

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 944 446**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/548 (2006.01)
C07D 513/18 (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/27 (2006.01)
A61K 31/445 (2006.01)
A61K 31/473 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 31/522 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2016 E 20172824 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2023 EP 3733188**

(54) Título: **Uso de la modulación de H3K9me3 para potenciar la función cognitiva**

(30) Prioridad:

08.06.2015 US 201562172690 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.06.2023

(73) Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street 12th Floor
Oakland, CA 94607-5200, US**

(72) Inventor/es:

**COTMAN, CARL;
OVERMAN, LARRY y
SNIGDHA, SHIKHA**

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 944 446 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

Uso de la modulación de H3K9me3 para potenciar la función cognitiva

- 5 La presente invención fue realizada con la financiación del gobierno con las subvenciones AG012694 y AG000538, otorgadas por el National Institute of Aging de los NIH. El gobierno tiene determinados derechos sobre la invención.

Antecedentes de la invención

10 Campo de la invención

Los modos de realización de la invención se refieren al tratamiento de la disfunción cognitiva en el envejecimiento, trastornos dependientes del factor neurotrófico derivados del cerebro (BDNF) y relacionados con la edad. Más específicamente, la invención se refiere al tratamiento de la disfunción cognitiva mediante la administración de un inhibidor de SUV39H1 denominado ETP69 (*rac-(3S,6S,7S,8aS)-6-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2,3,7-trimetil-1,4-dioxohexahidro-6H-3,8a-epiditiopirrolo[1,2-a]piracina-7-carbonitrilo*) solo o en combinación con otros potenciadores cognitivos.

Descripción de la técnica relacionada

20 Es conocido que la regulación epigenética incorrecta contribuye a varios aspectos de las deficiencias de memoria relacionadas con la edad. En los últimos años, muchos estudios han identificado cambios en los estados de metilación de histonas con el envejecimiento. La metilación de la cola de histona se produce típicamente en residuos de lisina específicos, como H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79 y H4K20, y puede activar o reprimir la transcripción. En particular, la trimetilación de H3K9 (H3K9me3) es una importante marca de histona represiva y está implicada en el silenciamiento de la expresión génica. El establecimiento de H3K9me3 depende de la actividad de la histona metiltransferasa SUV39H1 que regula la trimetilación de H3K9 en la heterocromatina pericéntrica.

30 Si bien se ha sugerido que las variaciones en la metilación de H3K9 son el mecanismo epigenético subyacente para varios cambios relacionados con la edad, como la inflamación vascular sostenida, la diabetes y la memoria metabólica, no se ha explorado previamente el efecto directo del envejecimiento sobre la regulación de la metilación de las lisinas de histonas en el cerebro. Tampoco se han realizado estudios que aborden directamente el efecto de la inhibición de SUV39H1 y la correspondiente regulación por disminución de H3K9me3 sobre la memoria y la función cognitiva. El progreso reciente en el desarrollo de inhibidores de molécula pequeña de metiltransferasas y desmetilasas que regulan la función de las enzimas que contribuyen a la metilación de histonas puede ser un medio eficaz para compensar las deficiencias relacionadas con la edad.

40 Existe una necesidad urgente de identificar terapias y regímenes terapéuticos para la disfunción cognitiva, por ejemplo, deficiencias cognitivas relacionadas con el envejecimiento, trastornos relacionados con la edad y la enfermedad de Alzheimer.

Descripción breve de la invención

45 Uno o más modos de realización de la invención están dirigidos al uso de la modulación de H3K9me3 para potenciar la función cognitiva en el envejecimiento y para el tratamiento de trastornos relacionados con la edad, por ejemplo, demencia y otros defectos relacionados con las funciones cerebrales y neuronales.

50 Algunos estudios recientes han revelado que las histonas metiltransferasas y desmetilasas están implicadas en el envejecimiento y la longevidad. Las metiltransferasas catalizan la metilación de histonas de loci genómicos específicos. Y, sin embargo, nunca se ha explorado cómo contribuye la metilación de histonas al aprendizaje y la memoria en el envejecimiento. La trimetilación de H3K9 (H3K9me3) es una importante marca de histona represiva y está típicamente implicada en el silenciamiento de la expresión génica. Los modos de realización de la presente invención identifican por primera vez un papel esencial de la histona H3K9me3 y su histona metiltransferasa (SUV39H1) en la mediación de las funciones de memoria del hipocampo. La inhibición farmacológica de SUV39H1 mediante el uso de un inhibidor selectivo y novedoso disminuyó los niveles de H3K9me3 en el hipocampo de animales de edad avanzada, y mejoró el desempeño en la tarea de memoria de localización de objetos, la tarea de condicionamiento del miedo y en una tarea compleja de aprendizaje del entorno espacial. La inhibición de SUV39H1 indujo un incremento de la densidad espinal de las espinas delgadas y gruesas pero no de las espinas en forma de hongo en el hipocampo de animales de edad avanzada e incrementó los niveles de receptores AMPA que contienen GluR1 en la superficie de las espinas, un índice clave de la potenciación a largo plazo (LTP).

65 Además, se produjeron cambios en las regiones promotoras del gen BDNF, además de en los niveles globales de proteína BDNF en el hipocampo de los animales tratados con fármacos en comparación con los animales de control. El BDNF es un miembro clave de la familia de las neurotrofinas y está involucrado en una amplia gama de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo trastornos del estado de ánimo, depresión, trastorno bipolar y afecciones neuropsiquiátricas tales como la esquizofrenia, además del envejecimiento. A través de diversos

procesos, tales como la arborización dendrítica, la consolidación sináptica y el fortalecimiento de la transducción de señales por TrkB, el BDNF ayuda a la rigidez plástica de las neuronas, la salud neuronal y la supervivencia en el cerebro. Los datos presentados aquí muestran que la inhibición de SUV39H1 participa en la regulación de BDNF en el cerebro.

Por tanto, el compuesto puede tener utilidad en otros trastornos además de los asociados con deficiencias cognitivas relacionadas con la edad en los que los niveles de BDNF sean inadecuados para mantener el desempeño normal, incluyendo depresión, esquizofrenia, trastornos del estado de ánimo y otros. Juntos, estos datos demuestran que la inhibición de SUV39H1 y la regulación por disminución de H3K9me3 concomitante participan en la transcripción génica en el hipocampo y revierten las deficiencias dependientes de la edad en la memoria del hipocampo, y pueden ser fundamentales para revertir otros trastornos dependientes de BDNF tales como los mencionados anteriormente, pero sin limitarse a los anteriores.

Se usó una tarea de memoria espacial, denominada memoria de localización de objetos (OLM), que es conocido que depende del hipocampo, para evaluar los efectos de la manipulación de H3K9me3 en animales de edad avanzada. Esto se realizó para determinar si el tratamiento con ETP69 afectaba de manera diferencial a la exactitud de desempeño en la tarea de OLM en un paradigma de administración preensayo frente a una administración posensayo. Los paradigmas de administración preensayo frente a una administración posensayo para la tarea OLM permiten someter a prueba dos componentes distintos de la formación de memoria espacial. Específicamente, la administración del fármaco preentrenamiento evalúa la adquisición y recuperación de la memoria, mientras que la administración del fármaco posentrenamiento busca la consolidación de la memoria y el recuerdo. Se encontró que la inyección intraperitoneal ("i.p.") de 10 mg/kg del fármaco, administrada aproximadamente 30 minutos antes de la fase de adquisición (preensayo) o inmediatamente después de la adquisición (posensayo) mejoró el desempeño en la tarea OLM.

Otra prueba del efecto del compuesto sobre el aprendizaje y la memoria utilizó el uso de una tarea conocida como la tarea de aprendizaje sin supervisión (USL). La tarea USL es un paradigma conductual en el que los ratones pueden explorar libremente un entorno de cuatro compartimientos durante un período de tiempo específico. La reducción de la actividad global y la exploración del campo de pruebas durante este tiempo se consideran una medida de aprendizaje y memoria a corto plazo. Si esto se produce a tasas similares en los dos grupos, indica que no hay diferencias significativas en cuanto al aprendizaje a corto plazo y la memoria. Se observó que los animales tratados con ETP69 (10 mg/kg; i.p.) mostraron una disminución significativa de la habituación/exploración (medida por la distancia recorrida) 24 horas después del tratamiento. El ANOVA unidireccional reveló diferencias significativas de grupo ($F_{3,19} = 4,05, p <0,05$) y las pruebas a posteriori confirmaron la diferencia entre el desempeño el Día 1 y el Día 2 en los animales tratados con ETP69 ($p <0,05$) pero no en el grupo de control emparejado por edad.

En otra prueba, usando la prueba de condicionamiento contextual del miedo, el compuesto fue eficaz para mejorar el aprendizaje y la memoria dependientes del hipocampo. Se observó que los animales de edad avanzada ($n = 7$ /grupo) que habían sido tratados con ETP69 mostraron un mejorado desempeño en la tarea en comparación con los controles de edad avanzada ($p <0,01$).

Globalmente, estos datos conductuales sugieren que la administración de ETP69 mejora el aprendizaje y la memoria dependientes del hipocampo en una batería de pruebas. Los datos también sugieren que la administración de ETP69 también puede afectar positivamente a otras tareas que miden la memoria y el desempeño cognitivo.

Dado que la OLM, el condicionamiento del miedo y el USL son tareas específicas del hipocampo, también se sometió a prueba el nivel total de H3K9me3 en el hipocampo después del tratamiento farmacológico en muestras de tejido del hipocampo de animales de edad avanzada. Los resultados mostraron un efecto significativo del tratamiento farmacológico en extractos de histonas obtenidos del hipocampo de animales tratados con fármacos.

El análisis de la prueba de la *t* mostró disminuciones en los niveles de H3K9me3 en animales tratados con ETP69 (preensayo, $p <0,05$).

Los modos de realización de la presente invención proporcionan la primera prueba del papel de H3K9me3 en la potenciación de la memoria y la función cognitiva y muestran que esta marca de metilación de histonas se puede revertir mediante intervención farmacológica. Los estudios también proporcionan pruebas de que la manipulación de la enzima que regula la metilación de histonas permite alterar el estado de cromatina de los sujetos y restaurar la función de la memoria en el cerebro que envejece. Finalmente, este compuesto se puede usar solo o conjuntamente con diversas intervenciones farmacológicas o de estilo de vida para potenciar el desempeño cognitivo. La función cognitiva se puede subdividir y puede incluir subdominios tales como la memoria (incluyendo la memoria funcional y episódica), el aprendizaje, la función ejecutiva, la atención, la velocidad de procesamiento y funciones cognitivas globales como las actividades de la vida diaria, etc. El enfoque que usa una intervención combinada puede potenciar la cognición más allá de cualquier intervención sola. Las siguientes son declaraciones numeradas de divulgación

- 65 1. Un procedimiento para revertir la pérdida cognitiva en un sujeto animal que lo necesite, comprendiendo el procedimiento:

- seleccionar un sujeto animal con pérdida cognitiva; y
- 5 administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto inhibidor de SUV39H1 a dicho sujeto animal,
- en el que dicha cantidad terapéuticamente eficaz comprende una dosis única para tratamiento agudo y dosis repetidas para tratamiento crónico.
- 10 2. Un procedimiento para revertir la pérdida cognitiva en un paciente que lo necesite, comprendiendo el procedimiento:
- seleccionar un paciente con pérdida de la función de memoria; y
- 15 administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto inhibidor de SUV39H1 junto con un potenciador cognitivo farmacéutico, en el que dicha cantidad terapéuticamente eficaz comprende una dosis única para tratamiento agudo y dosis repetidas para tratamiento crónico.
- 20 3. El procedimiento de la declaración 2, en el que el potenciador cognitivo es un inhibidor de colinesterasa.
4. El procedimiento de la declaración 3, en el que el inhibidor de colinesterasa se selecciona de un grupo que comprende tacrina, donepezil, rivastigmina y galantamina.
- 25 5. El procedimiento de la declaración 2, en el que el potenciador cognitivo es un antagonista de NMDA o un agonista de NMDA.
6. El procedimiento de la declaración 2, en el que el potenciador cognitivo es una ampaquina.
- 30 7. El procedimiento de la declaración 2, en el que el potenciador cognitivo es un modulador del complejo entre BZD y el receptor GABA.
8. El procedimiento de la declaración 2, en el que el potenciador cognitivo es un antagonista de serotonina.
- 35 9. El procedimiento de la declaración 2, en el que el potenciador cognitivo es un compuesto de clase nicotínica.
10. El procedimiento de la declaración 2, en el que el potenciador cognitivo es un compuesto de clase muscarínica.
- 40 11. El procedimiento de la declaración 2, en el que el potenciador cognitivo es un inhibidor de PDE.
12. El procedimiento de la declaración 2, en el que el potenciador cognitivo es un compuesto de clase de proteína G.
- 45 13. El procedimiento de la declaración 2, en el que el potenciador cognitivo es un modulador de canal.
14. El procedimiento de la declaración 2, en el que el potenciador cognitivo es un compuesto de clase inmunoterápica.
- 50 15. El procedimiento de la declaración 2, en el que el potenciador cognitivo es un agente reductor antiamiloide o amiloide.
- 55 16. El procedimiento de la declaración 2, en el que el potenciador cognitivo es una estatina o un modulador de PPARS.
17. Un procedimiento para potenciar la cognición en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el procedimiento:
- 60 seleccionar un sujeto que necesite potenciar la memoria; y
- administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto inhibidor de SUV39H1 junto con un potenciador cognitivo del estilo de vida.
- 65 18. El procedimiento de la declaración 17, en el que el potenciador cognitivo es el ejercicio físico.

19. El procedimiento de la declaración 17, en el que el potenciador cognitivo es el ejercicio mental.
20. El procedimiento de la declaración 17, en el que el potenciador cognitivo es un complemento alimenticio.
- 5 21. El procedimiento de la declaración 20, en el que el complemento es un antioxidante.
22. El procedimiento de la declaración 20, en el que el complemento es un potenciador de la función mitocondrial.
- 10 23. El procedimiento de la declaración 20, en el que el complemento es cafeína.
24. El procedimiento de la declaración 20, en el que el complemento es omega-3.
- 15 25. El procedimiento de la declaración 20, en el que el complemento es ácido docosahexaenoico (DHA).
26. Un procedimiento de tratamiento, prevención o alivio de una disfunción cognitiva de un sujeto animal vivo, incluyendo un ser humano, comprendiendo el procedimiento:
- 20 seleccionar un sujeto animal vivo con signos de pérdida cognitiva; y
- administrar a dicho sujeto animal vivo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto inhibidor de SUV39H1.
- 25 27. Un procedimiento de tratamiento y alivio de trastornos relacionados con la ansiedad en un sujeto animal que lo necesite, comprendiendo el procedimiento:
- seleccionar un sujeto animal con un trastorno relacionado con la ansiedad;
- 30 administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto inhibidor de SUV39H1 a dicho sujeto animal,
- en el que dicha cantidad terapéuticamente eficaz comprende una dosis única para tratamiento agudo y dosis repetidas para tratamiento crónico.

35 Breve descripción de las figuras

Los aspectos, rasgos característicos y ventajas anteriores y otros de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción más particular de la misma, presentada junto con los siguientes dibujos en los que:

- 40 la **FIG. 1** ilustra la estructura de ETP69 (*rac*-(3*S*,6*S*,7*S*,8*A**S*)-6-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)-2,3,7-trimetil-1,4-dioxohexahidro-6*H*-3,8*a*-epiditiopirrolo[1,2-*a*]piracina-7-carbonitrilo).
- la **FIG. 2** es una representación gráfica del efecto del fármaco a 10 mg/kg y 20 mg/kg (i.p.) administrado 30 minutos antes de la fase de adquisición en la novedosa tarea de posicionamiento del lugar en ratones.
- 45 la **FIG. 3** es una representación gráfica de los resultados de la prueba OLM que muestra las diferencias en la exploración entre ratones tratados con vehículo o con 10 mg/kg de ETP69.
- las **FIGS. 4A-B** son ilustraciones gráficas del efecto del fármaco a 10 mg/kg (i.p.) administrado 30 minutos antes de la fase de adquisición (prensayo) o inmediatamente después de la adquisición (posensayo) en la novedosa tarea de localización de objetos en ratones de edad avanzada.
- 50 las **FIGS. 5A-B** son ilustraciones gráficas del efecto del fármaco a 10 mg/kg (i.p.) administrado 30 minutos antes de la fase de adquisición (prensayo) o inmediatamente después de la adquisición (posensayo) en la novedosa tarea de localización de objetos en ratones jóvenes.
- 55 la **FIG. 6A** es una representación gráfica del efecto de ETP69 en la tarea de aprendizaje sin supervisión.
- la **FIG. 6B** es una representación gráfica del efecto de ETP69 en la tarea de aprendizaje sin supervisión.
- 60 la **FIG. 7** es una representación gráfica del efecto de ETP69 en la tarea de condicionamiento del miedo.
- la **FIG. 8A** es una ilustración gráfica de los niveles de trimetilación de H3K9 en extractos de hipocampo de ratones jóvenes frente a ratones de edad avanzada.
- 65 la **FIG. 8B** es una ilustración gráfica de los niveles de trimetilación de H3K9 en extractos de cerebelo de

ratones jóvenes frente a ratones de edad avanzada, $n = 3/\text{grupo}$, $p < 0,05$.

la **FIG. 8C** es una representación gráfica de los niveles de trimetilación de H3K9 en ratones de edad avanzada a los que se administraron 10 mg/kg del fármaco (i.p.) o del vehículo, 24 horas después de la administración del fármaco, $n = 7/\text{grupo}$, $*p < 0,05$.

las **FIGS. 9A-C** son ilustraciones gráficas del efecto del tratamiento con ETP69 sobre el recuento de espinas (delgadas, en hongo y gruesas) en la región CA1 del hipocampo $*p < 0,05$, significativamente diferente en comparación con los controles emparejados por edad (prueba de la t para datos independientes de Student). $**p < 0,01$, significativamente diferente en comparación con los controles emparejados por edad (prueba de la t para datos independientes de Student).

la **FIG. 10** presenta imágenes representativas que muestran el efecto del tratamiento con ETP69 sobre las espinas de la región CA1 del hipocampo.

las **FIGS. 11 (A)** Gráfico de densidad representativo que muestra sinaptosomas de tamaño controlado; **(B)** Histograma representativo que muestra un incremento de la subpoblación de sinaptosomas con expresión de PSD-95 después del tratamiento con ETP69; **(C)** Los eventos de expresión de PSD-95 se incrementan después del tratamiento con ETP69 en sinaptosomas obtenidos de ratones de edad avanzada; **(D)** Gráficos de densidad representativos que muestran la expresión de GluR1 y PSD-95 de superficie en sinaptosomas de tamaño controlado; **(E)** Los eventos de expresión tanto de GluR1 como de PSD-95 (cuadrante superior derecho) se incrementan después del tratamiento con ETP69 en sinaptosomas obtenidos de ratones de edad avanzada ($p = 0,05$ vs. ratones control de edad avanzada); **(F)** Gráficos de densidad representativos que muestran pAkt y PSD-95 en sinaptosomas de tamaño controlado. Los eventos de expresión tanto de pAkt como de PSD-95 (cuadrante superior derecho) se incrementan después del tratamiento con ETP69; **(G)** Los eventos de expresión tanto de pAkt como de PSD-95 se incrementan después del tratamiento con ETP69 en sinaptosomas obtenidos de ratones de edad avanzada ($p < 0,05$ vs. ratones de control de edad avanzada).

la **FIG. 12A** es una ilustración gráfica de que los niveles de proteína BDNF en grupos a los que se administraron 10 mg/kg del fármaco (i.p.) ya sea 30 minutos antes o justo después de la fase de adquisición en la tarea OLM se incrementaron en el hipocampo en comparación con los controles. $p < 0,01$, significativamente diferente en comparación con los controles.

la **FIG. 12B** es una representación gráfica que muestra que los niveles de H3K9me3 en el Exón 1 de BDNF fueron significativamente menores en los animales tratados con ETP69 en comparación con los controles ($p = 0,056$). $n = 7$ para los controles y $n = 9$ para los animales tratados con ETP69.

la **FIG. 13** es una ilustración gráfica del efecto de ETP69 sobre la supervivencia neuronal después de la privación de oxígeno y glucosa (OGD).

las **FIGS. 14A-B** son ilustraciones del efecto de ETP69 sobre los niveles de H3K9me3 en neuronas del hipocampo 14 DIV (A, imagen del gel; B, cuantificación, $n = 3$, $*p < 0,05$).

la **FIG. 15A** son imágenes que muestran que el tratamiento con ETP69 (20 nM, 24 horas) incrementó la inmunorreactividad a PSD-95 de neuronas del hipocampo 14 DIV.

la **FIG. 15B** son imágenes que muestran que el tratamiento con ETP69 (20 nM, 24 horas) incrementó la tinción de actina F dendrítica (un marcador de espinas dendríticas).

la **FIG. 16** es una imagen que ilustra que ETP69 incrementó la fosforilación de CREB en Ser133 medida por inmunoelectrotransferencia.

Descripción detallada

Se describirá ahora la presente invención que comprende el uso de la modulación de H3K9me3 para potenciar la función cognitiva. En la siguiente descripción ejemplar se exponen numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión más completa de los modos de realización de la invención. Sin embargo, será evidente para un experto en la técnica que la presente invención se puede practicar sin incorporar todos los aspectos de los detalles específicos descritos en el presente documento. Además, aunque las etapas o procedimientos se exponen en un orden ejemplar para proporcionar una comprensión de uno o más sistemas y procedimientos, el orden ejemplar no pretende ser limitante. Un experto en la técnica reconocerá que las etapas o procedimientos se pueden realizar en un orden diferente, y que una o más etapas o procedimientos se pueden realizar simultáneamente o en múltiples flujos de procedimiento sin apartarse del espíritu o el alcance de la invención. En otros casos, rasgos característicos, cantidades o medidas específicas bien conocidas por los expertos en la técnica no se han descrito en detalle para no complicar la invención. Los lectores deben tener en cuenta que, aunque en el presente documento se exponen ejemplos de la invención, las reivindicaciones y el

alcance completo de cualquier equivalente son los que definen las medidas y los límites de la invención.

Para una mejor comprensión del modo de realización divulgado, sus ventajas operativas y el objetivo especificado alcanzado mediante sus usos, se debe hacer referencia a los dibujos adjuntos y al material descriptivo en el que

5 se ilustran modos de realización divulgados ejemplares. Los modos de realización divulgados no pretenden limitarse a las formas específicas establecidas en el presente documento. Se entiende que se contemplan diversas omisiones y sustituciones de equivalentes según las circunstancias lo sugieran o hagan conveniente, pero estas tienen por objeto cubrir la aplicación o implementación.

10 En el presente documento, el término "primero", "segundo" y similares no denotan ningún orden, cantidad o importancia, sino que se usan para distinguir un elemento de otro, y los términos "un", "uno" y "una" en el presente documento no denotan una limitación de cantidad, sino que denotan la presencia de al menos uno de los elementos referenciados.

15 20 El término "unidad de dosificación", como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido, por ejemplo, un portador o vehículo. Las especificaciones para la dosis unitaria de la presente invención están dictadas por y dependen directamente de (a) las características únicas del material activo y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de combinar dicho material activo para uso terapéutico en animales.

25 El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, significa que la cantidad del compuesto inhibidor de SUV39H1 de la presente invención contenida en la composición administrada es una cantidad suficiente para lograr el propósito pretendido, tal como, en este caso, mejorar las deficiencias cognitivas asociadas con el envejecimiento, la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos dependientes de BDNF. Para el propósito de la presente invención, el tratamiento de defectos cognitivos relacionados con la edad se puede medir mediante reversiones o eliminación de la marca de metilación de histonas. Por ejemplo, al regular eficazmente la función de las enzimas que contribuyen a la metilación de histonas, las deficiencias cognitivas relacionadas con la edad se pueden revertir.

30 35 En consecuencia, al determinar el incremento del recuerdo en un paciente, se puede determinar fácilmente si la cantidad del compuesto de la presente invención es terapéuticamente eficaz. En un modo de realización, la cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto ETP69 de la presente invención puede ser, por ejemplo, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg y otros valores adecuados.

40 45 Uno o más modos de realización de la invención proporcionan compuestos para su uso en procedimientos para mejorar eficazmente las deficiencias cognitivas asociadas con el envejecimiento, la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos dependientes de BDNF usando la inhibición *in vivo* de la histona metiltransferasa SUV39H1 y la consecuente regulación por disminución de la trimetilación de la histona H3K9 (H3K9me3) en el cerebro que envejece. La H3K9me3 es una importante marca de histona represiva y está implicada en el silenciamiento de la expresión génica. El establecimiento de H3K9me3 depende de la actividad de la histona metiltransferasa SUV39H1 que regula la trimetilación de H3K9 en la heterocromatina pericéntrica. Por lo tanto, regular la función de las enzimas que contribuyen a la metilación de histonas puede ser un medio potente para compensar las deficiencias cognitivas relacionadas con la edad. Las deficiencias cognitivas asociadas con el envejecimiento, la regulación incorrecta de BDNF y otros trastornos relacionados con la edad implican deficiencias en el procesamiento de la información sensorial, la atención, la adquisición y consolidación de la memoria, el recuerdo de la información y funciones ejecutivas como la planificación, la resolución de problemas, el control inhibitorio, el autocontrol y otros aspectos de la cognición que se relacionarían con funciones globales, entre otros.

50 55 60 De acuerdo con uno o más modos de realización de la presente invención, se estudia el papel de H3K9me3 en el aprendizaje y la memoria en un modelo animal de envejecimiento usando un análogo recientemente desarrollado del alcaloide de epiditioidicotipericina chatocina A llamado ETP69, ilustrado en la Figura 1. Este compuesto, es decir, ETP69, un inhibidor selectivo de la histona metiltransferasa SUV39H1, muestra una selectividad significativamente mayor frente a un panel de 17 histona metiltransferasas humanas que la chatocina A, el primer inhibidor informado de SUV39H1. Además, ETP69 no presenta actividad inhibitoria hacia la histona acetiltransferasa p300 y la ADN metiltransferasa DNMT1.

65 El hipocampo es de importancia crítica para la memoria de los mamíferos y es conocido que se ve afectado por el envejecimiento del cerebro. Los datos de que el deterioro del hipocampo da como resultado graves deficiencias de memoria espacial son indiscutibles. También se ha sugerido que estos hallazgos podrían significar que la memoria espacial tiene un estado singular con respecto a la función del hipocampo. Por tanto, los estudios para la presente invención utilizaron una tarea de memoria espacial para evaluar los efectos de la manipulación de H3K9me3 en animales de edad avanzada. Además, el estudio emplea una tarea de actividad espontánea, denominada tarea de aprendizaje sin supervisión para ampliar y confirmar estos hallazgos. Esta tarea mide el aprendizaje dependiente del hipocampo, que es conocido que está altamente correlacionado con los cambios sinápticos en el hipocampo y es susceptible a deficiencias relacionadas con la edad. Además, otra prueba que se

ha empleado para medir la eficacia del compuesto es la tarea de condicionamiento del miedo. Esta tarea mide una forma de aprendizaje y memoria en la que un estímulo aversivo (por ejemplo, una descarga eléctrica) se asocia con un contexto neutro particular (por ejemplo, una habitación), dando como resultado la expresión de respuestas de miedo al estímulo o contexto originalmente neutro. También se anticipa que otras de dichas tareas que exploran el aprendizaje y la memoria también se beneficiarían uso del fármaco.

A continuación, para identificar los acontecimientos celulares/moleculares posteriores que provocan las mejoras en la memoria por inhibición de H3K9me3, el estudio evaluó el efecto de ETP69 sobre la formación de espinas en el hipocampo utilizando la tinción de Golgi y la sinaptometría de flujo. De acuerdo con el papel esencial del BDNF en la reestructuración de espinas dependiente de la actividad, los estudios del efecto de ETP69 sobre la trimetilación de H3K9 de exones *bdnf* y los niveles de proteínas en el hipocampo, junto con la activación de Akt (un efecto situado corriente abajo de BDNF) en las sinapsis, los datos revelan un novedoso papel de H3K9me3 en la función de memoria y sugieren un papel específico en la memoria y el aprendizaje dependientes del hipocampo.

15 Materiales y procedimientos

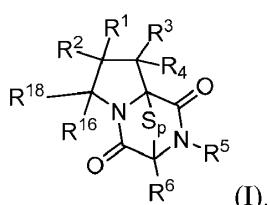
Animales:

20 Ratones macho C57B1/6J de edad avanzada (18-20 meses, $n = 34$) o jóvenes (3-4 meses, $n = 18$) se alojaron en grupos con comida y agua *ad libitum* y se aclimataron al animalario durante una semana antes de los procedimientos experimentales. Las luces se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad 12:12 y todas las pruebas de comportamiento se llevaron a cabo durante la fase de luz del ciclo.

25 Compuesto:

ETP69 (*rac*-(3*S*,6*S*,7*S*,8*aS*)-6-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)-2,3,7-trimetil-1,4-dioxohexahidro-6*H*-3,8*a*-epiditiopirrolo[1,2-*a*]piracina-7-carbonitrilo), un análogo racémico de alcaloides de epiditiocetopiperacina como la chatocina A, se preparó como se describe en Overman LE, Baumann M, S., Nam D, Horne R, Jove LJ, Xie C, Kwolik (2014) "Preparation of Epipolythiodioxopiperazine ETP Derivatives for Treatment of Cancer", PCT Int., Vol. 2014066435, (Int, P., ed), EE. UU. [ahora también publicado en: M. Baumann, A. P. Dieskau, B. M. Loertscher, M. C. Walton, S. Nam, J. Xie, D. Horne y Larry E. Overman "Tricyclic Analogues of Epidithiodioxopiperazine Alkaloids with Promising In Vitro and In Vivo Antitumor Activity," Chemical Science, 2015, 6, DOI: 10.1039/C5SC01536G, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad, y se recristalizó en metanol. Véase también la solicitud de patente PCT n.º PCT/US2013/066252, titulada "ETP Derivatives", de Overman *et al*, que también se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. El compuesto se disolvió en una mezcla de solución salina basada en DMSO al 50 %. Los sujetos de control recibieron solución salina basada en DMSO.

40 Los análogos de ETP69 incluirían compuestos que tienen la fórmula:



45 El símbolo p es 2, 3 o 4. R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^{16} y R^{18} son independientemente hidrógeno, halógeno, $-N_3$, $-CF_3$, $-CCl_3$, $-CBr_3$, $-Cl_3$, $-CN$, $-CHO$, $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$, $-CONH_2$, $-NO_2$, $-SH$, $-SO_2$, $-SO_2Cl$, $-SO_3H$, $-SO_4H$, $-SO_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC(O)NHNH_2$, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido o heteroarilo sustituido o no sustituido.

50 Pruebas:

Memoria de localización de objetos (OLM): Los procedimientos de entrenamiento y prueba se realizaron utilizando un protocolo OLM estándar. En resumen, se manipularon 22 ratones de edad avanzada y 18 ratones jóvenes durante aproximadamente 2-3 minutos al día durante 5 días, seguido de habituación al aparato experimental (campo abierto rectangular blanco que mide $30 \times 23 \times 21,5$ cm) durante 5 min al día durante 5 días consecutivos antes del entrenamiento.

Respuesta a la dosis en OLM: El día de la prueba, los ratones recibieron 3 minutos de habituación (en un campo de prueba vacío), seguida de inyección i.p. de ETP69 (10 mg/kg ($n = 8$) o 20 mg/kg ($n = 7$) o vehículo ($n = 7$). A

continuación, los ratones se sometieron a un ensayo de adquisición de 3 min (con 2 objetos similares colocados en el campo de prueba, uno frente al otro) 30 minutos después de la inyección i.p. del fármaco o del vehículo y todos los animales fueron devueltos a sus jaulas de alojamiento durante un intervalo entre ensayos de 24 horas.

Veinticuatro horas después, se realizó una prueba de retención de 3 minutos, donde se movió un objeto a una localización novedosa y se registró la cantidad de tiempo que los animales pasaron explorando la localización novedosa frente a la localización familiar para evaluar la respuesta a la dosis en la tarea OLM. Dado que los animales que habían recibido 10 mg/kg obtuvieron mejores resultados que otros grupos en la tarea OLM, se utilizaron 10 mg/kg para el resto del estudio. Este paradigma de OLM ha demostrado previamente ser subliminal para el aprendizaje.

Adquisición (preentrenamiento) o Consolidación (posentrenamiento): En otra prueba, dirigida a determinar la eficacia del compuesto en los paradigmas de pre y posentrenamiento, el mismo grupo de 22 animales de edad avanzada se volvió a someter a la prueba de la tarea OLM 3 semanas después de la primera prueba. Para determinar si el fármaco afectaba a los mecanismos de adquisición o consolidación, a los ratones se les inyectaron 10 mg/kg del compuesto (i.p. n = 7) o del vehículo (n = 8). Los animales se sacrificaron inmediatamente después de la prueba de retención (es decir, 24 horas después de la inyección), y los hipocampos se extrajeron, se congelaron rápidamente en hielo seco y se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento para determinar los niveles de trimetilación y el ensayo de BDNF. La figura 2 es una representación gráfica del efecto del fármaco a 10 mg/kg y 20 mg/kg (i.p.) administrado 30 minutos antes de la fase de adquisición en la novedosa tarea de posicionamiento del lugar en ratones. Los datos muestran que los ratones tratados con ETP69 a 10 mg/kg y 20 mg/kg (i.p.) administrados 30 minutos antes de la fase de adquisición en la OLM no mostraron diferencias en cuanto a la exploración de objetos (medida en segundos) en la fase de adquisición. Los datos son media ± EEM; n = 7 u 8/grupo.

También se sometieron a prueba 18 ratones jóvenes en el mismo paradigma OLM como se describe anteriormente. Para determinar si el fármaco afectaba a los mecanismos de adquisición o consolidación, a los ratones jóvenes se les inyectaron 10 mg/kg del compuesto o vehículo (i.p., n = 6/grupo), justo antes o inmediatamente después del ensayo de adquisición, y se sometieron a prueba 24 horas después de la adquisición. La figura 3 es una representación gráfica de los resultados de la prueba OLM que muestra las diferencias en la exploración entre ratones tratados con vehículo o con 10 mg/kg de ETP69. Los datos muestran que, en la fase de retención de la tarea (24 horas después de la administración del fármaco), los ratones tratados con 10 mg/kg de ETP69 (i.p.) exploraron el objeto novedoso significativamente más tiempo (medido en segundos) que el objeto familiar (** p ≤0,01, prueba de la t de Bonferroni). Los ratones tratados con 20 mg/kg de ETP69 se comportaron de manera similar a los controles de edad avanzada. Los datos son media ± EEM; n = 7 u 8/grupo.

Tarea de aprendizaje sin supervisión: Se utilizó un nuevo grupo de 12 animales de edad avanzada para la tarea de aprendizaje sin supervisión. Los procedimientos fueron adaptados a partir del trabajo publicado. El aparato conductual de aprendizaje sin supervisión (USL) consistía en un gran campo abierto dividido mediante paredes en 4 cámaras, todas accesibles por pequeñas entradas en cada pared divisoria. Los animales también podían acceder a un compartimento oscuro cerrado adjunto más pequeño por una entrada abierta. Después de 5 días de manipulación, a los animales se les inyectó ETP69 (10 mg/kg, i.p.) o vehículo y se colocaron en la caja de USL monitorizada por video durante treinta minutos, y a continuación se devolvieron a su jaula de alojamiento. 24 horas después, los animales se colocaron nuevamente en la caja de USL y se sacrificaron inmediatamente después. Se extrajeron sus cerebros rápidamente, el hipocampo se diseccionó rápidamente, se congeló en hielo seco y se almacenó a -80 °C hasta su procesamiento adicional.

Condicionamiento del miedo: Se colocaron 14 ratones macho de edad avanzada (18-20 meses) en la cámara de condicionamiento del miedo y se les permitió explorar durante 2 minutos antes de recibir descargas eléctricas de un pie (2 segundos, 0,2 mA). Los animales fueron devueltos a la jaula de alojamiento 2 minutos después de la descarga eléctrica en el pie. Veinticuatro horas después, se observó el comportamiento en la cámara de condicionamiento durante 5 minutos y posteriormente se analizó el comportamiento de petrificación, que se definió como la ausencia de todo movimiento, excepto la respiración.

Trimetilación de histonas: Se extrajo la histona total del hipocampo congelado de 3 ratones jóvenes y 3 de edad avanzada usando un kit de extracción EpiQuik (OP-0006-100) siguiendo el protocolo del fabricante. En resumen, el tejido se pesó y se cortó en trozos pequeños y se homogeneizó en 1 × tampón de prelisis, se transfirió a un tubo de 2 ml y se centrifugó a 10.000 g durante 1 minuto a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante; se resuspendió el sedimento de tejido en 3 volúmenes de tampón de lisis, se incubó en hielo durante 30 minutos y se centrifugó a 12.000 g durante 5 minutos a 4 °C. Se añadió tampón de equilibrio de ditiotreitol (DTT) (0,3 volúmenes) al sobrenadante, que se almacenó a -80 °C. La concentración de proteína de la histona eluida se determinó usando un kit de detección de proteína Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) usando BSA como estándar. El análisis de trimetilación de histonas (H3K9) se realizó de acuerdo con la información del fabricante (ab115064). En resumen, se capturaron las histonas trimetiladas usando un anticuerpo específico y se detectaron con un anticuerpo de detección marcado, seguido de un reactivo de desarrollo de color. La absorbancia se leyó a 450 nm y los resultados se calcularon usando una curva estándar siguiendo las instrucciones del fabricante.

5 Recuentos de espinas: En otra serie de experimentos, a 10 ratones de edad avanzada (20-22 meses) se les inyectó ETP69 (10 mg/kg; i.p.) o vehículo (i.p.) y, 24 horas después, los animales fueron sacrificados y sus cerebros se separaron en dos hemisferios. El hemisferio derecho se usó para la tinción de Golgi y el izquierdo se procesó para realizar una sinaptometría de flujo. La tinción se llevó a cabo de acuerdo con la información del fabricante (Golgi-Cox, Bioenna).

10 Sinaptometría de flujo: Se obtuvieron fracciones frescas de sinaptosoma P2 de hipocampo de ratón completo utilizando nuestro protocolo arraigado. En resumen, las fracciones se obtuvieron del hipocampo homogeneizando tejido (1:10 p/v) en sacarosa helada 320 mM. Todas las etapas se llevaron a cabo a 4 °C; los tubos de tampón de sacarosa, triturado, mano de mortero y microcentrifuga se enfriaron previamente en hielo. Los hipocampos se disecaron rápidamente de un solo ratón y se homogeneizaron en sacarosa 320 mM (1,5 ml) que contenía HEPES [10 mM] y mezcla de inhibidores de proteasa/fosfatasa, pH 7,4. La homogeneización consistió en 6-8 golpes manuales en una trituradora de vidrio y teflón, espacio libre (entre el émbolo y el vidrio): 0,15-0,25 mm. El émbolo se hizo girar suavemente durante los golpes mientras la trituradora se mantenía en hielo. El homogeneizado se centrifugó a 1200 g durante 10 min. El sobrenadante (S1, que contenía mitocondrias y sinaptosomas) se transfirió a dos tubos limpios de microcentrifuga y se centrifugaron a 12.000 g durante 20 min. Los sobrenadantes (S2) se eliminaron cuidadosamente usando una punta de plástico y vacío. Los sedimentos (P2, correspondientes a la fracción de sinaptosoma bruta) se resuspendieron pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo en 1,5 ml de PBS. La concentración de proteína se determinó usando el ensayo BCA usando seroalbúmina bovina (BSA) como estándar. Antes del inmunomarcaje, todas las muestras se ajustaron a la misma concentración de proteína usando PBS como diluyente. El inmunomarcaje para el análisis por sinaptometría de flujo se realizó de acuerdo con un procedimiento para la tinción de antígenos extracelulares/intracelulares usando 200 ul de fracciones de sinaptosomas (50-100 µg de proteína). Anticuerpos: GluR1 (extracelular) (Millipore, ABN241, DIL = 1:400), p-Akt-ser473 (Cell Signaling, 4060, DIL = 1:400), PSD-95 (Millipore, MAB1598, DIL = 1:400), anti-IgG de conejo Alexa-488 y anti-IgG de ratón Alexa 647 (Life Science, DIL = 1:400). Los datos se adquirieron utilizando un citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciences) equipado con láseres de argón de 488 nm y helio-neón de 635 nm. El tamaño relativo y la granularidad se determinaron mediante las propiedades de dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC). Las señales de FSC, SSC, FL1 y FL4 se recogieron mediante amplificación logarítmica. Los fluorocromos Alexa 488 y Alexa 647 se detectaron por los detectores FL1 y FL4, respectivamente. Las gráficas FSC-SSC se usaron para seleccionar partículas cuyo tamaño coincide con el de los sinaptosomas (0,5-3,0 µm) usando microesferas calibradas (figura 6A). Se utilizaron configuraciones FSC idénticas para adquirir datos sobre muestras y estándares de microesferas. Se excluyeron pequeños fragmentos y residuos estableciendo un umbral FSC-H (325). Se recogieron y analizaron diez mil partículas de tamaño controlado para cada muestra. El análisis se realizó utilizando el software CellQuest Pro (BD Biosciences).

35 ELISA para BDNF

Se realizó ELISA utilizando el sistema de inmunoensayo BDNF Emax (G7610, Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se prepararon dos conjuntos de muestras del hipocampo de cada animal, y todas las reacciones se realizaron por duplicado.

40 La primera serie de experimentos estableció que el BDNF era una diana de ETP69; a continuación, se utilizaron cerebros obtenidos de un segundo conjunto de experimentos (tarea USL) para detectar qué exones de BDNF estaban metilados y qué dianas de BDNF posteriores mostraban cambios después del tratamiento con ETP69.

45 **50 CHIP para regiones promotoras de BDNF:** Después de la reticulación con formaldehído al 1 %, la cromatina se cortó en fragmentos de 200-500 pb. La inmunoprecipitación se realizó durante la noche a 4 °C con un anticuerpo dirigido contra la histona H3K9me3 (H3K9me3; Millipore). Después de los lavados, la elución de las microesferas y la inversión de la reticulación, el ADN inmunoprecipitado se purificó y analizó por triplicado mediante qRT-PCR con una curva estándar interna preparada a partir de muestras de entrada agrupadas. Cada muestra se normalizó con el valor de entrada respectivo. Los cebadores para los promotores de *bdnf* para el exón I, IV y VI corresponden a cada secuencia de exón única. Los conjuntos de cebadores de RT-qPCR se diseñaron utilizando el Universal Probe Library Assay Design Center de Roche y se obtuvieron de Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). Las reacciones de RT-qPCR se realizaron en un termociclador Stratagene MX3005P a 95 °C durante 3 min, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 10 s y 58 °C durante 15 s. Cada ejecución de RT-qPCR incluyó la ejecución de todas las muestras por triplicado y una curva estándar. Los datos se analizaron mediante el procedimiento $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y se expresaron como un factor de cambio con respecto al control después de normalizar con muestras de entrada, como se describió previamente.

60 Análisis estadístico

65 Las pruebas de Mann-Whitney se usaron como prueba de la *t* no paramétrica para datos emparejados e independientes, respectivamente, y la prueba de Student se usó para datos paramétricos. Los ANOVA unidireccionales fueron seguidos por la prueba de Tukey *post hoc* para realizar comparaciones medias de tres o más grupos; mientras que los ANOVA bidireccionales fueron seguidos por la prueba de Bonferroni *post hoc*. Todas las pruebas estadísticas y el ajuste no lineal para la figura 6B se realizaron usando GraphPad Prism 6. Los datos

se presentan como media ± EEM. El valor de $p < 0,05$ se consideró significativo.

Resultados

5 ETP69 en la tarea de memoria de localización de objeto (OLM)

Se llevó a cabo un estudio de dosis-respuesta de los efectos agudos de ETP69 administrado por vía intraperitoneal en la tarea espacial OLM. El intervalo de dosis incluyó cantidades conocidas por ser bien toleradas por los ratones. Nuestros resultados demostraron que 10 mg/kg, pero no 20 mg/kg, indujeron mejoras de memoria en la tarea OLM en ratones de edad avanzada. Esto se confirmó utilizando un ANOVA bidireccional (efecto de interacción, $(F(2,19) = 10,25, p < 0,01, n = 7-8/\text{grupo})$), con pruebas *post hoc* que muestran que el grupo que recibió 10 mg/kg del fármaco tuvo un desempeño significativamente mejor en comparación con los controles ($p < 0,05$, prueba de la *t de Bonferroni*). Esto también se refleja en el análisis del ensayo de adquisición. La fase de adquisición de la prueba no mostró un efecto de interacción significativo ($F(2,19) = 0,139, p = \text{NS}, n = 7-8/\text{grupo}$) ni el efecto principal de localización de objetos ($F(1,19) = 0,19, p = \text{NS}$). Sin embargo, el tratamiento tuvo un efecto significativo ($F(2,19) = 3,18, p < 0,05$) en los animales que recibieron una dosis más alta del fármaco (20 mg/kg), mostrando una disminución en el tiempo total de exploración ($p < 0,05$, prueba de la *t de Bonferroni*). Esto sugiere que dosis más altas de H3K9me3 pueden perjudicar la exploración general y posiblemente perjudicar la actividad locomotora en animales de edad avanzada, de modo que las dosis óptimas se deben identificar cuidadosamente

20 A continuación, los estudios buscaron determinar si el tratamiento con ETP69 afectaba de manera diferencial a la exactitud de desempeño en la tarea de OLM en un paradigma de administración preensayo frente a una administración posensayo. Los paradigmas de administración previa al ensayo frente a una administración posterior al ensayo para la tarea OLM permiten someter a prueba dos componentes distintos de la formación de memoria. Específicamente, la administración del fármaco preentrenamiento evalúa la adquisición y recuperación de la memoria, mientras que la administración del fármaco posentrenamiento busca la consolidación de la memoria y el recuerdo. Por tanto, el fármaco se administró 30 minutos antes o bien inmediatamente después de la fase de adquisición de la prueba OLM. Se encontró que 10 mg/kg (i.p.) del fármaco, administrados 30 minutos antes de la fase de adquisición (preensayo, $n = 6/\text{grupo}$) o bien inmediatamente después de la adquisición (posensayo, $n = 8/\text{grupo}$) mejoró el desempeño en la tarea OLM (efecto de interacción ($F(2,19) = 9,81, p < 0,01$, figura 4B)). Las pruebas *post hoc* adicionales mostraron un efecto significativo tanto en el grupo preensayo como en el posensayo ($p < 0,001$, prueba de la *t de Bonferroni*). La fase de adquisición de la prueba no mostró diferencias significativas entre los grupos (interacción $F(2,19) = 0,26$, efecto principal del fármaco $F_{2,19} = 0,01$, efecto principal de la localización de objetos $F(1,19) = 0,01, p = \text{NS}$, figura 4A).

35 Las figuras 4A-B son ilustraciones gráficas del efecto del fármaco a 10 mg/kg (i.p.) administrado 30 minutos antes de la fase de adquisición (preensayo) o inmediatamente después de la adquisición (posensayo) en la novedosa tarea de localización de objetos en ratones de edad avanzada. No hay diferencia en la exploración de objetos en la fase de adquisición (A). En la fase de retención de la tarea (24 h ± 30 minutos, después de la administración del fármaco), los animales tratados con el fármaco exploraron el objeto novedoso significativamente más tiempo que el objeto familiar (B) $p < 0,001$, diferencia significativa en el tiempo dedicado a explorar el objeto novedoso frente al objeto familiar.

45 Para someter a prueba la hipótesis de que la inhibición de H3K9me3 afecta positivamente a la memoria en ratones jóvenes y de edad avanzada, la prueba conductual se extendió a ratones jóvenes. A diferencia de los animales de edad avanzada, la administración de ETP69 no mejoró el rendimiento de OLM en ratones jóvenes. La administración de 10 mg/kg (i.p.) del fármaco, 30 minutos antes de la fase de adquisición (preensayo) o inmediatamente después de la adquisición (posensayo), no mostró diferencias estadísticas en comparación con los controles jóvenes (efecto de interacción ($F(2,15) = 0,32, p = \text{NS}$), efecto principal del fármaco $F_{2,15} = 2,21$, efecto principal de localización de objetos $F(2,15) = 6,02, p < 0,05$, figura 5B, $n = 6/\text{grupo}$). La fase de adquisición de la prueba tampoco mostró diferencias significativas entre los grupos (interacción $F(2,15) = 0,44$, efecto principal del fármaco $F(2,15) = 25,01, p < 0,01, n = 6/\text{grupo}$) ni diferencias entre la exploración de la POSICIÓN 1 frente a la POSICIÓN 2 (medida por la prueba de la *t de Bonferroni*, $p = \text{NS}$, efecto principal de localización de objetos $F(2,15) = 1,56$, figura 5A). Esto sugiere que la manipulación de H3K9me3 puede tener efectos bastante diferentes en el cerebro joven frente al de edad avanzada.

55 Las figuras 5A-B son ilustraciones gráficas del efecto del fármaco a 10 mg/kg (i.p.) administrado 30 minutos antes de la fase de adquisición (preensayo) o inmediatamente después de la adquisición (posensayo) en la novedosa tarea de localización de objetos en ratones jóvenes. No hay diferencia en la exploración de objetos en la fase de adquisición (A) o la fase de retención (B) de la tarea (24 h ± 30 minutos, después de la administración del fármaco).

ETP69 en la tarea de aprendizaje sin supervisión (USL)

65 Para evaluar si H3K9me3 está implicada en las medidas de aprendizaje espacial y para evaluar los criterios de valoración moleculares, se llevó a cabo una segunda serie de experimentos con la tarea USL como el criterio de valoración conductual. La tarea USL es un paradigma conductual sencillo en el que los ratones pueden explorar

libremente un entorno de cuatro compartimentos durante un período de tiempo específico. La reducción de la actividad global y la exploración del campo de pruebas durante este tiempo se consideran una medida de aprendizaje y memoria a corto plazo. Si esto se produce a tasas similares en los dos grupos, indica que no hay diferencias significativas en cuanto al aprendizaje a corto plazo y la memoria. El patrón locomotor de los ratones refleja la habituación y el aprendizaje que muestran, y está altamente correlacionado con los cambios sinápticos en el hipocampo.

La figura 6A es una representación gráfica del efecto de ETP69 en la tarea de aprendizaje sin supervisión. Mientras que los ratones de edad avanzada continúan explorando el campo de prueba en ambos días, los ratones de edad avanzada tratados con ETP69 (10 mg/kg, i.p.) mostraron una disminución significativa en la habituación/exploración (medida por la distancia recorrida) en el Día 2 en comparación con el Día 1. Los ratones de control de edad avanzada pasaron el mismo tiempo explorando el campo de prueba tanto el Día 1 como el Día 2. La habituación se midió durante 30 minutos y los datos se muestran en tramos de 5 minutos. * $p < 0,05$, diferencia significativa entre habituación/exploración el Día 1 y el Día 2 en los puntos de tiempo especificados (prueba de la t de Tukey). $n = 5$ o 6/grupo.

La figura 6B es una representación gráfica del efecto de ETP69 en la tarea de aprendizaje sin supervisión. El gráfico muestra la distancia total recorrida durante 30 minutos el Día 1 y el Día 2 después de la administración de ETP69 (10 mg/kg, i.p.) o de vehículo. * $p < 0,05$, disminución significativa de la distancia total recorrida en 30 minutos entre el Día 1 y el Día 2 (prueba de la t de Tukey). Los datos son media ± EEM; $n = 5$ u 6/grupo.

Durante esta prueba, se colocaron ratones cuidadosamente manipulados en la caja de prueba de cuatro compartimentos y se monitorizaron sus movimientos durante 30 min el Día 1 y nuevamente 24 horas más tarde el Día 2. Se determinó que los animales tratados con ETP69 (10 mg/kg; i.p.) mostraron una disminución significativa en la habituación/exploración (medida por la distancia recorrida) 24 horas después del tratamiento, pero no en los primeros 30 minutos del Día 1 (figura 6A). El ANOVA unidireccional reveló diferencias significativas de grupo ($F_{3,19} = 4,05$, $p < 0,05$) y las pruebas a posteriori confirmaron la diferencia entre el desempeño el Día 1 y el Día 2 en los animales tratados con ETP69 ($p < 0,05$) pero no en el grupo de control emparejado por edad (figura 6B, $n = 5$ /grupo). 30 minutos de exploración el Día 1 son suficientes para inducir una cierta memoria a largo plazo del campo de prueba en los ratones y se puede medir el Día 2 de la prueba. Se observó una diferencia en los niveles de actividad el Día 2, que se interpreta como una mejor retención y recuerdo en los animales tratados con ETP69, incluso cuando el aprendizaje sigue siendo el mismo entre los grupos.

ETP69 en la tarea de condicionamiento del miedo

En otra prueba, usando la prueba de condicionamiento contextual del miedo, el compuesto fue eficaz para mejorar el aprendizaje y la memoria dependientes del hipocampo. Se observó que los animales de edad avanzada ($n = 7$ /grupo) que habían sido tratados con ETP69 mostraron un mejorado desempeño en la tarea en comparación con los controles de edad avanzada ($p \leq 0,01$). El condicionamiento del miedo se ha estudiado en numerosas especies y a menudo se mide por petrificación (un período de inmovilidad vigilante). Varios estudios han mostrado que el miedo condicionado coincide sustancialmente con los mecanismos de los trastornos de ansiedad clínica. La investigación sobre la adquisición, consolidación y extinción del miedo condicionado sugiere que esto puede ser un medio para el tratamiento de una variedad de afecciones patológicas como la disociación, el trastorno de crisis de angustia, las fobias e incluso el trastorno de estrés postraumático, además del aprendizaje y la memoria. Además, es conocido que la proyección de la corteza prefrontal ventral medial (mPFC) a la amígdala basomedial (BMA) implementa el control descendente del estado de ansiedad y la petrificación aprendida, tanto a nivel basal como en la ansiedad inducida por estrés, definiendo una nueva vía de regulación conductual descendente ampliamente relevante que es relevante para todas las condiciones mencionadas anteriormente.

Para confirmar los hallazgos de las tareas OLM y USL, se utilizó el condicionamiento contextual del miedo para someter a prueba el efecto de la regulación por disminución de H3K9me3 en el aprendizaje y la memoria dependientes del hipocampo. El condicionamiento del miedo también indica si la amígdala y las funciones relacionadas también están reguladas. Se observó que los animales de edad avanzada ($n = 7$ /grupo) que habían sido tratados con ETP69 mostraron un mejorado desempeño en la tarea en comparación con los controles de edad avanzada ($p \leq 0,01$). Globalmente, estos datos conductuales sugieren que la administración de ETP69 mejora el aprendizaje y la memoria dependientes del hipocampo en una batería de pruebas.

La figura 7 es una representación gráfica del efecto de ETP6 en la tarea de condicionamiento del miedo. Los ratones de edad avanzada tratados con ETP69 (10 mg/kg, i.p.) mostraron un desempeño mejorado cuando se evaluó el condicionamiento contextual el miedo. * $p = 0,01$, prueba de la t de Bonferroni. Datos mostrados como ± EEM. $n = 7$ por grupo.

Niveles de H3K9me3 en el hipocampo

Primero se compararon los niveles de H3K9me3 en el hipocampo y el cerebelo de ratones jóvenes frente a ratones de edad avanzada y se encontró un nivel significativamente mayor de H3K9me3 en los ratones de edad avanzada

en el hipocampo pero no en el cerebelo (figura 8A, $p < 0,05$, $n = 3$ /grupo). Dado que la OLM y la USL son tareas específicas del hipocampo y que se encontró una diferencia en los niveles de H3K9me3 en el hipocampo de ratones jóvenes con respecto a ratones de edad avanzada, se sometió a prueba el nivel total de H3K9me3 en el hipocampo después del tratamiento con el fármaco en muestras de tejido del hipocampo de la cohorte de animales descritos anteriormente en la tarea OLM. Los resultados mostraron un efecto significativo del fármaco en extractos de histonas del hipocampo de los animales tratados con el fármaco. El análisis de la prueba de la t mostró disminuciones en los niveles de H3K9me3 en los animales tratados con ETP69 ($p < 0,05$, $n = 7$ /grupo, figura 8B). En comparación, no existieron diferencias significativas entre los niveles de H3K9me3 en el cerebelo de los ratones tratados con ETP69 frente a los de los ratones no tratados.

La inhibición de H3K9me3 incrementa la densidad de espinas y la expresión superficial del receptor GLuR1 en los sinaptosomas del hipocampo

Se ha informado de que la formación de memoria novedosa se puede asociar con un incremento transitorio de la densidad de espinas en el hipocampo. En particular, la mejora del desempeño en las tareas OLM y USL se asocia con cambios estructurales y/o funcionales en las sinapsis glutamatérgicas excitadoras. Por tanto, se examinó si la inhibición farmacológica de la histona metiltransferasa (SUV39H1) era suficiente para inducir un incremento de la formación de espinas dendríticas en el hipocampo.

Especificamente, se realizó un recuento y clasificación de las espinas en las neuronas piramidales en CA1. Se tomaron imágenes de los segmentos de dendrita de las neuronas en CA1 del hipocampo por microscopía confocal y un investigador sin información sobre el tratamiento realizó un recuento y clasificación de las espinas dendríticas según su morfología. Las espinas se contaron manualmente y se clasificaron como delgadas, en hongo o gruesas de acuerdo con los criterios descritos previamente.

Para cada animal se analizaron al menos 3 neuronas piramidales y 200 μm de longitud total de dendrita y 250-500 espinas ($n = 5$ animales por grupo). Todas las neuronas se eligieron de la parte dorsal de la región CA1 del hipocampo (de acuerdo con su papel esencial en la memoria espacial) y se tiñeron completamente a lo largo de las dendritas basales y apicales. La figura 10 presenta imágenes representativas que muestran el efecto del tratamiento con ETP69 sobre las espinas de la región CA1 del hipocampo. En esta ilustración, el panel superior muestra neuronas del hipocampo de animales de control y el panel inferior muestra espinas observadas en animales tratados con ETP69.

El análisis de segregación se realizó para diferenciar las dendritas basales de las apicales en la misma neurona. En promedio, los ratones tratados con ETP69 tenían un número total de espinas un 45 % mayor por longitud de dendrita (μm) en comparación con los controles. El análisis de la densidad de espinas por morfología reveló una densidad significativamente mayor de espinas delgadas ($p < 0,001$, prueba de la t de Student) y gruesas ($p < 0,05$, prueba de la t de Student) en ratones tratados con ETP69 en comparación con ratones de control (figuras 9A-C). No existieron diferencias en el número de espinas en hongo/longitud de dendrita medida (figuras 9A-C).

A continuación, se estudió la influencia de ETP69 en las sinapsis usando sinaptometría de flujo, un enfoque innovador para caracterizar molecularmente los sinaptosomas aislados (terminales presinápticas unidas a las espinas dendríticas posinápticas). Nos centramos en la expresión de PSD95 (proteína de estructura) y GluR1 (subunidad de los receptores AMPA), ya que el crecimiento de espinas dependiente de la actividad depende de la incorporación del receptor AMPA a regiones enriquecidas con PSD y este proceso vincula el crecimiento de espinas con una incrementada eficacia de transmisión sináptica. Después del tratamiento farmacológico, las fracciones de sinaptosoma del hipocampo se inmunotíñeron y se analizaron mediante sinaptometría de flujo. La adquisición de muestras por sinaptometría de flujo identifica primero los sinaptosomas por tamaño utilizando microesferas calibradas como se describió previamente. Se ha mostrado que el subconjunto de partículas entre 0,5 y 3,0 μm está altamente enriquecido en sinaptosomas, como lo indican los altos niveles de sinaptofisina y PSD95 en la mayoría de las partículas de tamaño controlado (>70 %). De acuerdo con el incremento del número de espinas inducido por ETP69 (figuras 9A-C), el análisis de las partículas de tamaño controlado reveló que ETP69 incrementa la proporción de sinaptosomas que expresan PSD95 ($p < 0,05$, figura 11C), reflejando por tanto un incremento del número de sinapsis. No se observaron cambios detectables en los niveles de PSD95 por partícula, según lo determinado por la fluorescencia media de intensidad. A continuación, se sometió a prueba si ETP69 incrementa los niveles relativos de espinas que expresan los receptores GluR1-AMPA de superficie. Se cuantificó la proporción de sinaptosomas de tamaño controlado que coexpresan GluR1 en la superficie y PSD95 por vía intracelular mediante un doble marcado que combina la inmunodetección extracelular (sin permeabilización) e intracelular. Se observó un incremento de la cantidad de acontecimientos con expresión de PSD95 (PSD95+) que coexpresan GluR1 de superficie en ratones tratados con ETP69, en comparación con los controles tratados con vehículo ($p = 0,05$, figura 11E). A continuación, se analizaron los efectos de ETP69 sobre la activación de Akt (fosforilación de Akt en la serina 473, p-Akt), una etapa esencial para el transporte dependiente de la actividad de PSD95 hasta las dendritas después de la activación del receptor NMDA. De acuerdo con la proporción incrementada de acontecimientos PSD95+ GluR1+ después del tratamiento con ETP69, la inhibición de SUV39H1 por ETP69 también incrementó la proporción de acontecimientos que expresan tanto p-Akt como PSD-95 (p-Akt+ PSD95+), en relación con las muestras de ratones tratados con vehículo ($p < 0,05$, figura 11G). En general, estos

resultados sugieren que la inhibición de H3K9me3 actúa, al menos en parte, modulando positivamente los procesos moleculares que promueven la generación y la rigidez plástica de las espinas.

5 **ETP69 incrementa los niveles de H3K9me3 en el promotor de BDNF y los niveles de proteína BDNF en el hipocampo de ratones de edad avanzada**

Es lógico pensar que, si el tratamiento con el inhibidor de SUV39H1 estimula la formación de espinas en el hipocampo, también debería producir cambios específicos de genes en distintas cascadas de señalización que corresponden a la memoria. En el cerebro adulto, el BDNF desempeña un papel importante en la formación y la rigidez plástica de las sinapsis, actuando en los sitios pre y possinápticos. Por tanto, se sometió a prueba el efecto de la regulación por disminución de H3K9me3 en BDNF, que es fundamental para la consolidación del aprendizaje y la memoria dependientes del hipocampo. El gen *bdnf* se compone de varios exones no codificantes, cada uno regulado por su propio promotor y que responde a diferentes estímulos. Por lo tanto, se evaluó si el tratamiento con ETP69 disminuye la trimetilación de H3K9 en los promotores de *bdnf* I, IV y VI. Se encontró un efecto significativo del tratamiento para H3K9me3 en *bdnf* I ($p = 0,05$, prueba de la *t* de Mann-Whitney, $n = 7$ para el control, 9 para ETP69, figura 12B). Es importante destacar que los cambios epigenéticos inducidos por ETP69 en el promotor de BDNF se asociaron con un incremento de los niveles de proteína BDNF en el hipocampo. Se observaron niveles significativamente elevados de BDNF en el hipocampo de los ratones tratados con ETP69 en relación con los controles ($p < 0,01$ $F(2,16) = 8,09$, ANOVA seguido de prueba de la *t* Bonferroni *post hoc*; figura 12A).

En este estudio se sometió a prueba el potencial de la inhibición aguda *in vivo* de SUV39H1 y la consiguiente regulación por disminución de H3K9me3 para atenuar las deficiencias de aprendizaje y de memoria en el envejecimiento. Se evaluaron adicionalmente los posibles mecanismos que pueden contribuir a los beneficios cognitivos observados después de la manipulación de H3K9me. El desempeño en la tarea de memoria de localización de objetos, el condicionamiento del miedo y la tarea de aprendizaje sin supervisión mejoró después de la regulación por disminución de H3K9me3. Esto se correspondió con un incremento de la densidad de espinas dendríticas de neuronas piramidales y con un incremento de las sinapsis que expresan receptores AMPA de superficie que contienen GluR1 en el hipocampo. Los niveles de BDNF también se incrementaron en el hipocampo de animales a los que se les había administrado el inhibidor de SUV39H1, y los extractos de sinaptosomas obtenidos del hipocampo de estos animales mostraron niveles incrementados de Akt fosforilado. Por lo tanto, estos resultados proporcionan apoyo para la mejora de las deficiencias cognitivas y sugieren que la regulación por disminución de H3K9me3 desencadena una cascada de acontecimientos que involucran BDNF, remodelación y crecimiento de espinas.

35 Hasta donde conocen los inventores, no ha habido estudios que hayan evaluado el efecto de la inhibición de H3K9me3 sobre el aprendizaje y/o la función de la memoria. Aquí se presenta las primeras pruebas de que la disminución de H3K9me3 en el hipocampo mejora la memoria espacial en ratones de edad avanzada. Tanto en los paradigmas previos como posteriores al entrenamiento de la tarea OLM, los animales tratados con ETP69 se comportaron igualmente bien durante las pruebas, 24 horas después del ensayo de adquisición. Esto dio lugar a la conclusión de que el tratamiento agudo con ETP69 estaba induciendo un cambio específico del hipocampo en los niveles de H3K9me3 en animales de edad avanzada. Los datos de la tarea USL confirmaron que los animales tratados con ETP69 mostraban una mejor retención y recuerdo a las 24 horas, pero no 30 minutos después del tratamiento farmacológico, cuando el aprendizaje se mantuvo igual entre los grupos. Los represores y cofactores reclutados por H3K9me3 incluyen histona desacetilasas (HDAC) y proteína heterocromatina-1α (HP1α). De hecho, HP1 se asocia directamente con SUV39H1 y da lugar a un ciclo represivo autosostenible y puede requerir más de 30 minutos para mostrar cualquier manifestación conductual. Por tanto, los resultados son consecuentes con la hipótesis de que los cambios a nivel molecular (y, por lo tanto, los niveles conductuales) no se producen rápidamente, sino que se necesita tiempo para desarrollar el mecanismo que respalda la retención y el recuerdo mejorados.

55 Los incrementos transitorios en la densidad de espinas se han asociado con una mejora del aprendizaje y la memoria, en particular en el hipocampo de ratones de edad avanzada, pero el efecto de la manipulación de H3K9me3 sobre la función sináptica y las espinas no se ha explorado actualmente. Aquí se informa de que ETP69 incrementó el recuento de espinas delgadas y gruesas en la región CA1 de los animales tratados con ETP69. Las espinas delgadas son flexibles y críticas para la formación de nuevas sinapsis, lo que las hace muy adecuadas para facilitar las mejoras agudas en la cognición observadas con el tratamiento con ETP69. Es lógico pensar que los cambios conductuales observados después del bloqueo de H3K9me3 se debieron en parte de los cambios en la densidad de espinas. Además, la remodelación de las espinas requiere la incorporación del receptor AMPA en las regiones enriquecidas con PSD (Park *et al.*, 2004). Se ha mostrado previamente que las conexiones sinápticas se pueden fortalecer mediante la adición del receptor AMPA a las sinapsis y que, de hecho, la remodelación de las espinas requiere la incorporación de receptores AMPA en la superficie sináptica. Los datos de los inventores muestran que aumentaron los niveles de sinaptosomas PSD+ y de sinaptosomas PSD95+ que expresan GluR1 de superficie en terminales sinápticos en muestras de hipocampo de animales tratados con ETP69, respaldando por tanto la hipótesis de que H3K9me3 participa en los cambios en la red/señalización sináptica en el hipocampo que da lugar a una función cognitiva mejorada en el envejecimiento. Además de su efecto sobre el hipocampo, el

antagonismo de H3K9me3 también da lugar a la regulación por incremento de p-AKT en sinaptosomas que contienen PSD95 de tamaño controlado del hipocampo. El BDNF es una molécula clave que aporta rigidez plástica sináptica y actividad neuronal. Previamente se ha demostrado que la inhibición de HDAC en el cerebro envejecido mejora la memoria espacial de manera dependiente de BDNF. Dado que HDAC es uno de los cofactores reclutados por H3K9me3, se sometió a prueba el papel de la inhibición de SUV39H1 sobre los niveles de proteína BDNF en el cerebro envejecido. Los datos de los inventores muestran que H3K9me3 modula el aprendizaje y la memoria y es probable que en este efecto intervenga un mecanismo dependiente de BDNF. Además, los resultados de los inventores sugieren que EXON 1 solo impulsa la regulación por incremento de BDNF después del tratamiento con ETP69 en ratones de edad avanzada. Se ha sugerido que la producción diferencial de transcritos de BDNF puede afectar a la función de la proteína o proporcionar un medio para mecanismos reguladores específicos en la producción de BDNF en diferentes regiones del cerebro. Parece probable que la inhibición de H3K9me3 participe selectivamente en la regulación de un transcripto de BDNF 1, pero el resultado posterior de esta selectividad sigue siendo desconocido. Sin embargo, no se observaron cambios en Arc (datos no mostrados). No se puede descartar por completo la posibilidad de que no se hayan observado cambios en Arc porque se induce y decae rápidamente, pero es igualmente probable que existan múltiples cambios en las sinapsis después de la regulación por disminución de H3K9me3 y la inducción de Arc puede no ser uno de ellos. Este estudio solo proporciona una primera mirada a la cascada de posibilidades reguladas directa o indirectamente por la inhibición de H3K9me3. Es posible que la activación de determinada vía molecular después de la eliminación de la marca represiva H3K9me3 active la(s) vía(s) de memoria del hipocampo, lo que a su vez puede generar transcripción y traducción adicionales necesarias para el mantenimiento de la función de memoria mejorada en animales de edad avanzada.

Efectos del inhibidor de SUV39H1 ETP69 sobre la supervivencia y las funciones neuronales

Se intentó establecer que ETP69 puede actuar directamente sobre las neuronas. A diferencia de las células cancerosas, las neuronas son células que no se dividen y, por tanto, son una diana celular distinta. Se utilizaron cultivos de células neuronales primarias que carecen de otros tipos de células y donde la concentración del fármaco se puede controlar rigurosamente. La supervivencia neuronal y el crecimiento sináptico es un procedimiento común para evaluar compuestos.

La OGD en neuronas del hipocampo 14 DIV se indujo por un enfoque similar al descrito por Newcomb-Fernández *et al.* (2001). Los medios normales se reemplazaron por PBS y las placas de cultivo se colocaron en una cámara hermética. La cámara se enjuagó con N₂ y CO₂ durante 3 minutos, se selló y se colocó en una incubadora a 37 °C durante 2 horas. El PBS se reemplazó por DMEM (sin suero) y los cultivos se devolvieron a un entorno normóxico. El medio de cultivo se recogió 48 horas después de que los cultivos hubieran regresado a un entorno normal. La citotoxicidad se midió mediante el ensayo LDH (Thermo-Fisher). Para calcular el % de citotoxicidad, se resta la actividad LDH de la LDH espontánea, se libera el control (tratado con agua) de la actividad LDH de la muestra tratada con productos químicos, se divide por la actividad LDH total [(Actividad máxima de control de liberación de LDH) - (Actividad de control de liberación de LDH espontánea)], y se multiplica por 100:

$$\% \text{ de citotoxicidad} = \frac{\text{Actividad de LDH tratado con compuesto} - \text{Actividad espontánea de LDH} \times 100}{\text{Actividad máxima de LDH} - \text{Actividad espontánea de LDH}}$$

Inicialmente se sometió a prueba el efecto de ETP69 sobre la citotoxicidad inducida por la privación de oxígeno-glucosa (OGD). Las neuronas maduras del hipocampo (14 DIV) se trataron con OGD durante 2 horas en presencia o ausencia de ETP69. La citotoxicidad se midió mediante el ensayo LDH 48 horas después de la OGD. El ETP69 a 4 nM pero no a 100 nM rescató neuronas de la citotoxicidad inducida por OGD. La figura 13 es una ilustración gráfica del efecto de ETP69 sobre la supervivencia neuronal después de la privación de oxígeno y glucosa (OGD). Neuronas del hipocampo 14 DIV se trataron con OGD durante 2 horas en presencia o ausencia de ETP. La citotoxicidad se midió mediante el ensayo LDH 48 horas después de la OGD. Los resultados son medias ± EEM de 4 muestras. *p <0,05.

A continuación, se examinó el efecto de ETP69 sobre los niveles de H3K9me3 en neuronas del hipocampo cultivadas. 24 horas de tratamiento con ETP69 dieron como resultado una disminución dependiente de la dosis en el nivel neuronal de H3K9me3. Las figuras 14A-B son ilustraciones del efecto de ETP69 sobre los niveles de H3K9me3 en neuronas del hipocampo 14 DIV (figura 14A: imagen de gel; figura 14B: cuantificación, n = 3, *, p <0,05). Como muestran las ilustraciones, el tratamiento con ETP69 (24 horas) disminuyó el nivel de H3K9me3 medido por inmunoelectrotransferencia.

Dado que el ETP69 a 20 nM dio lugar a la máxima disminución del nivel de H3K9me3, se examinó el efecto de ETP69 a 20 nM sobre la expresión sináptica de la proteína PSD-95 y la morfología de las espinas dendríticas. El tratamiento con ETP69 incrementó la inmunorreactividad a PSD-95. La figura 15A son imágenes que muestran que el tratamiento con ETP69 (20 nM, 24 horas) incrementó la inmunorreactividad a PSD-95 (un marcador de espinas dendríticas donde se crean las sinapsis) de neuronas del hipocampo 14 DIV. Las neuronas se tiñeron con anticuerpos contra PSD-95 (rojo) y MAP2 (verde). Barras de escala: 10 μm, panel superior; 2 μm, panel inferior.

La figura 15B son imágenes que muestran que el tratamiento con ETP69 (20 nM, 24 horas) incrementó la tinción de actina F dendrítica (un marcador de espinas dendríticas). Obsérvese la presencia de numerosas puntas que marcan la presencia de muchas espinas. Panel superior: Control, panel inferior: Neuronas tratadas con ETP. Barra de escala: 2 μ m. Esta ilustración muestra que ETP69 también incrementó las espinas dendríticas marcadas con tinción de F-actina.

Además, el tratamiento con ETP69 incrementó la fosforilación del factor de transcripción CREB en Ser133. La figura 16 es una imagen que ilustra que ETP69 incrementó la fosforilación de CREB en Ser133 medida por inmunoelectrotransferencia. CREB es un factor de transcripción cuya activación está involucrada en la rigidez plástica sináptica y la formación de memoria.

Estos datos distinguen el uso de ETP en el sistema nervioso y las neuronas de las aplicaciones de cáncer, ya que demuestran que ETP69 actúa sobre las neuronas, un tipo de célula que no se divide, para promover su supervivencia, crecimiento y rigidez plástica sináptica.

Los estudios proporcionan pruebas del papel de H3K9me3 en la potenciación de la memoria y la función cognitiva, por ejemplo, disminución de la memoria relacionada con la edad, y muestran que esta marca de metilación de histonas se puede revertir mediante una intervención farmacológica. Los estudios también proporcionan pruebas de que la manipulación de la enzima que regula la metilación de histonas permite alterar el estado de cromatina de los sujetos y restaurar la función de la memoria en el cerebro que envejece. Finalmente, este compuesto se puede usar solo o conjuntamente con diversas intervenciones en el estilo de vida o intervenciones farmacológicas para potenciar el desempeño cognitivo (es decir, potenciador cognitivo), por ejemplo, memoria, aprendizaje, función ejecutiva, atención, velocidad de procesamiento, funciones cognitivas globales, actividades cotidianas, etc. Estos enfoques duales pueden potenciar la cognición más allá de cualquier intervención sola. Esto también dará lugar a mejores resultados funcionales tales como el sueño, el dolor y la calidad de vida.

En uno o más modos de realización, los potenciadores cognitivos farmacológicos pueden incluir un inhibidor de colinesterasa tal como tacrina, donepezil, rivastigmina y galantamina, por ejemplo. El potenciador cognitivo farmacológico también puede ser un antagonista de NMDA o un agonista de NMDA, una ampaquina, un modulador del complejo entre BZD y el receptor GABA, un antagonista de serotonina, un compuesto de clase nicotínica, un compuesto de clase muscarínica, un inhibidor de PDE, un compuesto de clase de proteína G, un modulador de canal, un compuesto de clase immunoterápica, un agente reductor antiamiloide o amiloide, una estatina o un modulador de PPARS.

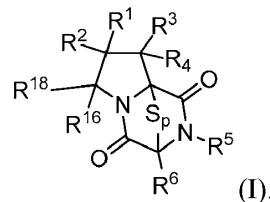
En uno o más modos de realización, los potenciadores cognitivos del estilo de vida pueden incluir ejercicios físicos y mentales, complementos alimenticios tales como antioxidantes, un potenciador de la función mitocondrial, cafeína, omega-3 y ácido docosahexaenoico (DHA).

En una o más modos de realización, el potenciador cognitivo puede incluir combinaciones de intervenciones farmacológicas y en el estilo de vida.

Si bien la invención divulgada en el presente documento se ha descrito por medio de modos de realización específicos y aplicaciones de los mismos, los expertos en la técnica podrían realizar numerosas modificaciones y variaciones sin apartarse del alcance de la invención establecido en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para su uso para revertir la pérdida cognitiva en un sujeto animal que lo necesite, que comprende un compuesto de fórmula (I):



en la que p es 2, 3 o 4; y

10 $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^{16}$ y R^{18} son independientemente hidrógeno, halógeno, $-N_3$, $-CF_3$, $-CCl_3$, $-CBr_3$, $-Cl_3$, $-CN$, $-CHO$, $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$, $-CONH_2$, $-NO_2$, $-SH$, $-SO_2$, $-SO_2Cl$, $-SO_3H$, $-SO_4H$, $-SO_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC(O)NHNH_2$, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido.

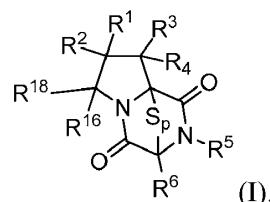
- 15 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el compuesto de fórmula I es ETP69 ($Rac-(3S,6S,7S,8aS)-6-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2,3,7-trimetil-1,4-dioxohexahidro-6H-3,8a-epiditiopirrolo[1,2-a]piracina-7-carbonitrilo$).

- 20 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la composición se administra junto con un inhibidor de colinesterasa seleccionado de un grupo que comprende tacrina, donepezil, rivastigmina y galantamina.

- 25 4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la composición se administra junto con una ampaquina.

- 30 5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la composición se administra junto con una estatina.

- 35 6. Una composición para su uso para potenciar la cognición en un sujeto que lo necesite, que comprende un compuesto de fórmula (I):



en la que p es 2, 3 o 4; y

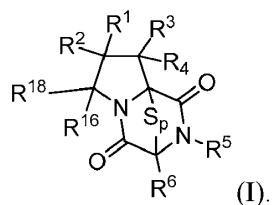
40 $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^{16}$ y R^{18} son independientemente hidrógeno, halógeno, $-N_3$, $-CF_3$, $-CCl_3$, $-CBr_3$, $-Cl_3$, $-CN$, $-CHO$, $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$, $-CONH_2$, $-NO_2$, $-SH$, $-SO_2$, $-SO_2Cl$, $-SO_3H$, $-SO_4H$, $-SO_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC(O)NHNH_2$, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido.

- 45 7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el compuesto de fórmula (I) es ETP69 ($Rac-(3S,6S,7S,8aS)-6-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2,3,7-trimetil-1,4-dioxohexahidro-6H-3,8a-epiditiopirrolo[1,2-a]piracina-7-carbonitrilo$).

- 50 8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en la que la composición se administra junto con ejercicio físico.

9. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en la que la composición se administra junto con ejercicio mental.

10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en la que la composición se administra junto con un complemento alimenticio.
- 5 11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el complemento es cafeína.
12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el complemento es omega-3.
- 10 13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el complemento es ácido docosahexaenoico (DHA).
14. Una composición para su uso en el tratamiento, prevención o alivio de una disfunción cognitiva de un sujeto animal vivo, que comprende un compuesto de fórmula (I):



15 en la que p es 2, 3 o 4; y

20 $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4, \text{R}^5, \text{R}^6, \text{R}^{16}$ y R^{18} son independientemente hidrógeno, halógeno, $-\text{N}_3$, $-\text{CF}_3$, $-\text{CCl}_3$, $-\text{CBr}_3$, $-\text{Cl}_3$, $-\text{CN}$, $-\text{CHO}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{NO}_2$, $-\text{SH}$, $-\text{SO}_2$, $-\text{SO}_2\text{Cl}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SO}_4\text{H}$, $-\text{SO}_2\text{NH}_2$, $-\text{NHINH}_2$, $-\text{ONH}_2$, $-\text{NHC(O)NHNH}_2$, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido.

- 25 15. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en la que el compuesto de fórmula (I) es ETP69 (*Rac-(3S,6S,7S,8aS)-6-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2,3,7-trimetil-1,4-dioxohexahidro-6H-3,8a-epidiptiopirrolo[1,2-a]piracina-7-carbonitrilo*).

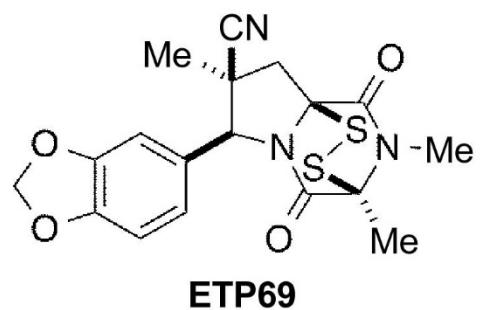


Figura 1

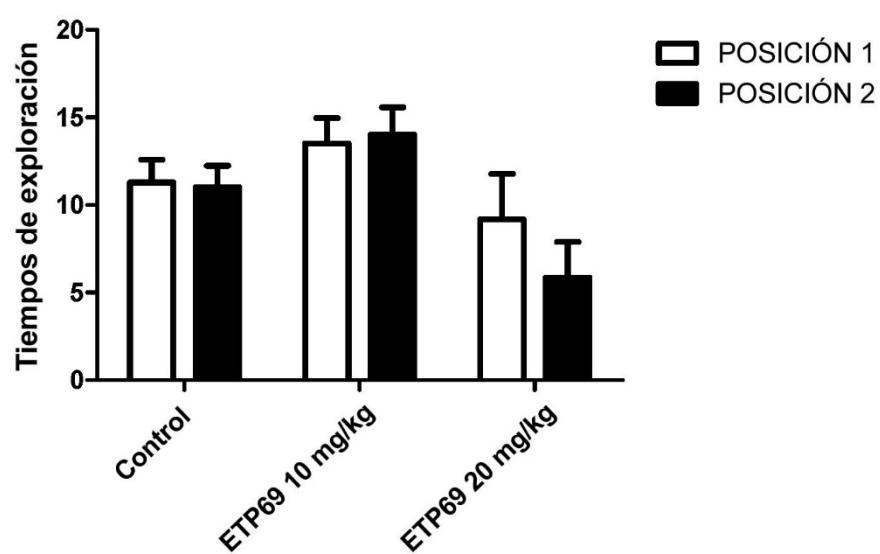
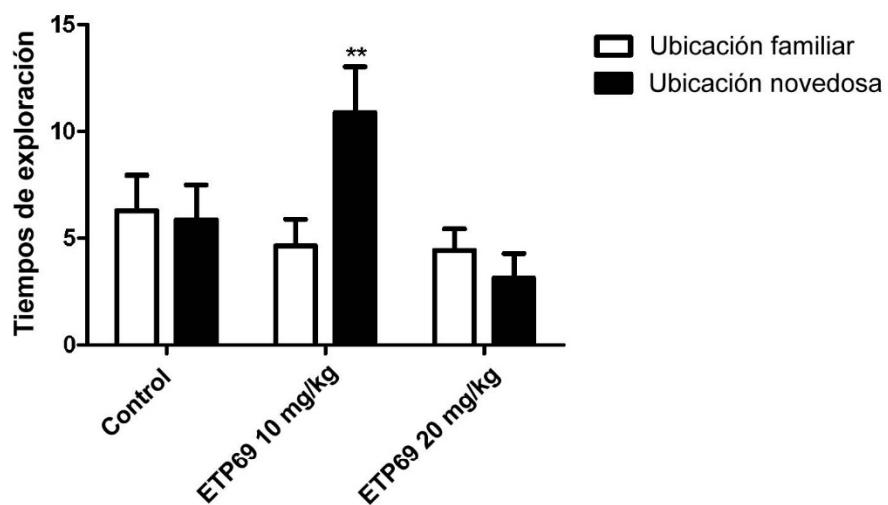
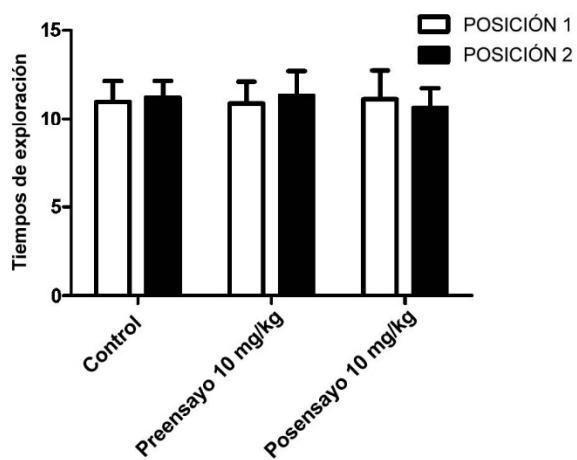
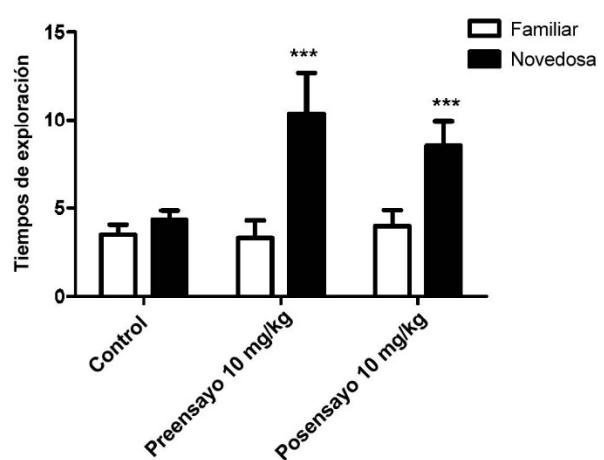
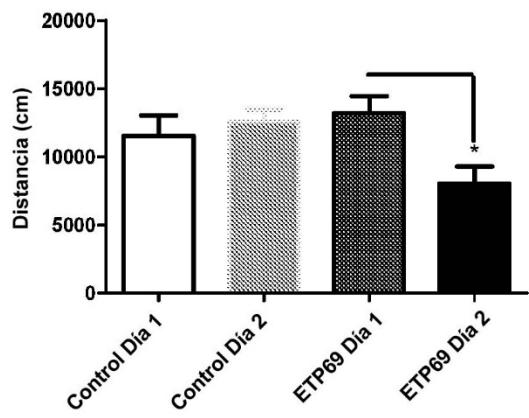
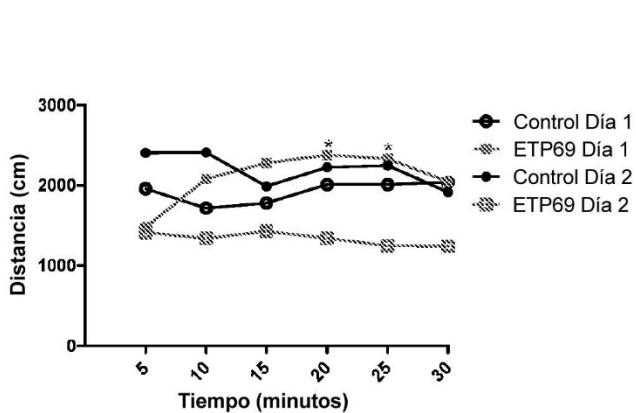
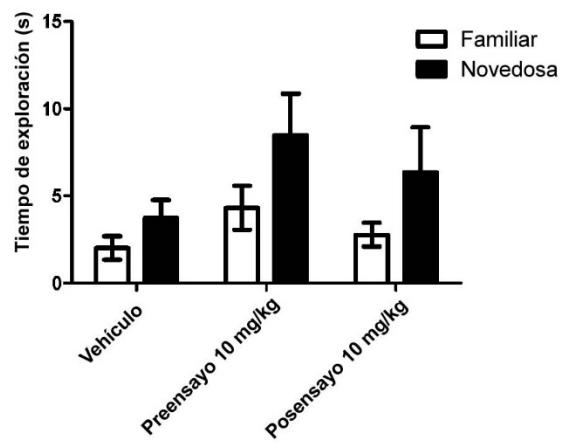
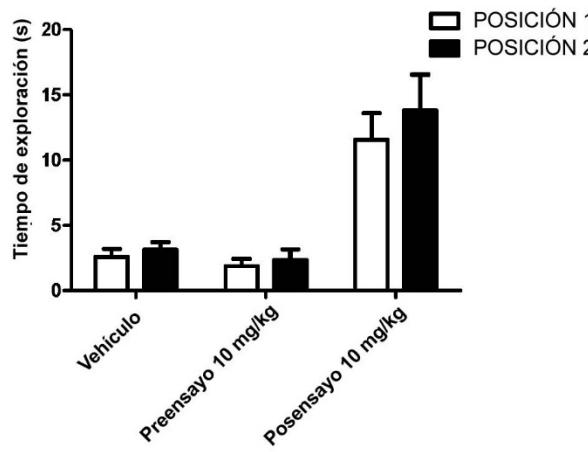


Figura 2

**Figura 3****Figura 4A****Figura 4B**



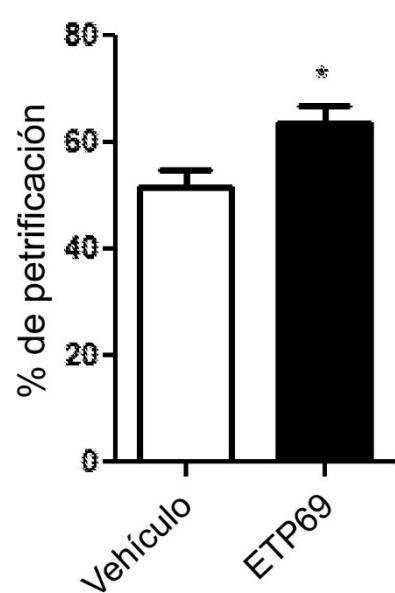
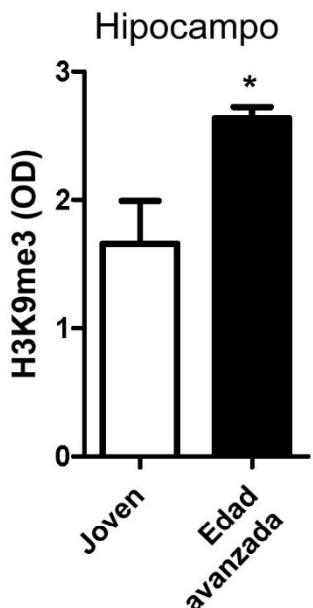
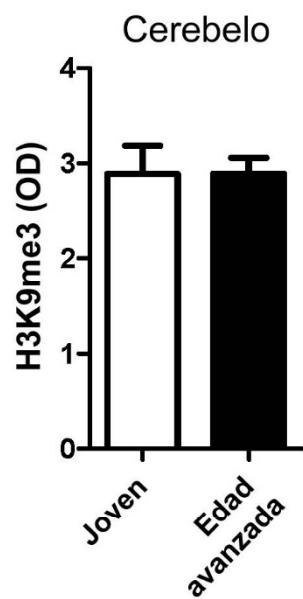
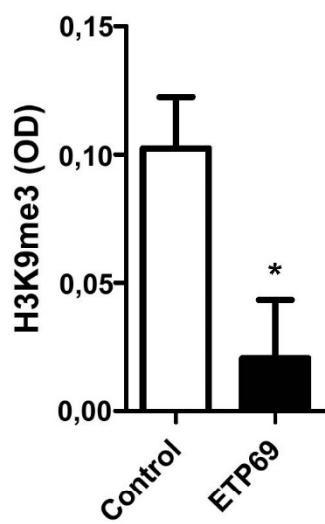
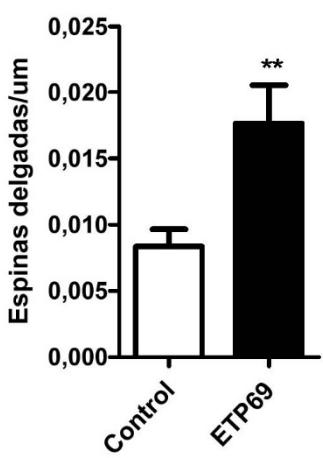
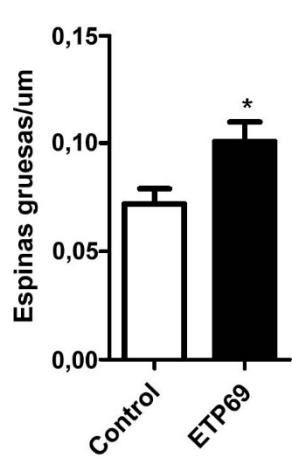
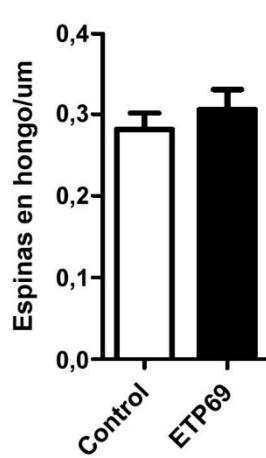


Figura 7

**Figura 8A****Figura 8B****Figura 8C****Figura 9A****Figura 9B****Figura 9C**

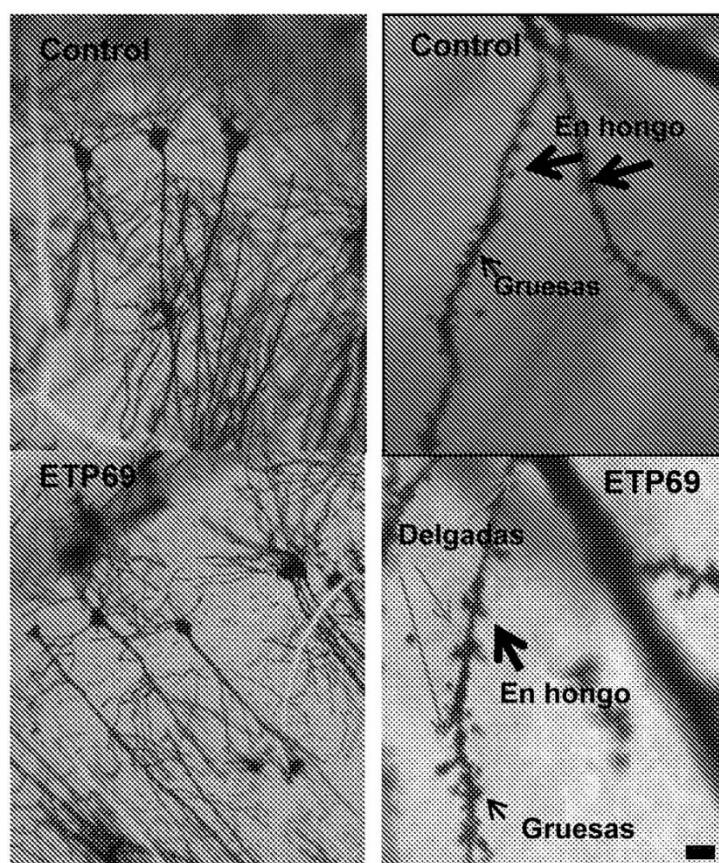
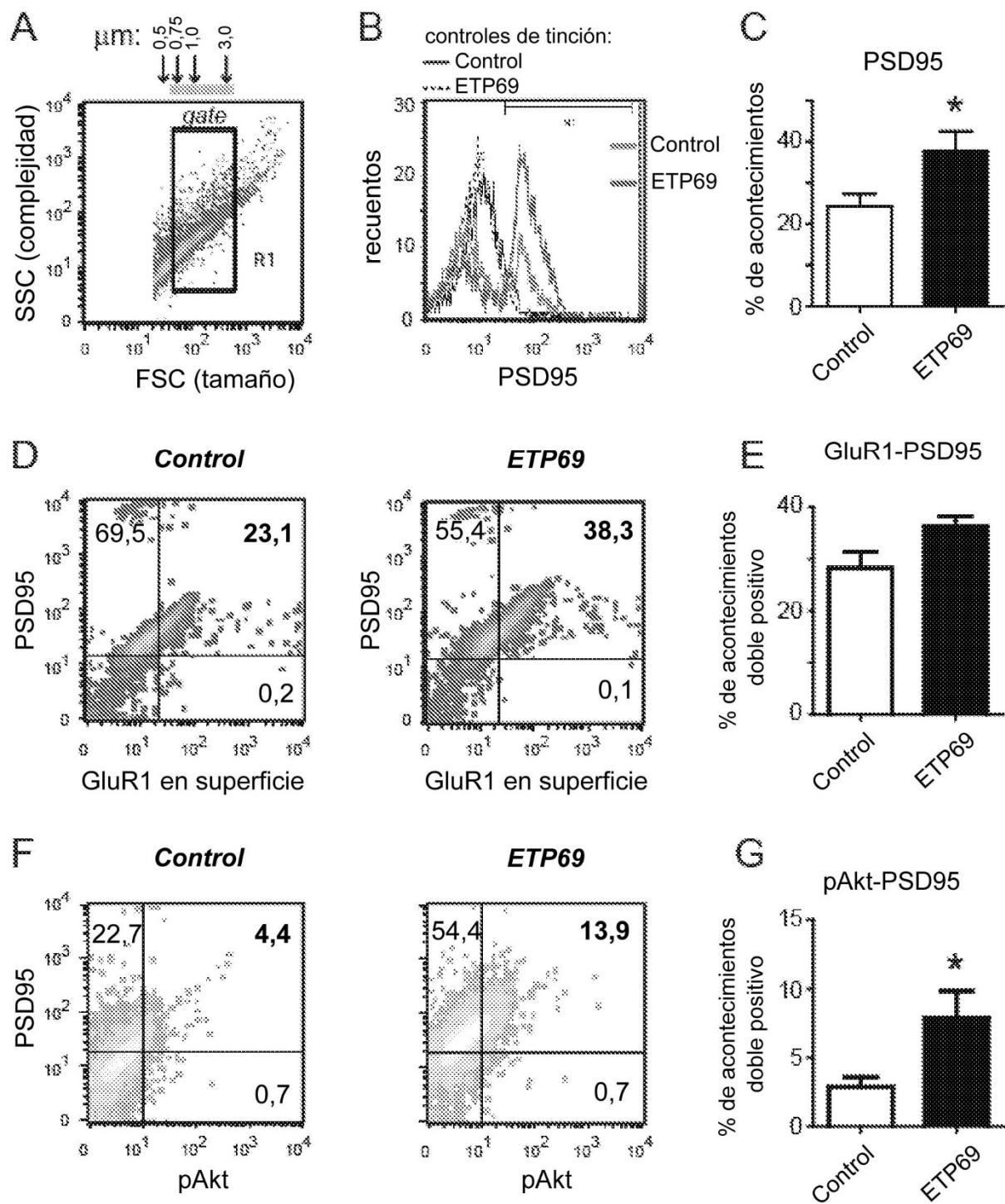
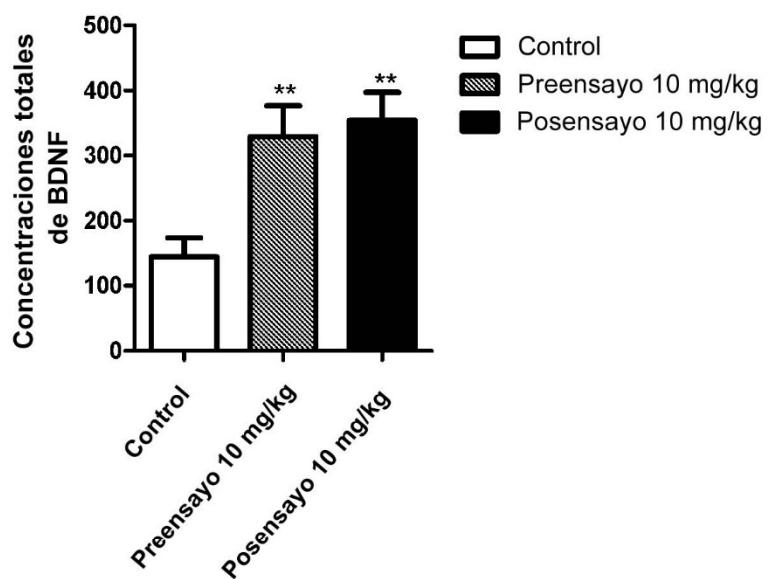
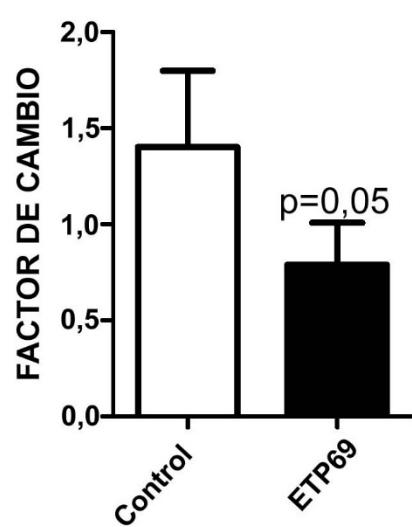
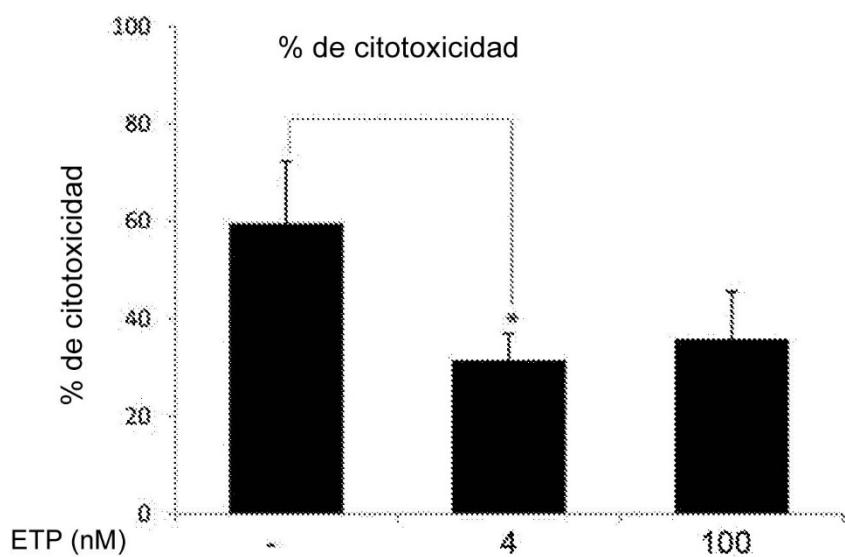


Figura 10

**Figura 11**

**Figura 12A****Figura 12B****Figura 13**

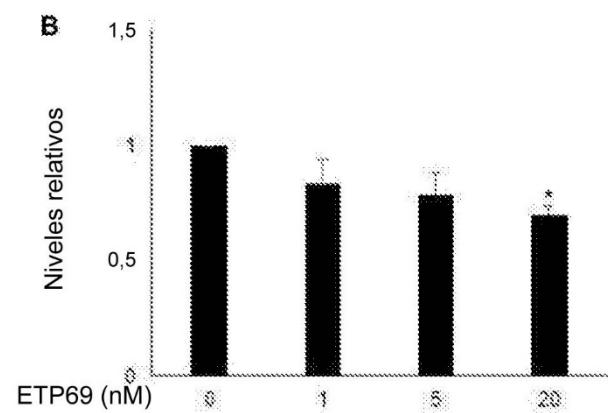
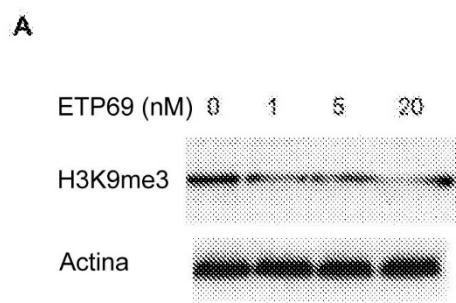


Figura 14A

Figura 14B

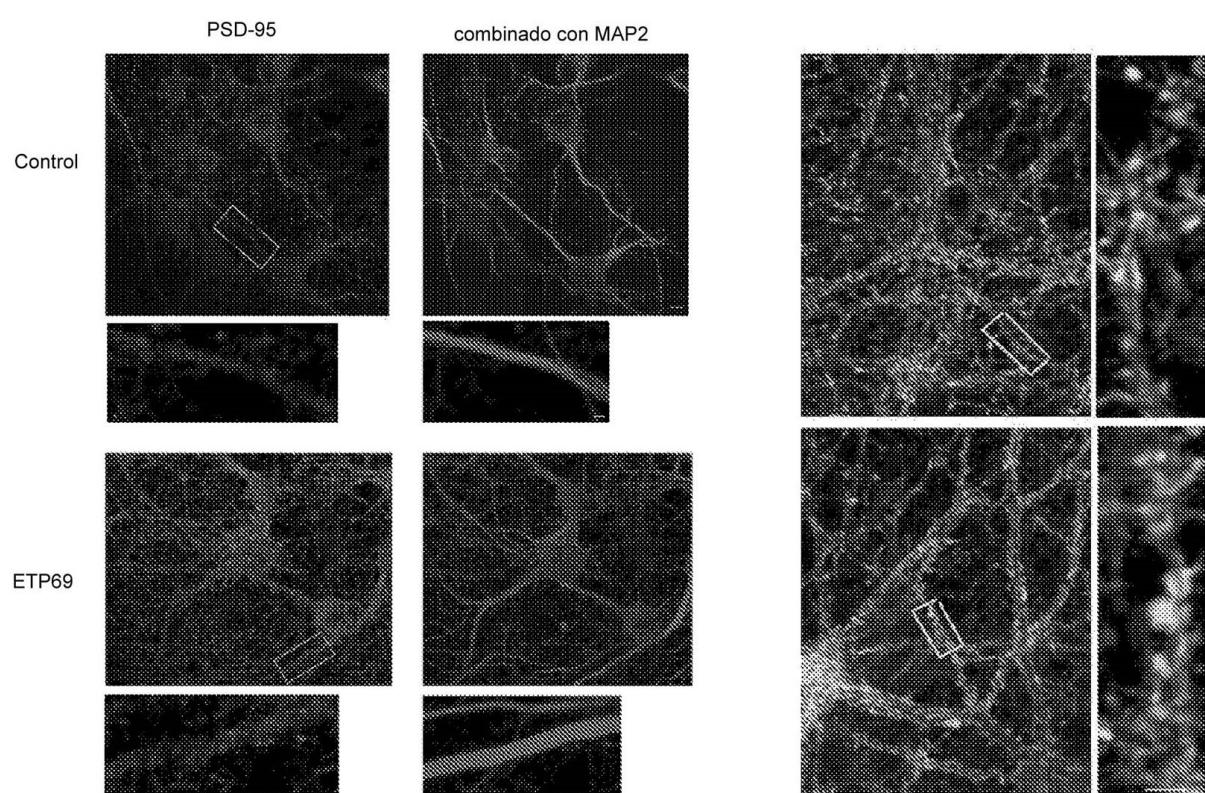


Figura 15A

Figura 15B

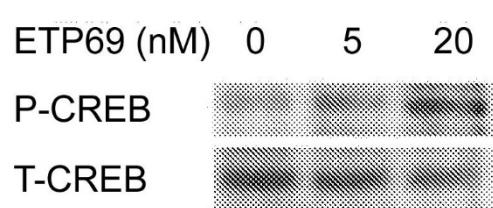


Figura 16