en el tratamiento de seres humanos con síndrome de X frágil.

## Laberinto en cruz elevado

En otro estudio, usamos un "laberinto en cruz elevado". El ensayo del laberinto en cruz elevado es uno de los ensayos más usados para medir la hiperactividad similar a la ansiedad en ratones. El ensayo se basa en la aversión natural de los ratones para áreas abiertas y elevadas, así como en su comportamiento exploratorio espontáneo natural en entornos nuevos. La **FIG. 23** representa una fotografía de un dispositivo usado en este estudio. El aparato consta de dos brazos abiertos y dos brazos cerrados, cruzados en el medio perpendicularmente entre sí, y un área central. Los brazos abiertos están más expuestos y, por lo tanto, crean más ansiedad en los ratones. Por lo tanto, los ratones pasan más tiempo en los brazos cerrados y los visitan con más frecuencia. Los ratones tuvieron acceso a todos los brazos y se les permitió moverse libremente entre ellos. El número de entradas en los brazos abiertos, el tiempo que pasaron en los brazos abiertos y el tiempo que pasaron en el centro se usaron como índices de ansiedad inducida por el espacio abierto:

## Tiempo pasado en el brazo cerrado

La **FIG. 24** muestra los resultados de los estudios que usan el laberinto en cruz elevado sobre la cantidad de tiempo pasado en el brazo cerrado (eje vertical) del dispositivo para cada uno de los cuatro grupos de animales ensayados.

Como se muestra en la **FIG. 24**, los ratones no modificados tratados con vehículo (barra izquierda) pasaron alrededor de 240 segundos en el brazo cerrado. Los ratones no modificados tratados con cG-2-AlilP ("NNZ 2591") (tercera barra desde la izquierda) pasaron alrededor de la misma cantidad de tiempo en el brazo cerrado.

Por el contrario, los animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo (la segunda barra desde la izquierda) pasaron significativamente menos tiempo en el brazo cerrado (alrededor de 160 segundos;  $p < 0.001$ ), lo que indica un estado de hiperactividad en los animales con *fmr1* inactivado. La cG-2-AlilP normalizó el tiempo que pasaron en el brazo cerrado en animales con *fmr1* inactivado (barra derecha). Esta hiperactividad se redujo significativamente en los animales con *fmr1* inactivado tratados con cG-2-AlilP en comparación con los animales no modificados tratados con vehículo y los animales no modificados tratados con cG-2-AlilP. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo con *fmr1* inactivado tratado con vehículo y el grupo con *fmr1* inactivado tratado con cG-2-AlilP ( $p < 0.001$ ).

Concluimos de este estudio que la cG-2-AlilP disminuyó la hiperactividad de ratones con *fmr1* inactivado en estas condiciones. Debido a que los ratones con *fmr1* inactivado usados en este estudio tienen la misma mutación genética que los seres humanos con síndrome de X frágil, concluimos que la cG-2-AlilP puede ser efectiva en el tratamiento de seres humanos con síndrome de X frágil.

## Tiempo pasado en el brazo abierto del laberinto en cruz elevado

La **FIG. 25** representa gráficos de los resultados de este estudio, en la que se muestra el tiempo pasado en el brazo abierto (eje vertical) para cada uno de los 4 grupos de animales ensayados.

Los animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo (segunda barra desde la izquierda) pasaron un tiempo significativamente más largo en los brazos abiertos ( $p < 0.001$ ) en comparación con sus compañeros de camada no modificados tratados con vehículo (barra izquierda). Por el contrario, la cG-2-AlilP ("NNZ 2591") normalizó el tiempo pasado en los brazos abiertos por los animales con *fmr1* inactivado. El tiempo pasado en el brazo abierto por los animales con *fmr1* inactivado tratados con cG-2-AlilP no difería significativamente del observado para los ratones no modificados tratados con vehículo (barra izquierda), o los animales no modificados tratados con cG-2-AlilP (tercera barra desde la izquierda).



Concluimos de este estudio que: (1) los animales con *fmr1* inactivado exhibieron más comportamiento de hiperactividad que los animales no modificados, y (2) la cG-2-AlilP normalizó la hiperactividad. Debido a que los ratones con *fmr1* inactivado usados en este estudio tienen la misma mutación genética que los seres humanos con síndrome de X frágil, concluimos que la cG-2-AlilP puede ser efectiva en el tratamiento de seres humanos con síndrome de X frágil.

#### Tiempo en el centro del laberinto en cruz elevado

La **FIG. 26** representa gráficos del tiempo pasado en el centro del dispositivo (eje vertical), para cada uno de los 4 grupos de animales ensayados. El tiempo pasado en el centro del laberinto en cruz elevado es reconocido en la técnica como una medida de hiperactividad.

Los ratones no modificados tratados con vehículo (barra izquierda) pasaron unos 30 segundos en el centro del laberinto. Los ratones no modificados tratados con cG-2-AlilP ("NNZ 2591") (tercera barra desde la izquierda) pasaron un poco menos de tiempo en el centro que los animales no modificados tratados con vehículo. Por el contrario, los ratones con *fmr1* inactivado tratados con vehículo pasaron significativamente más tiempo en el centro (segunda barra desde la izquierda;  $p < 0.001$ ) en comparación con los animales no modificados tratados con vehículo.

Encontramos inesperadamente que los ratones con *fmr1* inactivado tratados con cG-2-AlilP (barra derecha) pasaron significativamente menos tiempo que los animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo (segunda barra desde la izquierda). Observamos diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de permanencia en el centro para los animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo (segunda barra desde la izquierda), en comparación con los animales no modificados tratados con vehículo (barra izquierda;  $p < 0.001$ ), animales no modificados tratados con cG-2-AlilP (tercera barra desde la izquierda;  $p < 0.001$ ), o animales con *fmr1* inactivado tratados con cG-2-AlilP (barra derecha;  $p < 0.001$ ). De hecho, no observamos diferencias estadísticamente significativas entre el tiempo en el centro pasado por el grupo de no modificados tratados con vehículo (barra izquierda), el grupo de no modificados tratados con cG-2-AlilP (tercera barra desde la izquierda) o el grupo con *fmr1* inactivado tratados con cG-2-AlilP (barra derecha).

Concluimos de este estudio que la cG-2-AlilP disminuyó la hiperactividad de ratones con *fmr1* inactivado en estas condiciones. Debido a que los ratones con *fmr1* inactivado usados en este estudio tienen la misma mutación genética que los seres humanos con síndrome de X frágil, concluimos que la cG-2-AlilP puede ser efectiva en el tratamiento de seres humanos con síndrome de X frágil.

#### Ejemplo 15: efectos de la cG-2-AlilP sobre el condicionamiento del miedo en animales con síndrome de X frágil

El condicionamiento del miedo a una señal o un contexto representa una forma de aprendizaje asociativo que ha sido bien usado en muchas especies. La medida dependiente usada en el condicionamiento del miedo contextual (retraso) es una respuesta de inmovilización que tiene lugar después del emparejamiento de un estímulo no condicionado (descarga eléctrica en la pata), con un estímulo condicionado (CS), un contexto particular y/o tal señal. Si en un contexto de condicionamiento se administra una descarga eléctrica en la pata que se combina con un desagravio, no solo se aprenderá del desagravio, sino también el contexto.

El condicionamiento contextual del miedo es un procedimiento de condicionamiento básico. Implica tomar un animal y colocarlo en un ambiente novedoso, proporcionar un estímulo aversivo y a continuación retirarlo. Cuando el animal regresa al mismo ambiente, generalmente mostrará una respuesta de inmovilización si recuerda y asocia ese ambiente con el estímulo aversivo. La inmovilización es una respuesta al miedo, que se ha definido como "ausencia de movimiento, excepto la respiración". Este comportamiento de inmovilización puede durar de segundos a minutos, dependiendo de la fuerza del estímulo aversivo, el número de presentaciones y el grado de aprendizaje alcanzado por el sujeto.

#### Métodos

##### Animales

Usamos animales no modificados o con *fmr1* inactivado para este estudio, como se describió anteriormente. Los animales se dividieron en grupos de la siguiente manera.

No modificados tratados con vehículo;

Con *fmr1* inactivado tratados con vehículo;

No modificados tratados con cG-2-AlilP; y

Con *fmr1* inactivado tratados con cG-2-AlilP.

## Aparato para evaluar el condicionamiento contextual del miedo

El dispositivo utilizado en este estudio se representa en la **FIG. 27**. Se aplicó un estímulo no condicionado (descarga eléctrica leve en las patas), y el estímulo condicionado fue un tono aplicado junto con la descarga eléctrica en las patas. En estas condiciones, los animales asocian el estímulo no condicionado con el estímulo condicionado y el contexto de los estímulos. Los animales fueron ensayados durante cinco (5) minutos.

## Resultados

La **FIG. 28** representa un gráfico del tiempo dedicado al "comportamiento de inmovilización" para cada uno de los grupos de animales ensayados. En condiciones de estrés agudo de este estudio, los animales no modificados tratados con vehículo (barra izquierda) pasaron un promedio de alrededor del 30% del período de ensayo de cinco minutos (es decir, alrededor de 100 segundos). Por el contrario, los animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo (segunda barra desde la izquierda) pasaron sustancialmente menos tiempo en comportamiento de inmovilización (alrededor del 18% del período de ensayo de cinco minutos, o alrededor de 54 segundos). Concluimos que los animales con *fmr1* inactivado exhibieron menos miedo que los animales no modificados tratados con vehículo.

Descubrimos inesperadamente que la cG-2-AlilP ("NNZ 2591") produjo un incremento sustancial y estadísticamente significativo del tiempo dedicado al comportamiento de inmovilización en animales con *fmr1* inactivado (barra derecha). De hecho, el tiempo empleado en el comportamiento de inmovilización observado para los animales con *fmr1* inactivado tratados con cG-AlilP era similar al tiempo que pasaron los animales no modificados tratados con vehículo (barra izquierda) y los animales no modificados tratados con cG-2-AlilP (tercera barra desde la izquierda).

## Conclusiones

Concluimos de este estudio que los animales con *fmr1* inactivado exhibieron un menor condicionamiento del miedo que los animales no modificados. Esto indica que los animales con *fmr1* inactivado pueden tener una desventaja de supervivencia en comparación con los animales no modificados. También concluimos que la cG-2-AlilP aumentó el condicionamiento del miedo en ratones con *fmr1* inactivado en estas condiciones. Este efecto puede mitigar la desventaja de supervivencia observada en animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo. Debido a que los ratones con *fmr1* inactivado usados en este estudio tienen la misma mutación genética que los seres humanos con síndrome de X frágil, concluimos que la cG-2-AlilP puede ser efectiva en el tratamiento de seres humanos con síndrome de X frágil.

## Ejemplo 16: efectos de la cG-2-AlilP sobre el comportamiento de enterramiento de canicas y anidación en animales con síndrome de X frágil

Los ratones son una especie social, que participan en comportamientos sociales fáciles de calificar que incluyen acercamiento, seguimiento, olfateo, acicalamiento, encuentros agresivos, interacciones sexuales y comportamientos parentales, anidación y dormir acurrucados en grupo, y se evaluaron el reconocimiento social y la memoria social en ratones y la cantidad de tiempo empleado olfateando un ratón nuevo tras exposiciones repetidas, para inducir familiaridad, y el restablecimiento de altos niveles de olfateo cuando se introduce un nuevo animal de estímulo.

## Enterramiento de canicas

Los ratones cavan espontáneamente en muchos sustratos en el laboratorio. Este comportamiento proviene de su ascendencia en la naturaleza, donde buscarían semillas, granos, insectos y otros alimentos que se encuentran enterrados en el suelo o la hojarasca en su hábitat natural. Explora un comportamiento natural común de los roedores, proporciona datos cuantitativos en condiciones controladas de laboratorio y ha demostrado ser extremadamente sensible a la enfermedad por priones, el síndrome de X frágil y las lesiones cerebrales. El deterioro de la capacidad de realizar "actividades de la vida diaria" (ADL) es un signo temprano de la enfermedad de Alzheimer (AD) y el deterioro cognitivo (Deacon, 2012).

Para estudiar los efectos de la cG-2-AlilP en el comportamiento de enterramiento de canicas, llevamos a cabo una serie de estudios en ratones no modificados y ratones con *fmr1* inactivado.

## Métodos

### Animales

Usamos animales no modificados o con *fmr1* inactivado para este estudio, como se describió anteriormente. Los animales se dividieron en grupos de la siguiente manera.

No modificados tratados con vehículo;

Con *fmr1* inactivado tratados con vehículo;

No modificados tratados con cG-2-AlilP; y

Con *fmr1* inactivado tratados con cG-2-AlilP.

Los ratones se colocaron en un entorno cerrado con una cama de virutas de madera. Se introdujeron diez (10) canicas en el entorno, y el número de canicas enterradas se determinó mediante observación visual (mediana  $\pm$  rango intercuartílico (IQR)).

## 5 Resultados

Observamos que los ratones no modificados tratados con vehículo y los ratones no modificados tratados con cG-2-AlilP enterraron 10 de 10 (100%) de las canicas presentadas. Por el contrario, los animales con *fmr1* inactivado enterraron significativamente menos canicas (promedio de 3 de 10 o 30%; ( $p < 0.001$ ) que los animales no modificados tratados con vehículo.

- 10 Encontramos inesperadamente que los animales con *fmr1* inactivado tratados con cG-2-AlilP ("NNZ 2591") enterraron una mediana de 8 de 10 canicas (80%). De hecho, la cG-2-AlilP normalizó el número de canicas enterradas a niveles muy similares a los encontrados para ratones no modificados tratados con vehículo, o ratones no modificados tratados con cG-2-AlilP.

## Conclusiones

- 15 Concluimos de este estudio que los ratones con *fmr1* inactivado enterraron menos canicas que los animales no modificados, y que la cG-2-AlilP rescató esta disminución y, de hecho, normalizó el comportamiento. Debido a que los ratones con *fmr1* inactivado usados en este estudio tienen la misma mutación genética que los seres humanos con síndrome de X frágil, concluimos que la cG-2-AlilP puede ser efectiva en el tratamiento de seres humanos con síndrome de X frágil.

## 20 Comportamiento de anidación

Los machos y las hembras hacen nidos y realizan este ensayo por igual, ya que los propósitos incluyen la termorregulación, así como estar asociados con la reproducción. Este ensayo también se usa como un indicador de lesión y disfunción del hipocampo.

## Métodos

## 25 Animales

Usamos animales no modificados o con *fmr1* inactivado para este estudio, como se describió anteriormente. Los animales se dividieron en grupos de la siguiente manera.

No modificados tratados con vehículo;

Con *fmr1* inactivado tratados con vehículo;

- 30 No modificados tratados con cG-2-AlilP; y

Con *fmr1* inactivado tratados con cG-2-AlilP.

## Ensayo de comportamiento de anidación

- 35 Los ratones típicamente usan ciertos materiales para hacer un nido. En este estudio, introdujimos "nestlets" de algodón en las jaulas de anidación. Los ratones pueden a continuación rasgar y usar el algodón del nestlet y usarlo para hacer un nido en la cama de las jaulas de anidación. La anidación es un comportamiento típico en ratones y representa un aspecto de rutina de la vida cotidiana. Por lo tanto, este ensayo refleja las tareas cotidianas llevadas a cabo por los seres humanos. Los cambios en el comportamiento de anidación en ratones con *fmr1* inactivado por lo tanto predicen el comportamiento de los seres humanos con el síndrome de X frágil. Además, los efectos de los fármacos en ratones con *fmr1* inactivado son razonablemente predictivos de los efectos de los fármacos en los seres humanos con síndrome de X frágil.

- 40 Los ratones se colocaron individualmente en jaulas de anidación alrededor de una hora antes de la fase oscura del ciclo claro-oscuro, y los resultados se evaluaron a la mañana siguiente. La apariencia de los nidos se evaluó según una escala de 5 puntos como se describe a continuación, y también se pesó la cantidad de material de nestlet sin rasgar.

- 45 1. El nestlet estaba prácticamente intacto ( $> 90\%$  intacto). La **FIG. 20A** representa una fotografía de un nestlet con una puntuación de 1.
2. El nestlet estaba parcialmente rasgado (50-90% restante intacto). La **FIG. 20B** representa una fotografía de un nestlet con una puntuación de 2.
3. El nestlet estaba rasgado en su mayoría, pero a menudo no hay un sitio identificable de anidación:  $<50\%$  del

nestlet permanece intacto, pero <90% está dentro de un cuarto del área del piso de la jaula, es decir, el algodón no se reunió en un nido, sino que se extendió por toda la jaula. El material a veces puede estar en un área de anidación ampliamente definida, pero la definición crítica es que 50-90% ha sido rasgado. La **FIG. 29C** representa una fotografía de un nestlet con una puntuación de 3.

5 4. Un nido identificable, pero plano: > 90% del nestlet se rasgó, el material se reunió en un nido dentro de un cuarto del área del piso de la jaula, pero el nido es plano, con paredes más altas que la altura del cuerpo del ratón (acurrucado sobre su lado) en menos del 50% de su circunferencia. La **FIG. 29D** representa una fotografía de un nestlet que tiene una puntuación de 4, con un ratón encima del nestlet.

10 5. Un nido casi perfecto: > 90% del nestlet se rasgó, el nido es un cráter, con paredes más altas que la altura del cuerpo del ratón en más del 50% de su circunferencia. La **FIG. 29E** representa una fotografía de un nestlet con una puntuación de 5, con un ratón encima del nestlet.

### Resultados y conclusiones

15 Encontramos que los ratones C57BL/6 no modificados tratados con vehículo obtuvieron alrededor de 4-5 en la construcción del nido. Por el contrario, para los ratones con fmr1 inactivado tratados con vehículo, la puntuación media fue de alrededor de 1-2.

Descubrimos inesperadamente que el tratamiento con cG-2-AlilP ("NNZ 2591") incrementó la puntuación de anidación hasta alrededor de 4-5 en ratones con fmr1 inactivado.

20 Llegamos a la conclusión de que los ratones con fmr1 inactivado demostraron un déficit en la construcción de nidos, y que la cG-2-AlilP por lo menos revirtió parcialmente este déficit. Debido a que los ratones con fmr1 inactivado usados en este estudio tienen la misma mutación genética que los seres humanos con síndrome de X frágil, concluimos que la cG-2-AlilP puede ser efectiva en el tratamiento de seres humanos con síndrome de X frágil.

### Ejemplo 17: sociabilidad: reconocimiento social, preferencia por la novedad social

25 Los ratones son una especie social, que participan en comportamientos sociales fáciles de calificar que incluyen el acercamiento, seguimiento, olfateo, acicalamiento, encuentros agresivos, interacciones sexuales, comportamientos parentales, anidación y dormir acurrucados en grupo. Para estudiar la sociabilidad, llevamos a cabo una serie de estudios en ratones no modificados y ratones con la mutación de fmr1 inactivado.

### Métodos

#### Animales

30 Usamos animales no modificados o con fmr1 inactivado para este estudio, como se describió anteriormente. Los animales se dividieron en grupos de la siguiente manera.

No modificados tratados con vehículo;

Con fmr1 inactivado tratados con vehículo;

No modificados tratados con cG-2-AlilP; y

Con fmr1 inactivado tratados con cG-2-AlilP.

### 35 Procedimientos de ensayo

El reconocimiento social y la memoria social en ratones se evaluaron por la cantidad de tiempo dedicado a olfatear un ratón nuevo tras exposiciones repetidas, para inducir familiaridad y el restablecimiento de altos niveles de olfateo cuando se introduce un nuevo animal de estímulo. Medimos el número de episodios de olfateo en cada uno de los grupos de animales.

### 40 Resultados y conclusiones

La **FIG. 30** representa un gráfico de la duración de los episodios de olfateo (eje vertical) para los diferentes grupos de ratones estudiados. Descubrimos que los animales no modificados tratados con vehículo (barra izquierda) exhibieron episodios de olfateo de alrededor de 23 durante el período de ensayo. Por el contrario, los animales con fmr1 inactivado (segunda barra desde la izquierda) exhibieron un comportamiento de olfateo menor (alrededor de 6).

45 Sin embargo, sorprendentemente encontramos que en animales con fmr1 inactivado tratados con cG-2-AlilP ("NNZ 2591") (barra derecha), la cantidad de comportamiento de olfateo se incrementó significativamente hasta alrededor de 21 ( $p < 0.001$ ). De hecho, la cG-2-AlilP incrementó el comportamiento de olfateo en animales con fmr1 inactivado hasta alrededor de los mismos niveles que en los animales no modificados tratados con vehículo (barra izquierda) o tratados con cG-2-AlilP (tercera barra desde la izquierda).

Concluimos que los animales con *fmr1* inactivado exhibieron un déficit de sociabilidad en comparación con los animales no modificados. Los resultados de esto son consistentes con los bien conocidos déficits en la sociabilidad observados en seres humanos con Síndrome de X frágil. También concluimos que la cG-2-AlilP incrementó la sociabilidad observada para ratones con *fmr1* inactivado, y normalizó el comportamiento.

- 5 Debido a que los ratones con *fmr1* inactivado usados en este estudio tienen la misma mutación genética que los seres humanos con síndrome de X frágil, concluimos que la cG-2-AlilP puede ser efectiva para mejorar las interacciones sociales en seres humanos con síndrome de X frágil.

#### **Ejemplo 18: la cG-2-AlilP normaliza la sobreexpresión de pERK y pAKT en animales con síndrome de X frágil**

- 10 Las neuronas están críticamente influenciadas por la proteína de retraso mental de X frágil, que regula la traducción dendrítica local por medio de la de fosfatidilinositol 3-quinasa-Akt-mamífero objetivo de la rapamicina (mTOR) y cascadas de señalización de Ras-ERK y está implicada en la cascada de señalización de mGluR5. La sobreactivación de las moléculas de señalización intracelular, ERK y Akt juega un papel crucial en la plasticidad sináptica. Los niveles de expresión de estas proteínas son una característica de la patología celular del síndrome de X frágil y se cree que contribuyen directamente al fenotipo neuroconductual del FXS. La ERK es una proteína de transducción de señal MAPK clásica, responsable de la transducción del factor de crecimiento, la proliferación, la respuesta de las citocinas al estrés y la apoptosis. La Akt es un componente clave en la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR y regula la supervivencia celular y el metabolismo mediante la unión y regulación de muchos efectores posteriores, tales como las proteínas de la familia del factor kB nuclear (NfκB) y Bcl-2. La activación excesiva (fosforilación) de estas proteínas se ha implicado en trastornos del espectro autista.

#### **Métodos**

##### **Animales**

Usamos animales no modificados o con *fmr1* inactivado para este estudio, como se describió anteriormente. Los animales se dividieron en grupos (n = 4 animales por grupo) como sigue.

No modificados tratados con vehículo;

- 25 Con *fmr1* inactivado tratados con vehículo;

No modificados tratados con cG-2-AlilP; y

Con *fmr1* inactivado tratados con cG-2-AlilP.

##### **Ensayos bioquímicos**

- 30 Los niveles de fosforilación de ERK1/2 y Akt de lisados cerebrales completos se evaluaron usando transferencias de Western. Se sacrificaron los ratones y se extrajeron los cerebros 12 días después de la última inyección, e inmediatamente después del último ensayo de comportamiento. Otros estudios midieron pERK y pAkt en linfocitos sanguíneos. Los resultados del análisis de Western se normalizaron a la cantidad de proteína GAPDH observada en cada transferencia.

##### **Resultados**

#### **ERK fosforilada**

- La **FIG. 31** representa gráficos de resultados del estudio sobre cerebros de ratones. Los ratones no modificados tratados con vehículo tenían un promedio de aproximadamente 0.9 (unidades UA) (barra izquierda). Por el contrario, los animales con *fmr1* inactivado (segunda barra desde la izquierda) tuvieron un mayor nivel de fosforilación de ERK a alrededor de 1.3 (unidades UA) (p <0.05). El tratamiento de animales con *fmr1* inactivado con c-2-AlilP ("NNZ 2591") (tercera barra desde la izquierda) redujo significativamente la fosforilación de ERK (p <0.05) en comparación con los animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo. Los niveles de pERK observados después del tratamiento de animales con *fmr1* inactivado con cG-2-AlilP fueron muy similares a los de los animales no modificados tratados con vehículo (barra izquierda) o los animales no modificados tratados con cG-2-AlilP (tercera barra desde la izquierda).

- 45 Se encontraron resultados similares para pERK en linfocitos aislados de los grupos de animales.

#### **AKT fosforilada**

- Observamos un patrón similar en AKT fosforilada como lo hicimos para ERK en cerebros de los animales. La **FIG. 32** representa gráficas de resultados de este estudio. Los ratones no modificados tratados con vehículo tenían un promedio de alrededor de 0.9 (unidades UA) (barra izquierda). Por el contrario, los animales con *fmr1* inactivado (segunda barra desde la izquierda) tuvieron un mayor nivel de fosforilación de AKT de alrededor de 1.3 (unidades UA) (p <0.05). El tratamiento de animales con *fmr1* inactivado con c-2-AlilP ("NNZ 2591") (tercera barra desde la

izquierda) redujo significativamente la fosforilación de ERK a alrededor de 0.9 (unidades UA ( $p < 0.05$ ) en comparación con animales con *fmr1* inactivado tratados con vehículo. Los niveles de pAKT observados después del tratamiento de animales con *fmr1* inactivado con cG-2-AlilP fueron muy similares a los de los animales no modificados tratados con vehículo (barra izquierda) o los animales no modificados tratados con cG-2-AlilP (tercera barra desde la izquierda).

Se encontraron resultados similares para pAkt en linfocitos aislados de los grupos de animales.

#### **Ejemplo 19: tratamiento del síndrome de Rett: efectos de la cG-2-AlilP sobre la esperanza de vida y la potenciación a largo plazo en el modelo de síndrome de Rett (RTT)**

Para determinar si el tratamiento con cG-2-AlilP puede afectar el desarrollo y la progresión del síndrome de Rett en un modelo murino del trastorno, usamos ratones macho hemizigóticos MeCP2 (1lox). El sistema de ratón con MeCP2 inactivado (MeCP2-KO) es ampliamente aceptado en la técnica por imitar estrechamente el rango y la gravedad de las anomalías fisiológicas y neurológicas características del trastorno humano, síndrome de Rett.

Todos los experimentos se realizan en el Southwestern Medical Center de la Universidad de Texas y son aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales del Southwestern Medical Center de la Universidad de Texas o aprobaciones similares de otras organizaciones. La CG-2-AlilP se sintetizó en Albany Molecular Research Inc. (Albany, NY) y se suministró por Neuren Pharmaceuticals Limited.

#### **Métodos**

##### **Tratamiento**

Tratamos ratones macho hemizigóticos MeCP2 (1lox) con 20 mg/kg/día de cG-2-AlilP o disolución salina (0.01% BSA,  $n = 15$  por grupo en el experimento de supervivencia y  $n = 20$  en el experimento LTP). Los tratamientos se administran por vía intraperitoneal a partir de las 4 semanas después del nacimiento. Para los experimentos de supervivencia, el tratamiento se mantiene durante el transcurso del experimento. Para el experimento LTP, los ratones son tratados hasta la semana 9 cuando se usan para la preparación de cortes.

##### **Supervivencia**

Los ratones mutantes deficientes en MeCP2 desarrollan síntomas de RTT a alrededor de 4-6 semanas de edad y mueren entre 10-12 semanas (Chen et al., 2001. Nat Genet 27: 327-331). Comparamos la supervivencia de los controles no modificados y los animales deficientes en MeCP2 en grupos tratados con vehículo y con cG-2-AlilP. La supervivencia se mide semanalmente desde el inicio del tratamiento (4 semanas) y se usa para producir curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para mostrar la proporción de ratones que sobreviven (eje y) en cada intervalo semanal (eje x).

##### **Potenciación a largo plazo (electrofisiología)**

Se ha publicado previamente que los ratones con deficiencia de MeCP2 padecen disfunción sináptica funcional y ultraestructural, deterioro significativo de la memoria dependiente del hipocampo y potenciación a largo plazo del hipocampo (LTP) (Moretti et al. The Journal of Neuroscience. 2006. 26 (1): 319-327). Para ensayar los efectos del tratamiento con cG-2-AlilP sobre la función sináptica en el modelo RTT, comparamos LTP del hipocampo en animales tratados tanto con vehículo como con cG-2-AlilP a las 9 semanas de edad. Para hacerlo, medimos la pendiente de la fEPSP como un % del potencial de referencia en neuronas en cortes de hipocampo de ratones deficientes en MeCP2 tratados con disolución salina o cG-2-AlilP.

#### **Resultados**

Los resultados muestran que el tratamiento con cG-2-AlilP incrementa la supervivencia de ratones con deficiencia de MeCP2. Los ratones no modificados (línea superior) son animales de control y, por lo tanto, su supervivencia es del 100% en cada punto de tiempo. Los ratones con deficiencia de MeCP2 tratados con disolución salina solo mueren mucho más rápidamente que los ratones no modificados, de modo que alrededor de 11 semanas, solo sobreviven algunos de los ratones con deficiencia de MeCP. Por el contrario, sin embargo, encontramos que los ratones con deficiencia de MeCP2 tratados con cG-2-AlilP sobreviven sustancialmente más tiempo que los ratones tratados con disolución salina. El tratamiento de ratones *mecp2* con cG-2-AlilP no plantea problemas de seguridad.

Estos resultados demuestran que la cG-2-AlilP puede aumentar sustancialmente la supervivencia de ratones con deficiencia de MeCP2. Debido a que los ratones con deficiencia de MeCP2 predicen la patología y la eficacia terapéutica en seres humanos con síndrome de Rett, concluimos que la cG-2-AlilP puede incrementar la vida de los seres humanos con síndrome de Rett.

Los resultados también muestran que el tratamiento con cG-2-AlilP incrementa la potenciación a largo plazo (LTP) del hipocampo según lo medido por la pendiente de fEPSP en animales con deficiencia de MeCP2 en comparación con ratones mutantes tratados con disolución salina. Encontramos que la cG-2-AlilP incrementa la pendiente de fEPSP en ratones con deficiencia de MeCP2 en comparación con los animales tratados solo con disolución salina.

Estos resultados demuestran que la cG-2-AlilP puede ser efectiva en el tratamiento de ratones con deficiencia de MeCP2 in vivo. Debido a que los ratones con deficiencia de MeCP2 predicen la patología y la eficacia terapéutica en seres humanos con síndrome de Rett, concluimos que la cG-2-AlilP puede ser una terapia efectiva para seres humanos con síndrome de Rett.

## 5 Ejemplo 20: la cG-2-AlilP mejora la arborización dendrítica e incrementa la longitud de la espina dendrítica

Evaluamos los efectos del tratamiento con cG-2-AlilP sobre las dendritas. A ratones transgénicos con *mecp2* inactivado (n = 15 a 20) se les administra cG-2-AlilP por vía intraperitoneal con una dosis de 20 mg/kg una vez al día. Después del sacrificio, se examina la densidad de la espina dendrítica, la longitud de la espina y la arborización después de la tinción de Golgi después de nueve semanas, según la **Tabla 5** a continuación.

10 **Tabla 5**

| <b>Tamaños de muestra para todos los análisis de morfología neuronal y espinas</b> |                |                        |               |                                        |               |
|------------------------------------------------------------------------------------|----------------|------------------------|---------------|----------------------------------------|---------------|
| Análisis                                                                           | Edad (semanas) | Machos. No. de ratones |               | No. de neuronas o dendritas por animal |               |
|                                                                                    |                | KO-vehículo            | KO-cG-2-AlilP | KO-vehículo                            | KO-cG-2-AlilP |
| Morfología                                                                         | 9              | 3                      | 3             | 4                                      | 4             |
| Análisis de espinas                                                                | 9              | 3                      | 3             | 10                                     | 10            |

La longitud dendrítica se evalúa por la distancia desde el soma de neuronas representativas del hipocampo CA1 de ratones mutantes de *mecp2* nulo machos de 9 semanas de edad tratados con disolución salina (3 neuronas analizadas de 3 ratones separados, n = 9) o cG-2-AlilP (20 mg/kg ip 1/día, a partir de la semana 4; 3 neuronas se analizan de 3 ratones separados, n = 9).

Observamos que la cG-2-AlilP mejora la arborización dendrítica e incrementa la longitud de la espina dendrítica. La longitud dendrítica en  $\mu\text{m}$  (eje vertical) se representa contra la distancia (en  $\mu\text{m}$ ; eje horizontal) del soma de las células. Para las células con dendritas cercanas a los somas, las dendritas son cortas. Sin embargo, a medida que se incrementa la distancia desde el soma, el tratamiento con disolución salina produce longitudes dendríticas que se incrementan hasta un máximo a una distancia de alrededor de 70  $\mu\text{m}$  del soma y disminuyen a distancias más alejadas de los somas. Por el contrario, el tratamiento con cG-2-AlilP (cuadrados rellenos) produce dendritas más largas en gran parte del intervalo de distancias desde los somas.

## Ejemplo 21: tratamiento del síndrome de Rett en ratones II: apareamiento y genotipado de ratones

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

### Tratamiento con cG-2-AlilP

Para las medidas de supervivencia, el análisis de actividad nocturna y el análisis de inmunotransferencia, cG-2-AlilP suministrada por Neuren Pharmaceuticals Limited se administra diariamente vía inyecciones intraperitoneales (20 mg/kg, vehículo = disolución salina, BSA al 0.01%). El tratamiento comienza en P15 y se mantiene durante el transcurso de los experimentos. Para los experimentos de fisiología intracelular, a los ratones se les inyecta diariamente cG-2-AlilP (20 mg/kg de peso corporal, vehículo = disolución salina, BSA al 0.01%) durante 2 semanas, de P15 a P28-P32 cuando se usan para la preparación de cortes finos. Para los experimentos de obtención de imágenes ópticas, se inyecta a los ratones cG-2-AlilP (20 mg/kg de peso corporal, vehículo = disolución salina, BSA al 0.01%) diariamente desde el día de la sutura del párpado hasta el día de la obtención de imágenes.

### Preparación fisiológica en cortes

Las secciones coronales (300  $\mu\text{m}$  de grosor) en o cerca de la corteza sensoriomotora se cortan en  $<4^{\circ}\text{C}$  ACSF usando un vibratomo. Los cortes se incuban a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos después del corte y a temperatura ambiente durante el resto del experimento. Los cortes se transfieren a una cámara Warner y se toman registros de neuronas piramidales identificadas visualmente localizadas en la capa 5. Fluido cerebroespinal artificial (ACSF) que contiene NaCl 126 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1 mM, KCl 3 mM,  $\text{MgSO}_4$  2 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM, y dextrosa 14 mM, se ajusta a 315-320 mOsm y pH 7.4, y se burbujea con 95% de  $\text{O}_2$ /5% de  $\text{CO}_2$ . La disolución de pipeta intracelular contiene gluconato de potasio 100 mM, KCl 20 mM, HEPES 10 mM, MgATP 4 mM, NaGTP 0.3 mM y Na-fosfocreatina 10 mM.

### Registros intracelulares de células enteras

Las pipetas de borosilicato (3-5 MΩ, WPI) se extraen usando un extractor Sutter P-80 (Sutter Instruments). Las células se visualizan con una lente de inmersión en agua Achroplan 40x con óptica infrarroja-DIC (Zeiss) y se detectan con una cámara infrarroja (Hamamatsu) que se proyecta en un monitor de video. Los experimentos son controlados por un software de adquisición personalizada y análisis en tiempo real escrito en Matlab (Mathworks, Natick, Mass.) usando un amplificador Multiclamp 700B (Axon Instruments) conectado a un bloque conector BNC-2110 y una tarjeta de adquisición de doble canal M-Series (National Instruments). Se logra el gigasellado y ruptura y se verifican continuamente registros de células completas para detectar bajos niveles de fuga y resistencia en serie. Para cada registro, se aplica un pulso de prueba de 5 mV en la abrazadera de voltaje ~10 veces para medir la entrada y la resistencia en serie. A continuación, en la abrazadera de corriente, se aplican ~10 pulsos (500 ms, 40-140 pA a incrementos de 10 pA) para cuantificar las tasas de disparo evocado y la excitabilidad celular. Se verifica que la resistencia de acceso, la fuga y la excitabilidad intrínseca celular son consistentes en todos los grupos. Finalmente, las EPSC espontáneas con el voltaje de la abrazadera a -60 mV se muestrean a 10 kHz y se filtran en paso bajo a 1 kHz. El análisis se realiza usando un paquete de software personalizado escrito en Matlab, siendo detectados todos los eventos según umbrales automatizados y verificados ciegos para cada evento individualmente por el experimentador.

### Tinción de Golgi

Las muestras (<1 cm) de ratones P28 se fijan en formalina al 10% y bicromato de potasio al 3% durante 24 horas. A continuación, el tejido se transfiere a nitrato de plata al 2% durante 2 días en la oscuridad a temperatura ambiente. Las secciones de estas muestras se cortan a continuación a 50 μm de grosor en agua destilada. Las secciones correspondientes a la corteza motora se montan sobre portaobjetos, se secan al aire durante 10 minutos y a continuación se deshidratan mediante lavados secuenciales de 95% de alcohol, 100% de alcohol y xileno, y a continuación se sellan con un cubreobjetos. Las imágenes se adquieren a 10x (célula completa) y 100x (imágenes de la espina) usando un microscopio confocal Zeiss Pascal 5 Exciter.

### Obtención de imágenes ópticas de señales intrínsecas

Se usan para este experimento hembras adultas (> P60) no modificadas (SVEV o BL6) y mutantes MeCP2 (+/-) (BL6). El grupo de control no modificadas está compuesto por compañeras de camada no modificadas de hembras MeCP2 +/- o hembras SVEV de la misma edad no modificadas. Para la privación monocular, los animales se anestesian con Avertin (0.016 ml/g) y los párpados de un ojo se suturan durante 4 días. Antes de la obtención de imágenes, se retira la sutura y se vuelve a abrir el ojo privado. Solo los animales en los que las suturas de privación están intactas y el estado del ojo privado parece saludable se usan para la sesión de obtención de imágenes. Para la activación de la señalización de cG-2-AlilP, se inyecta diariamente una disolución que contiene cG-2-AlilP intraperitonealmente (IP) durante todo el período de privación. Para las sesiones de obtención de imágenes, los ratones se anestesian con uretano (1.5 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 clorprotixeno al 1% junto con la primera administración). Se expone el cráneo y se pega una placa construida a medida en la cabeza para minimizar el movimiento. El cráneo se adelgaza sobre VI con un taladro dremel y se cubre con una disolución de agarosa en disolución salina (1.5%) y un cubreobjetos de vidrio. Durante la sesión de obtención de imágenes, el animal se oxigena constantemente, se mantiene su temperatura con una manta calefactora y los ojos se tratan periódicamente con aceite de silicona; las condiciones fisiológicas se controlan constantemente. El ratón anestesiado se coloca frente a un monitor que muestra un estímulo periódico presentado a cada ojo, monocularmente; el estímulo consistió en una barra blanca vertical u horizontal a la deriva de dimensiones 9° x 72°, a la deriva a 9 segundos/ciclo, sobre un fondo uniformemente gris. La superficie del cráneo se ilumina con una luz roja (630 nm) y el cambio de luminosidad es captado por una cámara CCD (Cascade 512B, Roper Scientific) a una velocidad de 15 imágenes/segundo durante cada sesión de estímulo de 25 minutos. Se usa un filtro de paso alto temporal (135 imágenes) para eliminar el ruido de baja frecuencia, después de lo cual la señal se procesa por ordenador para extraer, en cada píxel, el componente temporal de la Transformada rápida de Fourier (FFT) correspondiente a la frecuencia del estímulo. La amplitud de FFT se usa para medir la fuerza de la respuesta visual evocada a cada ojo. El índice de dominancia ocular se deriva de la respuesta de cada ojo (R) en cada píxel como  $ODI = (R_{contra-Ripsi}) / (R_{contra+Ripsi})$ . La zona binocular se define como la región activada por la estimulación del ojo ipsilateral al hemisferio fotografiado.

### Medidas de frecuencia cardíaca

La frecuencia cardíaca en tiempo real se mide usando un sensor de clip de cola (Mouse OX Oximeter - Oakmont, PA). Los ratones no están anestesiados, sino sujetos físicamente en un tubo de plástico abierto ajustado. Antes de la sesión de registro, el tubo se coloca durante la noche en las jaulas que albergan los animales experimentales para permitir la habituación. La temperatura corporal se mantiene a ~ (27.7-28.8°C) (82-84°F) durante todo el tiempo de grabación. Registramos 3 ensayos de 15 minutos para cada ratón, los ratones tienen 8 semanas de edad y se trataron con vehículo o cG-2-AlilP de P15.



### Medidas de actividad nocturna

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

### Resultados

Para probar si el tratamiento con cG-2-AliiP afectará el desarrollo de las características cardinales de la enfermedad de RTT, se administran inyecciones intraperitoneales diarias a los animales mutantes de 2 semanas de edad durante el transcurso de su vida. Las medidas de fisiología sináptica, composición molecular sináptica y plasticidad cortical se adquieren como se detalla a continuación, junto con medidas relacionadas con la salud, como la frecuencia cardíaca, los niveles de actividad locomotora y la esperanza de vida.

### Efectos de la cG-2-AliiP en la fisiología sináptica de ratones mutantes MeCP2

Estudios recientes han informado de que las neuronas a través de múltiples regiones cerebrales de ratones MeCP2-/y muestran una reducción profunda de la actividad espontánea (Chang et al., 2006; Chao et al., 2007; Dani et al., 2005; Nelson et al., 2006) un fenotipo que se rescata por la sobreexpresión de BDNF (Chang et al., 2006). De manera similar, se ha demostrado que la aplicación aguda de un derivado de IGF1 eleva las amplitudes de la corriente postsináptica excitadora evocada (EPSC) en un 40% en cultivos de hipocampo de rata (Ramsey et al., 2005; Xing et al., 2007). Para probar la eficacia de cG-2-AliiP en el rescate del fenotipo fisiológico MeCP2-/y, adquirimos registros de células enteras intracelulares en cortes cerebrales finos, midiendo el impulso sináptico excitador (amplitud y frecuencia espontáneas de EPSC) en las neuronas corticales de la capa 5. Aquí, las EPSCs registradas de animales -/y se reducen significativamente en amplitud en comparación con las EPSC medidas en animales no modificados. La tendencia se invierte parcialmente en EPSCs registradas de animales MeCP2-/y tratados con cG-2-AliiP, que son significativamente más grandes en amplitud que las EPSC de ratones MeCP2-/y tratados con vehículo. Estas diferencias también se ven al promediar a todas las células. En todas estas medidas, también se verifica que la resistencia de acceso, la fuga y la excitabilidad intrínseca celular son consistentes entre los grupos. La cuantificación de los intervalos de EPSC también muestra un ligero incremento en el intervalo entre los eventos de EPSC (frecuencia de EPSC reducida) entre los animales no modificados y MeCP2-/y ( $P = 0.04$ , ensayo de Kolmogorov-Smirnov). Encontramos que la reducción del impulso sináptico excitador en las células corticales de ratones MeCP2-/y, y su rescate parcial después del tratamiento con cG-2-AliiP, 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 la transmisión excitadora en esta región.

### El tratamiento con cG-2-AliiP estimula la maduración de la espina cortical

Usamos la tinción de Golgi para etiquetar las neuronas de forma escasa y clara, y aplicamos la obtención de imágenes confocales de alta resolución para medir la densidad y la morfología de espinas dendríticas en las células marcadas, restringiendo el análisis a las neuronas piramidales de la capa 5 en secciones de la corteza motora de ratones de período crítico (P28).

Si bien la obtención de imágenes de bajo aumento delimita claramente la extensión de las dendritas de las células piramidales, usamos aumentos más altos para contar los contactos sinápticos y determinar la clase morfológica de cada espina. Clasificamos las espinas como grandes y bulbosas ("hongo", M), cortas y rechonchas ("rechonchas", S), cortas y delgadas ("delgadas", T) o filopodia (F). La comparación de la densidad de espinas por rama unidad muestra una tendencia a la disminución de la densidad de espinas en las neuronas inactivadas que se mejora en gran medida en la inactivación con el tratamiento.

Encontramos que el potencial de déficits en el número y el estado de maduración de los contactos dendríticos en la inactivación apuntala los defectos funcionales en la transmisión excitadora, de una manera que se puede tratar después de la administración de cG-2-AliiP.

### La plasticidad del dominio ocular (OD) en ratones MeCP2 +/- adultos se reduce mediante la cG-2-AliiP

Los cambios en el desarrollo de la plasticidad del OD se controlan en parte por la activación de la vía IGF-1, y la administración de (1-3) IGF-1 puede reducir la plasticidad del OD en ratones jóvenes no modificados (Tropea et al., 2006). Por lo tanto, analizamos si el tratamiento con cG-2-AliiP podría estabilizar la plasticidad del OD prolongada observada en mutantes adultos MeCP2. Los ratones hembra MeCP2 +/-, de edad P60 o más, se privan de forma monocular durante 4 días y se tratan simultáneamente con cG-2-AliiP. El tratamiento con cG-2-AliiP reduce la plasticidad del OD en los ratones adultos Mecp2 +/-, lo que indica que, de hecho, la cG-2-AliiP puede inducir rápidamente la estabilización o maduración de la sinapsis.

### La bradicardia en ratones MeCP2-/y es tratada por cG-2-AliiP

Además de examinar la eficacia de la cG-2-AliiP para mejorar los síntomas neurofisiológicos, buscamos caracterizar

sus efectos sobre la salud general del organismo. La evidencia clínica y experimental muestra disfunciones del sistema autónomo, tales como ritmos de respiración lábiles y tono vagal cardíaco basal reducido 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 arterial a través del sistema simpático, por ejemplo, disminución de la frecuencia cardíaca inducida por hiperventilación, es común en pacientes con síndrome de Rett y puede causar arritmias cardíacas potencialmente mortales (Acampa y Guideri, 2006; Julu et al., 2001).

La patogénesis de la disautonomía cardíaca, aunque no se entiende 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 y el efecto del tratamiento con cG-2-AlilP, controlamos la frecuencia cardíaca en tiempo real en animales no modificados no anestesiados y MeCP2-/y tratados con vehículo o cG-2-AlilP. Los ratones no modificados exhiben una distribución regular de medidas de frecuencia cardíaca centradas cerca de 750 latidos por minuto. Por el contrario, los ratones MeCP2-/y exhiben una frecuencia cardíaca más irregular con una frecuencia promedio más baja, cuya aparición se reduce significativamente después del tratamiento con cG-2-AlilP.

#### **La administración de cG-2-AlilP mejora la actividad locomotora y la esperanza de vida**

Los ratones MeCP2-/y desarrollan síntomas similares al Rett a partir de las 4-6 semanas de edad cuando progresivamente se vuelven letárgicos, desarrollan ataxia de la marcha y mueren entre las 10 y 12 semanas de edad (Chen et al., 2001). La actividad locomotora basal también se registra en ratones después de 6 semanas contando los eventos nocturnos de cruce de rayos infrarrojos dentro de un área acotada. Los ratones con MeCP2 inactivado (KO) exhiben niveles de actividad locomotora marcadamente reducidos en comparación con los ratones no modificados (WT), pero el tratamiento con cG-2-AlilP (KO-T) eleva estos niveles.

Finalmente, en comparación con los compañeros de camada MeCP2 KO, los ratones MeCP2-/y tratados con cG-2-AlilP también muestran un incremento de la esperanza de vida.

También medimos el efecto del tratamiento con cG-2-AlilP sobre el tamaño del soma neuronal en el hipocampo. Los ratones se tratan con cG-2-AlilP como se describió anteriormente para la actividad locomotora. El tamaño del soma en las neuronas en la región CA3 del hipocampo se ve significativamente afectado en los animales MeCP2 KO en relación con los animales no modificados. El tratamiento con cG-2-AlilP aumenta el tamaño promedio del soma en animales KO, pero tiene poco o ningún efecto sobre el tamaño del soma en animales no modificados.

#### **Ejemplo 22: efecto de la cG-2-AlilP oral sobre la supervivencia en el síndrome de Rett en ratones**

Debido a que el síndrome de Rett es un trastorno debilitante crónico que implica la pérdida de habilidades motoras, es deseable tratar el síndrome de Rett usando preparaciones fáciles de administrar. Con este fin, podemos aprovechar las propiedades terapéuticas y farmacocinéticas inesperadamente beneficiosas de la cG-2-AlilP y compuestos relacionados (patentes de EE.UU. Nos. 7776876 y 8067425).

Por lo tanto, administramos cG-2-AlilP por vía oral a ratones con deficiencia de MeCP2. Brevemente, se administra diariamente una disolución acuosa u otra composición que contiene una cantidad farmacéuticamente efectiva de cG-2-AlilP (20 u 80 mg/kg por animal). En los animales deficientes en MeCP2 de control, solo administramos disolución salina, y los animales no modificados se usan para obtener datos de referencia similares al diseño.

En animales no modificados, se define que la supervivencia es 100% en cada punto de tiempo. En animales deficientes en MeCP2, la supervivencia disminuye sustancialmente. Sin embargo, después de la administración oral de cG-2-AlilP a ratones deficientes en MeCP2, la supervivencia se incrementa sustancialmente.

#### **Ejemplo 23: efecto de la cG-2-AlilP sobre la actividad convulsiva en el síndrome de Rett en ratones**

Debido a que las convulsiones son un aspecto prominente, peligroso y difícil de tratar del Síndrome de Rett, determinamos los efectos de la cG-2-AlilP sobre la actividad de las convulsiones en animales con deficiencia de MeCP2.

Se obtienen registros electroencefalográficos de ratones no modificados y ratones deficientes en MeCP2 tratados con disolución salina o cG-2-AlilP usando métodos descritos en la patente de EE.UU. No. 7714020.

Encontramos que la cG-2-AlilP puede ser efectiva para disminuir tanto las crisis epilépticas motoras como las crisis epilépticas no convulsivas.

#### **Conclusiones**

La cG-2-AlilP puede ser una terapia efectiva para tratar seres humanos con síndrome de Rett. Además, debido a que la cG-2-AlilP tiene una vida media inesperadamente más larga que un compuesto natural ((1-3) IGF-1; Glicil-Prolil-Glutamato o GPE), encontramos que el uso de cG-2-AlilP tiene características distintas y ventajas sustanciales sobre otros agentes farmacológicos, incluido el GPE.

Por ejemplo, la cG-2-AlilP no se necesita administrar por vía intravenosa, subcutánea, intraventricular o parenteral.

De hecho, las formulaciones orales que comprenden microemulsiones, emulsiones gruesas, preparaciones de cristal líquido, nanocápsulas e hidrogeles se pueden usar en la fabricación de preparaciones administradas por vía oral, tales como comprimidos, cápsulas y geles que pueden mejorar la función neurológica y tratar afecciones neurodegenerativas. Los compuestos de esta invención se pueden usar en situaciones en las que el funcionamiento motor de un paciente es inferior al necesario para tragar un comprimido o cápsula. Existen varios tipos de geles solubles para la administración oral de compuestos, y estos se pueden usar para administrar un compuesto o composición de esta invención a un paciente. Debido a que la cG-2-AlilP se puede administrar fácilmente por vía oral y es oralmente efectiva en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, incluido el síndrome de Rett, concluimos que la cG-2-AlilP puede ser conveniente y beneficiosa para la terapia a largo plazo de pacientes con síndrome de Rett.

Además, debido a que el síndrome de Rett comparte características clave con otros trastornos del espectro autista, los compuestos de esta invención pueden ser útiles para proporcionar beneficios terapéuticos de animales que tienen otro ASD, y en seres humanos con autismo, síndrome de Asperger, trastorno desintegrativo infantil y trastorno generalizado del desarrollo no especificado de otra manera (PDD-NOS).

#### **Ejemplo 24: tratamiento de ASDs**

Existen varios sistemas animales que se han usado para evaluar la eficacia terapéutica de compuestos en ASDs.

##### **Modelo de ratón deficiente en Shank3**

Los ratones deficientes en shank3 se usan en el estudio como modelo del síndrome de delección de 22q13 asociado con ASD.

El síndrome de delección de 22q13 se ha relacionado con delecciones o mutaciones en el gen Shank3 (Bonaglia et al., 2006). El gen Shank3 codifica una proteína de estructura maestra que forma el marco en las sinapsis glutamatérgicas (Boeckers et al., 2006). El Shank3 es una parte crucial del núcleo de la densidad postsináptica (PSD) y recluta muchos elementos funcionales clave para la PSD y para la sinapsis, que incluyen los componentes de receptores del ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA), glutamato metabotrópico (mGlu) y glutamato del ácido n-metil-D-aspartico (NMDA), así como elementos del citoesqueleto. Estudios recientes que exploran la tasa de delecciones 22q13/mutaciones de Shank3 sugieren que la haploinsuficiencia de Shank3 puede causar una forma monogénica de ASD con una frecuencia de 0.5% a 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 expresión interrumpida de Shank3 de longitud completa se ha descrito previamente en la técnica (Bozdagi et al., Molecular Autism 2010, 1:15, p4). Brevemente, se usaron células madre embrionarias Bruce4 C57BL/6 para generar una línea de ratón que tenía sitios loxP insertados antes del exón 4 y el exón 9. El alelo flojado se cortó y se mantuvo una línea con una delección de los exones 4 a 9, es decir, una completa delección de los dominios de repetición de anquirina de Shank3. Se produjeron ratones no modificados (+/+), heterocigotos (+/-) y modificados (-/-), con frecuencias mendelianas de cruces heterocigoto-heterocigoto. Una reducción del 50% de la longitud total de mRNA de Shank3 se confirmó en heterocigotos (qPCR), así como una expresión reducida de proteína Shank3 (por inmunotransferencia con anticuerpo Shank3 N69/46).

Los ratones heterocigotos generados al cruzar ratones no modificados con heterocigotos se usan en este ejemplo para modelar mejor la haploinsuficiencia de Shank3, responsable del síndrome de delección 22q13.

##### **Métodos**

##### **Tratamiento con fármaco**

Ratones de 1 a 3 meses de edad no modificados y deficientes en Shank3 heterocigotos se dividen en 4 grupos de tratamiento: no modificados tratados con placebo, grupo tratado con placebo deficiente en Shank3 y dos grupos deficientes en Shank3 tratados con cG-2-AlilP. Los animales reciben placebo (agua) o cG-2-AlilP formulada en agua administrada por vía oral, b.i.d durante 14 días. La cG-2-AlilP se administra en dos dosis: 15 o 60 mg/kg.

##### **Metodología**

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

##### **Análisis de comportamiento**

Las evaluaciones de 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. Brevemente, se evalúan las interacciones sociales macho-hembra en cada grupo de tratamiento. Los sujetos macho se alojan en grupo y se ensayan individualmente en jaulas limpias con lecho limpio. Cada sesión de ensayo dura 5 min. Cada uno de los ratones sujeto se empareja con una hembra C57BL/6J desconocida en celo. Una cámara de televisión digital de circuito cerrado (Panasonic, Secaucus, NJ, EE. UU.) se coloca horizontalmente a 30 cm de la jaula. Un micrófono ultrasónico (cápsula de micrófono de condensador AvisSoft UltraSoundGate CM15; Avisoft Bioacoustics, Berlín,

Alemania) está montada 20 cm por encima de la jaula. La frecuencia de muestreo del micrófono es de 250 kHz y la resolución es de 16 bits. Si bien el equipo usado no puede distinguir entre las llamadas emitidas por el sujeto macho y la pareja hembra, la preponderancia de las llamadas durante las interacciones macho-hembra en ratones usualmente es emitida por el macho. Todo el aparato está contenido en una cámara ambiental que atenúa el sonido (ENV-018V; Med Associates, St Albans, VT, EE. UU.) iluminada por una sola luz roja de 25 vatios. Los videos de los sujetos macho se califican subsecuentemente por un investigador no informado del genotipo del sujeto y del grupo de tratamiento sobre las medidas de olfateo de nariz a nariz, de olfateo de nariz a anogenital y de olfateo de otras regiones del cuerpo, usando el software Noldus Observer (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA). Las vocalizaciones ultrasónicas se identifican manualmente por dos investigadores altamente capacitados, sin información del grupo de genotipo/tratamiento, y las estadísticas resumidas se calculan usando el paquete Avisoft. La fiabilidad entre evaluadores es del 95%. Los datos se analizan usando un test de la t de Student no pareado.

El ensayo de habituación/deshabituación olfativa se realiza en ratones macho y hembra para cada grupo. La metodología es como se describió anteriormente (Silverman et al. 2010, Yang et al. 2009 y Silverman et al. 2010). Los olores no sociales y sociales se presentan en una serie de hisopos de algodón insertados en la jaula de alojamiento de forma secuencial, cada uno durante 2 minutos, en el siguiente orden: agua, agua, agua, agua (agua destilada); almendra, almendra, almendra (extracto de almendra de dilución 1:100); plátano, plátano, plátano (aromatizante artificial de plátano con dilución 1:100); social 1, social 1, social 1 (deslizado por el fondo de una jaula que alberga ratones B6 del mismo sexo desconocidos); y social 2, social 2, social 2 (deslizado por el fondo de una segunda jaula que aloja un grupo diferente de ratones 129/SvImJ del mismo sexo desconocidos). El ANOVA de medidas repetidas unidireccionales se realiza dentro de cada grupo de tratamiento para cada conjunto de eventos de habituación y cada evento de deshabituación, seguido de un ensayo Tukey post hoc.

### Electrofisiología de corte de hipocampo

Post-mortem, se preparan cortes finos de hipocampo (350  $\mu$ m) de ratones usando un cortador de tejido. Los cortes se mantienen y los experimentos se efectúan a 32°C. Los cortes se perfunden con disolución de Ringer que contiene (en mM): NaCl, 125.0; KCl, 2.5; MgSO<sub>4</sub>, 1.3; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0; NaHCO<sub>3</sub>, 26.2; CaCl<sub>2</sub>, 2.5; glucosa, 11.0. La disolución de Ringer se burbujea con 95% de O<sub>2</sub>/ 5% de CO<sub>2</sub>, a 32°C, durante registros extracelulares (disolución de electrodo: NaCl 3 M). Los cortes se mantienen durante 1 hora antes del establecimiento de una línea base de potenciales postsinápticos excitadores de campo (fEPSP) registrados desde el estrato radiado en el área CA1, evocados por la estimulación de los aferentes colaterales-comisurales de Schaffer (pulsos de 100  $\mu$ s cada 30 s) con electrodos de tungsteno bipolares colocados en el área CA3. La intensidad del estímulo de ensayo se ajusta para obtener fEPSP con amplitudes que son la mitad de la respuesta máxima. La pendiente inicial del EPSP (mV/ms) se determina a partir de la forma de onda promedio de cuatro respuestas consecutivas. Las curvas de entrada-salida (E/S) se generan al trazar la pendiente de fEPSP frente a la amplitud de la volea de fibra en disolución de bajo contenido de Mg<sup>2+</sup> (0.1 mM). Las relaciones de E/S mediadas por el receptor AMPA y mediadas por el receptor NMDA se miden en presencia de antagonistas del receptor de glutamato ionotrópico: ácido 2-amino-2-fosfonopentanoico APV (50  $\mu$ M) y 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona CNQX (100  $\mu$ M). Las respuestas de pulso pareado se miden con intervalos entre estímulos de 10 a 200 ms, y se expresan como la relación entre las respuestas promedio del segundo pulso de estimulación al primer pulso de estimulación.

La LTP es inducida por un estímulo de alta frecuencia (cuatro trenes de 100 Hz, 1 s de estimulación separados por 5 min) o por la estimulación theta-burst (TBS) (10 ráfagas de cuatro pulsos a 100 Hz separados por 200 ms), o por una sola estimulación de 100 Hz, para ratones de control y genéticamente modificados. Para inducir depresión a largo plazo (LTD), los colaterales de Schaffer son estimulados por un estímulo de baja frecuencia o pulso pareado de baja frecuencia (900 pulsos a 1 Hz durante 15 min) para inducir LTD dependiente del receptor mGlu. Los datos se expresan como medias  $\pm$  DE, y los análisis estadísticos se realizan mediante análisis de varianza (ANOVA) o ensayo de la t de Student, con una significancia establecida en un nivel  $\alpha$  de 0.05.

## Resultados

### Comportamiento

La duración acumulada del olfateo social total por los sujetos de ensayo machos es menor en el grupo deficiente en Shank3 tratados con placebo que en el grupo de no modificados tratado con placebo. Además, el grupo deficiente en Shank3 tratados con placebo emite menos vocalizaciones ultrasónicas que los controles no modificados durante las interacciones sociales macho-hembra.

El tratamiento con cG-2-AlilP en los dos grupos deficientes en Shank3 da como resultado un incremento significativo de la duración acumulativa del olfateo social total en comparación con el grupo deficiente en Shank3 tratados con placebo. Además, los grupos tratados con cG-2-AlilP muestran un mayor número de vocalizaciones ultrasónicas que el grupo mutante tratado con placebo.

En el estudio de habituación/deshabituación olfativa, destinado a confirmar que los ratones son capaces de detectar feromonas sociales, los 4 grupos muestran niveles normales de habituación (indicado por la disminución del tiempo dedicado a olfatear la secuencia de los tres mismos olores), y la deshabituación esperada (indicado por un mayor

tiempo dedicado a olfatear los diferentes olores).

### Electrofisiología

La representación de la pendiente del potencial postsináptico excitador del campo (fEPSP) frente a la intensidad del estímulo demuestra una reducción en las curvas de E/S en el grupo deficiente en Shank3 tratado con placebo en comparación con el grupo de control. En el grupo tratado con placebo heterocigoto también observamos una disminución en los potenciales de campo mediados por el receptor AMPA, que se refleja en una disminución del 50% en la pendiente promedio de la función de E/S en comparación con el grupo de control no modificado. Por el contrario, cuando la relación de E/S se analiza en presencia del antagonista del receptor competitivo de AMPA/kianato CNQX para medir la función sináptica del receptor de NMDA, no hay diferencia entre los grupos heterocigoto tratados con placebo y no modificados. Estos resultados indican que hay una reducción específica de la transmisión basal mediada por el receptor AMPA en los ratones Shank3 heterocigotos.

El tratamiento con cG-2-AlilP en ambos grupos heterocigotos normaliza los potenciales de campo mediados por el receptor AMPA y provoca un incremento de la pendiente promedio de la función de E/S en comparación con el grupo deficiente en Shank3 tratado con placebo.

El mantenimiento de LTP en el grupo deficiente en Shank3 tratado con placebo está claramente afectado en comparación con el control no modificado. Los ensayos TBS LTP (10 ráfagas de cuatro pulsos a 100 Hz separadas por 200 ms) también muestran una disminución significativa en la potenciación a los 60 minutos después de TBS en el grupo deficiente en Shank3 tratado con placebo. En contraste con la plasticidad sináptica alterada observada con LTP, la depresión a largo plazo (LTD) no cambió significativamente en el grupo mutante. El tratamiento con cG-2-AlilP incrementa la potenciación a largo plazo del hipocampo (LTP) y su mantenimiento en ambos grupos deficientes en Shank3 en comparación con el grupo deficiente en Shank3 tratado con placebo.

### Discusión y conclusiones

Pobres competencias sociales y comportamientos repetitivos son las características comunes y las medidas de diagnóstico clave de todas las formas de ASD. El desarrollo intelectual retrasado y las habilidades del lenguaje subdesarrolladas también son una característica común presente en todos los ASD, excluyendo el síndrome de Asperger.

Ha sido aceptado en la técnica que los modelos animales descritos anteriormente demuestran síntomas similares a las afecciones clínicas humanas. Todos los modelos mutantes discutidos anteriormente (NLGN3, NLGN4, CADM1, NRXN1, FMR1, shank3) exhiben habilidades sociales deterioradas o mayor ansiedad social. Se ha identificado una disminución de la transmisión excitadora en el hipocampo en 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, brindan la mejor oportunidad para probar la eficacia de las terapias de ASD.

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

### Ejemplo 25: medida de las proteínas de señalización Phospho-ERK1/2 y Phospho-Akt por análisis de fosfocitometría de flujo de linfocitos de ratones FXS

Las vías de transducción de señales vinculan los estímulos externos con las respuestas celulares, que normalmente regulan la proliferación, muerte y diferenciación celular. Usamos anticuerpos fosfoespecíficos para ERK1/2 y Akt que reconocen estas proteínas solo cuando están fosforiladas. Una de las características únicas de la citometría de flujo es su capacidad para realizar medidas de estados de fosforilación que no se obtienen mediante técnicas bioquímicas estándar, esto claramente tiene un gran potencial para estudiar el efecto del tratamiento farmacológico.

### Métodos

Se aíslan linfocitos de cinco ratones con fmr1 inactivado y cinco de control compañeros de camada no modificados, para estudiar el tiempo después de inyección con cG-2-AlilP. Los linfocitos se examinan para determinar la activación de dos efectores de señalización, p-ERK1/2 y p-Akt usando el estado de fosforilación como una medida de activación por citometría de flujo (fosfocitometría de flujo).

Las medidas tomadas son:

1. Citometría de flujo total y ERK fosforilada en linfocitos

2. Citometría de flujo total y AKT fosforilada en linfocitos

### Resultados

Encontramos que los linfocitos aislados de ratones con fmr1 inactivado exhiben activación de fosfoepítomos de

ERK1/2 y Akt. Los niveles de intensidad media de fluorescencia (MFI) para p-AKT y p-ERK1/2 en ratones con *fmr1* inactivado tratados con cG-2-AlilP disminuyen en todos los puntos de tiempo: 15, 30, 60 y 240 minutos después de un solo tratamiento. Encontramos reducciones similares de MFI en ratones con *fmr1* inactivado después de 5 y días consecutivos de tratamiento con cG-2-AlilP.

- 5 En resumen, la cG-2-AlilP produce una reducción significativa de la fosfoactivación de ERK1/2 y Akt en ratones con *fmr1* inactivado. Este resultado indica que p-ERK y p-Akt son marcadores biológicos útiles para evaluar la eficacia terapéutica en el tratamiento de seres humanos con ASD o NDD. Debido a que la expresión de pERK y pAkt en linfocitos es similar a la expresión de esas proteínas fosforiladas en cerebros de ratones con *fmr1* inactivado, la observación de efectos terapéuticos en linfocitos es razonablemente predictiva de los efectos de la cG-2-AlilP en los cerebros de animales afectados, incluidos los seres humanos.

#### **Ejemplo 26: tratamiento de seres humanos que tienen síndrome de X frágil usando G-2-AlilP**

Para determinar si la cG-2-AlilP es efectiva en el tratamiento de pacientes con síndrome de X frágil, llevamos a cabo un estudio doble ciego, controlado con placebo.

#### **Métodos**

##### **15 Pacientes**

- Los pacientes varones con síndrome de X frágil son diagnosticados por análisis genético que demuestra mutación total de *fmr1*. Los síntomas se evalúan usando una o más de las herramientas de evaluación clínica discutidas aquí anteriormente. Cada paciente se puntúa de acuerdo con una o más herramientas de evaluación clínica para uno o más de comportamiento repetitivo (RBB), ansiedad y sociabilidad. Se inscriben los de una puntuación de Clinical Global Impression of Severity (CGL-S) de 4 o más, o una puntuación total ABC de 30 o más.

#### **Administración de fármaco**

- Los pacientes inscritos se dividen en grupos. Todos los inscritos comienzan el estudio con una administración de placebo simple-cego de 2 semanas b.i.d. A continuación, la cG-2-AlilP se administra por vía oral con una dosis de 35 mg/kg b.i.d. (n = 20) o 70 mg/kg b.i.d. (n = 20) durante 28 días, seguido de 28 días de placebo, o si se aleatoriza a placebo, se administra cG-2-AlilP con una dosis de 70 mg/kg b.i.d. a partir del día 42 y hasta el día 70. Antes de dispensar la medicación del estudio, la cG-2-AlilP se reconstituye con un diluyente con sabor a fresa para proporcionar un líquido para la administración oral. El placebo (n = 20) es diluyente de fresa y agua.

#### **Evaluaciones**

##### **Farmacocinética**

- 30 Se toman muestras de sangre de todos los sujetos en cada grupo el día 42 y el día 70. Se recogen cuatro (4) muestras a partir del día 42 (antes de la dosis y de 2 a 4 horas después de la dosis) y el día 70 (antes de la dosis y 2 a 4 horas después de la dosis). También se recoge una muestra de seguridad para cada punto de tiempo.

##### **Eficacia**

- 35 La eficacia se determina usando la Clinical Global Impression of Severity (CGL-S), Clinical Global Impression Improvement (CGI-I), Fragile X Syndrome Rating Scale, Fragile X Domain Specific Concerns (Visual Analog Scale) completada por el médico, Caregiver Top Three Concerns (Visual Analogue Scale), Aberrant Behavior Checklist, Vineland Adaptive Behavior Scale, CASI-16, CYBOCS-PDD, diario de convulsiones, seguimiento ocular computarizado, medida computarizada de la cognición usando el KiTap y la Expressive Language Sampling Task.

#### **Medidas del resultado de la eficacia**

- 40 Se evalúan los siguientes cuatro grupos de medidas del resultado de la eficacia, comparando dos niveles de dosificación de cG-2-AlilP, por separado y combinados, con placebo.

##### **Medidas del resultado funcional global**

Las siguientes medidas se evalúan al inicio y durante el tratamiento y los cambios se comparan entre los grupos activo y placebo.

- 45 Los cambios en la Fragile X Syndrome Rating Scale se calculan para cada sujeto entre el día 14 de inicio (pretratamiento) y el final del tratamiento (días 42 y 70).

El resultado global se mide mediante la Clinical Global Impression – Severity and Improvement Scales (CGI-S y CGI-I) en cada visita clínica, desde el inicio en adelante (por ejemplo, días 14, 28, 42, 56, 70 y 84).

- 50 Los cambios en la Fragile X Domain Specific Concerns completada por el médico, tal como se captan vía una escala analógica visual (VAS), se calcula para cada sujeto entre el inicio (pretratamiento), el día 14, y el final del tratamiento

(días 42 y 70).

Los cambios en la Caregiver Top Three Concerns (relacionados con el síndrome de X frágil del sujeto) según lo captado vía una escala analógica visual (VAS) se calcula dentro de los sujetos entre el inicio (pretratamiento), el día 14 y el final del tratamiento (días 42 y 70).

- 5 Los cambios en la CASI-16, CYBOCS-PDD, Aberrant Behavior Checklist (ABC), Expressive Language Sampling Task y Vineland Adaptive Behavior Scales (VABS) se calculan para cada sujeto entre el inicio, día 14 y los días 42 y 70.

#### **Medidas del resultado fisiológico**

- 10 Los niveles séricos y los cambios de los parámetros estándar de hematología y química (incluida la función tiroidea) se calculan desde el inicio hasta el día 70. La fundoscopia y el tamaño de las amígdalas se documentan en el inicio, y los días 14, 28, 42, 56, 70 y 84. La citometría de flujo se usa para evaluar el estado de fosforilación de las enzimas Akt y ERK en linfocitos periféricos, en muestras de sangre obtenidas los días 14, 28, 42, 56 y 70. El ECG se evalúa en la detección, al inicio, los días 28, 42, 56 y 70.

#### **Medidas del resultado cognitivas/automatizadas**

- 15 Las siguientes medidas se evalúan al inicio, durante y después de la administración del fármaco del estudio. La medida computarizada de la cognición usando el KiTap se evalúa al inicio, el día 14, el día 42, el día 70 y el día 84. La evaluación del seguimiento ocular por ordenador se mide al inicio, el día 14, 28, 42, 56 y el día 70.

#### **Relaciones farmacocinéticas-farmacodinámicas**

- 20 Las medidas farmacocinéticas (PK) y de eficacia (PD) coincidentes se obtienen de todos los pacientes asignados al azar para recibir 35 mg/kg o 70 mg/kg de cG-2-AlilP oral dos veces al día. Los marcadores farmacodinámicos incluyen resultados globales funcionales, fisiológicos y cognitivos/automatizados. El enfoque consiste en evaluar los cambios en las medidas de eficacia en el transcurso del estudio y correlacionarlos con los puntos finales farmacocinéticos medidos o calculados. Además, los modelos PK/PD se usan para establecer una relación entre la concentración en sangre de cG-2-AlilP y el efecto, cuando corresponda.

#### **Métodos estadísticos**

##### **25 Eficacia**

Los tests ANOVA, ANCOVA y Chi-cuadrado se usan para comparar los niveles de medida de eficacia y los cambios entre los grupos de tratamiento. Cada grupo de dosis se compara con el grupo de placebo concurrente y el grupo de dosis combinada se compara con el grupo de placebo combinado. Se considera un valor p de dos colas <0.05 para indicar significación estadística.

- 30 Un tamaño de muestra total de 60 (40:20) permite que los tamaños de efecto >0.80 entre activos y placebo se detecten como estadísticamente significativos ( $\alpha$  de 2 colas = 0.05) con una potencia del 80% en medidas de resultado clave tales como la Fragile X Syndrome Rating Scale. Para las comparaciones dentro de cada grupo de dosis (es decir, la comparación de los tiempos de evaluación), los tamaños de efecto > 0.7 entre activo y placebo se detectan como estadísticamente significativos ( $\alpha$  de 2 colas = 0.05) con 80% de potencia.

##### **35 Farmacocinética**

Los parámetros concentración máxima (C<sub>max</sub>; pico), concentración mínima (C<sub>min</sub>; valle), C<sub>0-4</sub> y área bajo la curva (AUC) en estado estacionario se calculan directamente a partir de los datos de concentración de cG-2-AlilP y se resumen en cada punto de tiempo usando estadísticos descriptivos estándar que incluyen medias, medianas, medias geométricas, desviaciones estándar, rangos, e intervalos de confianza del 95%.

- 40 Para determinar si existen asociaciones entre los parámetros PK y las medidas de eficacia, los cambios en las medidas de eficacia en el transcurso del estudio se correlacionan con los parámetros PK estimados en los diferentes puntos de tiempo. Estas asociaciones se prueban estadísticamente usando coeficientes de correlación y modelos lineales generales.

#### **Resultados y conclusiones**

- 45 Encontramos que la cG-2-AlilP es bien tolerada por los pacientes. Además, encontramos que la cG-2-AlilP tiene efectos clínicamente relevantes y significativos para mejorar los resultados clínicos medidos usando una o más herramientas de evaluación descritas aquí. También encontramos que la cG-2-AlilP normaliza los niveles de pERK y pAkt.

- 50 Este estudio demuestra que la cG-2-AlilP es efectiva en el tratamiento de los síntomas adversos del síndrome de X frágil en los seres humanos.

### **Ejemplo 26: efectos de la cG-2-AlilP sobre la plasticidad sináptica después de una lesión cerebral de tipo balístico penetrante en ratas I:**

En este ejemplo, investigamos si la cG-2-AlilP tiene actividad antiinflamatoria y antiapoptótica después de una lesión cerebral de tipo balístico penetrante (PBBI). Se ha demostrado que las moléculas estructuradas de manera similar a la cG-2-AlilP tienen efectos de mejora de la memoria o mejoran el aprendizaje de evitación pasiva in vivo y promueve el crecimiento de neuritas in vitro. Esto sugiere que el tratamiento con análogos de c(GP) mejora la neuroplasticidad y la formación de sinapsis. Por lo tanto, investigamos si la cG-2-AlilP regula genes y proteínas codificadas que gobiernan la plasticidad sináptica después de PBBI.

#### **Métodos**

##### **Lesión cerebral penetrante de tipo balístico (PBBI)**

El modelo de PBBI unilateral frontal, que imita la dinámica balística de una herida de bala o fragmento en la cabeza (Williams, 2005; Williams, 2006), fue inducido por la inserción estereotáctica de una sonda personalizada a través de la corteza frontal derecha. Se formó una cavidad temporal por el rápido inflado/desinflado (es decir, <40 ms) de un globo elástico unido al extremo de la sonda. El aparato de PBBI consistía en un generador de presión hidráulica controlado por ordenador (Mitre Corp McLean, VA), una sonda de PBBI y un marco estereotáxico equipado con un soporte de sonda diseñado a medida como se describió anteriormente (Lu, 2009; Williams, 2005). La gravedad de la lesión se determinó por el tamaño del globo bajo control de la presión hidráulica computarizada. El diámetro del globo calibrado a 0.63 cm de expansión representaba el 10% del volumen total del cerebro de la rata, expresando de este modo un 10% de PBBI. Todas las cirugías se realizaron bajo anestesia. Grupos ensayados: simulación + vehículo, PBBI + vehículo, PBBI + cG-2-AlilP (30 mg/kg por sonda oral, 30 minutos después de la lesión, y nuevamente una vez al día hasta el punto final). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Institutional Animal Care and Use de WRAIR. Los animales fueron alojados en una instalación acreditada por la AAALAC.

##### **Administración oral de cG-2-AlilP**

Se administró cG-2-AlilP (o vehículo) a los animales mediante sonda oral con una dosis de 30 mg/kg.

##### **ELISA**

Las proteínas diana se cuantificaron con interleucina 1 beta ("IL-1beta") (GenWay Biotech GWB-SKR107) e interleucina-6 ("IL-6") (GenWay Biotech GWB-ZZD100) según las instrucciones del fabricante. Los niveles se calcularon y normalizaron a la concentración de proteína total según lo determinado por el ensayo BCA (n = 9-10 por grupo).

##### **Transferencia de Western**

Las muestras se analizaron a las 24 horas y 3 y 7 días después de la lesión para todos los grupos (simulación + vehículo, PBBI + vehículo, PBBI + cG-2-AlilP). El tejido se homogeneizó en tampón RIPA que contenía inhibidores de la proteasa HALT. La proteína total se basó en el ensayo BCA. Las transferencias se bloquearon con leche al 5%, se sondearon con anti-ATF3, anti-BAX o anti-BCL2. Las transferencias se volvieron a sondear con anticuerpo anti-beta-actina para controlar la carga de proteínas. El análisis de la intensidad de banda se realizó usando un software LAS4000 e ImageQuantTL (GE Healthcare) (n = 9-10 por grupo).

##### **Matrices de ARNm de neuroplasticidad**

Se generó ADNc a partir del ARN total de animales individuales usando cebadores aleatorios. Se depositó ADNc en una matriz de PCR específica producida por SA Biosciences y el producto se detectó usando fluorescencia verde SyBr. Los niveles de Ct se normalizaron a beta actina. Los resultados de la lesión se compararon con la simulación para evaluar las cantidades relativas (RQ) (n = 6 por grupo).

#### **Resultados**

La lesión PBBI sola condujo a un incremento agudo (a las 24 horas después de la PBBI) en las medidas inflamatorias y apoptóticas estudiadas. La **FIG. 33A-33F** muestra estos resultados. La PBBI incrementó la cantidad de IL-1beta (**FIG. 33A**) e IL-6 (**FIG. 33D**). La cG-2-AlilP disminuyó las citocinas proinflamatorias IL1-beta (**FIG. 33C**) e IL-6 (las **FIGs. 33D** y **33F**). ANOVA: \* p < 0.05, \*\* p < 0.01; barra de error: SEM. La cG-2-AlilP incrementó los niveles de IL1-beta a los 3 días después de la PBBI, lo que puede ser compensatorio para su objetivo IL-6 aguas abajo. El tratamiento con cG-2-AlilP disminuyó los niveles de IL1-beta a los 7 días después de la PBBI (**FIG. 33C**). El tratamiento con cG-2-AlilP disminuyó los niveles de IL-6 a las 24 horas (**FIG. 33D**) y 7 días (**FIG. 33E**) después de la PBBI, pero tuvo poco efecto a los 3 días (**FIG. 33B**). Estos resultados indican que la cG-2-AlilP redujo estas citocinas inflamatorias.

La **FIG. 34** muestra que la PBBI incrementó significativamente y sustancialmente la expresión de BAX (**FIGs. 34 A, 34B, y 34C**) y BCL2 (**FIGs. 34D, 34E, 34F, 34G, y 34H**). La cG-2-AlilP no alteró significativamente los niveles de BAX (**FIGs. 34A - 34C**) o BCL2 (**FIGs. 34D - 34H**).



La **FIG. 35** muestra que la PBBI incrementó la expresión de ATF3 en todos los puntos de tiempo (**FIGs. 35A - 35C**). Sorprendentemente, encontramos que la cG-2-AlilP disminuyó el ATF3 a las 24 h. después de la PBBI medida globalmente por transferencia de Western (**FIG. 35A**).

- 5 La **FIG. 36** muestra que después de PBBI, el tratamiento con cG-2-AlilP incrementó significativamente la Gria 4 (un receptor de AMPA; **FIG. 36F**) a las 24 h. punto de tiempo. Además, observamos tendencias que incluyen: disminución de Crem (un inhibidor de CREB; **FIG. 36D**), disminución de NTF3 (**FIG. 36J**), disminución de NTF4 (**FIG. 36K**), disminución de Pcdh8 (un gen supresor tumoral; **FIG. 36L**), disminución de BDNF (**FIG. 36A**), disminución de Pim1; **FIG. 36M**) y aumento de Ppp3ca (**FIG. 36N**).

### Conclusiones

- 10 Estas tendencias en la expresión de ARN, particularmente el incremento de Gria 4, la disminución de Crem y la disminución de la expresión de Pcdh8 promueven la neuroplasticidad. La disminución de NTF3 y NTF4 permite la formación sináptica.

- 15 En conjunto, estos resultados indican que la cG-2-AlilP tiene efectos antiinflamatorios después de PBBI severa y neuroplasticidad mejorada. Debido a que los resultados obtenidos en este sistema experimental son razonablemente predictivos de los efectos observados en los seres humanos, la cG-2-AlilP y compuestos de GP cíclica similares pueden ser efectivos en el tratamiento de los síntomas de lesión cerebral traumática leve, moderada o grave.

**Ejemplo 27: efectos de la cG-2-AlilP sobre la plasticidad sináptica después de una lesión cerebral de tipo balístico penetrante en ratas II:**

### Proteína 43 asociada al crecimiento y sinaptofisina

- 20 En este ejemplo, examinamos el papel de la cG-2-AlilP en la expresión de genes y proteínas relacionadas implicadas en la neuroplasticidad después de una lesión cerebral de tipo balístico penetrante (PBBI; 10% de gravedad de la lesión) en ratas.

### Métodos

- 25 Los métodos para producir PBBI en este ejemplo son los mismos que los descritos anteriormente para el **Ejemplo 26**. Las ratas adultas Sprague-Dawley se repartieron aleatoriamente en tres grupos: simulación (solo craneotomía), PBBI + vehículo (es decir, H<sub>2</sub>O), y PBBI + cG-2-AlilP. Se administró la cG-2-AlilP (o vehículo) vía sonda oral a 30 mg/kg a los 30 minutos después de la lesión y se continuó una vez al día durante 7, 14 o 28 días. En cada punto final del tratamiento, las ratas se perfundieron y los cerebros se procesaron para el análisis histológico (n = 5-6/grupo/punto de tiempo). Para la detección del brote axonal, se empleó la detección inmunohistoquímica de la proteína 43 asociada al crecimiento (GAP-43). La sinaptogénesis se determinó por inmunohistoquímica para determinar la sinaptofisina (SYN). Para la cuantificación histológica, la densidad integrada en la región del hipocampo se determinó utilizando el software NIH ImageJ.

### Resultados

- 35 En el grupo de tratamiento con vehículo, la PBBI disminuyó significativamente la expresión de GAP-43 en el hipocampo ipsilateral en 7d, 14d y 28d después de la lesión, y en el hipocampo contralateral en 7d y 14d después de la lesión (p <0.05 vs. simulación). Se detectaron reducciones significativas en la tinción de SYN en 14d y 28d después de la lesión en el hipocampo ipsilateral y en 14d después de la lesión en el hipocampo contralateral en el grupo de PBBI + vehículo (p <0.05 vs. simulación). El tratamiento continuo con cG-2-AlilP no mostró ningún efecto sobre las reducciones inducidas por lesiones en la expresión de GAP-43 o SYN en 7d o 14d post-PBBI. Sin embargo, a los 28 días después de la lesión, el tratamiento con cG-2-AlilP atenuó las reducciones inducidas por PBBI en la expresión de GAP-43 y SYN a niveles que no diferían significativamente de los controles de simulación, lo que indica un efecto de tratamiento intermedio.

### Conclusiones

- 45 El análisis histológico indica que la PBBI indujo una reducción significativa del brote axonal y la sinaptogénesis durante la fase de sub-aguda a crónica después de la lesión. Estos resultados muestran una tendencia de la cG-2-AlilP en la promoción de la neuroplasticidad. Debido a que el sistema animal usado es predictivo de la neuroplasticidad en los seres humanos, estos resultados indican que la cG-2-AlilP puede ser efectiva para mejorar los efectos adversos de la lesión cerebral.

- 50 Las descripciones y ejemplos proporcionados aquí son solo para fines ilustrativos. El alcance de esta invención no pretende estar limitado a las realizaciones descritas. Otras realizaciones que incorporan elementos de la invención se pueden practicar sin experimentación indebida por personas de experiencia media en la técnica. Por lo tanto, todas estas realizaciones se consideran parte de esta invención.

## 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.
- 5 Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. 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 JR, Zalla T, Herbrecht E, Leboyer M, Sirigu A. (2010). Promoting social behavior with oxytocin in high-functioning autism spectrum disorders. *PNAS* 107:4389-4394.
- 10 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., and 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.
- 15 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., and State MW (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., and 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.
- 20 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 PV, Oldfors A, Hagberg B, Dahlström A. Rett syndrome: 3-D confocal microscopy of cortical pyramidal dendrites and afferents. *Neuroreport.* 1994 5: 1509-1513.
- 25 Biederer T, Sara Y, Mozhayeva M, Atasoy D, Liu X, Kavalali ET, Südhof TC. (2002) SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science* 297(5586): 1525-1531.
- Chapleau CA, Larimore JL, 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.
- 30 Cheng CM, Mervis RF, Niu SL, Salem N Jr, Witters LA, Tseng V, Reinhardt R, Bondy CA. Insulin-like growth factor 1 is essential for normal dendritic growth. *J Neurosci Res.* 2003 73: 1-9.
- Comery TA, Harris JB, Willems PJ, Oostra BA, Irwin SA, Weiler IJ, Greenough WT. (1997) Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94: 5401-5404.
- 35 Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, Nygren G, Rastam M, Gillberg IC, Anckarsäter H, Sponheim E, Goubran-Botros H, Delorme R, Chabane N, Mouren-Simeoni MC, 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 MR, Blaiss CA, Powell CM, Südhof TC. (2009) Mouse neurexin- 1  $\alpha$  deletion causes correlated electrophysiological and behavioural changes consistent with cognitive impairments. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 106: 17998-18003.
- 40 Garbern, J.Y., Neumann, M., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., Feldman, G., Norris, J.W., Friez, M.J., Schwartz, C.E., Stevenson, R., and Sima, A.A. (2010), A mutation affecting the sodium/proton exchanger, SLC9A6, causes mental retardation with tau deposition. *Brain* 133, 1391-1402.
- 45 Gauthier J, Bonnel A, St-Onge J, Karemera L, Laurent S, Mottron L, Fombonne E, Joober R, Rouleau GA. (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.
- 50 Gilfillan, G.D., Selmer, K.K., Roxrud, I., Smith, R., Kyllerman, 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., and 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 SR, 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 MJ, 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 AJ, Einfeld SL, Gray KM, Rinehart NJ, Tonge BJ, Lambert TJ, Hickie IB. (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 SW, Hessler D, Goodlin-Jones B, Ferranti J, Bacalman S, Barbato I, Tassone F, Hagerman PJ, Herman H, Hagerman PJ. (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 JJ, Zhang H. Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Res*. 2010 1309:83-94.
- Irwin SA, Galvez R, Greenough WT. Dendritic spine structural anomalies in fragile-X mental retardation syndrome. *Cereb Cortex*. 2000 10: 1038-1044.
- Jamain S, Quach H, Betancur C, Råstam M, Colineaux C, Gillberg IC, 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, Rormentberg 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 HG, Kishikawa S, Higgins AW, Seong IS, Donovan DJ, Shen Y, Lally E, Weiss LA, Najm J, Kutsche K, Descartes M, Holt L, Braddock S, Troxell R, Kaplan L, Volkmar F, Klin A, Tsatsanis K, Harris DJ, Noens I, Pauls DL, Daly MJ, MacDonald ME, Morton CC, Quade BJ, Gusella JF. (2008) Disruption of *neurexin 1* associated with autism spectrum disorder. *Am. J. Hum. Genet*. 82: 199-207.
- Klemmer P, Meredith RM, Holmgren CD, Klychnikov OI, Stahl-Zeng J, Loos M, van der Schors RC, Wortel J, de Wit H, Spijker S, Rotaru DC, Mansvelder HD, Smit AB, Li KW. 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 DD, Osterweil EK, Chen SP, Tye LD, Bear MF. (2011) Cognitive dysfunction and prefrontal synaptic abnormalities in a mouse model of fragile X syndrome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108: 2587-2592.
- Lauterborn JC, Rex CS, Kramar E, Chen LY, Pandeyarajan V, Lynch G, Gall CM. (2007) Brain-derived neurotrophic factor rescues synaptic plasticity in a mouse model of fragile X syndrome. *J. Neurosci*. 27: 10685-10694.
- Lintas C, Persico AM. (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 neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 143 :527-539 (incl. supplemental information).
- Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, Shago M, Moessner R, Pinto D, Ren Y, Thiruvahindrapuram B, Fiebig A, Schreiber S, Friedman J, Ketelaars CE, Vos YJ, Ficocioglu C, Kirkpatrick S, Nicolson R, Sloman L, Summers A, Gibbons CA, 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 SW. (2008) Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet*. 82: 477-488.
- Minshew NJ, Williams DL. The new neurobiology of autism: cortex, connectivity, and neuronal organization. *Arch Neurol*. 2007 64:945-950.
- Moessner R, Marshall CR, Sutcliffe JS, Skaug J, Pinto D, Vincent J, Zwaigenbaum L, Fernandez B, Roberts W, Szatmari P, Scherer SW. (2007) Contribution of *SHANK3* mutations to autism spectrum disorder. *Am. J. Hum.*

Genetics 81: 1289-1297.

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

5 Paylor, 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., and Lindsay, E. (2006). *PNAS* 103, 7729-7734.

10 Penagarikano, O., Abrahams, B.S., Herman, E.L., Winden, K.D., Gdalyahu, A., Dong, H., Sonnenblick, L.I., Gruver, R., Almajano, J., Bragin, A., Golshani, P., Trachtenberg, J.T., Peles, E., and 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.

15 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 YH, Hicks J, Spence SJ, Lee AT, Puura K, Lehtimäki T, Ledbetter D, Gregersen PK, Bregman J, Sutcliffe JS, Jobanputra V, Chung W, Warburton D, King MC, Skuse D, Geschwind DH, Gilliam TC, Ye K, Wigler M. (2007) Strong association of de novo copy number variation mutations with autism. *Science* 316(5823): 445-449.

Schaevertz LR, Moriuchi JM, Nag N, Mellot TJ, Berger-Sweeney J. (2010) Cognitive and social functions and growth factors in a mouse model of Rett syndrome. *Physiol. Behav.* 100: 255-263.

20 Schütt J, Falley K, Richter D, Kreienkamp HJ, 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.

25 Silverman JL, Yang M, Lord C, Crawley JN: Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nat Rev Neurosci* 2010, 11 :490-502.

Spence SJ, Schneider MT. The role of epilepsy and epileptiform EEGs in autism spectrum disorders. *Pediatr Res.* 2009 65:599-606.

Spencer CM, Alekseyenko O, Serysheva E, Yuva-Paylor LA, Paylor R, (2005) Altered anxiety-related and social behaviors in the Fmr1 knockout mouse model of fragile X syndrome. *Genes Brain Behav.* 4: 420-430.

30 Strauss, K.A., Puffenberger, E.G., Huentelman, M.J., Gottlieb, S., Dobrin, S.E., Parod, J.M., Stephan, D.A., and Morton, D.H. (2006). Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant contactin-associated protein-like 2. *N. Engl. J. Med.* 354, 1370-1377.

35 Stromme, P., Dobrenis, K., Sillitoe, R.V., Gulinello, M., Ali, N.F., Davidson, C., Micsenyi, M.C., Stephney, G., Ellevog, L., Klungland, A., and 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.

Sykes NH, Toma C, Wilson N, Volpi EV, Sousa I, Pagnamenta AT, Tancredi R, Battaglia A, Maestrini E, Bailey AJ, Monaco AP; 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.

40 Tabuchi K, Blundell J, Etherton MR, Hammer RE, Liu X, Powell CM, Sudhof TC. (2007) A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science* 318(5847): 71-76.

Takayanagi Y, Fujita E, Yu Z, Yamagata T, Momoi MY, Momoi T, Onaka T. (2010) Impairment of social and emotional behaviors in Cadm1-knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396: 703-708.

45 Tropea D, Giacometti E, Wilson NR., Beard C, McCurry C, Fu DD, Flannery R, Jaenisch R, Sur M. (2009) Partial reversal of Rett Syndrome-like symptoms in MeCP2 mutant mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106: 2029-2034.

Vernes, S.C., Newbury, D.F., Abrahams, B.S., Witichester, L., Nicod, J., Groszer, M., Alarcon, M., Oliver, P.L., Davies, K.E., Geschwind, D.H., Monaco, A.P., and Fisher, S.E. (2008). A functional genetic link between distinct developmental language disorders. *N. Engl. J. Med.* 359, 2337-2345.

50 Yan J, Noltner K, Feng J, Li W, Schroer R, Skinner C, Zeng W, Schwartz CE, Sommer SS. (2008) Neurexin 1alpha structural variants associated with autism. *Neurosci Lett.* 438: 368-370.

Yan QJ, Asafo-Adjei PK, Arnold HM, Brown RE, Bauchwitz RP. (2004) A phenotypic and molecular characterization of the *fmr1*-tm1Cgr fragile X mouse. *Genes Brain Behav.* 3:337-359.

Yang M, Crawley JN: Simple behavioural assessment of mouse olfaction. *Curr Protoc Neurosci* 2009, Chapter 8(Unit 8):24.

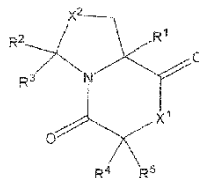
- 5 Zhiling Y, Fujita E, Tanabe Y, Yamagata T, Momoi T, Momoi MY. (2008) Mutations in the gene encoding *CADM 1* are associated with autism spectrum disorder. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 926-929.

Zhao MG, Toyoda H, Ko SW, Ding HK, Wu LJ, 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. (Erratum in: *J Neurosci.* 2005, 25: 8112).

- 10 Zoghbi HY. (2005) *MeCP2* dysfunction in humans and mice. *J Child Neurol.* 20: 736-740.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto para uso en un método para tratar un síntoma de un trastorno del espectro autista (ASD) o trastorno del neurodesarrollo (NDD) en un animal que padece dicho trastorno, que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente efectiva de dicho compuesto, siendo dicho compuesto Glicil-2-Alilprolina cíclica (cG-2-AlilP), ciclohexil-G-2MeP cíclica o ciclopentil-G-2MeP cíclica, en el que dicho síntoma es uno o más de un déficit en la función ejecutiva, ansiedad, condicionamiento anormal del miedo, comportamiento social anormal y comportamiento repetitivo.
2. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en el que dicha cG-2-AlilP, o ciclohexil-G-2MeP cíclica, o ciclopentil-G-2MeP cíclica comprende una disolución acuosa y uno o más excipientes, aditivos, vehículos, o adyuvantes farmacéuticamente aceptables, o uno o más excipientes, vehículos, aditivos, adyuvantes o aglutinantes en un comprimido o cápsula.
3. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en trastorno autista, síndrome de Asperger, trastorno desintegrativo infantil y trastorno generalizado del desarrollo no especificado de otra manera (PDD-NOS), evitación de la demanda patológica (PDA), síndrome de X frágil (FXS), síndrome de Angelman, complejo de esclerosis tuberosa, síndrome de Phelan McDermid, síndrome de Rett, mutaciones de CDKL5 y trastorno de espasmo infantil ligado a X.
4. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el compuesto se administra directa o indirectamente vía la circulación.
5. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicha cantidad efectiva de dicho compuesto tiene un límite inferior de alrededor de 0.001 miligramos por kilogramo de masa (mg/kg) del mamífero y un límite superior de alrededor de 100 mg/kg.
6. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho tratamiento produce una mejora en un síntoma de ASD o NDD según se evalúa usando uno o más ensayos clínicos seleccionados del grupo que consiste en The Rett Syndrome Natural History / Clinical Severity Scale, Aberrant Behavior Checklist Community Edition (ABC), Vineland Adaptive Behavior Scales, Clinical Global Impression of Severity (CGI-S), Clinical Global Impression Improvement (CGI-I), el Caregiver Strain Questionnaire (CSQ), o uno o más ensayos fisiológicos seleccionados del grupo que consiste en frecuencia de pico de electroencefalograma (EEG), potencia general en bandas de frecuencia de un EEG, coherencia hemisférica de las frecuencias de EEG, movimiento estereotípico de la mano, QTc y variabilidad de la frecuencia cardíaca (HRV), irregularidades respiratorias y acoplamiento de la función cardíaca y respiratoria en comparación con animales de control que no padecen dicho trastorno.
7. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho tratamiento reduce más un síntoma seleccionado del grupo que consiste en pérdida de orientación espacial, disminución de la capacidad de aprendizaje, disminución de la memoria espacial, déficits en el mapeo cognitivo y memoria de la escena, disminución de la adquisición rápida de asociaciones de configuración o conjuntivas, locomoción anormal y bradicardia.
8. Un compuesto para uso en un método para tratar un trastorno del espectro autista (ASD) o un trastorno del neurodesarrollo (NDD) en un mamífero que padece tal trastorno, que comprende administrar dicho compuesto al mamífero, teniendo dicho compuesto la fórmula:



- o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que

X<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste en NR', O y S;

X<sup>2</sup> se selecciona del grupo que consiste en CH<sub>2</sub>, NR', O y S;

- R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OR', -SR', -NR'R', -NO<sub>2</sub>, -CN, -C(O)R', -C(O)OR', -C(O)NR'R', -C(NR')NR'R', trihalometilo, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heteroarilalquilo y heteroarilalquilo sustituido; cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, alquilo, heteroalquilo, alqueno, alquino, arilo, arilalquilo, heteroarilo y heteroarilalquilo;

o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> tomados conjuntamente son -CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>- en la que n es un número entero de 0-6;

o  $R^2$  y  $R^3$  tomados conjuntamente son  $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2-$  en la que  $n$  es un número entero de 0-6;

con la condición de que cuando  $R^1 = \text{metilo}$  y  $R^2 = R^3 = R^4 = \text{H}$  entonces  $R^5 \neq \text{bencilo}$  y;

cuando  $R^1 = \text{H}$ , por lo menos uno de  $R^2$  y  $R^3 \neq \text{H}$ .

- 5 9. El compuesto para el uso de la reivindicación 8, en el que  $R^1 = \text{metilo}$ ; o  $R^1 = \text{alilo}$ ; o  $R^2 = R^3 = \text{metilo}$  y  $X^2 = \text{S}$ ; o en el que  $R^1 = \text{alilo}$ ,  $R^2 = R^3 = R^4 = R^5 = \text{H}$ ,  $X^1 = \text{NH}$ ,  $X^2 = \text{CH}_2$ ; o en el que  $R^1 = \text{metilo}$ ,  $R^2 = R^3 = \text{H}$ ,  $R^4$  y  $R^5$  tomados conjuntamente son  $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-$ ,  $X^1 = \text{NH}$ ,  $X^2 = \text{CH}_2$ ; o en el que  $R^1 = \text{metilo}$ ,  $R^2 = R^3 = \text{H}$ ,  $R^4$  y  $R^5$  tomados conjuntamente son  $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2-$ ,  $X^1 = \text{NH}$ ,  $X^2 = \text{CH}_2$ .
- 10 10. El compuesto para el uso de la reivindicación 8, en el que dicho método comprende además administrar un excipiente farmacéuticamente aceptable, o un excipiente farmacéuticamente aceptable y un aglutinante, o un excipiente farmacéuticamente aceptable y una cápsula.
- 15 11. El compuesto para el uso de la reivindicación 8, en el que dicho método comprende además administrar por lo menos otro agente seleccionado del grupo que consiste en factor de crecimiento similar a insulina I [IGF-I], factor de crecimiento similar a insulina II [IGF-II], factor de crecimiento transformante  $\beta$ -1, activina, hormona del crecimiento, factor de crecimiento nervioso, proteína de unión a hormona de crecimiento, IGFBP-3, factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor de crecimiento de fibroblastos ácido, el producto del gen hst/Kfgk, FGF-3, FGF-4, FGF-6, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento inducido por andrógenos, int-2, factor homólogo 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (FHF-1), FHF-2, FHF-3 y FHF-4, factor de crecimiento de queratinocitos 2, factor de activación glial, FGF-10, 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 línea de células gliales, factor neurotrófico dependiente de la actividad, factor inhibidor de la leucemia de citoquinas, oncostatina M, una interleucina, interferón  $\alpha$ , interferón  $\beta$ , interferón  $\gamma$ , interferón consenso, TNF- $\alpha$ , clometiazol; ácido quinurénico, Semax, tacrolimus, L-treo-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol, análogo de adrenocorticotropina-(4-9) [ORG 2766], dizolcipina [MK-801], selegilina, un antagonista de glutamato seleccionado del grupo que consiste en NPS1506, GV1505260, MK-801 y GV150526, un antagonista de AMPA seleccionado del grupo que consiste en 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoilbenzo(f)quinoxalina (NBQX), LY303070 y LY300164, y el anticuerpo anti-MAdCAM-1 MECA-367.
- 20 12. El compuesto para el uso de la reivindicación 8, en el que dicho compuesto es G-2-AlilP cíclica.
13. El compuesto para el uso de la reivindicación 8, en el que dicho compuesto es ciclohexil-G-2MeP cíclica.
14. El compuesto para el uso de la reivindicación 8, en el que dicho compuesto es ciclopentil-G-2MeP cíclica.
- 30 15. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en trastorno autista, síndrome de Asperger, trastorno desintegrativo infantil y trastorno generalizado del desarrollo no especificado de otra manera (PDD-NOS), y evitación de la demanda patológica (PDA).
- 35 16. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en síndrome X frágil (FXS), síndrome de Angelman, complejo de esclerosis tuberosa, síndrome de Phelan McDermid, síndrome de Rett, mutaciones de CDKL5 y trastorno de espasmo infantil ligado a X.
17. El compuesto para el uso de la reivindicación 3, en el que dicho trastorno es el síndrome de Rett.
18. El compuesto para el uso de la Reivindicación 3, en el que dicho trastorno es el síndrome de X Frágil.
19. El compuesto para el uso de la reivindicación 3, en el que dicho trastorno es el síndrome de Phelan-McDermid.
- 40 20. El compuesto para el uso de la reivindicación 3, en el que el trastorno es el síndrome de Angelman.

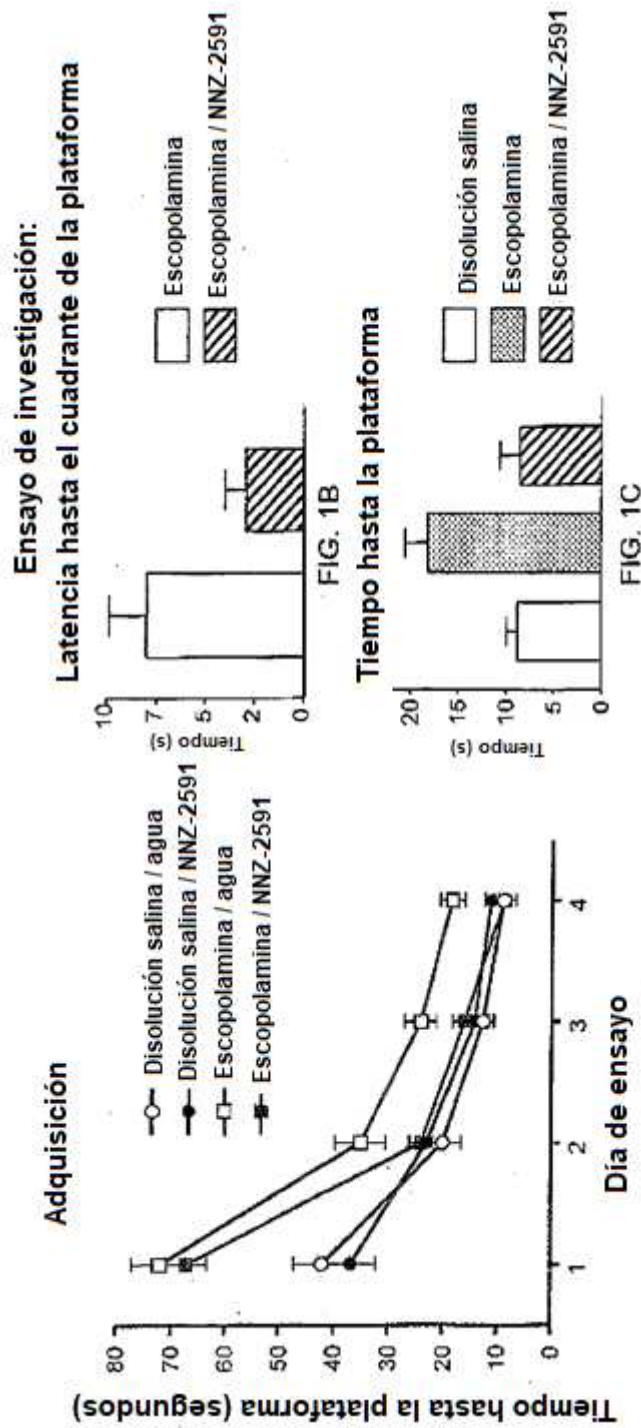
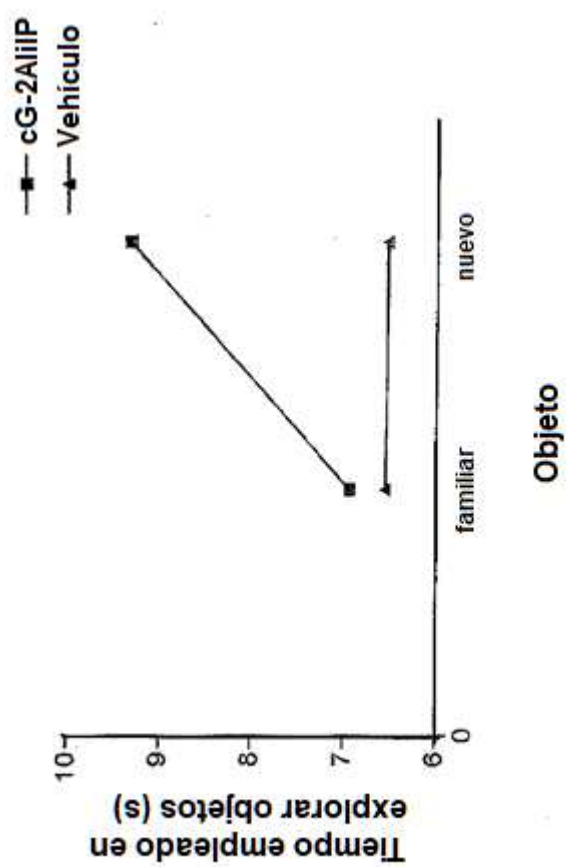


FIG. 1A





**Figura 2**

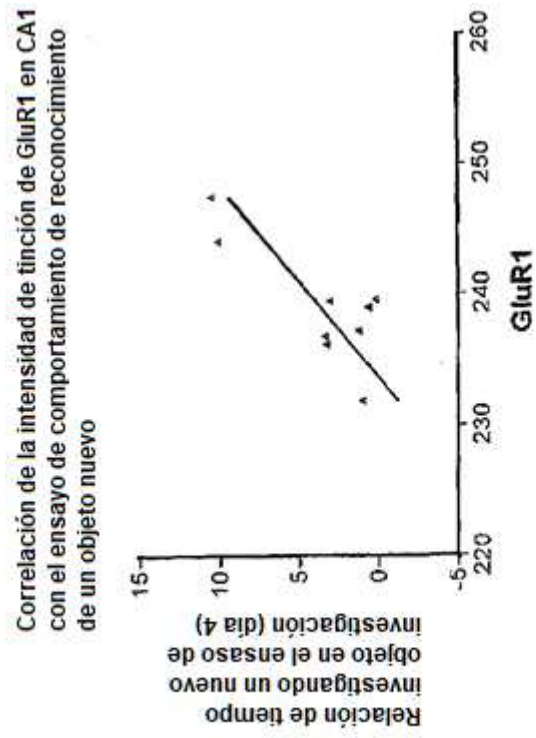
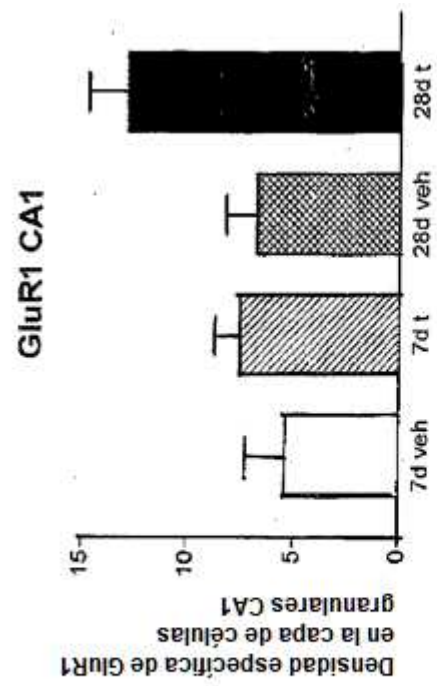
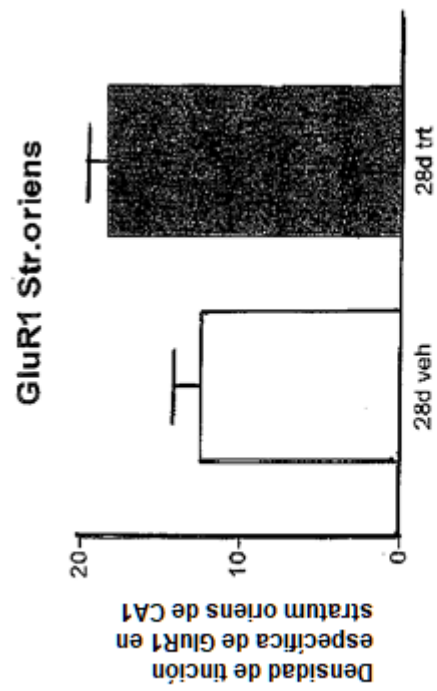


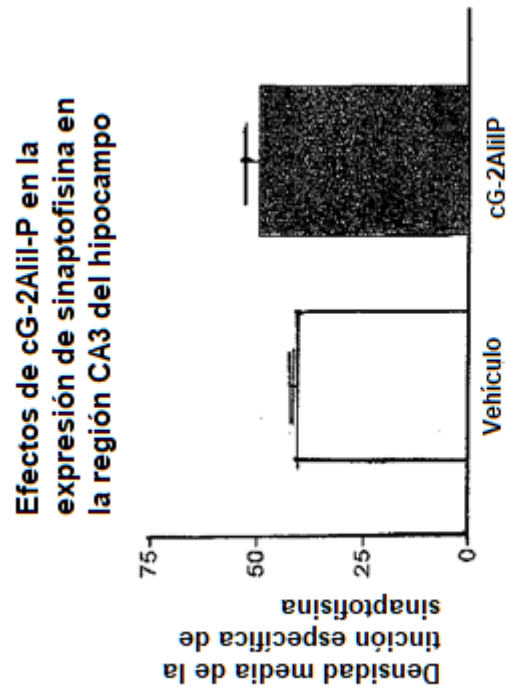
Figura 3



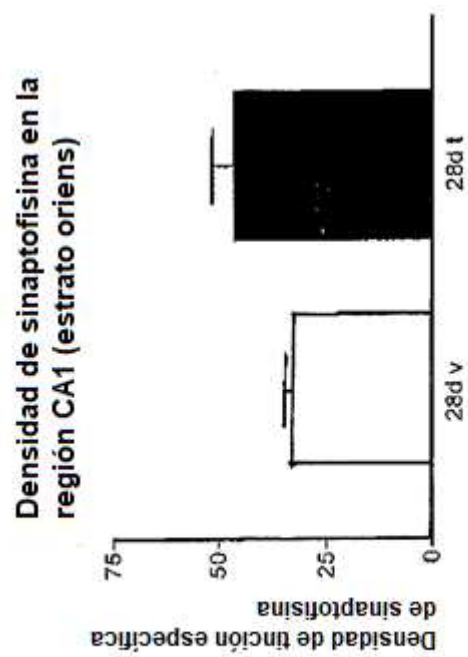
**Figura 4**



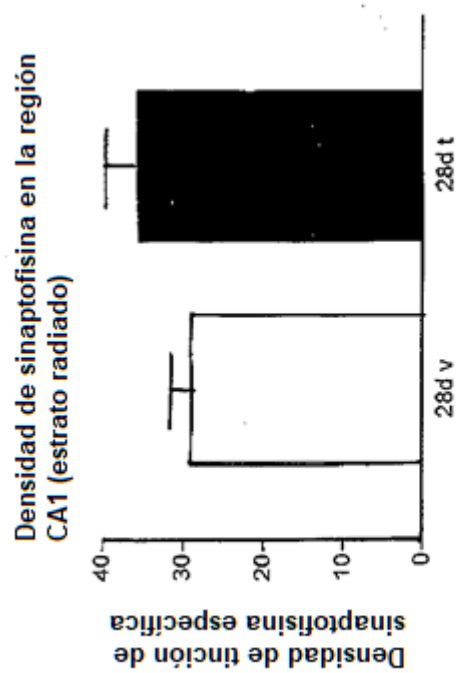
**Figura 5**



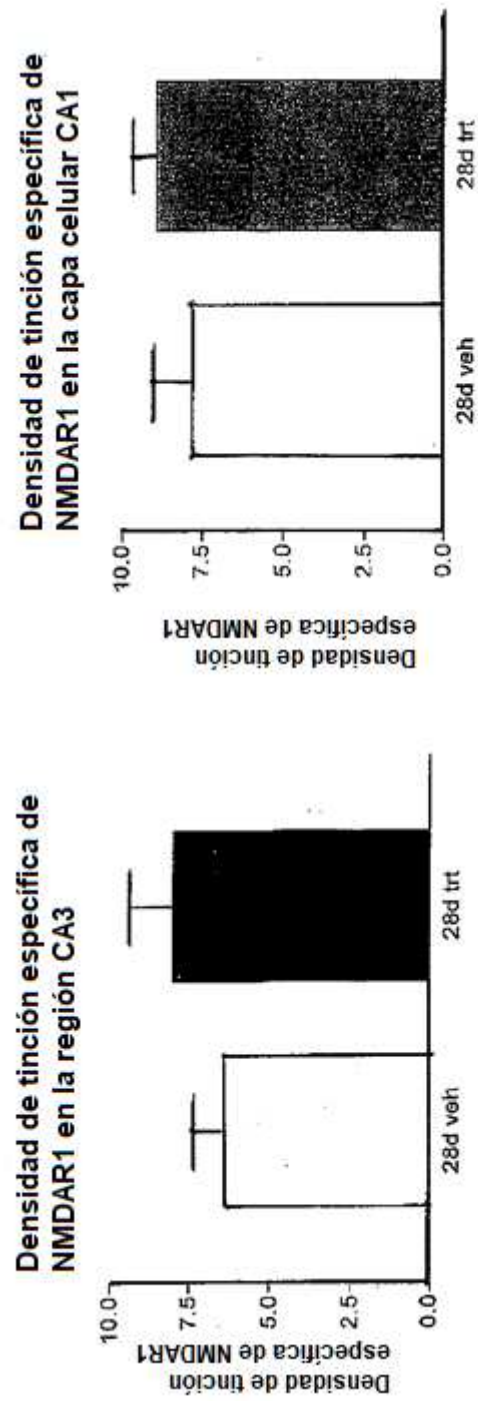
**Figura 6**



**Figura 7**



**Figura 8**



**Figura 9A**

**Figura 9B**



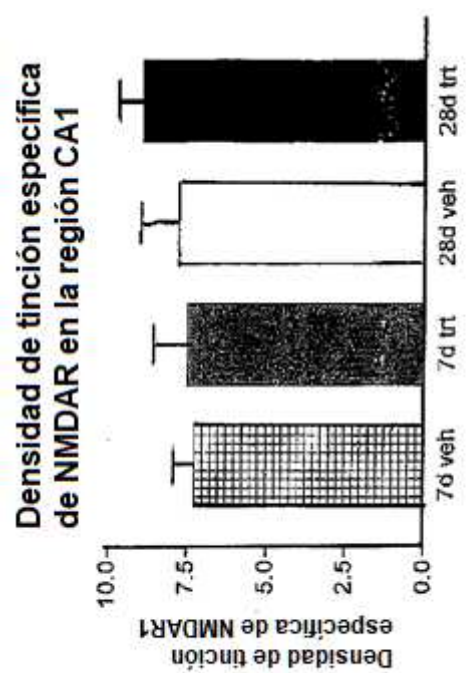
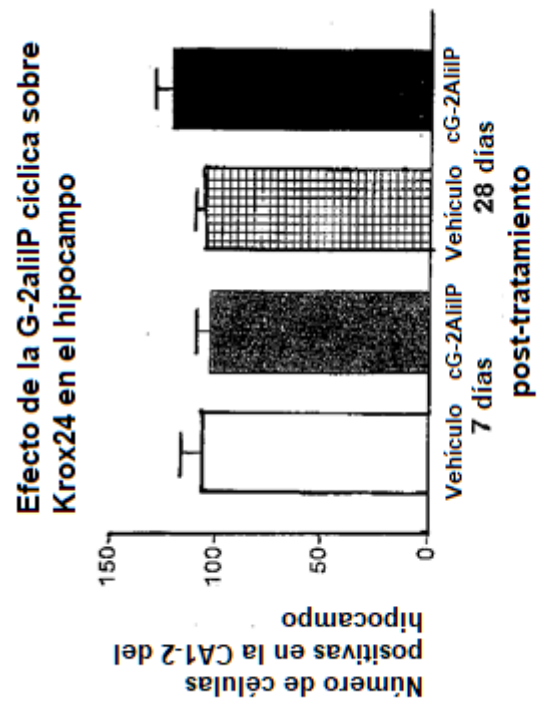
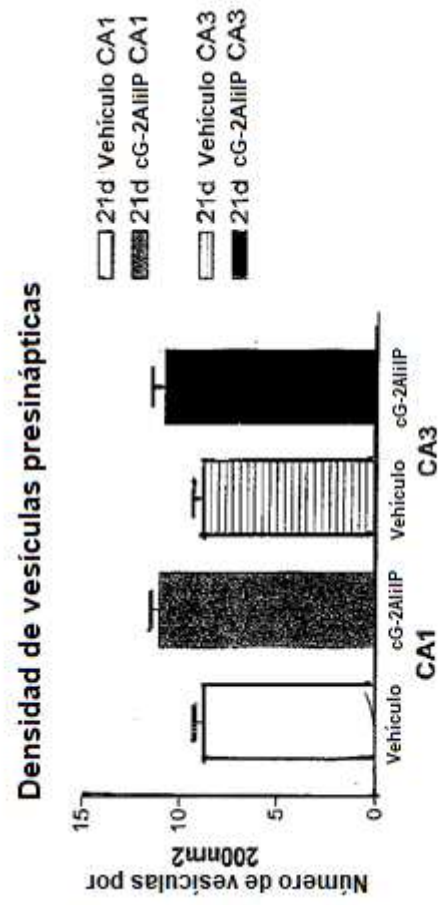


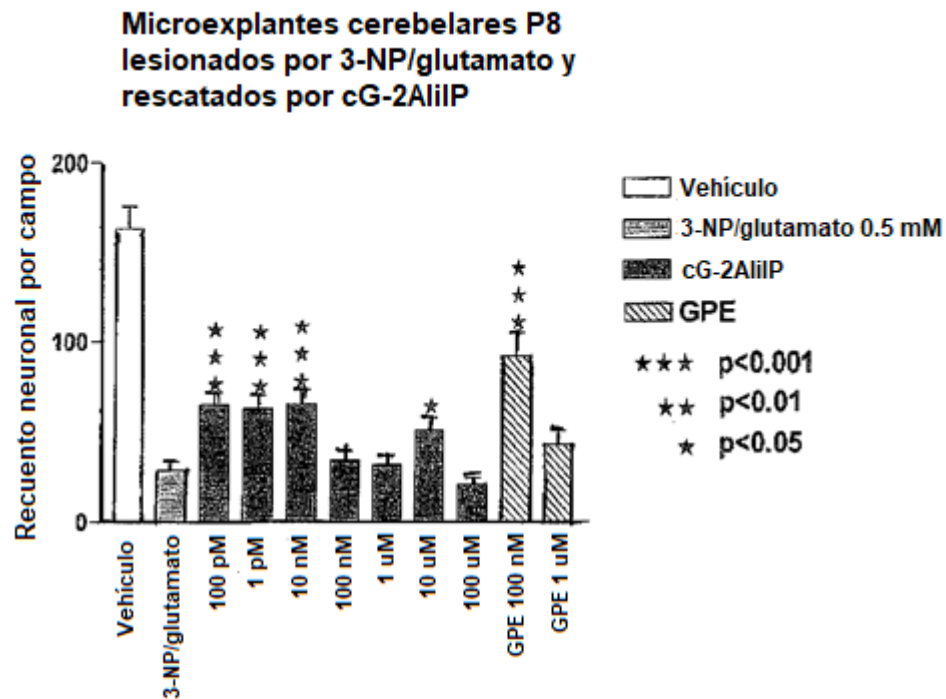
Figura 9C



**Figura 10**



**Figura 11**



Número de células analizadas después de 48 h. Entre 100 pM y 10 nM de cG-2AlilP (N=4) la recuperación de lesión está entre 25.5% y 27.3%. GPE 100 nM muestra 47.1 de recuperación.

FIG. 12

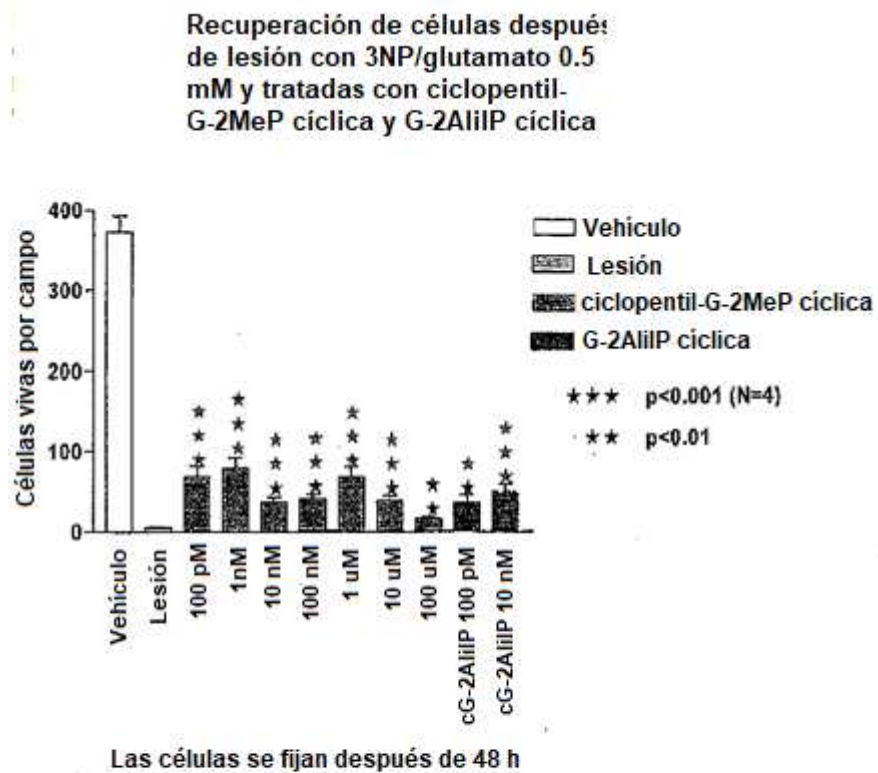


FIG. 13

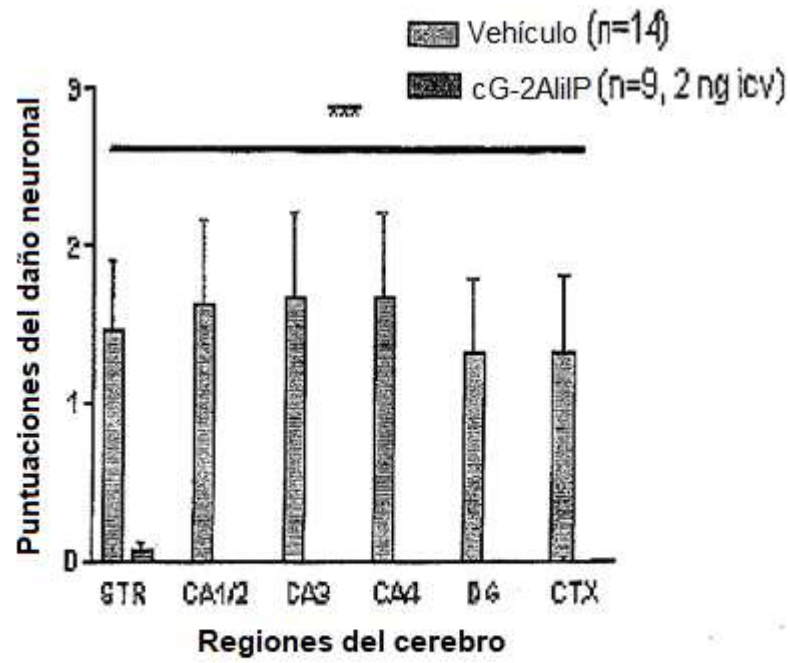
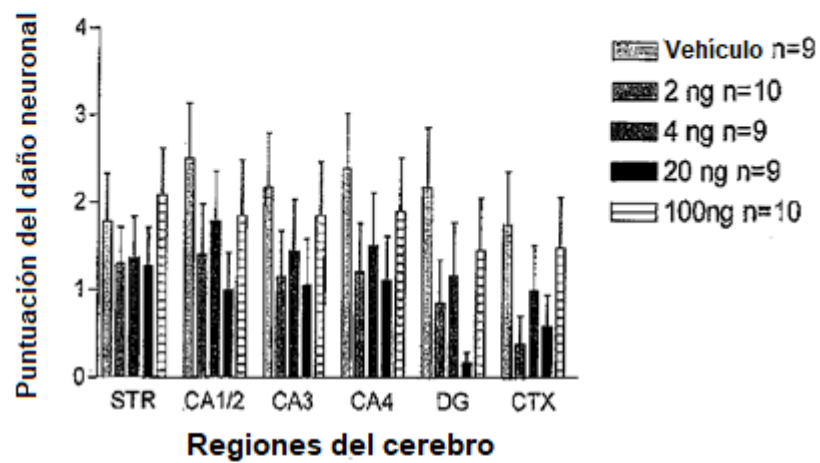


FIG. 14

**Efectos de la cG-2alil-P después  
de la administración icv**



**FIG 15**

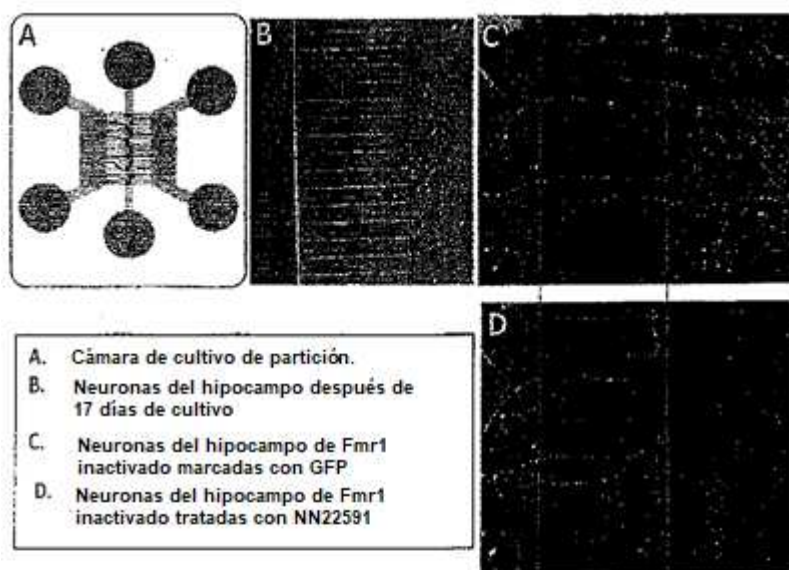


FIG. 16



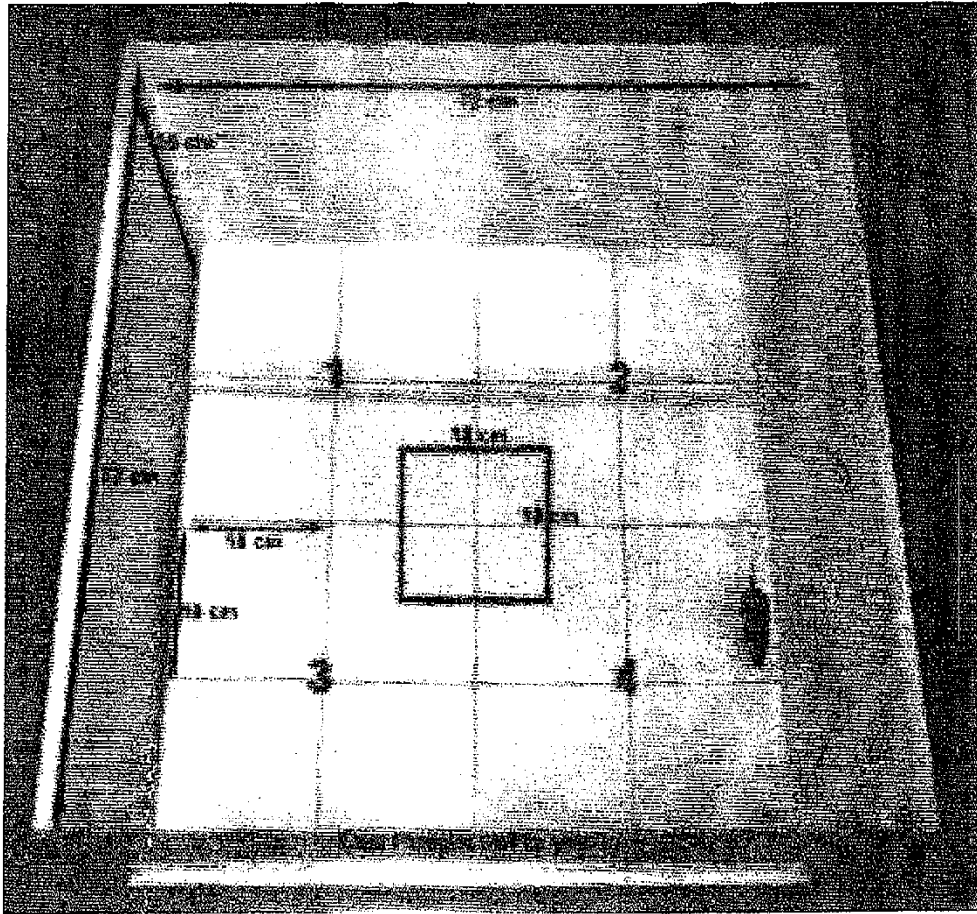


FIG. 17

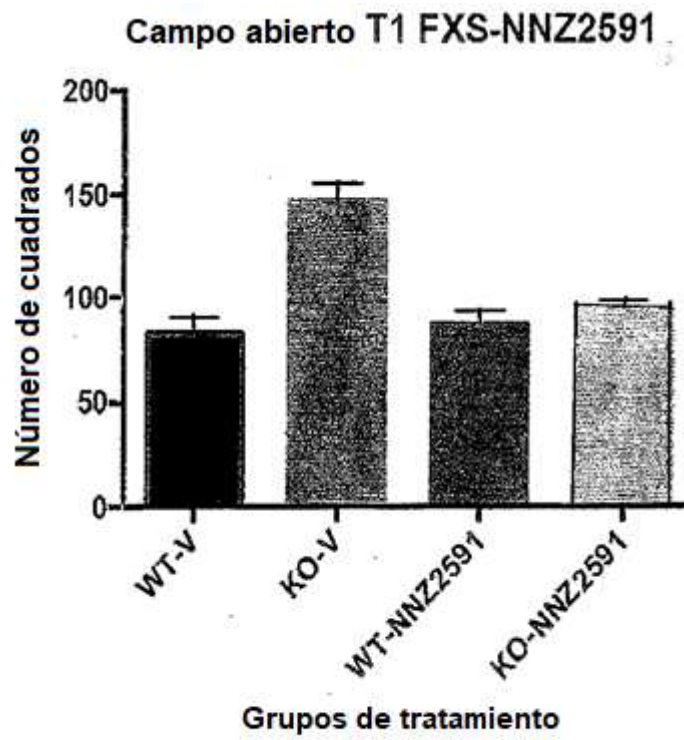
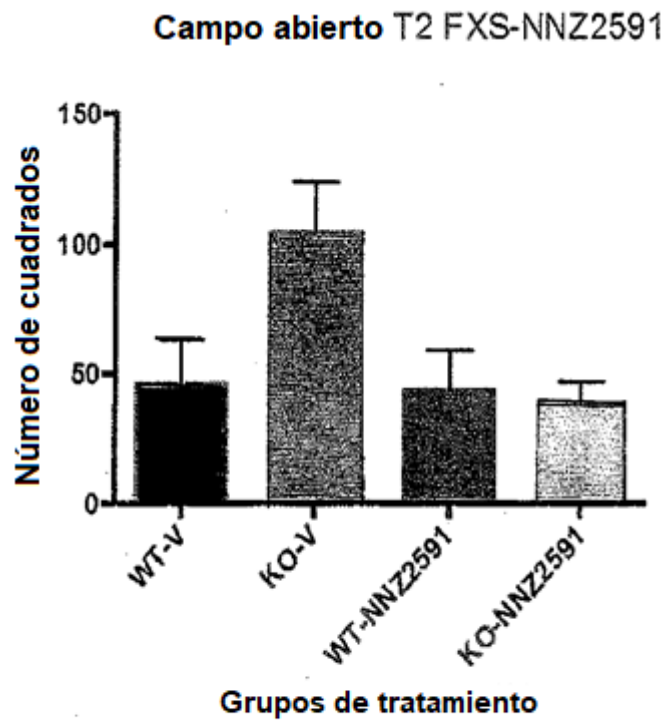


FIG. 18



**FIG. 19**

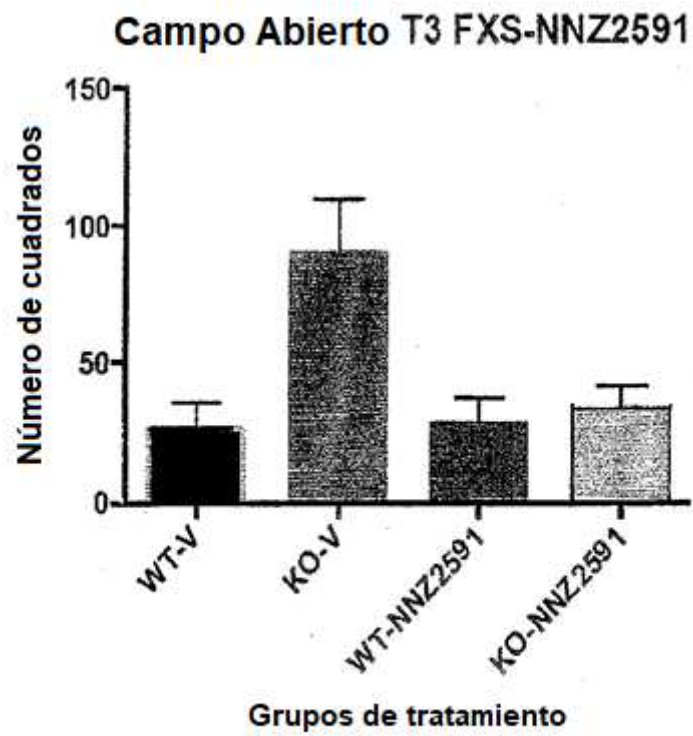


FIG. 20

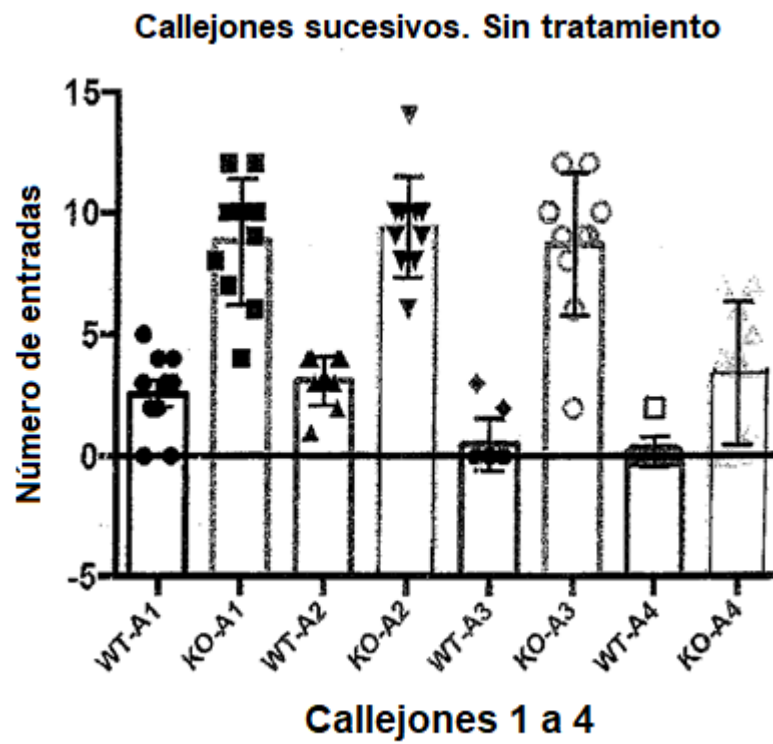


FIG. 21

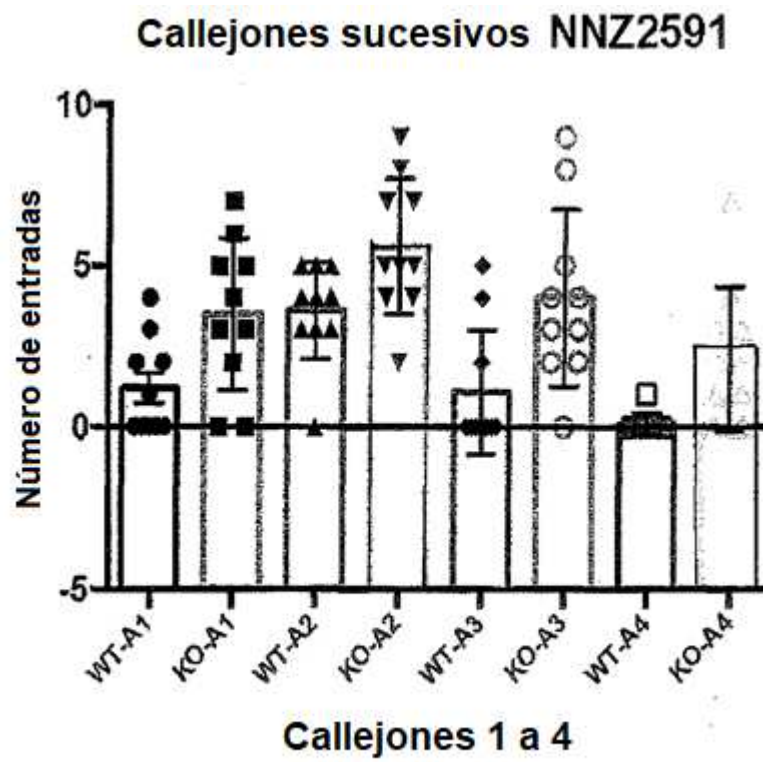
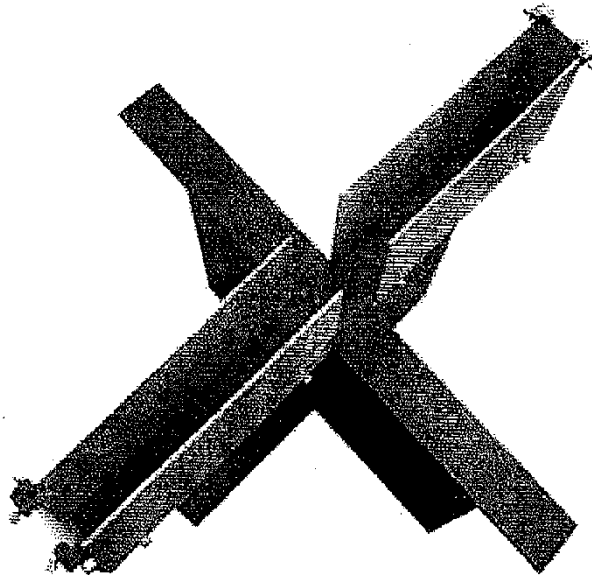


FIG. 22



**FIG. 23**

Laberinto en cruz elevado FXS-NNZ2591

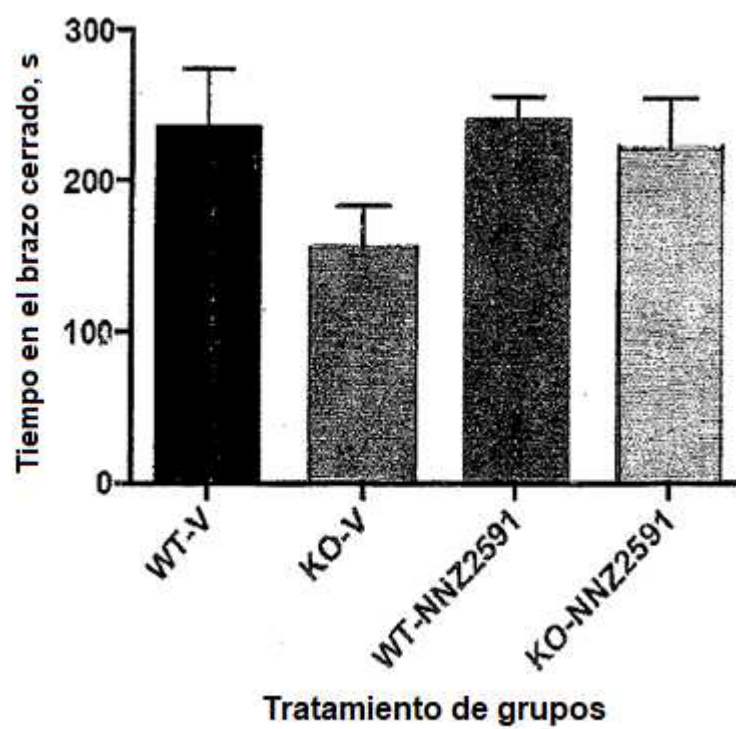


FIG. 24



**Laberinto en cruz elevado FXS-NNZ2591**

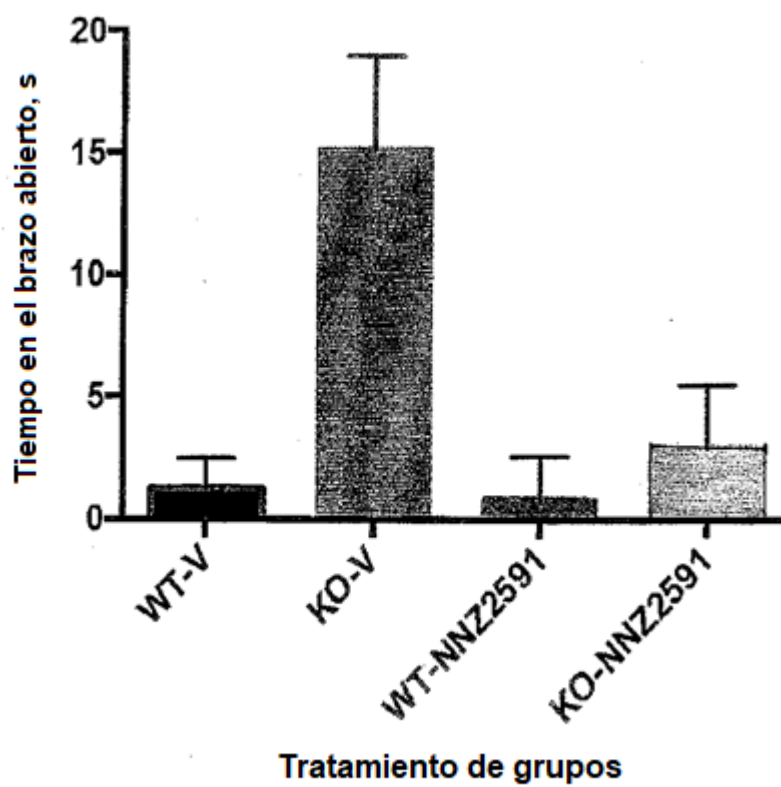


FIG. 25

# Laberinto en cruz elevado FXS-NNZ2591

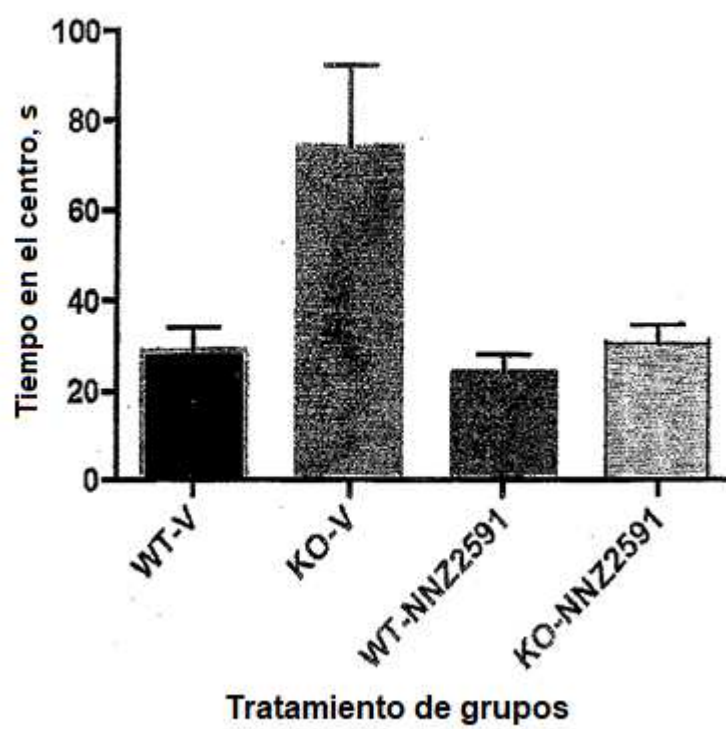


FIG. 26

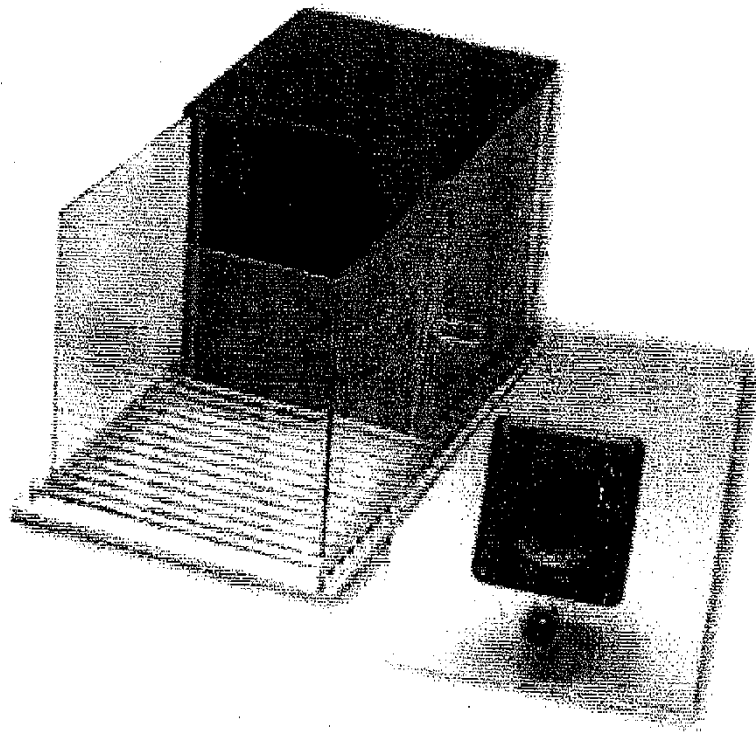


FIG. 27

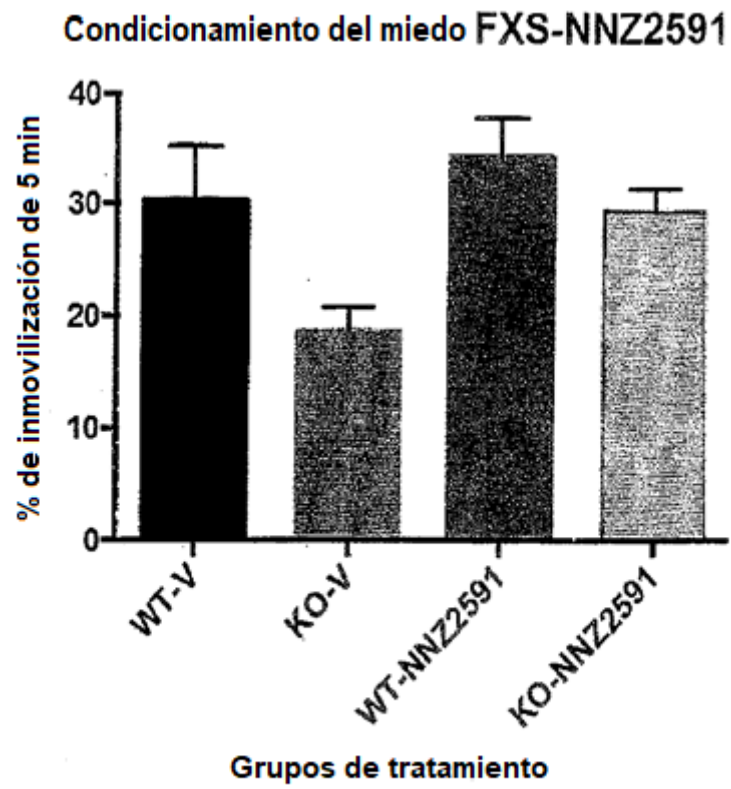
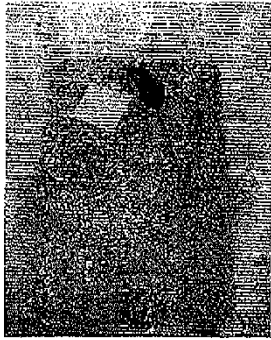
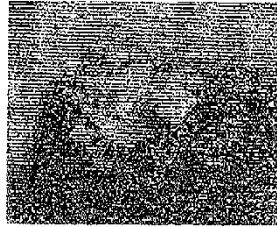


FIG. 28



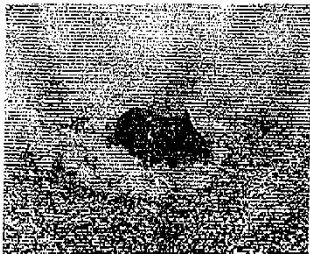
**FIG. 29A**



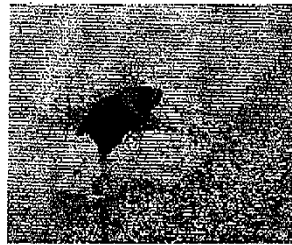
**FIG. 29B**



**FIG. 29C**



**FIG. 29D**



**FIG. 29E**

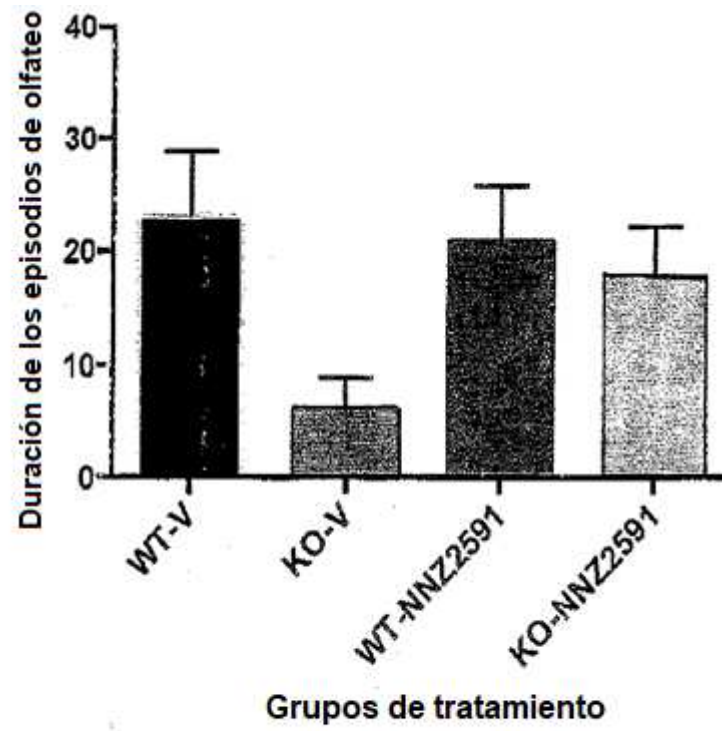


FIG. 30

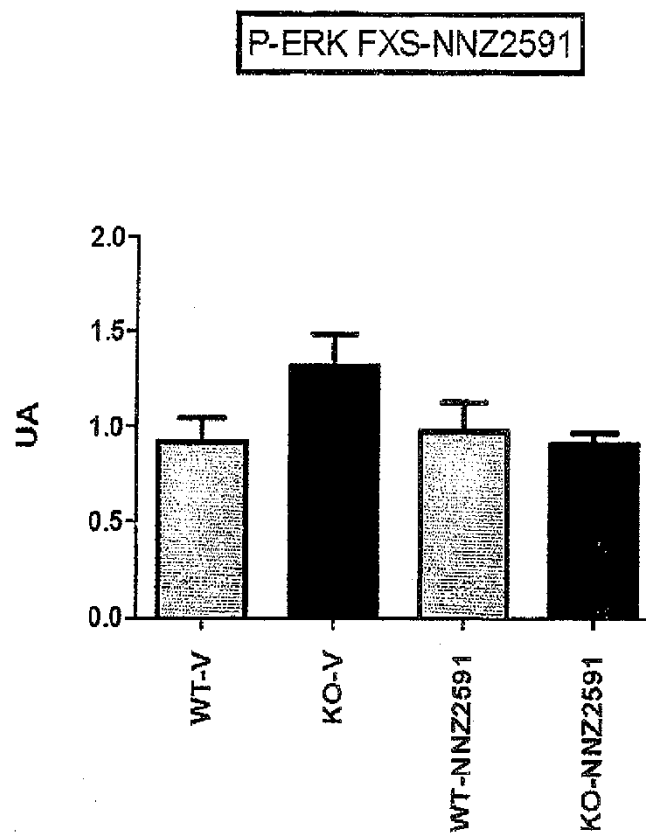


FIG. 31

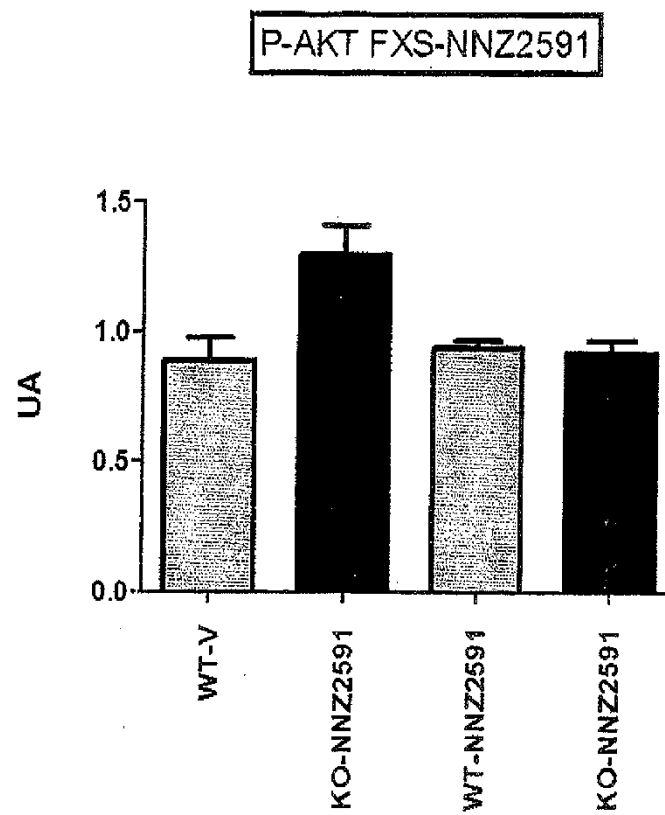


FIG. 32



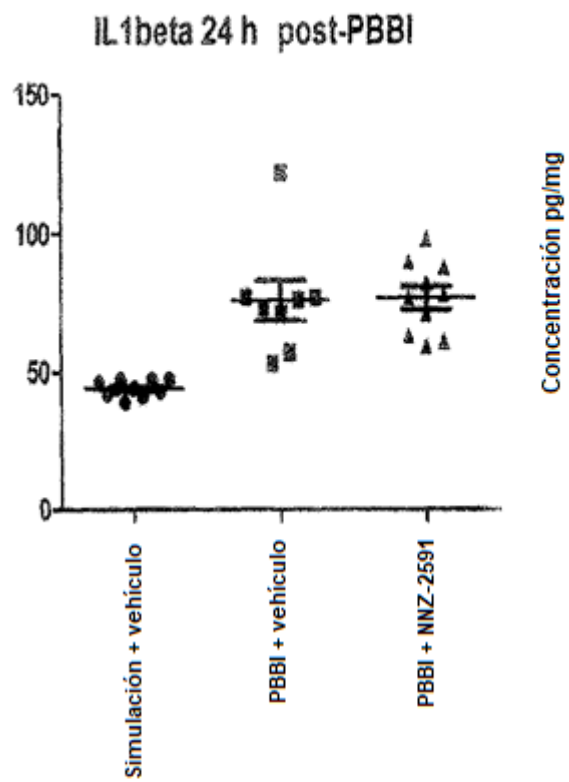


FIG. 33A

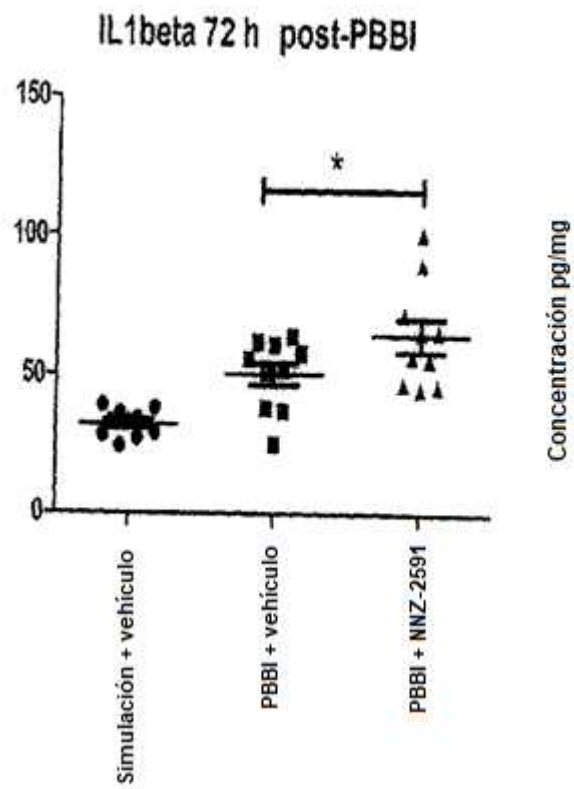


FIG. 33B

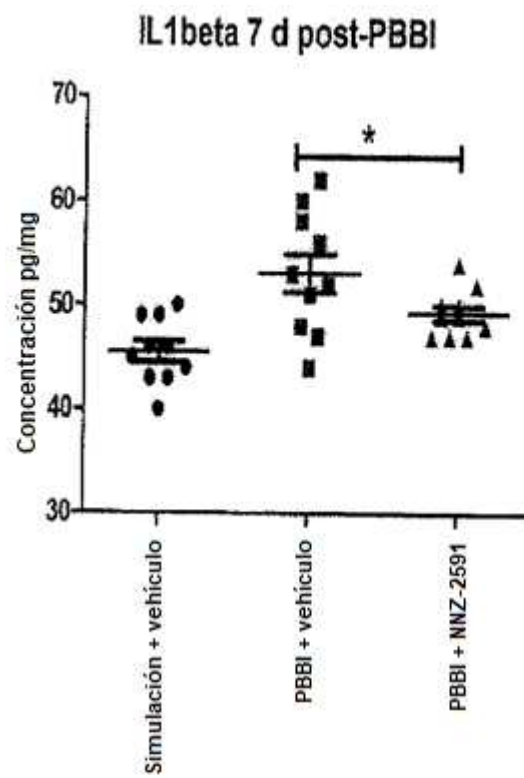


FIG. 33C

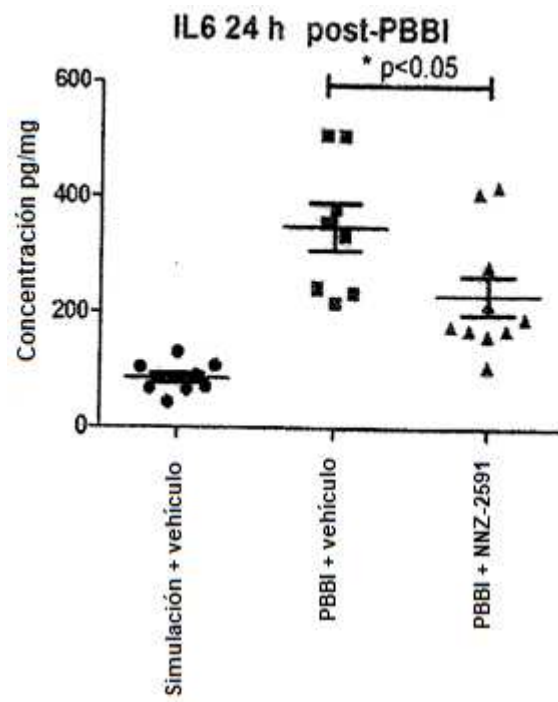


FIG. 33D

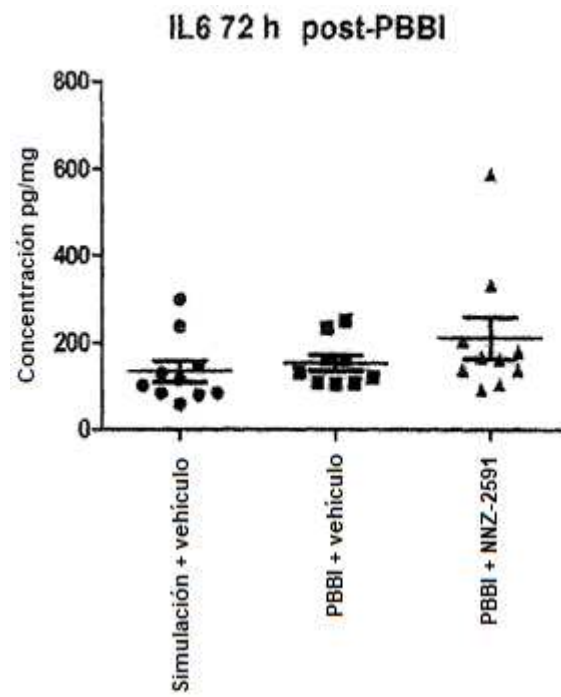


FIG. 33E

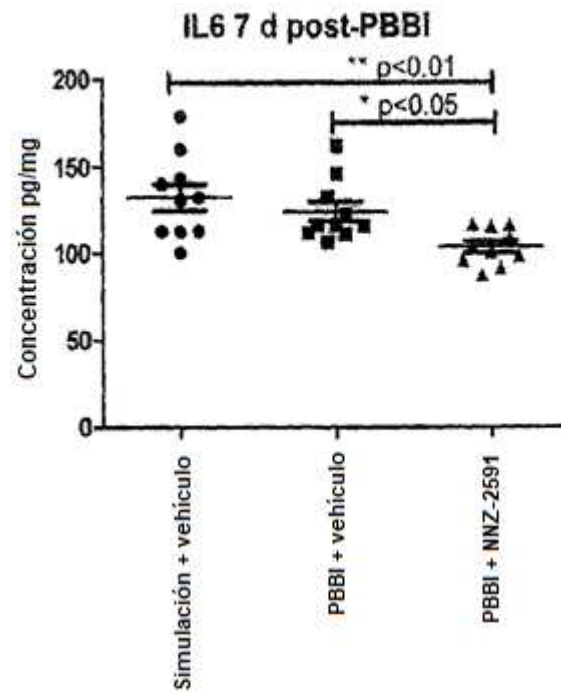
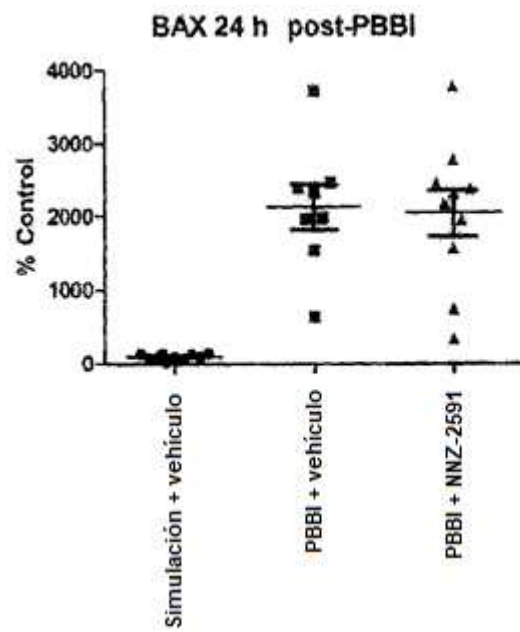
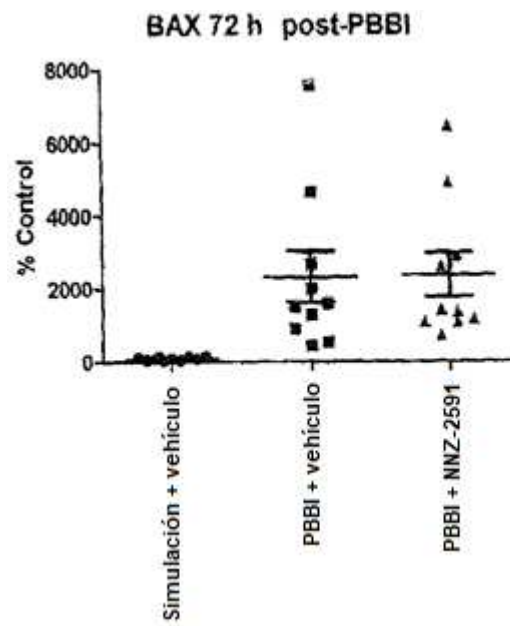


FIG. 33F



**FIG. 34A**



**FIG. 34B**



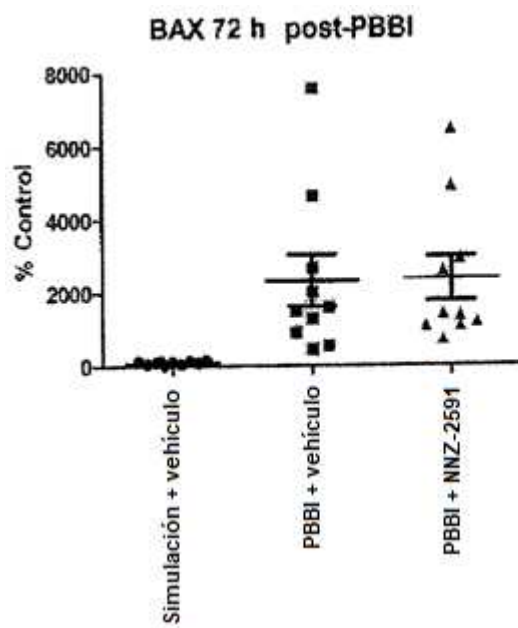
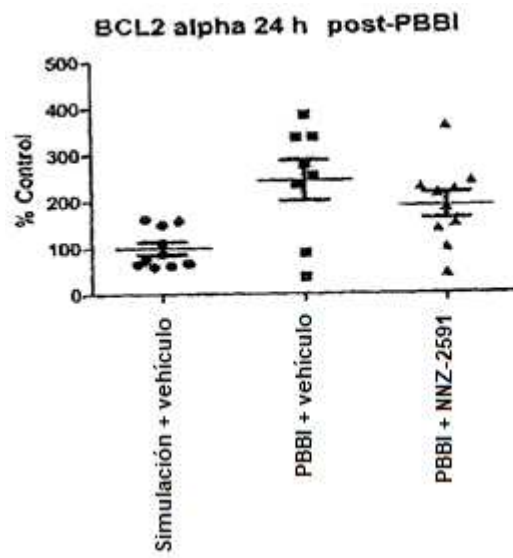
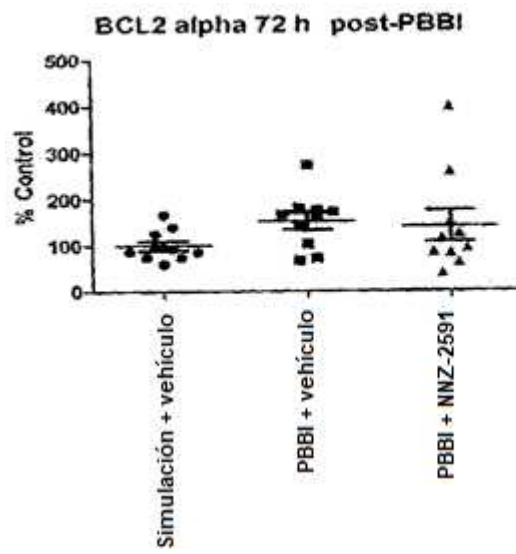


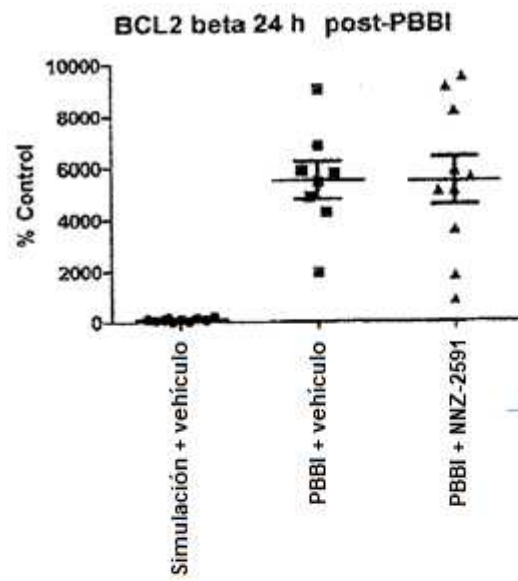
FIG. 34C



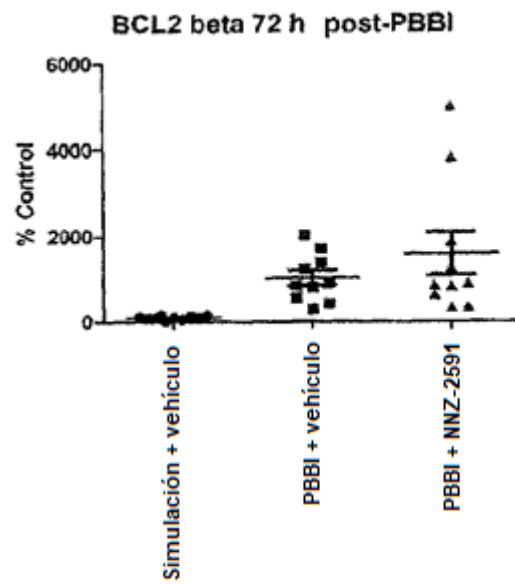
**FIG. 34D**



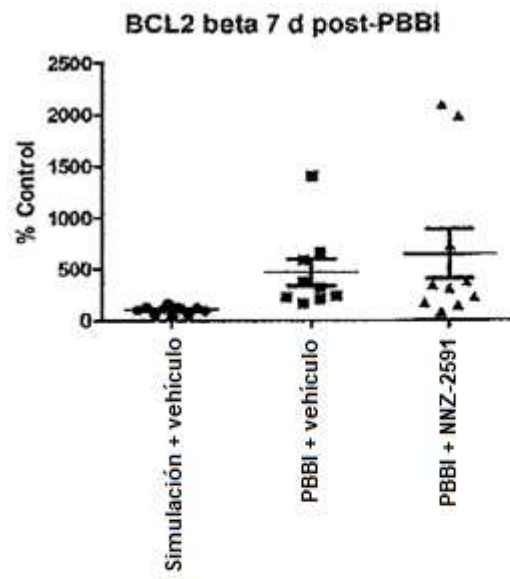
**FIG. 34E**



**FIG. 34F**



**FIG. 34G**



**FIG. 34H**

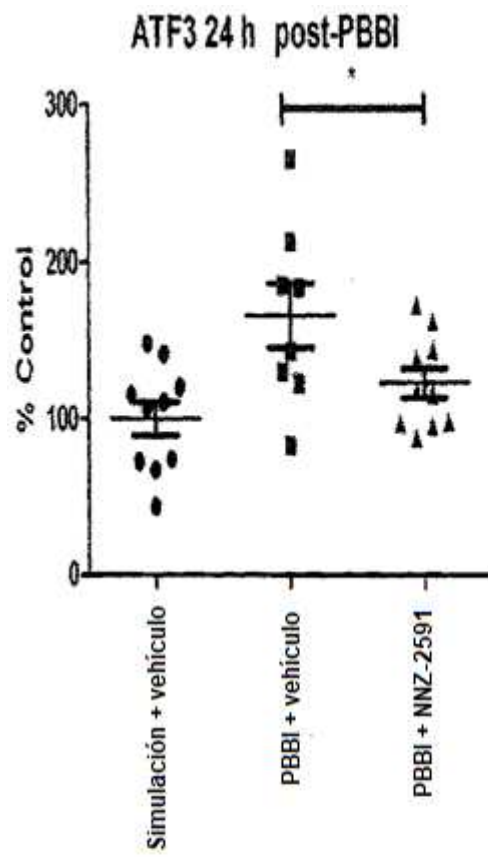


FIG. 35A

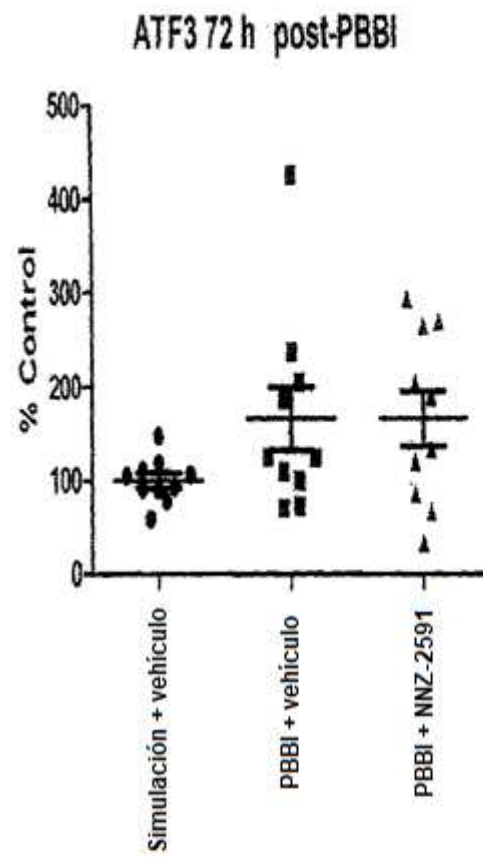
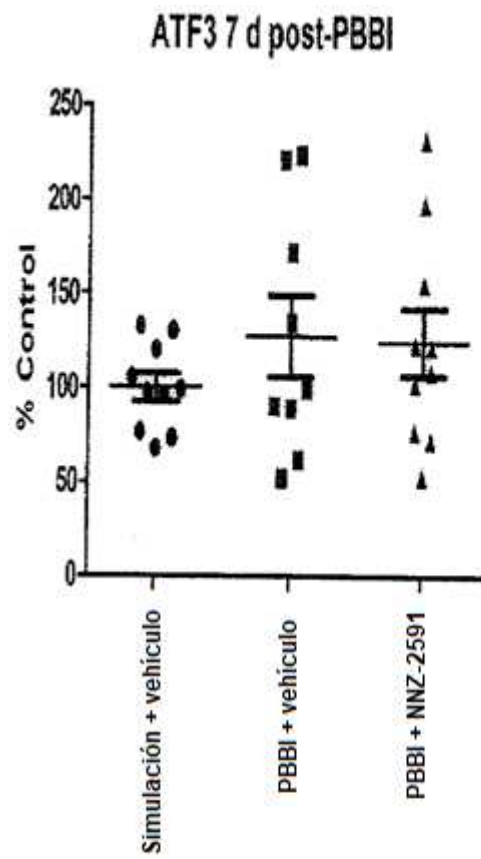
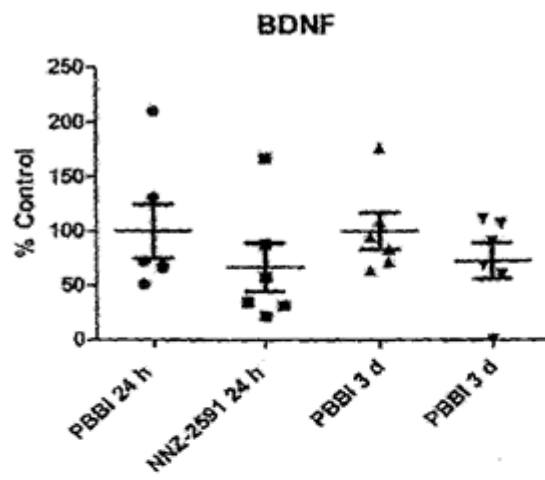


FIG. 35B

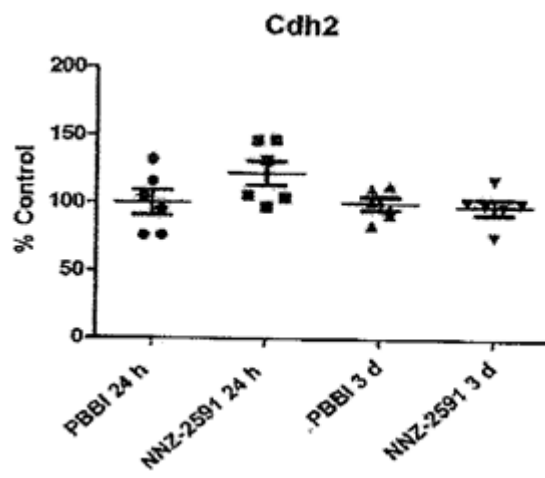




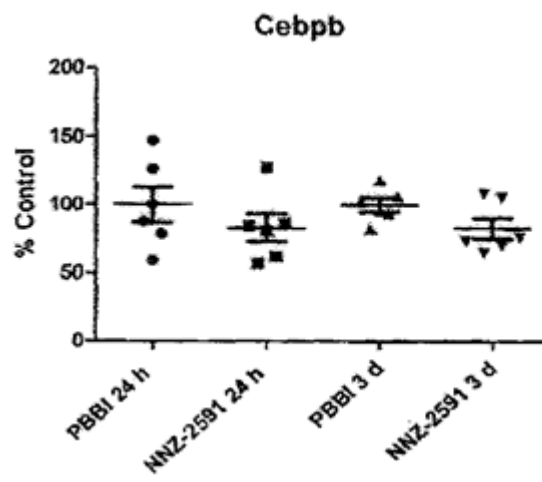
**FIG. 35C**



**FIG. 36A**



**FIG. 36B**



**FIG. 36C**

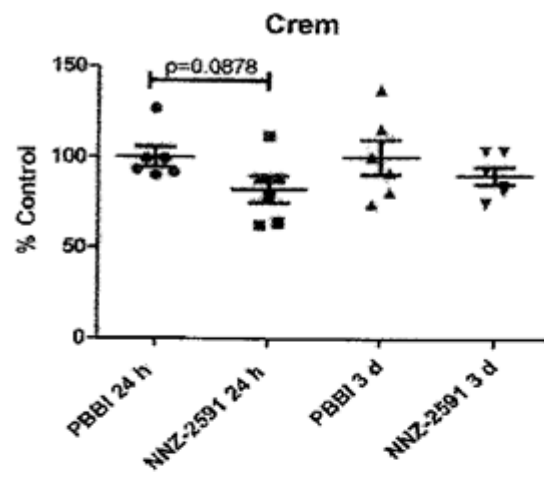
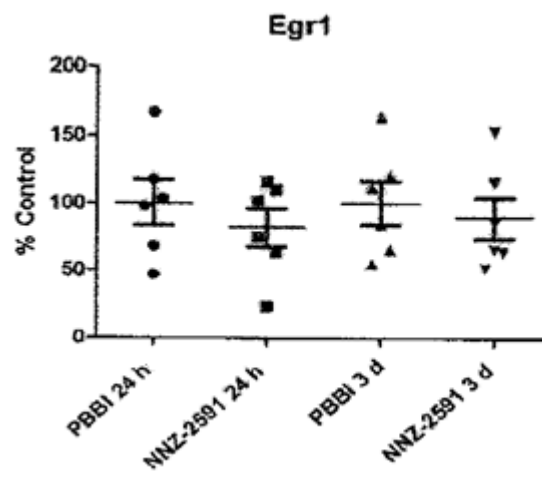
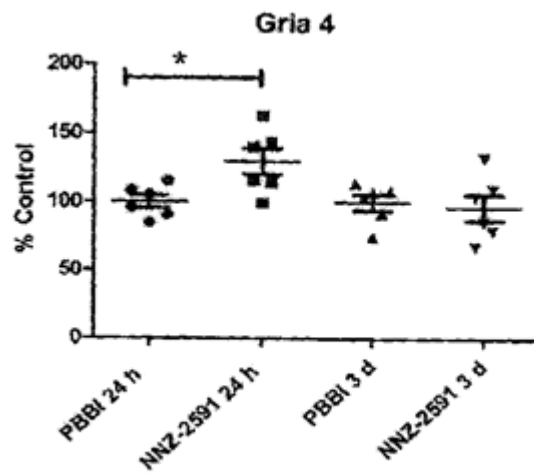


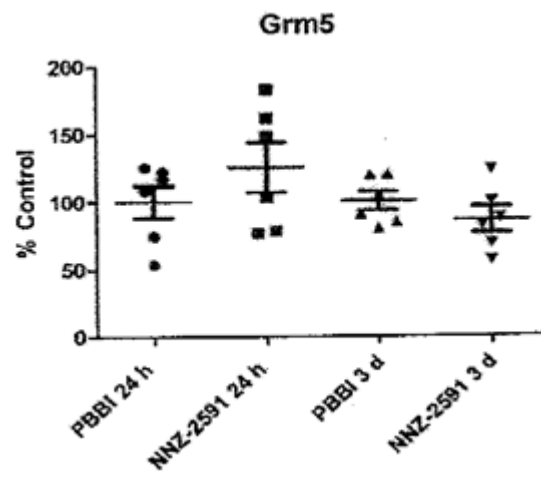
FIG. 36D



**FIG. 36E**

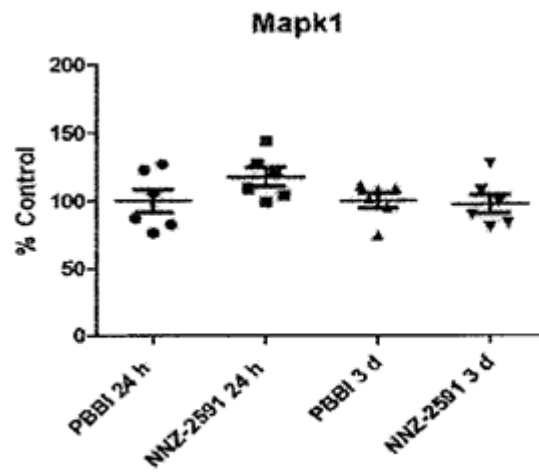


**FIG. 36F**



**FIG. 36G**





**FIG. 36H**

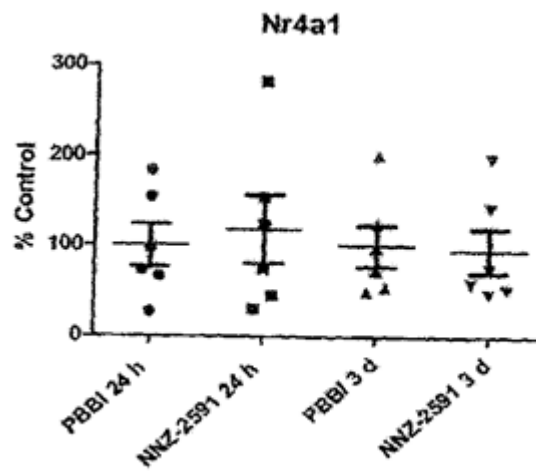
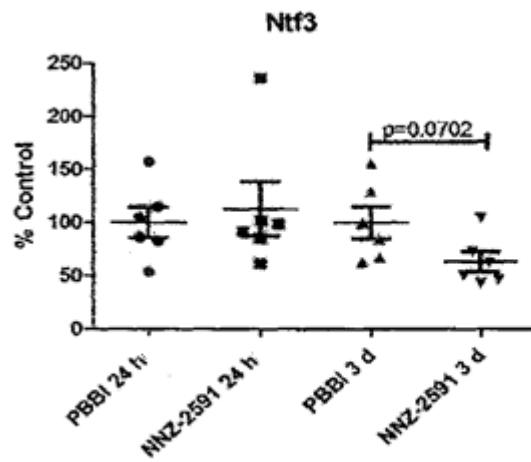
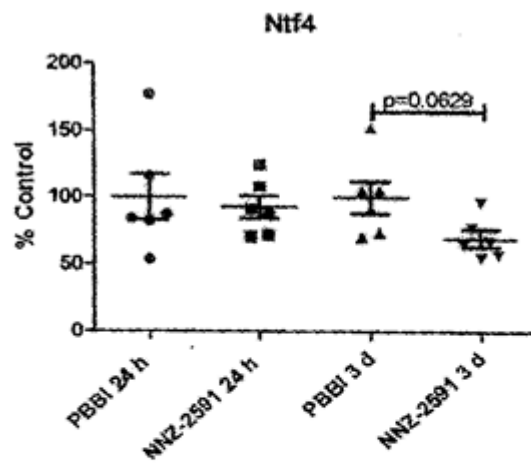


FIG. 36I



**FIG. 36J**



**FIG. 36K**

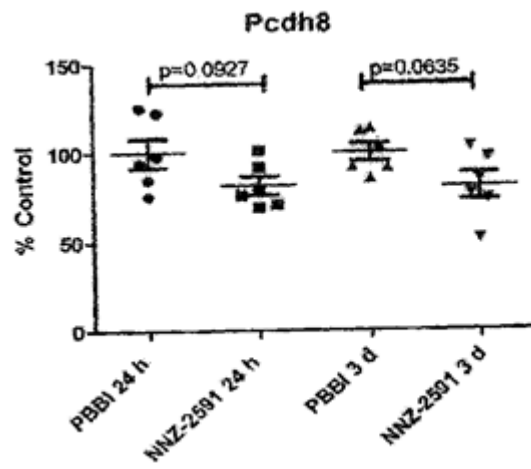
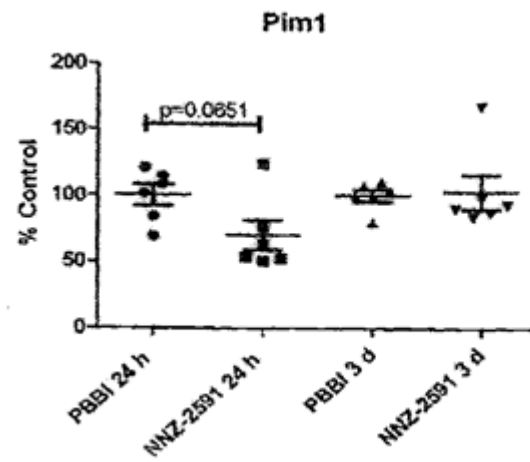


FIG. 36L



**FIG. 36M**

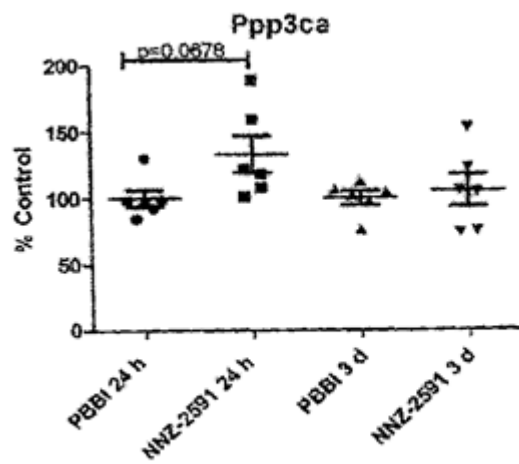
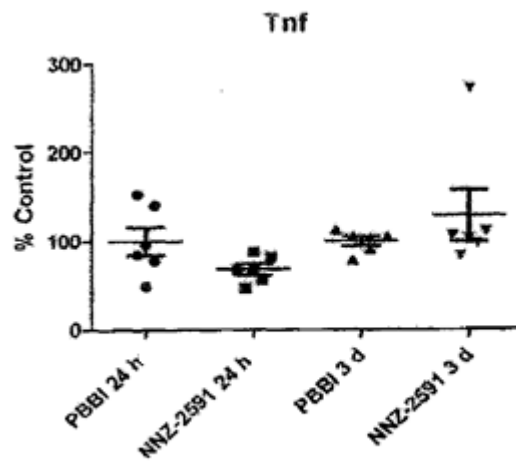


FIG. 36N



**FIG. 360**