

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 797 395**

51 Int. Cl.:

A61K 31/404 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2012** **PCT/IB2012/053089**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2013** **WO13001412**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2012** **E 12735048 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020** **EP 2723336**

54 Título: **Composiciones para el tratamiento del síndrome X frágil**

30 Prioridad:

27.06.2011 EP 11171532

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.12.2020

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%)**

3, rue Michel-Ange

75016 Paris, FR;

**CENTRE HOSPITALIER RÉGIONAL D'ORLÉANS
(33.3%) y**

UNIVERSITÉ D'ORLÉANS (33.3%)

72 Inventor/es:

BRIAULT, SYLVAIN y

PERCHE, OLIVIER

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 797 395 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

Composiciones para el tratamiento del síndrome X frágil

5 **[0001]** La presente invención se refiere a composiciones para el alivio de los síntomas neuropsiquiátricos y, en particular, los del síndrome X frágil.

[0002] La neuropsiquiatría es la rama de la medicina que se ocupa de los trastornos mentales atribuibles a enfermedades del sistema nervioso, esta disciplina está estrechamente relacionada con la neurología, pero la
10 neurología y la neuropsiquiatría generalmente se practican por separado. La neurología es una especialidad médica que se ocupa de los trastornos del sistema nervioso, como las patologías del sistema nervioso central, periférico y autónomo, así como del tejido conectivo asociado con el sistema nervioso.

[0003] La base de las afecciones neuropsiquiátricas puede deberse a una aberración de un solo gen o una
15 combinación de varias mutaciones y/o señales ambientales.

[0004] Un ejemplo de un trastorno neuropsiquiátrico causado por una aberración de un solo gen es el síndrome X frágil (FXS). El FXS o el síndrome Martin-Bell (ICD₁₀: Q99.2), es un síndrome genético que produce un espectro de limitaciones físicas e intelectuales características, así como una serie de aberraciones emocionales y conductuales
20 que varían de graves a leves en su manifestación. En particular, los enfermos de FXS pueden presentar síntomas de trastorno mental en el espectro del autismo, así como epilepsia.

[0005] FXS es una deficiencia mental sindrómica ligada al cromosoma X (Hamel y Ropers, 2005) caracterizada por un coeficiente intelectual bajo (De la Cruz y col., 1985), dismorfia facial, macroorquidismo, lo que lo convierte en
25 una afección clínicamente reconocible. En el 5 al 25 % de los casos, la deficiencia mental puede asociarse con síntomas adicionales variables, tales como comportamientos similares al espectro autista, déficit de atención e hiperactividad, convulsiones infantiles y varias manifestaciones físicas (Hagerman y col., 2006; Di Bonaventura y col., 2006). La base molecular del FXS es una expansión anormal de un triplete CGG ubicado en Xq27 en la región 5' no traducida del gen FMR1, lo que conduce a una disminución en la transcripción del gen. Hay tres estados generalmente
30 aceptados de la región cromosómica involucrados en el FXS que se relacionan con la longitud de la secuencia CGG repetida: Normal (29-31 repeticiones CGG) (no afectado por el síndrome), Premutación (55-200 repeticiones CGG) (no afectado por el síndrome), mutación completa (más de 200 repeticiones CGG) (afectado).

[0006] La proteína FMR (FMRP) actúa como un supresor de la actividad traduccional, particularmente en las
35 dendritas neuronales que controlan la localización y expresión de un conjunto de proteínas sinápticas específicas. Se ha propuesto que la pérdida de retroalimentación negativa como consecuencia de la caída en la producción de FMRP, produce anomalías en la estructura y el funcionamiento de las sinapsis que a su vez causan el fenotipo del FXS.

[0007] Además de la discapacidad intelectual, las características prominentes del FXS incluyen una cara
40 alargada, orejas grandes o protuberantes, pies planos, testículos más grandes (macroorquidia) y bajo tono muscular. El habla puede incluir patrones de habla desordenados o nerviosos. Las características de comportamiento pueden incluir movimientos estereotípicos (por ejemplo, aleteo de manos) y desarrollo social atípico, particularmente timidez, contacto visual limitado, problemas de memoria y dificultad con la codificación y el reconocimiento facial. Muchas personas con FXS también cumplen con los criterios de diagnóstico para algunas características de tipo autista. La
45 mayoría de las mujeres que tienen el síndrome experimentan síntomas en menor grado debido a su segundo cromosoma X; sin embargo, las mujeres pueden desarrollar síntomas tan graves como sus contrapartes masculinas. Mientras que los hombres con mutación completa tienden a presentar discapacidad intelectual grave, los síntomas de las mujeres con una mutación completa abarcan toda la gama de discapacidad intelectual de mínimamente afectada a grave, lo que puede explicar por qué las mujeres tienen un diagnóstico insuficiente en relación con los hombres, lo
50 que lleva a la persistencia de la anomalía en la población.

[0008] En la actualidad, no se ha aprobado ningún medicamento para el tratamiento del FXS.

[0009] El FXS se considera un objetivo terapéutico importante en primer lugar, ya que es la forma más común
55 de retraso mental atribuible a una mutación genética única y también porque el desarrollo de medicamentos para tratar enfermedades neuropsiquiátricas como el retraso mental o el autismo se está convirtiendo en un objetivo comercial cada vez más importante. Un enfoque basado en la observación de los trastornos de un solo gen y el uso de estos como una ventana al campo del tratamiento de enfermedades neuropsiquiátricas como el retraso mental o el autismo es una de las estrategias de desarrollo más atractivas disponibles.

[0010] Sin embargo, la investigación en esta área ha sido lenta debido a la interacción compleja de factores
60 genéticos y ambientales en la gravedad del retraso mental y los fenotipos asociados. Específicamente en relación con las formas de retraso mental ligadas al cromosoma X, se conocen actualmente unas ciento cuarenta formas sindrómicas (Ropers y col., Nature Reviews Genetics 2005), de las cuales algunas han demostrado tener una base
65 alélica, mientras que otras siguen sin caracterizarse. Por lo tanto, aunque se conoce la base genética del FXS, las

diversas consecuencias bioquímicas y fisiológicas de esta aberración genética siguen siendo caracterizadas y se desarrollan nuevos tipos de tratamiento a medida que nuestros conocimientos continúan aumentando.

5 **[0011]** Algunos trabajadores que buscaron los medios para tratar el FXS han demostrado que un exceso de glutamato se acumula en la sinapsis de un modelo de ratón de FXS y es responsable de los déficits cognitivos que se observan en este modelo de ratón de FXS (Huber y col. Proc. Natl. Acad. Sci. (2002)). Algunos trabajadores también encontraron que reducir la expresión de un receptor de glutamato específico, mGluR5, revierte estos síntomas en el modelo animal (Dolen y col. Neuron (2007)).

10 **[0012]** Como consecuencia de este trabajo, se desarrollaron inhibidores de mGluR5, en particular por parte de Merck & Co Inc, y posteriormente se han llevado a ensayos clínicos.

[0013] También se propuso una segunda clase de fármaco ejemplificada por el arbaclofen que estimula los receptores de ácido gamma aminobutírico (B) o GABA (B) y, por lo tanto, amortigua la señalización de glutamato. 15 También se están realizando ensayos clínicos para evaluar el arbaclofen en niños y adultos con síndrome X frágil, así como un ensayo abierto de niños con autismo.

[0014] Otros ejemplos de tratamientos propuestos para el FXS se detallan en la Tabla 1 a continuación.

20

Tabla 1

Referencia	Compuesto	Efectos
Rueda y col., BMC Neurology 2009	Ácido fólico	Metabolismo
	Compuesto de ampaquinas CX516	Ruta de AMPA
	Dextroanfetamina	Ciclo del fosfoinositol
	Metilfenidato	Inhibidor del transporte de la dopamina
	L-acetilcarnitina	Mitocondrial
Chang y col., Nature Chemical Biology 2008	Ácido nipecotico	Inhibidor de la recaptación del GABA
	Creatinina	Metabolismo, ruta GABAérgica
	Maleato de ergonovina	Ruta de serotonina
	Nitrato de pilocarpina	Agonista muscarínico
	Dienestrol	Relacionado con las hormonas sexuales
	Citrato de clomifeno	Relacionado con las hormonas sexuales
	GABA	Ruta GABAérgica
	Ácido kójico	Inhibidor de la tirosinasa
	Aminobenzotropina	Agonista muscarínico
	MPEP	Ruta de mGluR
Erickson y col. Neurotherapeutics 2010	Aripiprazol	Dopamina parcial y agonista de 5-HT _{1A} y antagonista de 5-HT _{2A}

[0015] Varios de los tratamientos propuestos para el FXS son medicamentos bien caracterizados como la dextroanfetamina y el aripiprazol, suplementos dietéticos como el ácido fólico o metabolitos como la creatinina, cuyas propiedades farmacológicas y modo de acción están bien caracterizados. 25

[0016] Otros trabajadores en el campo han propuesto tratamientos alternativos para el FXS, por ejemplo, Zeier y col. (Gene Therapy 2009) proponen un tratamiento para el FXS mediante terapia génica para reemplazar el FMRP endógeno defectuoso con una versión funcional de FMRP. Con referencia a Brown y col., (Nat. Neurosci. 2010), se esperaría que este nivel aumentado de FMRP activara una clase específica de canales de potasio, el canal Slack 30 (para una secuencia similar a un canal K⁺ activado por Ca²⁺).

[0017] Los supuestos objetivos terapéuticos alternativos para tratar el FXS incluyen la regulación de la expresión del gen KCND2. KCND2 es otro canal iónico de potasio que forma un canal iónico de potasio de tipo A activado por voltaje que desempeña un papel destacado en la fase de repolarización del potencial de acción. De

hecho, muchos canales de potasio parecen ser objetivos terapéuticos para el FXS (Lee y col., 2012). Recientemente, Lee y col. revisaron todos los canales de potasio que podrían ser nuevas formas de tratamiento, entre ellos, se mencionaron Slack, Kv4.2 (KCND2), Kv1.3.

5 **[0018]** En Liao y col. (PNAS 2008) se observó una pequeña reducción en el nivel de expresión de la proteína KCNMA1, la subunidad alfa del canal BKCa, en un modelo de ratón noqueado con respecto al gen FMR1. Liao y col. no pudieron atribuir esta reducción en la expresión de la subunidad alfa BKCa al fenotipo del modelo, ya que era solo una de las 132 proteínas (de un grupo inicial de 3880) que mostraban una expresión alterada. Anteriormente, Hu y col. (2001) y otros han demostrado que BKCa no modula la actividad de la transmisión sináptica.

10

[0019] La presente invención está definida por las reivindicaciones.

[0020] Los solicitantes han descubierto ahora una nueva vía terapéutica para el FXS, la vía BKCa que nunca ha sido presentada anteriormente y han investigado una clase de medicamentos dirigidos específicamente a BKCa. Este medicamento se puede usar para tratar específicamente los síntomas del FXS y también puede ser generalmente aplicable al tratamiento y al alivio de los síntomas del trastorno del espectro autista y/u otras clases de trastornos neuropsiquiátricos.

15

[0021] En particular, los solicitantes han investigado una nueva vía terapéutica para el FXS, la vía BKCa y los efectos de los agentes que actúan sobre este canal de potasio como medio para tratar los síntomas de dos afecciones diferentes FXS (ICD₁₀: Q99.2) y también más generalmente los del autismo (ICD₁₀: F84.0).

20

[0022] Sorprendentemente, los inventores han establecido que esta clase de compuesto puede revertir los síntomas característicos asociados con el FXS y, por lo tanto, según un primer aspecto de la presente descripción, se proporciona una composición que comprende un abridor de canales de potasio maxi-K para el uso en el tratamiento de un trastorno neuropsiquiátrico.

25

[0023] Según este aspecto de la presente descripción, el trastorno neuropsiquiátrico puede mostrar en particular síntomas/comportamientos característicos de los trastornos del espectro autista.

30

[0024] El espectro autista, también llamado trastornos del espectro autista (ASD) o afecciones del espectro autista (ASC), es un espectro de afecciones neuropsiquiátricas caracterizadas por anomalías generalizadas de las interacciones sociales y la comunicación, así como intereses restringidos y comportamiento repetitivo.

35

[0025] Específicamente, según la presente descripción, se proporciona una composición que comprende un abridor de canales de potasio maxi-K para el uso en el tratamiento del síndrome X frágil.

[0026] Según la presente descripción, un canal Maxi-K también conocido como canal BK (Big Potassium) o slo1 o BKCa (Big Potassium Calcium) o KCNMA1, son canales iónicos caracterizados por su gran conductancia de iones de potasio (K⁺) a través de las membranas celulares. Estos canales se activan (abren) por cambios en el potencial eléctrico de la membrana y/o por aumentos en la concentración de iones de calcio intracelulares (Ca²⁺). La apertura de los canales maxi-K permite que los K⁺ fluyan pasivamente a través del canal, bajando por el gradiente electroquímico. En condiciones fisiológicas típicas, esto produce un flujo de salida de K⁺ de la célula, lo que conduce a la hiperpolarización de la membrana celular (una disminución en el potencial eléctrico a través de la membrana celular) y una disminución en la excitabilidad de la célula (una disminución en la probabilidad de que la célula transmita un potencial de acción).

40

[0027] Al igual que con otros canales de potasio, los canales Maxi-K tienen una estructura tetramérica. Cada monómero de la subunidad alfa formadora de canales es el producto del gen KCNMA1. Las subunidades beta moduladoras (codificadas por KCNMB1, KCNMB2, KCNMB3 o KCNMB4) pueden asociarse con el canal tetramérico.

50

[0028] Según la presente descripción, un abridor de canales maxi-K es uno que activa los canales de potasio maxi-K en las células en condiciones de alta concentración de calcio intracelular y no activa significativamente los canales de potasio maxi-K en las células con concentraciones bajas o normales de calcio intracelular.

55

[0029] Como guía, los ejemplos no limitativos de altos niveles de calcio intracelular se consideran típicamente en el intervalo nanomolar alto (por ejemplo, mayor que aproximadamente 250 o 300 nM) a micromolar (por ejemplo, aproximadamente de 1 a 10 mM); los niveles normales o fisiológicos de calcio intracelular se consideran típicamente en el intervalo de aproximadamente 50 nM a 250 nM y los niveles bajos de calcio intracelular se consideran típicamente en el intervalo de aproximadamente 5 a 50 nM. Se sabe que un gran número de moléculas tiene la capacidad de abrir el canal maxi-K como los derivados de oxindol sustituidos con 3-fenilo, halo-oxindoles, bencimidazolona (NS 004, NS 1619), bencimidazol, amiodarona (KB 130015), carboxilatos de indol como el ácido indol-3- carboxílico (CGS 7181, CGS 7184), arilpirrol (NS 8), dihidrosojasaponina-1 (DHS-1), terpeno, cerebrosido (Baifuzi), mallotoxina (Rottlerin), arilquinolina, ariloxindol, ácido pimárico (PiMa), diclorodehidroabiético (diCl-DHAA), flavonoide (naringenina, floretina), benzofuroindol (LDD 175), bencimidazolinona (1-EBIO), fluoropropionamida [(S)-N-(4-benzoilfenil)-3,3,3-trifluoro-2-

60

65

hidroxi-2-metil-propionamida], unoprostona (y unoprostona isopropilo), benzotiadiazolamina [6-(trifluorometoxi)benzotiazol-2-amina], etilbromuro de tamoxifeno, ácido epoxieicosatrienoico, estradiol-17 beta, difenilurea (NS 1608).

5 **[0030]** Una clase de abridores de canales de potasio que funcionan selectivamente en células que tienen altas concentraciones de calcio intracelular son los derivados de oxindol sustituidos con 3-fenilo, tal como se describió en las patentes de EE.UU. n.º 5,565,483 y 5,602,169. Los halo-oxindol como los compuestos de fluoro-oxindol y cloro-oxindol están dentro de la clase descrita anteriormente y son capaces de actuar selectivamente como abridores de canales maxi-K en células que tienen una alta concentración de calcio intracelular.

10 **[0031]** Esta clase de abridor de canales de potasio se ha caracterizado por ser sensible a la concentración de calcio intracelular de las células y ha demostrado ser más efectiva en condiciones de aumento de las concentraciones de calcio intracelular, p. ej., intervalo micro molar, mientras que es mínimamente efectivo o nada efectivo con concentraciones fisiológicas normales de calcio intracelular.

15 **[0032]** Estos compuestos no actúan de manera apreciable para abrir canales de potasio maxi-K en células que tienen una concentración de calcio intracelular normal, moderada o baja.

[0033] En el documento WO02/30868, esta nueva clase de abridor de canales de potasio se propuso para su uso como agentes neuroprotectores, donde la disfunción de los canales de potasio/acumulación excesiva de calcio se asocia con neuronas en riesgo en afecciones neurodegenerativas, como las que se producen durante un accidente cerebrovascular isquémico agudo.

20 **[0034]** Los canales iónicos Maxi-K son proteínas que reaccionan a aumentos sustanciales en el Ca^{2+} intracelular y la despolarización de la membrana al aumentar notablemente el flujo de salida de potasio (K^+), hiperpolarizar rápidamente la membrana y reducir la afluencia de Ca^{2+} dependiente del voltaje (V. K. Gribkoff y col., Adv. Pharmacol., 37:319-348 (1997)).

30 **[0035]** Aunque se realizaron ensayos clínicos para determinar los efectos de los derivados de oxindol sustituidos con 3-fenilo en las víctimas de accidente cerebrovascular isquémico, no se observó ningún efecto estadísticamente significativo y, por lo tanto, los estudios cesaron (BS Jensen, CNS Drug Reviews, Vol. 8, N.º 4 pp. 353- 360 (2002)).

35 **[0036]** Más específicamente, según la presente descripción, se proporciona una composición que comprende un halo-oxindol seleccionado del grupo fluoro-oxindol o un cloro-oxindol para el uso en el tratamiento del síndrome X frágil.

[0037] Como se indicó anteriormente, los derivados de oxindol sustituidos con 3-fenilo, como los compuestos de fluoro-oxindol y cloro-oxindol, se han caracterizado anteriormente como abridores de canales maxi-K.

40 **[0038]** Los fluoro-oxindoles adecuados para su uso según la presente descripción incluyen (6)-(5-cloro-2-metoxifenil)-1,3-dihidro-3-fluoro-6-(trifluorometil)-2H-indol-2-ona; (3S)-(+)-(5-cloro-2-metoxifenil)-1, 3-dihidro-3-fluoro-6-(trifluorometil)-2H-indol-2-ona y (3S)-(-)-(5-cloro-2-metoxifenil)-1,3-dihidro-3-fluoro-6-(trifluorometil)-2H-indol-2-ona.

45 **[0039]** Un cloro-oxindol adecuado para usar según la presente descripción incluye ((6)-(5-cloro-2-metoxifenil)-1,3-dihidro-3-cloro-6-(trifluorometil)-2H-indol-2-ona); (3S)-(+)-(5-cloro-2-metoxifenil)-1,3-dihidro-3-cloro-6-(trifluorometil)-2H-indol-2-ona; y (3R)-(-)-(5-cloro-2-metoxifenil)-1,3-dihidro-3-cloro-6-(trifluorometil)-2H-indol-2-ona.

50 **[0040]** En particular, los solicitantes han realizado una serie de experimentos utilizando el compuesto de fluoro-oxindol (3S)-(+)-(5-cloro-2-metoxifenil)-1, 3-dihidro-3-fluoro-6-(trifluorometil)-2H-indol-2-ona, que también se llama BMS-204352, y este compuesto representa una realización preferida de la presente descripción.

55 **[0041]** Aunque los solicitantes han realizado experimentos utilizando derivados de oxindol sustituidos con 3-fenilo, como (3S)-(+)-(5-cloro-2-metoxifenil)-1, 3-dihidro-3-fluoro-6-(trifluorometil)-2H-indol-2-ona, dado que el efecto terapéutico se debe a la apertura del canal maxi-K, está claro que todas las diversas sustancias que se sabe que abren los canales de potasio tendrán un efecto terapéutico similar.

60 **[0042]** Según un segundo aspecto de la presente descripción, un procedimiento para tratar el síndrome X frágil en un individuo que lo necesita, que comprende: administrar al individuo una cantidad eficaz de un abridor de canales maxi-K, dicho abridor tiene actividad de abridor sobre proteínas de canales de potasio maxi-K en células neuronales que tienen una alta concentración de calcio intracelular, mientras que no tienen actividad de apertura significativa en proteínas de canales de potasio maxi-K en células neuronales que tienen una concentración de calcio intracelular normal o baja.

65 **[0043]** En particular, donde el abridor de canal maxi-K se selecciona del grupo que consiste en compuestos de

fluoro-oxindol y compuestos de cloro-oxindol.

[0044] Más particularmente donde el compuesto de fluoro-oxindol se selecciona del grupo que consiste en (6)-(5-cloro-2-metoxifenil)-1,3-dihidro-3-fluoro-6-(trifluorometil)-2H-indol-2-ona; (3S)-(+)-(5-cloro-2-metoxifenil)-1, 3-dihidro-3-fluoro-6-(trifluorometil)-2H-indol-2-ona y (3S)-(-)-(5-cloro-2-metoxifenil)-1, 3-dihidro-3-fluoro-6-(trifluorometil)-2H-indol-2-ona.

[0045] De forma alternativa, donde el compuesto de cloro-oxindol se selecciona del grupo que consiste en ((6)-(5-cloro-2-metoxifenil)-1,3-dihidro-3-cloro-6-(trifluorometil)-2H-indol-2-ona; (3S)-(+)-(5-cloro-2-metoxifenil)-1,3-dihidro-3-cloro-6-(trifluorometil)-2H-indol-2-ona; y (3R)-(-)-(5-cloro-2-metoxifenil)-1,3-dihidro-3-cloro-6-(trifluorometil)-2H-indol-2-ona.

[0046] Para una mejor comprensión de la invención y para mostrar cómo puede llevarse a cabo la misma, ahora se mostrarán solo a modo de ejemplo, realizaciones específicas, procedimientos y procesos según la presente invención con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

Figura 1: Análisis de la transcripción, expresión de proteínas y niveles electrofisiológicos de KCNMA1 (BKCa) en pacientes humanos con FXS. La expresión del gen FMR1 y del gen KCNMA1 se calcula utilizando el chip de expresión EXON1.0 Affymetrix (Panel A) y se verifica por PCR cuantitativa. Los pacientes con FXS tienen casi todo el gen FMR1, pero presentan un nivel de disminución (20 %) del ARNm de KCNMA1. La cuantificación de proteínas de cada uno de estos genes se obtuvo mediante transferencia Western (Panel B). Los pacientes con FXS, los inventores observaron la ausencia de FMRP y los inventores también vieron una disminución significativa del 46 % en la cantidad de la proteína KCNMA1 (similar a la disminución del 42 % en ratones *fmr1* KO). Los análisis de la actividad "eléctrica" del canal BKCa se investigaron mediante un estudio electrofisiológico (Patch-clamp). El paciente con FXS presenta una disminución del 50 % de la actividad de BKCa de la célula completa (Panel C).

Figura 2: Análisis de los niveles de transcripción y proteína en ratones FMR1 KO y ratones de tipo salvaje. La expresión del gen FMR1 (Panel A) y del gen KCNMA1 (Panel B) se estudió mediante PCR cuantitativa en diferentes órganos (cerebro, testículo, hígado). Los ratones FMR1 KO no exhiben, tal como se esperaba, prácticamente ninguna expresión del gen FMR1, pero no muestran anomalías en la expresión del gen KCNMA1. La cuantificación de las proteínas FMR1 y KCNMA1 de estos genes se obtuvo mediante transferencia Western (paneles C y D, respectivamente). En el cerebro de ratones FMR1 KO, no se detectó FMRP y se observó una cantidad disminuida de la proteína KCNMA (una reducción del 42 % en comparación con los ratones de tipo salvaje (Panel D)).

Figura 3: Se observó inmunolocalización de la proteína FMRP y de la proteína KCNMA1 en el cerebelo. La distribución de FMRP [columna izquierda A (x200) y B (área punteada x400)] y la distribución de KCNMA1 [columna derecha C (x200) y D (área punteada x400)] se hizo en ratones de tipo salvaje. FMRP está presente en todas las neuronas cerebrales. La proteína BKCa se encuentra en el cerebelo en las células de Purkinje (D, flechas). Los núcleos se marcaron con DAPI.

Figura 4: Análisis de la interacción social según la prueba de Crawley. Se estudió la actividad social de ratones de tipo salvaje y ratones FMR1 KO, tratados con vehículo o BMS-204352 (n = 16 por grupo). Los ratones FMR1 KO exhiben una falta de interés social significativamente (p = 0,036) inferior que los controles de tipo salvaje (Panel A). Una inyección de BMS-204352 (2 mg/kg) aumentó significativamente (p = 0,037) el interés social de los ratones FMR1 KO (Panel B). Una inyección de BMS-204352 (2 mg/kg) no alteró significativamente la actividad social de los ratones de tipo salvaje (Panel C). La observación de un mayor interés social después de la administración de BMS-204352 a ratones FMR1 KO no se debió a un aumento en la actividad locomotora (Panel D).

Figura 5: Análisis de la interacción social directa entre el ratón de prueba (macho) con una hembra. Se estudió la actividad social de ratones de tipo salvaje y ratones FMR1 KO, tratados con vehículo o BMS-204352 (n = 9 por grupo). Los ratones FMR1 KO tienen un déficit de interés social en la hembra en comparación con los animales de control, sin embargo, una inyección de BMS-204352 (2 mg/kg) aumentó significativamente la interacción social de los ratones FMR1 KO y no tuvo ningún efecto significativo sobre el control de tipo salvaje.

Figura 6: Análisis del comportamiento del ratón mediante un laberinto en Y para examinar la preferencia por la novedad no social. Se estudió la preferencia por la novedad de ratones salvajes y FMR1 KO, tratados con vehículo o BMS-204352 (n = 9 por grupo). Los ratones FMR1 KO muestran un déficit/falta de interés en el entorno nuevo significativamente inferior que los controles de ratones de tipo salvaje. Una inyección de BMS-204352 (2 mg/kg) aumentó significativamente el tiempo empleado por los ratones FMR1 KO en el nuevo entorno.

Figura 7: Espectroscopía por resonancia magnética (ERM) cerebral *in vivo*. Las ERM se realizaron *in vivo* en hipocampo de ratones adultos *fmr1* KO frente a controles. Los resultados muestran claramente una desregulación de varios metabolitos cerebrales. Tal como se muestra en la Figura 7 (Panel A), los ratones *Fmr1* KO presentan niveles significativamente inferiores de glutamato frente a los controles. Esta observación es particularmente interesante, ya que confirma la hipótesis de la participación de una disfunción sináptica glutamatérgica en el fenotipo FXS. En una segunda etapa, los inventores investigaron el efecto de BMS-204352 en estos parámetros. La inyección de BMS-204352 (dosis única en ratones adultos, como para el estudio conductual) indujo un aumento del nivel de glutamato que vuelve al nivel de control. Una vez más, esto sugiere que el fenotipo FXS es el resultado de una anomalía funcional y no estructural. Como segunda observación, se observa un aumento grande del nivel de inosítoles (Panel B) en los ratones *fmr1* KO. Dado que el inositol cerebral es el marcador de activación de

astrocitos, que se sabe que colaboran con la neurona para la síntesis de glutamato, eso podría decir que el síndrome FXS está compuesto por un compuesto de astrocitos. Como confirmación, hemos demostrado que la expresión (ARNm) y el conjunto de proteínas de GFAP (proteína ácida fibrilar glial), que se sabe que están reguladas positivamente en los astrocitos activados, aumentan en los ratones *fmr1* KO. Por lo tanto, la reactividad de los astrocitos parece contribuir al fenotipo FXS. Se estudiaron varios otros metabolitos cerebrales y se demostró que el BMS-204352 rescata los defectos sinápticos.

Figura 8: Las espinas dendríticas *in vitro* maduraron en presencia de BMS-204352. El cultivo primario de neuronas *fmr1* KO demostró una falta de maduración de las espinas dendríticas que son más largas, tortuosas y delgadas (Panel A). Esta observación es coherente con la bibliografía (Irwin y col., 2008; Bilousova y col., 2009). Sin embargo, la adición crónica de BMS-204352 (10 mM) en los medios induce la maduración de las espinas dendríticas (Panel B). Estas son más cortas y más grandes. Esta observación demostró que BMS-204352 mejora el defecto morfológico de las neuronas *fmr1* KO.

[0047] Ahora se describirá a modo de ejemplo un modo específico contemplado por los inventores. En la siguiente descripción, se exponen numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión completa de la invención. No obstante, será evidente para un experto en la técnica que la presente invención se puede llevar a cabo sin limitarse a estos detalles específicos. En otros casos, no se han descrito procedimientos y estructuras bien conocidos para no complicar la descripción innecesariamente.

20 Materiales y procedimientos

- Transferencia Western

[0048] Las proteínas de interés fueron detectadas por transferencia Western. El cerebro de los ratones o las células linfoblastoides humanas se homogeneizaron en tampón RIPA [NaCl 0,15 M, EDA 1 mM, Tris 10 mM, Nonidet P40 1 %, SDS 0,2 %] y se incubaron en hielo durante 10 minutos antes de centrifugar a 11 000 g durante 20 min a 4 °C. El contenido de proteína del sobrenadante se cuantificó mediante el ensayo de proteína BCA (Pierce). Se cargaron 60 mg de proteína en un gel de SDS-poliacrilamida al 12 %. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Después del bloqueo (solución salina tamponada con Tris que contenía Tween 20 al 0,1 % y leche en polvo sin grasa al 10 %, TTBS), la membrana se incubó durante la noche a 4 °C con anti-FMRP o anti-KCNMA1 (scbt-28739, Santa Cruz biotechnology y APC- 021, Alomone, respectivamente) diluido en TTBS1X a 1:2000. Después del lavado con TTBS1X, el anticuerpo secundario se incubó durante 1 hora a 1: 4000 (Amersham Biosciences). Las señales inmunopositivas se detectaron mediante un kit de detección de quimioluminiscencia ECL plus (Amersham Biosciences). A continuación, se eliminaron las bandas y se volvieron a analizar con un anticuerpo anti-GAPDH (Abcam). La cuantificación de las bandas inmunorreactivas se realizó mediante Image J (Software Image J). En cada transferencia, hubo 2 muestras por tiempo y se realizaron tres transferencias por anticuerpo.

- Ensayos de expresión

40 Aislamiento de ARN

[0049] Las muestras de tejido cerebral congelado se homogeneizaron en reactivo TRIZOL (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad). El ARN total se extrajo usando un protocolo estándar de cloroformo. La integridad del ARN se evaluó mediante el uso de RNA 6000 Nano LabChips en un Applied 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Foster City). La pureza del ARN se evaluó mediante la relación de absorbancia espectrofotométrica a 260 y 280 nm (A260/280 nm) mediante NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Inc, Wilmington). Todos los chips se prepararon según las instrucciones del fabricante. La degradación total de ARN se evaluó revisando los electroferogramas y la cuantificación de los picos de 18S y 28S conservados.

50 EXON1.0 Affymetrix

[0050] El ADNc se sintetizó a partir del ARN total mediante el kit GeneChip® WT (Whole Transcript) Sense Target Labelling and Control Reagents según lo descrito por el fabricante (Affymetrix). El ADNc sentido fue fragmentado a continuación por UDG (uracilo-ADN glicosilada) y APE 1 (endonucleasa apurínica/apirimídica 1) y marcado con biotina con TdT (desoxinucleotidil transferasa terminal) mediante el kit de etiquetado GeneChip® WT Terminal (Affymetrix, Santa Clara, EE. UU.). La hibridación se realizó con 5 mg de diana biotinilada, que se incubó con la matriz GeneChip® Human Exon 1.0 ST (Affymetrix) a 45 °C durante 16-20 horas. Después de la hibridación, el material no específicamente unido se eliminó mediante lavado y la detección de la diana específicamente unida se realizó mediante el kit de hibridación, lavado y tinción GeneChip®, y la estación de fluidos GeneChip® 450 (Affymetrix). Las matrices se escanearon con el GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix) y los datos sin procesar se extrajeron de las imágenes escaneadas y se analizaron con el paquete de software Affymetrix Power Tools (Affymetrix). Los datos de micromatrices se depositaron en la base de datos "Gene Expression Omnibus".

PCR cuantitativa en tiempo real

65

[0051] Para cada gen examinado, se utilizaron cebadores disponibles comercialmente y sondas TaqMan de las tecnologías de Agilent Biosystem. La PCR se llevó a cabo en un volumen de 50 µl que contenía IX PCR buffer Master Mix (Applied Biosystems) y ADNc. Para el ensayo TaqMan, las reacciones de amplificación se calentaron inicialmente a 95 °C durante 10 minutos y a continuación se sometieron a 45 ciclos de 94 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos en Mx3005p (Agilent Biotechnology Agilent). Los datos fluorescentes fueron recogidos durante la etapa de 72 °C. El software determinó el ciclo umbral de PCR (Ct), que se define como el número de ciclo fraccional en el que la fluorescencia alcanza 10 veces la desviación estándar (DE) de la línea de base. El software calculó el Ct promedio para estándares duplicados y muestras clínicas. Las ecuaciones de curva estándar se calcularon mediante análisis de regresión de Ct promedio *versus* el log10 del número de copia estándar. El software de análisis de datos calculó automáticamente los números de copias virales en las muestras clínicas.

[0052] En estos ensayos, los conjuntos de cebadores KCNMA1:Mm00516078_m1 y FMR1:Mm00484415_m1 se usaron en estudios con ratones y KCNMA1:Hs00266938_m1 y FMR1:Hs00924547_m1 se usaron en estudios con muestras humanas, ambos de las tecnologías de Agilent Biosystem.

Procedimientos de comportamiento

[0053] Se realizaron tres pruebas de comportamiento en ratones que tenían 12 semanas de edad, las pruebas fueron una prueba de interacción social directa con una hembra, luego una prueba de tres compartimentos para la sociabilidad y una prueba de alternancia espontánea en un laberinto en Y. Se estudiaron dos grupos experimentales (n = 10 para ambos), el grupo vehículo (DMSO 1/80, Tween 80 1/80, solución salina) y los grupos tratados con BMS-204352 (DMSO que contiene BMS-204352 (2 mg/kg) 1/80, Tween 80 1/80, solución salina). La administración de cada solución se realizó 30 minutos antes de las tres pruebas.

Interacción social directa con una hembra

Aparato.

[0054] La interacción social directa se evaluó en una jaula de plástico de 30x15x22 cm con 3 cm de serrín y un techo de plástico con una abertura central de 17x8 cm.

Procedimiento.

[0055] Los ratones experimentales y de estímulo se habituaron a la sala experimental como anteriormente. A continuación, se introdujo cada ratón experimental en la jaula de prueba y se dejó que se habituasen durante 5 minutos. Luego se introdujo un ratón de estímulo desconocido (hembra adulta NMRI) en la jaula de prueba a través de la abertura del techo. La sesión de prueba duró 3 minutos, pero se detuvo inmediatamente si ocurrían episodios agresivos. La jaula de prueba se limpió con agua y el serrín se renovó entre sesiones. Se grabaron sesiones de prueba y se analizaron vídeos con Observer XT (versión 7, Noldus, Países Bajos), teniendo en cuenta solo el animal experimental. Un observador que desconocía el genotipo de los animales calificó la frecuencia y la duración de cada una de las siguientes categorías y elementos de comportamiento:

Variables medidas

[0056] Comportamientos afiliativos: olfatear la cabeza y el hocico del compañero, su región anogenital o cualquier otra parte del cuerpo; acicalamiento mutuo (acicalar a compañero); atravesar el cuerpo del compañero deslizándose arriba/abajo de un lado al otro.

[0057] Actividades no sociales: crianza (de pie en las extremidades posteriores a veces con las extremidades anteriores contra las paredes de la jaula) y excavación. El tiempo dedicado al cuidado personal (el animal se lame y boquea su propio pelaje) se analizó por separado, ya que esto a veces se considera que representa un comportamiento repetitivo.

Sociabilidad y preferencia por la novedad social en la prueba de tres compartimentos.

Aparato.

[0058] El aparato de prueba empleado aquí es similar al descrito previamente por otros (Moy y col., 2004). Consistía en 3 compartimentos: una cámara central (45x18x25 cm) conectada a cada lado con otro compartimento (45x20x25 cm) a través de una pequeña abertura rectangular (15x5 cm). Los suelos y paredes (1 cm de grosor) de todos los compartimentos estaban hechos de plexiglás transparente. Cada compartimento lateral contenía una jaula de estímulo redonda (10 cm de diámetro, 7 cm de alto) hecha de malla de alambre (tamaño del orificio: 0,7x0,7 cm) cubierta por un techo de plástico (5 cm de alto). Se colocó un peso de metal en el techo para mantener estable la caja de estímulo. Cada jaula de estímulo se colocó a una distancia de 6 cm de la pared posterior y 4 cm de los lados. Las

imágenes de seguimiento de una cámara sobre el centro del aparato se analizaron con Ethovision (Versión 3.1, Noldus Technology, Wageningen, Países Bajos) *Procedimiento*. Los ratones experimentales y de estímulo (ratones machos NMRI de 4 semanas de edad) se alojaron individualmente en jaulas de policarbonato estándar provistas de serrín, comida y botellas de agua y se dejaron tranquilos en la sala experimental durante aproximadamente 10 minutos antes de comenzar las pruebas. Luego, cada sujeto experimental se introdujo en el medio del compartimento central y se le permitió explorar el aparato durante 3 ensayos de 5 minutos cada uno:

Ensayo 1 (habitación): las jaulas de estímulo estaban vacías; se evaluaron los niveles basales de exploración.

Ensayo 2 (sociabilidad): se introdujo un ratón de estímulo en una de las jaulas de estímulo, mientras que se introdujo un nuevo objeto (un cilindro gris de plástico, 6 cm de diámetro, 2 cm de alto) en la jaula opuesta (los lados estaban compensados dentro de los grupos experimentales); Se midió la exploración preferencial de los estímulos novedosos sociales frente a los no sociales.

Ensayo 3 (preferencia de novedad social): como el ensayo 2, pero el objeto se cambió por un nuevo ratón de estímulo; Se evaluó la exploración preferencial de la novedad frente al estímulo social familiar.

[0059] Al final de cada ensayo, el animal experimental fue confinado en el compartimento central mediante dos puertas magnéticas de plexiglás durante 30 segundos. Al final de la tercera prueba, el aparato y el objeto y las jaulas de estímulo se limpiaron con agua y se secaron. Variables medidas. La exploración de cada estímulo se evaluó midiendo el tiempo pasado en cada área de contacto, un área de 20622 cm que contiene la jaula de estímulo (ver Fig. 1). También se calculó un puntaje porcentual para los dos últimos ensayos de la siguiente manera:

Para el ensayo 2: Puntuación de sociabilidad = $1006 \text{ Testímulo social} / (\text{Testímulo social} + \text{Testímulo no-social})$,
Para el ensayo 3: Puntuación de preferencia de novedad social = $1006 \text{ Testímulo social novedoso} / (\text{Testímulo social novedoso} + \text{Testímulo social familiar})$.

[0060] Finalmente, se midió en cada ensayo la distancia total recorrida en todo el aparato en metros.

Alternancia espontánea

Aparato.

[0061] La alternancia espontánea se evaluó en un laberinto en Y de plástico gris, colocado en una mesa de 80 cm de altura y ubicado en el centro de una habitación que contiene una variedad de señales de laberinto adicionales. Los tres brazos del laberinto en Y tenían una apariencia similar y estaban separados 120 cm entre sí. Cada brazo tenía 42 cm de largo y 8 cm de ancho. Todo el laberinto estaba encerrado por una pared de 15 cm de alto y 0,5 cm de espesor. Las imágenes de seguimiento de una cámara sobre el laberinto se analizaron con Ethovision.

Procedimiento.

[0062] Los ratones fueron habituados a la sala de experimentación como antes y a continuación introducidos al final de uno de los brazos y se les permitió explorar el laberinto durante 5 min. La asignación del brazo de inicio se compensó dentro de los grupos experimentales. Variables medidas. Un observador que no conocía el genotipo de los animales anotó una entrada en uno de los brazos cuando las cuatro patas del animal se colocaron dentro de un brazo. Por lo tanto, si un animal hacía la siguiente secuencia de elecciones de brazo: A, B, C, B, A, B, C, A, el número total de posibilidades de alternancia sería de seis (total de entradas menos dos) y el porcentaje de alternancia sería del 67 % (cuatro de seis).

Espectroscopia por resonancia magnética

[0063] Los ratones fueron colocados en un dispositivo hecho a medida para inmovilizar su cabeza. Fueron anestesiados durante el experimento de RM con 1,5 % de isoflurano y una mezcla de O₂/N₂O (1:1) con una salida de 0,7 l/min. El movimiento respiratorio fue controlado durante todo el experimento usando una almohada de aire. La temperatura corporal de los ratones se mantuvo constante con una circulación de agua tibia. La espectroscopia por resonancia magnética se realizó en un imán refrigerado horizontal ultrapantallado de 7T destinado a la obtención de imágenes de pequeños animales (94/20 USR Bruker Biospec, Wissembourg, Francia) y equipado con un conjunto de gradientes de 950mT/m. Se utilizó una bobina de jaula de pájaro de 35 mm de diámetro interior de Bruker para la transmisión y recepción de ¹H. En primer lugar, se realizaron imágenes de exploración para localizar el vóxel de interés (VOI) utilizando una secuencia RARE con los siguientes parámetros: TR/TE = 5 s/56 ms, factor rare = 8, tamaño del VOI = 2*2 cm, tamaño de la matriz = 256*256, espesor del corte = 1 mm para mostrar (78*78) mm en resolución plana durante 5 min de duración. La homogeneidad estática B₀ se ajustó con calzos de primer y segundo orden en un vóxel de (3.5*3.5*3.5) mm centrado en el hipocampo con el procedimiento de mapa rápido de Bruker (Gruetter 1993, MRM). El ancho de línea alcanzado para el agua de los tejidos fue inferior a 10 Hz. Se utilizó una secuencia PRESS (Point Resolved Spectroscopy) para registrar espectros de ¹H localizados en un vóxel cúbico (3*3*3) mm colocado en un vóxel de mapa rápido con los siguientes parámetros (TR = 4 s, TE = 16 ms, 256 scan: 17 min, 2048 puntos, ancho de banda = 4000 Hz) con supresión de agua usando el módulo VAPOR (VARIABLE Pulse power and Optimized Relaxation

delays) y supresión del volumen exterior. (Tkac 1., MRM 1999). Durante la adquisición de los espectros se aplicó la compensación de las corrientes de Foucault y la corrección de la deriva del campo magnético estático. Se recogieron espectros de ^1H para WT y KO con o sin BMS-204352. A continuación fueron analizados con el software JMRUI 3.0 (<http://www.mrui.uab.es/mrui/>) trabajando en el dominio del tiempo (corrección de la línea de base, fase, llenado
5 cero..). El módulo AMARES (JMR1997, 129, 35-43, Vanhammel y col.) se usó para cuantificar 9 metabolitos del cerebro: N-acetil-aspartato (NAA), glutamato (Glu), glutamina (Gln), γ -ácido aminobutírico (GABA), creatina (Cr), colina (Cho), mio-inositol (Ins), taurina (Tau) y lactato (Lac). Las concentraciones de metabolitos obtenidas en el control o KO fueron comparadas por parejas mediante la prueba t o las pruebas de Mann-Whitney cuando las distribuciones no
10 eran gaussianas.

Electrofisiología

[0064] Se adquirieron registros de células enteras de corrientes K^+ en líneas celulares linfoides obtenidas de 3 pacientes con síndrome X frágil (FXS) y 4 individuos de control de la misma edad. Las células fueron lavadas y
15 giradas tres veces y suspendidas en una solución salina fisiológica (PSS) compuesta de lo siguiente (en mM): NaCl 137; KCl 4; CaCl_2 1,8; MgCl_2 1; glucosa 10; tampón Hepes 10; El pH se equilibró a 7,4 con NaOH. Una alícuota de estas células se colocó en una placa de Petri que contenía 1,5 ml de PSS. Las placas de Petri con las células se colocaron en la platina de un microscopio Elipse TE-300 Nikon. Las células fueron impregnadas con una solución experimental a través de un sistema de tubos paralelos que se bajaron hacia las cercanías de las células. Las células
20 se perfundieron intracelularmente con una solución de pipeta de Ca^{2+} libre de 400 nM (para activar la corriente de BKCa) que contenía (en mM): K-glutamato 125; KCl 20; CaCl_2 0,7; Mg-ATP 1; EGTA 1 tampón Hepes 10; El pH se equilibró a 7,2 con KOH. La resistencia de la punta de la pipeta osciló entre 4 y 6 M Ω . Las corrientes macroscópicas de K^+ se generaron por etapas de despolarización progresiva de 8 mV (500 mseg de duración, intervalos de 5 segundos) a partir de un potencial de retención constante de -70 mV. La corriente de BKCa se definió como la
25 corriente de salida inhibida por la iberitoxina 100 nM (IbTx) o paxilina 10 mM (Pax), dos bloqueadores selectivos de los canales de BKCa. Las corrientes sensibles a IbTx y Pax se expresaron como densidad de corriente (pA/pF), tras estimar la capacitancia de cada célula. El protocolo de pinza de tensión y la adquisición de datos se controlaron con el software pClamp V 9.0 (Axon Instruments, Union City, CA, EE.UU.). Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. Todos los datos se expresan como media $\pm$ 6 SEM. Se realizaron comparaciones estadísticas
30 entre los grupos con medidas repetidas en dos sentidos ANOVA con una posterior prueba de análisis post hoc de Bonferroni con el Prisma V 5.0 (GraphPad). La significancia se estableció en $p < 0,05$.

Cultivo primario de neuronas

[0065] Se prepararon cultivos primarios de fmr1 KO y neuronas de ratones de tipo salvaje a partir de embriones de ratón E15 tal como se describió anteriormente (Ethell y col. 2001), con modificaciones. Brevemente, después de la
35 disociación mecánica, las células cerebrales de los ratones E15 se plaquearon sobre cubreobjetos pre-revestidos con poli-DL-lisina (0,5 mg/mL en tampón de borato). Las células se mantuvieron en medio Neurobasal complementado con B27 (Invitrogen), 25 de glutamato 1 M, y penicilina-estreptomicinaal 1 %, en una incubadora humidificada con un
40 5 % de $\text{CO}_2/10$ % de O_2 a 37 °C durante 14 a 17 días. Algunos cultivos de hipocampo fueron etiquetados con Dil en D14 para la observación de las espinas dendríticas. Todos los datos se expresan como media $\pm$ 6 SEM. Las comparaciones estadísticas entre grupos se realizaron con la prueba t de Student. La significancia se estableció en $p < 0,05$.

Resultados

1. Proteínas, ARNm y niveles electrofisiológicos de BKCa en sujetos humanos FXS y no FXS.

[0066] El papel central de FMRP como regulador de la traducción neuronal significa que cualquier cambio en
50 su función contribuye a la interrupción de la traducción de otras proteínas y, por lo tanto, a través de esta cascada de alteración, se altera el perfil de proteínas de la célula.

[0067] Este efecto se ha demostrado claramente (Liao L y col., 105: 15281-15286 PNAS (2008)), en un cultivo primario de neuronas del ratón FMR1 KO (un modelo de ratón de FXS). Entre las variaciones observadas, una
55 disminución del 50 % en el nivel de la proteína KCNMA1 parece ser la más significativa. Sin embargo, esta observación no se ha verificado en humanos y, por lo tanto, el primer paso de los inventores fue determinar la existencia de una anomalía en pacientes humanos que padecen FXS.

[0068] En un primer conjunto de experimentos, se realizó un análisis transcriptómico utilizando microarrays de
60 ADN EXON1.0 Afymetrix (GENOTRANS), para los genes FMR1 y Kcnma1, los resultados se confirmaron por RT-PCR (7900 HT, Biotecnología Aplicada).

[0069] Brevemente, se extrajo ARN de pacientes (FXS) y controles sanos de líneas celulares linfoblastoides.

[0070] Tal como se muestra en la (Figura 1A), la expresión de FMR1 cae más del 95 % en pacientes con FXS,

lo que confirma el fenotipo del síndrome X frágil. Además, se observó una disminución del 20 % en el nivel de ARNm del gen KCNMA1 entre pacientes y controles sanos.

[0071] El análisis proteómico también se realizó mediante transferencia Western para FMRP y KCNMA1, usando los extractos de proteínas de las mismas líneas celulares linfoblastoides. Este análisis mostró una reducción de más del 45 % de la proteína KCNMA1 en pacientes con FXS (Figura 1B), esta reducción fue comparable a la observada en ratones FMR1 KO por Liao L y col., 105: 15281-15286 PNAS (2008). Sin embargo, el perfil de expresión es diferente entre ratones fmr1 KO y FXS humano. Los análisis electrofisiológicos se realizaron en células linfoblastoides humanas FXS y no FXS y demostraron una disminución del 50 % de la actividad de BKCa de células enteras. Por lo tanto, los defectos proteicos conducen a la disfunción eléctrica de BKCa.

[0072] En conclusión, por lo tanto, los inventores demostraron una anomalía en el gen KCNMA1 (BKCa) en pacientes con FXS. Es sorprendente que se encuentre una anomalía de KCNMA1 en el síndrome X frágil y también en un paciente con autismo (Laumonnier y col., 2006; Patente WO2005/008249). De hecho, estas patologías son estrictamente diferentes, tal como se muestra en la clasificación DSM IV y la escala ICD 10 (Autismo: ICD 10 F84.0; FRAXA: ICD10 Q99.2). Esto es de gran interés, ya que el síndrome X frágil es la forma principal de deficiencia mental sindrómica con un origen genético caracterizado.

[0073] Según la bibliografía, parece que la modificación de la cantidad de la proteína KCNMA1 (BKCa) en el síndrome FXS no es relevante. De hecho, Hu y sus colaboradores sugieren que la modulación de la actividad de BKCa no tiene ningún efecto sobre la función sináptica y no podría explicar los defectos sinápticos (Hu y col., 2001). Además, esta falta de relevancia se confirma por la ausencia de la descripción de la vía BKCa como un objetivo terapéutico en el FXS en dos revisiones recientes de Berry-Kravis y Lee (Berry-kravis y col., 2011; Lee y col., 2012). De hecho, en el artículo de Berry-kravis y col., las rutas de mGluR1/5, MMP9, GSK3 β , GABA y AMPA, y no la de BKCa, se describieron como la única forma terapéutica putativa de los tratamientos del FXS. Del mismo modo, Lee y col. investigan el papel de varios canales potásicos (slack, Kv3.1, etc.) en la fisiopatología del FXS, sin ningún argumento sobre BKCa.

[0074] Los resultados demostraron claramente que BKCa es un objetivo terapéutico totalmente innovador para el FXS. De hecho, se ha demostrado por primera vez que la modulación específica de la actividad del canal BKCa a través de BMS-204352 puede modificar la función cerebral y rescatar a la actividad cerebral "normal" (como lo demuestran los resultados de la espectroscopía por resonancia magnética presentados a continuación). Estos resultados son totalmente relevantes y caracterizan la innovación de este trabajo.

[0075] Por lo tanto, los inventores han analizado si las moléculas que pueden abrir los canales de BKCa, tales como BMS-204352, pueden usarse como agente terapéutico para tratar el FXS humano.

2. Estudio de los efectos de los fluoro-oxindoles en ratones FMR1 KO

2.1 Estudios de fenotipo

[0076] Las similitudes entre el comportamiento observado en ratones FMR1 KO y pacientes con FXS hacen de esta cepa de ratón un buen modelo para estudiar las características de comportamiento del síndrome FXS (The Dutch-Belgian Fragile X Consortium 1994 y Crusio Bernardet 2006).

[0077] Los ratones FMR1 KO están disponibles en el Centre de Neurosciences Integratives et Cognitives - CNRS UMR5228 (S Pietropaolo y W Crusio).

[0078] Esta cepa se obtuvo mediante el protocolo estándar del "The Dutch-Belgian Fragile X Consortium (1994)" (El consorcio belga-holandés dedicado a la investigación y el estudio del síndrome X frágil) al insertar un casete de neomicina en el exón 5 del gen FMR1 mediante recombinación homóloga, inactivando el gen.

[0079] Desde un punto de vista fenotípico, los ratones FMR1 KO exhiben características de sujetos FXS. Por lo tanto, los ratones machos tienen un macroorquidismo similar a los sujetos humanos con FXS y también muestran comportamientos similares, como mayores niveles de ansiedad, comportamientos estereotípicos/repetidos y una interacción social deteriorada.

[0080] Los inventores también han validado este modelo de ratón desde un punto de vista molecular mediante el análisis de la expresión de los genes/productos génicos de FMR1 y KCNMA1.

[0081] Tal como se muestra en la Figura 2, los inventores observaron que los ratones de tipo salvaje muestran niveles muy elevados de expresión del gen FMR1 en comparación con los ratones FMR1 KO, cualquiera que sea el tejido estudiado (cerebro, testículo, hígado). La expresión residual del gen FMR1 en ratones FMR1 KO probablemente corresponde a una forma de "empalme" del ARNm FMR1 no traducido (Huang y col., 1996) y no muestra diferencias en la expresión entre ratones de tipo salvaje y ratones FMR1 KO, que es diferente en la enfermedad humana donde el ARNm de KCNMA1 se desregula en pacientes con FXS.

[0082] En comparación y de manera similar a la observada en humanos, el gen KCNMA1 se expresa altamente en el cerebro y los testículos y menos en otros tejidos (Figura 2B) y no muestra diferencias en la expresión entre ratones de tipo salvaje y ratones FMR1 KO. Sin embargo, la cantidad de proteína KCNMA1 disminuye tanto (≈45 %) en el FXS humano como en los ratones fmr1 KO, validando la teoría de que la reducción de FMRP conduce a una disminución de la traducción del ARNm de KCNMA1 en ambos casos. Esta disfunción proteica conduce a una disminución del 50 % de la actividad eléctrica de BKCa de la célula completa (Figura 1). Sin embargo, la cantidad de proteína KCNMA1 producida se reduce en un 42% (Figura 2C y D) en el cerebro de ratones FMR1 KO, validando la teoría de que la reducción de FMRP conduce a una disminución de la traducción del ARNm de KCNMA1.

[0083] En una serie paralela de experimentos para comprender mejor el funcionamiento del canal BKCa en relación con FMRP, los inventores estudiaron por inmunohistología la distribución en el cerebro del ratón de FMRP y KCNMA1 en ratones salvajes.

[0084] De la Figura 3, el canal BKCa se expresa en el cerebelo, en las células de Purkinje (paneles derechos C y D, flechas), pero también en la corteza, el tronco encefálico y el hipocampo. Además, FMRP está en el cerebro, pero se encuentra exclusivamente dentro de las neuronas (Figura 3, columna izquierda).

2.2 Estudios de comportamiento

[0085] Para estudiar el efecto terapéutico de la molécula BMS-204352, los inventores se centraron en los parámetros de comportamiento que tienen el mayor efecto sobre el deterioro en pacientes con FXS y FMR1 KO de ratón, es decir, interacciones sociales.

[0086] Esto se logró mediante tres pruebas de comportamiento descritas previamente por Pietropaolo y col. (2011), en colaboración con los autores:

1. Prueba de preferencia social (la prueba de Crawley)
2. Prueba de interacción social directa (interacción con una hembra), y
3. Preferencia por la novedad utilizando un laberinto en Y

[0087] Cada uno de estos experimentos se realizó con ratones machos adultos (3,5 meses) con o sin inyección intraperitoneal de BMS-204352 a 2 mg/kg.

2.2.1 Prueba de Crawley

[0088] En esta prueba, el ratón se introduce en un entorno en el que están presentes otros dos ratones, estos otros dos ratones se denominan "estímulos".

[0089] El ratón sujeto ya conoce uno de los ratones de estímulo y el segundo es completamente desconocido.

[0090] El parámetro medido es el tiempo pasado con cada uno de los dos ratones de estímulo. Se espera que un ratón de tipo salvaje pase más tiempo con el ratón desconocido.

[0091] Los datos presentados en la Figura 4 muestran:

- a. Hay una diferencia de "interacción social" ($p = 0,036$) entre ratones de tipo salvaje y ratones no tratados kb FMR1 (Figura 4A),
- b. Que la inyección de una dosis única de BMS-204352 (2 mg/kg) en ratones adultos FMR1 KO (3,5 meses) mejoró significativamente ($p = 0,037$) su interés en el ratón nuevo (Figura 4B),
- c. El análisis estadístico no muestra diferencias significativas entre los ratones de tipo salvaje tratados y no tratados ($p = 0,22$) (Figura 4C).
- d. La mejora observada en ratones FMR1 KO no es consecuencia de un aumento en la actividad locomotora general (Figura 4D).

2.2.2 Prueba de interacción con una hembra

[0092] En esta prueba, se introduce un ratón hembra de otra cepa, pero de la misma edad en el entorno del ratón examinado.

[0093] El comportamiento afiliativo de los ratones examinado (olfateo, acicalamiento ...) se registra en el transcurso de un periodo de 5 minutos.

[0094] Los datos presentados en la Figura 5 muestran:

1. Que existe una diferencia de "interacción social directa" ($p = 0,04$) entre los ratones de tipo salvaje no tratados y los ratones FMR1 KO no tratados, y
2. Que la inyección de una dosis única de BMS 204 352 (2 mg/kg) en ratones adultos FMR1 KO mejora significativamente la interacción social ($p = 0,04$).

2.2.3 Prueba de laberinto en Y

[0095] Esta prueba implicó colocar al animal sujeto en un laberinto que tiene la forma de una Y, pero inicialmente tiene un brazo cerrado.

[0096] Después de 5 minutos de habituación en el laberinto inicial, se abre el tercer brazo y se registra el tiempo que el animal pasa en el brazo nuevo.

[0097] Los datos presentados en la Figura 6 muestran:

1. Hay una diferencia de "preferencia por la novedad" ($p=0,04$) entre ratones salvajes y ratones FMR1 KO sin tratar, y
2. Que la inyección de una sola dosis de BMS-204 352 (2 mg/kg) en ratones adultos FMR1 KO aumenta significativamente su preferencia por la novedad ($p = 0,04$).

[0098] Por lo tanto, la inyección de una sola dosis de BMS-204352 a los ratones adultos FMR1 KO mejora significativamente su desempeño en las tres pruebas de comportamiento diferentes. Este resultado confirma la hipótesis de los inventores de que los problemas cognitivos y de comportamiento están relacionados, al menos en parte, con una anomalía de BKCa y que, por lo tanto, una terapia que alivie los efectos de la disfunción de BKCa también puede aliviar los problemas cognitivos y de comportamiento.

[0099] La espectroscopia por resonancia magnética cerebral *in vitro* (MRS) (Figura 7) se realizó en el hipocampo de ratones adultos *fmr1* KO en comparación con los controles. Los resultados muestran claramente una desregulación de varios metabolitos cerebrales y confirman la hipótesis de la implicación de una disfunción sináptica glutamatérgica en el fenotipo de FXS. De hecho, la concentración de glutamato se reduce significativamente en los ratones *fmr1* KO. La inyección de BMS-204352 (dosis única en ratones adultos, como para el estudio conductual) indujo un aumento del nivel de glutamato que vuelve al nivel de control. Por lo tanto, se ha demostrado que una parte del fenotipo de FXS es el resultado de una anomalía funcional y no estructural, y especialmente de la sinapsis glutamatérgica. Al contrario de Hu y col. (2001), se ha demostrado aquí que la focalización específica del canal BKCa conduce a la modulación de la función sináptica glutamatérgica. BMS-204352 mejora la función sináptica, a través de su acción específica sobre BKCa.

[0100] Se investigaron las maduraciones *in vitro* de espinas dendríticas en presencia de BMS-204352. El cultivo primario de las neuronas *fmr1* KO demostró una no maduración de las espinas dendríticas que se rescata mediante la adición crónica de BMS-204352 (10 mM) en los medios que inducen la maduración de las espinas dendríticas. Esta observación demostró que BMS-204352 mejora el defecto morfológico de las neuronas *fmr1* KO.

[0101] Además, la observación de la mejora después del tratamiento de dosis única de ratones adultos sugiere que la función cerebral conductual es total o parcialmente una consecuencia de una función anormal y no de un cambio estructural en el canal BKCa.

[0102] En base a estos resultados, los inventores podrían decir que, al contrario de Hu y col., la modulación de la actividad de BKCa tiene consecuencias directas sobre la función sináptica glutamatérgica y el uso de la molécula de abridor de canales específica de BKCa constituye una buena forma terapéutica y un tratamiento de la Síndrome X frágil. Además, se probaron dos moléculas de abridor de canales diferentes (BMS-20452 y 1-EBIO), y ambas demostraron un fenotipo rescatado.

[0103] Por lo tanto, la presente invención proporciona la base de una forma potencial de tratar el FXS.

Referencias

[0104]

1. Liao L, y col. PNAS 105:15281-15286 (2008).
2. Laumonnier F, y col. Am J Psychiatry, 163: 1622-1629 (2006).
3. Jensen BS, CNS drug reviews, 8:353-360 (2002).
4. Gribkoff VK, y col. Nature medicine 2001, 7:471-477
5. Zoute L, y col. Organic & biomolecular chemistry, 1:1833-1834 (2003).
6. Hamashima Y, y col., Journal of the American Chemical Society, 127:10164-10165 (2005).

7. Sausbier M, y col. PNAS 101:9474-9478 (2004).
8. Bernardet M, y col. TheScientificWorldJournal, 6:1164-1176 (2006).
9. Consorhium TD-BFX: Cell, 78:23-33 (1994).
10. Huber K.M. Y col. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 7746-7750 (2002).
- 5 11. Dolen G. y col. Neuron 56, 955-962 (2007).
12. V. K. Gribkoff y col., Adv. Pharmacol., 37:319-348 (1997).
13. Ropers, H.H., Hamel, B.C., 2005. Nat Rev Genet. 6, 46-57.
14. de la Cruz, F.F., 1985. Am J Ment Defic. 90, 119-23.
15. Di Bonaventura y col., 2006 Epileptic Disord. 8, 195-9.
- 10 16. Hagerman, R.J., 2006. J Dev Behav Pediatr. 27, 63-74.
17. Ropers y col., Nature Reviews Genetics, 6:46-57 (2005).
18. Rueda y col., BMC Neurology, Vol. 9. N.º 1: 53 (2009).
19. Chang y col., Nature Chemical Biology, Vol. 4 No. 4: 256-263 (2008).
20. Erickson y col., Neurotherapeutics, Vol. 7: 258-263 (2010).
- 15 21. Zeier y col., Gene Therapy, Vol. 16: 1122-1129 (2009).
22. Brown y col., Nat. Neurosci. Vol.13(7): 819-821 (2010).
23. Gross y col., Journal of Neuroscience, Vol. 31(15): 5693-5698 (2011).
24. Hu, H., y col., 2001 J Neurosci. 21, 9585-97.
24. Berry-Kravis, E.y col., 2011. J Neurodev Disord. 3, 193-210.
- 20 25. Lee, H.Y y col., 2012. Curr Opin Neurobiol.
26. Pietropaolo y col., PLoS One. 2011;6(2):e17073.
27. Huang, T y col., 1996. Am J Med Genet. 64, 252-5.

REIVINDICACIONES

1. Un abridor de un canal de potasio maxi-K para su uso en el tratamiento del síndrome X frágil, donde dicho abridor de canal de potasio maxi-K se selecciona de entre los compuestos de fluoro-oxindol y cloro-oxindol, seleccionándose dichos fluoro-oxindoles del grupo que comprende: (6)-(5-cloro-2-metoxifenil)-1,3- dihidro-3-fluoro-6-(trifluorometil)-2H-indol-2-ona; (3S)-(+)-(5-cloro-2-metoxifenil)-1,3-dihidro-3-fluoro-6-(trifluorometil) -2H-indol-2-ona; y (3R)-(-)-(5-cloro-2-metoxifenil)-1,3-dihidro-3-fluoro-6-(trifluorometil)-2H-indol-2-ona, y seleccionándose dichos cloro-oxindoles se seleccionan del grupo que comprende: ((6)-(5-cloro-2-metoxifenil)-1,3-dihidro-3-cloro-6-(trifluorometil)-2H-indol-2-ona) ; (3S)-(+)-(5-cloro-2-metoxifenil)-1,3-dihidro-3-cloro-6-(trifluorometil) -2H-indol-2-ona; y (3R)-(-)-(5-cloro-2-metoxifenil)-1,3-dihidro-3-cloro-6-(trifluorometil)-2H-in-dol-2-ona.

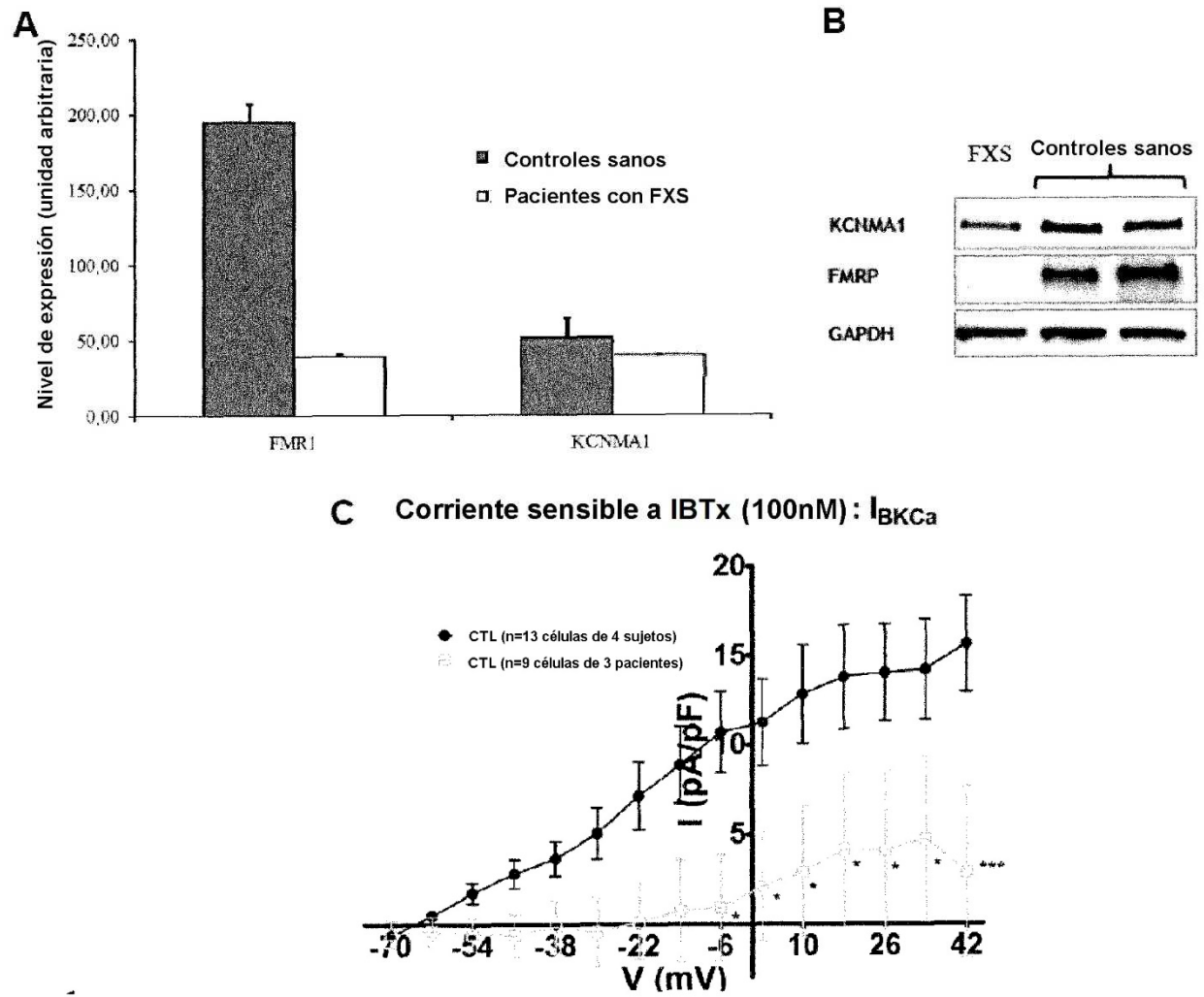


FIGURA 1

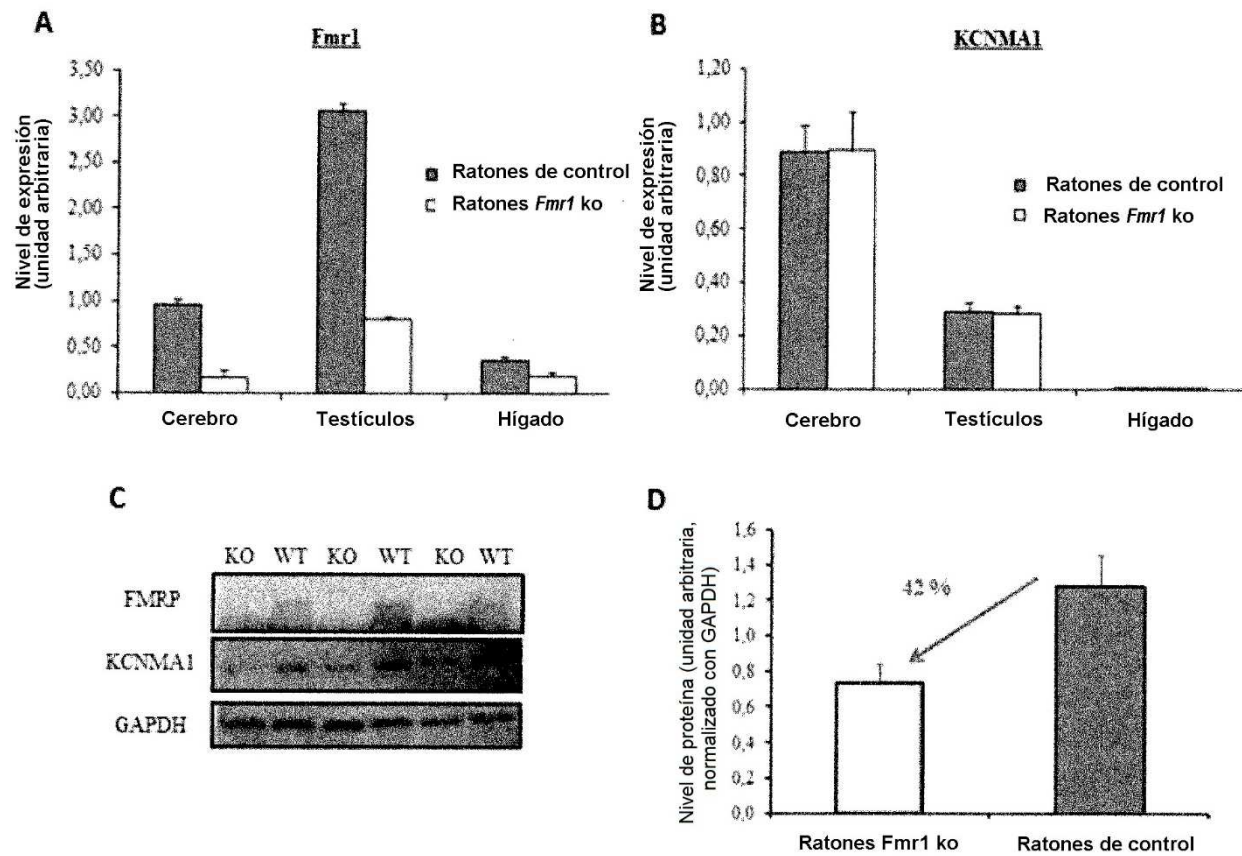


FIGURA 2

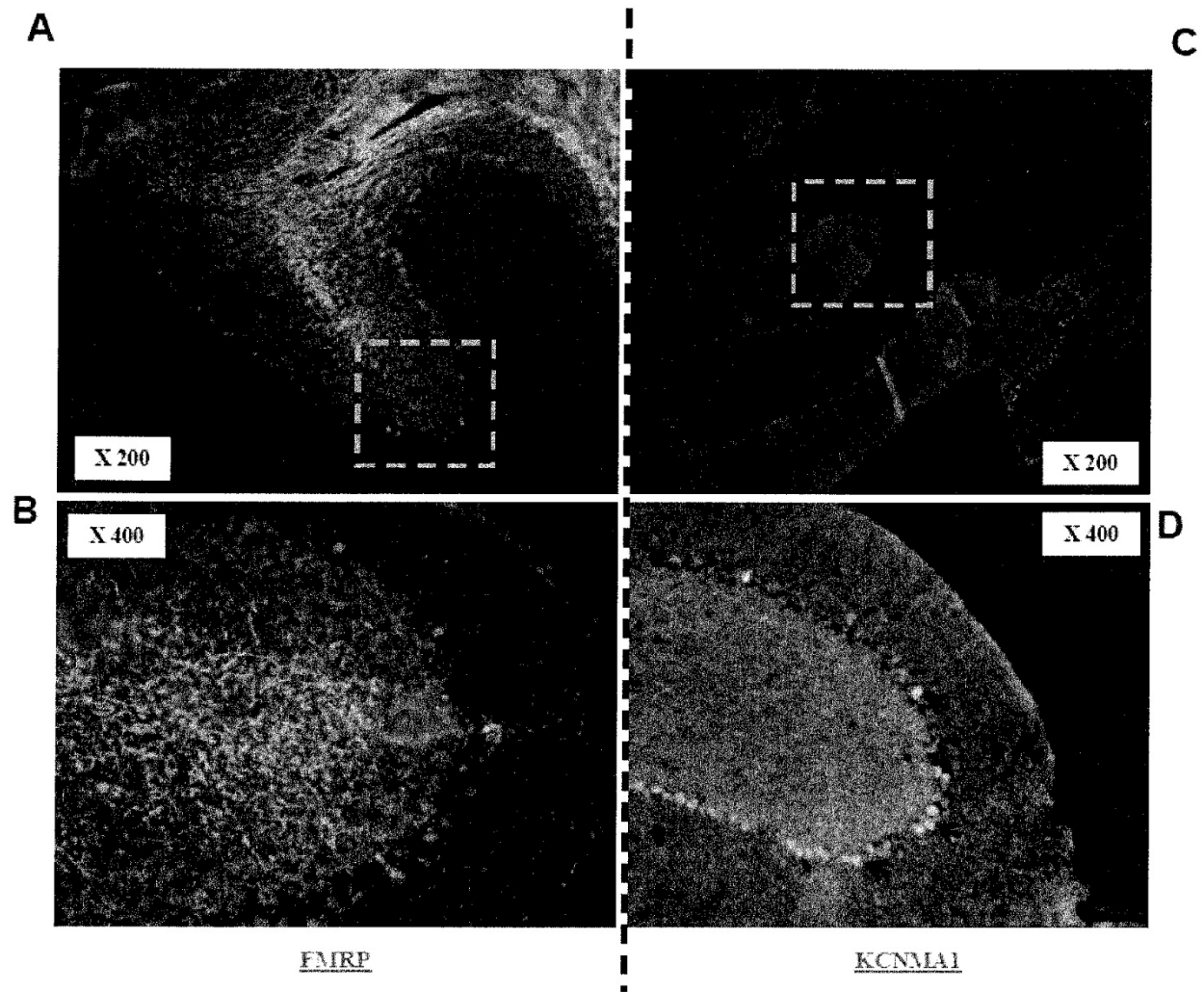


FIGURA 3

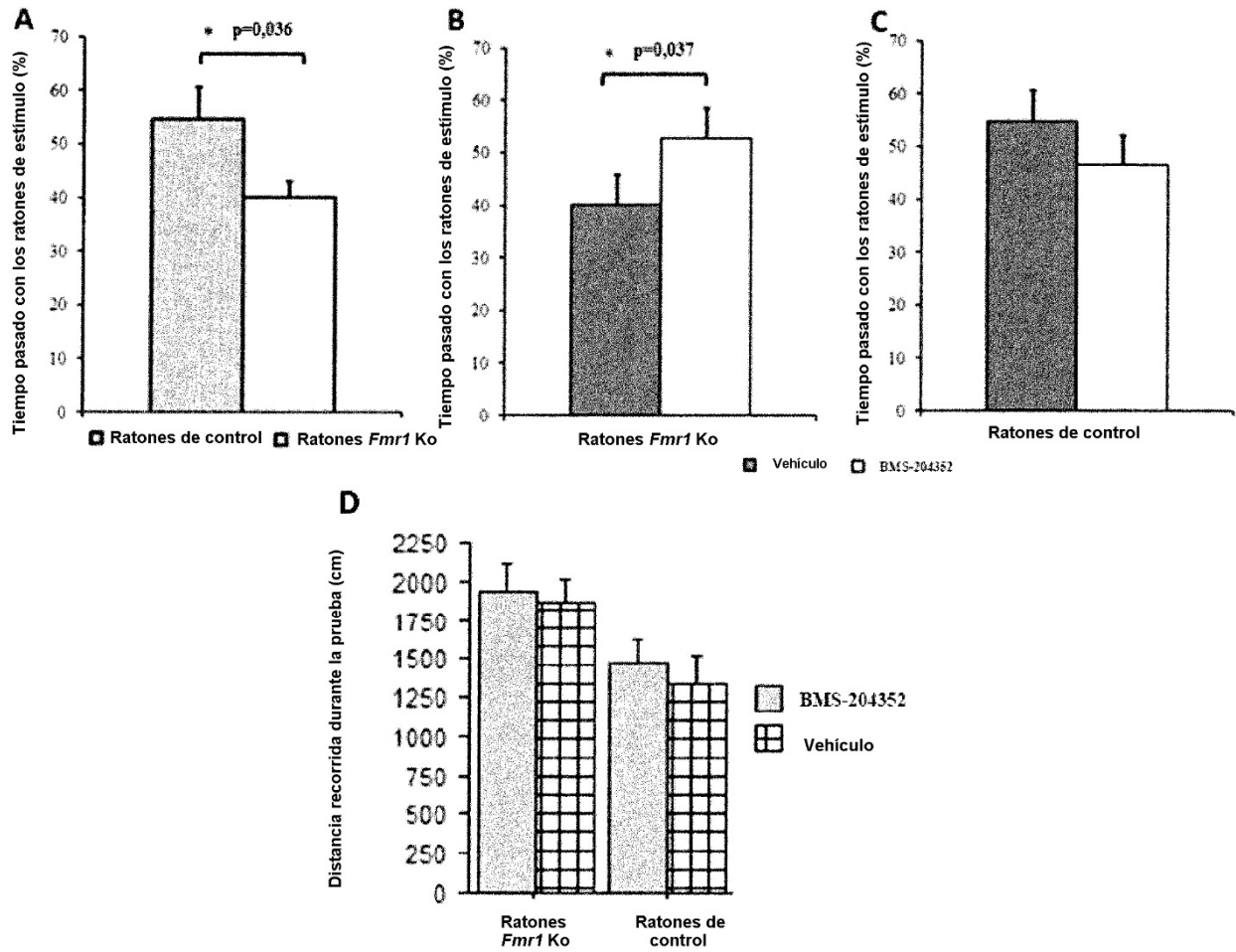


FIGURA 4

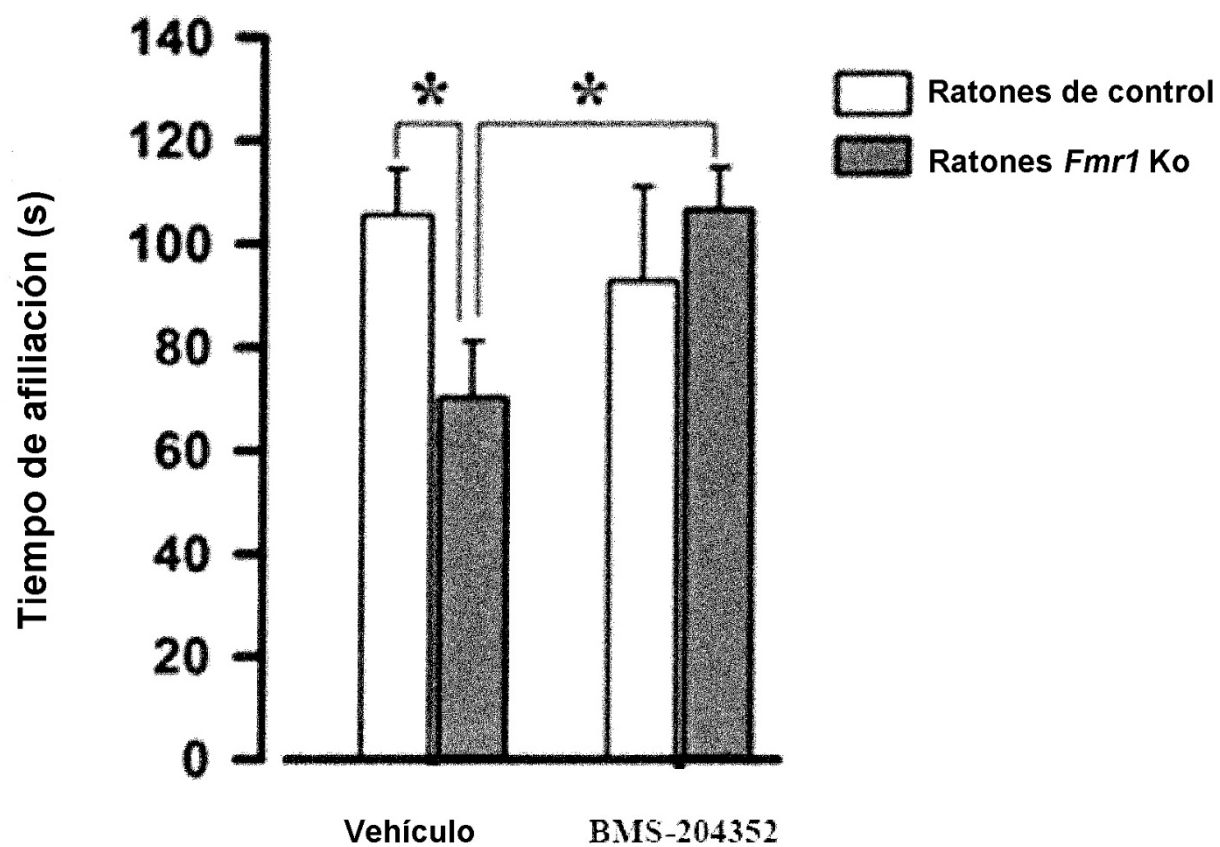


FIGURA 5

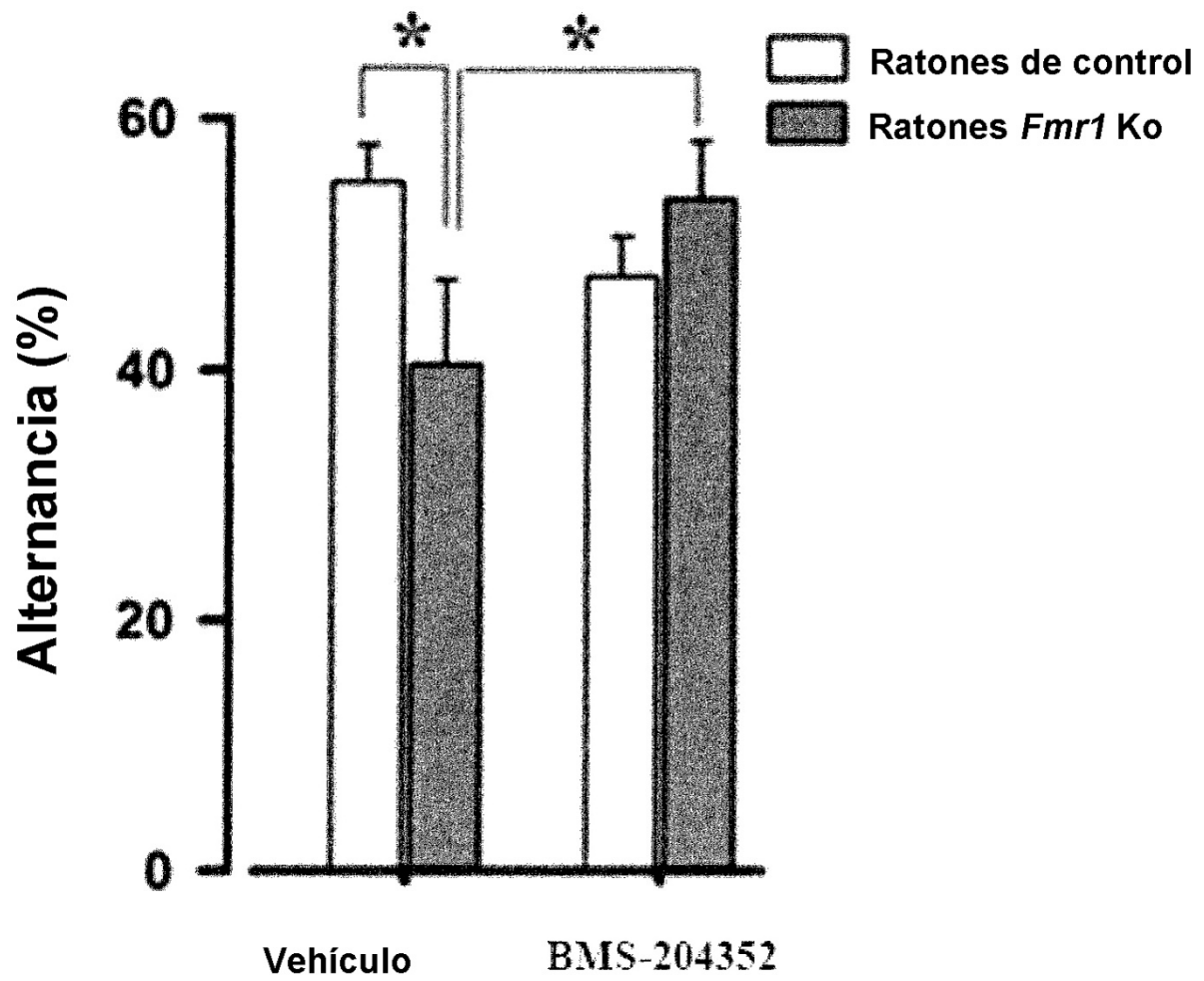


FIGURA 6

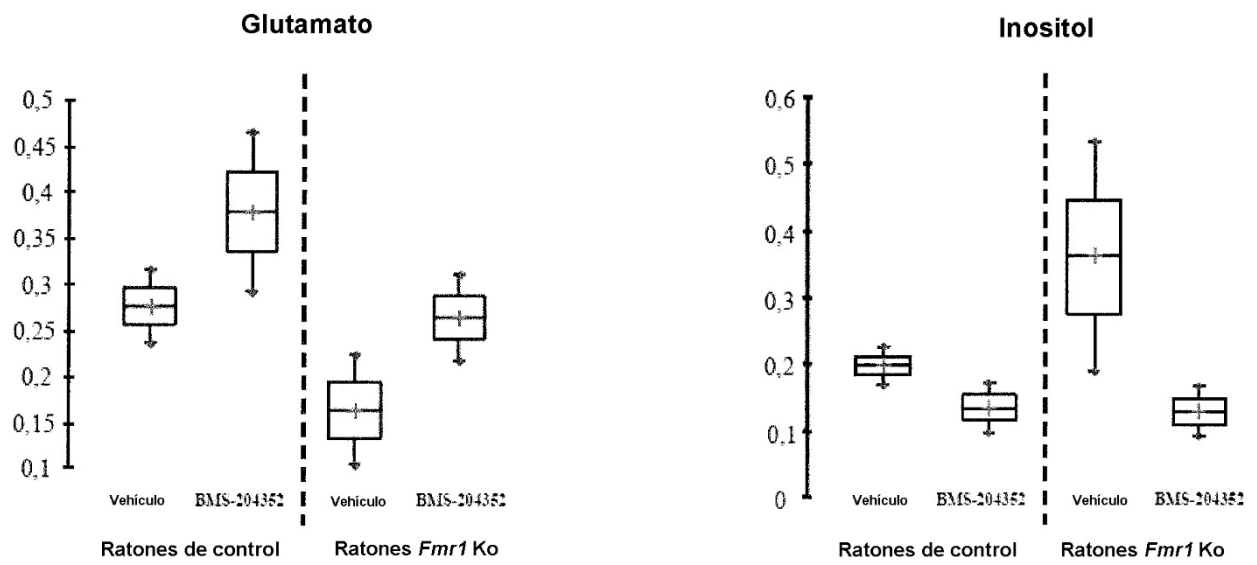


FIGURA 7

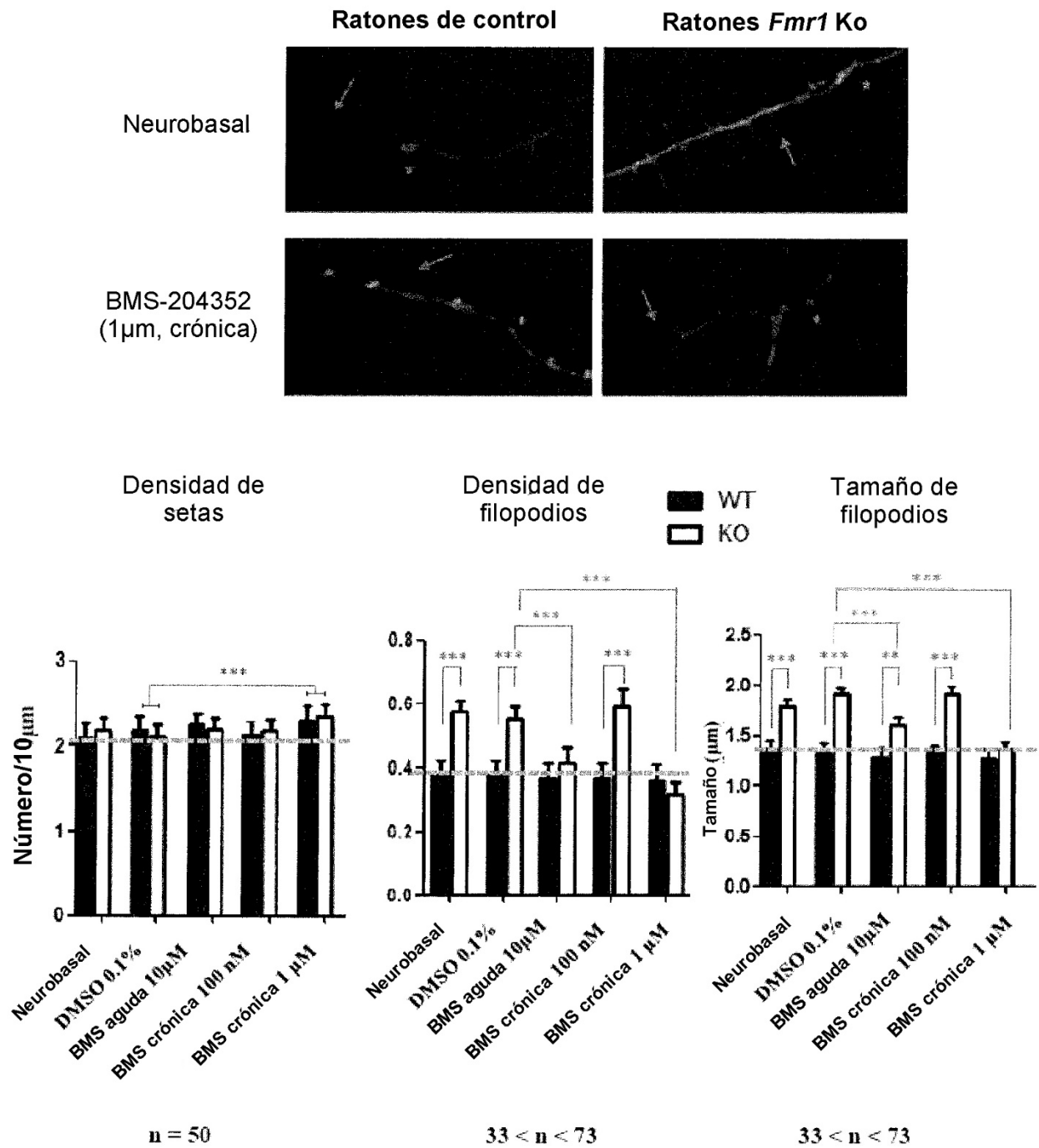


FIGURA 8