

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 015 758**

(51) Int. Cl.:

**A61K 31/135** (2006.01)  
**A61K 31/165** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**H04R 25/00** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2018 PCT/US2018/044608**  
(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2019 WO19028025**  
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2018 E 18841846 (1)**  
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2024 EP 3661492**

---

(54) Título: **Nitrosynapsin para uso en el tratamiento trastorno del espectro autista**

(30) Prioridad:

**01.08.2017 US 201762539549 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.05.2025**

(73) Titular/es:

**LIPTON, STUART A. (100.00%)  
P.O. Box 8095, 17475 Circa del Sur  
Rancho Santa Fe, California 92067, US**

(72) Inventor/es:

**LIPTON, STUART A.**

(74) Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 3 015 758 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

Nitrosynapsin para uso en el tratamiento trastorno del espectro autista

## 5 ANTECEDENTES

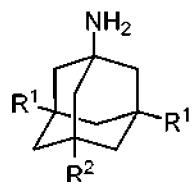
En el cerebro, la transcripción del factor potenciador de miocitos 2 (MEF2) es fundamental para la diferenciación neuronal, la formación sináptica y la supervivencia neuronal. Se ha demostrado que la inactivación condicional de *Mef2c* en las células progenitoras neuronales que expresan nestina produjo ratones con propiedades de red electrofisiológicas deterioradas y déficits conductuales que recuerdan al síndrome de Rett, un trastorno neurológico relacionado con el TEA. Las regiones de microdelecciones del cromosoma 5q14.3q15 causan fenotipos de déficit neurológico en niños identificados como haploinsuficiencia de *MEF2C*. Estos pacientes presentan signos y síntomas que incluyen TEA, discapacidad intelectual y del desarrollo (IDD), mala conducta recíproca, falta de habla, conducta estereotipada y repetitiva, y epilepsia. Los trastornos causados por haploinsuficiencia de *MEF2C* se han denominado colectivamente síndrome de haploinsuficiencia de *MEF2C* (MCHS). Además, se han identificado múltiples genes diana de MEF2 como genes relacionados con el autismo en genealogías humanas con ascendencia compartida.

La técnica anterior relacionada con el tratamiento de los trastornos del espectro autista (TEA) se centra en la memantina, pero no se menciona nada sobre el tratamiento con NitroSynapsin (documento WO 2006/034465; Erickson et al., A retrospective study of memantine in children and teenagers with pervasive developmental disorder, Psychopharmacology, vol. 191, n.º 1, 3 de octubre de 2006, págs. 141-147; Chez et al., Memantine experience in children and adolescents with autistic spectrum, Annals of Neurology, vol. 56, supl. 8, 31 de agosto de 2004, página S109; y documento US 2014/088083). El tratamiento del TEA se analiza en el contexto de una gran cantidad de compuestos/clases de compuestos (documento US 2015/359759).

La NitroSynapsin tiene efectos protectores contra concentraciones destructivas de NMDA *in vitro*, y se ha demostrado que es neuroprotector en la recuperación de un accidente cerebrovascular *in vivo* (en ratones) pero sin asociación con trastornos del espectro autista, autismo, síndrome de Rett o esclerosis tuberosa (documento EP 1852113). Se han descrito métodos para la detección de antagonistas de NMDAR pero sin asociación con métodos de tratamiento ni enfermedades específicas (documento US 2011/171291).

## SUMARIO

35 La invención se expone en el conjunto adjunto de reivindicaciones, referidas a un inhibidor del receptor de glutamato de tipo N-metil-D-aspartato (NMDAR) para uso en el tratamiento de un trastorno del espectro autista (TEA), en el que el inhibidor de NMDAR es NitroSynapsin de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma:



40

## Fórmula I

en la que cada R<sup>1</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; y R<sup>2</sup> es -ONO<sub>2</sub>.

45 En algunos casos, el trastorno del espectro autista (TEA) es esclerosis tuberosa. En algunos casos, el trastorno del espectro autista (TEA) es autismo. En algunos casos, el trastorno del espectro autista (TEA) es síndrome de Rett. En algunos casos, el sujeto es un niño. En algunos casos, el sujeto es *MEF2C* haploinsuficiente, y tiene síndrome de haploinsuficiencia de *MEF2C* (MCHS). En algunos casos, la selección del sujeto para el tratamiento se basa en un nivel de expresión de al menos un gen seleccionado de *MEF2C*, *SLC32A1*, *SLC17A6*, *SYP*, y *GAD65*. En algunos casos, el nivel de expresión es el de una célula del sujeto. En algunos casos, el nivel de expresión es el de una célula del cerebro del sujeto. En algunos casos, el nivel de expresión es el de una célula circulante del sujeto. En algunos casos, el nivel de expresión es un nivel de expresión de ARNm. En algunos casos, el nivel de expresión es un nivel de expresión de proteína. En algunos casos, el sujeto tiene haploinsuficiencia de *MEF2C*. En algunos casos, el gen es *SLC32A1*, y el nivel de expresión se reduce significativamente con respecto al del sujeto promedio que comprende dos copias del gen *MEF2C*. En algunos casos, el gen es *SLC17A6*, y el nivel de expresión aumenta significativamente con respecto al del sujeto promedio que comprende dos copias del gen *MEF2C*. En algunos casos, el gen es *SYP*, y el nivel de expresión se reduce significativamente con respecto al del sujeto promedio que comprende dos copias del gen *MEF2C*. En algunos casos, el gen es *GAD65*, y el nivel de expresión se reduce significativamente con respecto al del sujeto

promedio que comprende dos copias del gen *MEF2C*.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 5 La FIG. 1 muestra un diagrama resumen de haploinsuficiencia de *Mef2c* que conduce a un desequilibrio E/l y fenotipos similares a MCHS que fueron rescatados por NitroSynapsin (también conocido como NitroMemantine YQW-036 o NMI-6979).
- 10 La FIG. 2 muestra que los niveles de proteína MEF2C disminuyeron en los cerebros *Mef2c-het*. La inmunotransferencia de lisados de tejido del prosencéfalo mostró una disminución de MEF2C en ratones *Mef2c-het* en comparación con los WT. Los niveles de proteína se normalizaron a  $\beta$ -actina (% de control). Las transferencias representativas se ilustran en la parte inferior. Los valores son media + s.e.m.,  $n = 5$ ; \*\* $P < 0,01$  mediante la prueba de Student.
- 15 La FIG. 3 muestra que los ratones *Mef2c-het* mostraron fenotipos similares a MCHS. La FIG. 3A muestra que los ratones *Mef2c-het* mueren prematuramente. El número de ratones *Mef2c-het* en comparación con los ratones WT fue casi igual a E18, pero ~45% de los WT en la edad adulta (~3 meses) (\* $P < 0,05$  por Chi-cuadrado). Las FIG. 3B y 3C muestran un deterioro del aprendizaje y la memoria espacial en el laberinto de Bames de ratones *Mef2c-het* durante el entrenamiento (FIG. 3B) y en pruebas de sondeo posteriores (FIG. 3C). Las FIGS. 3D y 3E muestran un aumento del agarre de las patas (FIG. 3D) y de la introducción repetida de la cabeza (FIG. 3E) de los ratones *Mef2c-het* en la exploración del tablero con orificios. Los datos son media ± s.e.m.;  $n = 9-11$  ratones por genotipo en las FIGS. 3B, C y E;  $n = 30$  (WT) y 21 (het) en d; n.s. no significativo, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  mediante la prueba de la t de Student (FIGS. 3C-E) o ANOVA (FIG. 3B).
- 20
- 25 La FIG. 4 muestra la regulación negativa de genes neurogénicos y sinápticos en ratones *Mef2c-het* mediante análisis de micromatrices. La FIG. 4A muestra un gráfico de volcán que muestra el perfil de expresión de ARN en el hipocampo *Mef2c-het* y WT del día posnatal (P)30 (rojo = arriba, azul = abajo,  $P < 0,05$  indicado por la línea verde). [NOTA: En la FIG. 4 y las FIGS. 5-19 posteriores que hacen referencia al color, las imágenes en color aparecen en nuestra publicación: Tu S, Lipton SANakanishi N, et al. NitroSynapsin therapy for the mouse MEF2C haploinsufficiency model of human autism. Nature Commun 8, 1488 (2017)]. La FIG. 4B muestra el análisis de enriquecimiento de la ruta de todos los genes con expresión significativamente alterada en *Mef2c-het* con respecto a WT utilizando el filtrado de NextBio y Gene-Ontology (GO-term). La FIG. 4C muestra un gráfico de experimentos de qPCR que muestran los niveles de expresión de ARNm (con respecto a 18S) en ratones *Mef2c-het* como porcentaje del control WT (% Ctrl;  $n = 4$  por grupo). Los datos son media ± s.e.m.; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  mediante la prueba de la t de Student.
- 30
- 35 La FIG. 5 muestra que los ratones *Mef2c-het* exhibieron propiedades neuronales anormales. La FIG. 5A muestra inmunohistoquímica que muestra células NeuN+ en el giro dentado (DG) de ratones WT y *Mef2c-het*. La FIG. 5B presenta cuantificación que muestra recuentos disminuidos de células NeuN+ en hipocampo (hip) y corteza (Ctx) en ratones *Mef2c-het* con respecto a WT. Las medidas hipocampales se obtuvieron en células granulares en la capa molecular del DG, y la medida cortical en las capas IV y V del lóbulo frontal. La FIG. 5C y la FIG. 5D muestran un número aumentado de células GFAP+ consistente con astrocitosis en ratones *Mef2c-het*. La FIG. 5E muestra un dibujo neurolúcido de dendritas representativas visualizadas mediante tinción de Golgi en VI (corteza visual primaria), M2ML (área mediolateral de la corteza visual secundaria) y LPtA (corteza de asociación parietal lateral) de la corteza visual de ratones WT y *Mef2c-het*. La FIG. 5F y la FIG. 5G muestran gráficos de resumen del análisis de Sholl que muestra la reducción en el número acumulado de intersecciones dendríticas (FIG. 5F) y longitudes dendríticas (FIG. 5G) en neuronas *Mef2c-het*. Barra de escala: 50  $\mu$ m. Los datos son media ± s.e.m.;  $n = 4$  por grupo. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  por prueba de la t de Student en las FIGS. 5A-D y ANOVA en la FIG. 5F y FIG. 5G.
- 40
- 45
- 50 La FIG. 6 muestra que los ratones *Mef2c-het* exhibieron neurogénesis adulta anormal. FIG. 6A Imágenes confocales que muestran doble tinción de PCNA (verde) y DCX (rojo) en la zona subgranular (SGZ) del DG en ratones WT y *Mef2c-het* de 8 semanas de edad. La FIG. 6B y la FIG. 6C muestran que la cuantificación de células PCNA+ y DCX+ reveló una reducción en el número de células proliferantes (FIG. 6B) y neuronas en desarrollo (FIG. 6C) en DG *Mef2c-het*. La FIG. 6D muestra doble tinción de BrdU (verde) y NeuN (rojo) 4 semanas después de la inyección de BrdU en ratones WT y *Mef2c-het* de 8 semanas de edad reveló neuronas DG recién nacidas (flechas: BrdU+/NeuN+). La FIG. 6E muestra una reducción en células BrdU+/NeuN+ en DG *Mef2c-het*;  $n = 4$  ratones por genotipo en el panel A-E. La FIG. 6F muestra ejemplos de desarrollo morfológico de neuronas nacidas en ratones adultos *Mef2c-het* y WT. Las células en división en el giro dentado (DG) se marcaron con mCherry a través de la transducción génica mediada por retrovirus. Los ratones se sacrificaron 4 semanas después. La FIG. 6G muestra la cuantificación de la longitud dendrítica total de neuronas de 4 semanas de edad que reveló una longitud dendrítica reducida en ratones *Mef2c-het* ( $n = 17$ ) en comparación con ratones WT ( $n = 12$ ). La FIG. 6H muestra la cuantificación que mostró un tamaño somal reducido en ratones *Mef2c-het* ( $n = 71$ ) en comparación con ratones WT ( $n = 28$ ). La FIG. 6I muestra la cuantificación del número de neuritas que mostró un número normal de neuritas primarias ( $n_{wr} = 25$ ,  $n_{Het} = 55$ ), pero número reducido de neuritas secundarias ( $n_{wr} = 25$ ,  $n_{Het} = 55$ ), terciarias ( $n_{wr} = 25$ ,  $n_{Het} = 55$ ), cuaternarias ( $n_{wr} = 12$ ,  $n_{Het} = 17$ ) y quinarias

(n<sub>WT</sub> = 12, n<sub>Het</sub> = 17) de neuronas de 4 semanas de edad en *Mef2c-het* en comparación con el cerebro WT. Grosor de la sección: 40 µm. Barra de escala: 50 µm. Los valores son media ± s.e.m., \*P < 0,05, \*\*\*P < 0,001 mediante la prueba de la t de Student.

- 5 La FIG. 7 muestra que los ratones *Mef2c-het* exhibieron propiedades sinápticas alteradas y desequilibrio excitatorio/inhibitorio (E/I) en la neurotransmisión sináptica. La FIG. 7A muestra inmunohistoquímica de sinaptofisina (SYP), VGLUT1 y VGAT en hipocampo WT y *Mef2c-het*. Barras de escala: 500 µm (panel superior), 50 µm (paneles medio e inferior). La FIG. 7B muestra una inmunorreactividad reducida de SYP en las regiones del giro dentado (DG) y CA1 del hipocampo de *Mef2c-het* pero no en la corteza (Ctx) o el cuerpo estriado (str, izquierda). Las medidas de DG se realizaron en la capa molecular, CA1 en la capa de células piramidales, Ctx en las capas corticales frontales IV y VI, y str en el putamen a nivel del núcleo accumbens. Expresión reducida de VGAT pero no de VGLUT1 en el hipocampo *Mef2c-het* (derecha). Los datos son media ± s.e.m., n = 4 por grupo; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 según la prueba de la t de Student. Las FIGS. 7C y 7D muestran trazas representativas de mIPSC (FIG. 7C) y corrientes postsinápticas excitatorias en miniatura (mEPSC) (FIG. 7D) a partir de registros de cortes de neuronas DG de ratones WT y *Mef2c-het*. Las FIGS. 7E-H muestran gráficos acumulativos de corrientes postsinápticas inhibitorias en miniatura (mIPSC) y amplitud de mEPSC e intervalos entre eventos, n = 7-9 por genotipo; \*\*P < 0,01 mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov de dos muestras.
- 10 La FIG. 8 muestra que los ratones *Mef2c-het* expresaron niveles alterados de proteínas sinápticas en el hipocampo. La FIG. 8A muestra inmunotransferencias de lisados de hipocampo enriquecidos con sinaptosomas que mostraron una disminución de sinaptofisina (SYP) y GAD65 pero no de VGLUT1 en ratones *Mef2c-het*. Niveles de proteína normalizados a α-tubulina (% de control). Las inmunotransferencias representativas se ilustran en la parte inferior. La FIG. 8B muestra la relación de VGLUT1 a GAD65. La FIG. 8C muestra inmunotransferencias de lisados de hipocampo enriquecidos con sinaptosomas que mostraron un aumento de VGLUT2 normalizado a α-tubulina en ratones *Mef2c-het*. Las inmunotransferencias representativas se ilustran en la parte inferior. Los datos son media ± s.e.m., n = 4 por genotipo; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01. La significancia estadística se determinó mediante la prueba de la t de Student.
- 15 La FIG. 9 muestra ratones *Mef2c-het* que mostraron deterioro de la potenciación a largo plazo (LTP) del hipocampo y de la facilitación de pulsos pareados (PPF) en los registros de cortes cerebrales. Las FIGS. 9A y 9B muestran ratones *Mef2c-het* que mostraron deterioro de la LTP (FIG. 9A) y disminución de la PPF (FIG. 9B). Los trazos representativos se muestran debajo de los gráficos. Los datos son media ± s.e.m., n = 5-9 por genotipo. La significancia estadística se determinó mediante ANOVA (FIG. 9A, \*P < 0,01) o prueba de signos (FIG. 9B, \*P < 0,05).
- 20 La FIG. 10 muestra fenotipos similares a MCHS rescatados por NitroSynapsin en ratones *Mef2c-het*. La FIG. 10A muestra la latencia para encontrar una plataforma oculta durante las sesiones de entrenamiento en el laberinto acuático de Morris. La FIG. 10B muestra los resultados de una prueba de sondeo; los ratones *Mef2c-het* tratados con vehículo (Het/V) no mostraron preferencia entre el cuadrante diana y el opuesto, lo que sugiere una memoria deteriorada. El tratamiento con NitroSynapsin (N) rescató este efecto (Het/N). Patrones de nado representativos mostrados en la parte inferior. La FIG. 10C y la FIG. 10D muestran una prueba de campo abierto; los ratones Het/V exhibieron un tiempo en centro aumentado que fue rescatado por el tratamiento con N (FIG. 10C). Por el contrario, los ratones Het/V mostraron una actividad total normal (FIG. 10D). La FIG. 10E muestra que los ratones Het/V mostraron un aumento de las inmersiones de cabeza por orificio, lo que sugiere un comportamiento repetitivo. Cada fármaco rescató. Las FIGS. 10F-I muestran que el tratamiento con N rescató la capacidad social aberrante en ratones *Mef2c-het*. La FIG. 10E muestra trazas representativas del movimiento del ratón en la prueba de habilidad social de tres cámaras. Las FIGS. 10G-I muestran que los ratones *Mef2c-het* (Het/V) presentan anomalías en la interacción social medida por el tiempo que pasan en cada cámara (FIG. 10G); y el número de visitas (FIG. 10H) y la duración de las visitas (FIG. 10I) a las cámaras E (vacía) o S1 (ratón extraño 1). El tratamiento con N mejoró este déficit (Het/N). M: Cámara intermedia. Los datos son media ± s.e.m. n = 7-9 por grupo. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 por ANOVA.
- 25 La FIG. 11 muestra que ni heterocigosisidad *Mef2c* ni el tratamiento con NitroSynapsin alteraron la velocidad de nado de los ratones en el laberinto acuático de Morris. La velocidad de los ratones que escaparon hacia la plataforma oculta durante la fase de entrenamiento del laberinto acuático de Morris se calculó como la distancia dividida entre la latencia. A diferencia de la latencia hacia la plataforma (véase la FIG. 10), la velocidad de los tres grupos de ratones (WT/V, Het/V y Het/N) no fue significativamente diferente. Los datos son media ± s.e.m., n = 7-9 por grupo.
- 30 La FIG. 12 muestra que la NitroSynapsin fue más eficaz que la memantina para rescatar los déficits neurológicos de ratones *Mef2c-het*. La FIG. 12A presenta un gráfico resumen que muestra que el número de visitas sociales de ratones *Mef2c-het* tratados con NitroSynapsin (N) fue significativamente mayor que el de ratones tratados con memantina (M) en la prueba de interacción social de tres cámaras. Las visitas sociales constituyen el número de visitas a la cámara con un ratón extraño (S1) menos el número de visitas a la cámara vacía (E). Los datos son media ± s.e.m., n = 7-9 por grupo; \*P < 0,05 mediante la prueba de la t de Student. La FIG. 12B presenta un gráfico resumen que muestra que el número de células NeuN+ hipocampales en ratones *Mef2c-het* tratados con

NitroSynapsin (N), pero no con memantina (M), fue significativamente mayor que en ratones tratados con vehículo (V). Los datos son la media ± s.e.m., n = 4-5 por grupo; \*\*P < 0,01 por ANOVA.

La FIG. 13 muestra que el tratamiento con NitroSynapsin (N) no alteró el comportamiento social de los ratones WT en el ensayo de tres cámaras. Gráficos de resumen que muestran el tiempo en tres cámaras (FIG. 13A), el número de visitas (FIG. 13B) y la duración de las visitas (FIG. 13C) de los ratones WT después de un tratamiento de 3 meses con vehículo (V) o NitroSynapsin (N). El tratamiento con NitroSynapsin no alteró significativamente el comportamiento social de los ratones WT. Los datos son media ± s.e.m., n = 10 para cada uno de los grupos WT/V y WT/N. E: Cámara vacía; S1: Cámara con ratón extraño 1. \*P < 0,05 y \*\*P < 0,01, comparado con E por ANOVA o la prueba de la t.

La FIG. 14 muestra que los ratones *Mef2c-het* no exhibieron conductas motoras anormales, excepto el agarre de las patas, que no fue rescatado por NitroSynapsin. Gráficos de resumen que muestran las conductas motoras de los ratones WT y *Mef2c-het* después de un tratamiento de 3 meses con vehículo (V) o NitroSynapsin (N). Los ratones *Mef2c-het* no exhibieron comportamientos significativamente alterados en la barra de equilibrio (FIG. 14A), varilla cilíndrica (FIG. 14B), capacidad de tracción (FIG. 14C), prueba de suspensión (FIG. 14D) o pruebas de poste vertical (FIG. 14E). En estos experimentos, el tratamiento con NitroSynapsin no tuvo un efecto significativo en los comportamientos de los ratones WT o *Mef2c-het*. La actividad anormal de agarre de las patas observada en los ratones *Mef2c-het* no fue rescatada por el tratamiento con NitroSynapsin (FIG. 14F). Los datos son media ± s.e.m., n = 12, 5, 11 y 13 para los grupos WT/V, WT/N, Het/V y Het/N, respectivamente. \*P < 0,05 en comparación con WT/V por ANOVA.

La FIG. 15 muestra que la NitroSynapsin rescató propiedades neuronales y sinápticas anormales en ratones *Mef2c-het*. La FIG. 15A muestra imágenes inmunohistoquímicas de NeuN, VGLUT1, VGAT y VGLUT2 en la capa molecular (ML) del giro dentado hipocampal (DG) de ratones WT y *Mef2c-het* tratados con vehículo (V) o NitroSynapsin (N). Barras de escala: 500 µm (panel superior), 25 µm (paneles centrales), 40 µm (panel inferior). La FIG. 15B-F presenta gráficos de resumen que muestran el rescate por NitroSynapsin de una cantidad reducida de recuentos totales de células NeuN+ (FIG. 15B), inmunorreactividad reducida de VGAT (FIG. 15D) y VGLUT2 (FIG. 15F), y una relación aumentada de VGLUT1/VGAT (e) o VGLUT2/VGAT (FIG. 15G) en el hipocampo de ratones *Mef2c-het*. La FIG. 15H muestra que la LTP deteriorada en ratones *Mef2c-het* también fue rescatada por NitroSynapsin. Los datos son media ± s.e.m., n = 4-5 por grupo en la FIG. 15A-G, y 7-9 en la FIG. 15H. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, por ANOVA.

La FIG. 16 muestra que los ratones *Mef2c-het* mostraron una mayor activación de la caspasa-3 y apoptosis en el hipocampo. La FIG. 16A muestra inmunohistoquímica de la caspasa-3 activada (Act Casp 3, paneles superiores) y tinción TUNEL (paneles inferiores) en la región CA3 del hipocampo de ratones WT tratados con vehículo (WT/V) o NitroSynapsin (WT/N), y en ratones *Mef2c-het* tratados con vehículo (Het/V) o NitroSynapsin (Het/N). Barras de escala, 25 µm. La FIG. 16B y la FIG. 16C presentan histogramas que muestran que las neuronas caspasa-3+ (FIG. 16B) y TUNEL+ (FIG. 16C) aumentaron significativamente en ratones Het/V en comparación con los ratones WT/V de control. Además, ambos fenotipos mejoraron en ratones Het/N. Los datos son media ± s.e.m., n = 4-5 por grupo; \*P < 0,05, por ANOVA.

La FIG. 17 muestra que la NitroSynapsin normalizó el número de astrocitos en el hipocampo *Mef2c-het*. La FIG. 17A-C presentan imágenes representativas que muestran un aumento de células GFAP+ con morfología de astrocitos en ratones *Mef2c-het* frente a WT (FIG. 17B frente a FIG. 17A). El número de células GFAP+ se restableció a los niveles WT mediante el tratamiento crónico con NitroSynapsin (FIG. 17C). ML, capa molecular del giro dentado (DG). Barra de escala, 25 µm (FIG. 17D) Cuantificación de células GFAP+ en el hipocampo de ratones WT y *Mef2c-het* tratados con vehículo (V) o NitroSynapsin (N). Los datos son media ± s.e.m., n = 4 o 5 por grupo; \*\*P < 0,01 en comparación con WT/V y \*\*P < 0,05 en comparación con Het/V por ANOVA.

La FIG. 18 muestra que los ratones *Mef2c-het* mostraron una reducción en las sinapsis y células inhibidoras de parvalbúmina+ (PV+). La FIG. 18A presenta imágenes representativas que muestran la inmunorreactividad de PV+ en el hipocampo de ratones WT tratados con vehículo (WT/V) y en ratones *Mef2c-het* tratados con vehículo (Het/V) o NitroSynapsin (Het/N). Mayor aumento de neuronas PV+ (parte inferior izquierda de cada panel) o sinapsis (parte inferior derecha de cada panel). Barra de escala, 25 µm. La FIG. 18B presenta un histograma que muestra la reducción en las sinapsis inmunorreactivas de PV- en ratones Het/V en comparación con ratones WT/V. Esta reducción mejoró significativamente después del tratamiento con NitroSynapsin. La FIG. 18C presenta un histograma que muestra la reducción en el número de células inmunorreactivas de PV- en ratones Het/V pero no en ratones Het/N en comparación con ratones WT/V. Los datos son media ± s.e.m., n = 4-5 por grupo; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 por ANOVA.

La FIG. 19 muestra los déficits rescatados en la LTP en ratones *Mef2c-het* que fueron rescatados por el tratamiento con NitroSynapsin. Trazas representativas de corrientes evocadas antes (izquierda) y después (derecha) de la inducción de la LTP hipocampal en cortes preparados a partir de ratones tratados con WT/V, Het/V y Het/N. Las pendientes de fEPSP para cada grupo de animales se presentan en la FIG. 15H en el texto.

La FIG. 20A muestra que la actividad del receptor extrasináptico N-metil-D-aspartato (eNMDAR) desencadenó la señalización que inactivó el complejo de esclerosis tuberosa 2 (TSC2) y que se atenuó por el antagonista de NMDAR nitromemantina (también conocida como NitroSynapsin, YQW-036, NMI-6979) en mayor grado que la memantina. El esquema muestra que los antagonistas del receptor NMDA bloquearon la activación de la cascada de p38 MAPK. La nitromemantina YQW-036 (también conocida como NitroSynapsin) es un antagonista más eficaz que la memantina, y por lo tanto ejerció un efecto beneficioso aún mayor (de ahí el símbolo de inhibidor más grande). La FIG. 20B muestra signos de transferencia Western de que la estimulación con eNMDAR aumentó la fosforilación/activación de la cascada de p38 MAPK/MAPKAPK2/TSC2/mTORC1/S6K1. El bloqueo de los eNMDAR con el antagonista de eNMDAR memantina (10  $\mu$ M) redujo esta señalización. Este experimento se replicó 4 veces con resultados similares, y se cuantificó en la Fig. 20 C. La FIG. 20C muestra la cuantificación de inmunotransferencias mediante la prueba de la t no pareada; media  $\pm$  s.e.m., n = 4, \*P < 0,05 (Mem, memantina).

La FIG. 21 muestra los efectos del tratamiento con memantina (M) y NitroSynapsin (N, denominada nitromemantina en la figura) sobre la integridad sináptica de ratones *Tsc2<sup>+/−</sup>* (het). La FIG. 21A muestra imágenes histológicas representativas de cortes cerebrales de ratones WT y transgénicos *Tsc2<sup>+/−</sup>* de tres meses de edad tratados con vehículo, M o N. La tinción para terminales sinápticas positivas para SY38 (sinaptofisina) (rojo) se muestra en el hipocampo. La FIG. 21B muestra la cuantificación de la inmunorreactividad de la sinaptofisina en ratones WT y transgénicos *Tsc2<sup>+/−</sup>* con tratamiento con vehículo, M o N. La integridad sináptica se midió como el porcentaje de área ocupada por SY38 inmunorreactivo. El tratamiento de ratones *Tsc2<sup>+/−</sup>* con N elevó la señal sináptica a niveles WT y fue significativamente mayor que para los tratados con vehículo. Valores presentados como % área  $\pm$  s.e.m., \*P < 0,5 mediante la prueba de la t, n = 3 ratones por grupo de tratamiento.

La FIG. 22 muestra CA1-LTP anormal en ratones *Tsc2<sup>+/−</sup>* (het) y mejora con NitroSynapsin. La FIG. 22A muestra LTP (potenciación a largo plazo) registrada a partir de cortes de hipocampo mediante matriz multielectrodo (MEA). La pendiente de fEPSP se representa gráficamente cada 30 s, y representa la media  $\pm$  s.e.m. para *Tsc2<sup>+/+</sup>* y *Tsc2<sup>+/−</sup>* (n = 7 cortes de 7 ratones). La FIG. 22B muestra los efectos del tratamiento con control de vehículo frente a 1-2  $\mu$ M de memantina o NitroSynapsin en ratones *Tsc2<sup>+/−</sup>* (n = 13 cortes de 13 ratones, P < 0,001 para la mejora de la LTP por NitroSynapsin (pero no memantina) monitorizada 55-65 minutos después de la inducción).

La FIG. 23 muestra los efectos beneficiosos del tratamiento con NitroSynapsin pero no con memantina sobre la discriminación de contexto en ratones *Tsc2<sup>+/−</sup>* (het) evaluados mediante la prueba de condicionamiento del miedo. Tiempo de congelación de ratones WT y transgénicos *Tsc2<sup>+/−</sup>* de tres meses de edad tratados con vehículo, memantina o NitroSynapsin en ensayos de condicionamiento del miedo. Los cuatro grupos de ratones evaluados (WT-vehículo, Het-vehículo, Het-memantina y Het-NitroSynapsin) mostraron congelación en el "contexto de entrenamiento" y el "contexto nuevo + señal", lo que indica que sus respuestas de miedo condicionado no se vieron afectadas por el genotipo o los fármacos. Además, los ratones WT mostraron discriminación de contexto entre el entrenamiento y los contextos nuevos (\*P = 0,032). Por el contrario, los ratones *Tsc2<sup>+/−</sup>* tratados con vehículo o memantina mostraron déficits en este comportamiento, lo que dio como resultado la falta de discriminación entre el entrenamiento y los contextos nuevos (n.s. = ninguna diferencia significativa). El tratamiento con NitroSynapsin (pero no con memantina) mejoró este fenotipo, normalizando la discriminación del contexto en ratones *Tsc2<sup>+/−</sup>* (\*\*P = 0,023). Los valores son media  $\pm$  s.e.m. (n = 7-12 ratones por grupo).

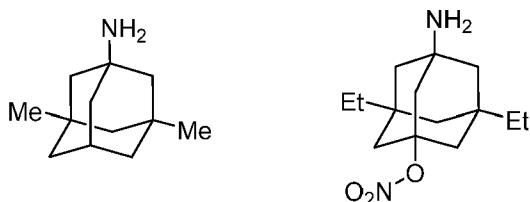
La FIG. 24 muestra un rendimiento mejorado en rotarod del modelo de ratón carente (KO) de *MeCP2* del síndrome de Rett mediante tratamiento con NitroSynapsin. Los ratones se colocaron en el cilindro estacionario, y después el cilindro se aceleró lentamente a 10 revoluciones/min. Se registró el tiempo total a 10 rpm antes de una caída del cilindro. V = tratamiento con vehículo (n = 12 para WT y n = 7 para ratones KO de *MeCP2*; M = tratamiento con memantina (n = 16 para WT y n = 13 para *MeCP2* KO; N = tratamiento con NitroSynapsin (n = 5 para WT y n = 14 para *MeCP2* KO). Los valores son  $\pm$ s.e.m.; \*P < 0,05. El tratamiento con N pero no con M ejerció un rendimiento motor significativamente mejorado en esta prueba de rotarod.

#### DESCRIPCION DETALLADA

En el cerebro, el factor de transcripción, factor potenciador de miocitos 2 (MEF2), es fundamental para la diferenciación neuronal, la formación sináptica y la supervivencia neuronal. Se ha demostrado que la inactivación condicional de *Mef2c* en las células progenitoras neuronales que expresan nestina produjo ratones con propiedades de red electrofisiológicas deterioradas y déficits conductuales que recuerdan al síndrome de Rett, un trastorno neurológico relacionado con el trastorno del espectro autista (TEA). Las regiones de microdelecciones del cromosoma 5q14.3q15 causan fenotipos de déficit neurológico en niños identificados como haploinsuficiencia de *MEF2C*. Estos pacientes presentan signos y síntomas que incluyen TEA, discapacidad intelectual y del desarrollo (IDD), mala conducta reciproca, falta de habla, conducta estereotipada y repetitiva, y epilepsia. Los trastornos causados por la haploinsuficiencia de *MEF2C* se han denominado colectivamente síndrome de haploinsuficiencia de *MEF2C* (MCHS). Además, se han identificado múltiples genes diana de MEF2 como genes relacionados con el autismo en linajes humanos con ascendencia compartida. Por lo tanto, el método terapéutico reivindicado para el MCHS también resulta útil para tratar eficazmente otras formas de TEA/IDD y epilepsia.

Se necesitan terapias mejoradas para el tratamiento del TEA, la IDD, la epilepsia y las afecciones relacionadas. En esta línea, recientemente se sintetizó una serie mejorada de medicamentos basados en una acción dual similar a la de la memantina y una inhibición basada en la oxidación-reducción (S-nitrosilación) predominantemente de los receptores NMDA extrasinápticos (eNMDAR). Inicialmente, estos compuestos se denominaron "nitromemantinas", pero recientemente el compuesto principal, YQW-036 (o NMI-6979), se denominó NitroSynapsin debido a su capacidad para restaurar el número y la función sináptica frente a múltiples agresiones. El esquema 1 muestra las estructuras de la memantina y la nitromemantina (también conocida como NitroSynapsin).

Esquema 1.



Memantina      Nitromemantina

Como se muestra en los Ejemplos aquí, los déficits neuroconductuales, el desequilibrio excitatorio/inhibitorio (E/I) y el daño histológico se mejoraron mediante el tratamiento con NitroSynapsin (también conocida como NitroMemantina YQW-036/NMI-6979 - véase la Estructura 1) en ratones *Mef2c<sup>+/−</sup>* (*Mef2c-het*). Se desarrollaron ratones *Mef2c-het* como modelo para la forma humana de TEA con haploinsuficiencia de *MEF2C*. Los ratones *Mef2c-het* mostraron anomalías neuronales y sinápticas, disminución de la transmisión sináptica inhibitoria y aumento de la excitatoria en el hipocampo, potenciación a largo plazo suprimida (LTP), y fenotipos conductuales similares a MCHS. Antes del tratamiento con NitroSynapsin, estos ratones exhibieron neurogénesis disminuida, apoptosis neuronal aumentada, una relación alterada de neurotransmisión E/I, y un fenotipo de déficits conductuales similares a los de los pacientes humanos con trastorno del espectro autista (TEA), discapacidad intelectual y del desarrollo (IDD), y epilepsia. Es importante destacar que casi todos estos fenotipos se rescataron o mitigaron con el tratamiento crónico con NitroSynapsin. Además, modelos de ratón adicionales de las enfermedades humanas del síndrome de Rett y la esclerosis tuberosa mostraron que NitroSynapsin fue igualmente eficaz para corregir los fenotipos asociados con estas otras formas de TEA/IDD y epilepsia que están asociadas con el desequilibrio E/I. Independientemente del mecanismo, se ha demostrado que NitroSynapsin es un tratamiento eficaz en múltiples modelos de ratones con TEA/IDD y epilepsia, y por lo tanto debería ser eficaz para el tratamiento del TEA/IDD y la epilepsia en seres humanos.

Fue sorprendente que NitroSynapsin tuviera eficacia para el síndrome de MCHS y otras formas de TEA/IDD y síndromes de epilepsia debido a que otros antagonistas de NMDAR, como la memantina, habían fallado en ensayos clínicos en seres humanos para este fin (Fung LK, Hardan AY. Developing medications targeting glutamatergic dysfunction in autism: Progress to date. CNS Drugs 29, 453-463 (2015); Tu S, Lipton SA, Nakanishi N, et al. NitroSynapsin therapy for the mouse MEF2C haploinsufficiency modelo of human autism. Nature Commun 8, 1488 (2017)). La NitroSynapsin funciona en este sentido porque manifiesta una eficacia superior y al mismo tiempo tiene propiedades clínicamente toleradas de evitar el bloqueo de la transmisión sináptica y la potenciación a largo plazo (LTP).

La FIG. 1 muestra un diagrama resumen de haploinsuficiencia de *Mef2c* que conduce a un desequilibrio E/I y fenotipos similares a MCHS que fueron rescatados por NitroSynapsin. La haploinsuficiencia de *Mef2c* conduce a una disminución de VGAT y un aumento de los niveles de proteína VGLUT2, lo que da como resultado un desequilibrio E/I (sobreexcitabilidad) y disfunción sináptica. La haploinsuficiencia de *Mef2c* también causa pérdida neuronal, en particular una reducción del número de interneuronas inhibidoras de PV+. Es probable que estas anomalías sinápticas y celulares sean la causa subyacente de los fenotipos conductuales similares a MCHS observados en ratones *Mef2c-het*. Los fenotipos histológicos y conductuales mejoran con el tratamiento crónico con NitroSynapsin (NitroMem) en un grado significativamente mayor que el fármaco memantina (Mem) aprobado por la FDA.

#### Afecciones neurológicas

Se proporciona aquí, como se define en las reivindicaciones, NitroSynapsin para uso en el tratamiento de un trastorno del espectro autista (TEA) en un sujeto. Los métodos pueden comprender la administración de un compuesto descrito aquí al sujeto. Los métodos pueden comprender la administración de una combinación de compuestos descritos aquí al sujeto. La afección neurológica puede estar asociada con un desequilibrio E/I, como saben evaluar los expertos en la técnica. En resumen, E/I se puede evaluar mediante varios métodos, por

- ejemplo registro eléctrico de fijación de parche para mostrar hiperexcitabilidad o déficits en la transmisión inhibitoria (Tu et al., 2017 *ibid.*). La evaluación histológica de sinapsis excitatorias e inhibidoras como se describe en Tu et al., 2017 (*ibid.*) también se puede utilizar en parte para evaluar el desequilibrio E/I. Las afecciones neurológicas en seres humanos u otros animales que pueden tratarse según los métodos descritos aquí pero no reivindicados incluyen, pero no se limitan a, cualquier forma de autismo (TEA), síndrome de haploinsuficiencia de MEF2C (MCHS), discapacidades intelectuales y del desarrollo (IDD), epilepsia, síndrome de Rett, y esclerosis tuberosa.
- Los métodos de tratamiento descritos aquí pero no reivindicados comprenden el tratamiento de una afección neurológica de inicio juvenil. Una afección neurológica de inicio juvenil es aquella en la que aparecen una o más anomalías neurológicas o conductuales durante la infancia. En algunos casos, se considera infancia entre las edades de 0 y 18 años. En algunos casos, el niño tiene entre 0 y 12 años. Los ejemplos no limitativos de anomalías neurológicas y conductuales incluyen apretar las manos, falta de contacto visual, crecimiento lento de la cabeza, convulsiones, movimientos repetitivos, reducción o pérdida del lenguaje, retorcimiento de manos, aplausos, golpeteos, agarre y liberación aleatorios, irregularidades en la respiración, reducción o pérdida de interacción social, reducción o pérdida de interacción social de habilidades de comunicación, marcha inestable, apraxia, dificultades motoras, debilidad muscular, rigidez, espasticidad, retraso psicomotor, hipotonía generalizada, contacto visual deficiente, estereotipias mano-boca, estrabismo, y dimorfismos faciales. Los ejemplos no limitativos de afecciones neurológicas de inicio juvenil incluyen trastornos del espectro autista (TEA), discapacidades intelectuales y del desarrollo (IDD), epilepsia, síndrome de haploinsuficiencia de MEF2C (MCHS), y esclerosis tuberosa. En algunos casos, la IDD comprende afecciones que caen dentro del TEA, incluido el autismo en sí. Los trastornos del espectro autista incluyen, pero no se limitan a, autismo, síndrome de Asperger, y síndrome de Rett. Otras afecciones que pueden considerarse afecciones neurológicas de inicio juvenil incluyen el trastorno por déficit de atención, el trastorno por déficit de atención con hiperactividad, el trastorno generalizado del desarrollo, y el trastorno obsesivo compulsivo. En algunos casos, la afección neurológica de inicio juvenil se debe a una lesión cerebral causada por una enfermedad/infección, traumatismo craneal, o toxicidad.
- En algunos casos, NitroSynapsin se utiliza en métodos para tratar a un sujeto con trastorno del espectro autista (TEA). Los sujetos que se incluyen en el TEA incluyen sujetos diagnosticados con autismo, síndrome de Asperger y trastorno generalizado del desarrollo no especificado de otra manera (PDD-NOS), y trastorno desintegrativo infantil. Estos sujetos presentan dificultad con la comunicación e interacción social. También pueden presentar comportamientos repetitivos. El diagnóstico de TEA puede realizarse según los criterios publicados en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales más actualizado y/o la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (ICD). Los médicos pueden administrar evaluaciones como la Entrevista de diagnóstico de autismo revisada y el Programa de observación de diagnóstico de autismo. Otras afecciones, tales como la epilepsia, esclerosis tuberosa (tumores no malignos), ansiedad, depresión, esquizofrenia, trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), y el trastorno del procesamiento sensorial a menudo son comórbidas con el TEA. Los métodos descritos aquí pueden comprender la evaluación de la gravedad del TEA o de una afección comórbida con el TEA. Los métodos pueden comprender la evaluación de la presencia y/o gravedad de uno o más síntomas del TEA o de una afección comórbida con el TEA antes de administrar al sujeto un compuesto descrito aquí. Los métodos pueden comprender la evaluación de la presencia y/o gravedad de uno o más síntomas del TEA o de una afección comórbida con el TEA después de administrar al sujeto un compuesto descrito aquí. Los métodos descritos aquí pueden dar como resultado la reducción de la gravedad de uno o más síntomas del TEA o de una afección comórbida con el TEA. En algunos casos, los métodos comprenden administrar un compuesto descrito aquí a un sujeto con TEA y proporcionar una terapia conductual al sujeto, tal como terapia del habla y del lenguaje y terapia ocupacional.
- En algunos casos, NitroSynapsin se utiliza en métodos para tratar a un sujeto con síndrome de Rett. El síndrome de Rett es un trastorno neurológico que se caracteriza por problemas con el lenguaje y la coordinación, y movimientos repetitivos. En algunos casos, los sujetos con síndrome de Rett tienen convulsiones, escoliosis y problemas para dormir. Otros síntomas incluyen disminución del crecimiento de la cabeza (antes de los 4 años), reducción o pérdida del control de las manos, reducción o pérdida del lenguaje, retorcimiento de manos, aplausos, golpeteos, agarre y liberación aleatorios, irregularidades en la respiración, reducción o pérdida de la interacción social, reducción o pérdida de la interacción social de las habilidades de comunicación, marcha inestable, apraxia, dificultades motoras, debilidad muscular, rigidez, y espasticidad. Los métodos pueden comprender la administración de uno o más compuestos descritos aquí a un sujeto con síndrome de Rett en combinación con medicamentos utilizados para tratar el síndrome de Rett, incluidos, pero sin limitarse a, somníferos, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, antipsicóticos, y betabloqueantes, o una combinación de los mismos. Los métodos pueden comprender evaluar la presencia y/o la gravedad de los síntomas del sujeto antes de administrar un compuesto descrito aquí al sujeto con síndrome de Rett. Los métodos pueden comprender evaluar la presencia y/o la gravedad de los síntomas del sujeto después de administrar un compuesto descrito aquí al sujeto con síndrome de Rett. Los métodos descritos aquí pueden dar como resultado la reducción de la gravedad de uno o más de los síntomas del sujeto con síndrome de Rett. Los métodos descritos aquí pueden dar como resultado el alivio de uno o más de los síntomas del sujeto con

síndrome de Rett.

En algunos casos, NitroSynapsin se utiliza en métodos para tratar a un sujeto con esclerosis tuberosa. La esclerosis tuberosa (TSC) es un trastorno autosómico dominante causado por mutaciones heterocigotas en el gen *TSC1* o *TSC2*. La TSC a menudo se asocia con déficits neurológicos, cognitivos y conductuales. Los pacientes con TSC pueden expresar comorbilidad con ansiedad y trastornos del estado de ánimo. Los síntomas neurológicos relacionados con la TSC pueden estar acompañados de actividad glutamatérgica excesiva y estructuras de la espina sináptica alteradas. La esclerosis tuberosa es una afección que generalmente se caracteriza por tumores benignos. Estos tumores pueden aparecer en órganos tales como el cerebro, el corazón, los riñones, el hígado, los ojos, los pulmones y la piel. Los síntomas incluyen, pero no se limitan a, signos de TEA, convulsiones, discapacidades cognitivas, anomalías conductuales (por ejemplo, agresión, trastorno por déficit de atención con hiperactividad, trastorno obsesivo compulsivo, autolesión), afecciones de la piel, enfermedad pulmonar y enfermedad renal. Existen pocas opciones de tratamiento para esta afección, pero everolimus se ha aprobado para el tratamiento de tumores en el cerebro y los riñones. Los métodos pueden comprender la administración de uno o más compuestos descritos aquí a un sujeto con esclerosis tuberosa en combinación con everolimus, intervención neuroquirúrgica, o una combinación de los mismos. Los métodos pueden comprender la evaluación de la presencia y/o gravedad de los síntomas del sujeto antes de administrar un compuesto descrito aquí al sujeto con esclerosis tuberosa. Los métodos pueden comprender la evaluación de la presencia y/o gravedad de los síntomas del sujeto después de administrar un compuesto descrito aquí al sujeto con esclerosis tuberosa. Los métodos descritos aquí pueden dar como resultado la reducción de la gravedad de uno o más de los síntomas del sujeto con esclerosis tuberosa. Los métodos descritos aquí pueden dar como resultado el alivio de uno o más de los síntomas del sujeto con esclerosis tuberosa.

En algunos casos, NitroSynapsin se utiliza en métodos para tratar a un sujeto con haploinsuficiencia de *MEF2C*. El síndrome de haploinsuficiencia de *MEF2C* (MCHS) es un trastorno del desarrollo neurológico asociado con discapacidad intelectual, características autistas, epilepsia y movimientos anormales. Los síntomas incluyen, pero no se limitan a, retraso psicomotor, hipotonía generalizada, mal contacto visual, estereotipias mano-boca, estrabismo y dimorfismos faciales menores. Algunos síntomas pueden deberse a una relación excitatoria a inhibitoria (relación E/I) alterada de la actividad eléctrica normal en el cerebro. Los métodos descritos aquí pueden comprender restaurar la relación E/I hacia un intervalo normal (por ejemplo, el de una persona sin haploinsuficiencia de *MEF2C*) y mejorar los signos de TEA. Los métodos pueden comprender evaluar la presencia y/o gravedad de los síntomas del sujeto antes de administrar un compuesto descrito aquí al sujeto con haploinsuficiencia de *MEF2C*. Los métodos pueden comprender la evaluación de la presencia y/o gravedad de los síntomas del sujeto después de administrar un compuesto descrito aquí al sujeto con haploinsuficiencia de *MEF2C*. Los métodos descritos aquí pueden dar como resultado la reducción de la gravedad de uno o más de los síntomas de haploinsuficiencia de *MEF2C* del sujeto. Los métodos descritos aquí pueden dar como resultado el alivio de uno o más de los síntomas de haploinsuficiencia de *MEF2C* del sujeto.

En algunos casos, NitroSynapsin se utiliza en métodos para tratar a un sujeto, en los que el sujeto es un niño. El niño puede tener menos de alrededor de 14 años, menos de alrededor de 13 años, menos de alrededor de 12 años o menos de alrededor de 10 años. En algunos casos, el sujeto tiene más de 1 año, más de 2 años, más de 3 años, más de 4 años o más de 5 años.

Dichos métodos descritos aquí, pero no reivindicados, pueden comprender la selección de un sujeto para el tratamiento. En algunos casos, el sujeto se selecciona en función de la expresión de un gen en el sujeto. En algunos casos, el sujeto se selecciona en función de una secuencia de un gen en el sujeto. En algunos casos, el sujeto se selecciona en función de una mutación en un gen en el sujeto. La mutación puede ser una mutación por delección. La mutación por delección puede ser una haploinsuficiencia (por ejemplo, haploinsuficiencia de *MEF2C*). La mutación puede ser una mutación por desplazamiento del marco de lectura. La mutación puede ser un polimorfismo de un solo nucleótido. En algunos casos, el sujeto se selecciona en función de la expresión del sujeto de una proteína codificada por el gen. En algunos casos, el sujeto se selecciona en función de la actividad de la proteína codificada por el gen. El gen puede ser *MEF2C*, que codifica el factor potenciador de miocitos 2C (*MEF2C*). El gen puede ser *SLC32A1*, que codifica el transportador vesicular de ácido γ-aminobutírico (GABA) (VGAT). El gen puede ser *SLC17A6*, que codifica el transportador vesicular de glutamato 2 (VGLUT2). El gen puede ser *SYP*, que codifica la proteína sinaptofisina, también conocida como proteína p38 de la vesícula sináptica mayor. El gen puede ser *GAD65*, que codifica la descarboxilasa del ácido glutámico.

Estos métodos pueden comprender la obtención de un nivel de expresión de un gen descrito aquí. Los métodos pueden comprender la obtención de un nivel de expresión de una proteína descrita aquí. Los métodos pueden comprender la obtención de información sobre la actividad de una proteína descrita aquí. Los métodos pueden comprender el análisis de un nivel de expresión de un gen descrito aquí. Los métodos pueden comprender el análisis de un nivel de expresión de una proteína descrita aquí. Los métodos pueden comprender el análisis de información sobre la actividad de una proteína descrita aquí. Los métodos pueden comprender la cuantificación de un nivel de expresión de un gen descrito aquí. Los métodos pueden comprender la cuantificación de un nivel de expresión de una proteína descrita aquí. Los métodos pueden comprender la cuantificación de información sobre la actividad de una proteína descrita aquí. La cuantificación y análisis de la expresión y la actividad de

genes y proteínas, respectivamente, son bien conocidos en la técnica. Ejemplos no limitativos de cuantificación y análisis de la expresión génica son q-PCR, micromatrices, secuenciación, y transferencia Northern. Los métodos pueden comprender el análisis de la expresión específica de alelos. Ejemplos no limitativos de cuantificación y análisis de la expresión y actividad de proteínas son inmunohistoquímica, transferencia Western, inmunoprecipitación, citometría de flujo, inmunofluorescencia, y combinaciones de las mismas. Los métodos pueden comprender la secuenciación de un gen descrito aquí.

Los métodos pueden comprender la obtención de un nivel de expresión de un gen descrito aquí, en los que el nivel de expresión es el de una célula del sujeto. Los métodos pueden comprender la obtención de una célula del sujeto. Los métodos pueden comprender el aislamiento de una célula del sujeto. La célula puede ser una célula cerebral. La célula puede ser una célula circulante. La célula puede ser una célula que circula en el líquido cefalorraquídeo. La célula puede ser una célula sanguínea. La célula puede ser una célula cutánea. La célula puede ser una célula epitelial. La célula puede ser una célula madre pluripotente inducida humana derivada de una biopsia de piel de un paciente y diferenciada en una neurona u otras células cerebrales (por ejemplo, astrocitos, oligodendrocitos y microglia) y analizada en un sistema de cultivo bidimensional (2D) o en un organoide cerebral 3D, una pequeña estructura similar a un cerebro producida *in vitro* y por lo tanto capaz de modelar una "enfermedad en una placa".

La obtención del nivel de expresión del gen puede comprender aislar un ácido nucleico libre de células del sujeto. El ácido nucleico libre de células puede comprender ARN. El ácido nucleico libre de células puede comprender ARN mensajero. El ácido nucleico libre de células puede consistir esencialmente en ARN mensajero. El ácido nucleico libre de células puede comprender ADN. El ADN puede ser ADN metilado. La obtención del nivel de expresión del gen puede comprender aislar un ácido nucleico libre de células del sujeto. El ácido nucleico libre de células puede ser ácido nucleico libre de células circulante. Los métodos pueden comprender la obtención de una muestra del sujeto, en los que la muestra contiene el ácido nucleico libre de células. Ejemplos no limitativos de tales muestras son sangre completa, plasma, suero, orina, líquido cefalorraquídeo, y saliva.

Los métodos descritos aquí, pero no reivindicados, pueden comprender cuantificar un nivel de expresión de *SLC32A1* en un sujeto, o una célula del mismo, o un fluido biológico del mismo. El sujeto puede tener una haploinsuficiencia de *MEF2C*. El sujeto puede no tener una haploinsuficiencia de *MEF2C*. El sujeto puede tener un nivel de expresión de *SLC32A1* significativamente reducido con respecto al promedio de una pluralidad de sujetos de control que tienen dos copias del gen *MEF2C*. El sujeto puede tener un nivel de expresión de *SLC32A1* significativamente reducido con respecto al promedio de una pluralidad de sujetos de control que no presentan signos o síntomas de un trastorno neurológico. El sujeto puede tener un nivel de expresión de *SLC32A1* significativamente reducido con respecto al promedio de una pluralidad de sujetos de control que no presentan signos o síntomas de un trastorno neurológico descrito aquí. Significativamente reducido puede ser al menos aproximadamente 10% reducido, al menos aproximadamente 20% reducido, al menos aproximadamente 30% reducido, al menos aproximadamente 40% reducido, al menos aproximadamente 50% reducido, al menos aproximadamente 75% reducido, o aproximadamente 100% reducido.

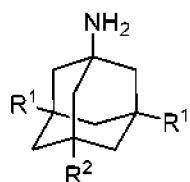
Los métodos descritos aquí, pero no reivindicados, pueden comprender la cuantificación de un nivel de expresión de *SLC17A6* en un sujeto, o una célula del mismo, o un fluido biológico del mismo. El sujeto puede tener una haploinsuficiencia de *MEF2C*. El sujeto puede no tener una haploinsuficiencia de *MEF2C*. El sujeto puede tener un aumento significativo del nivel de expresión de *SLC17A6* con respecto al promedio de una pluralidad de sujetos de control que tienen dos copias del gen *MEF2C*. El sujeto puede tener un nivel de expresión de *SLC17A6* significativamente aumentado con respecto al promedio de una pluralidad de sujetos de control que no presentan signos ni síntomas de un trastorno neurológico. El sujeto puede tener un nivel de expresión de *SLC17A6* significativamente aumentado con respecto al promedio de una pluralidad de sujetos de control que no presentan signos ni síntomas de un trastorno neurológico descrito aquí. Significativamente aumentado puede ser al menos aproximadamente 10% aumentado, al menos aproximadamente 20% aumentado, al menos aproximadamente 30% aumentado, al menos aproximadamente 40% aumentado, al menos aproximadamente 50% aumentado, al menos aproximadamente 75% aumentado, o aproximadamente 100% aumentado.

Los métodos descritos aquí, pero no reivindicados, pueden comprender la cuantificación de un nivel de expresión de sinaptofisina (SYP), una proteína presináptica, en un sujeto, o una célula del mismo, o un fluido biológico del mismo. El sujeto puede tener una haploinsuficiencia de *MEF2C*. El sujeto puede no tener una haploinsuficiencia de *MEF2C*. El sujeto puede tener un nivel de expresión de SYP significativamente reducido con respecto al promedio de una pluralidad de sujetos de control que no presentan signos ni síntomas de un trastorno neurológico. El sujeto puede tener un nivel de expresión de SYP significativamente reducido con respecto al promedio de una pluralidad de sujetos de control que no presentan signos ni síntomas de un trastorno neurológico descrito aquí. Significativamente reducido puede ser al menos aproximadamente 10% reducido, al menos aproximadamente 20% reducido, al menos aproximadamente 30% reducido, al menos aproximadamente 40% reducido, al menos aproximadamente 50% reducido, al menos aproximadamente 75% reducido, o aproximadamente 100% reducido.

Los métodos descritos aquí, pero no reivindicados, pueden comprender la cuantificación de un nivel de expresión de *GAD65* en un sujeto, o una célula del mismo, o un fluido biológico del mismo. El sujeto puede tener una haploinsuficiencia de *MEF2C*. El sujeto puede no tener una haploinsuficiencia de *MEF2C*. El sujeto puede tener un nivel de expresión de *GAD65* significativamente reducido con respecto al promedio de una pluralidad de sujetos de control que tienen dos copias del gen *MEF2C*. El sujeto puede tener un nivel de expresión de *GAD65* significativamente reducido con respecto al promedio de una pluralidad de sujetos de control que no presentan signos ni síntomas de un trastorno neurológico. El sujeto puede tener un nivel de expresión de *GAD65* significativamente reducido con respecto al promedio de una pluralidad de sujetos de control que no presentan signos ni síntomas de un trastorno neurológico descrito aquí. Significativamente reducido puede ser al menos aproximadamente 10% reducido, al menos aproximadamente 20% reducido, al menos aproximadamente 30% reducido, al menos aproximadamente 40% reducido, al menos aproximadamente 50% reducido, al menos aproximadamente 75% reducido, o aproximadamente 100% reducido.

Compuestos

Se describe aquí un inhibidor de NMDAR para uso en un método para tratar el trastorno del espectro autista (TEA), el síndrome de Rett y/o la esclerosis tuberosa en un sujeto que lo necesita, en el que el inhibidor de NMDAR es NitroSynapsin de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma:



Fórmula I

en la que cada  $\text{R}^1$  es  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ; y  $\text{R}^2$  es  $-\text{ONO}_2$ .

Formulaciones

Los métodos, no reivindicados, pueden comprender administrar a un sujeto una dosis de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 25 mg de un compuesto según la reivindicación 1. Tales métodos pueden comprender administrar a un sujeto una dosis de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 20 mg de un compuesto descrito aquí. Los métodos pueden comprender administrar a un sujeto una dosis de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 5 mg de un compuesto descrito aquí. Los métodos pueden comprender administrar a un sujeto una dosis de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 mg de un compuesto descrito aquí. Los métodos pueden comprender administrar a un sujeto una dosis de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 15 mg de un compuesto descrito aquí. Los métodos pueden comprender administrar a un sujeto una dosis de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 20 mg de un compuesto descrito aquí. Los métodos pueden comprender administrar a un sujeto una dosis de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg de un compuesto descrito aquí. Los métodos pueden comprender administrar a un sujeto una dosis de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 20 mg de un compuesto descrito aquí. Una dosis de 1 a 5 mg de compuesto por día para un niño (paciente pediátrico) puede ser suficiente. La dosis puede aumentarse lentamente según la tolerancia hasta aproximadamente 20 mg por día en dosis divididas. La dosis puede aumentarse lentamente durante una o más semanas.

Los métodos, no reivindicados, pueden comprender la administración de una dosis de un compuesto descrito aquí una vez al día. Los métodos pueden comprender la administración de una dosis descrita aquí una vez al día. Los métodos pueden comprender la administración de una dosis descrita aquí dos veces al día. Los métodos pueden comprender la administración de una primera dosis en un primer momento durante un día y una segunda dosis en un segundo momento durante el día. La primera dosis y la segunda dosis pueden ser iguales. La primera dosis y la segunda dosis pueden ser diferentes.

Los métodos descritos aquí, pero no reivindicados, pueden comprender aumentar una dosis diaria de un compuesto descrito aquí a lo largo del tiempo. Por ejemplo, los métodos pueden comprender administrar al menos un compuesto descrito aquí en una primera dosis durante una primera semana, y administrar el al menos un compuesto en una segunda dosis durante una segunda semana, en los que la primera dosis y la segunda dosis son diferentes. En algunos casos, la segunda dosis es mayor que la primera dosis. En algunos casos, la segunda dosis es menor que la primera dosis.

Los métodos descritos aquí, pero no reivindicados, pueden comprender la administración oral a un sujeto de al menos un compuesto descrito aquí. El compuesto puede formularse como un comprimido o una cápsula. El compuesto puede formularse como una disolución líquida. La disolución líquida puede tragarse. La disolución

líquida puede administrarse mediante un gotero o una pipeta. Como alternativa o adicionalmente, la administración puede comprender la inyección del compuesto (administración parenteral), la aplicación del compuesto por vía tópica, la inhalación del compuesto, la administración del compuesto por vía transnasal al cerebro, o cualquier combinación de las anteriores.

- 5 Los métodos descritos aquí, pero no reivindicados, pueden comprender la administración de una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto descrito aquí. La composición farmacéutica puede comprender un diluyente, excipiente, vehículo farmacéuticamente aceptable, o una combinación de los mismos. La expresión "farmacéuticamente aceptable", como se utiliza aquí, se refiere a un material que no anula la actividad biológica o las propiedades de los compuestos descritos aquí, y es relativamente no tóxico (es decir, la toxicidad del material supera significativamente el beneficio del material). En algunos casos, un material farmacéuticamente aceptable puede administrarse a un individuo sin causar efectos biológicos indeseables significativos o interactuar significativamente de manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.
- 10 15 Las composiciones farmacéuticas descritas aquí pueden formularse utilizando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables, incluyendo excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los agentes activos en preparaciones que se utilizan farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida. Se puede encontrar un resumen de las composiciones farmacéuticas, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, decimonovena edición (Easton, Pensilvania: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, 1975; Liberman, HA y Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Nueva York, NY, 1980; y Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, séptima edición (Lippincott Williams & Wilkins, 1999).
- 20 25 30 Las composiciones farmacéuticas descritas aquí pueden comprender uno o más diluyentes, excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir otros agentes medicinales o farmacéuticos, vehículos, adyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizadores, humectantes o emulsionantes, promotores de la disolución, sales para regular la presión osmótica y/o amortiguadores. Además, las composiciones farmacéuticas también contienen otras sustancias terapéuticamente valiosas.
- 35 Las composiciones farmacéuticas descritas aquí pueden administrarse a un sujeto mediante cualquier vía de administración adecuada, incluyendo, pero sin limitarse a, administración parenteral (intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravascular, intratecal, intravítreo, infusión o local), tópica, oral o nasal.
- 40 45 Las formulaciones adecuadas para inyección intramuscular, subcutánea, peritumoral, o intravenosa pueden incluir disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles fisiológicamente aceptables, y polvos estériles para reconstitución en disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Ejemplos de portadores, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (propilenglicol, polietilenglicol, glicerol, cremophor y similares), mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tal como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables tal como oleato de etilo. La fluidez adecuada se mantiene, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos. Las formulaciones adecuadas para inyección subcutánea también contienen aditivos opcionales tales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes y dosificadores.
- 50 Para inyecciones intravenosas, un agente activo puede formularse opcionalmente en disoluciones acuosas, preferiblemente en amortiguadores fisiológicamente compatibles tal como disolución de Hank, disolución de Ringer o un amortiguador salino fisiológico.
- 55 60 Las inyecciones parenterales implican opcionalmente una inyección en bolo o una infusión continua. Las formulaciones para inyección se presentan opcionalmente en forma de dosificación unitaria, por ejemplo en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido. La composición farmacéutica descrita aquí puede estar en una forma adecuada para inyección parenteral tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones estériles en vehículos aceitosos o acuosos, y contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de un agente activo en forma soluble en agua. Además, las suspensiones se preparan opcionalmente como suspensiones oleosas para inyección adecuadas.

## EJEMPLOS

**EJEMPLO 1** Los ratones *Mef2c-het* manifiestan comportamientos similares a los de MCHS y una viabilidad reducida

La expresión de la proteína MEF2C fue significativamente menor ( $P < 0,01$ ) en ratones *Mef2c-het* que en sus

compañeros de camada de tipo salvaje (WT) (FIG. 2), y se observó un número significativo de muertes tempranas en los ratones *Mef2c-het* (FIG. 3A). Se contó el número de animales viables de los cruces entre los padres WT y *Mef2c-het*. Mientras que el número de crías WT y *Mef2c-het* fueron aproximadamente iguales en el día embrionario (E)18 (28 frente a 23, respectivamente), la relación de ratones supervivientes *Mef2c-het* frente a

WT fue 44% y 40% en el día postnatal (P)21 y 90, respectivamente. La diferencia entre la supervivencia en E18 y en la edad adulta fue significativa ( $P < 0,05$  por Chi-cuadrado). Además de la viabilidad reducida, los ratones *Mef2c-het* que sobrevivieron hasta los 3 meses de edad mostraron una disminución (~14%) en el peso corporal en comparación con sus contrapartes WT ( $31,9 \pm 1,0$  g para WT frente a  $27,4 \pm 0,8$  g para *Mef2c-het*:  $P < 0,001$  por prueba de la t de Student).

Para determinar si los ratones *Mef2c-het* adultos muestran fenotipos similares a MCHS, se realizaron pruebas de comportamiento en ratones *Mef2c-het* machos y sus compañeros de camada WT ( $\geq 3$  meses de edad). De manera similar a los pacientes humanos que muestran deterioro cognitivo, los ratones *Mef2c-het* tuvieron un rendimiento deficiente en el laberinto de Barnes, una prueba que mide el aprendizaje espacial y la función de la memoria. Los ratones *Mef2c-het* tardaron significativamente más tiempo en encontrar el túnel de escape durante las sesiones de entrenamiento (FIG. 3B). En pruebas de sondeo posteriores, los ratones WT, pero no los ratones *Mef2c-het*, mostraron una preferencia por el cuadrante diana en comparación con el cuadrante opuesto (FIG. 3C), lo que sugiere una memoria espacial deteriorada en los ratones *Mef2c-het*. Los ratones *Mef2c-het* manifestaron estereotipias, incluyendo un comportamiento anormal de agarre de las patas (FIG. 3D) y una introducción repetida de la cabeza en la prueba de exploración del tablero con orificios (FIG. 2E). En conjunto, estos resultados sugieren que los ratones *Mef2c-het* muestran una amplia gama de fenotipos similares al MCHS que modelan el MCHS.

#### **EJEMPLO 2 Los genes que regulan la neurogénesis y la función sináptica están regulados negativamente en ratones *Mef2c-het***

Para identificar las rutas moleculares subyacentes a la patogénesis del MCHS, se analizó mediante micromatrizes la expresión génica de ratones *Mef2c-het* frente a compañeros de camada WT. Se identificó un total de 783 genes cuyos niveles de expresión se alteraron significativamente en el hipocampo, incluidos 394 regulados a la baja y 389 regulados al alza en ratones *Mef2c-het* (FIG. 4A, encima de la línea verde). Con estos datos, utilizando el análisis de la ruta NextBio, se identificaron los principales biogrupos neuronales que estaban regulados negativamente por haploinsuficiencia de *Mef2c* en ratones, incluidos biogrupos para la neurogénesis, la diferenciación neuronal y la función sináptica (FIG. 4B). Al mismo tiempo, el biogrupo para la regulación de la muerte celular neuronal estaba aumentado (FIG. 4B). Los resultados de la micromatriz se confirmaron mediante qPCR utilizando ARN extraídos de ratones de 3 meses de edad (FIG. 4C). En consonancia con el análisis de NextBio, el nivel de ARNm del transportador vesicular de ácido γ-aminobutírico (GABA) VGAT (codificado por *Slc32a1*), que representa un marcador presináptico inhibidor, disminuyó significativamente en ratones *Mef2c-het*. También se examinó el nivel de ARNm de los transportadores de glutamato vesicular 1/2 (VGLUT1/2), que representan marcadores sinápticos excitatorios, y se encontró que el nivel de VGLUT2, pero no de VGLUT1, aumentó significativamente en ratones *Mef2c-het*, lo que indica una disfunción de la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria en estos ratones.

#### **EJEMPLO 3. Reducción neuronal y transmisión sináptica excitatoria / inhibitoria (E / I) alterada en ratones *Mef2c-het***

En experimentos histológicos que utilizan el disector óptico como un método de conteo estereológico imparcial, el número total de células NeuN+ (es decir, neuronas) disminuyó significativamente en ratones *Mef2c-het* en comparación con WT en el hipocampo ( $69,5 \pm 1,6\%$  del valor de control WT,  $P < 0,01$  mediante la prueba de la t de Student) y la corteza frontal ( $79,8 \pm 5,1\%$  del control WT,  $P < 0,05$ ) (FIG. 5A, FIG. 5B). A diferencia de las células NeuN+, el número de células de proteína ácida fibrilar glial (GFAP)± aumentó significativamente en ratones *Mef2c-het* en comparación con los WT tanto en el hipocampo ( $123,0 \pm 6,8\%$  del control WT,  $P < 0,01$ ) como en la corteza frontal ( $135,16 \pm 11,70\%$  del control WT,  $P < 0,05$ ) (FIG. 5C, FIG. 5D).

Se realizó tinción de Golgi en cerebros *Mef2c-het* y WT para determinar los patrones de ramificación dendrítica de las células piramidales en la capa V del cerebrocortex utilizando el software Neurolucida en imágenes de montaje 3D (FIG. 5E). Los análisis de Sholl indicaron que la complejidad dendrítica de las neuronas *Mef2c-het* se redujo significativamente, como lo demuestra la disminución de las interacciones dendríticas (FIG. 5F) y la disminución de las longitudes dendríticas totales (FIG. 5G).

Para explicar aún más la disminución en el número neuronal, además de la reducción conocida en la neurogénesis embrionaria mediada por la deficiencia de MEF2C, la neurogénesis adulta se caracterizó en la zona subgranular (SGZ) del giro dentado (DG) de ratones *Mef2c-het* de 2-3 meses de edad, y se observó una disminución tanto en el número de células proliferantes (PCNA+, FIG. 6A, FIG. 6B) como en el de neuronas en desarrollo (DCX+, FIG. 6A, FIG. 6C). El número de células NeuN+ marcadas con BrdU también se redujo en el DG (FIG. 6D, FIG. 6E). Estos resultados sugieren que la neurogénesis adulta reducida en ratones *Mef2c-het* contribuye a la reducción de neuronas. Además, el desarrollo y la complejidad de las neuronas recién formadas,

visualizadas a través de la transducción génica mediada por retrovirus de mCherry, también disminuyeron en el DG *Mef2c-het*, como lo indica la disminución del tamaño somal y la longitud dendrítica (FIG. 6F-I). Por lo tanto, la haploinsuficiencia de *Mef2c* da como resultado una disminución del número neuronal, neurogénesis adulta deteriorada, y una disminución de la complejidad dendrítica en ratones.

Se examinó subsiguientemente las sinapsis de los ratones *Mef2c-het*. En consonancia con el análisis de micromatrizes que predecía una alteración en las proteínas sinápticas, la inmunohistoquímica confocal cuantitativa mostró que la expresión de sinaptofisina (SYP), un marcador presináptico, disminuyó significativamente en el hipocampo de los ratones *Mef2c-het* (FIG. 7A, FIG. 7B). Para definir mejor el déficit sináptico, se examinaron los niveles de expresión de la proteína sináptica excitatoria predominante VGLUT1 y la proteína sináptica inhibidora VGAT mediante inmunohistoquímica confocal cuantitativa en el hipocampo (FIG. 7A). La expresión de VGAT, pero no de VGLUT1, disminuyó significativamente en ratones *Mef2c-het* (FIG. 7B). Además, se realizaron experimentos de immunotransferencia en lisados enriquecidos con sinaptosomas del hipocampo, y se encontró que los niveles de SYP y GAD65 (otro marcador neuronal inhibidor), pero no de VGLUT1, estaban regulados a la baja en ratones *Mef2c-het* (FIG. 8A). La relación de VGLUT1 (neuronas excitadoras) a GAD65 (neuronas inhibidoras) aumentó significativamente en ratones *Mef2c-het* (FIG. 8B), un signo de desequilibrio E/I. Además, a diferencia de VGLUT1 y en línea con los hallazgos del ARNm, la proteína VGLUT2, que normalmente se expresa sólo en niveles muy bajos en el hipocampo adulto, se reguló positivamente de manera significativa en *Mef2c-het* frente a WT (FIG. 8C). En conjunto, estos hallazgos indican una expresión aberrante de proteínas sinápticas excitatorias e inhibidoras en el hipocampo *Mef2c-het*.

Para determinar si estas alteraciones en la expresión del marcador E/I estaban acompañadas de anomalías en la transmisión sináptica funcional, se registraron corrientes postsinápticas excitatorias e inhibitorias en miniatura espontáneas (mEPSCs/mIPSCs) de cortes de hipocampo de ratones *Mef2c-het* y WT. A partir de la teoría de la liberación cuántica, un cambio en la frecuencia en miniatura refleja un cambio en la liberación de neurotransmisores presinápticos o en el número de sinapsis, mientras que se piensa que un cambio en la amplitud en miniatura representa un cambio en la función postsináptica, por ejemplo el número de receptores postsinápticos. Los ratones *Mef2c-het* mostraron una frecuencia de mIPSC reducida (manifestada como un intervalo entre eventos aumentado en la FIG. 7C, FIG. 7G), en consonancia con la reducción general en VGAT presináptica, dendritas y sinapsis. También se observó una amplitud reducida de mIPSC (FIG. 7C, FIG. 7E), posiblemente reflejando el hecho de que se sabe que los niveles de MEF2 se correlacionan con la expresión de subunidades específicas del receptor GABA. Curiosamente, estos ratones también mostraron un aumento en la frecuencia de mEPSC (manifestado como un intervalo entre eventos disminuido, FIG. 7D, FIG. 7F), similar a un informe previo de aumento de la frecuencia de mEPSC en ratones carentes de *Mef2c* específicos del cerebro. Este resultado también fue consistente con el hallazgo de aumento de la expresión de VGLUT2 presináptica en el hipocampo *Mef2c-het*. La ligera reducción en la amplitud de mEPSC (FIG. 7D, FIG. 7H) se relaciona con el hecho de que MEF2 transcripcionalmente regula positivamente normalmente la expresión del receptor de glutamato. Se esperaría que el cambio general en mIPSC y mEPSC diera como resultado una relación E/I elevada en ratones *Mef2c-het*. De hecho, como se determinó por el cociente de los valores medios de mEPSC a mIPSC, los ratones *Mef2c-het* manifestaron un aumento del 116,2% en la relación de frecuencia E/I y un aumento del 25,7% en la relación de amplitud E/I en comparación con los ratones WT, lo que confirma la existencia de un desequilibrio funcional E/I.

Para determinar si estos defectos neuronales y sinápticos tienen un efecto perjudicial sobre la plasticidad sináptica y los circuitos neuronales, se registró la LTP del hipocampo. Los ratones *Mef2c-het* mostraron una LTP reducida en la región CA1 del hipocampo (FIG. 9A). La facilitación de pulsos emparejados (PPF) representa una mejora a corto plazo de la función presináptica en respuesta al segundo de dos estímulos emparejados causados por Ca<sup>2+</sup> residual en la terminal presináptica después de la primera estimulación. Por ejemplo, una PPF reducida se asocia con una mayor probabilidad de liberación de neurotransmisores. Se observó una disminución estadística de la PPF en *Mef2c-het* con respecto a los ratones WT (FIG. 9B), en consonancia con el pequeño aumento observado en la frecuencia de mEPSC (FIG. 7D, FIG. 7F). En conjunto, estos resultados muestran que los ratones *Mef2c-het* manifiestan un número reducido de neuronas, acompañado de déficits sinápticos con neurotransmisión sináptica inhibitoria disminuida y neurotransmisión sináptica excitatoria aumentada, lo que conduce a un desequilibrio E/I.

#### 55 EJEMPLO 4 La NitroSynapsin rescata comportamientos similares a los del autismo en ratones *Mef2c-het*

Se trató a ratones machos *Mef2c-het* o WT con NitroSynapsin o PBS durante 3 meses. Después, se realizaron análisis conductuales, electrofisiológicos e histológicos para determinar los efectos de este fármaco. Es importante destacar que el tratamiento con NitroSynapsin de ratones WT no mostró efectos en el laberinto acuático de Morris, EPSC o LTP.

60 Se utilizaron pruebas neuroconductuales para determinar si el tratamiento de ratones *Mef2c-het* con NitroSynapsin podría rescatar fenotipos conductuales autistas/similares a MCHS. Primero se realizó el laberinto acuático de Morris para probar el efecto sobre el aprendizaje espacial y la memoria (FIG. 10A, FIG. 10B). Durante las sesiones de entrenamiento de plataforma oculta, los ratones *Mef2c-het* (Het/V) tratados con vehículo

mostraron un aprendizaje espacial deteriorado en los primeros dos días al tardar más en encontrar la plataforma oculta que los ratones WT (WT/V) tratados con vehículo (FIG. 10A). Sin embargo, los ratones *Mef2c-het* tratados con NitroSynapsin (Het/N) mostraron un rendimiento mejorado con respecto al vehículo durante estas pruebas. Esta mejora no se pudo atribuir a un aumento en la velocidad de natación per se, ni la heterocigosisidad de *Mef2c* ni el tratamiento con NitroSynapsin afectaron la velocidad de natación (FIG. 11). Veinticuatro horas después de que todos los grupos de ratones alcanzaran los criterios (20 segundos para encontrar la plataforma oculta), se realizaron pruebas de sondeo para examinar la retención de la memoria. Como se muestra en la FIG. 10B, los ratones WT/V mostraron una retención de la memoria normal al pasar un tiempo significativamente más largo en el cuadrante diana, en el que se encontraba previamente la plataforma oculta. Por el contrario, los ratones Het/V mostraron una memoria deteriorada al no mostrar una preferencia por el cuadrante diana con respecto al cuadrante opuesto. Curiosamente, los ratones Het/N pasaron significativamente más tiempo en el cuadrante diana que en el cuadrante opuesto, una señal de que el tratamiento con NitroSynapsin normalizó la función de la memoria (FIG. 10A, FIG. 10B). A continuación, se realizó una prueba de campo abierto, una prueba de 30 minutos para evaluar la actividad locomotora general. Los ratones Het/V mostraron una actividad central mejorada (FIG. 10C), pero no una actividad total (FIG. 10D). Este comportamiento anormal se rescató mediante un tratamiento crónico con NitroSynapsin. El fármaco también corrigió el comportamiento repetitivo anormal de aumento de la introducción de la cabeza de los ratones *Mef2c-het* en la prueba de exploración del tablero con orificios (FIG. 10E). Además, se realizó una prueba de comportamiento de interacción social. Los ratones WT/V pasaron significativamente más tiempo en una cámara con un ratón extraño 1 (S1) que en una cámara con una jaula similar pero vacía (FIG. 10E). Sin embargo, los ratones Het/V no mostraron preferencia por el tiempo pasado en ninguna de las cámaras (FIG. 10F, FIG. 10G), un signo de capacidad social deteriorada. Además, los ratones Het/V visitaron significativamente menos S1 y durante tiempos más cortos por visita que los ratones WT/V (FIG. 10H, FIG. 10I). El tratamiento con NitroSynapsin mejoró este comportamiento social anormal. Es importante destacar que los experimentos de viabilidad iniciales, en los que se trató a ratones *Mef2c het* con una dosis equimolecular en una comparación directa entre memantina y nitrosinaxina, demostraron la superioridad de NitroSynapsin en estos paradigmas de comportamiento (FIG. 12A). Además, el tratamiento con NitroSynapsin no alteró significativamente el comportamiento social de los ratones WT (FIG. 13).

En conjunto, estos resultados muestran que el tratamiento crónico de ratones *Mef2c-het* con NitroSynapsin mejoró significativamente los déficits cognitivos, el comportamiento repetitivo, las interacciones sociales deterioradas y posiblemente la ansiedad alterada. Cabe destacar que los ratones *Mef2c-het* no mostraron conductas motoras aberrantes, excepto el agarre de las patas (FIG. 14A-E). Sin embargo, el tratamiento con NitroSynapsin no mejoró el fenotipo de agarre de las patas (FIG. 14F).

### 35 EJEMPLO 5 Efectos beneficiosos de NitroSynapsin sobre la pérdida de células neuronales, marcadores E/I alterados y LTP deteriorada en ratones *Mef2c-het*

Se realizó inmunohistoquímica para determinar los efectos del tratamiento farmacológico sobre la pérdida neuronal y la expresión alterada de VGAT o VGLUT2 en el hipocampo de ratones *Mef2c-het* (FIG. 15A-G). Específicamente, monitorizado por estereología utilizando el método de disector óptico, el número total de células NeuN+ en el hipocampo de ratones Het/N fue significativamente mayor que en ratones Het/V (FIG. 15B), consistente con la eficacia de NitroSynapsin en los experimentos de comportamiento previos. Además, en los experimentos de viabilidad iniciales, se observó un efecto significativamente mayor de NitroSynapsin sobre memantina en los recuentos de células NeuN+ (FIG. 12B).

La reducción de células NeuN+ en ratones *Mef2c-het* podría explicarse al menos en parte por la pérdida de células apoptóticas debido a que el número de neuronas que se tiñen para la caspasa-3 activa y para el etiquetado de extremos de mella de dUTP de la desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) en la región CA3 del hipocampo aumentó significativamente en ratones *Mef2c-het* en comparación con WT ( $P < 0,012$ , FIG. 16). Además, mientras que el número de células positivas para caspasa 3 activada y positivas para TUNEL aumentó en Het/V, se redujo a la normalidad en ratones Het/N (FIG. 16). Este resultado fue consistente con la noción de que las neuronas apoptóticas observadas en ratones *Mef2c-het* fueron rescatadas significativamente por NitroSynapsin. Además, el tratamiento con NitroSynapsin también normalizó el número de células GFAP+ con morfología astrocítica en ratones *Mef2c-het* (FIG. 17).

El efecto de la NitroSynapsin sobre la expresión alterada de los marcadores E/I en ratones *Mef2c-het* se determinó mediante inmunohistoquímica confocal cuantitativa. Mientras que el nivel de inmunorreactividad de VGLUT1 no se alteró con el tratamiento con NitroSynapsin, los niveles de VGAT y VGLUT2, así como la relación de VGLUT1/VGAT o VGLUT2/VGAT, se normalizaron con el tratamiento con NitroSynapsin en ratones *Mef2c-het* (FIG. 15C-G). El número de interneuronas de cesta que expresan parvalbúmina (PV) y de sinapsis PV-positivas se redujo significativamente en ratones *Mef2c-het* (FIG. 18), mientras que la NitroSynapsin aumentó significativamente las sinapsis PV+ (% de área) (FIG. 18). Estos resultados sugieren que la NitroSynapsin restablece el equilibrio E/I en ratones *Mef2c-het*. Finalmente, el tratamiento crónico con NitroSynapsin también rescató significativamente la LTP hipocampal deteriorada en los ratones *Mef2c-het* (FIG. 15H, FIG. 19).

Como se resume en la FIG. 1, los ratones *Mef2c-het* mostraron déficits de comportamiento similares a MCHS, y

de este modo representaron un modelo para estudiar la patofisiología de la enfermedad. Los ratones *Mef2c-het* mostraron una viabilidad reducida, cuya causa se desconoce actualmente. Los ratones *Mef2c-het* que sobrevivieron hasta la edad adulta exhiben una cantidad reducida de neuronas y deterioro sináptico, específicamente un desequilibrio E/I causado por una neurotransmisión inhibitoria reducida y una

5 neurotransmisión excitatoria aumentada. Sorprendentemente, el tratamiento de ratones *Mef2c-het* con el nuevo y mejorado antagonista de NMDAR NitroSynapsin no sólo corrigió el desequilibrio E/I, sino que también mejoró los déficits de comportamiento autístico/similares a MCHS, proporcionando así una validación de la diana y un posible tratamiento de la enfermedad.

10 Los resultados proporcionados aquí mostraron que VGAT se redujo significativamente en el hipocampo de ratones *Mef2c-het*. De acuerdo con este hallazgo, la transmisión sináptica inhibitoria funcional se redujo, como se demostró en los registros de mIPSC espontáneas. Además, VGLUT2 se reguló positivamente de manera aberrante, en consonancia con un aumento de la neurotransmisión excitatoria, como se documentó por el aumento de la frecuencia de mEPSC. En consecuencia, la neurotransmisión inhibitoria y excitatoria disfuncional contribuye al desequilibrio E/I en el hipocampo de ratones *Mef2c-het*. Sorprendentemente, NitroSynapsin mejoró significativamente los tres parámetros en ratones *Mef2c-het*, con aumentos en los marcadores sinápticos, LTP y número neuronal. Lo más importante es que NitroSynapsin mejoró significativamente los comportamientos autistas/similares a MCHS en ratones *Mef2c-het*.

15 20 **EJEMPLO 6 Efectos beneficiosos de NitroSynapsin en el modelo de ratón TSC<sup>+/−</sup> de esclerosis tuberosa**

El complejo de esclerosis tuberosa (TSC) es un trastorno autosómico dominante que se manifiesta por discapacidad intelectual, epilepsia/déficits electrofisiológicos, y anomalías neuroconductuales, y que a menudo produce características del trastorno del espectro autista (TEA). El trastorno es causado por mutaciones heterocigotas que inactivan uno de dos genes, *Tsc1* o *Tsc2*. Las proteínas TSC forman el complejo TSC1/2, que inhibe Rheb, una GTPasa que activa el complejo 1 de la diana de rapamicina en mamíferos (mTORC1). mTORC1 estimula la traducción del ARNm y el crecimiento celular; la activación excesiva de esta vía debido al complejo TSC1/2 inactivo puede conducir a características patológicas de TSC, tal como señalización anormal en las sinapsis y composición aberrante de subunidades de receptores AMPA en una variedad de tipos neuronales. Una vía etiológica importante implica la sobreestimulación de mTOR. La hiperactivación de mTOR en TSC da como resultado la inhibición de la macroautofagia, con la consiguiente pérdida de espinas sinápticas y anomalías conductuales; la inhibición de mTOR con rapamicina puede rescatar estos fenotipos.

25 30 35 40 45 En este ejemplo, se encontró que los antagonistas que bloquean preferentemente la actividad tónica en los eNMDAR, en particular el fármaco más nuevo NitroSynapsin, proporcionan una mejora biológica y estadísticamente significativa en los fenotipos de ratones *Tsc2<sup>+/−</sup>* (het). En estos estudios, se utilizó un modelo de ratón *Tsc2<sup>+/−</sup>* de esclerosis tuberosa. Acompañando esta mejora se produjo la corrección de la actividad en la ruta p38 MAPK-TSC-Rheb-mTORC1-S6K1 (FIG. 20). Los déficits en la potenciación a largo plazo (LTP) del hipocampo, la pérdida histológica de sinapsis y el condicionamiento del miedo conductual en ratones *Tsc2<sup>+/−</sup>* mejoraron después del tratamiento con NitroSynapsin. En conjunto, estos resultados sugieren que la mejora del desequilibrio excitatorio/inhibitorio (E/I), al limitar la actividad excesiva de eNMDAR, puede representar un nuevo enfoque de tratamiento para la TSC.

*La NitroSynapsin revierte los déficits en la plasticidad hipocampal a largo plazo en ratones heterocigotos *Tsc2**

50 55 60 Se examinó la potenciación a largo plazo (PLP), una forma de plasticidad sináptica provocada en respuesta a la entrada excitatoria y que se cree que representa un correlato eléctrico del aprendizaje y la memoria en el hipocampo. Se utilizaron grabaciones de campo en la región CA1 de cortes de hipocampo para investigar los efectos de la mutación *Tsc2* en esta forma de plasticidad sináptica. Para este fin, se prepararon cortes de hipocampo agudos de ratones de un mes de edad y se realizaron grabaciones de campo en una cámara de matriz de microelectrodos (MEA) perfundida con líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF). Se registraron fEPSP (potenciales postsinápticos excitatorios de campo) en la región CA1 después de evocar LTP mediante la estimulación de las colaterales de Schaffer (cuatro repeticiones de pulsos de 100 Hz durante un segundo cada una). Se analizó la pendiente inicial de fEPSP para evaluar la LTP. Sin embargo, con un protocolo de inducción más fuerte como el utilizado aquí, observamos una disminución de la LTP, monitorizada 60 minutos después de la inducción. Sorprendentemente, encontramos que un tratamiento de 4 horas con 1-2 µM del antagonista eNMDAR más eficaz NitroSynapsin, pero no memantina, mejoró la LTP en Ratones *Tsc2<sup>+/−</sup>* en comparación con el tratamiento de control con vehículo ( $P < 0,001$  a 55-65 min). Como se muestra en las FIGS. 21-23, la NitroSynapsin (también conocida como nitromemantina) protegió las sinapsis, la potenciación a largo plazo (LTP) y el comportamiento neurológico en el modelo het del complejo de esclerosis tuberosa (TSC) de TDA/TDI en un grado significativamente mejor que la memantina.

*El tratamiento con NitroSynapsin en ratones heterocigotos *Tsc2* reduce la pérdida sináptica*

65 Para determinar los efectos de los antagonistas de eNMDAR en la histología cerebral de ratones *Tsc2<sup>+/−</sup>*, se utilizó inmunohistoquímica confocal cuantitativa para analizar cortes coronales cerebrales de ratones de tipo

salvaje (WT) y *Tsc2<sup>+/−</sup>* de 3 meses de edad que se habían tratado durante dos días y medio con vehículo, memantina o NitroSynapsin. Los ratones *Tsc2<sup>+/−</sup>* con el fondo C57B1/6J recibieron por vía intraperitoneal vehículo o una dosis de carga de 92 µmol/kg de memantina o NitroSynapsin, seguido de 4,6 mol/kg de fármaco dos veces al día durante dos días y medio, con la última dosis 3 horas antes de la sesión de entrenamiento conductual (para un total de cinco inyecciones de fármaco). Este régimen de dosificación produce una concentración efectiva de fármaco en los NMDAR en el cerebro de 1-10 µM.

Se cree que una característica clave del TSC es la pérdida de sinapsis. Es importante destacar que los ratones *Tsc2<sup>+/−</sup>* tratados con NitroSynapsin (NitroMemantina) manifestaron significativamente más tinción para el marcador presináptico sinaptofisina (SY38) en el hipocampo que sus compañeros de camada heterocigotos no tratados, mientras que el efecto de la memantina no fue estadísticamente significativo (véanse FIGS. 21A y 21B).

El análisis de marcadores adicionales incluyó la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, un marcador astrocítico en estas condiciones), NeuN (un marcador de núcleos neuronales y cuerpos celulares), y la proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP2, que marca las espinas dendríticas neuronales). Las imágenes inmunohistoquímicas confocales del hipocampo no revelaron diferencias en la expresión entre NeuN, MAP2 o GFAP en ratones WT frente a *Tsc2<sup>+/−</sup>*. En conjunto, estos resultados histológicos indican que no hubo una pérdida significativa de neuronas/neuropilo ni un aumento de la astrocitosis reactiva en esta etapa de la enfermedad en el hipocampo, en contraposición a la pérdida de sinapsis.

#### 20 *La NitroSynapsin mejora los fenotipos neuroconductuales en ratones heterocigotos Tsc2*

Se realizaron pruebas de condicionamiento del miedo en ratones *Tsc2<sup>+/+</sup>* y *Tsc2<sup>+/−</sup>* de tres meses de edad para explorar los efectos de los antagonistas de eNMDAR sobre la ansiedad y los déficits de aprendizaje y memoria en ratones *Tsc2<sup>+/−</sup>*. Se administró vehículo, memantina o NitroSynapsin durante dos días y medio, y la última dosis del fármaco se administró 3 horas antes de la primera sesión de entrenamiento. En la prueba de condicionamiento del miedo (véase la FIG. 23), los ratones de la misma camada WT mostraron una cantidad significativamente mayor de tiempo de congelación en el contexto de entrenamiento en comparación con el contexto nuevo ( $P = 0,032$ ), lo que indica que estos animales podían discriminar entre las dos condiciones. La FIG. 23 muestra los efectos del tratamiento con memantina o NitroSynapsin en la discriminación del contexto en ratones *Tsc2<sup>+/−</sup>*- evaluados mediante la prueba de condicionamiento del miedo. Tiempo de congelación de ratones transgénicos WT y *Tsc2<sup>+/−</sup>* de tres meses de edad tratados con vehículo, memantina o NitroSynapsin en ensayos de condicionamiento del miedo. Los cuatro grupos de ratones evaluados (WT-vehículo, Het-vehículo, Het-memantina y Het-NitroSynapsin) mostraron congelación en el "contexto de entrenamiento" y el "contexto nuevo + señal", lo que indica que sus respuestas de miedo condicionado no se vieron afectadas por el genotipo o los fármacos. Además, los ratones WT mostraron discriminación de contexto entre el entrenamiento y los contextos nuevos ( $*P = 0,032$ ). Por el contrario, los ratones *Tsc<sup>+/−</sup>* tratados con vehículo o memantina mostraron déficits en este comportamiento, lo que dio como resultado la falta de discriminación entre el entrenamiento y los contextos nuevos (n.s. = sin diferencia significativa). El tratamiento con NitroSynapsin mejoró este fenotipo, normalizando la discriminación del contexto en ratones *Tsc2<sup>+/−</sup>* ( $**P = 0,023$ ). Los valores son media + s.e.m. (n = 7-12 ratones por grupo). Abreviaturas: Contexto de entrenamiento = entorno de entrenamiento en el que los ratones fueron entrenados previamente con una descarga precedida por una señal sonora. Contexto nuevo = suelo y paredes nuevos en la cámara de prueba. Contexto nuevo + señal = contexto nuevo con señal sonora.

45 Por el contrario, los ratones *Tsc2<sup>+/−</sup>* (het) eran deficientes en esta forma de discriminación del contexto. Sorprendentemente, mientras que la memantina no logró mitigar este déficit, la NitroSynapsin mejoró la capacidad de discriminación del contexto en ratones *Tsc2<sup>+/−</sup>* hasta niveles WT normales ( $P = 0,023$ ). Como control, los cuatro grupos de ratones evaluados (WT-vehículo, Het-vehículo, Het-memantina y Het-NitroSynapsin) mostraron congelamiento ante la señal condicionada en el nuevo contexto, lo que indica que las respuestas de miedo independientes del hipocampo no se vieron afectadas por el genotipo o los fármacos.

50 En resumen, la aplicación a corto plazo (4 horas) del nuevo fármaco mejorado NitroSynapsin, pero no de memantina, fue capaz de revertir los déficits en la plasticidad sináptica, como se monitorizó aproximadamente una hora después de la inducción de LTP en el hipocampo CA1. Es importante destacar que un tratamiento de dos días y medio con NitroSynapsin revirtió la pérdida sináptica observada en el hipocampo de ratones *Tsc2<sup>+/−</sup>*, como se monitorizó mediante tinción de sinaptofisina. Tan solo un tratamiento de dos días y medio con NitroSynapsin, pero no con memantina, normalizó la discriminación del contexto en los ratones *Tsc2<sup>+/−</sup>*. La NitroSynapsin ofreció un beneficio significativo sobre la memantina en una lectura electrofisiológica de la plasticidad sináptica, en el análisis neurohistológico de las sinapsis, y en las evaluaciones neuroconductuales de la ansiedad y la memoria. Estos resultados sugieren que NitroSynapsin debería probarse como un posible tratamiento terapéutico para los aspectos neurológicos de TSC en un esfuerzo por mejorar la calidad de vida.

#### 65 **EJEMPLO 7 Efectos beneficiosos de NitroSynapsin en el modelo de ratón nulo para MeCP2 del síndrome de Rett**

Como se muestra en la FIG. 24, la NitroSynapsin mejoró el comportamiento motor (en la prueba rotarod, que es

bien conocida por un experto en la técnica) en el modelo de ratón carente (KO) de MeCP2 del síndrome de Rett, otro tipo de TEA/IDD.

5 La presente solicitud demuestra que los ratones *Mef2c-het* son un modelo útil para MCHS humano; el desequilibrio E/I puede desempeñar un papel en la patogénesis de MCHS. La restauración de la plasticidad sináptica y la prevención de la pérdida neuronal con un antagonista de NMDAR apropiado rescató o mejoró los fenotipos autistas/similares a MCHS en ratones *Mef2c-het*. Los resultados que se presentan aquí describen el tratamiento de MCHS humano y otras formas de TEA, IDD y epilepsia (por ejemplo, esclerosis tuberosa y síndrome de Rett, como se muestra aquí) mediante la administración de NitroSynapsin (también conocida como nitromemantina YQW-036 o NMI-6979, véase la Estructura 1).

10

#### **EJEMPLO 8. Métodos**

15 Los ejemplos 1-7 emplearon los siguientes métodos como se describen. Un experto en la técnica entiende que las siguientes descripciones son a modo de ejemplo y que podrían realizarse variaciones intrascendentes mientras se obtienen los mismos resultados o resultados similares en los Ejemplos 1-7.

##### *Ratones, tratamientos farmacológicos, y pruebas de comportamiento*

20 20 Se crearon ratones carentes de *Mef2c* heterocigotos (*Mef2c-het*) cruzando ratones portadores del alelo convencional con exón 2 eliminado de *Mef2c* (*Mef2c<sup>Δ2</sup>*) con sus compañeros de camada WT. Todos los procedimientos para mantener y utilizar estos ratones fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC) en el Instituto de Descubrimiento Médico Sanford Burnham Prebys. En este estudio, sólo se utilizaron ratones machos para los ensayos de comportamiento, para asegurar la uniformidad (con o sin tratamiento farmacológico). Se administró un tratamiento crónico con memantina, NitroSynapsin (ambos a 4,6 µmol/kg de peso corporal) o vehículo (PBS) mediante inyección i.p., dos veces al día durante al menos 3 meses, comenzando a las ~2,5 semanas de edad. Esta edad se eligió porque los ratones aún son jóvenes, y por lo tanto el tratamiento podría comenzar en seres humanos en una etapa equivalente. Esta dosis y duración del tratamiento farmacológico se eligió basándose en estudios previos en los que NitroSynapsin mostró efectos protectores significativos sobre las neuronas y las sinapsis.

25

30

35 Los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos de memantina, NitroSynapsin o vehículo antes de ser genotipados. Los trabajadores de laboratorio que realizaron las inyecciones intraperitoneales y las pruebas de comportamiento desconocían los genotipos. Después de las pruebas de comportamiento, los ratones se utilizaron para inmunohistoquímica o electrofisiología, como se describe a continuación, y se estudiaron de manera enmascarada.

##### *Actividad locomotora*

40 40 La actividad locomotora se midió en jaulas de policarbonato (42 x 22 x 20 cm) colocadas en estructuras (25,5 x 47 cm) montadas con dos niveles de haces de fotocélulas a 2 y 7 cm por encima del fondo de la jaula (San Diego Instruments, San Diego, CA). Estos dos conjuntos de haces permitieron registrar tanto el comportamiento horizontal (locomoción) como el vertical (levantamiento). Se aplicó una fina capa de material de cama al fondo de la jaula. Los ratones se sometieron a pruebas durante 30 o 120 minutos, según la prueba exacta.

45

##### *Agarre de las patas*

50 50 Para la prueba de agarre de las patas, se tomó a los ratones por el tercio distal de sus colas, y se observaron durante 10 segundos. Se calificaron de manera enmascarada con respecto al genotipo en función del agarre de las patas delanteras y/o traseras: 0 - sin agarre de patas, 1 - agarre ocasional de las patas delanteras, y 3 - agarre constante de las patas delanteras y agarre ocasional de las patas traseras.

##### *Laberinto de Barnes*

55 55 El laberinto de Barnes consistía en un disco de plexiglás opaco de 75 cm de diámetro, elevado 58 cm por encima del suelo mediante un trípode. Se ubicaron veinte orificios de 5 cm de diámetro a 5 cm del perímetro, y se colocó una caja de escape de plexiglás negra (19 x 8 x 7 cm) debajo de uno de los orificios. Se ubicaron señales espaciales distintivas por todo el laberinto y se mantuvieron constantes durante todo el estudio. El primer día de pruebas se realizó una sesión de entrenamiento que consistió en colocar al ratón en la caja de escape y dejarlo allí durante 1 minuto. Un minuto después se inició la primera sesión. Al comienzo de cada sesión, el ratón se colocó en el centro del laberinto en una cámara de salida cilíndrica negra de 10 cm de alto. Después de 10 s, se retiró la cámara de salida, se encendió un timbre (80 dB) y una luz (400 lux) y se dejó al ratón libre para explorar el laberinto. La sesión finalizó cuando el ratón entró en el túnel de escape o después de que transcurrieran 3 min. Cuando el ratón entró en el túnel de escape, se apagó el timbre y se dejó al ratón en la oscuridad durante un minuto. Cuando un ratón no entró en el túnel por sí solo, se le colocó suavemente en la caja de escape durante 1 minuto. El túnel siempre se encontraba debajo del mismo orificio (estable dentro del entorno espacial), que se

60

65

determinó aleatoriamente para cada ratón. Los ratones fueron probados una vez al día durante 12 días para la parte de adquisición del estudio. Cabe señalar que, en general, los ratones suelen preferir el laberinto de Barnes al laberinto acuático de Morris porque es menos estresante. Sin embargo, dado que se probó a los roedores con NitroSynapsin para otras indicaciones utilizando el laberinto acuático de Morris, también se utilizó aquí para realizar pruebas de detección de fármacos a fin de poder realizar comparaciones.

#### *Laberinto acuático de Morris*

Evaluamos el aprendizaje y la memoria de referencia espacial utilizando una versión del laberinto acuático convencional de Morris. Los ratones fueron entrenados para nadar hasta una plataforma de 14 cm de diámetro y sumergida 1,5 cm debajo de la superficie del agua. La plataforma era invisible para los ratones mientras nadaban. Si un ratón no lograba encontrar la plataforma en 60 s, era guiado manualmente hasta la plataforma y se le permitía permanecer allí durante 10 s. Se les dieron a los ratones 4 ensayos al día durante tantos días como fuera necesario para alcanzar el criterio (latencia de escape media de <20 s). La retención del entrenamiento espacial se evaluó 24 h después del último ensayo de entrenamiento. Ambos ensayos de sondeo consistieron en nadar libremente durante 60 s en la piscina sin la plataforma. Se utilizó el sistema de seguimiento de vídeo ANY-maze (Stoelting Co.) para grabar en vídeo todos los ensayos para el análisis automatizado.

#### *Interacción social de tres cámaras*

Esta prueba fue desarrollada originalmente por el grupo Crawley para un modelo animal de autismo. Los individuos autistas muestran una interacción social recíproca aberrante, que incluye niveles bajos de acercamiento social y modos inusuales de interacción. Se utilizó un aparato de interacción social que consistía en una caja rectangular de plexiglás de tres cámaras, cada una de las cuales medida 20 cm (largo) x 40,5 cm (ancho) x 22 cm (alto). Las paredes que dividían la cámara eran transparentes con pequeñas aberturas semicirculares (radio de 3,5 cm), que permitían el acceso a cada cámara. La cámara del centro estaba vacía, y las dos cámaras exteriores contenían pequeñas jaulas de alambre redondo (Galaxy Cup, Spectrum Diversified Designs, Inc., Streetsboro, OH). Los ratones se acostumbraron a todo el aparato durante 5 minutos. Para evaluar la interacción social, los ratones se devolvieron a la cámara del centro, esta vez con un ratón extraño (C57BL/6J del mismo sexo atado a la jaula de alambre). Se registraron durante 5 minutos el tiempo que los participantes permanecieron en la cámara con el ratón extraño y el tiempo que permanecieron en la cámara vacía que contenía la jaula de alambre, así como el número de entradas a cada cámara. Los ratones experimentales se probaron una vez, y los ratones desconocidos C57BL/6J se utilizaron durante hasta 6 pruebas.

#### *Exploración del tablero con orificios*

El aparato consistió en una jaula de plexiglás (32 x 32 x 30 cm) con 16 orificios en un formato de 4 x 4 (cada uno de 3 cm de diámetro) espaciados de manera uniforme sobre un suelo elevado. La actividad exploratoria, que incluía el número de introducciones de la cabeza y el tiempo empleado en realizarlas, se midió durante 5 minutos.

#### *Preparación de cortes de hipocampo y electrofisiología*

Se anestesiaron ratones de uno a seis meses con una sobredosis de isoflurano y se decapitaron. Se disecaron rápidamente el cerebro, y se recogieron cortes de hipocampo (350 µm de grosor) en un amortiguador de disección helado que contenía lo siguiente (en mM): 212 sacarosa, 3 KCl, 5 MgCl<sub>2</sub>, 0,5 CaCl<sub>2</sub>, 1 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, y 10 glucosa (pH 7,4). La región CA3 se cortó para evitar la actividad epileptiforme. Los cortes se colocaron a 30 °C en líquido céfalorraquídeo artificial (LCRA) que contenía lo siguiente (en mM): 124 NaCl, 5 KCl, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, y 10 glucosa (pH 7,4). El LCRA y el amortiguador de disección se burbujearon con 95% de O<sub>2</sub>/5% de CO<sub>2</sub>. Antes de los registros, los cortes se colocaron en una cámara de registro de inmersión, se mantuvieron a 30 °C y se perfundieron con LCRA durante >1 h.

Para los registros de campo extracelular, se utilizaron electrodos de volframio bipolares concéntricos para activar las fibras colaterales/comisurales de Schaffer (SC) en la región CA1 del hipocampo. Se colocaron microelectrodos de vidrio extracelulares llenos de LCRA (resistencia ~1-3 MΩ) en el stratum radiatum, para medir los potenciales postsinápticos excitatorios de campo (fEPSP). Para los registros de referencia, se estimularon cortes a 0,033 Hz durante 20 min a intensidades de estimulación del 30-40% de las utilizadas para obtener la mayor amplitud de fEPSP medida. La potenciación a largo plazo (LTP) se indujo aplicando estimulación de alta frecuencia (HFS) que consiste en tres pulsos de 100 Hz (duración: 1 s, intervalo: 20 s). La facilitación de pulsos pareados (PPF) se probó aplicando dos pulsos con intervalos entre estímulos (ISI) que oscilaron de 20 a 200 ms. Para los experimentos se utilizó un amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices). Los datos se muestrearon a 5 kHz, y se analizaron utilizando el programa Clampfit 10 (Molecular Devices).

La actividad sináptica se registró a partir de neuronas granulares del giro dentado (DG) utilizando la técnica de fijación de voltaje de célula completa. Los datos se adquirieron utilizando un amplificador Multi Clamp 700B y el software Clampex 10.2 (Molecular Devices). Los registros se muestrearon a 200 µs, y se filtraron a 2 kHz. Se

utilizó LCRA como disolución de baño externo, con 50  $\mu$ M de picrotoxina y 1  $\mu$ M de tetrodotoxina (TTX) para aislar corrientes postsinápticas excitatorias en miniatura espontáneas (mEPSCs), o 10  $\mu$ M de 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX), 50  $\mu$ M de (2R)-amino-5-fosfonopentanoato (AP5) y 1  $\mu$ M de TTX para aislar corrientes postsinápticas inhibitorias en miniatura espontánea (mIPSCs). Se dejó que todas las disoluciones se equilibraran durante al menos 20 minutos antes de iniciar el registro. La disolución interna de la pipeta para los experimentos de fijación de voltaje contenía lo siguiente (en mM): 120 K-gluconato, 15 KC1, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, 5 EGTA, 2 Mg-ATP, pH 7,4 (300 mOsm). Las mEPSC y mIPSC normalmente se registraron durante al menos 3-5 minutos, y se analizaron utilizando el Mini Analysis Program versión 6.0.3 (Synaptosoft).

#### 10 *Inmunohistoquímica y recuento celular estereológico no sesgado*

Los ratones se perfundieron con amortiguador PBS, y después con paraformaldehído al 2% en PBS (PFA). Despues de la perfusión, los cerebros se trajeron y se colocaron en PFA al 2% durante la noche para su posterior fijación, y después se sumergieron en sacarosa al 30% en PBS antes de la congelación. Se cortaron secciones criostáticas con un grosor de 15  $\mu$ m. Las secciones se sumergieron en disolución desenmascaradora de antígenos (Vector) y se calentaron en microondas durante 30 s, seguido de una permeabilización con Triton X-100 al 0,25% en PBS durante 15 min. Los anticuerpos primarios se incubaron durante 16 h a 4 °C, y los anticuerpos secundarios conjugados con fluorescencia durante 2 h a 25 °C. Numerosas células no teñidas en cada campo sirvieron como control interno para la especificidad de la tinción. Los anticuerpos primarios incluyeron: NeuN (ratón, EMD Millipore), caspasa-3 activada (conejo, Cell Signaling), VGLUT1 (cobaya, SYSY), VGLUT2 (conejo, SYSY), VGAT (ratón, SYSY), sinaptofisina (ratón, Sigma), GFAP (ratón, Sigma), PCNA (ratón, Santa Cruz), DCX (cabra, Santa Cruz). Se realizó un ensayo TUNEL para evaluar la apoptosis utilizando el kit de detección de muerte celular in situ de Roche según las instrucciones del proveedor. Se contó el número de células positivas o el porcentaje de área ocupada por NeuN, caspasa-3 activada, TUNEL, GFAP, PCNA o DCX en regiones cerebrales específicas utilizando un disector óptico, o se estimó mediante inmunohistoquímica confocal cuantitativa o densidad óptica, como se describió anteriormente.

#### *Preparación de lisados cerebrales y transferencia Western*

El tejido cerebral se homogeneizó en 10 volúmenes de amortiguador de sacarosa frío (0,32 M de sacarosa, 25 mM Hepes, pH 7,4). Despues de una breve centrifugación a 3000 g durante 5 min a 4 °C, el sobrenadante se recogió y se centrifugó a 10.000 g durante 12 min a 4 °C. Los  $\frac{3}{4}$  exteriores del pelete se recogió y se resuspendió utilizando el mismo amortiguador de sacarosa mediante un pipeteo suave, mientras que se evitó el centro oscuro que contenía mitocondrias. Despues de una segunda centrifugación a 10.000 g durante 12 min a 4 °C, el pelete sin centro oscuro se recogió en HBS frío (25 mM Hepes, pH 7,4, 150 mM NaCl) como lisado cerebral enriquecido con sinaptosomas, y se utilizó para experimentos de transferencia Western. Los anticuerpos primarios para inmunotransferencia incluyeron: VGLUT1 (cobaya, SYSY), VGLUT2 (conejo, SYSY), GAD65 (conejo, Millipore), sinaptofisina (ratón, Millipore), MEF2C (conejo, Proteintech),  $\alpha$ -tubulina (ratón, Sigma),  $\beta$ -actina (ratón, Sigma), seguido de anticuerpos secundarios apropiados<sup>52</sup>. Tenga en cuenta que se utilizó GAD65 en lugar de VGAT para inmunotransferencia debido a que el primer anticuerpo demostró ser superior para las transferencias Western. Las inmunoseñales se capturaron en una película de rayos X Kodak, y se cuantificaron utilizando Image J versión 1.45s.

#### *Tinción de Golgi y análisis de Sholl*

Se realizó una impregnación estándar de Golgi-Cox con cerebros WT y *Mef2c-het* utilizando el kit FD Rapid GolgiStain (FD NeuroTechnologies, Inc.), según las instrucciones del fabricante. Despues de fotografiar a 40x un montaje 3D de una célula completa mediante microscopía de deconvolución, y reconstruirlo con el software SlideBook 5.0 (Intelligent Imaging Innovations), se utilizó el software de rastreo de neuronas Neurolucida (MBF Bioscience) para delinear el perfil celular completo, y se realizó un análisis de Sholl, como se describe en detalle en otra parte. Se analizaron las intersecciones dendríticas acumulativas y las longitudes dendríticas.

#### *Neurogénesis adulta*

Para estudiar la neurogénesis adulta, se inyectó BrdU (50 mg/kg de peso corporal) a ratones de 8 semanas de edad por vía intraperitoneal dos veces al día durante 5 días consecutivos, y se perfundieron con PFA al 4% 4 semanas después de la última inyección. Despues, los cerebros se diseccionaron y se fijaron durante la noche en PFA al 4%, se enjuagaron, se crioprotegieron, y se congelaron en nitrógeno líquido. Se cortaron crio secciones (30 o 40  $\mu$ m de grosor) en un criostato. Se utilizaron procedimientos de inmunotinción estándar para anticuerpos primarios con anticuerpos secundarios conjugados apropiados. Para la inmunotinción con BrdU, las secciones se trataron previamente en HCl 2N durante 30 min. Las células positivas para PCNA, DCX, BrdU, NeuN o mCherry se analizaron en secciones seriadas a través del DG hipocampal de ratones *Mef2c-het* y WT. Las células positivas se contaron con un objetivo de 63x utilizando el software SlideBook. El número total de células se contó utilizando una técnica de disector óptico. Las fotografías se tomaron con el mismo tiempo de exposición y los mismos parámetros de contraste/luminosidad. La intensidad media de un marcador en particular se determinó utilizando el software ImageJ y se normalizó a la intensidad media de las neuronas granulares de DG. Se analizó

un mínimo de 6 fotografías que contenían al menos 40 células para cada marcador.

*Pruuebas de comportamiento motor*

- 5 El equilibrio se midió por la latencia para caerse de la varilla horizontal elevada (40 cm) (50 cm de largo) en cuatro ensayos de 20 s. Se utilizó una varilla de madera plana (9 mm de ancho) en los ensayos 1-2, y una varilla cilíndrica de aluminio (1 cm de diámetro) en los ensayos 3-4. En cada ensayo, los animales se colocaron en una zona central marcada (10 cm) en la varilla elevada. Se dio una puntuación de 0 si el animal cayó dentro de los 20 s, 1 si permaneció dentro de la zona central durante 20 s, 2 si salió de la zona central, y 3 si llegó a uno de los extremos de la barra. La capacidad de tracción se midió en tres ensayos de 5 s como la capacidad del animal para levantar las extremidades traseras mientras permanecía suspendido por las patas delanteras agarradas alrededor de una barra horizontal elevada (2 mm de diámetro). Se dio una puntuación de 0 si el animal no levantó ninguna extremidad, 1 si levantó una extremidad, y 2 si levantó las dos extremidades. La fuerza muscular se determinó mediante un ensayo de 60 s en el que los ratones se colocaron en el medio de la barra horizontal en posición invertida y se midió la latencia hasta caer. Para la prueba del poste vertical, los ratones se colocaron con la cabeza apuntando hacia arriba sobre un poste de madera vertical cubierto con cinta de tela (1 cm de diámetro; altura: 75 cm en el ensayo 1, 55 cm en los ensayos 2-3). Se registró la latencia para girar hacia abajo y el tiempo total para descender al suelo a lo largo de 3 ensayos. Si el ratón no giraba hacia abajo, se caía o se resbalaba, se registraba un valor de fallo de 60 s.
- 10
- 15
- 20

*Análisis de redes genéticas mediante micromatrizes y NextBio*

- El ARN total se extrajo de tejidos congelados preparados a partir de los hipocampos de ratones WT y *Mef2c-het* en el día posnatal 30, utilizando el kit Qiagen miRNA. Las concentraciones de ARN se determinaron utilizando un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific), y la calidad del ARN se evaluó utilizando un Agilent Bioanalyzer. Todas las muestras de ARN incluidas en el análisis de expresión tenían un número de integridad del ARN (RIN) >8. Se utilizó el chip de expresión MouseRef-8 v2 (Illumina) para la micromatriz de expresión génica. El análisis de datos de la micromatriz se realizó utilizando el software R y los paquetes Bioconductor. Los datos de expresión sin procesar se transformaron en log2, y se normalizaron mediante normalización de cuantiles. Los criterios de control de calidad de los datos incluyeron una alta correlación entre matrices (coeficientes de correlación de Pearson > 0,85) y detección de matrices de valores atípicos en función de la correlación media entre matrices y la agrupación jerárquica.
- 25
- 30
- 35

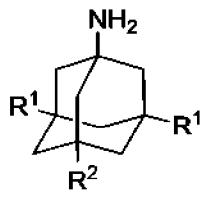
- Para el análisis de enriquecimiento de la ruta, todos los genes cuya expresión se alteró estadísticamente ( $P < 0,05$ ) en ratones *Mef2c-het* con respecto a los ratones WT se agruparon para los términos GO utilizando la aplicación de enriquecimiento de la ruta de NextBio (Illumina, Inc.). El conjunto de genes de fondo utilizado fue el genoma humano completo. NextBio asignó las puntuaciones de intervalo según el método descrito anteriormente. Los genes agrupados en términos GO relacionados con el desarrollo neuronal se priorizaron para la validación de los cambios en la expresión génica.
- 40

*Análisis estadístico*

- Los datos se dan como media ± s.e.m. Las pruebas estadísticas en cada experimento se enumeran aquí, en las leyendas de las figuras o en el texto. Todos los datos se analizaron utilizando el programa Prism 6 (GraphPad Software, Inc.). Para los datos con una distribución normal, la significancia estadística se determinó mediante la prueba de la t de Student para comparaciones por pares. Se utilizó un ANOVA con análisis post-hoc de Tukey, Dunnett o Newman-Keuls para comparaciones múltiples. Para los datos categóricos, se empleó una prueba de Chi-cuadrado o una prueba exacta de Fisher en una tabla de contingencia de 2x2. Para los datos que no se ajustaban a una distribución normal, se utilizaron pruebas no paramétricas.  $P < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.
- 45
- 50

## REIVINDICACIONES

5 1. Un inhibidor del receptor de glutamato de tipo N-metil-D-aspartato (NMDAR) para uso en el tratamiento de un trastorno del espectro autista (TEA) en un sujeto que lo necesita, en el que el inhibidor de NMDAR es NitroSynapsin:



en la que cada R<sup>1</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; y R<sup>2</sup> es -ONO<sub>2</sub>, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

10 2. El inhibidor para un uso según la reivindicación 1, en el que el trastorno del espectro autista (TEA) es autismo.

15 3. El inhibidor para un uso según la reivindicación 1, en el que el trastorno del espectro autista (TEA) es el síndrome de Rett.

15 4. El inhibidor para un uso según la reivindicación 1, en el que el sujeto tiene esclerosis tuberosa.

20 5. El inhibidor para un uso según la reivindicación 1, en el que el sujeto es un niño.

20 6. El inhibidor para un uso según la reivindicación 1, en el que el sujeto es haploinsuficiente en MEF2C y tiene síndrome de haploinsuficiencia de MEF2C (MCHS).

25 7. El inhibidor para un uso según la reivindicación 1, que comprende seleccionar el sujeto para el tratamiento basándose en un nivel de expresión de al menos un gen seleccionado de MEF2C, SLC32A1, SLC17A6, SYP, y GAD65.

25 8. El inhibidor para un uso según la reivindicación 5, en el que el nivel de expresión es el de una célula del sujeto.

30 9. El inhibidor para un uso según la reivindicación 5, en el que el nivel de expresión es el de una célula en el cerebro del sujeto.

30 10. El inhibidor para un uso según la reivindicación 5, en el que el nivel de expresión es el de una célula circulante del sujeto.

35 11. El inhibidor para un uso según la reivindicación 5, en el que el nivel de expresión es un nivel de expresión de ARNm.

40 12. El inhibidor para un uso según la reivindicación 5, en el que el nivel de expresión es un nivel de expresión de proteína.

40 13. El inhibidor para un uso según la reivindicación 5, en el que el sujeto tiene una haploinsuficiencia de MEF2C.

45 14. El inhibidor para un uso según la reivindicación 13, en el que el gen es SLC32A1 y el nivel de expresión se reduce significativamente con respecto al del sujeto promedio que comprende dos copias del gen MEF2C; o en el que el gen es SLC17A6 y el nivel de expresión se incrementa significativamente con respecto al del sujeto promedio que comprende dos copias del gen MEF2C; o en el que el gen es SYP y el nivel de expresión se reduce significativamente con respecto al del sujeto promedio que comprende dos copias del gen MEF2C; o en el que el gen es GAD65 y el nivel de expresión se reduce significativamente con respecto al del sujeto promedio que comprende dos copias del gen MEF2C.

## DIBUJOS

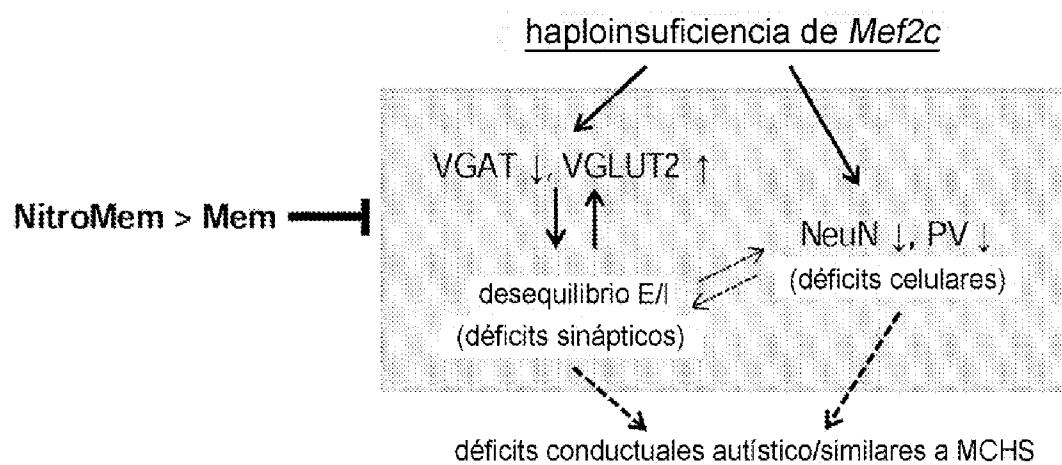


FIG. 1

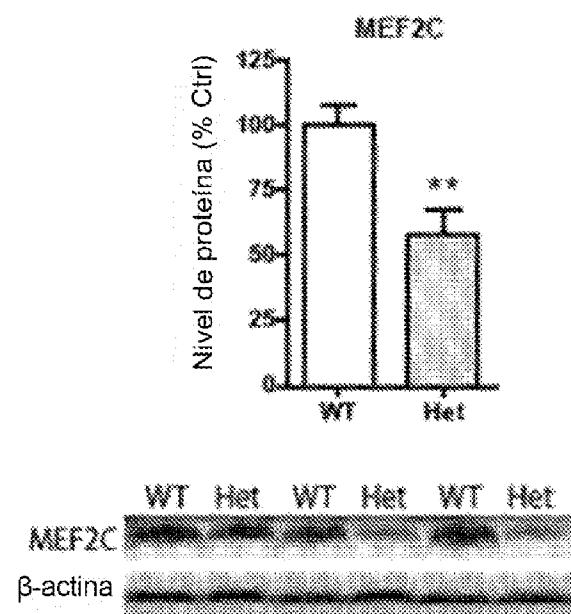


FIG. 2

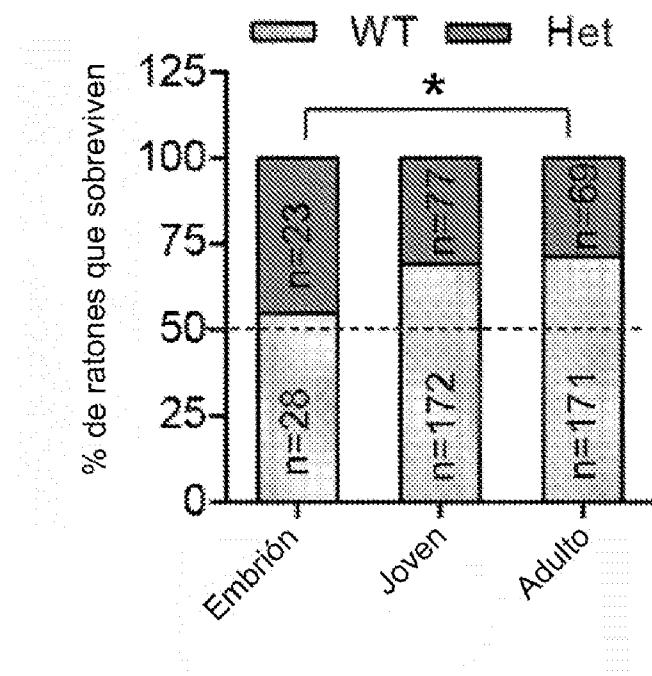


FIG. 3A

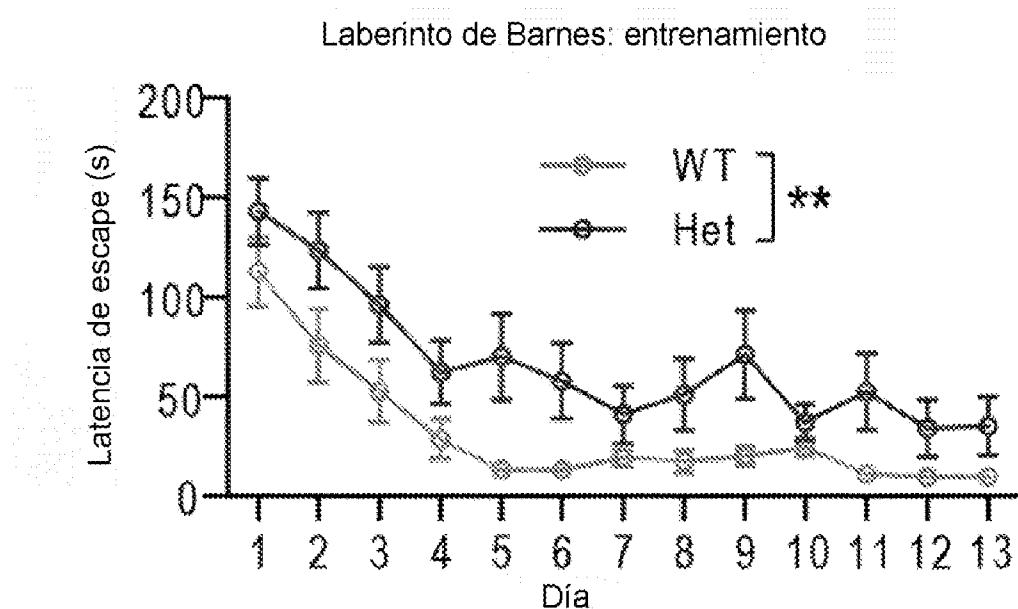


FIG. 3B

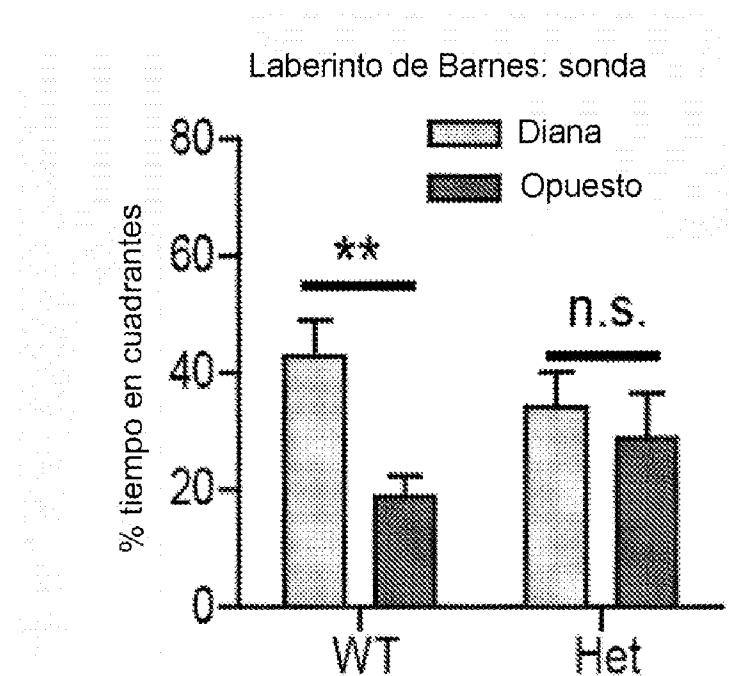


FIG. 3C

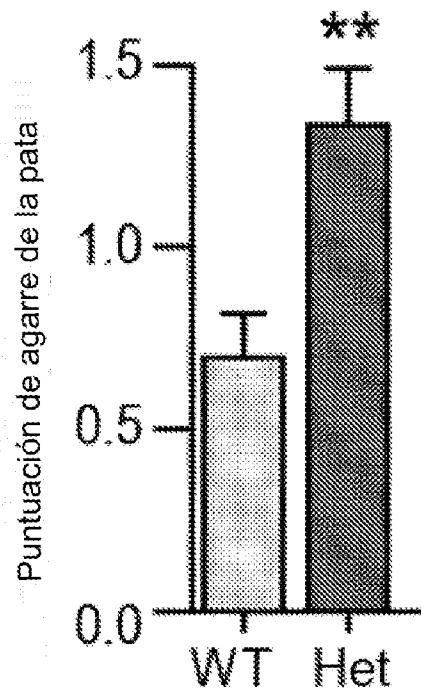


FIG. 3D

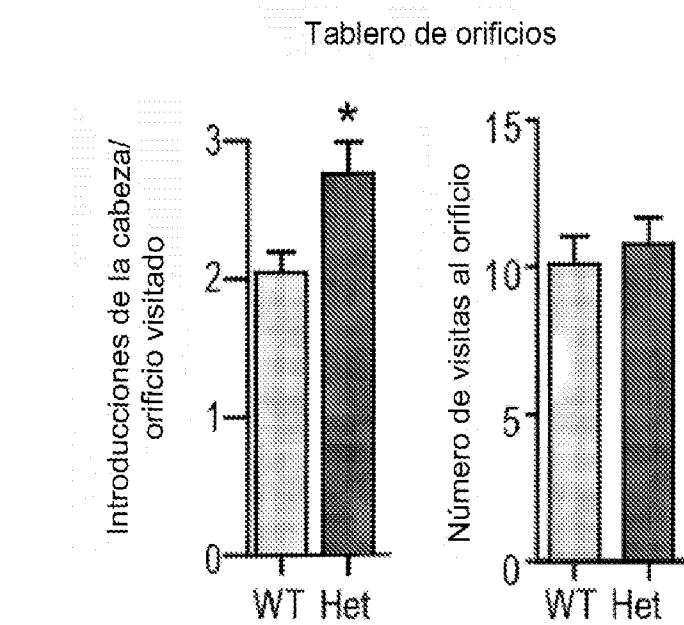


FIG. 3E

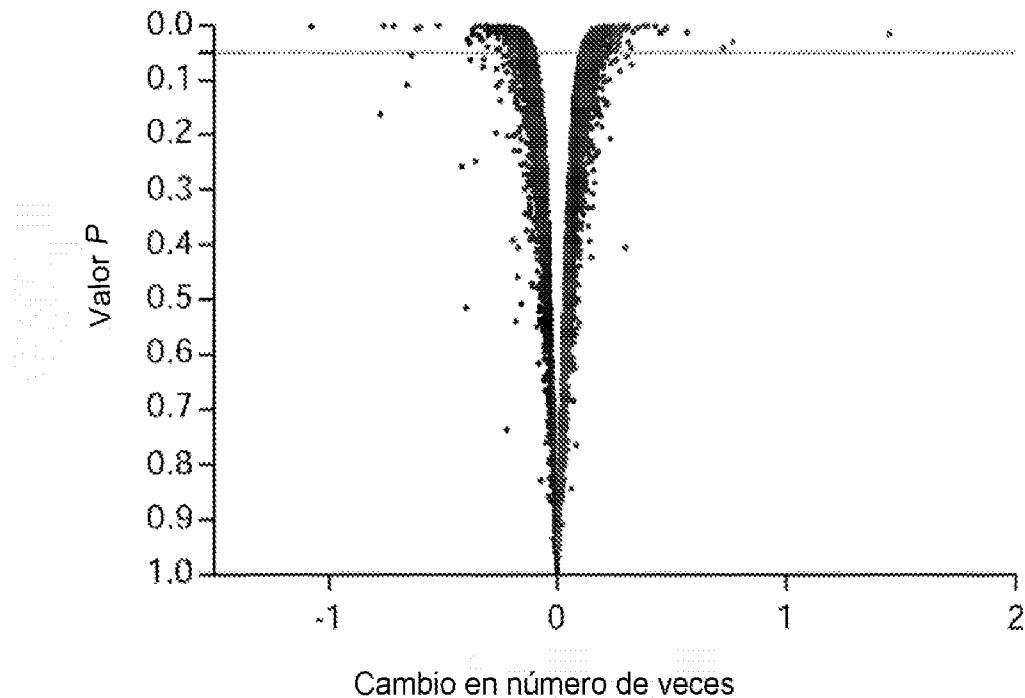
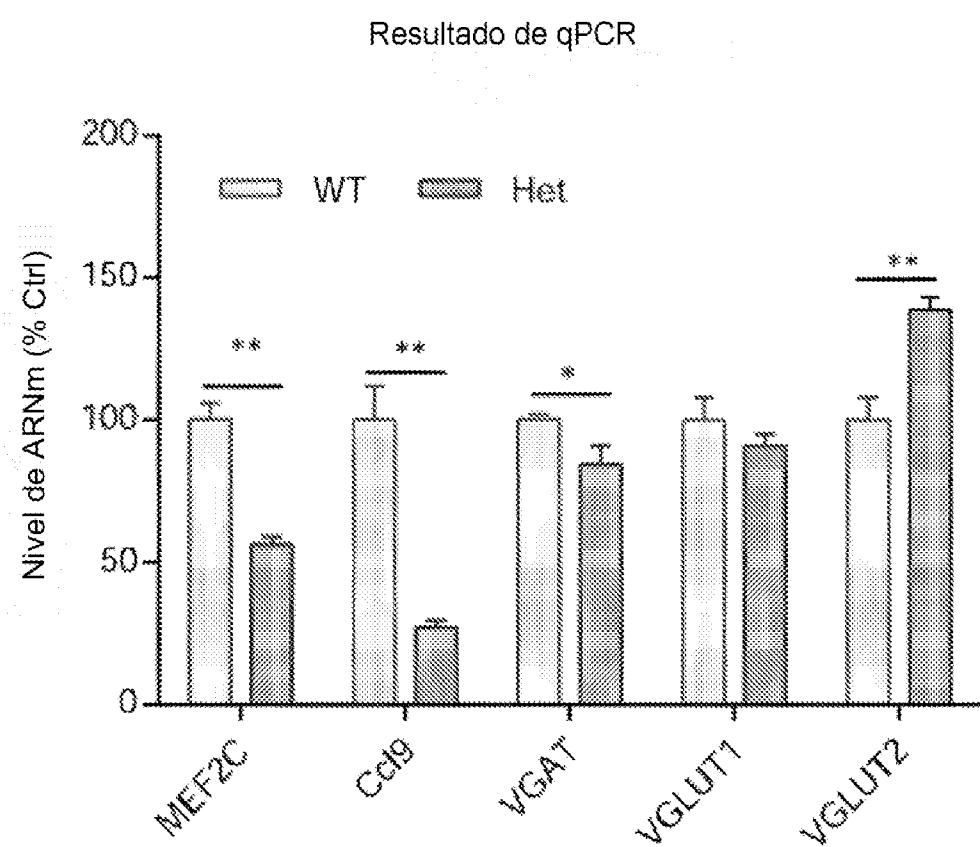


FIG. 4A

Biogrupos desregulados en ratones <i>Mef2c-het</i>	Nº de genes desregulados	Dirección	Puntuación	valor P	Fuente
neurogénesis	33	Abajo	34.31	1.3E-15	GO
diferenciación de neuronas	23	Abajo	27.51	1.1E-12	GO
sinapsis	18	Abajo	24.04	3.6E-11	GO
regulación de muerte neuronal	5	Arriba	9.29	9.3E-05	GO

**FIG. 4B****FIG. 4C**

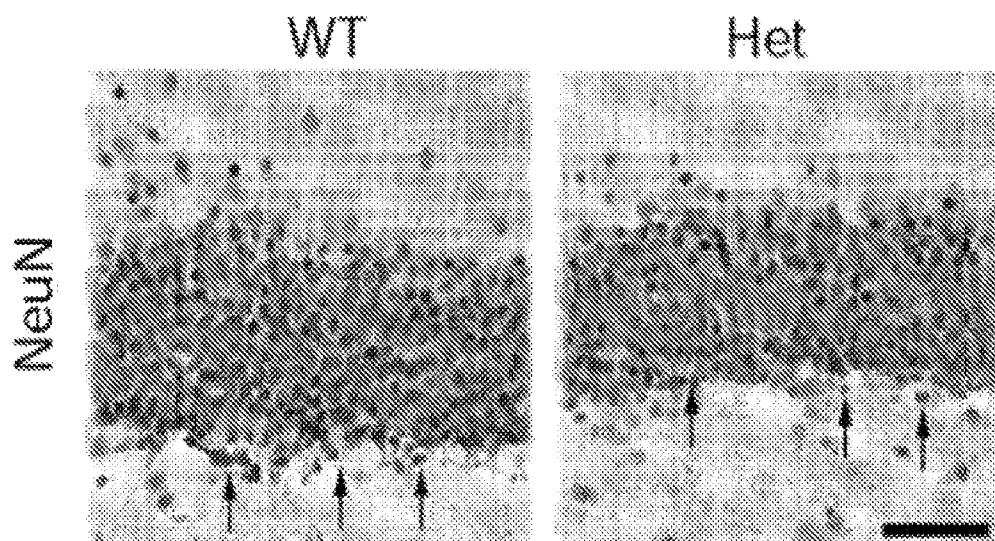


FIG. 5A

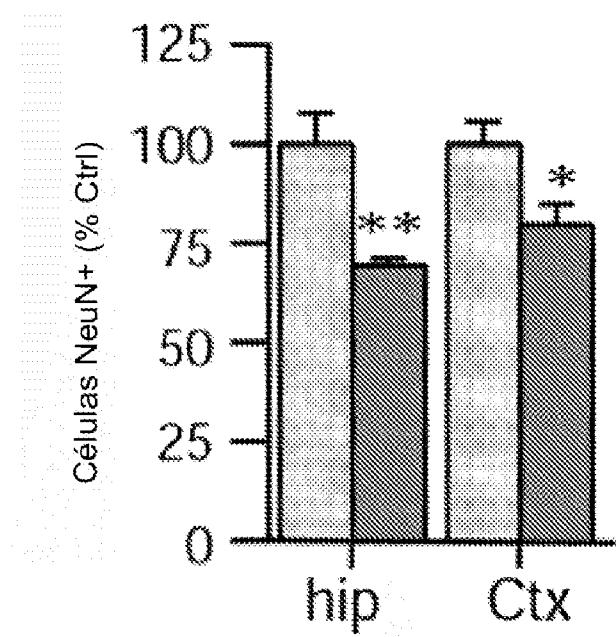


FIG. 5B

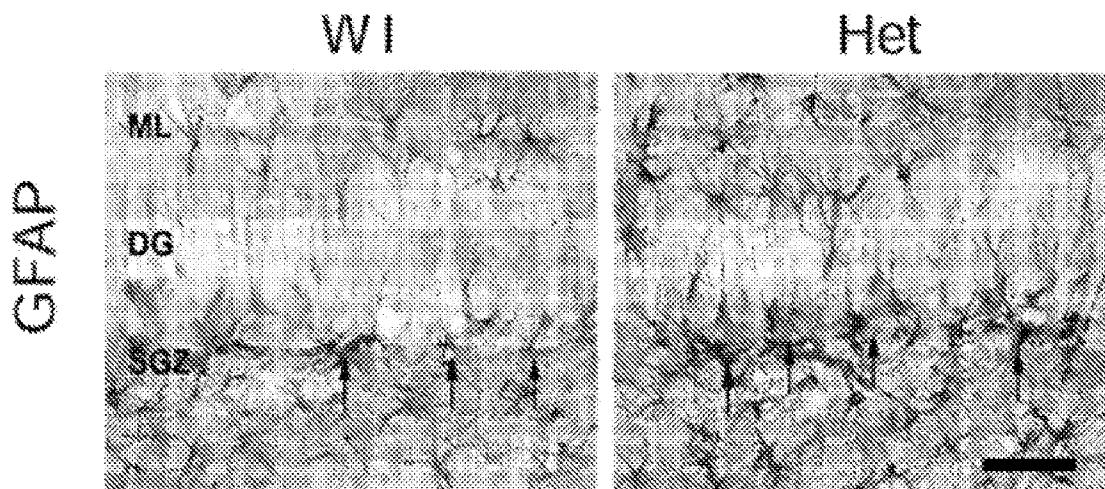


FIG. 5C

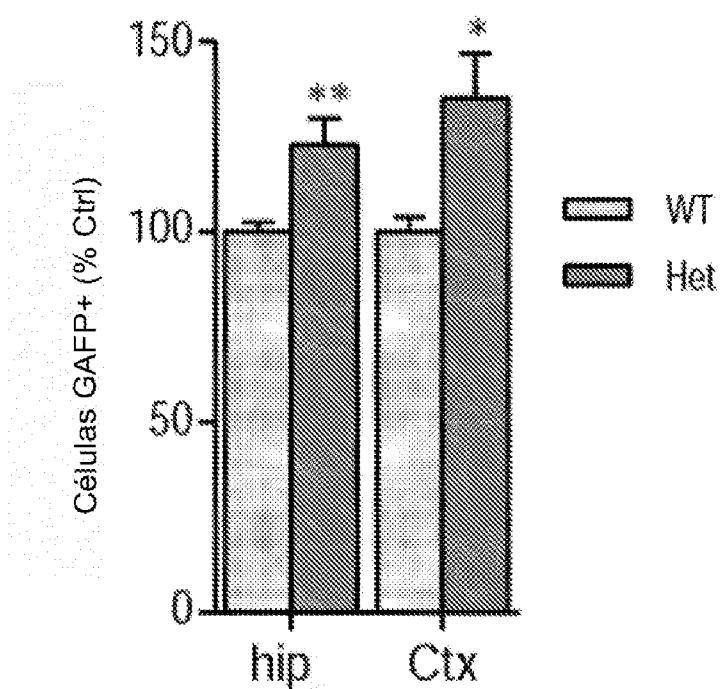


FIG. 5D

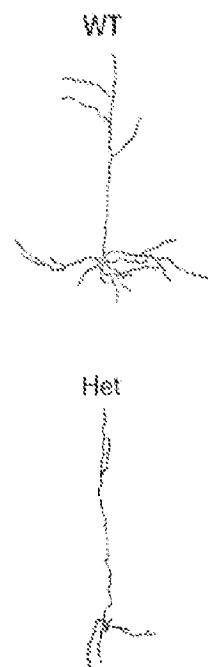


FIG. 5E

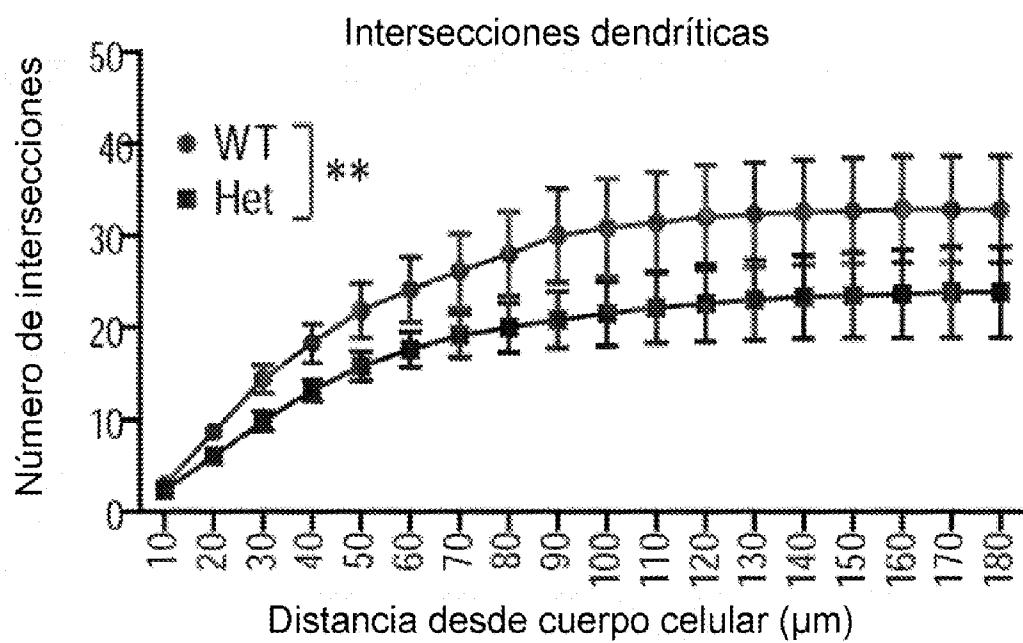


FIG. 5F

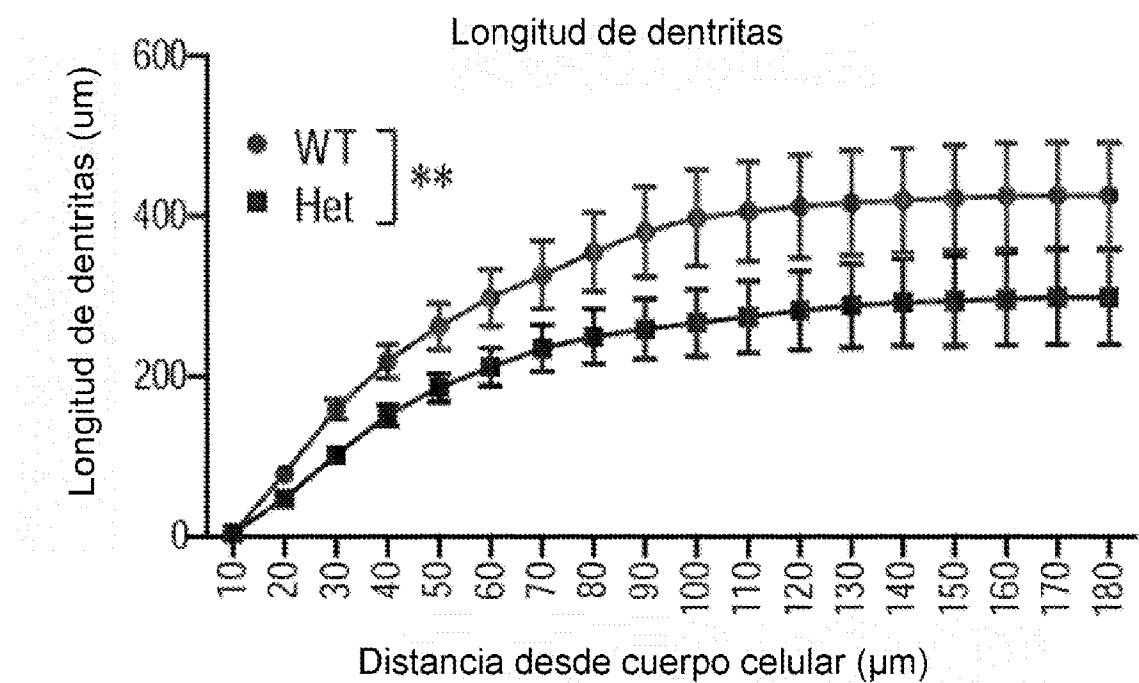


FIG. 5G

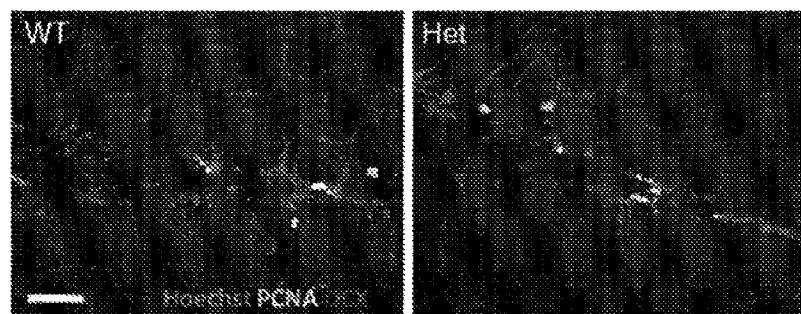


FIG. 6A

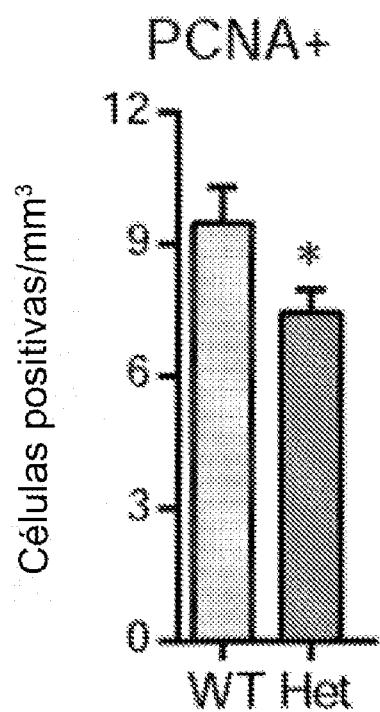


FIG. 6B

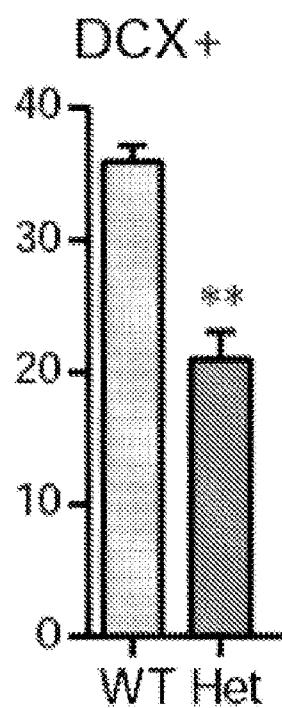


FIG. 6C

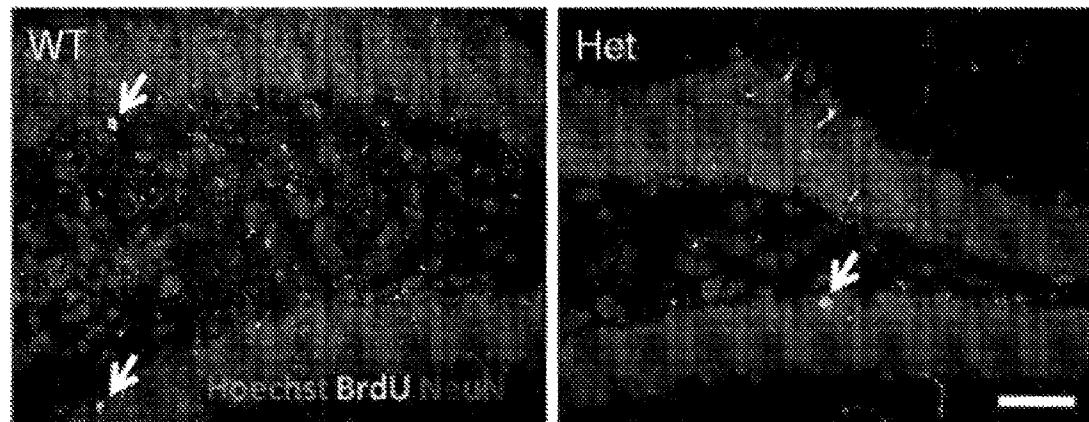


FIG. 6D

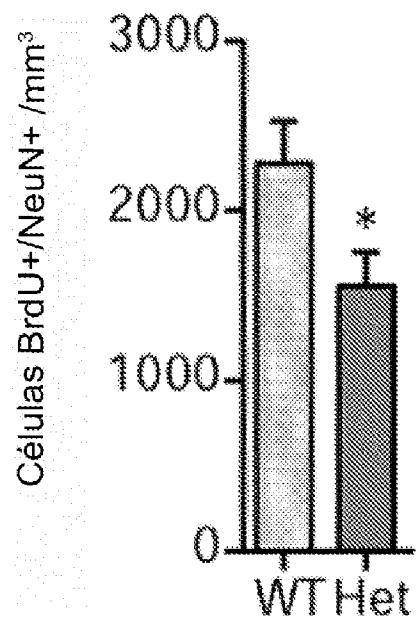


FIG. 6E

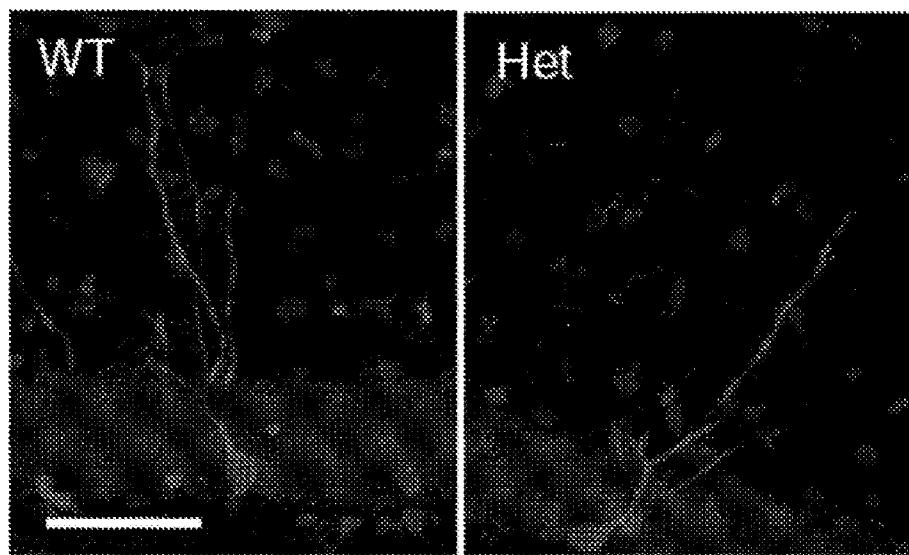


FIG. 6F

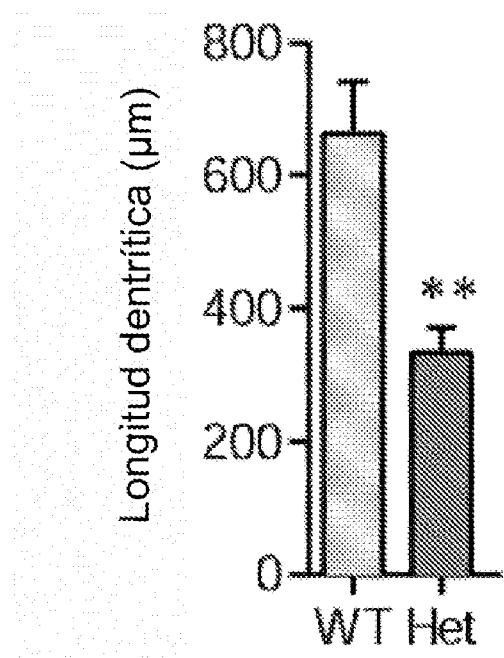


FIG. 6G

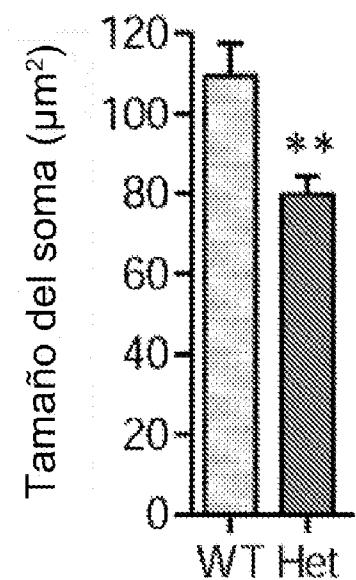


FIG. 6H

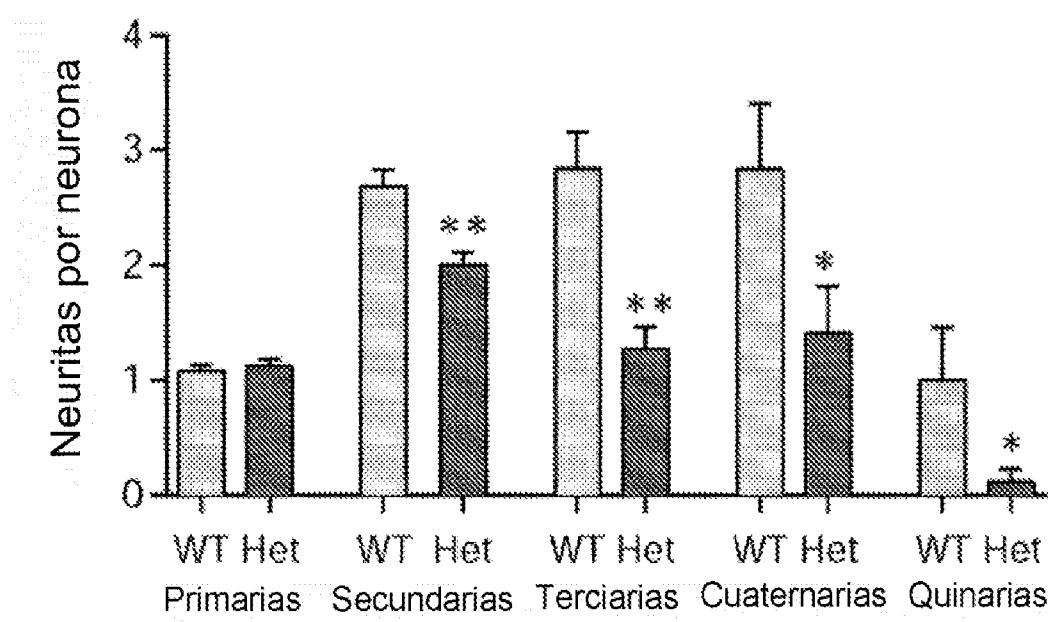
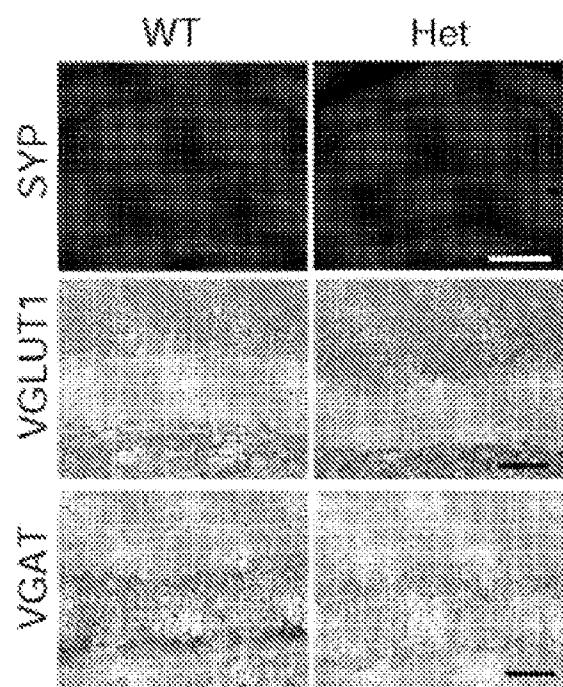
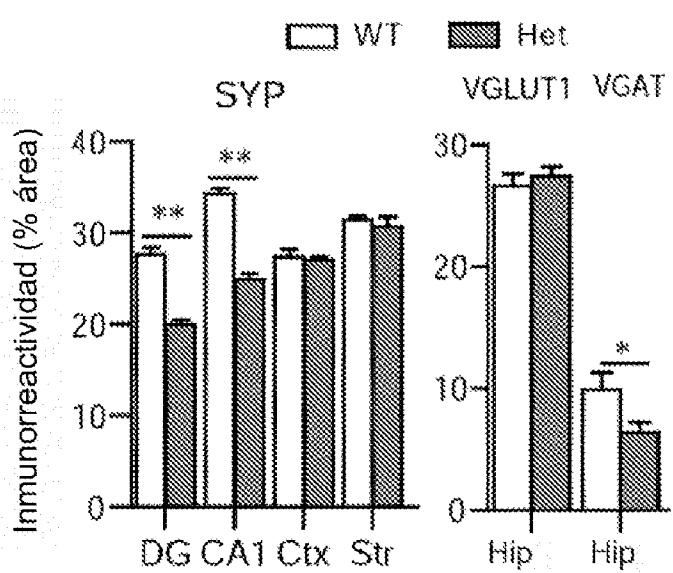


FIG. 6I

**FIG. 7A****FIG. 7B**

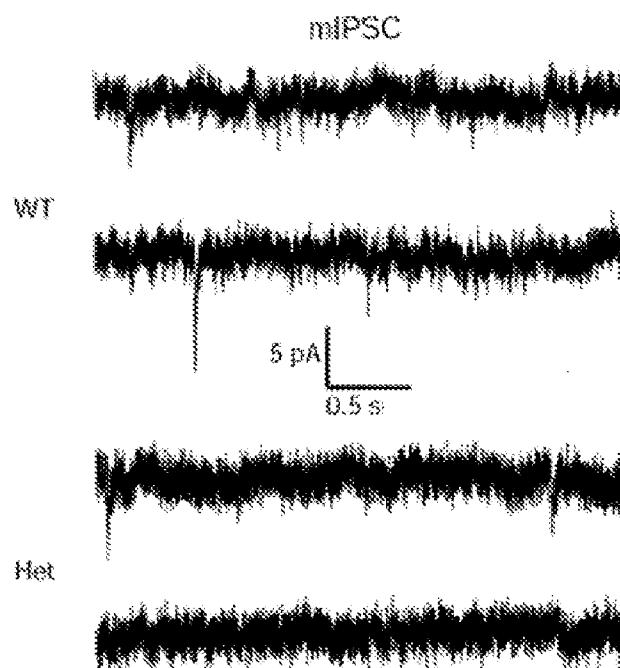


FIG. 7C

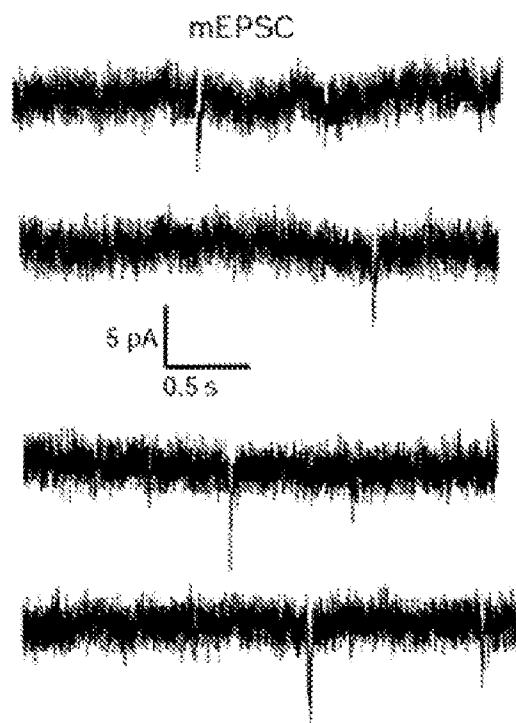


FIG. 7D

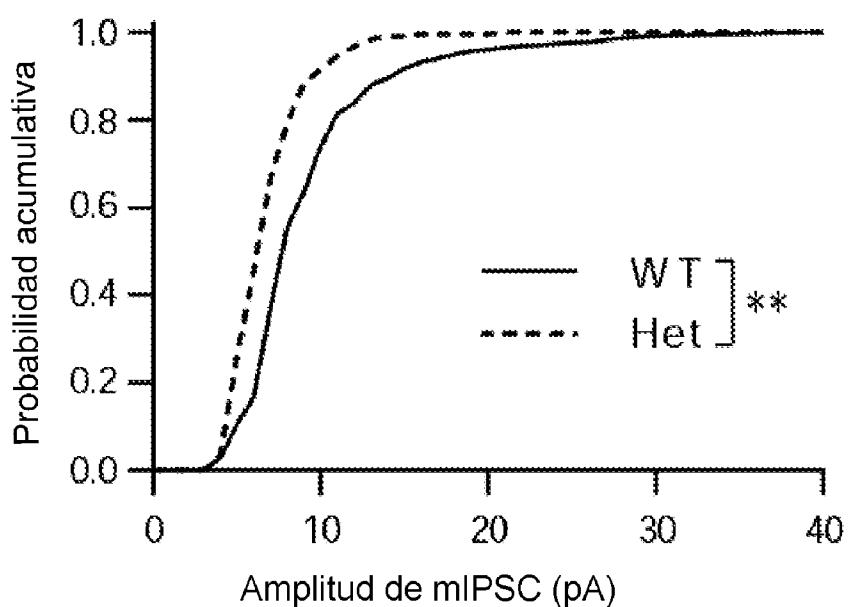


FIG. 7E

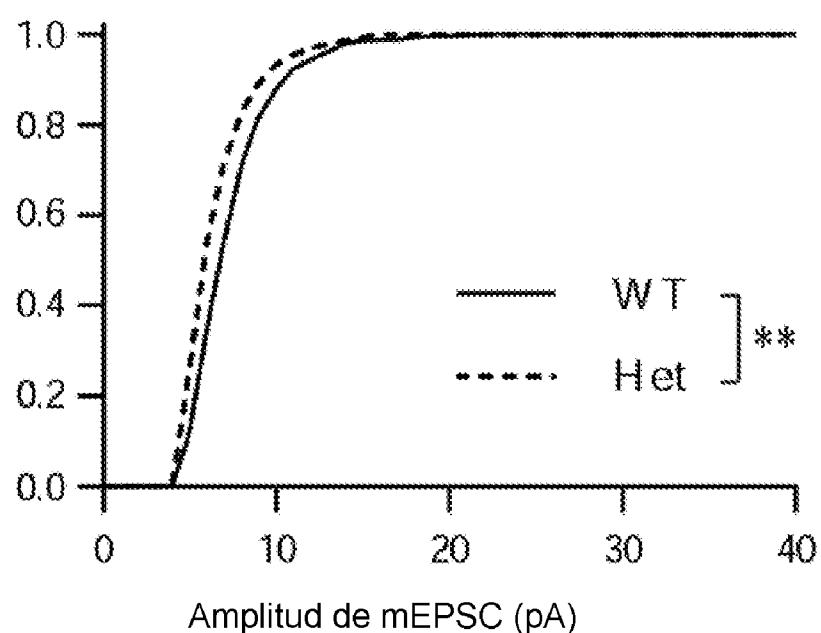


FIG. 7F

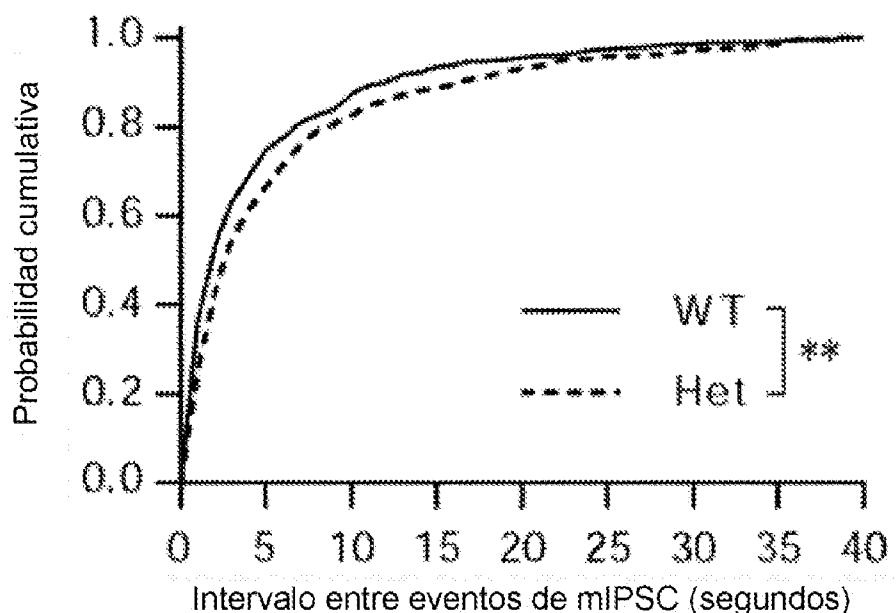


FIG. 7G

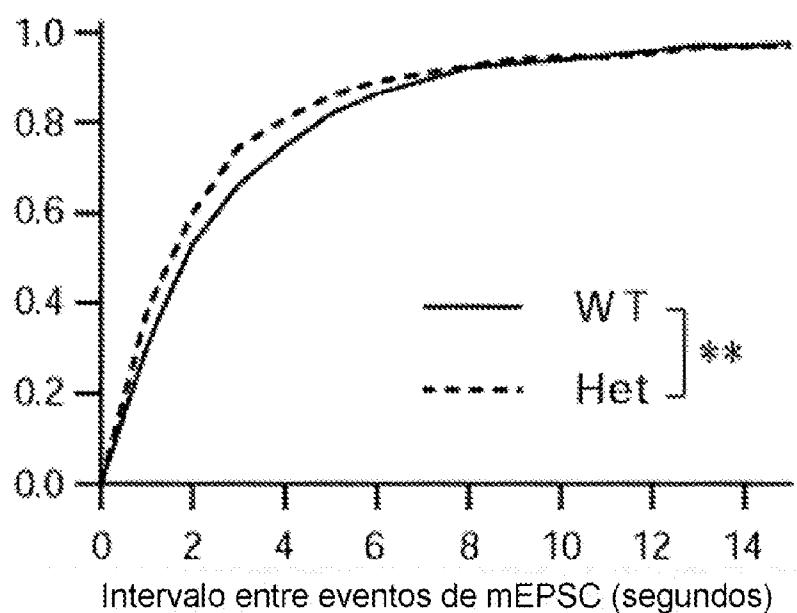


FIG. 7H

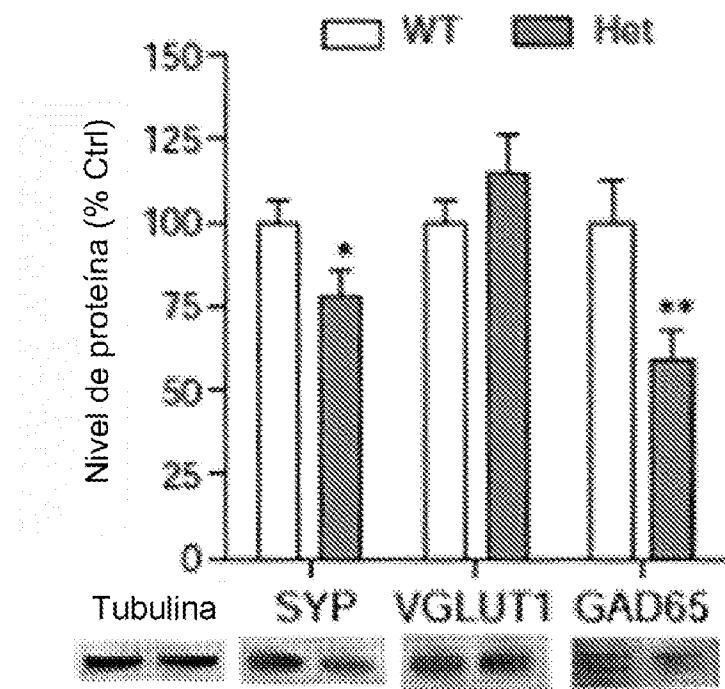


FIG. 8A

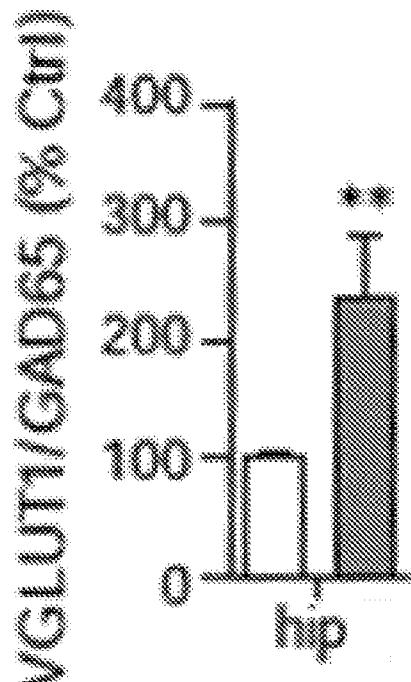
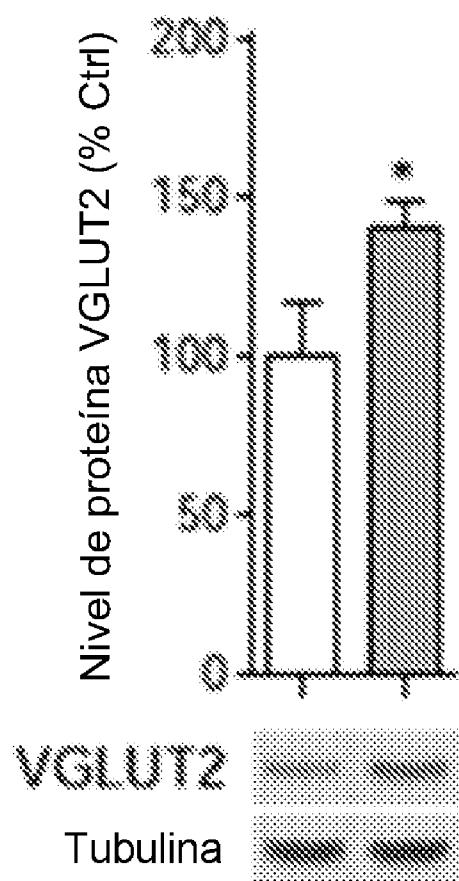


FIG. 8B



**FIG. 8C**

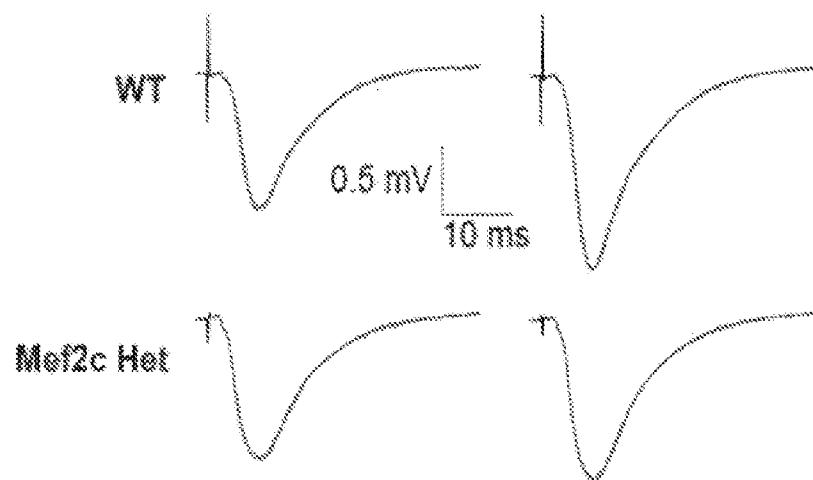
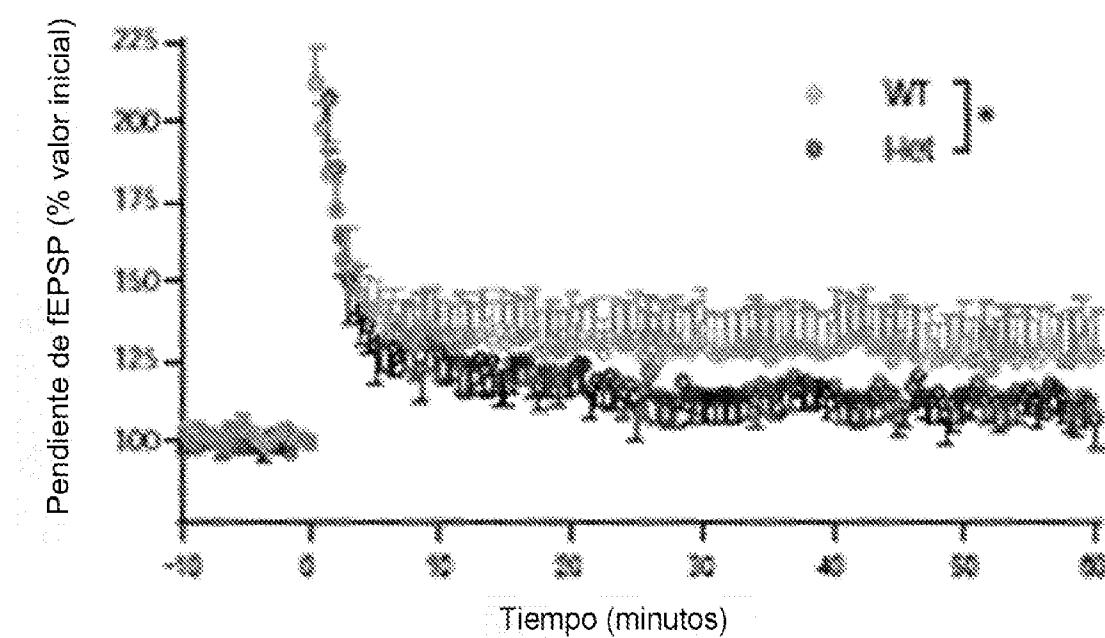


FIG. 9A

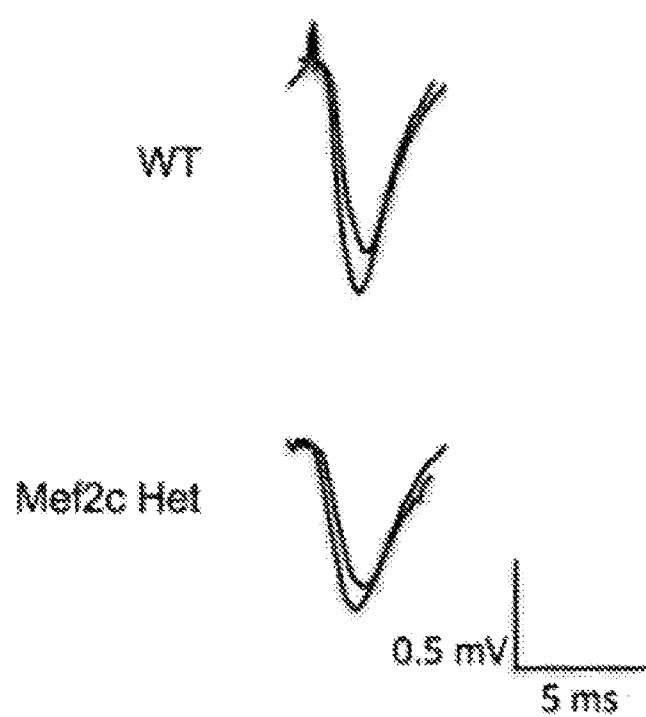
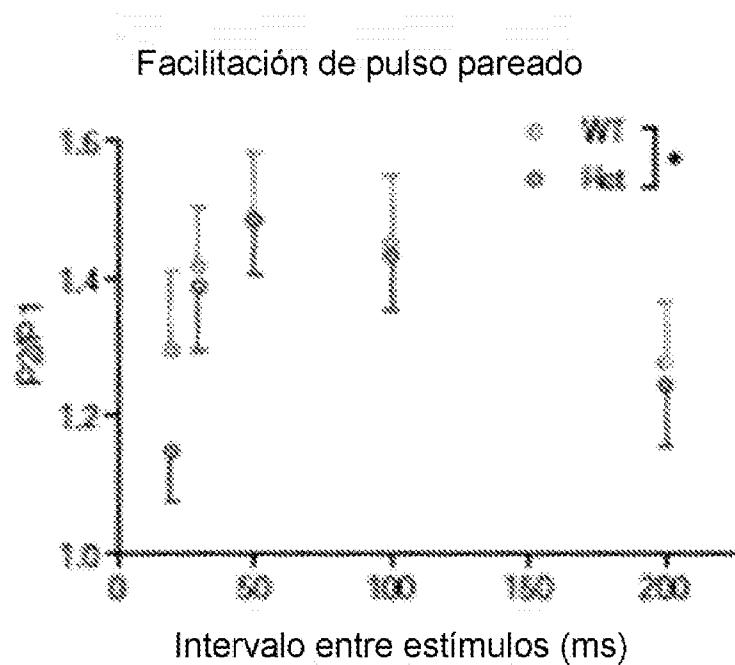
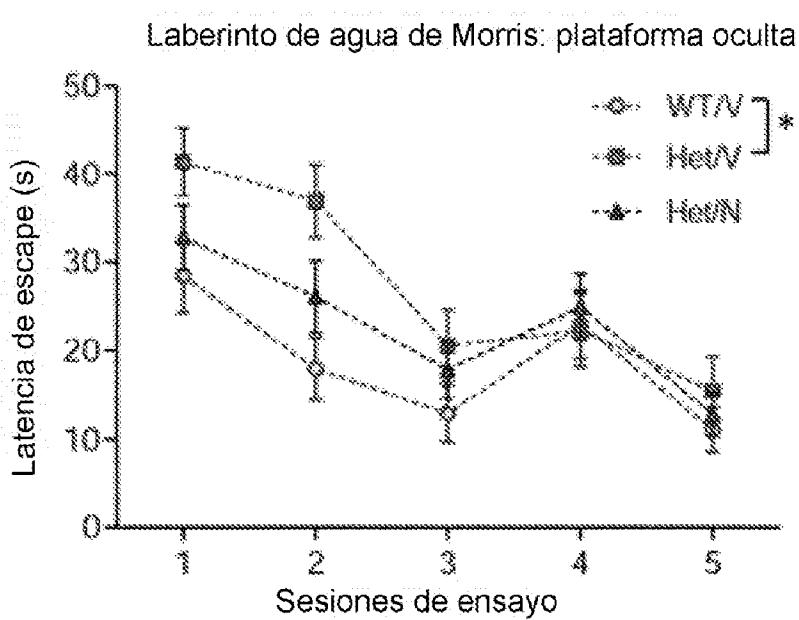
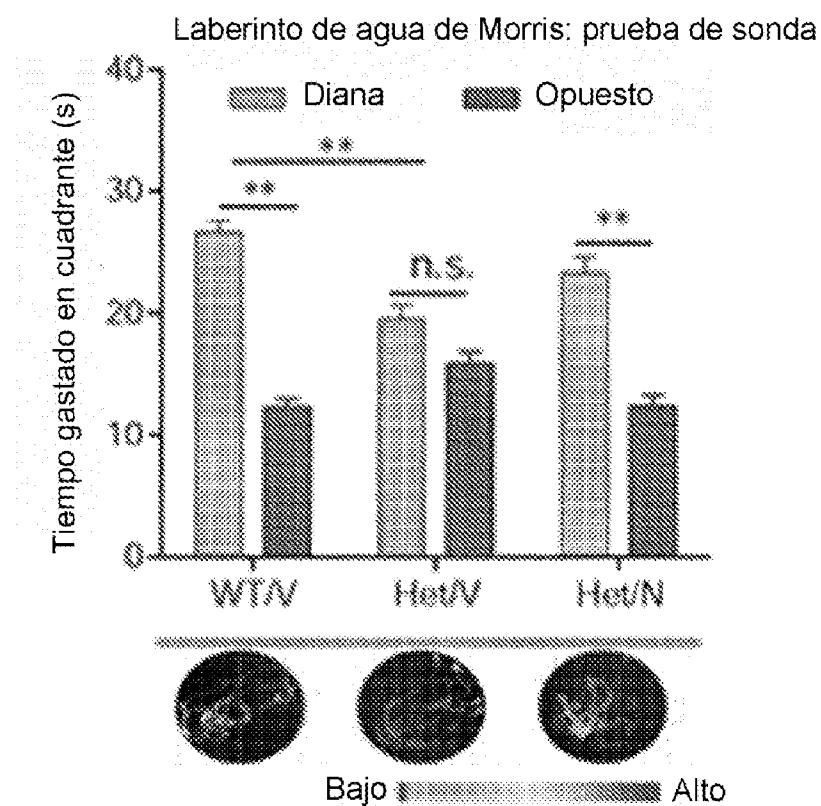


FIG. 9B

**FIG. 10A****FIG. 10B**

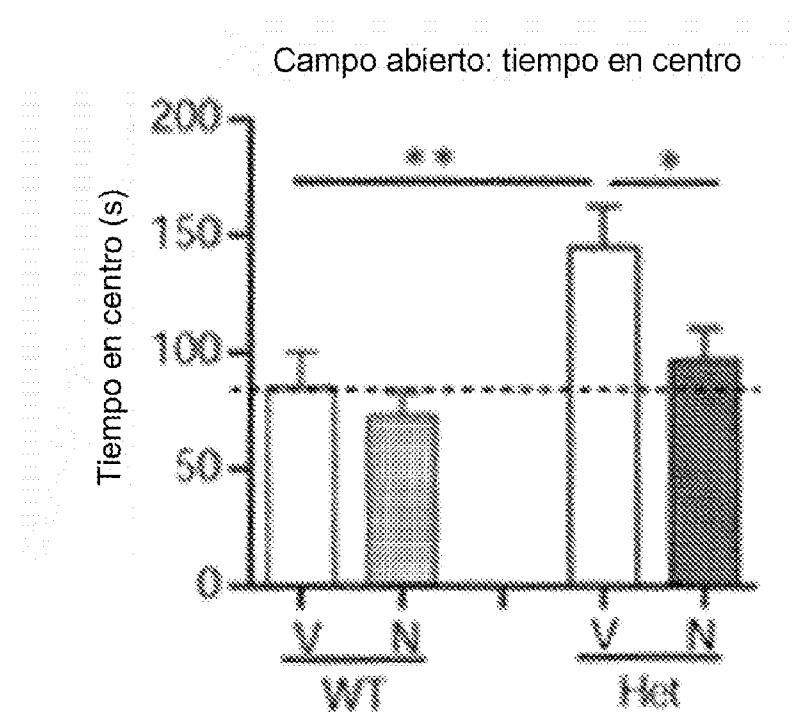


FIG. 10C

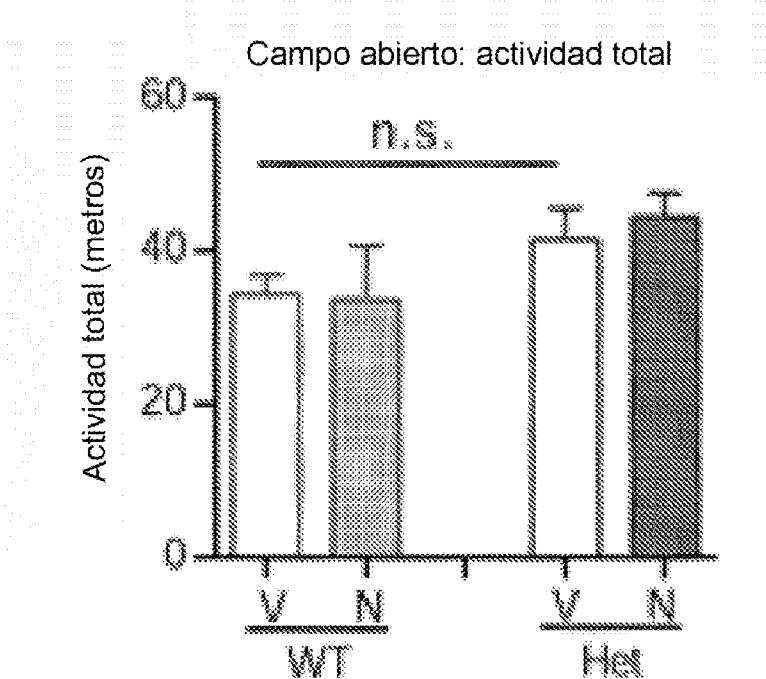


FIG. 10D

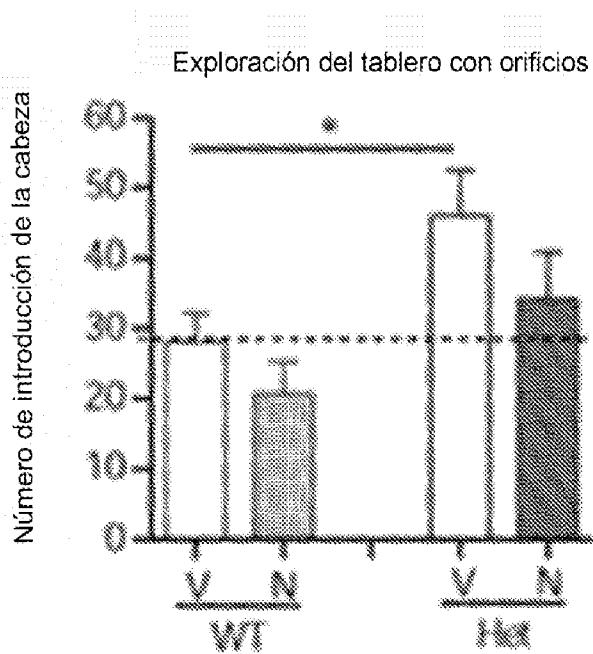


FIG. 10E

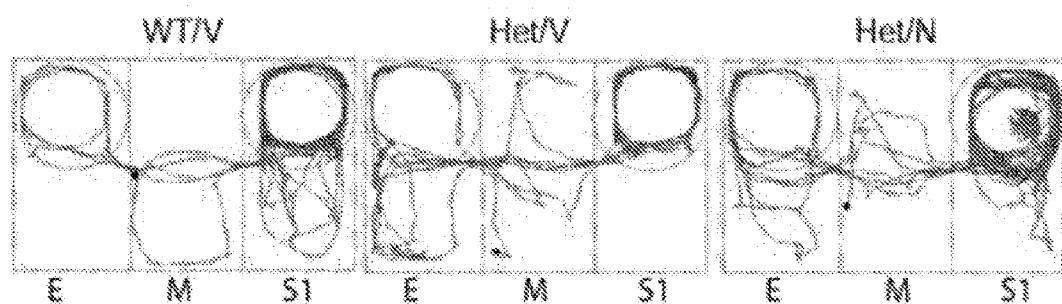
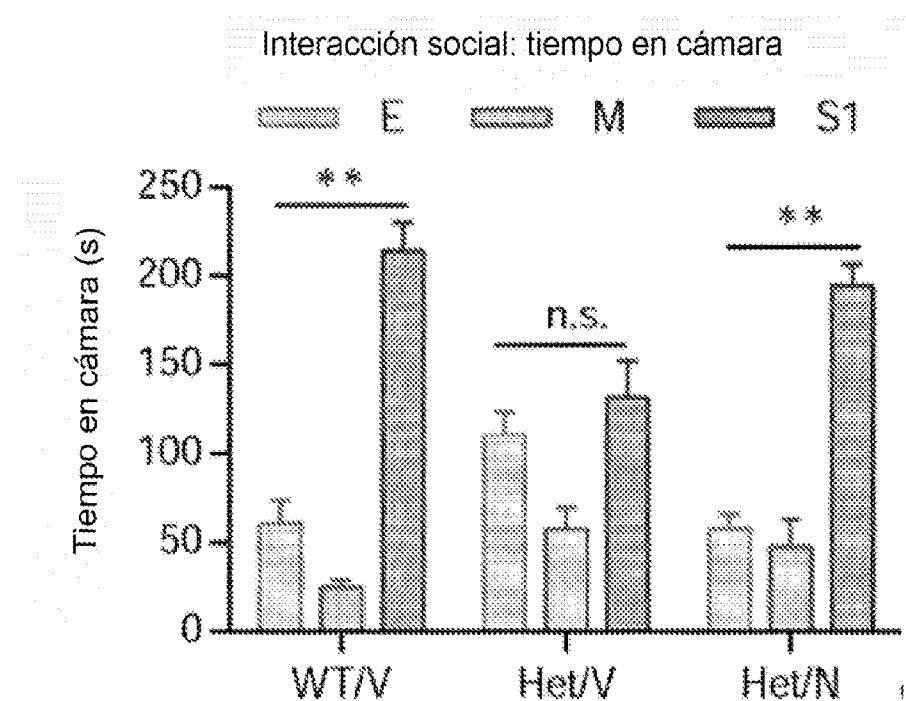
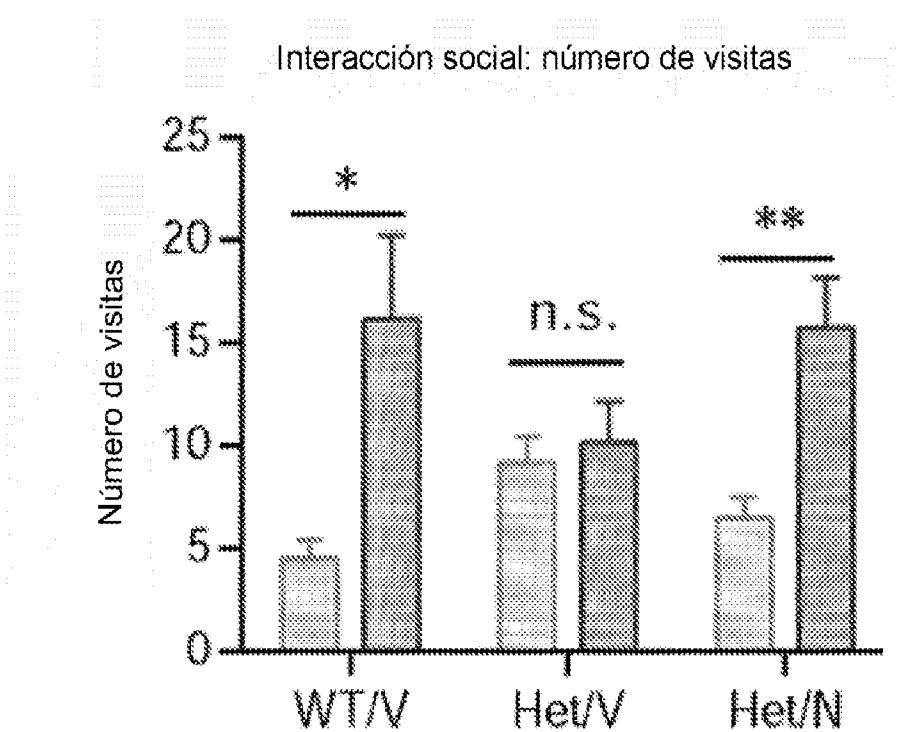


FIG. 10F

**FIG. 10G****FIG. 10H**

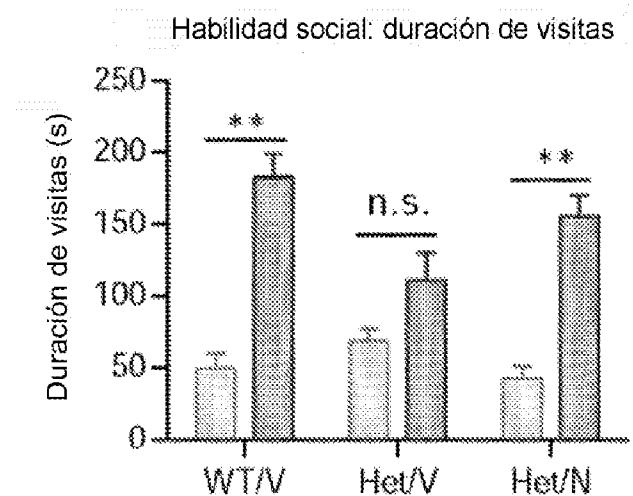


FIG. 10I

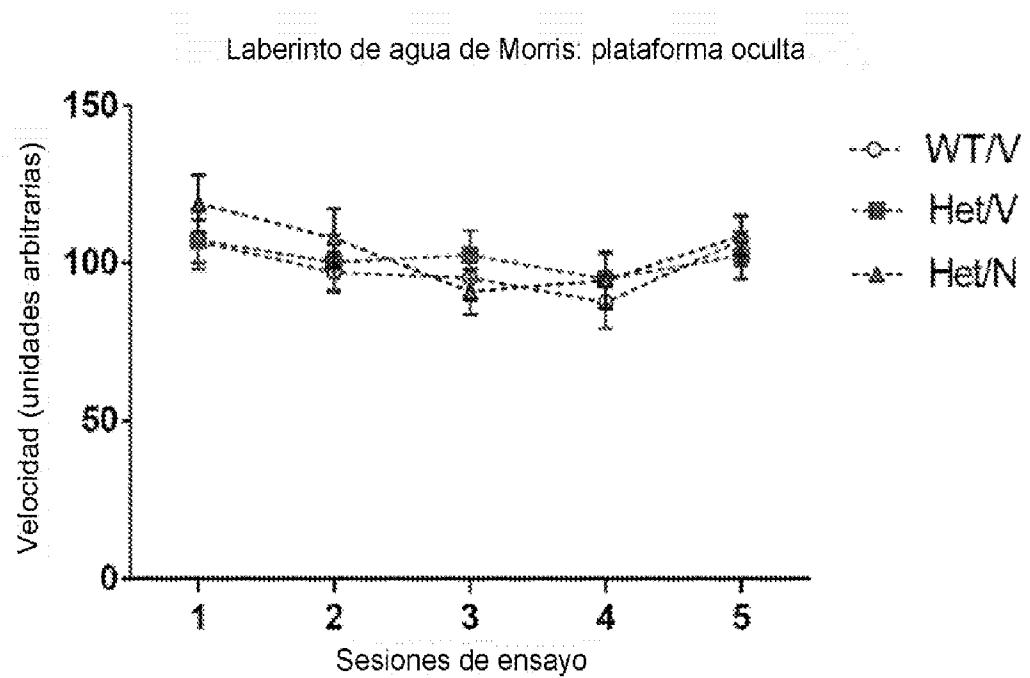
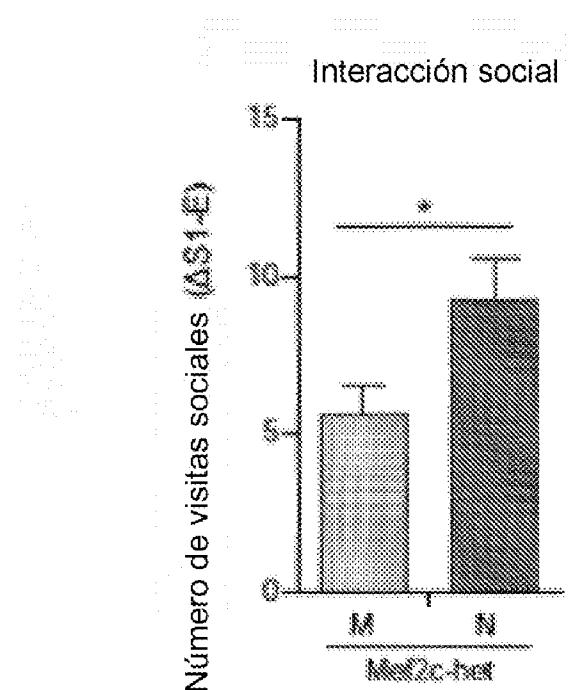
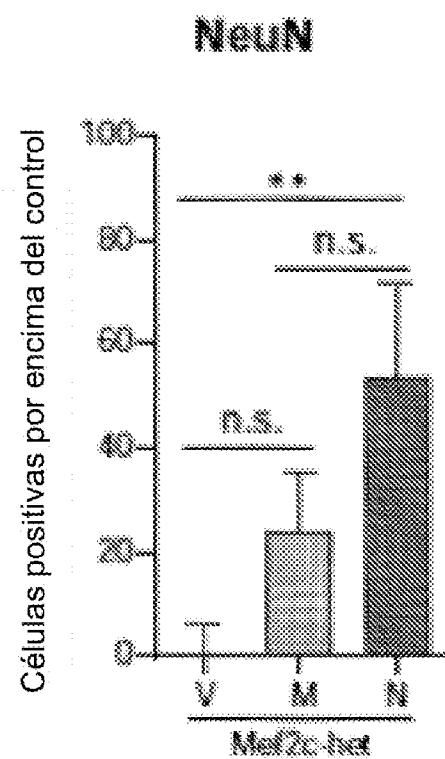


FIG. 11

*FIG. 12A**FIG. 12B*

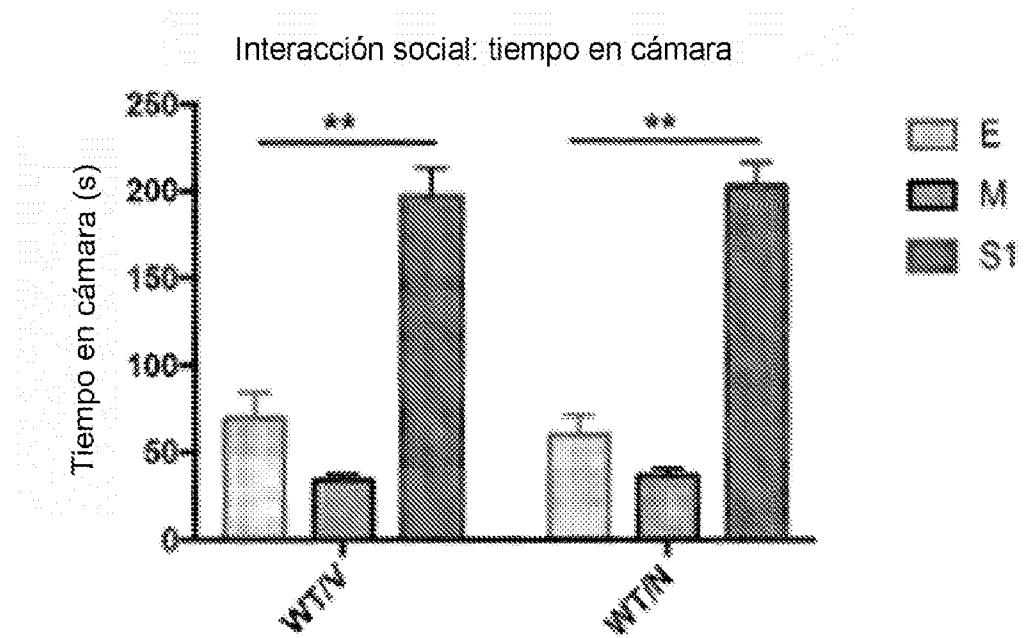


FIG. 13A

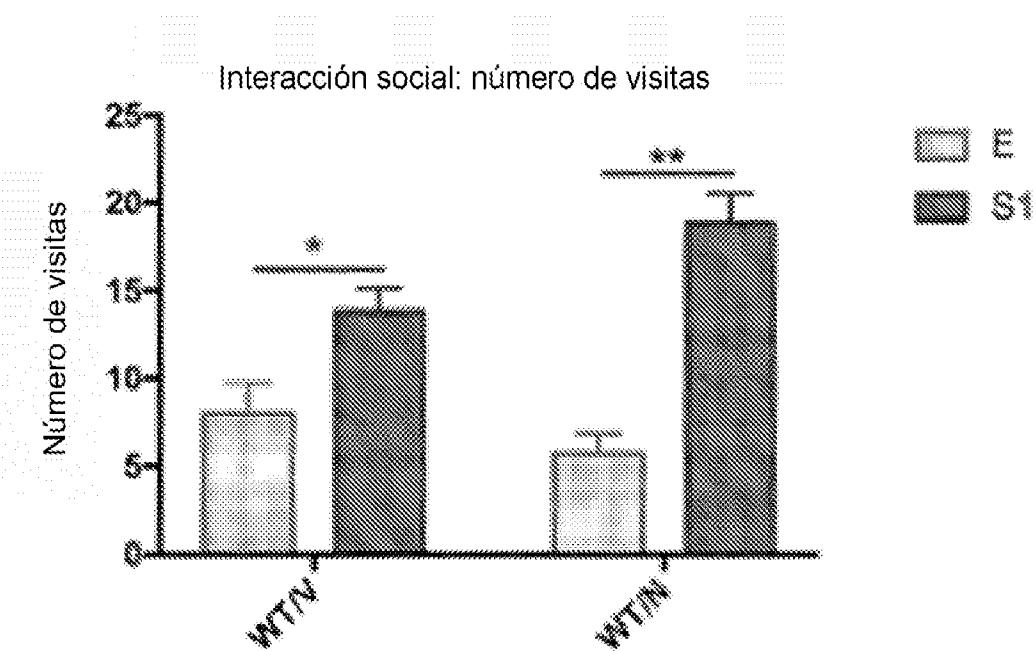
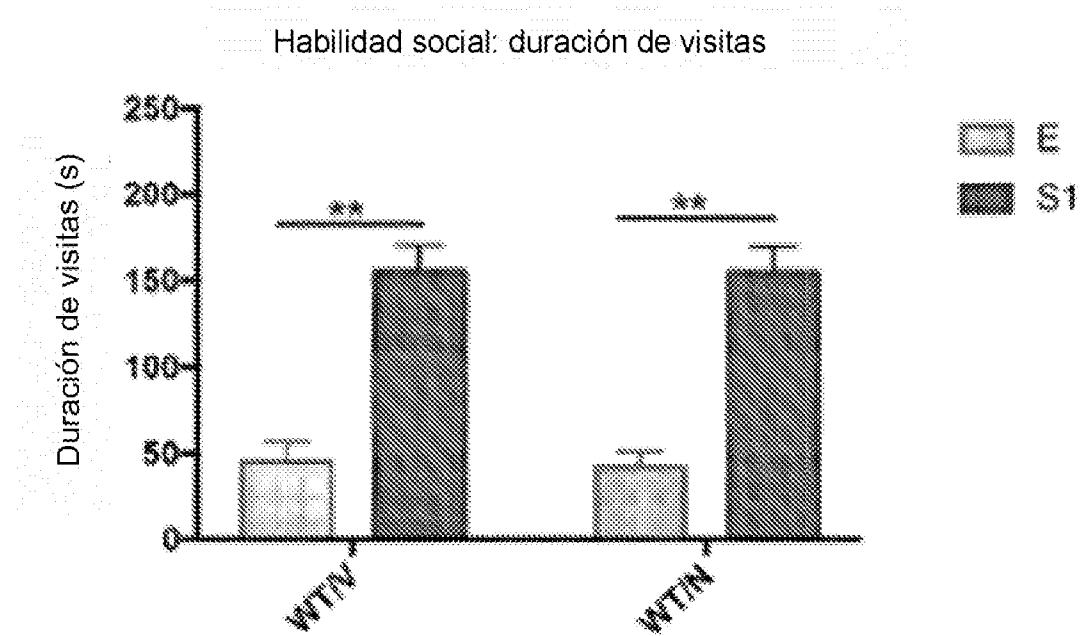
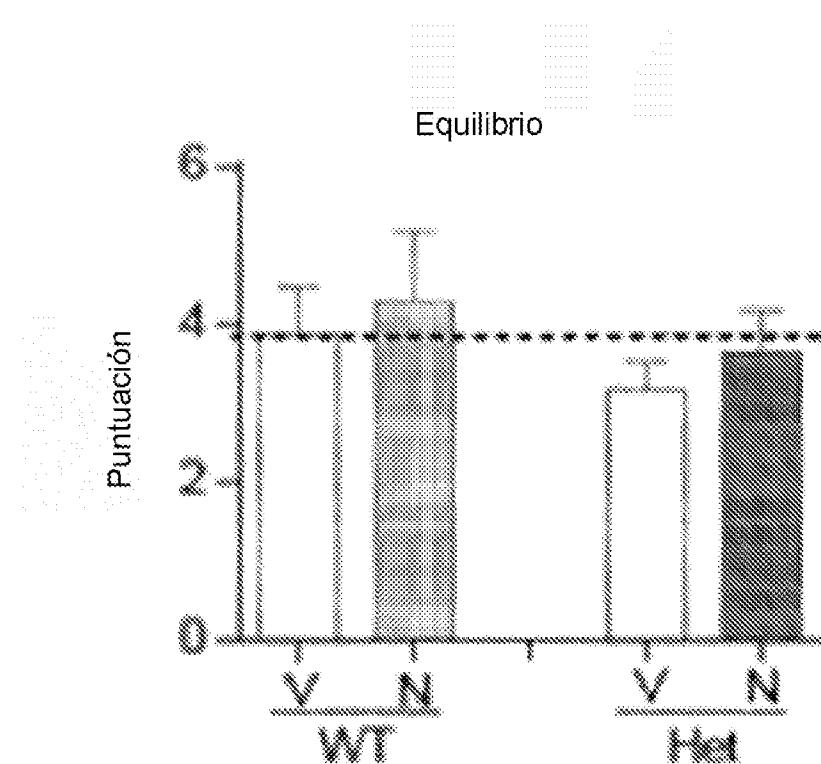


FIG. 13B

**FIG. 13C****FIG. 14A**

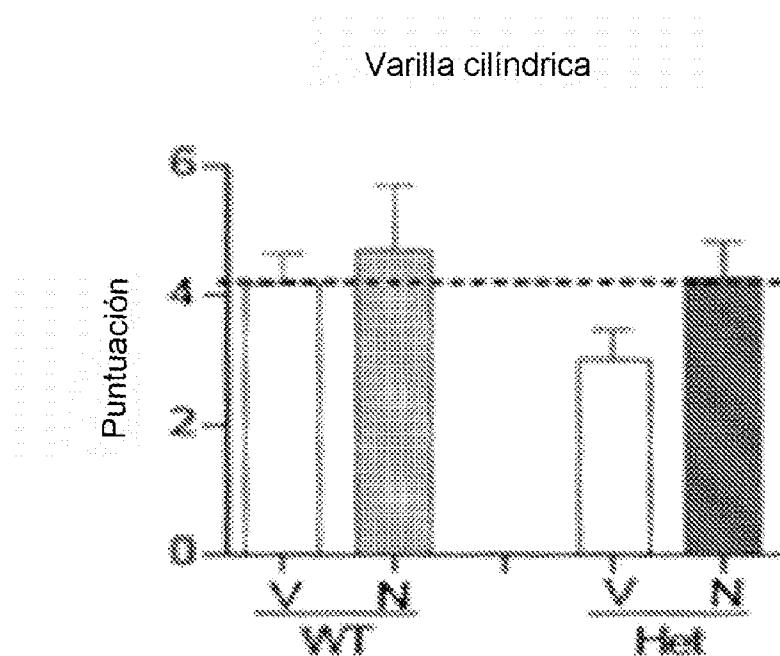


FIG. 14B

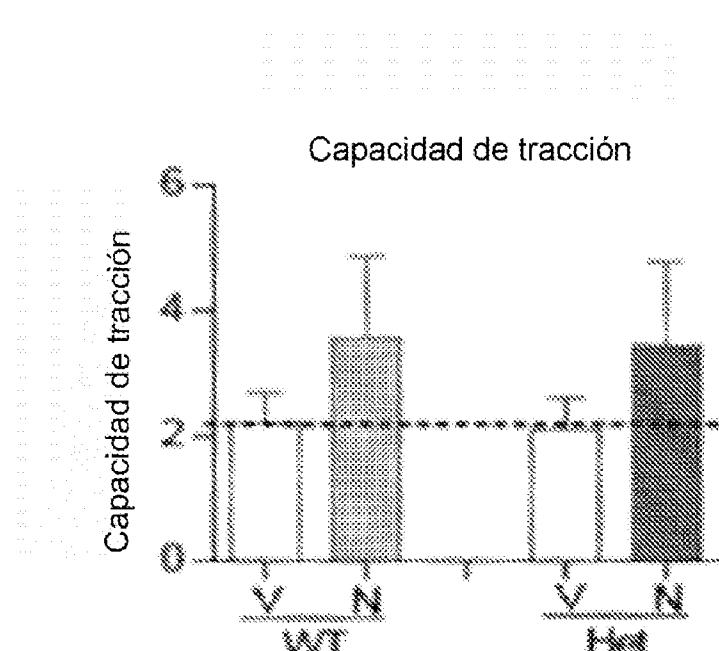


FIG. 14C

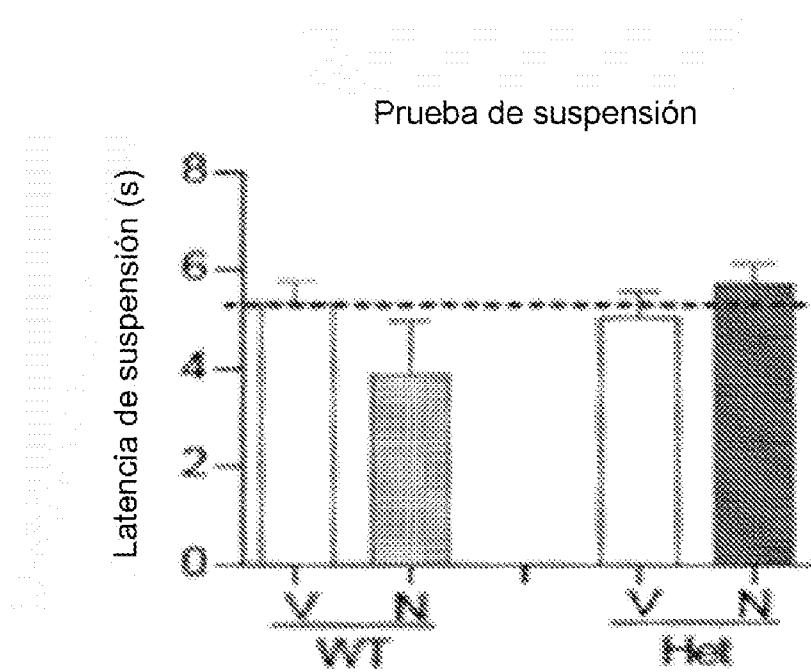


FIG. 14D

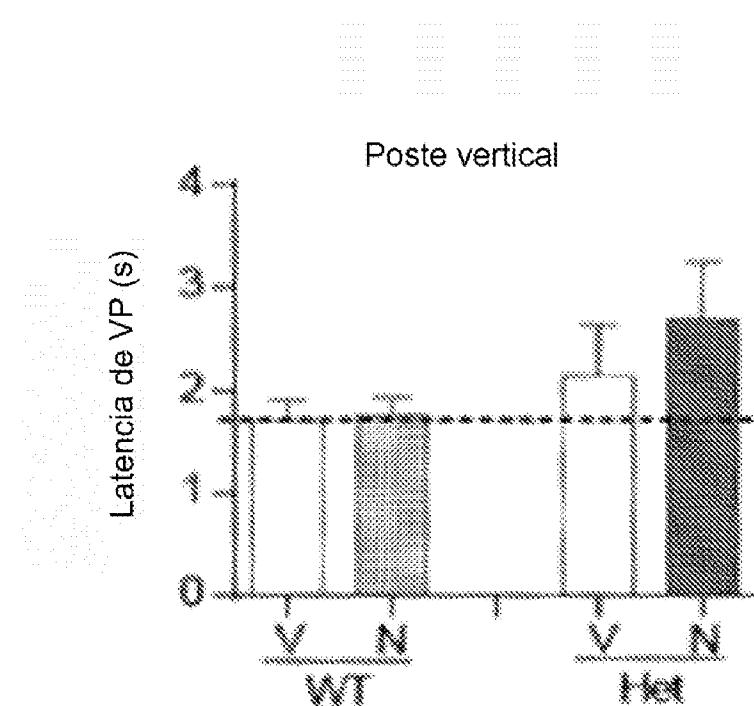


FIG. 14E

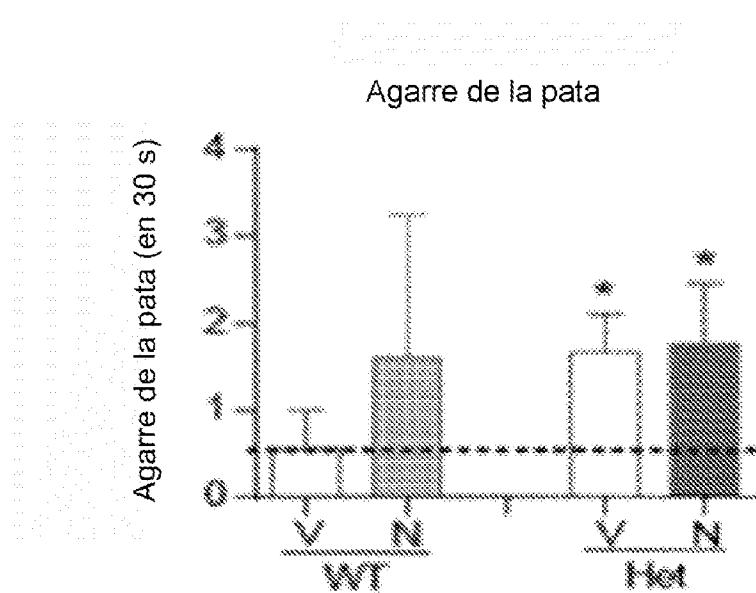


FIG. 14F

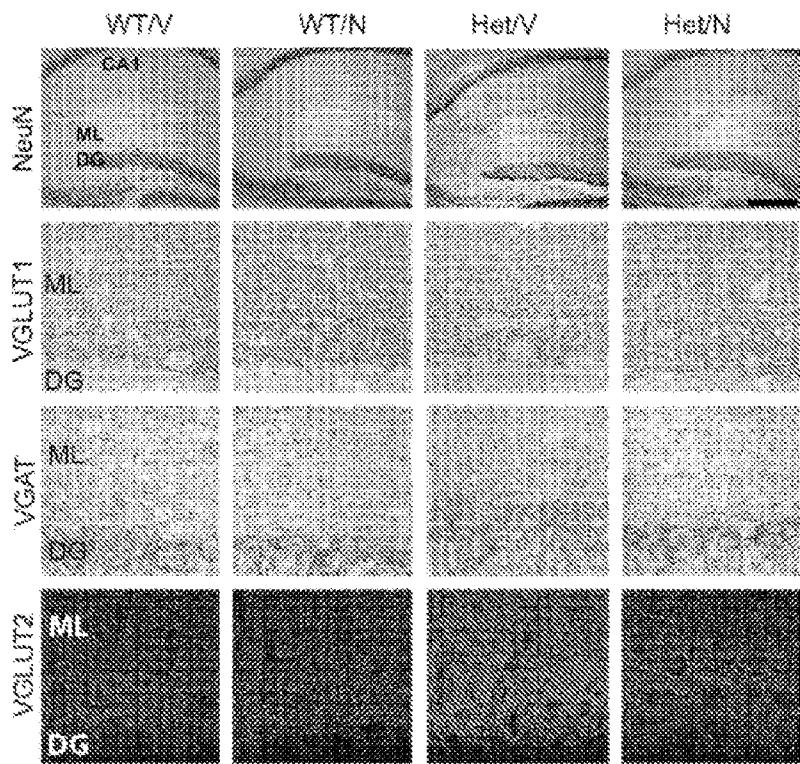


FIG. 15A

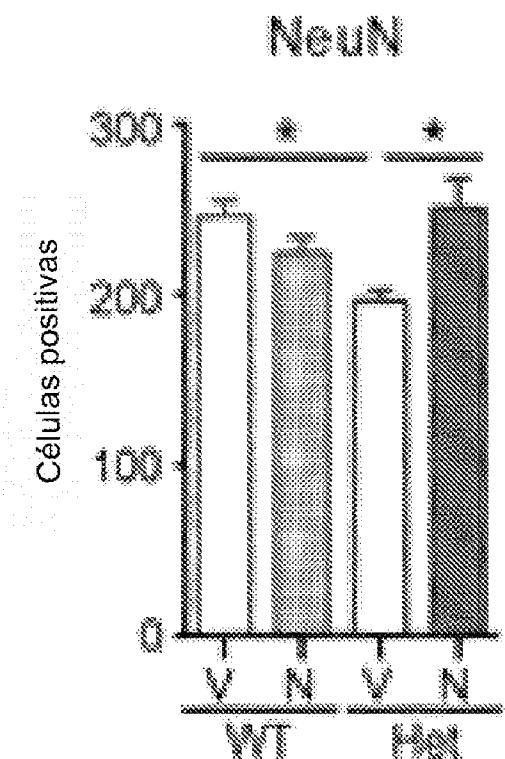


FIG. 15B

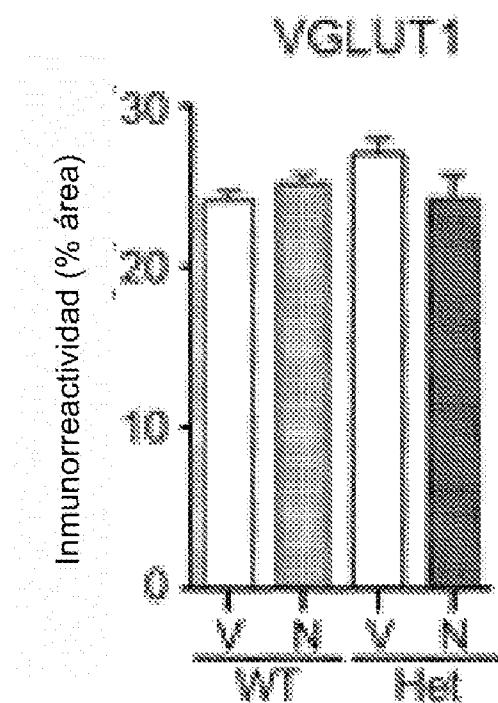


FIG. 15C

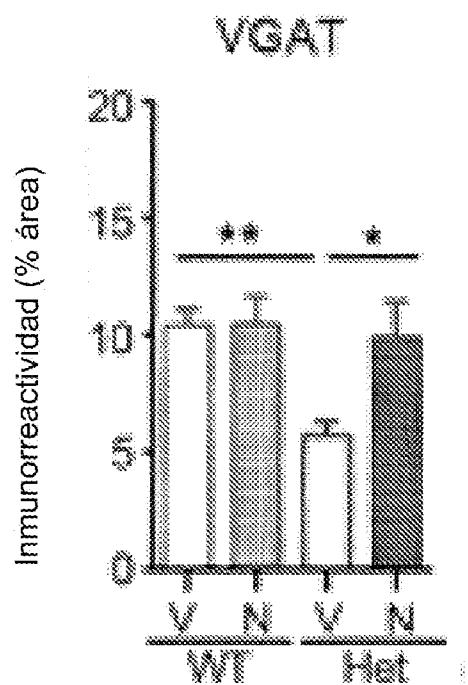


FIG. 15D

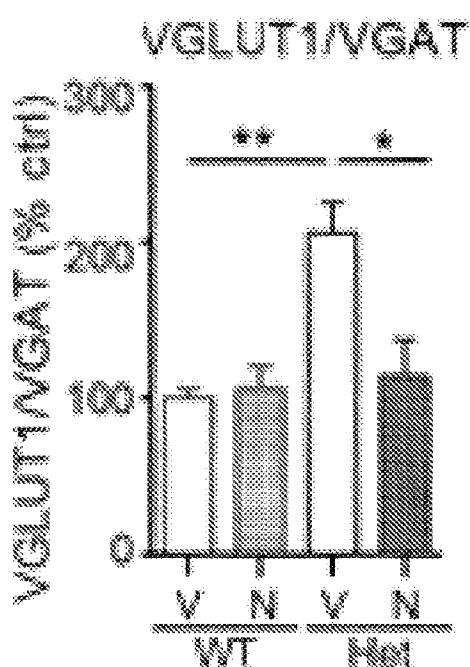


FIG. 15E

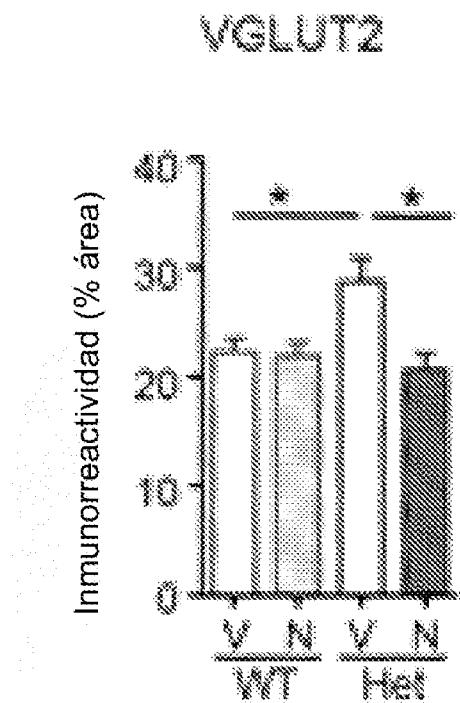


FIG. 15F

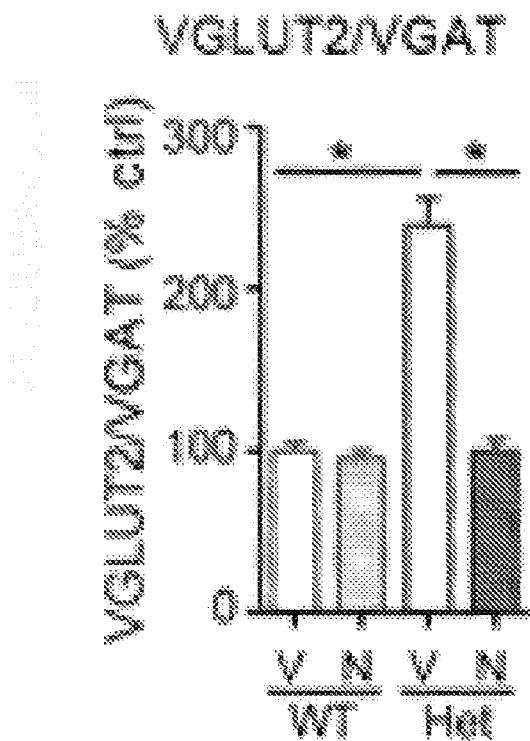


FIG. 15G

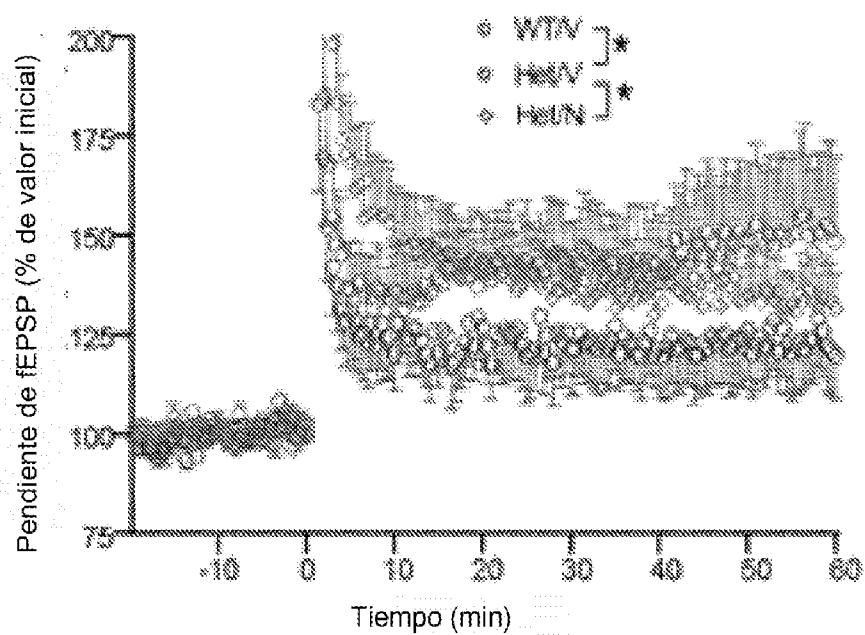


FIG. 15H

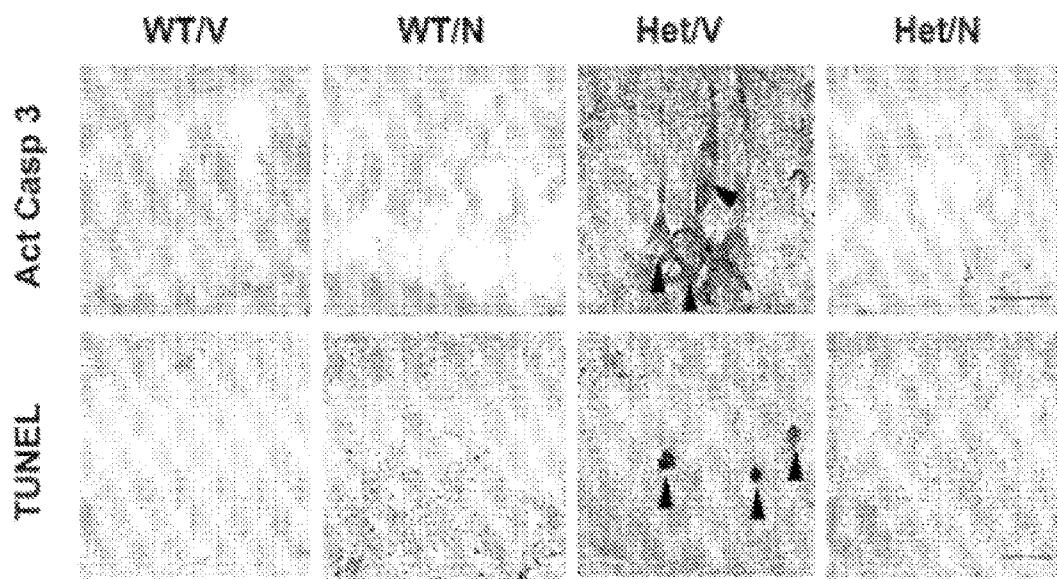


FIG. 16A

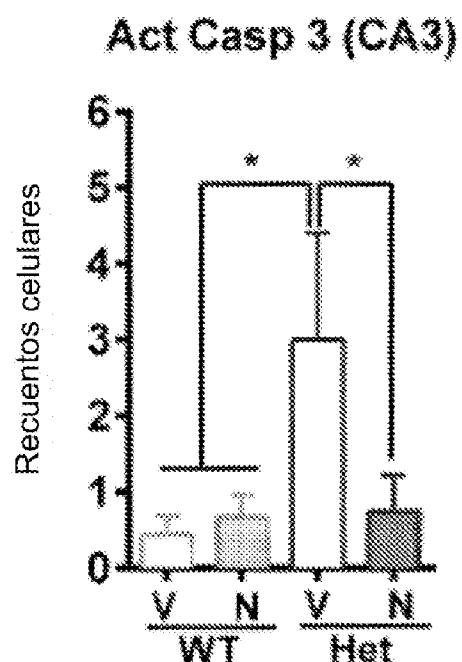


FIG. 16B

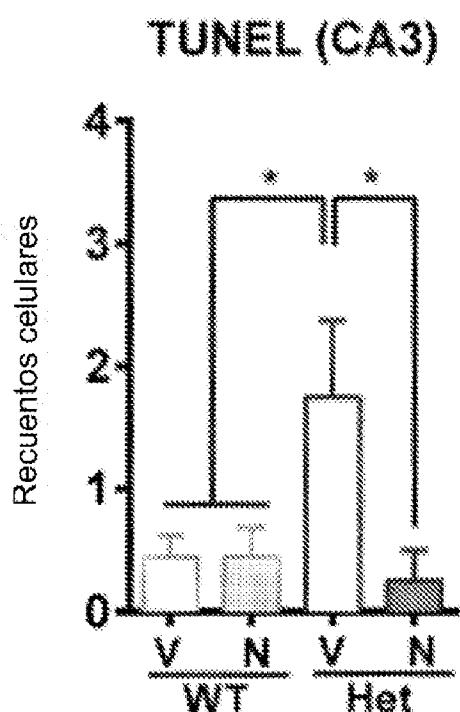
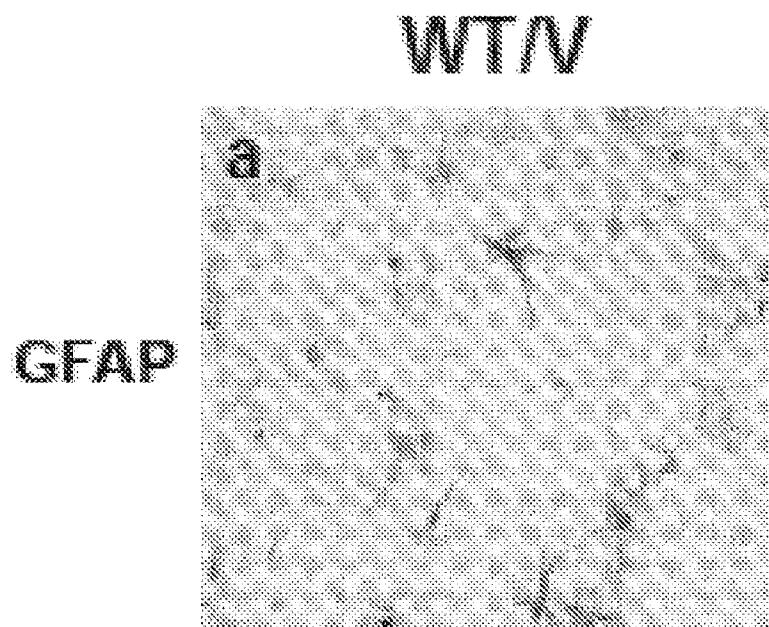
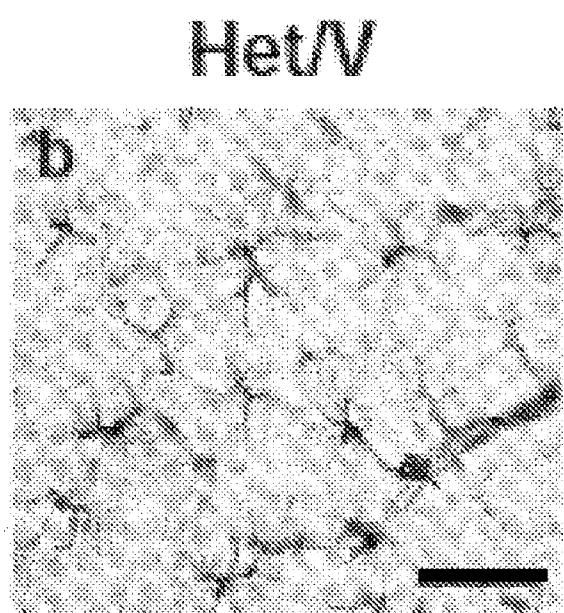


FIG. 16C



*FIG 17A*



*FIG 17B*

Het/N

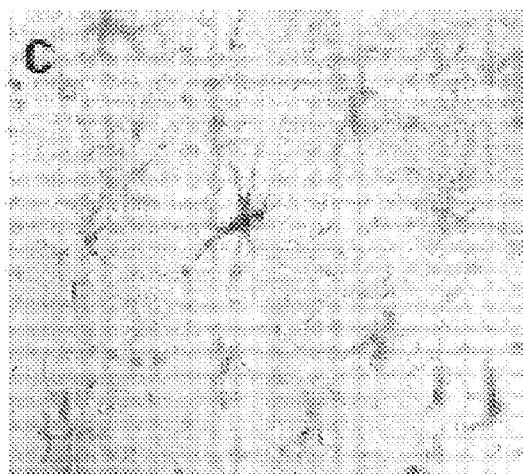


FIG 17C

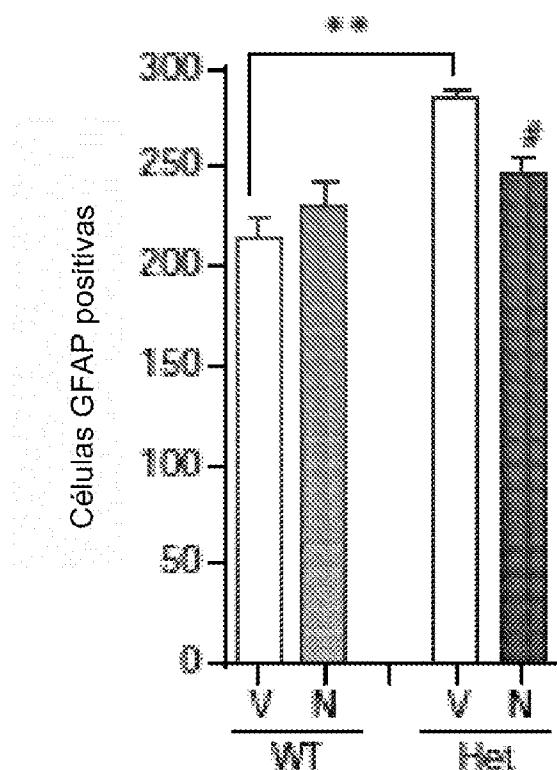


FIG 17D

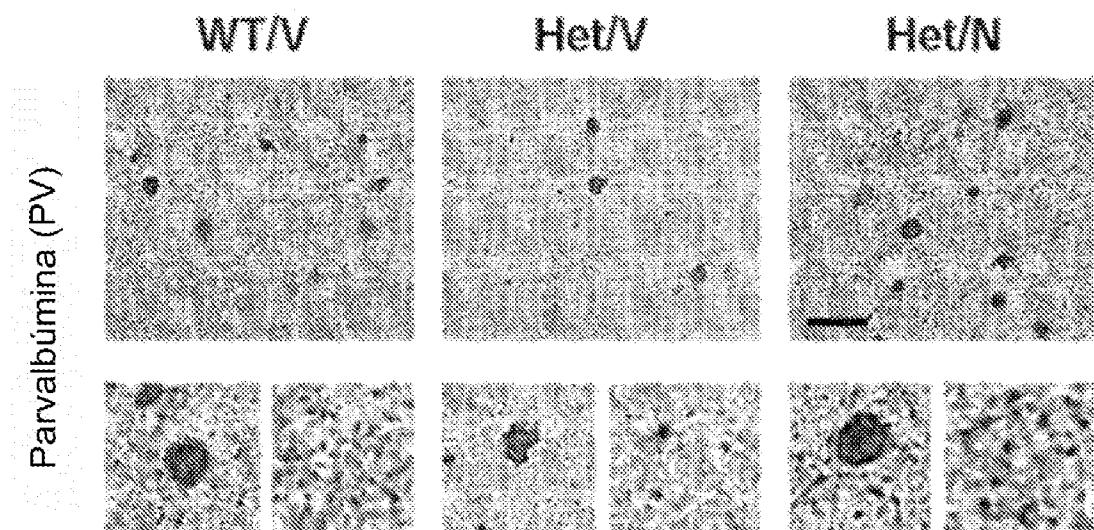


FIG 18A

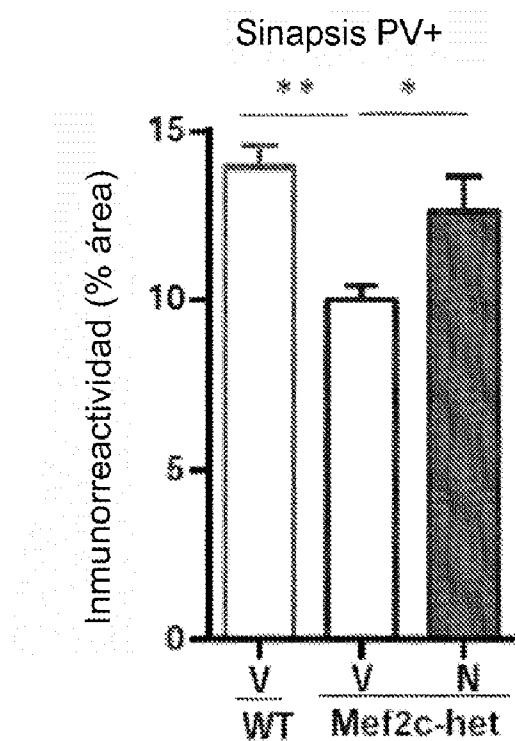


FIG 18B

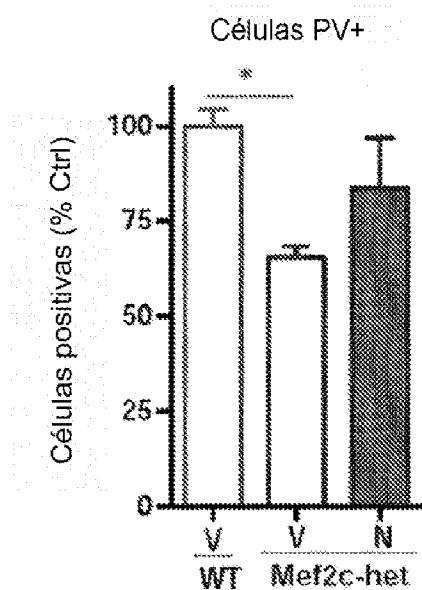


FIG 18C

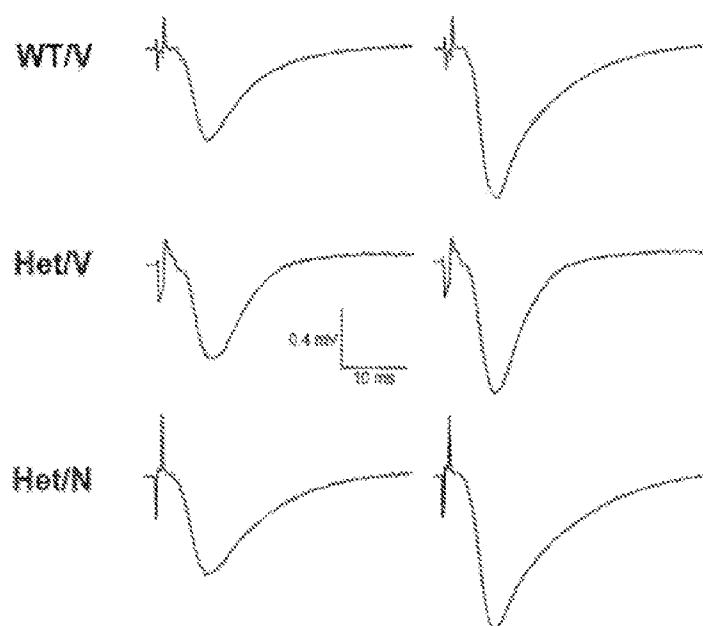
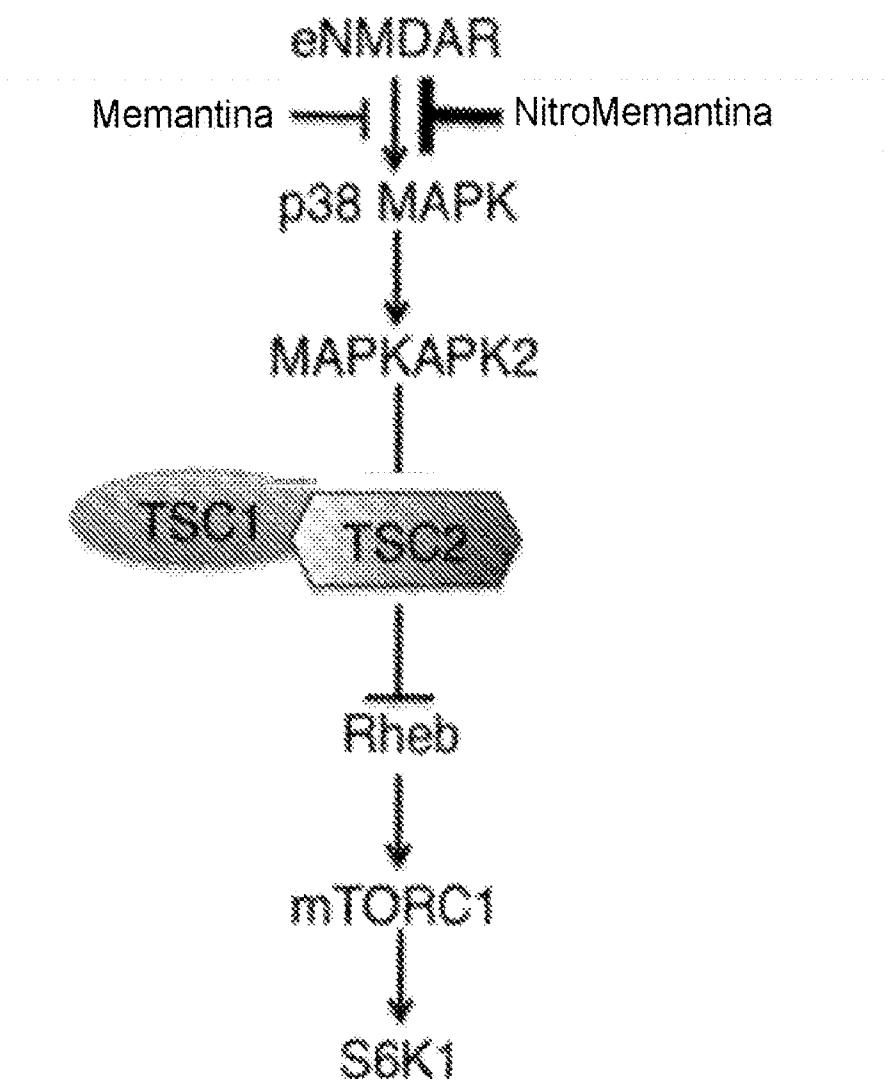


FIG 19



*FIG 20A*

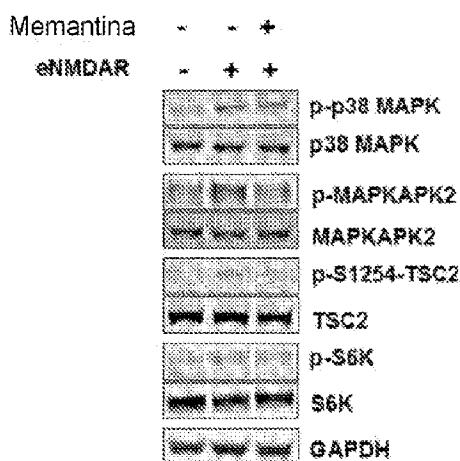


FIG. 20B

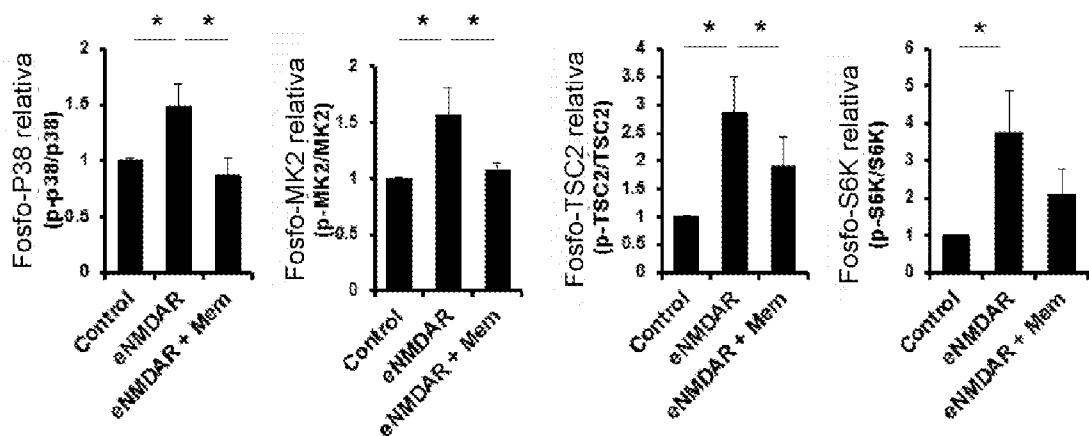


FIG. 20C

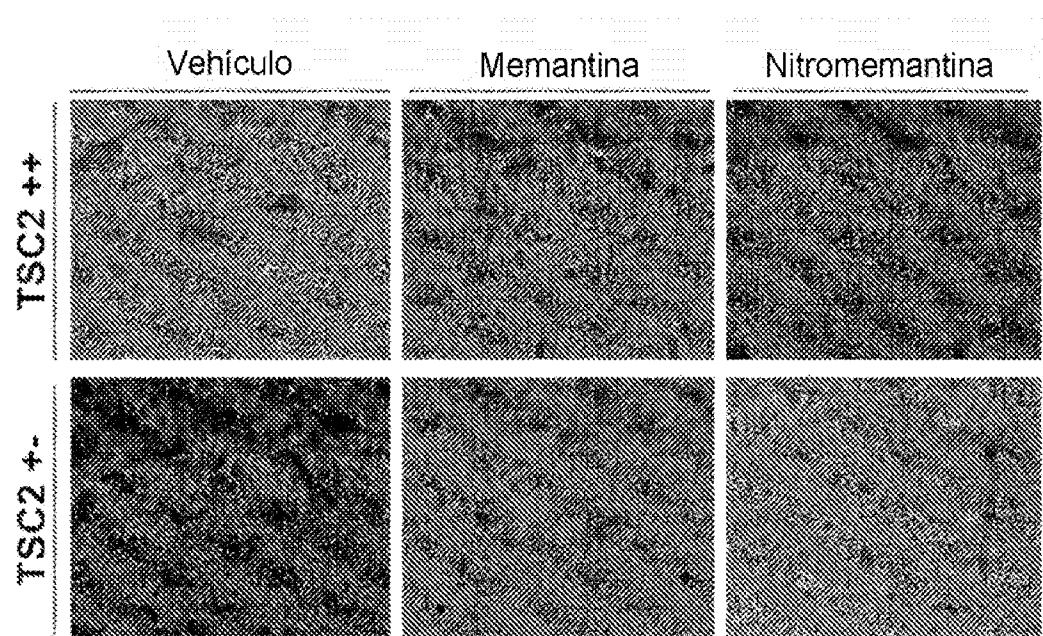


FIG 2IA

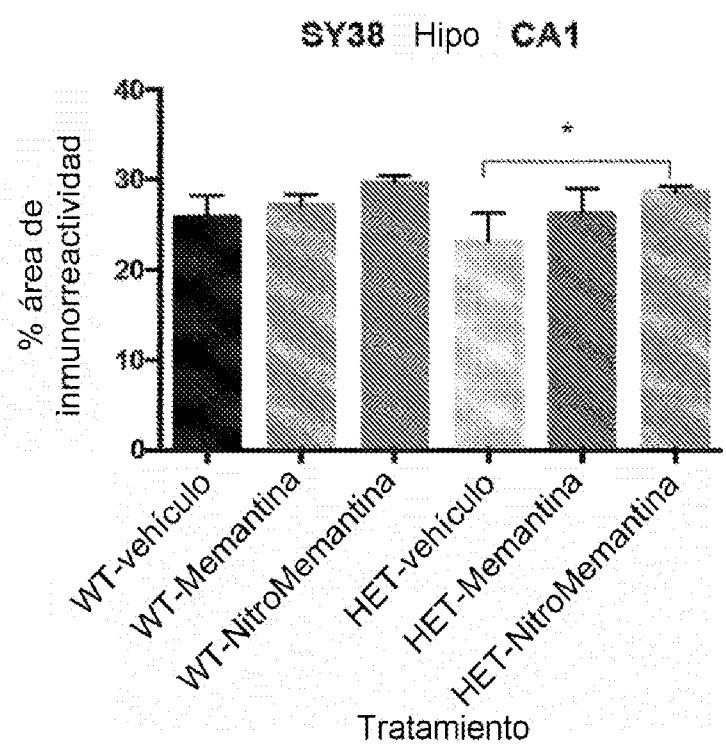


FIG 2IB

Los resultados muestran que tanto la Memantina como la Nitromemantina tienen una efecto protector sobre la expresión de TSC2 en el hipocampo CA1 de los ratones HET. Sin embargo, la Nitromemantina es más efectiva que la Memantina.

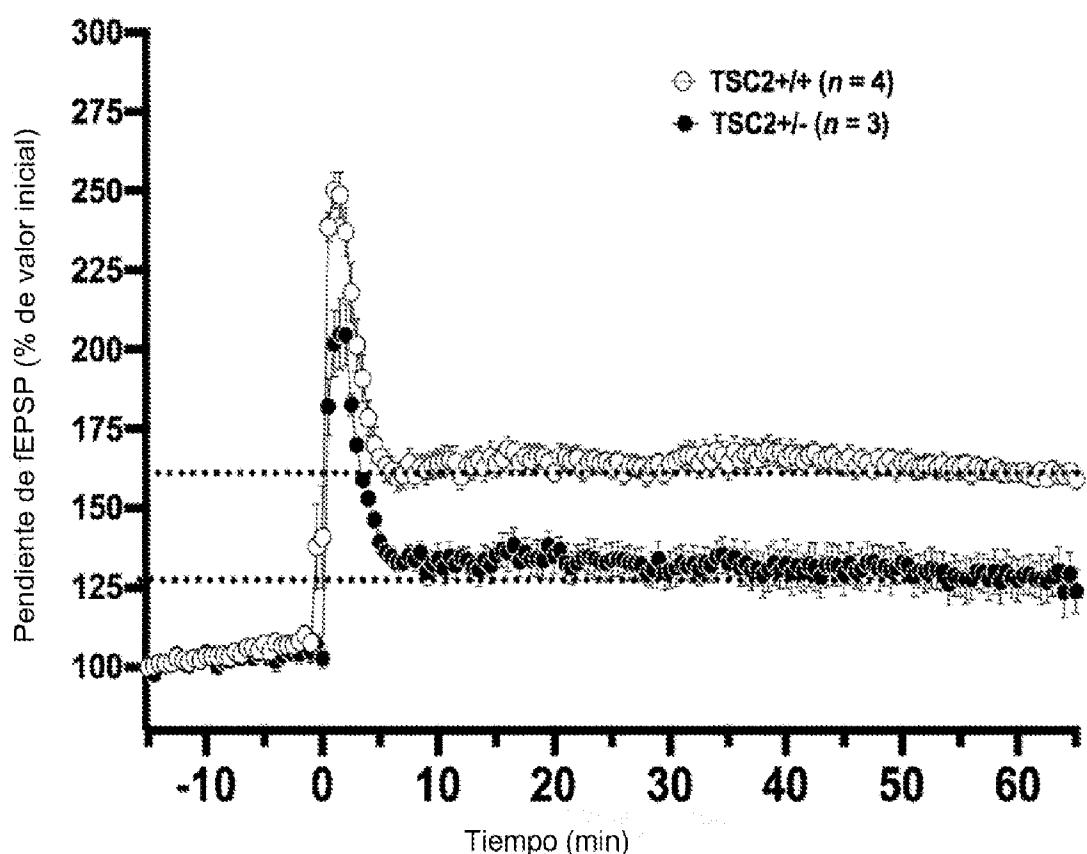


FIG 22A

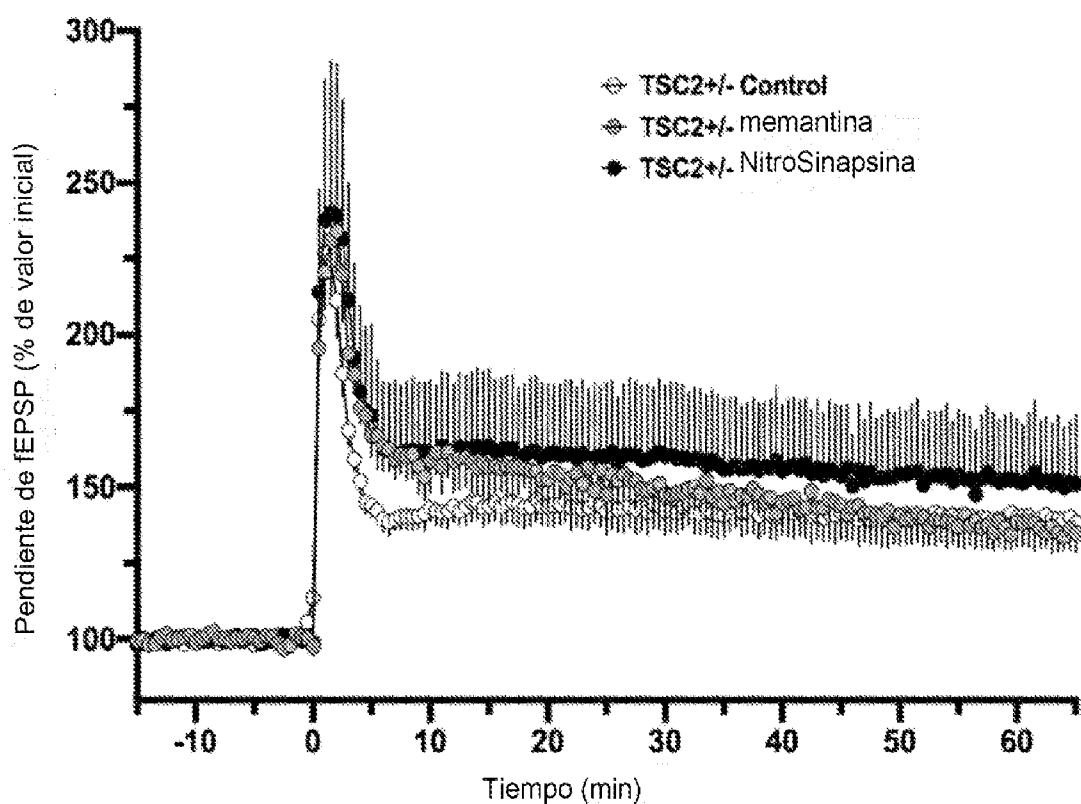


FIG 22B

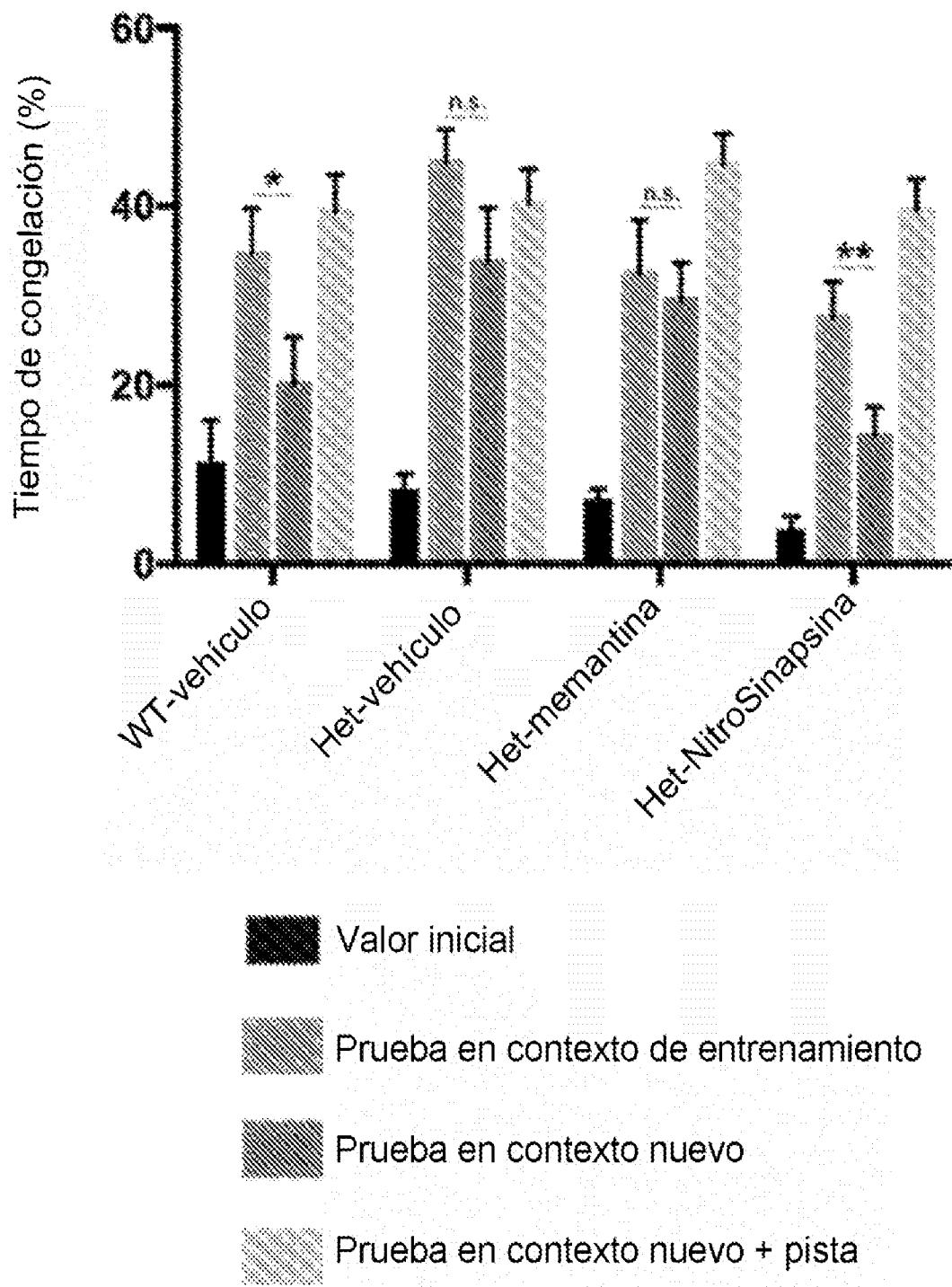


FIG 23

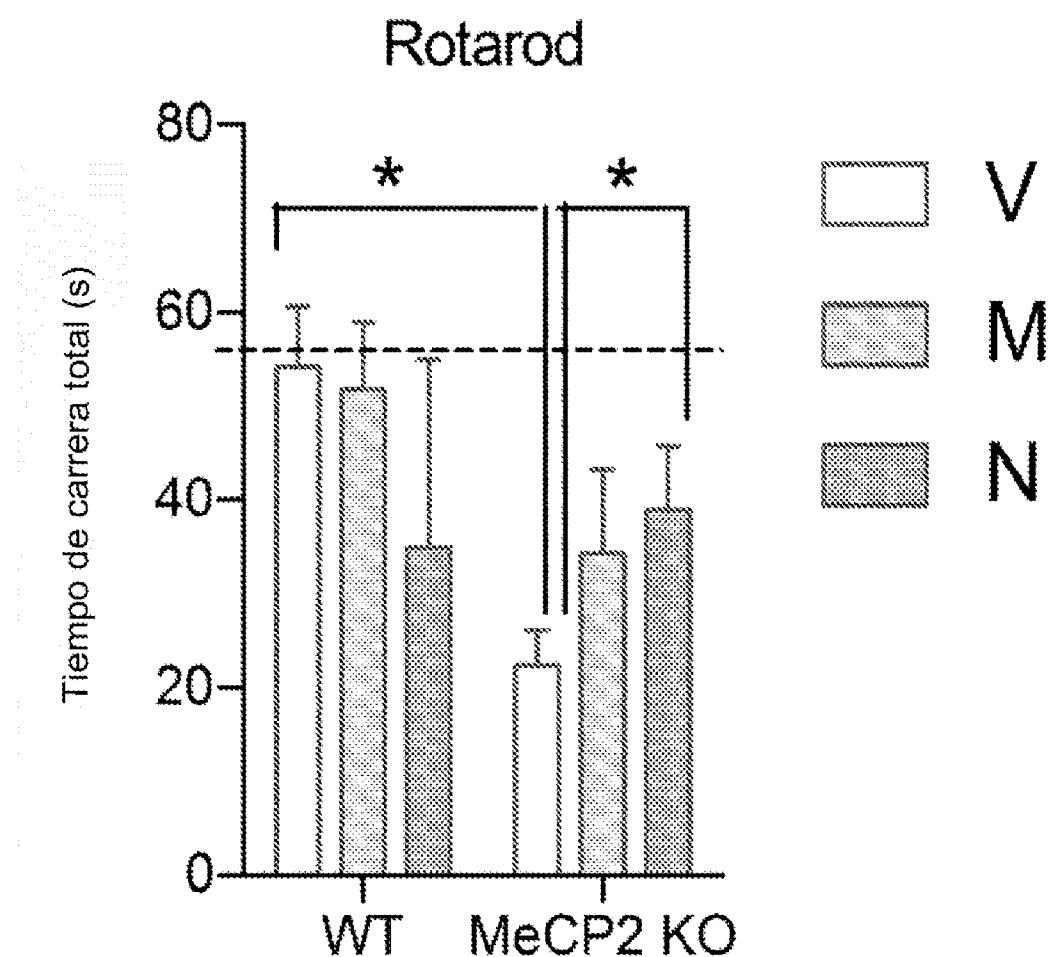


FIG 24