SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-200227- -00000-0000

Fecha: 2013-08-23 13:29:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 339 342

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

SOLICITUD
REGISTRO DE PATENTE DE INVENCION
PCT

EXPEDIENTE No _____

TITULO TRATAMIENTO DE TRANSTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA QUE UTILIZA ÁCIDO GLICIL-L-2-METILPROLIL-L- GLUTÁMICO

CLASIFICACION INTERNACIONAL _____

SOLICITANTE NEUREN PHARMACEUTICALS LIMITED

DOMICILIO AUCKLAND, NUEVA ZELANDIA

APODERADO LUZ HELENA ADARVE GOMEZ

BOGOTA D.C._____

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-200227- -00000-0000
Fecha: 2013-08-23 13:29:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 338 342

de radicación

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD		X	Patente de invención		Patente de Modelo de Utilidad
			X	Capitulo I		Capitulo II

2 DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)

Solicitud Internacional No.	PCT/US2012/000047	**Fecha**	27.01.2012
Publicación Internacional No.	WO 2012/102832 A1	**Fecha**	02.08.2012

3 (54) TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)

TRATAMIENTO DE TRANSTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA QUE UTILIZA ÁCIDO GLICIL-L-2-METILPROLIL-L- GLUTÁMICO

4 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (51) CIP

5 (71) SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

	APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
1.	NEUREN PHARMACEUTICALS LIMITED			

6 DATOS DEL SOLICITANTE

DIRECCIÓN	PO BOX 9923, Newmarket, 1149	No. TELÉFONO	313 7800
CIUDAD	Auckland	E-MAIL	infopi@cardenasycardenas.com
DEPARTAMENTO/ESTADO		NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	
PAÍS DE RESIDENCIA	Nueva Zelandia		Nueva Zelandia

7 (72) INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

APELLIDOS	NOMBRE	NACIONALIDAD
1. GLASS	1. Larry	1. Estadounidense
2. BICKERDIKE	2. Michael John	2. Británico
3. SNAPE	3. Michael Frederick	3. Británico

DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:

8 DATOS INVENTOR (ES)

PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO	CIUDAD	DIRECCIÓN
Estados Unidos de América	Maryland	Takoma Park	7410 Piney Branch Road, 20912
Nueva Zelandia		Auckland	41 Waimarie Street. St. Heliers,
Gran Bretaña	Surey	Thames Ditton	111 Thorkhill Road, KT7 0UW

OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

☐ ☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.

9 (74) ☐ **REPRESENTANTE** X **APODERADO**

APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
ADARVE GOMEZ	LUZ HELENA	C.C .41575435 BTA T.P .14884 CSJ

DIRECCIÓN	Carrera 7 No 71-52 Torre B Piso 9	No. TELÉFONO	313 7800
CIUDAD	BOGOTA	E-MAIL	infopi@cardenasycardenas.com
		No. DE PROTOCOLO EN LA OFICINA	
PAÍS	COLOMBIA		

10	(30)	DECLARACIONES DE PRIORIDAD		SI	X	NO

(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. Estados Unidos de América	US	61/462,141	27.01.2011
2.Estados Unidos de América	US	61/492,248	01.06.2011
3.			

11 DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.

[ ] SI [x] NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.

12 DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.

[ ] SI [x] NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.

13 REDUCCIÓN DE TASAS

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

[ ] SI [x] NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

Micro, pequeñas y medianas empresas	Universidades públicas o privadas	Entidades sin ánimo de lucro
[ ] Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	[ ] Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación. Acreditación Colciencias.	[ ] Copia de registro vigente en Cámara de comercio.
[ ] Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.		[ ] Hoja de información complementaria.
		[ ] Otros, especificar

14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA		SI	x	NO

Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.

14	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 13-0083405	Fecha 22.08.2013

15 FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL

Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)

LUZ HELENA ADARVE GOMEZ NPV

16 ORDEN Y RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD

Documentación Técnica
Solicitud Internacional en castellano

1. [X] Descripción N° de folios: 153
2. [X] Reivindicaciones..... N° Reivindicaciones 18
3. [X] Dibujos y/o figuras N° folios: 26
4. [X] Resumen.
5. [ ] Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso
6. [ ] Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso
7. [ ] Arte final 12 x 12.
8. [ ] Anexo formato digital.

Documentación Jurídica

9. [ ] Poderes, si fuera el caso.
10. [X] Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante
11. [ ] Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.
12. [ ] Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.
13. [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal, cuando el solicitante es persona jurídica.
14. [X] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
15. [ ] Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
16. [ ] Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
17. [X] Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0083405

Bogotá D.C., Agosto 22 de 2013 - 11:33:00

RECIBIDO DE : CARDENAS & CARDENAS ABOGADOS PI LTDA NI 830.083.491

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	599236735	22/08/2013	3.140.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	500.000.00	500.000.00
				$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-200227- -00000-0000
Fecha: 2013-08-23 13:29:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: ~~339~~ 342

CARDENAS & CARDENAS
ABOGADOS

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0083409

Bogotá D.C., Agosto 22 de 2013 - 11:33:00

RECIBIDO DE : CARDENAS & CARDENAS ABOGADOS PI LTDA NI 830.083.491

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	599236735	22/08/2013	3.140.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
8	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	240.000.00
				$240.000.00

SON: **DOSCIENTOS CUARENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-200227- -00000-0000
Fecha: 2013-08-23 13:29:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 339 342

DEED OF ASSIGNMENT

PARTIES:

(1) **Lawrence Irwin Glass**, also known as Larry Glass, a resident of 7410 Piney Branch Road, Takoma Park, Maryland 20912, U.S.A. ("**First Inventor**");

(2) **Michael John Bickerdike**, a resident of 41 Waimarie Street, St. Heliers, Auckland, New Zealand ("**Second Inventor**"); and

(3) **Michael Frederick Snape**, a resident of Throwsters, Wonersh, Surrey GU5 0PF, G.B. ("**Third Inventor**");

together referred to as "**Inventors**"; and

(4) **Neuren Pharmaceuticals Limited**, a New Zealand company, having a place of business at Level 1, 59 Wellington Street, Freemans Bay, Auckland, New Zealand ("**Assignee**");

each referred to as a "**Party**" and collectively the "**Parties**".

COVENANTS

WHEREAS, the Inventors have created certain new inventions and have filed the following applications ("**the Patent Applications**") disclosing the inventions:

(a) Title:	**Treatment of Autism Spectrum Disorders Using Glycyl-L-2-MethylProlyl-L-Glutamic Acid**
Application No.:	**PCT/US2012/000047**
International Publication No.:	**WO2012/102832**
Filing Date:	**27 January 2012**
Ref No.:	**1018WO3**
(b) Title:	**Treatment of Autism Spectrum Disorders Using Glycyl-L-2-MethylProlyl-L-Glutamic Acid**
Application No.:	**No. 13/699,087**
Filing Date:	**20 November 2012**
Ref No.:	**1018US16**

WHEREAS the Assignee wishes to acquire the entire right, title and interest in and to: (a) the Patent Applications and (b) the inventions disclosed in them, together with all embodiments of the inventions, and any improvements in, modifications of or additions to the inventions, conceived, made or discovered jointly or severally by the Inventors, while employed by the Assignee or under a commission for money or money's worth from the Assignee (collectively referred to as "**the Inventions**"), and (c) any and all patents, certificates of invention, other governmental grants and other forms of protection which may exist or come into existence in relation to the Inventions in any country of the world (collectively referred to as "**the Patents**").

WHEREAS the Assignee has requested the Inventors to execute this Deed of Assignment.

WHEREAS the First Inventor and the Second Inventor are the employees of the Assignee and they have invented the Inventions in the course of their employment.

WHEREAS the Third Inventor is a contractor to the Assignee and he has invented the Inventions in the performance of services for the Assignee, under a commission for money or money's worth.

NOW THEREFORE, for good and valuable consideration, acknowledged by each of the Inventors to have been received in full from the Assignee:

1. Each of the Inventors hereby sells, assigns, transfers and conveys to the Assignee, the entire right, title and interest:

(a) in and to the Inventions;
(b) in and to the Patent Applications together with any future Patent(s) granted on the Patent Applications;
(c) to apply for Patents in any or all countries of the world;
(d) in and to any and all applications for Patents filed anywhere in the world, including, without limitation, the entire right, title and interest in each and every divisional, continuation, continuation-in-part, supplementary protection application or additional application filed or any applications for Patents filed pursuant to any international convention, treaty, agreement or understanding;
(e) in and to any and all future Patents granted on applications referred to in paragraph (d) above;
(f) in and to each and every reissue or extension of any and all Patents referred to in paragraphs (b) and (e) above; and
(g) in and to each and every Patent claim resulting from a reexamination certificate for any and all Patents referred to in paragraphs (b) and (e) above.

2. The assignment effected in Clause 1 above includes, without limitation, the assignment of the right to sue for damages and for any legal and equitable remedies in respect of all causes of action arising before, on or after the date of this Deed in relation to any right, title and interest conveyed in this Deed.

3. Each Inventor hereby covenants and agrees to cooperate with the Assignee to enable the Assignee to enjoy to the fullest extent the right, title and interest conveyed in this Deed. Such cooperation by the Inventors shall include prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, executing of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance, all to the extent deemed necessary or desirable by the Assignee:

(a) to perfect in the Assignee the right, title and interest conveyed in this Deed;
(b) to comply with any duty of disclosure;
(c) to prosecute the Patent Applications;
(d) to file and prosecute any applications for Patents including, without limitation, any divisional, continuation, continuation-in-part, supplementary protection or additional application or any application for Patents filed pursuant to any international convention, treaty, agreement or understanding;
(e) to file and prosecute applications for reissue of any of the Patents;
(f) for interference or other priority proceedings involving the Inventions; or
(g) for legal proceedings involving the Inventions and any patent applications therefor and any Patents granted thereon, including, without limitation, opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, reexamination proceedings, compulsory licensing proceedings, infringement actions and court actions;

provided, however, that the expense incurred by said Inventors in providing such cooperation shall be paid for by the Assignee.

4. Each of the Inventors hereby irrevocably appoints the Assignee as his or her attorney with full power to act in his or her name and on his or her behalf in fulfilling any of the obligations set out in Clause 3 if:

(a) the Inventor fails to do any of the acts set out in Clause 3, after being requested to do so by the Assignee; or

(b) if the Assignee is unable, after making reasonable and proper inquiries, to locate the Inventor to request the fulfillment of his or her obligations under Clause 3.

5. The Inventors agree to treat as confidential all information relating to the Inventions, and shall not use, disclose or publish the same without the express prior written consent of the Assignee. Such obligation shall not extend to information which already is in or which enters the public domain through no fault of the Inventors. The Inventors agree to seek prior clearance from the Assignee in any case of uncertainty.

6. The terms and covenants of this Deed of Assignment shall inure to the benefit of the Assignee, its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon the Inventors, their respective heirs, legal representatives and assigns.

7. The Inventors hereby jointly and severally warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

8. The Inventors acknowledge that:

(a) the Assignee has recommended that each of them seek independent legal advice regarding whether or not to enter into this Deed of Assignment;

(b) they had the opportunity to do so, prior to signing this Deed; and

(c) if they elect not to seek legal advice, they understand and acknowledge that they take responsibility for their decision.

9. **Waiver:** No failure or delay by any Party in exercising any right, power or privilege under this Deed will operate as a waiver of such right, power or privilege, nor will any single or partial exercise preclude any other or further exercise of any right, power or privilege under this Deed.

10. **Entire agreement:** This Deed contains the whole of the contract and understanding between the Parties relating to the matters covered by it and supersedes all prior representations, agreements, statements and understandings between the Parties relating to those matters, whether verbal or in writing.

11. **Counterparts:** This Deed may be executed in counterparts, all of which together shall be considered a single instrument. The Parties acknowledge that this Deed may be executed on the basis of an exchange of electronic copies and confirm that their respective execution of this Deed by such means will be a valid and sufficient execution.

12. **Governing law:** The formation, validity, construction and performance of this Deed will be governed and construed in accordance with the laws of New Zealand. The Parties irrevocably agree that the Courts of New Zealand will have non-exclusive jurisdiction to hear and determine all disputes under or in connection with this deed. The Parties irrevocably waive any objections to New Zealand as the forum for proceedings on the grounds of forum non-conveniens or any similar grounds.

IN WITNESS WHEREOF, the Parties have executed this instrument as a DEED on the last date given below:

Signed by Lawrence Irwin Glass

(1) _____ _____
Signature Date

In the presence of:

(1) Witness Signature:_____ _____
Date

(1) Name (Printed): _____

(1) Occupation:_____

(1) Address:_____

Signed by Michael John Bickerdike

_____ _____
Signature Date

In the presence of:

Witness Signature:_____ _____
Date

Name (Printed): _____

Occupation:_____

Address:_____

Signed by Michael Frederick Snape

MSnape
_____ 23rd May 2013
Signature Date

In the presence of:

Witness Signature: Rose Snape 23rd May 2013
Date

Name (Printed): Rose Snape

Occupation: Social Worker

Address: Throwsters Wonersh Surrey GU5 0PF GB

Signed on behalf of Neuren Pharmaceuticals Limited by:

_____ _____

Signature of Director Date

_____

Name of Director

In the presence of:

Witness Signature_____ _____

Date

Name (Printed): _____

Occupation:_____

Address:_____

DEED OF ASSIGNMENT

PARTIES:

(1) **Lawrence Irwin Glass**, also known as Larry Glass, a resident of 7410 Piney Branch Road, Takoma Park, Maryland 20912, U.S.A. ("**First Inventor**");

(2) **Michael John Bickerdike**, a resident of 41 Waimarie Street, St. Heliers, Auckland, New Zealand ("**Second Inventor**"); and

(3) **Michael Frederick Snape**, a resident of 111 Thorkhill Road, Thames Ditton, Surrey KT7 0UW, G.B. ("**Third Inventor**");

together referred to as "**Inventors**"; and

(4) **Neuren Pharmaceuticals Limited**, a New Zealand company, having a place of business at Level 1, 59 Wellington Street, Freemans Bay, Auckland, New Zealand ("**Assignee**");

each referred to as a "**Party**" and collectively the "**Parties**".

COVENANTS

WHEREAS, the Inventors have created certain new inventions and have filed the following applications ("**the Patent Applications**") disclosing the inventions:

(a) Title:	**Treatment of Autism Spectrum Disorders Using Glycyl-L-2-MethylProlyl-L-Glutamic Acid**
Application No.:	**PCT/US2012/000047**
International Publication No.:	**WO2012/102832**
Filing Date:	**27 January 2012**
Ref No.:	**1018WO3**
(b) Title:	**Treatment of Autism Spectrum Disorders Using Glycyl-L-2-MethylProlyl-L-Glutamic Acid**
Application No.:	**No. 13/699,087**
Filing Date:	**20 November 2012**
Ref No.:	**1018US16**

WHEREAS the Assignee wishes to acquire the entire right, title and interest in and to: (a) the Patent Applications and (b) the inventions disclosed in them, together with all embodiments of the inventions, and any improvements in, modifications of or additions to the inventions, conceived, made or discovered jointly or severally by the Inventors, while employed by the Assignee or under a commission for money or money's worth from the Assignee (collectively referred to as "**the Inventions**"), and (c) any and all patents, certificates of invention, other governmental grants and other forms of protection which may exist or come into existence in relation to the Inventions in any country of the world (collectively referred to as "**the Patents**").

WHEREAS the Assignee has requested the Inventors to execute this Deed of Assignment.

WHEREAS the First Inventor and the Second Inventor are the employees of the Assignee and they have invented the Inventions in the course of their employment.

WHEREAS the Third Inventor is a contractor to the Assignee and he has invented the Inventions in the performance of services for the Assignee, under a commission for money or money's worth.

NOW THEREFORE, for good and valuable consideration, acknowledged by each of the Inventors to have been received in full from the Assignee:

1. Each of the Inventors hereby sells, assigns, transfers and conveys to the Assignee, the entire right, title and interest:

(a) in and to the Inventions;
(b) in and to the Patent Applications together with any future Patent(s) granted on the Patent Applications;
(c) to apply for Patents in any or all countries of the world;
(d) in and to any and all applications for Patents filed anywhere in the world, including, without limitation, the entire right, title and interest in each and every divisional, continuation, continuation-in-part, supplementary protection application or additional application filed or any applications for Patents filed pursuant to any international convention, treaty, agreement or understanding;
(e) in and to any and all future Patents granted on applications referred to in paragraph (d) above;
(f) in and to each and every reissue or extension of any and all Patents referred to in paragraphs (b) and (e) above; and
(g) in and to each and every Patent claim resulting from a reexamination certificate for any and all Patents referred to in paragraphs (b) and (e) above.

2. The assignment effected in Clause 1 above includes, without limitation, the assignment of the right to sue for damages and for any legal and equitable remedies in respect of all causes of action arising before, on or after the date of this Deed in relation to any right, title and interest conveyed in this Deed.

3. Each Inventor hereby covenants and agrees to cooperate with the Assignee to enable the Assignee to enjoy to the fullest extent the right, title and interest conveyed in this Deed. Such cooperation by the Inventors shall include prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, executing of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance, all to the extent deemed necessary or desirable by the Assignee:

(a) to perfect in the Assignee the right, title and interest conveyed in this Deed;
(b) to comply with any duty of disclosure;
(c) to prosecute the Patent Applications;
(d) to file and prosecute any applications for Patents including, without limitation, any divisional, continuation, continuation-in-part, supplementary protection or additional application or any application for Patents filed pursuant to any international convention, treaty, agreement or understanding;
(e) to file and prosecute applications for reissue of any of the Patents;
(f) for interference or other priority proceedings involving the Inventions; or
(g) for legal proceedings involving the Inventions and any patent applications therefor and any Patents granted thereon, including, without limitation, opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, reexamination proceedings, compulsory licensing proceedings, infringement actions and court actions;

provided, however, that the expense incurred by said Inventors in providing such cooperation shall be paid for by the Assignee.

4. Each of the Inventors hereby irrevocably appoints the Assignee as his or her attorney with full power to act in his or her name and on his or her behalf in fulfilling any of the obligations set out in Clause 3 if:

(a) the Inventor fails to do any of the acts set out in Clause 3, after being requested to do so by the Assignee; or
(b) if the Assignee is unable, after making reasonable and proper inquiries, to locate the Inventor to request the fulfillment of his or her obligations under Clause 3.

5. The Inventors agree to treat as confidential all information relating to the Inventions, and shall not use, disclose or publish the same without the express prior written consent of the Assignee. Such obligation shall not extend to information which already is in or which enters the public domain through no fault of the Inventors. The Inventors agree to seek prior clearance from the Assignee in any case of uncertainty.

6. The terms and covenants of this Deed of Assignment shall inure to the benefit of the Assignee, its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon the Inventors, their respective heirs, legal representatives and assigns.

7. The Inventors hereby jointly and severally warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

8. The Inventors acknowledge that:
(a) the Assignee has recommended that each of them seek independent legal advice regarding whether or not to enter into this Deed of Assignment;
(b) they had the opportunity to do so, prior to signing this Deed; and
(c) if they elect not to seek legal advice, they understand and acknowledge that they take responsibility for their decision.

9. **Waiver:** No failure or delay by any Party in exercising any right, power or privilege under this Deed will operate as a waiver of such right, power or privilege, nor will any single or partial exercise preclude any other or further exercise of any right, power or privilege under this Deed.

10. **Entire agreement:** This Deed contains the whole of the contract and understanding between the Parties relating to the matters covered by it and supersedes all prior representations, agreements, statements and understandings between the Parties relating to those matters, whether verbal or in writing.

11. **Counterparts:** This Deed may be executed in counterparts, all of which together shall be considered a single instrument. The Parties acknowledge that this Deed may be executed on the basis of an exchange of electronic copies and confirm that their respective execution of this Deed by such means will be a valid and sufficient execution.

12. **Governing law:** The formation, validity, construction and performance of this Deed will be governed and construed in accordance with the laws of New Zealand. The Parties irrevocably agree that the Courts of New Zealand will have non-exclusive jurisdiction to hear and determine all disputes under or in connection with this deed. The Parties irrevocably waive any objections to New Zealand as the forum for proceedings on the grounds of forum non-conveniens or any similar grounds.

IN WITNESS WHEREOF, the Parties have executed this instrument as a DEED on the last date given below:

Signed by Lawrence Irwin Glass

(1) _____ 16 May 2013
Signature Date

In the presence of:

(1) Witness Signature: Charla T. Glass May 16, 2013
Date

(1) Name (Printed): Charla T. Glass

(1) Occupation: Licensed Clinical Social Worker

(1) Address: 7410 Piney Br. Rd., Takoma Park, MD. 20912

Signed by Michael John Bickerdike

_____ _____
Signature Date

In the presence of:

Witness Signature: _____ _____
Date

Name (Printed): _____

Occupation: _____

Address: _____

Signed by Michael Frederick Snape

_____ _____
Signature Date

In the presence of:

Witness Signature: _____ _____
Date

Name (Printed): _____

Occupation: _____

Address: _____

Signed on behalf of Neuren Pharmaceuticals Limited by:

Signature of Director — Date: 16 May 2013

Larry Glass
Name of Director

In the presence of:

Witness Signature: Charla D. Glass — Date: May 16, 2013

Name (Printed): Charla T. Glass

Occupation: Licensed Clinical Social Worker

Address: 7410 Piney Br. Road, Takoma Park, MD. 20912

DEED OF ASSIGNMENT

PARTIES:

(1) **Lawrence Irwin Glass**, also known as Larry Glass, a resident of 7410 Piney Branch Road, Takoma Park, Maryland 20912, U.S.A. ("**First Inventor**");

(2) **Michael John Bickerdike**, a resident of 41 Waimarie Street, St. Heliers, Auckland, New Zealand ("**Second Inventor**"); and

(3) **Michael Frederick Snape**, a resident of 111 Thorkhill Road, Thames Ditton, Surrey KT7 0UW, G.B. ("**Third Inventor**");

together referred to as "**Inventors**"; and

(4) **Neuren Pharmaceuticals Limited**, a New Zealand company, having a place of business at Level 1, 59 Wellington Street, Freemans Bay, Auckland, New Zealand ("**Assignee**");

each referred to as a "**Party**" and collectively the "**Parties**".

COVENANTS

WHEREAS, the Inventors have created certain new inventions and have filed the following applications ("**the Patent Applications**") disclosing the inventions:

(a) Title:	**Treatment of Autism Spectrum Disorders Using Glycyl-L-2-MethylProlyl-L-Glutamic Acid**
Application No.:	**PCT/US2012/000047**
International Publication No.:	**WO2012/102832**
Filing Date:	**27 January 2012**
Ref No.:	**1018WO3**
(b) Title:	**Treatment of Autism Spectrum Disorders Using Glycyl-L-2-MethylProlyl-L-Glutamic Acid**
Application No.:	**No. 13/699,087**
Filing Date:	**20 November 2012**
Ref No.:	**1018US16**

WHEREAS the Assignee wishes to acquire the entire right, title and interest in and to: (a) the Patent Applications and (b) the inventions disclosed in them, together with all embodiments of the inventions, and any improvements in, modifications of or additions to the inventions, conceived, made or discovered jointly or severally by the Inventors, while employed by the Assignee or under a commission for money or money's worth from the Assignee (collectively referred to as "**the Inventions**"), and (c) any and all patents, certificates of invention, other governmental grants and other forms of protection which may exist or come into existence in relation to the Inventions in any country of the world (collectively referred to as "**the Patents**").

WHEREAS the Assignee has requested the Inventors to execute this Deed of Assignment.

WHEREAS the First Inventor and the Second Inventor are the employees of the Assignee and they have invented the Inventions in the course of their employment.

WHEREAS the Third Inventor is a contractor to the Assignee and he has invented the Inventions in the performance of services for the Assignee, under a commission for money or money's worth.

NOW THEREFORE, for good and valuable consideration, acknowledged by each of the Inventors to have been received in full from the Assignee:

1. Each of the Inventors hereby sells, assigns, transfers and conveys to the Assignee, the entire right, title and interest:

(a) in and to the Inventions;
(b) in and to the Patent Applications together with any future Patent(s) granted on the Patent Applications;
(c) to apply for Patents in any or all countries of the world;
(d) in and to any and all applications for Patents filed anywhere in the world, including, without limitation, the entire right, title and interest in each and every divisional, continuation, continuation-in-part, supplementary protection application or additional application filed or any applications for Patents filed pursuant to any international convention, treaty, agreement or understanding;
(e) in and to any and all future Patents granted on applications referred to in paragraph (d) above;
(f) in and to each and every reissue or extension of any and all Patents referred to in paragraphs (b) and (e) above; and
(g) in and to each and every Patent claim resulting from a reexamination certificate for any and all Patents referred to in paragraphs (b) and (e) above.

2. The assignment effected in Clause 1 above includes, without limitation, the assignment of the right to sue for damages and for any legal and equitable remedies in respect of all causes of action arising before, on or after the date of this Deed in relation to any right, title and interest conveyed in this Deed.

3. Each Inventor hereby covenants and agrees to cooperate with the Assignee to enable the Assignee to enjoy to the fullest extent the right, title and interest conveyed in this Deed. Such cooperation by the Inventors shall include prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, executing of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance, all to the extent deemed necessary or desirable by the Assignee:

(a) to perfect in the Assignee the right, title and interest conveyed in this Deed;
(b) to comply with any duty of disclosure;
(c) to prosecute the Patent Applications;
(d) to file and prosecute any applications for Patents including, without limitation, any divisional, continuation, continuation-in-part, supplementary protection or additional application or any application for Patents filed pursuant to any international convention, treaty, agreement or understanding;
(e) to file and prosecute applications for reissue of any of the Patents;
(f) for interference or other priority proceedings involving the Inventions; or
(g) for legal proceedings involving the Inventions and any patent applications therefor and any Patents granted thereon, including, without limitation, opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, reexamination proceedings, compulsory licensing proceedings, infringement actions and court actions;

provided, however, that the expense incurred by said Inventors in providing such cooperation shall be paid for by the Assignee.

4. Each of the Inventors hereby irrevocably appoints the Assignee as his or her attorney with full power to act in his or her name and on his or her behalf in fulfilling any of the obligations set out in Clause 3 if:

(a) the Inventor fails to do any of the acts set out in Clause 3, after being requested to do so by the Assignee; or

(b) if the Assignee is unable, after making reasonable and proper inquiries, to locate the Inventor to request the fulfillment of his or her obligations under Clause 3.

5. The Inventors agree to treat as confidential all information relating to the Inventions, and shall not use, disclose or publish the same without the express prior written consent of the Assignee. Such obligation shall not extend to information which already is in or which enters the public domain through no fault of the Inventors. The Inventors agree to seek prior clearance from the Assignee in any case of uncertainty.

6. The terms and covenants of this Deed of Assignment shall inure to the benefit of the Assignee, its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon the Inventors, their respective heirs, legal representatives and assigns.

7. The Inventors hereby jointly and severally warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

8. The Inventors acknowledge that:

(a) the Assignee has recommended that each of them seek independent legal advice regarding whether or not to enter into this Deed of Assignment;

(b) they had the opportunity to do so, prior to signing this Deed; and

(c) if they elect not to seek legal advice, they understand and acknowledge that they take responsibility for their decision.

9. **Waiver:** No failure or delay by any Party in exercising any right, power or privilege under this Deed will operate as a waiver of such right, power or privilege, nor will any single or partial exercise preclude any other or further exercise of any right, power or privilege under this Deed.

10. **Entire agreement:** This Deed contains the whole of the contract and understanding between the Parties relating to the matters covered by it and supersedes all prior representations, agreements, statements and understandings between the Parties relating to those matters, whether verbal or in writing.

11. **Counterparts:** This Deed may be executed in counterparts, all of which together shall be considered a single instrument. The Parties acknowledge that this Deed may be executed on the basis of an exchange of electronic copies and confirm that their respective execution of this Deed by such means will be a valid and sufficient execution.

12. **Governing law:** The formation, validity, construction and performance of this Deed will be governed and construed in accordance with the laws of New Zealand. The Parties irrevocably agree that the Courts of New Zealand will have non-exclusive jurisdiction to hear and determine all disputes under or in connection with this deed. The Parties irrevocably waive any objections to New Zealand as the forum for proceedings on the grounds of forum non-conveniens or any similar grounds.

IN WITNESS WHEREOF, the Parties have executed this instrument as a DEED on the last date given below:

Signed by Lawrence Irwin Glass

(1) _____ _____
Signature Date

In the presence of:

(1) Witness Signature:_____ _____
Date

(1) Name (Printed): _____

(1) Occupation:_____

(1) Address:_____

Signed by Michael John Bickerdike

_____ 16/5/13
Signature Date

In the presence of:

Witness Signature:_____ 16/5/2013
Date

Name (Printed): PAULINA LUCZYNSKA

Occupation: IT MANAGER

Address: 11A WARD CRES, TE ATATU PENINSULA, AUCKLAND

Signed by Michael Frederick Snape

_____ _____
Signature Date

In the presence of:

Witness Signature:_____ _____
Date

Name (Printed): _____

Occupation:_____

Address:_____

Signed on behalf of Neuren Pharmaceuticals Limited by:

_____ _____

Signature of Director Date

_____

Name of Director

In the presence of:

Witness Signature_____ _____

Date

Name (Printed): _____

Occupation:_____

Address:_____

20

ESCRITURA DE CESIÓN

PARTES:

(1) **Lawrence Irwin Glass**, también conocido como Larry Glass, con domicilio en 7410 Piney Branch Road, Takoma Park, Maryland 20912, Estados Unidos ("**Primer Inventor**");
(2) **Michael John Bickerdike**, con domicilio en 41 Waimarie Street, St. Heliers, Auckland, Nueva Zelanda ("**Segundo Inventor**"); y
(3) **Michael Frederick Snape**, con domicilio en Throwsters, Wonersh, Surrey GUS OPF, G.B. ("**Tercer Inventor**");

Juntos denominados como "**Inventores**" y;

(4) **Neuren Pharmaceuticals Limited**, una sociedad de Nueva Zelanda, con domicilio comercial en Levell, S9 Wellington Street, Freemans Bay, Auckland, Nueva Zelanda ("**Cesionario**");

Cada uno denominado como una "**Parte**" y colectivamente como las "**Partes**".

PACTAN

CONSIDERANDO QUE, los inventores han creado ciertas invenciones y han presentado las siguientes solicitudes ("**las Solicitudes de Patente**") que describen las invenciones:

(a) Título:	**Tratamiento de Trastornos de Espectro de Autismo que Utilizan Ácido Glicil-L-2-MetilProlil-L-Glutámico**
Solicitud No.:	**PCT/US2011/000047**
Publicación Internacional No.:	**WO2012/102832**
Fecha de Presentación:	**Enero 27 de 2012**

Ref. No.: **1018WO3**

(b) Título: **Tratamiento de Trastornos de Espectro de Autismo que Utilizan Ácido Glicil-L-2-MetilProlil-L-Glutámico**

Solicitud No.: **No. 13/699,087**

Fecha de Presentación: **Noviembre 20 de 2012**

Ref. No.: **1018US16**

CONSIDERANDO QUE el Cesionario desea adquirir el derecho, título y participación completos en y para: (a) las Solicitudes de Patente y (b) las invenciones descritas en ellas, junto con todas las realizaciones de las invenciones, y cualesquiera mejoras en, modificaciones de o adiciones a las invenciones, concebidas, hechas o descubiertas en forma conjunta o solidariamente por los Inventores, mientras estaba empleado por el Cesionario o en virtud de una comisión por dinero o cualquier otro valor del Cesionario (denominadas colectivamente como "**las Invenciones**"), y (c) cualesquiera y todas las patentes, certificados de invención, otras concesiones gubernamentales y otras formas de protección que puedan existir o que surjan en relación con las Invenciones en cualquier país del mundo (denominadas colectivamente como "**las Patentes**").

CONSIDERANDO QUE el Cesionario ha solicitado que los Inventores legalicen esta Escritura de Cesión.

CONSIDERANDO QUE el Primero y Segundo Inventor son los empleados del Cesionario y han realizado las invenciones en el curso de su empleo.

CONSIDERANDO QUE el tercer Inventor es un contratista para el Cesionario y que dicho inventor ha realizado las invenciones en la prestación de servicios para el Cesionario, en virtud de una comisión por dinero o cualquier otro valor.

EN VIRTUD DE LO ANTERIOR, a título oneroso, cuyo recibo del cesionario se reconoce en su totalidad por cada uno de los inventores:

1. Cada uno de los inventores por la presente presentes vende, cede, transfiere y transmite al Cesionario, el derecho, título y participación completos:

   (a) en y para las Invenciones;
   (b) en y para las Solicitudes de Patente junto con cualquier patente futura (s) concedida a las Solicitudes de Patente;
   (c) solicitar patentes en alguno o todos los países del mundo;
   (d) en y para cualquiera y todas las solicitudes de Patentes presentadas en cualquier parte del mundo, que incluye, sin limitación, el derecho, título y participación completos en todos y cada solicitud divisional, de continuación, continuación en parte, de protección complementaria o solicitud adicional presentada o cualquier solicitud de Patente presentada en virtud de cualquier convenio internacional, tratado, acuerdo o pacto;
   (e) en y para cualesquiera y todas las Patentes futuras otorgadas en las solicitudes mencionadas en el párrafo (d) anterior;
   (f) en y para todas y cada nueva publicación o ampliación de todas y cualquiera de las patentes relacionadas en los párrafos (b) y (e) anteriores, y
   (g) en y para todas y cada una de las solicitudes de patente que resulten de un certificado de re-examen para todas y cualquiera de las patentes relacionadas en los párrafos (b) y (e) anteriores.

2. La cesión efectuada en la Cláusula 1 anterior incluye, sin limitación, la cesión del derecho a demandar por daños y perjuicios y de cualquier recurso legal y equitativo con respecto a todas las causas de acción que surjan antes, en o después de la fecha de la presente Escritura, en relación

con cualquier derecho, títulos y participación transferido en la presente Escritura.

3. Cada Inventor por medio de la presente pacta y se compromete a colaborar con el Cesionario para permitir al Cesionario disfrutar al máximo los derechos, títulos y participación transferidos en la presente Escritura. Dicha cooperación de los inventores incluirá la realización pronta de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, legalizando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones y demás documentos y otro tipo de asistencia, todos en la medida que se consideren necesarios o convenientes por el Cesionario:

   (a) perfeccionar para el Cesionario el derecho, título y participación transferidos en la presente Escritura;
   (b) cumplir con cualquier obligación de divulgación;
   (c) procesar las Solicitudes de Patentes;
   (d) presentar y procesar las solicitudes de Patentes, que incluyen, sin limitación, cualquier solicitud divisional, de continuación, continuación en parte, protección complementaria o solicitud adicional o cualquier solicitud de patente presentada en virtud de cualquier convenio internacional, tratado, acuerdo o pacto;
   (e) presentar y tramitar solicitudes de nuevas publicaciones de cualquiera de las patentes;
   (f) para interferencia u otros procesos prioritarios que impliquen a los Inventores; o
   (g) los procesos legales que involucran las Invenciones y cualquier solicitud de patente para el mismo y cualesquier patentes concedidas al respecto, que incluyen, sin limitación, procesos de oposición, procesos de cancelación, oposiciones prioritarias, procesos de uso público, procesos de nuevo examen, procesos de concesión de licencias obligatorias, acciones por infracciones y acciones judiciales;

Siempre que, sin embargo, los gastos incurridos por dichos Inventores en la prestación de dicha cooperación sean pagados por el cesionario.

4. Cada uno de los inventores por la presente designa irrevocablemente al Cesionario como su abogado con plenos poderes para actuar a su nombre y por su cuenta en el cumplimiento de cualquiera de las obligaciones establecidas en la Cláusula 3 si:

   (a) el inventor no cumple con alguno de los actos previstos en la Cláusula 3, después de haber sido requerido para ello por el Cesionario, o

   (b) si el Cesionario no puede, previa investigación razonable y adecuada, localizar al Inventor para solicitar el cumplimiento de sus obligaciones en virtud de la Cláusula 3.

5. Los inventores están de acuerdo en tratar como confidencial toda la información que se relaciona con las Invenciones, y no utilizarán, divulgarán o publicarán la misma sin el consentimiento expreso y por escrito del Cesionario. Tal obligación no se extiende a la información que ya se está en o que ya se hace de dominio público sin culpa de los Inventores, los Inventores acuerdan solicitar autorización previa al Cesionario en cualquier cado de Incertidumbre.

6. Los términos y cláusulas del presente Contrato de Cesión se aplicarán en beneficio del Cesionario, sus sucesores, cesionarios y demás representantes legales, y serán vinculantes para los Inventores, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

7. Los Inventores por la presente conjunta y solidariamente garantizan y declaran que no han celebrado ni celebrarán ninguna cesión, contrato o convenio que entre en conflicto con ésta.

8. Los Inventores reconocen que:
   (a) el Cesionario ha recomendado que cada uno de ellos busque asesoría jurídica independiente con respecto a si procede o no celebrar esta Escritura de Cesión;
   (b) tuvieron la oportunidad de hacerlo, antes de la firma de la presente Escritura, y
   (c) si optan por no buscar asesoría legal, entienden y reconocen que tienen la responsabilidad de su decisión.

9. **Renuncia**: Ninguna falla o retraso de cualquiera de las Partes en el ejercicio de cualquier derecho, poder o privilegio en virtud de esta Escritura operará como una renuncia a tal derecho, poder o privilegio, ni ningún ejercicio individual o parcial excluirá cualquier otro ejercicio adicional de algún derecho, poder o privilegio en virtud de esta Escritura.

10. **Acuerdo Integral**: Esta Escritura contiene la totalidad del contrato y el convenio entre las Partes en relación con las materias cubiertas por la misma y reemplaza todas las declaraciones, acuerdos, afirmaciones y convenios entre las Partes que se relacionan con esos asuntos, ya sea verbal o por escrito.

11. **Duplicados**: Esta Escritura se podrá legalizar en duplicados, todos los cuales, se considerarán un único instrumento. Las Partes reconocen que esta Escritura se puede legalizar sobre la base de un intercambio de copias electrónicas y confirma que la legalización respectiva de la presente escritura, mediante dichos medios será una legalización válida y suficiente.

12. **Ley aplicable**: La formación, validez, interpretación y realización de esta Escritura se regirán e interpretarán de conformidad con las leyes de Nueva Zelanda, las partes acuerdan de forma irrevocable que los tribunales de Nueva Zelanda tendrán jurisdicción no exclusiva para conocer de todas las diferencias en virtud o en relación con esta Escritura. Las partes renuncian irrevocablemente a cualquier objeción a Nueva Zelanda como el principal foro para los procesos sobre la base de foro no conveniente o cualquier base similar.

EN FE DE LO CUAL, las partes han legalizado este instrumento como una Escritura en la última fecha indicada adelante:

Firmado por Lawrence Irwin Glass

(1) _____ _____

Firma Fecha

En presencia de:

(1) Firma de Testigo: _____ _____

Fecha

(1) Nombre (En letra imprenta):_____

(1) Ocupación: _____

(1) Dirección: _____

Firmado por Michael John Bickerdike

_____ _____

Firma Fecha

En presencia de:

Firma de Testigo: _____ _____

Fecha

Nombre (En letra imprenta): _____

Ocupación: _____

Dirección: _____

Firmado por Michael Frederick Snape

(aparece firma ilegible) Mayo 23, 2013

Firma Fecha

En presencia de:

Firma de Testigo: (aparece firma) Mayo 23, 2013

Fecha

Nombre (En letra imprenta): Rose Snape

Ocupación: Trabajadora Social

Dirección: Throwsters Wonersh Surrey GU5 0PF RU

Firmado a nombre de Neuren Pharmaceuticals Limited por:

_____ _____

Firma de Director Fecha

_____

Nombre de Director

En presencia de:

Firma de Testigo _____ _____

Fecha

Nombre (En letra imprenta): _____

Ocupación: _____

Dirección: _____

ESCRITURA DE CESIÓN

PARTES:

(1) **Lawrence Irwin Glass**, también conocido como Larry Glass, con domicilio en 7410 Piney Branch Road, Takoma Park, Maryland 20912, Estados Unidos ("**Primer Inventor**");
(2) **Michael John Bickerdike**, con domicilio en 41 Waimarie Street, St. Heliers, Auckland, Nueva Zelanda ("**Segundo Inventor**"); y
(3) **Michael Frederick Snape**, con domicilio en Throwsters, Wonersh, Surrey GUS OPF, G.B. ("**Tercer Inventor**");

Juntos denominados como "**Inventores**" y;

(4) **Neuren Pharmaceuticals Limited**, una sociedad de Nueva Zelanda, con domicilio comercial en Levell, S9 Wellington Street, Freemans Bay, Auckland, Nueva Zelanda ("**Cesionario**");

Cada uno denominado como una "**Parte**" y colectivamente como las "**Partes**".

PACTAN

CONSIDERANDO QUE, los inventores han creado ciertas invenciones y han presentado las siguientes solicitudes ("**las Solicitudes de Patente**") que describen las invenciones:

(a) Título:	**Tratamiento de Trastornos de Espectro de Autismo que Utilizan Ácido Glicil-L-2-MetilProlil-L-Glutámico**
Solicitud No.:	**PCT/US2011/000047**
Publicación Internacional No.:	**WO2012/102832**
Fecha de Presentación:	**Enero 27 de 2012**

Ref. No.: **1018WO3**

(b) Título: **Tratamiento de Trastornos de Espectro de Autismo que Utilizan Ácido Glicil-L-2-MetilProlil-L-Glutámico**

Solicitud No.: **No. 13/699,087**

Fecha de Presentación: **Noviembre 20 de 2012**

Ref. No.: **1018US16**

CONSIDERANDO QUE el Cesionario desea adquirir el derecho, título y participación completos en y para: (a) las Solicitudes de Patente y (b) las invenciones descritas en ellas, junto con todas las realizaciones de las invenciones, y cualesquiera mejoras en, modificaciones de o adiciones a las invenciones, concebidas, hechas o descubiertas en forma conjunta o solidariamente por los Inventores, mientras estaba empleado por el Cesionario o en virtud de una comisión por dinero o cualquier otro valor del Cesionario (denominadas colectivamente como "**las Invenciones**"), y (c) cualesquiera y todas las patentes, certificados de invención, otras concesiones gubernamentales y otras formas de protección que puedan existir o que surjan en relación con las Invenciones en cualquier país del mundo (denominadas colectivamente como "**las Patentes**").

CONSIDERANDO QUE el Cesionario ha solicitado que los Inventores legalicen esta Escritura de Cesión.

CONSIDERANDO QUE el Primero y Segundo Inventor son los empleados del Cesionario y han realizado las invenciones en el curso de su empleo.

CONSIDERANDO QUE el tercer Inventor es un contratista para el Cesionario y que dicho inventor ha realizado las invenciones en la prestación de servicios para el Cesionario, en virtud de una comisión por dinero o cualquier otro valor.

EN VIRTUD DE LO ANTERIOR, a título oneroso, cuyo recibo del cesionario se reconoce en su totalidad por cada uno de los inventores:

1. Cada uno de los inventores por la presente presentes vende, cede, transfiere y transmite al Cesionario, el derecho, título y participación completos:

(a) en y para las Invenciones;
(b) en y para las Solicitudes de Patente junto con cualquier patente futura (s) concedida a las Solicitudes de Patente;
(c) solicitar patentes en alguno o todos los países del mundo;
(d) en y para cualquiera y todas las solicitudes de Patentes presentadas en cualquier parte del mundo, que incluye, sin limitación, el derecho, título y participación completos en todos y cada solicitud divisional, de continuación, continuación en parte, de protección complementaria o solicitud adicional presentada o cualquier solicitud de Patente presentada en virtud de cualquier convenio internacional, tratado, acuerdo o pacto;
(e) en y para cualesquiera y todas las Patentes futuras otorgadas en las solicitudes mencionadas en el párrafo (d) anterior;
(f) en y para todas y cada nueva publicación o ampliación de todas y cualquiera de las patentes relacionadas en los párrafos (b) y (e) anteriores, y
(g) en y para todas y cada una de las solicitudes de patente que resulten de un certificado de re-examen para todas y cualquiera de las patentes relacionadas en los párrafos (b) y (e) anteriores.

2. La cesión efectuada en la Cláusula 1 anterior incluye, sin limitación, la cesión del derecho a demandar por daños y perjuicios y de cualquier recurso legal y equitativo con respecto a todas las causas de acción que surjan antes, en o después de la fecha de la presente Escritura, en

relación con cualquier derecho, títulos y participación transferido en la presente Escritura.

3. Cada Inventor por medio de la presente pacta y se compromete a colaborar con el Cesionario para permitir al Cesionario disfrutar al máximo los derechos, títulos y participación transferidos en la presente Escritura. Dicha cooperación de los inventores incluirá la realización pronta de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, legalizando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones y demás documentos y otro tipo de asistencia, todos en la medida que se consideren necesarios o convenientes por el Cesionario:

(a) perfeccionar para el Cesionario el derecho, título y participación transferidos en la presente Escritura;
(b) cumplir con cualquier obligación de divulgación;
(c) procesar las Solicitudes de Patentes;
(d) presentar y procesar las solicitudes de Patentes, que incluyen, sin limitación, cualquier solicitud divisional, de continuación, continuación en parte, protección complementaria o solicitud adicional o cualquier solicitud de patente presentada en virtud de cualquier convenio internacional, tratado, acuerdo o pacto;
(e) presentar y tramitar solicitudes de nuevas publicaciones de cualquiera de las patentes;
(f) para interferencia u otros procesos prioritarios que impliquen a los Inventores; o
(g) los procesos legales que involucran las Invenciones y cualquier solicitud de patente para el mismo y cualesquier patentes concedidas al respecto, que incluyen, sin limitación, procesos de oposición, procesos de cancelación, oposiciones prioritarias, procesos de uso público, procesos de nuevo examen, procesos de concesión de licencias obligatorias, acciones por infracciones y acciones judiciales;

Siempre que, sin embargo, los gastos incurridos por dichos Inventores en la prestación de dicha cooperación sean pagados por el cesionario.

4. Cada uno de los inventores por la presente designa irrevocablemente al Cesionario como su abogado con plenos poderes para actuar a su nombre y por su cuenta en el cumplimiento de cualquiera de las obligaciones establecidas en la Cláusula 3 si:

(a) el inventor no cumple con alguno de los actos previstos en la Cláusula 3, después de haber sido requerido para ello por el Cesionario, o

(b) si el Cesionario no puede, previa investigación razonable y adecuada, localizar al Inventor para solicitar el cumplimiento de sus obligaciones en virtud de la Cláusula 3.

5. Los inventores están de acuerdo en tratar como confidencial toda la información que se relaciona con las Invenciones, y no utilizarán, divulgarán o publicarán la misma sin el consentimiento expreso y por escrito del Cesionario. Tal obligación no se extiende a la información que ya se está en o que ya se hace de dominio público sin culpa de los Inventores, los Inventores acuerdan solicitar autorización previa al Cesionario en cualquier cado de Incertidumbre.

6. Los términos y cláusulas del presente Contrato de Cesión se aplicarán en beneficio del Cesionario, sus sucesores, cesionarios y demás representantes legales, y serán vinculantes para los Inventores, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

7. Los Inventores por la presente conjunta y solidariamente garantizan y declaran que no han celebrado ni celebrarán ninguna cesión, contrato o convenio que entre en conflicto con ésta.

8. Los Inventores reconocen que:

(a) el Cesionario ha recomendado que cada uno de ellos busque asesoría jurídica independiente con respecto a si procede o no celebrar esta Escritura de Cesión;

(b) tuvieron la oportunidad de hacerlo, antes de la firma de la presente Escritura, y

(c) si optan por no buscar asesoría legal, entienden y reconocen que tienen la responsabilidad de su decisión.

9. **Renuncia**: Ninguna falla o retraso de cualquiera de las Partes en el ejercicio de cualquier derecho, poder o privilegio en virtud de esta Escritura operará como una renuncia a tal derecho, poder o privilegio, ni ningún ejercicio individual o parcial excluirá cualquier otro ejercicio adicional de algún derecho, poder o privilegio en virtud de esta Escritura.

10. **Acuerdo Integral**: Esta Escritura contiene la totalidad del contrato y el convenio entre las Partes en relación con las materias cubiertas por la misma y reemplaza todas las declaraciones, acuerdos, afirmaciones y convenios entre las Partes que se relacionan con esos asuntos, ya sea verbal o por escrito.

11. **Duplicados**: Esta Escritura se podrá legalizar en duplicados, todos los cuales, se considerarán un único instrumento. Las Partes reconocen que esta Escritura se puede legalizar sobre la base de un intercambio de copias electrónicas y confirma que la legalización respectiva de la presente escritura, mediante dichos medios será una legalización válida y suficiente.

12. **Ley aplicable**: La formación, validez, interpretación y realización de esta Escritura se regirán e interpretarán de conformidad con las leyes de Nueva Zelanda, las partes acuerdan de forma irrevocable que los tribunales de Nueva Zelanda tendrán jurisdicción no exclusiva para conocer de todas las diferencias en virtud o en relación con esta Escritura. Las partes renuncian irrevocablemente a cualquier objeción a Nueva Zelanda como el principal foro para los procesos sobre la base de foro no conveniente o cualquier base similar.

EN FE DE LO CUAL, las partes han legalizado este instrumento como una Escritura en la última fecha indicada adelante:

Firmado por Lawrence Irwin Glass

(1) (aparece firma ilegible) Mayo 16, 2013

Firma Fecha

En presencia de:

(1) Firma de Testigo: (aparece firma) Mayo 16, 2013

Fecha

(1) Nombre (En letra imprenta): Charla T. Glass

(1) Ocupación: Trabajadora Social Clínica Licenciada

(1) Dirección: 7410 Piney Br. Rd., Takoma Park, MD. 20912

Firmado por Michael John Bickerdike

_____ _____

Firma Fecha

En presencia de:

Firma de Testigo: _____ _____

Fecha

Nombre (En letra imprenta): _____

Ocupación: _____

Dirección: _____

Firmado por Michael Frederick Snape

_____ _____

Firma Fecha

En presencia de:

Firma de Testigo: _____ _____

Fecha

Nombre (En letra imprenta): _____

Ocupación: _____

Dirección: _____

Firmado a nombre de Neuren Pharmaceuticals Limited por:

(aparece firma ilegible) Mayo 16, 2013

Firma de Director Fecha

Larry Glass

Nombre de Director

En presencia de:

Firma de Testigo (aparece firma ilegible) Mayo 16, 2013

Fecha

Nombre (En letra imprenta): Charla T. Glass

Ocupación: Trabajadora Social Clínica Licenciada

Dirección: 7410 Piney Br. Rd., Takoma Park, MD. 20912

ESCRITURA DE CESIÓN

PARTES:

(1) **Lawrence Irwin Glass**, también conocido como Larry Glass, con domicilio en 7410 Piney Branch Road, Takoma Park, Maryland 20912, Estados Unidos ("**Primer Inventor**");
(2) **Michael John Bickerdike**, con domicilio en 41 Waimarie Street, St. Heliers, Auckland, Nueva Zelanda ("**Segundo Inventor**"); y
(3) **Michael Frederick Snape**, con domicilio en Throwsters, Wonersh, Surrey GUS OPF, G.B. ("**Tercer Inventor**");

Juntos denominados como "**Inventores**" y;

(4) **Neuren Pharmaceuticals Limited**, una sociedad de Nueva Zelanda, con domicilio comercial en Levell, S9 Wellington Street, Freemans Bay, Auckland, Nueva Zelanda ("**Cesionario**");

Cada uno denominado como una "**Parte**" y colectivamente como las "**Partes**".

PACTAN

CONSIDERANDO QUE, los inventores han creado ciertas invenciones y han presentado las siguientes solicitudes ("**las Solicitudes de Patente**") que describen las invenciones:

(a) Título:	**Tratamiento de Trastornos de Espectro de Autismo que Utilizan Ácido Glicil-L-2-MetilProlil-L-Glutámico**
Solicitud No.:	**PCT/US2011/000047**
Publicación Internacional No.:	**WO2012/102832**
Fecha de Presentación:	**Enero 27 de 2012**

Ref. No.: **1018WO3**

(b) Título: **Tratamiento de Trastornos de Espectro de Autismo que Utilizan Ácido Glicil-L-2-MetilProlil-L-Glutámico**

Solicitud No.: **No. 13/699,087**

Fecha de Presentación: **Noviembre 20 de 2012**

Ref. No.: **1018US16**

CONSIDERANDO QUE el Cesionario desea adquirir el derecho, título y participación completos en y para: (a) las Solicitudes de Patente y (b) las invenciones descritas en ellas, junto con todas las realizaciones de las invenciones, y cualesquiera mejoras en, modificaciones de o adiciones a las invenciones, concebidas, hechas o descubiertas en forma conjunta o solidariamente por los Inventores, mientras estaba empleado por el Cesionario o en virtud de una comisión por dinero o cualquier otro valor del Cesionario (denominadas colectivamente como "**las Invenciones**"), y (c) cualesquiera y todas las patentes, certificados de invención, otras concesiones gubernamentales y otras formas de protección que puedan existir o que surjan en relación con las Invenciones en cualquier país del mundo (denominadas colectivamente como "**las Patentes**").

CONSIDERANDO QUE el Cesionario ha solicitado que los Inventores legalicen esta Escritura de Cesión.

CONSIDERANDO QUE el Primero y Segundo Inventor son los empleados del Cesionario y han realizado las invenciones en el curso de su empleo.

CONSIDERANDO QUE el tercer Inventor es un contratista para el Cesionario y que dicho inventor ha realizado las invenciones en la prestación de servicios para el Cesionario, en virtud de una comisión por dinero o cualquier otro valor.

EN VIRTUD DE LO ANTERIOR, a título oneroso, cuyo recibo del cesionario se reconoce en su totalidad por cada uno de los inventores:

1. Cada uno de los inventores por la presente presentes vende, cede, transfiere y transmite al Cesionario, el derecho, título y participación completos:

(a) en y para las Invenciones;
(b) en y para las Solicitudes de Patente junto con cualquier patente futura (s) concedida a las Solicitudes de Patente;
(c) solicitar patentes en alguno o todos los países del mundo;
(d) en y para cualquiera y todas las solicitudes de Patentes presentadas en cualquier parte del mundo, que incluye, sin limitación, el derecho, título y participación completos en todos y cada solicitud divisional, de continuación, continuación en parte, de protección complementaria o solicitud adicional presentada o cualquier solicitud de Patente presentada en virtud de cualquier convenio internacional, tratado, acuerdo o pacto;
(e) en y para cualesquiera y todas las Patentes futuras otorgadas en las solicitudes mencionadas en el párrafo (d) anterior;
(f) en y para todas y cada nueva publicación o ampliación de todas y cualquiera de las patentes relacionadas en los párrafos (b) y (e) anteriores, y
(g) en y para todas y cada una de las solicitudes de patente que resulten de un certificado de re-examen para todas y cualquiera de las patentes relacionadas en los párrafos (b) y (e) anteriores.

2. La cesión efectuada en la Cláusula 1 anterior incluye, sin limitación, la cesión del derecho a demandar por daños y perjuicios y de cualquier recurso legal y equitativo con respecto a todas las causas de acción que surjan antes, en o después de la fecha de la presente Escritura, en

relación con cualquier derecho, títulos y participación transferido en la presente Escritura.

3. Cada Inventor por medio de la presente pacta y se compromete a colaborar con el Cesionario para permitir al Cesionario disfrutar al máximo los derechos, títulos y participación transferidos en la presente Escritura. Dicha cooperación de los inventores incluirá la realización pronta de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, legalizando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones y demás documentos y otro tipo de asistencia, todos en la medida que se consideren necesarios o convenientes por el Cesionario:

(a) perfeccionar para el Cesionario el derecho, título y participación transferidos en la presente Escritura;
(b) cumplir con cualquier obligación de divulgación;
(c) procesar las Solicitudes de Patentes;
(d) presentar y procesar las solicitudes de Patentes, que incluyen, sin limitación, cualquier solicitud divisional, de continuación, continuación en parte, protección complementaria o solicitud adicional o cualquier solicitud de patente presentada en virtud de cualquier convenio internacional, tratado, acuerdo o pacto;
(e) presentar y tramitar solicitudes de nuevas publicaciones de cualquiera de las patentes;
(f) para interferencia u otros procesos prioritarios que impliquen a los Inventores; o
(g) los procesos legales que involucran las Invenciones y cualquier solicitud de patente para el mismo y cualesquier patentes concedidas al respecto, que incluyen, sin limitación, procesos de oposición, procesos de cancelación, oposiciones prioritarias, procesos de uso público, procesos de nuevo examen, procesos de concesión de licencias obligatorias, acciones por infracciones y acciones judiciales;

Siempre que, sin embargo, los gastos incurridos por dichos Inventores en la prestación de dicha cooperación sean pagados por el cesionario.

4. Cada uno de los inventores por la presente designa irrevocablemente al Cesionario como su abogado con plenos poderes para actuar a su nombre y por su cuenta en el cumplimiento de cualquiera de las obligaciones establecidas en la Cláusula 3 si:

   (a) el inventor no cumple con alguno de los actos previstos en la Cláusula 3, después de haber sido requerido para ello por el Cesionario, o

   (b) si el Cesionario no puede, previa investigación razonable y adecuada, localizar al Inventor para solicitar el cumplimiento de sus obligaciones en virtud de la Cláusula 3.

5. Los inventores están de acuerdo en tratar como confidencial toda la información que se relaciona con las Invenciones, y no utilizarán, divulgarán o publicarán la misma sin el consentimiento expreso y por escrito del Cesionario. Tal obligación no se extiende a la información que ya se está en o que ya se hace de dominio público sin culpa de los Inventores, los Inventores acuerdan solicitar autorización previa al Cesionario en cualquier cado de Incertidumbre.

6. Los términos y cláusulas del presente Contrato de Cesión se aplicarán en beneficio del Cesionario, sus sucesores, cesionarios y demás representantes legales, y serán vinculantes para los Inventores, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

7. Los Inventores por la presente conjunta y solidariamente garantizan y declaran que no han celebrado ni celebrarán ninguna cesión, contrato o convenio que entre en conflicto con ésta.

8. Los Inventores reconocen que:
   (a) el Cesionario ha recomendado que cada uno de ellos busque asesoría jurídica independiente con respecto a si procede o no celebrar esta Escritura de Cesión;
   (b) tuvieron la oportunidad de hacerlo, antes de la firma de la presente Escritura, y
   (c) si optan por no buscar asesoría legal, entienden y reconocen que tienen la responsabilidad de su decisión.

9. **Renuncia**: Ninguna falla o retraso de cualquiera de las Partes en el ejercicio de cualquier derecho, poder o privilegio en virtud de esta Escritura operará como una renuncia a tal derecho, poder o privilegio, ni ningún ejercicio individual o parcial excluirá cualquier otro ejercicio adicional de algún derecho, poder o privilegio en virtud de esta Escritura.

10. **Acuerdo Integral**: Esta Escritura contiene la totalidad del contrato y el convenio entre las Partes en relación con las materias cubiertas por la misma y reemplaza todas las declaraciones, acuerdos, afirmaciones y convenios entre las Partes que se relacionan con esos asuntos, ya sea verbal o por escrito.

11. **Duplicados**: Esta Escritura se podrá legalizar en duplicados, todos los cuales, se considerarán un único instrumento. Las Partes reconocen que esta Escritura se puede legalizar sobre la base de un intercambio de copias electrónicas y confirma que la legalización respectiva de la presente escritura, mediante dichos medios será una legalización válida y suficiente.

12. **Ley aplicable**: La formación, validez, interpretación y realización de esta Escritura se regirán e interpretarán de conformidad con las leyes de Nueva Zelanda, las partes acuerdan de forma irrevocable que los tribunales de Nueva Zelanda tendrán jurisdicción no exclusiva para conocer de todas las diferencias en virtud o en relación con esta Escritura. Las partes renuncian irrevocablemente a cualquier objeción a Nueva Zelanda como el principal foro para los procesos sobre la base de foro no conveniente o cualquier base similar.

EN FE DE LO CUAL, las partes han legalizado este instrumento como una Escritura en la última fecha indicada adelante:

Firmado por Lawrence Irwin Glass

(1) _____ _____

Firma Fecha

En presencia de:

(1) Firma de Testigo: _____ _____

Fecha

(1) Nombre (En letra imprenta):_____

(1) Ocupación: _____

(1) Dirección: _____

Firmado por Michael John Bickerdike

(aparece firma ilegible) 16/5/13

Firma Fecha

En presencia de:

Firma de Testigo: (aparece firma ilegible) 16/5/2013

Fecha

Nombre (En letra imprenta): PAULINA LUCZYNSKA

Ocupación: GERENTE DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Dirección: 11A Ward Cres, Te Atatu Peninsula, Auckland

Firmado por Michael Frederick Snape

_____ _____

Firma Fecha

En presencia de:

Firma de Testigo: _____ _____

Fecha

Nombre (En letra imprenta): _____

Ocupación: _____

Dirección: _____

Firmado a nombre de Neuren Pharmaceuticals Limited por:

_____ _____

Firma de Director Fecha

_____

Nombre de Director

En presencia de:

Firma de Testigo _____ _____

Fecha

Nombre (En letra imprenta): _____

Ocupación: _____

Dirección: _____

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

EXTRACTO PARA PUBLICACION

[ ] **Patente de Invención** [ ] **Patente modelo de utilidad** [X] **PCT**

(21) No De solicitud	(51) int. Cl:
(22) Fecha de solicitud	(71) Solicitante (s) NEUREN PHARMACEUTICALS LIMITED
(30) Prioridad (31) No Prioridad 61/462,141 – 61/492,248 (32) Fecha 27.01.2011 – 01.06.2011 (33) País US - US	(72) Inventor (es) Larry Glass; Michael John Bickerdike; Michael Frederick Snape (74) Apoderado (s) LUZ HELENA ADARVE

(54) Título **TRATAMIENTO DE TRANSTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA QUE UTILIZA ÁCIDO GLICIL-L-2-METILPROPIL-L- GLUTÁMICO**

Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT

(85) Fecha límite de inicio Fase Nacional 27.08.2013	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud 27.01.2012 **No de Solicitud PCT PCT/US2012/000047**	(87) Publicación internacional Fecha 02.08.2012 **No Publicación WO 2011/02832 A1**

Resumen reivindicación (es):

Esta invención proporciona compuestos, composiciones y métodos PARA tratar Trastornos del Espectro Autista (ASD) utilizando ácido glicil-2-metilprolil-glutámico (G-2-MePE) y análogos de los mismos. Los Trastornos del Espectro Autista incluyen autismo, Trastorno Autista, Síndrome de Asperger, Trastorno Desintegrativo de la Infancia, Trastorno del Desarrollo Generalizado no Específico (PDD-NOS), Síndrome del Cromosoma X Frágil, y Síndrome de Rett. Las composiciones que contienen el compuesto incluyen formulaciones solubles en agua, micro-emulsiones agua en aceite, emulsiones gruesas agua en aceite, cristales líquidos agua en aceite, nanocápsulas, comprimidos, y geles administrados oralmente. El compuesto y composiciones de esta invención se pueden administrar intravenosamente, intraventricularmente, parenteralmente, u oralmente, y pueden ser efectivos en tratar la neurodegeneración, promover la función neurológica, tratar actividad de convulsión y otros síntomas de ASD, y puede prolongar la vida en animales que incluyen seres humanos que tienen Trastornos del Espectro Autista.

44

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA DE ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION		PCT	X	MODELO DE UTILIDAD		DISEÑO INDUSTRIAL	

(21) No de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional:

(71)Solicitante(s) **NEUREN PHARMACEUTICALS LIMITED**

(72) Inventor(es) Larry Glass; Michael John Bickerdike; Michael Frederick Snape

(74) Apoderado: LUZ HELENA ADARVE GOMEZ

(30) Prioridad	(31) No Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	61/462,141	27.01.2011	US
	61/492,248	01.06.2011	US

(85) Fecha inicio fase nacional: 27.08.2013

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha de presentación de la solicitud: 27.01.2012

No de solicitud: PCT/US2012/000047

(54) Título **TRATAMIENTO DE TRANSTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA QUE UTILIZA ÁCIDO GLICIL-L-2-METILPROPIL-L-GLUTÁMICO**

45

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA DE ARCHIVO TEMÁTICO

PATENTE DE INVENCION		PCT	X	MODELO DE UTILIDAD		DISEÑO INDUSTRIAL	

(21) No de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(71) Solicitante(s) **NEUREN PHARMACEUTICALS LIMITED**

(72) Inventor (es) Larry Glass; Michael John Bickerdike; Michael Frederick Snape

(74) Apoderado: LUZ HELENA ADARVE GOMEZ

(30) Prioridad	(31) No Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	61/462,141	27.01.2011	US
	61/492,248	01.06.2011	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 27.08.2013	(87) Publicación internacional:
(86) Datos relativos a la presentación de la solic. PCT	Fecha:02.08.2012
Fecha de presentación de la solicitud: 27.01.2012	No Publicación: WO 2012/102832 A1
No de Solicitud PCT/US2012/000047	

(54) Título: TRATAMIENTO DE TRANSTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA QUE UTILIZA ÁCIDO GLICIL-L-2-METILPROPIL-L-GLUTÁMICO

(57) Resumen:

Esta invención proporciona compuestos, composiciones y métodos PARA tratar Trastornos del Espectro Autista (ASD) utilizando ácido glicil-2-metilprolil-glutámico (G-2-MePE) y análogos de los mismos. Los Trastornos del Espectro Autista incluyen autismo, Trastorno Autista, Síndrome de Asperger, Trastorno Desintegrativo de la Infancia, Trastorno del Desarrollo Generalizado no Específico (PDD-NOS), Síndrome del Cromosoma X Frágil, y Síndrome de Rett. Las composiciones que contienen el compuesto incluyen formulaciones solubles en agua, micro-emulsiones agua en aceite, emulsiones gruesas agua en aceite, cristales líquidos agua en aceite, nanocápsulas, comprimidos, y geles administrados oralmente. El compuesto y composiciones de esta invención se pueden administrar intravenosamente, intraventricularmente, parenteralmente, u oralmente, y pueden ser efectivos en tratar la neurodegeneración, promover la función neurológica, tratar actividad de convulsión y otros síntomas de ASD, y puede prolongar la vida en animales que incluyen seres humanos que tienen Trastornos del Espectro Autista.

46

TRATAMIENTO DE TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA QUE UTILIZA ÁCIDO GLICIL-L-2-METILPROLIL-L-GLUTÁMICO

Reivindicación de la Prioridad

Esta solicitud reivindica la prioridad para la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No. 61/462,141 titulada "Terapia del Síndrome de Rett que Utiliza Glicil-2-Metilprolil-L-Glutamato", Larry Glass y otros inventores, presentada el 27 de enero de 2011, y para la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No. 61/492,248 titulada "Tratamiento de Trastornos del Espectro Autista que Utiliza Glicil-2-L-Metilprolil-L-Glutamato", Michael John Bickerdike y otros inventores, presentada el 1 de junio, 2011. Ambas solicitudes se incorporan aquí completamente como si de forma separada de esta manera se incorporan.

Campo de la Invención

Esta invención se relaciona generalmente con la terapia de Trastornos del Espectro Autista (ASD), que incluyen autismo, Síndrome del Cromosoma X Frágil, Síndrome de Rett (RTT), Trastorno Autista, Síndrome de Asperger, Trastorno Desintegrativo de la Infancia y Trastorno Generalizado de Desarrollo No Especificado (PDD-NOS), y Evitación Patológica de la Demanda (PDA). En particular, esta invención se relaciona con tratamiento de ASD que utiliza Glicil-2-metil-Prolil-Glutamato (G-2-MePE).

ANTECEDENTES

Descripción de la Técnica Relacionada

Los Trastornos del Espectro Autista son cada vez más diagnosticados. Los Trastornos del Espectro Autista (ASD) son una colección de trastornos relacionados con el desarrollo, caracterizados por anormalidades en la interacción social y la comunicación, intereses restringidos y comportamientos repetitivos. La clasificación actual del ASD reconoce cinco formas distintas: autismo clásico o el trastorno autista, síndrome de Asperger, síndrome de Rett, trastorno desintegrativo de la infancia y Trastorno Generalizado de Desarrollo No Especificado (PDD-NOS). Un sexto síndrome, evitación patológica de la demanda (PDA), es un trastorno generalizado del desarrollo adicional.

El documento EP 0 366 638 describe un GPE (un tri-péptido que consiste de los aminoácidos Gly-Pro-Glu) y sus derivados di-péptidos Gly-Pro y Pro-Glu. El documento EP 0 366 638 describe que es efectivo como un neuromodulator y es capaz de afectar las propiedades eléctricas de las neuronas.

El documento WO95/172904 describe que el GPE tiene propiedades neuroprotectoras y que la administración de GPE puede reducir el daño al sistema nervioso central (SNC) mediante la prevención o inhibición de la muerte neuronal y célula glial.

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

El documento WO 99/65509 describe que aumentar la cantidad efectiva de GPE en el SNC, tal como mediante administración de GPE, puede aumentar la cantidad efectiva de tirosina hidroxilasa (TH) en el SNC para aumentar la producción de dopamina mediada por TH en el tratamiento de enfermedades tales como enfermedad de Parkinson.

El documento WO 02/16408 describe ciertos análogos de GPE que tienen sustituciones de aminoácidos y el efecto fisiológico equivalente a s GPE dentro de un paciente. Las aplicaciones de los análogos de GPE incluyen el tratamiento de lesión cerebral aguda y enfermedades neurodegenerativas, que incluyen lesión o enfermedad en el SNC.

RESUMEN

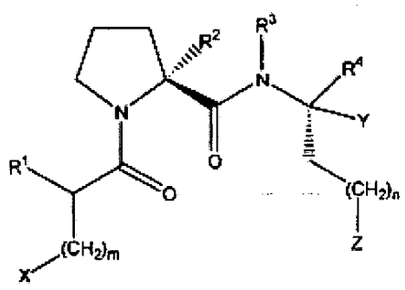
No hay ningún tratamiento actual, efectivo, para el ASD y el cuidado del paciente se limita al manejo de los síntomas.

Esta invención se relaciona con análogos sintéticos y peptidomiméticos de ácido glicil-L-prolil-L- glutámico (GPÈ). En particular, esta invención se relaciona con análogos de GPE y peptidmiméticos que son anti-apoptóticos y anti-necróticos, con métodos para elaborarlos, con composiciones farmacéuticas que los contienen, y con su uso para mejorar la función cognitiva y/o para tratar trastornos de memoria y para mejorar la conectividad neuronal en animales. Más específicamente, esta solicitud se relaciona con métodos de

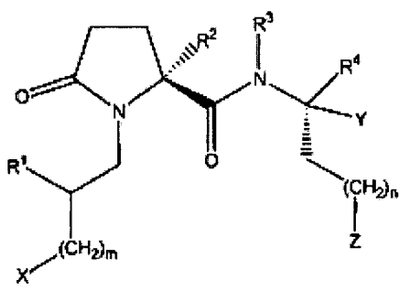
uso del análogo de GPE, ácido G-2Metil-Prolil-Glutámico (G-2-MePE) en el tratamiento de ASD.

La Patente Estadounidense No. 7,041,314 describe composiciones de materia y métodos de uso de G- 2-MePE

En un aspecto, esta invención proporciona compuestos de la Fórmula 1 y Fórmula 2:



Fórmula I



Fórmula II

donde m es 0 o 1;

n es 0 o 1;

X es H o $-NR^6R^7$;

Y es H, alquilo, $-CO_2R^5$, o - $CONR^6R^7$;

Z es H, alquilo, $-CO_2R^5$ o - $CONR^6R^7$;

R^1 es H, alquilo, o aralquilo;

R^2, R^3, y R^4 son independientemente H o alquilo;

cada R^5 es independientemente H, alquilo, o un resido de alcohol graso;

cada R^6 y R^7 es independientemente H, alquilo, o aralquilo, o $-NR^6R^7$ es pirrolidino, piperidino, o morfolino;

o una lactona formada cuando un compuesto donde Y es - CO_2(alquil) y Z es $-CO_2H$ o donde Y es $-CO_2H$ y Z es - CO_2(alquil) se lactoniza;

y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, dado que el compuesto no es GPE, N-Me-GPE, GPE amida, APE, GPQ o una sal de los mismos.

Otro aspecto la invención proporciona métodos para el tratamiento de un animal que tiene un Trastorno del Espectro Autista que comprende la administración de una cantidad efectiva de Ácido Glicil-L-2-Metilprolil-L-Glutámico (G-2-MePE) al animal.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Esta invención se describe con referencia a realizaciones específicas de la misma. Otros aspectos y características de esta invención se pueden entender con referencia a las Figuras, en las que:

La Figura 1 es un esquema general para la preparación de análogos sintéticos de GPE de la invención.

Las Figuras 2 y 3 representan esquemas para modificar residuos de glicina en GPE.

Las Figuras 4 a 9 representan esquemas para modificar residuos de ácido glutámico de GPE.

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

Las Figuras 12 - 15 representan gráficas que resumen los resultados de evaluar las neuronas in vitro con GPE o G-2-MePE y ácido ocadaico.

La Figura 12 representa una gráfica que muestra los efectos del GPE sobre neuronas corticales lesionadas con ácido ocadaico.

La Figura 13 representa una gráfica que muestra los efectos del G-2-MePE en neuronas corticales lesionadas con ácido ocadaico.

La Figura 14 representa una gráfica que muestra los efectos del G-2-MePE, GPE en microexplantes cerebelosos lesionados con ácido ocadaico.

La Figura 15 representa una gráfica que muestra los efectos del G-2-MePE o GPE sobre células estriadas lesionadas con ácido ocadaico.

La Figura 16 muestra los efectos de inyección subcutánea de G-2-MePE (en dosis de 0.012, 0.12, 1 .2 y 12 mg/kg) en el número de neuronas positivas a ChAT en el cuerpo estriado de ratas de 18 meses de edad.

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

Las Figuras 18A y 18B muestran los efectos del G-2-MePE sobre memoria de trabajo espacial de ratas de edad avanzada (17-meses de edad) en un laberinto radial de 8 brazos luego de 3-semanas de tratamiento y un lavado de nueve días. La Figura 18A muestra los perfiles de adquisición de laberinto con el paso de los días para los diferentes grupos. La Figura 18B muestra la proporción de selecciones de laberinto corresctas promediadas a través de lo días para los grupos.

La Figura 19A muestra los efectos de una única administración intraperitoneal de 4 dosis de G-2- MePE sobre proliferación de neuroblastos según se evalúa por el número de células positivas a PCNA en las zonas subventriculares (SVZ) de ratas de edad avanzada.

La Figura 19B muestra los efectos de una única administración intraperitoneal de 4 dosis de G-2-MePE sobre co-localización de PCNA y teñido con doblecortina en una rata tratada con la mayor dosis de G-2-MePE (panel derecho) en comparación de la rata tratada con vehículo (panel izquierdo).

La Figura 19C muestra los efectos de G-2-MePE sobre proliferación de neuroblastos según se evalúa por teñido inmunohistoquímico PCNA en ratas de mediana edad.

La Figura 20A muestra un aumento significativo en el número de astrocitos reactivos según se evalúa por teñido con GFAP en el hipocampo en ratas de edad avanzada en comparación de ratas jóvenes (*$p<0.01$) y ratas de mediana edad (*$p<0.01$).

La Figura 20B muestra una fotografía de una sección de la corteza cerebral de una rata vieja, que muestra astrocitos según se evalúa con teñido GFAP, algunos de los cuales se asocian con formación de capilares (flechas).

La Figura 20C muestra los efectos dependientes de dosis de tratamiento con G-2-MePE (en dosis de 0.12, 0.12, 1 .2 y 12 mg/kg/día) sobre la reducción del número de astrocitos según se evalúa utilizando teñido GFAP en la sub-región CA4 del hipocampo en ratas de edad avanzada.

La Figura 20D muestra los efectos dependientes de dosis del tratamiento con G-2-MePE (en dosis de 0.12, 0.12, 1 .2 y 12 mg/kg/día) sobre la reducción del número de astrocitos según se evalúa utilizando teñido GFAP en la corteza cerebral.

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

La Figura 22 muestra los efectos de G-2-MePE sobre la duración de supervivencia aumentada en ratones con deficiencia de MeCP2 en comparación de ratones con deficiencia de MeCP2 tratados con solución salina.

La Figura 23 muestra los efectos de G-2-MePE sobre la potenciación a largo plazo del hipocampo como se mide por la

pendiente fEPSP en ratones deficientes MeCP2, en comparación de ratones deficientes MeCP2 tratados con solución salina.

La Figura 24 representa una gráfica que muestra los efectos del G-2-MePE sobre la longitud de dendrita como una función de la distancia desde el soma celular.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

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

El término "alquilo" significa un grupo hidrocarbilo saturado lineal que tiene de uno o a seis átomos de carbono, o un grupo hidroarbilo saturado ramificado o cíclico que tiene tres a seis átomos de carbono. Grupos alquilo de ejemplo incluyen grupos alquilo de cadena recta y ramificada o cíclicos, metilo, etilo, isopropilo, ciclopropilo, terc-butilo, ciclopropilmetilo, y hexilo.

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

El término "aralquilo" significa un grupo de la fórmula $-(CH_2)_{i-2}Ar$, donde Ar es un anillo aromático carbocíclico o heterocíclico de 5 o 6 miembros, opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados de Cl, Br,-OH,- O- alquilo, $-CO_2R^8$ (donde R^8 es H o alquilo), o - NR^8R^9, donde R^8 es como se describió previamente y R^9 es H o alquilo. Grupos aralquilo de ejemplo incluyen bencilo, 2-clorobencilo, 4-(dimetilamino)bencilo, fenetilo, 1 -pirrolilmetilo, 2-tienilmetilo, y 3-piridilmetilo.

El término "enfermedad" incluye cualquier condición no saludable de un animal que incluye particularmente la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, diabetes, trastornos motrices, convulsiones, disfunciones cognitivas debido al envejecimiento y Trastornos del Espectro Autista que incluyen autismo, Síndrome del Cromosoma X Frágil, Síndrome de Rett (RTT), Trastorno Autista, Síndrome de Asperger, Trastorno Desintegrativo de la Infancia y Trastorno Generalizado de Desarrollo No Especificado (PDD-NOS), y Evitación Patológica de la Demanda (PDA). .

El término "residuo de alcohol graso" es un grupo hidrocarbilo lineal que tiene de siete a veinte átomos de carbono, que contienen opcionalmente hasta tres enlaces de carbono-carbono. Residuos de alcohol graso de ejemplo incluyen decilo, pentadecilo, hexadecilo (cetilo), octadecilo (estearilo), oleilo, linoleilo, y eicosilo.

El término "factor de crecimiento" significa una molécula de señalización de polipéptido extracelular que estimula a una célula a crecer o proliferar.

El término "lesión" incluye cualquier daño agudo de un animal que incluye apoplejía no hemorrágica, lesión cerebral traumática, asfixia perinatal asociada con sufrimiento fetal tal como aquel que sigue al desprendimiento, oclusión de la médula médulal o asociada con retardo del crecimiento intrauterino, asfixia perinatal asociada con falla de resucitación adecuada o respiración, traumatismos graves del SNC asociados con incidentes de ahogamiento, incidentes de muerte en la cuna, inhalación de monóxido de carbono, amoníaco u otra intoxicación gaseosa, paro cardíaco, coma, meningitis, hipoglucemia y estado epiléptico, episodios de asfixia cerebral asociada con la cirugía de bypass coronaria, episodios de hipotensión e crisis de hipertensión, trauma cerebral y lesión tóxica.

"Trastornos de memoria" o "trastornos cognitivos" son trastornos caracterizados por incapacidad permanente o temporal o pérdida de la capacidad de aprender, memorizar y recuperar información. El trastorno de memoria puede resultar del envejecimiento normal, lesión en el cerebro, tumores, enfermedad neurodegenerativa, afecciones vasculares, afecciones genéticas (enfermedad de Huntington), hidrocefalia, otras enfermedades (enfermedad de Pick, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, SIDA, meningitis), sustancias tóxicas, deficiencia nutricional, trastornos bioquímicos, disfunciones psicológicas o psiquiátricas. La presencia de

trastornos de memoria en un ser humano se puede establecer a través del examen de la historia del paciente, examen físico, pruebas de laboratorio, pruebas de formación de imagen y pruebas neuropsicológicas. Las pruebas neuropsicológicas estándar incluyen pero no se limitan a la Prueba de Memoria Visual Breve Revisada (BVMT-R), Batería Automatizada de la Prueba Neuropsicológica de Cambridge (CANTAB), Escala de Memoria en Niños (CMS), Prueba de Memoria Contextual, Prueba de Memoria de Reconocimiento Continuo (CMRT), Prueba de Asociación de Palabra Controlada y Cuestionario de Funcionamiento de Memoria, Escala de Memoria Neuropsicológica Denman, sub-prueba de secuencia de Número Letra y de lapso en Dígitos de la Escala de Inteligencia de adultos III, Evaluación de la Memoria de Objetos de Fuld (FOME), Prueba de Memoria para Diseños de Graham-Kendall, Prueba para Memoria de Guild, Prueba de Aprendizaje Verbal de Hopkins, Batería de Aprendizaje y Memoria (LAMB), Escala de auto-Clasificación Clínica de Evaluación de Memoria (MAC-S), Escalas de Evaluación de Memoria (MAS), Prueba de Memoria Randt, Prueba de Memoria de Reconocimiento (RMT), Prueba de Aprendizaje Auditivo Verbal de Rey (RAVLT), Prueba de Memoria de Comportamiento de Rivermead, versión de Rusell de la Escala de Memoria Wechsler (RWMS), Memoria de Trabajo Espacial, Prueba de Memoria y Aprendizaje (TOMAL), Escala de Memoria de Vermont (VMS), Escala de Memoria de Wechsler, Evaluación de Amplio Rango de Memoria y Aprendizaje (WRAML

El término "excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que es generalmente seguro, no

tóxico y deseable, e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario así como también para uso farmacéutico en humanos. Dichos excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos, o, en el caso de una composición en aerosol, gaseosos.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal que es farmacéuticamente aceptable y tiene las propiedades farmacológicas deseadas. Dichas sales incluyen sales que se pueden formar donde están presentes los protones ácidos en los compuestos que reaccionan con bases orgánicas o inorgánicas. Las sales inorgánicas adecuadas incluyen aquellas formadas con los metales alcalinos, por ejemplo sodio y potasio, magnesio, calcio, y aluminio. Las sales orgánicas adecuadas incluyen aquellas formadas con bases orgánicas tales como aminas por ejemplo etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina, y similares. Las sales también incluyen sales de adición de ácido formadas mediante reacción de un grupo amina o grupos presentes en el compuesto con un ácido. Los ácidos adecuados incluyen ácidos inorgánicos (por ejemplo ácidos clorhídrico y bromhídrico) y ácidos orgánicos (por ejemplo ácido acético, ácido cítrico, ácido maleico, y ácidos alcano- y areno-sulfónico tales como ácido metanosulfónico y ácido bencenosulfónico). Cuando hay dos grupos ácido presentes en un compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable puede ser una mono-sal mono-ácida o una di-sal; y de forma similar donde hay más de dos grupos ácidos presentes, se pueden salificar algunos o todos de dichos grupos. El mismo

razonamiento se puede aplicar cuando están presentes dos o más grupos amina en un compuesto.

El término "grupo protector" es un grupo que bloquea selectivamente uno o más sitios reactivos en un compuesto multifuncional de tal manera que se puede llevar a cabo selectivamente una reacción química en otro sitio reactivo no protegido, y de tal manera que el grupo se puede retirar fácilmente después que se ha completado la reacción selectiva.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" significa la cantidad de un agente que, cuado se administra a un animal para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar tratamiento para esa enfermedad según se mide utilizando un sistema de prueba reconocido en la técnica.

El término "tratar" o "tratamiento" de una enfermedad puede incluir prevenir que ocurra la enfermedad en un animal que puede estar predispuesto a la enfermedad pero todavía no experimenta o exhibe síntomas de la enfermedad (tratamiento profiláctico), inhibir la enfermedad (retardar o detener su desarrollo), proporcionar alivio de los síntomas o efectos secundarios de la enfermedad (que incluye tratamiento paliativo), y mitigar la enfermedad (que provoca regresión de la enfermedad).

El término "déficit funcional" significa un déficit de comportamiento asociado con daño neurológico. Dichos déficits incluyen déficits de marcha, como se observa en pacientes con

enfermedad de Parkinson, anormalidades motoras como se observa en pacientes con enfermedad de Huntington. El déficit funcional también incluye colocación anormal de pies y trastornos de memoria descritos aquí.

Los términos "G-2-MePE" y "NNZ-2566" significan L-Glicil-2-metil-L-Prolil-L-Glutamato.

El término "convulsión" significa un patrón anormal de actividad neuronal en el cerebro que resulta en un déficit motor o carencia de control motor que resulta en movimiento anormal, que incluye movimiento espasmódico. La "convulsión" incluye anormalidades electroencefalográficas acompañadas o no por actividad motora anormal.

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

Trastornos del Espectro Autista

Los trastornos del Espectro Autista (ASD) son una colección de trastornos relacionados con el desarrollo, caracterizados por anormalidades en la interacción social y la comunicación, intereses restringidos y comportamientos repetitivos. La clasificación actual del ASD reconoce cinco formas distintas: autismo clásico o el trastorno autista, síndrome de Asperger, síndrome de Rett, trastorno desintegrativo de la infancia y Trastorno Generalizado de Desarrollo No Especificado (PDD-NOS). Un sexto síndrome,

evitación patológica de la demanda (PDA), es un trastorno generalizado del desarrollo adicional. Sin embargo, aunque cada vez más se reconoce el PDA como un ASD, todavía no es parte del Manual Estadístico y de Diagnóstico de Trastornos Mentales (DSM-IV), publicado por la Asociación de Psiquiatría Americana, aún no hace parte de la revisión propuesta, el DSM-V.

Autismo

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

(i) deficiencias en el uso de comportamientos no verbales múltiples (por ejemplo contacto con los ojos) para regular la interacción social;

(ii) incapacidad para desarrollar relaciones entre pares adecuadas para el nivel de desarrollo;

(iii) carencia de búsqueda espontánea para compartir diversiones, intereses, o logros;

(iv) carencia de reciprocidad social o emocional.

Las deficiencias de comunicación en el autismo se pueden manifestar en una o más de las siguientes formas: retraso en (o carencia total de) el desarrollo del lenguaje hablado; deficiencia marcada en la capacidad de iniciar o mantener una conversación; uso estereotipado y repetitivo del lenguaje, y/o una carencia de juego de fantasía espontáneo. También se requieren patrones de comportamiento restringidos, repetitivos y estereotipados para el diagnóstico, tales como preocupación con uno o más de interés considerados anormales en intensidad, adherencia inflexible a rutinas o rituales, gestos motores repetitivos y/o enfoque persistente en partes de los objetos.

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

El autismo se asocia comúnmente con epilepsia o actividad epileptiforme en el electroencefalograma (EEG). Hasta un 60 por ciento de los pacientes con autismo tienen

una actividad epileptiforme en sus EEG (Spence y Schneider, 2009 *Ped Res* 65: 599-606).

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

Es importante destacar que el autismo comparte características del Síndrome de Rett y el Síndrome del Cromosoma X Frágil en relación con la conectividad neuronal. Todos los tres trastornos se caracterizan por defectos en la función sináptica y la conectividad neuronal. Esto se refleja en los estudios post mortem del cerebro humano en estos grupos de pacientes, todos los cuales muestran la falla para formar conexiones sinápticas normales. Esto se refleja en las características morfológicas alteradas, que son una reducción en la densidad de la médula dendrítica neuronal, o densidad de la médula dendrítica mejorada, pero asociada a las sinapsis inmaduras. Esto se refleja en los modelos animales de autismo, síndrome de Rett y síndrome del Cromosoma X Frágil, que se basan en los cambios genéticos conocidos por ser patológico en estos trastornos. En estos modelos animales, los defectos de conectividad neuronal se revelan morfológicamente, y también como una Falla de la Potenciación

a Largo Plazo (LTP). Esto es importante ya que el IGF-1, IGF-1 [1 -3] y G-2-MEPE aumenta la formación de sinapsis.

Síndrome de Asperger

El Síndrome de Asperger o Trastorno de Asperger es similar al autismo, y comparte ciertas características. Como el autismo, el Síndrome de Asperger también se caracteriza por la deficiencia en la interacción social y esta está acompañada por intereses y comportamiento restringido y repetitivo. Por lo tanto, el diagnóstico de Síndrome de Asperger se caracteriza por la misma triada de deficiencias como el autismo. Sin embargo, difiere de los otros ASD al no tener retraso general en el lenguaje o desarrollo cognitivo y sin déficit en el interés en el ambiente del sujeto. Más aún, el Síndrome de Asperger es normalmente menos severo en la sintomatología que el autismo clásico y los pacientes con Asperger pueden funcionar con auto-suficiencia y llevan vidas relativamente normales.

Trastorno Desintegrativo de la Infancia

Los trastorno desintegrativo de la infancia (CDD), también se conoce como el síndrome de Heller, es una afección en la que el niño se desarrolla normalmente hasta los 2-4 de edad (es decir más tarde que en el autismo y síndrome de Rett), pero luego demuestra una pérdida severa de las capacidades sociales, de comunicación y otras capacidades. El trastorno desintegrativo de la infancia es muy parecido al autismo y ambos involucran el desarrollo normal seguido por la pérdida significativa de lenguaje, juego social y capacidades motoras. Sin embargo, el trastorno desintegrativo

de la infancia normalmente ocurre después que el autismo, involucra una pérdida más dramática de las habilidades y es mucho menos común.

El diagnóstico del CDD es dependiente de la pérdida dramática de las capacidades adquiridas previamente en dos o más de las siguientes áreas: lenguaje, capacidades sociales, juego, capacidades motoras (tales como una disminución dramática en la habilidad para caminar, subir, agarrar, etc.), control de la vejiga o el intestino (a pesar de capacitación previa para ir al baño). La pérdida de las capacidades de desarrollo puede ser abrupta y tener lugar durante el curso de días a semanas o puede ser más gradual.

Trastorno Generalizado de Desarrollo No Especificado

El Trastorno Generalizado de Desarrollo No Especificado (PDD-NOS) es un ASD que describe pacientes que exhiben algunos, pero no todos, de los síntomas asociados con otros ASD bien definidos. El criterio clave para el diagnóstico de un ASD incluye la dificultad de socializar con otros, comportamientos repetitivos, y sensibilidades aumentadas a ciertos estímulos. Todos estos se encuentran en los ASD descritos anteriormente. Sin embargo, el autismo, Síndrome de Asperger, síndrome de Rett y trastorno desintegrativo de la infancia todos tienen otras características que permiten su diagnóstico específico. Cuando no se puede realizar el diagnóstico específico de uno de estos cuatro trastornos, pero es evidente el ASD, se realiza un diagnóstico de PDD-NOS. Dicho un diagnóstico puede resultar de los síntomas que

inician en la más última edad que es aplicable para otras afecciones en el espectro.

Síndrome de Rett

El síndrome de Rett (RTT) es un trastorno del neurodesarrollo que casi siempre exclusivamente afecta a las mujeres (1 en 10:000 nacidas vivas). El RTT se clasifica como un Trastorno del Espectro Autista (Manual Estadístico y de Diagnóstico de Trastornos Mentales, Cuarta Edición - Revisada (DSM-IV-R). Aproximadamente 16,000 pacientes están afectados actualmente por este en los Estados Unidos. (datos del Rett Syndrome Research Trust). Para un diagnóstico del síndrome de Rett, los siguientes síntomas son característicos: desarrollo deterioro desde la edad de 6-18 meses; desaceleración del índice del crecimiento de la cabeza entre los 3 meses y 4 años, lenguaje gravemente deteriorado, movimientos de la mano repetitivos y estereotipados, y anormalidades en el caminado, por ejemplo, caminar de puntillas o caminar inestable con las piernas rígidas. Se presenta, adicionalmente, un número de criterios de apoyo que pueden ayudar en el diagnóstico de síndrome de Rett, pero no son esenciales para el diagnóstico. Estos incluyen dificultades respiratorias, anormalidades en los EEG, convulsiones, rigidez muscular y espasticidad, escoliosis (curvatura de la columna), rechinar los dientes, manos y pies pequeños en relación con la altura, retraso del crecimiento, disminución de la grasa corporal y la masa muscular, patrones anormales del sueño, irritabilidad o agitación, dificultades para la masticación y/o deglución, mala circulación y estreñimiento.

El inicio de RTT por lo general comienza entre los 6-18 meses de edad con una desaceleración de los índices de desarrollo y crecimiento. Esto es seguido por una fase de regresión (normalmente en los niños de 1 a 4 años de edad), fase de pseudo-estacionaria (2 - 10 años de edad) y un estado de deterioro motor tardío progresiva posterior. Los síntomas RTT incluyen desaceleración súbita del crecimiento y regresión en el lenguaje y las habilidades motoras que incluyen movimientos de la mano intencionales que son reemplazados por movimientos estereotipados, características autistas, ataques similares a pánico, alteraciones del ciclo del sueño, temblores, convulsiones, disfunciones respiratorias (apnea episódica, hiperpnea), apraxia, distonía, discinesia, hipotonía, cifosis o escoliosis progresiva y deterioro cognitivo severo. La mayoría de pacientes RTT sobreviven hasta la edad adulta con discapacidades graves y requieren atención las 24 horas del día.

Se reporta que entre el 85% y 95% de los casos de RTT provocados por una mutación del gen *Mecp2* (Amir et al. 1999. *Nat Genet* 23: 185-188; *Rett Syndrome Research Trust*) - un gen que codifica la proteína de unión metil-CpG 2 (MeCP2). El *Mecp2* mapea al cromosoma X (ubicación Xq28) y por esta razón, las mutaciones al gen en los hombres son usualmente letales. Aunque el RTT es un trastorno genético, menos del 1% de los casos registrados son hereditarios; casi todas las de *Mecp2* ocurren *de novo*, con dos terceras partes provocadas por mutaciones en los dinucleótidos 8 CpG (R106, R133, T158,

R168, R255, R270. R294 y R306) ubicados en el tercer y cuarto exones.

El MeCP2 es una proteína que une los dinucleótidos CpG metilados para ejercer silenciamiento transcripcional del ADN en el SNC. El efecto clave de una reducción o ausencia del MeCP2 parece ser una deficiencia del desarrollo de la médula dendrítica y la formación de sinapsis. La expresión de MeCP2 parece correlacionarse temporalmente con la maduración del cerebro, explicando por qué los síntomas normalmente aparecen alrededor de los 18 meses de edad.

Presentación de las características comunes a los ASD

Tomando juntos los trastornos del ASD, está claro que existen puntos en común en la presentación de los síntomas entre todas las 5 formas. Estas características comunes son las deficiencias en las competencias sociales normales y los comportamientos repetitivos. En todos menos en el síndrome de Asperger también hay una presentación consistente del retraso en el desarrollo intelectual más comúnmente manifiesto como una insuficiencia en las capacidades de lenguaje. La pérdida cognitiva relacionada con los parámetros normales para la edad es a menudo bastante marcada en el autismo, síndrome de Rett, CDD y PDD-NOS. La presencia de epilepsia o actividad anormal en el EEG también es común con el autismo, el Síndrome del Cromosoma X Frágil y Síndrome de Rett. La epilepsia se produce en situaciones de conectividad neuronal anormal. La conectividad neuronal deteriorada y función sináptica trastornada es una característica común del

autismo, el Síndrome del Cromosoma X Frágil y Síndrome de Rett y de modelos animales de estas afecciones.

Modelos Genéticos de ASD

Para ofrecer validez, los modelos animales de ADS deben mostrar síntomas similares a las condiciones clínicas y tener un grado razonable de validez evidente con respecto a la etiología de aquellos síntomas. Se sabe que el autismo clásico puede ser provocado por muchas diferentes deficiencias genéticas y no se considera que el defecto genético individual sea responsable de más de un pequeño porcentaje de los casos de autismo. De hecho, estudios recientes han revelado numerosas variaciones estructurales *de novo* de ubicaciones cromosómicas que se consideran la base del ASD, además de defectos genéticos hereditarios raros (Marshall et al, 2008; Sebat et al, 2007). Por lo tanto, la variación de número de copia (CNV), la transubicación y la inversión de secuencias de genes en 20 sitios clave o más, que incluyen 1p, 5q, 7q, 15q, 16p, 17p y Xq, se han mapeado como los loci ASD.

Sin embargo, a pesar del fondo poligenético subyacente de ASD, y la complejidad de la etiología, se sabe que ciertos defectos genéticos pueden producir ASD. Algunos de los mejores defectos caracterizados surgen de aberraciones cromosómicas de genes que codifican un grupo de proteínas de densidad postsináptica, que incluyen neuroligina-3 (NLGN3), neuroligina-4 (NLGN4), neurexin-1α (NRXN1) y shank3 (Sebat et al, 2007). Es importante destacar que estos defectos apuntan a la función sináptica alterada y por lo tanto a la

conectividad neuronal perturbada como una ruta final común en el autismo y los trastornos relacionados (Minshew y Williams 2007 *Arch Neurol* 64:945-950; Gilman et al, 2011 *Neuron* 70:898 -907). Dichos déficits de conectividad se reflejan en hallazgos morfológicos en el examen post mortem, que revela un aumento de densidad de médula dendrítica en el autismo (Hutsler y Zhang *Brain Res.* 2010. 1309:83-94).

El NLGN3 y NLGN4 son moléculas de adhesión celular postsináptica presentes en las sinapsis glutamatérgicas. Cumplen una función en la coordinación del contacto presináptico al sitio postsináptico y también interactúan con los andamios postsinápticos de proteínas shank3. Se han observado mutaciones a NLGN3 y NLGN4 en la población ASD y representan quizás el 1% de todos los casos de ASD (Lintas & Persico, 2008). Jamain y colegas informaron por primera vez un sentido erróneo a NLGN3 y un desplazamiento del marco a NLGN4 en dos sujetos no relacionados, lo que resulta en el Síndrome de Asperger y el autismo clásico, respectivamente (Jamain et al, 2003). Si bien es baja la incidencia de las mutaciones NLGN3 o NLGN4 en la población ASD (de hecho, no se observaron mutaciones en un estudio de 96 pacientes con ASD en un estudio Canadiense; Gauthier et al, 2005), se ha confirmado en estudios preclínicos que las mutaciones de neuroligina pueden de hecho producir el modelo de los síntomas autistas. Por lo tanto, la introducción a los ratones del mismo sentido erróneo R451 C a NLGN3 que se ha informado resulta clínicamente en una cepa mutante de ratón que muestra la interacción social reducida y aumento de la transmisión sináptica inhibitoria (Tabuchi et al, 2007).

El mutante R451 C por lo tanto representa un modelo de ratón para ASD con base en la mutación NLGN3. En este caso, la mutación en la posición R451 del NLGN3 resulta en una mutación 'ganancia de función'.

En contraste, el modelamiento de la mutación clínica de NLGN4 en ratones se logra mediante una mutación de 'pérdida de función' de NLGN4 (un modelo modificado clásico). En este modelo, el ratón mutante exhibe un déficit de interacción social y vocalización ultrasónica reducida (Jamain et al, 2008). Los déficits de comunicación son centrales a los ADS clínicos y en el ratón modificado una reducción en vocalizaciones ultrasónicas de lo ratones machos expuestos a contrapartes hembras tipo natural apoya la validez evidente de la cepa como un modelo de ASD.

Las proteínas de neurexina presinápticas inducen la diferenciación postsináptica en dendritas opuestas a través de interacciones con contrapartes de neuroligina postsináptica. Las mutaciones de la neurexina-1 un gen (NRXN 1) se han reportado en numerosos estudios (Sebat et al, 2007; Marshall et al, 2008; Kim et al, 2008; Yan et al, 2008) y estas se han observado en la forma de variantes de número de copias. Como con las mutaciones NLGN, cuando se introduce una mutación del gen NRXN1 a ratones (en forma de genes modificados), se produce una cepa mutante con ciertas características similares a ASD (Etherton et al, 2009). Estos ratones modificados NRXN1 muestran una disminución de la frecuencia de corriente postsináptica excitadora en miniatura

del hipocampo (mEPSC) y una relación de entrada-salida reducida de las corrientes evocadas. Estos efectos electrofisiológicos se relacionan con la disminución de la transmisión excitadora en el hipocampo. Además de la neurotransmisión excitadora reducida, los ratones modificados NRXN1 exhiben una disminución en la inhibición pre-pulso, aunque no parece ser afectado el comportamiento social (Etherton et al, 2009).

Compartiendo ciertas características con la construcción trans-sináptica de neurexina-NLGN, la molécula de adhesión celular 1 (CADM1) que es una proteína de la familia immunogolbulina presente pre-y post-sinápticamente también está implicada en la actividad de adhesión de células trans-sináptica (Biederer et al, 2002). Las mutaciones en el gen CADM1 se han detectado en pacientes con ADS y parecen representar otra posible causa de estas afecciones (Zhiling et al, 2008).

El análisis de ratones modificados CADM1 revela que estos animales muestran un comportamiento relacionado con la ansiedad aumentado, interacción social deteriorada y memoria social y reconocimiento deteriorado. Además los ratones modificados CADM1 demuestran habilidades motoras pobres (Takayanagi et al, 2010). Estas disfunciones son de nuevo consistentes con la sintomatología de ASD.

El síndrome de supresión de 22q13 (también conocido como Síndrome Phelan-McDermid), es un trastorno genético raro provocado por una microsupresión en el extremo terminal q

13.3 del cromosoma 22. Esta microsupresión es raramente no cubierta por la detección genética típica y se recomienda una prueba de hibridación in situ de fluorescencia para confirmar el diagnóstico. Los trabajos recientes indican que el síndrome es provocado por errores en el gen shank3, una proteína postsináptica de densidad crítica para el funcionamiento neuronal normal. Curiosamente, los errores en este gen también se han asociado con ASD y el síndrome de supresión 22q13 comúnmente puede llevar a un diagnóstico de ASD (Durand et al, 2007; Moessner et al, 2007; Sykes et al, 2009). Dada la estrecha asociación del síndrome de supresión 22q13 y el diagnóstico de ASD consecuentes, se ha desarrollado un modelo de ratón mutante de esta mutación.

El ratón modificado shank3 exhibe varias deficiencias que reflejan los síntomas de ASD, que incluyen vocalizaciones ultrasónicas reducidas (es decir, comunicación social disminuida), así como también problemas de tiempo de interacción social entre los ratones. Adicionalmente, estos ratones tienen transmisión excitadora CA1 de hipocampo deteriorada, medida mediante relación de entrada-salida de las corrientes evocadas y potenciación a largo plazo deteriorada (LTP). Se considera que el LTP que es un proceso fisiológico subyacente a la formación y consolidación de la memoria. Por lo tanto, el modelo exhibe un fenotipo similar a la NLGN4 modificado, consistente con ASD.

Como se ha señalado, el síndrome de supresión 22q13 es muy raro. Sin embargo, proporciona información importante que pueden tener los genes específicos involucrados en la

etiología de los ADS. Además al shank3, este trastorno revela posible defecto genético adicional en ASD. De los 50 o menos casos de síndrome de supresión 22q13 descritos, todos menos uno tienen una supresión de gen que se extiende más allá de shank3 para incluir un gen adicional, conocido como el gen Islet Brain-2 (IB2) (Sebat et al, 2007). La proteína IB2 interactúa con muchas otras proteínas como MAP quinasas y proteína precursora amiloide, parece influir en el tráfico de proteínas en las neuritas, y se enriquece con densidades postsinápticas (Giza et al, 2010). Los ratones que carecen de proteína (IB2-/- ratones modificados) exhiben interacción social deteriorada (inhalación social reducida y tiempo de interacción), exploración reducida y déficits cognitivos y motrices (Giza et al, 2010). Este fenotipo de comportamiento se asocia con la transmisión excitadora reducida en las células del cerebelo. Como con shank3 modificado, el fenotipo de mutación IB2 por lo tanto también es consistente con ASD.

Adicionalmente a los modelos animales de defectos de proteína de densidad postsináptica descritos anteriormente, otros síndromes monogenéticas que comparten varias características con ASD pueden llevar al autismo ofrecen otra vía para la objetivación de fármaco de ASD. Un excelente ejemplo de esto es el Síndrome del Cromosoma X Frágil.

El Síndrome del Cromosoma X Frágil (FXS) es provocado por la expansión de una única secuencia de gen de trinucleótido (CGG) en el cromosoma X que da como resultado la falla en expresar la proteína codificada por el gen fmr1. El FMR1 (cromosoma X frágil de retraso mental 1) es una

proteína necesaria para el desarrollo neuronal normal. El FXS pueden provocar que un niño tenga autismo (Hagerman et al, 2010); en el 2-6% de todos los niños diagnosticados con autismo, la causa es la mutación del gen FXS. Más aún, aproximadamente el 30% de los niños con FXS tienen algún grado de autismo y un 30% adicional se diagnostican con PDD-NOS (Hagerman et al, 2010). De hecho, el Síndrome del Cromosoma X Frágil es el gen conocido más común único que provoca autismo. Los ratones modificados FMR1 se han desarrollado como un modelo de FXS y, por lo tanto, como un modelo adicional de ASD. La mutación modificada genéticamente del gen FMR1 ha mostrado que resulta en déficits de conectividad neuronal tales como el desarrollo anormal de la médula dendrítica y la poda sináptica (Comery et al, 1997), junto con una desregulación asociada de proteínas de yamiaje dendríticas (que incluyen shank1) y subunidades del receptor de glutamato en densidades postsinápticas (Schiitt et al, 2009). Estos efectos sobre la morfología de las dendritas resulta en déficits en las medidas funcionales de conectividad tales como LTP deteriorado en la corteza y la amígdala (Zhao et al, 2005) y el hipocampo (Lauterborn et al, 2007), así como también cognición deteriorada (Kreuger et al, 2011) y una mejora en la ansiedad social (Spencer et al, 2005). Estos déficits de conectividad se reflejan en los pacientes FXS, que muestran una mayor densidad de la médula dendrítica en el análisis post mortem (Irwin et al., 2000 Cereb corteza 10: 1034-1048). Esta mayor densidad de la médula dendrítica se acompaña de sinapsis inmaduras (Klemmer et al., 201 1 *J Biol Chem.* 286:25495-25504), es decir, puede representar un estado de inmadurez funcional.

En contraste con los ADS del autismo, Asperger, CDD y PDD-NOS, el síndrome de Rett parece tener una base casi monogenética y se puede modelar en ratones con buena validez evidente. Se considera que el síndrome de Rett es provocado, en hasta el 96% de los casos, por un defecto en el gen MECP2 (Zoghbi, 2005). Como resultado, los ratones mutantes modificados ECP2 proporcionan un modelo animal con todas las características de este síndrome de Rett clínico, con un fenotipo que muestran algunas coincidencias con los modelos modificados NLGN4, SHANK3 y IB2 de ASD. Por lo tanto, los ratones modificados MeCP2 muestran un claro deterioro en LTP en el hipocampo, junto con una disminución correspondiente en la memoria social y espacial (Moretti et al, 2006) y el reconocimiento de objetos deteriorado (Schaevitz et al, 2010). Este deterioro en LTP se acompaña de una disminución de la densidad de la médula dendrítica. Los pacientes con el síndrome de Rett presentan una densidad de médula dendrítica reducida (Belichenko et al, 1994 Neuroreport 5:. 1509-1513).

Por lo tanto, los ASD en seres humanos comparten muchas características de trastornos cognitivos o del desarrollo en animales, que incluyen roedores. Por lo tanto, los estudios de terapias de ADS en roedores tales como ratones y ratas son razonablemente predictivos de los resultados obtenidos en los seres humanos. Una característica común que se observa en el autismo, Síndrome del Cromosoma X Frágil y el Síndrome de Rett es la presencia de déficit de conectividad neuronal, que se refleja en cualquiera densidad de médula dendrítica reducida o densidad de médula dendrítica mejorada con

sinapsis inmaduras. Las consecuencias funcionales de estos cambios morfológicos son similares en modelos animales de estos trastornos, reflejados como déficits en LTP, por ejemplo.

Tratamiento de Modelos de ASD Clínicos y Modelos de Animal ASD Con G-2-MePE

Como se describió anteriormente, se observa una patología conservada en ASDs que comprende desarrollo de neurita deteriorado, conectividad sináptica deteriorada y un deterioro correspondiente en el funcionamiento social y cognitivo como resultado. Dichas disfunciones sinápticas resultan de las funciones alteradas genéticamente de proteínas de densidad postsináptica. El crecimiento de neuritas normal y el desarrollo postsináptico pueden ser regulados y aumentados por factores de crecimiento tales como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF; Chapleau et al, 2009) y factor de crecimiento-1 similar a insulina (IGF-1; Riikonen et al, 2006; Tropea et al, 2009). De hecho, el IGF-1 es esencial para el crecimiento normal de la médula dendrítica y la formación de sinapsis (Cheng et al, 2003 J Neurosci Res 73: 1 -9). Los fármacos que promueven la función del factor de crecimiento son por lo tanto de uso en el tratamiento de trastornos del desarrollo progresivos tales como ASD. El G-2-MEPE es una pequeña molécula análoga metilada del tripéptido terminal del IGF-1, IGF-1 (1 -3). Como un análogo mimético de IGF-1, la G-2-Mepe ejerce efectos tróficos y neuroprotectores en diversos modelos animales. Por lo tanto, la G-2-MEPE es eficaz en el tratamiento de los síntomas de ASD, tales como aquellos relacionados con

disfunciones sinápticas que resultan de las mutaciones en los genes descritos anteriormente.

En términos clínicos, los pacientes ASD, que presentan autismo, Síndrome de Asperger, síndrome de Rett, trastorno desintegrativo de la infancia y PDD-NOS, así como también pacientes con síndrome de supresión 22q13, Síndrome del Cromosoma X Frágil y evitación patológica de la demanda se tratan con G-2-MePE. Los pacientes exhiben deficiencias sociales y de comunicación así como también déficit cognitivo. El tratamiento con G-2-MePE, por ejemplo, en una base diaria y en otro ejemplo, mediante la ruta oral, se observa que induce una mejora en los movimientos repetitivos estereotípicos, funcionamiento social mejorado y desempeño cognitivo mejorado luego de tratamiento con fármaco.

En modelos animales de ASD, el tratamiento diario con G-2-Mepe por sonda oral o inyección intraperitoneal a ratones modificados genéticamente mejorará los síntomas similares a ASD. El G-2-Mepe es eficaz en los siguientes modelos de ratones mutantes ASD: mutante NLGN3 (R451 C), NLGN4 modificado genéticamente, NRXN1 modificado genéticamente, CADM 1 modificado genéticamente, shank3 modificado genéticamente, IB2 modificado genéticamente, FMR1 modificado genéticamente y MeCP2 modificado genéticamente. Cuando se administra sub-crónicamente (1 -10 semanas) sobre una base diaria, el G-2-MEPE es eficaz en la mejora de LTP en el hipocampo después de la estimulación en ráfaga o la estimulación de alta frecuencia. De forma similar, el G-2-Mepe aumenta la neurotransmisión excitadora según se mide por

los registros electrofisiológicos potencialed postsinápticos extracelular del campo de la corteza, el hipocampo y el cerebelo. Como resultado de neurotransmisión excitadora mejorada (reversión del déficit de la neurotransmisión similar a ADS observado), se observa que el G-2-MEPE mejora las pruebas de resultado cognitivas y motoras de desempeño cognitivo. Por lo tanto, la G-2-Mepe mejora el desempeño en las pruebas del laberinto de agua de Morris y laberinto de brazos radiales. En los modelos de interacción social, el G-2-Mepe, administrado a ratones mutantes ASD, aumenta el tiempo dedicado por los machos modificados genéticamente en interacción social con las hembras de tipo natural. Adicionalmente, se incrementa las vocalizaciones ultrasónicas a ratones hembra del tipo natural. En modelos en los que se observa que se reduce la longevidad en ratones mutantes en comparación con los controles de tipo natural (tales como modelo de ratón modificado genéticamente MeCP2 de síndrome de Rett), el tratamiento con G-2-Mepe aumenta la vida útil de los animales.

Se ha encontrado que el G-2-MEPE inhibe las convulsiones no convulsivas (NCS) en animales con lesiones hipóxico-isquémicas causadas por oclusión de la arteria cerebral media (MCAO;. Patente Estadounidense No. 7,714,020; Lu et al., NNZ-2566, *a glypromate analog, attenuates brain ischemia-induced nonconvulsive seizures in rats*, J Cerebral Blood Flow metabolism (2009) 1 -9) e inhibe la neuroinflamación en animales con lesiones por penetración balística (pTBI; Wei et al., *NNZ-2566 treatment inhibits neuroinflammation and pro-inflammatory cytokine expression induced by experimental*

penetrating ballistic-like brain injury in rats, J. Neuroinflamation (2009) 6: 19, 1 -10).

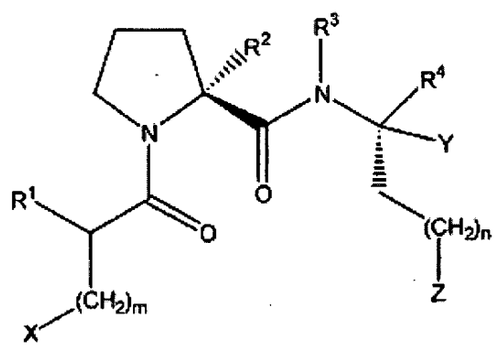
Nuestros hallazgos de que la G-2-Mepe también es efectiva en el tratamiento de síndrome de Rett y ASD, son completamente inesperado sobre la base de la técnica anterior. Esto es debido a que el SNC en el modelo MCaO es provocado por la hipoxia-isquemia y la expresión de citoquinas inflamatorias en el modelo pTB1 es provocada por un traumatismo penetrante, ambos de los cuales son lesiones agudas que son muy diferentes de los efectos crónicos de la MECP2 u otras mutaciones en la maduración sináptica.

Debido a que la G-2-MEPE es un miembro de los compuestos de análogos de GPE descritos aquí, cualquiera de los compuestos descritos también pueden ser efectivos en el tratamiento de los síntomas de ADS. Adicionalmente, debido a que los compuestos y métodos de esta invención se dirigen a los mecanismos subyacentes neurológicos (por ejemplo, inflamación neuronal reducida al inhibir la liberación de citoquinas inflamatorias), esta invención puede proporcionar más de manejo a corto plazo de los síntomas. Más bien, los compuestos y métodos de esta invención pueden mejorar la función neuronal, promover la migración de las células neuronales, promover la neurogenia, promover la diferenciación de citoblastos neuronales, promover el crecimiento axonal y dendrítico, y promover la transmisión sináptica, aliviando así los síntomas adversos del ASD.

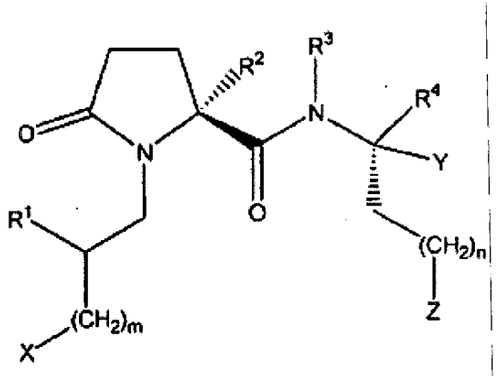
Compuesto de la Invención

Aunque la definición más amplia de la invención se establece en el Resumen, se describen actualmente ciertos compuestos de esta invención.

En un aspecto, esta invención proporciona compuestos de la Fórmula 1 y Fórmula 2:



Fórmula 1



Fórmula 2

donde m es 0 o 1;

n es 0 o 1;

X es H o - NR^6R^7;

Y es H, alquilo, $-CO_2R^5$, o - $CONR^6R^7$;

Z es H, alquilo, $-CO_2R^5$ o - $CONR^6R^7$;

R^1 es H, alquilo, o aralquilo;

R^2, R^3, y R^4 son independientemente H o alquilo;

cada R^5 es independientemente H, alquilo, o a fatty alcohol

cada R^6 y R^7 es independientemente H, alquilo, o aralquilo, o $-NR^6R^7$ es pirrolidino, piperidino, o morfolino;

o una lactona formada cuando un compuesto donde Y es - CO_2(alquilo) y Z es $-CO_2H$ o donde Y es $-CO_2H$ y Z es - CO_2(alquilo) se lactoniza;

y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, dado que el compuesto no es GPE, N-Me-GPE, GPE amida, APE, GPQ o una sal de los mismos.

En algunos aspectos, esta invención incluye:

(a) los compuesto son compuestos de la Fórmula 1;

(b) m es 0;

(c) n es 1;

(d) por lo menos uno de X, Y, R^1, R^2, R^3, R^4, y R^5 no es hidrógeno;

(e) X es- NR^6R^7; y

(f) Y es $-CO_2R^5$ o - $CO_2NR^6R^7$; y

(g) Z es $-CO_2R^5$ o - $CO_2NR^6R^7$.

Otro compuesto de la invención son compuestos de la Fórmula 1 en donde X es $-NR^6R^7$ y R^6 y R^7 son independientemente alquilo o aralquilo. La realización más preferida es un compuesto de la Fórmula I en donde X es $-NR^6R^7$ y R^6 y R^7 son alquilo.

Aún otro compuesto de la invención es G-2-MePE, un compuesto de la Fórmula 1 en donde m es 0. n es 1, R^1 $=R^3=R^4=H$, R^2 es metilo, X es NR^6R^7 donde $R^6=R^7=H$, Y es CO_2R^5 donde R^5 $=H$, Z es CO_2R^5 donde R^5 $=H$.

Farmacología y Utilidad

Los compuestos de esta invención pueden tener efectos anti-inflamatorios, anti-apoptóticos, anti-necróticos y neuroprotectores. Se puede medir su actividad *in vivo*

mediante conteos celulares, teñido específico de marcadores deseados, o mediante métodos tales como aquellos discutidos en Lempt ND et al: Hipoxia-isquemia induces transforming growth factor β î mRNA in the infant rat brain. Molecular Brain Research: 13: 93-101. Su actividad también se pude medir *in vitro* utilizando métodos conocidos en la técnica o descritos aquí.

Las condiciones que afectan la función cerebral llegan a ser frecuentes en las poblaciones envejecidas. La perdida de memoria y el deterioro de memoria son angustiosos para los pacientes afectados y sus familias. La pérdida o deterioro de memoria puede resultar del envejecimiento normal, la lesión al cerebro, la enfermedad neurodegenerativa y disfunciones sicológicas o siquiátricas. Es por lo tanto de gran beneficio para los pacientes, sus familias y para la sociedad que se identifiquen compuestos novedosos y caracterizados porque mejoran la memoria y/o función cognitiva, y tratan o evitan la pérdida o deterioro de memoria.

Es deseable estudiar los efectos de potenciales efectos terapéuticos en sistemas animales. Un dicho sistema útil es la rata. Se sabe que con el envejecimiento, las ratas y otros animales (que incluyen seres humanos) pueden exhibir síntomas de pérdida de memoria, deterioro de memoria y otras disfunciones cognitivas. Adicionalmente, se sabe que los estudios en ratas de agentes terapéuticos son predictivos de los efectos terapéuticos en humanos. Por lo tanto, los estudios de los efectos del GPE y G-2-MePE y la función cognitiva en las ratas envejecidas son razonablemente

predictivas de los efectos terapéuticos de aquellos agentes en el envejecimiento de los seres humanos que tienen o están propensos a adquirir déficits de memoria u otra disfunción cognitiva. Los compuestos de esta invención pueden mejorar la función cognitiva y/o tratar trastornos de memoria. La actividad de mejoramiento cognitivo *in vivo* se puede medir mediante pruebas de comportamiento o neurosicológicas estándar conocidas por individuos expertos en la técnica. Se pueden escoger dichas pruebas de un amplio rango de las pruebas disponibles descritas anteriormente, y variarán dependiendo de la función cognitiva que se va a probar y la afección del animal.

Las pruebas de comportamiento estándar útil para probar la función cognitiva en animales experimentales incluyen, pero no se limitan a la prueba de laberinto de agua de Morris, prueba de respuesta de evitación pasiva, prueba de reconocimiento de objetos novedosa, prueba de discriminación olfativa, prueba del laberinto radial de 8 brazos y la prueba de laberinto en T. Estas pruebas son directamente aplicables a los estudios de los efectos de GPE y G-2-Mepe sobre la función cognitiva en ratas de edad avanzada.

También se espera que los compuestos de esta invención tengan actividades farmacológicas y terapéuticas similares a aquellas del GPE y estas actividades se pueden medir mediante los métodos conocidos en la técnica, y se discute en los documentos citados aquí, y mediante los métodos utilizados para medir la actividad de GPE.

Se puede determinar la relación terapéutica de un compuesto, por ejemplo, al comparar la dosis que da actividad anti-inflamatoria, anti-apoptótica y anti-necrótica efectiva en un modelo *in vivo* adecuado tal como una lesión hipóxico-isquémica (Sirimanne ES, Guan J, Williams CE and Gluckman PD: Dos modelos para determinar los mecanismos de daño y reparación después de la lesión hipóxico-isquémica en el cerebro de rata en desarrollo (Journal of Neuroscience Methods: 55: 7-14, 1994) en una especie animal adecuada, tales como la rata, con la dosis que proporciona efectos observables secundarios significativos en las especies de animales de prueba.

También se puede determinar la relación terapéutica de un compuesto, por ejemplo, al comparar la dosis que da mejora de función cognitiva efectiva o trata un trastorno de la memoria en un modelo *in vivo* adecuado (Ejemplos 4, 5 y 6 adelante) en una especie de animales adecuada, tales como la rata, con la dosis que da pérdida de peso significativa (u otros efectos secundarios observables) en las especies de animales de prueba.

También pueden ser útiles los compuestos de esta invención en el tratamiento de una variedad de trastornos neurodegenerativos, que incluyen hipoxia/isquemia y degeneración neuronal (Patente Estadounidense No. 7,041,314), lesión cerebral traumática, trastornos motores y convulsiones, apoplejía, y cirugía de injerto de bypass de arteria cardiaca (Patente Estadounidense No. 7,605,177), convulsiones no convulsivas (Patente Estadounidense No.

7,714,020), y trastornos de la función cognitiva (Solicitud Estadounidense No. 12/903,844). Adicionalmente, como se describe más completamente aquí adelante, los compuestos de esta invención pueden ser útiles para tratar el Síndrome de Rett, que incluyen prolongar la vida, incrementar la actividad neuronal y tratar las convulsiones asociadas con Síndrome de Rett.

En un estudio del Síndrome de Rett en ratones (que utilizan el modelo modificado genéticamente MeCP2), se encuentra que el GPE tiene efectos para prolongar la vida e incrementar la función neuronal (Solicitud Estadounidense No. 2009/0099077). Sin embargo, como se describe adicionalmente aquí, el GPE, es un péptido de origen natural, se degrada rápidamente *in vivo* e *in vitro*, y por lo tanto no es clara su utilidad en las terapias de pacientes crónicos con Síndrome de Rett.

Composiciones Farmacéuticas y Administración

En general, e puede administrar los compuestos de esta invención en cantidades terapéuticamente efectivas mediante cualquiera de los modos usuales conocidos en la técnica, ya sea individualmente o en combinación con por lo menos otro compuesto de esta invención y/o por lo menos otro agente terapéutico convencional para la enfermedad que se va a tratar. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede variar dependiendo ampliamente de la enfermedad o lesión, la severidad de la enfermedad, la edad y salud relativa del animal que se va a tratar, la potencia de los compuestos, y otros factores. Ya que las cantidades terapéuticamente

efectivas anti-inflamatorias, anti-apoptóticas, anti-necróticas, anti-neurodegenerativas, de los compuestos de esta invención pueden variar desde aproximadamente 0.001 miligramos por kilogramo (mg/kg) a aproximadamente 100 (mg/kg) de la masa del animal, por ejemplo, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 mg/kg, con dosis menores tales como aproximadamente 0.001 a aproximadamente 0.1 mg/Kg, por ejemplo aproximadamente 0.01 mg/Kg, son apropiadas para la administración a través del fluido cerebromédulal, tal como mediante administración intracerebroventricular, y mayores dosis tales como aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg Kg, por ejemplo aproximadamente 10 mg Kg, son apropiadas para la administración mediante métodos tales como administración oral, sistémica (por ejemplo transdérmica), o parenteral (por ejemplo intravenosa). Una persona medianamente experta en la técnica será capaz sin experimentación excesiva, teniendo en cuenta esa capacidad y esta descripción, determinar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de esta invención para una enfermedad o lesión dada.

En general, se pueden administrar los compuestos de esta invención como composiciones farmacéuticas mediante una de las siguientes rutas: oral, tópica, sistémica (por ejemplo transdérmica, intranasal, o mediante supositorio), o parenteral (por ejemplo inyección intramuscular, subcutánea, o intravenosa), mediante administración al SNC (por ejemplo mediante inyección intramédulal o intercisternal); mediante implantación, y mediante infusión a través de dichos dispositivos como bombas osmóticas, bombas implantables, parches transdérmicos, y similares. Las composiciones pueden

tener la forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, semisólidos, polvos, formulación de liberación sostenida, soluciones, suspensiones, elíxires, aerosoles, geles solubles o cualesquier otras composiciones apropiadas; y comprenden por lo menos un compuesto de esta invención en combinación con por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable o fisiológico aceptable. Los excipientes adecuados son bien conocidos por personas medianamente expertas en la técnica, y estos, y los métodos para formular las composiciones, se pueden encontrar en dichas referencias estándar como Gennaro AR: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ava, ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 2000. Los portadores líquidos adecuados, especialmente para soluciones inyectables, incluyen agua, solución salina acuosa, solución de dextrosa acuosa, glicoles, y similares, con soluciones isotónicas que se prefieren para administración intravenosa, intramédulal, y intracisternal y vehículos tales como fluido cerebromédulal artificial que también es especialmente adecuado para la administración del compuesto al SNC. El texto anterior se incorpora expresamente aquí completamente mediante referencia.

Los compuestos de esta invención se pueden administrar oralmente, en comprimidos o cápsulas. En algunas realizaciones, se pueden preparar los compuestos de esta invención en emulsiones agua en aceite en la forma de microemulsiones, emulsiones gruesas, cristales líquidos, o nanocápsulas (Solicitud Estadounidense No. 12/283,684, ahora Patente Estadounidense No. 7,887,839 emitida el 15 de febrero, 2011). En razón a que los compuestos de esta

invención pueden tener biodisponibilidad oral sustancial, se pueden utilizar ventajosamente para administración conveniente o crónica. Adicionalmente, las composiciones oralmente disponibles incluyen hidrogeles solubles que contienen compuesto activo, permitiendo de esta manera la administración oral del compuesto neuroprotector sin la necesidad de que un paciente trague un comprimido o cápsula. Dichos materiales y geles de liberación lenta se conocen en la técnica.

Se pueden administrar los compuestos de esta invención después de o antes del inicio de una afección que es probable que resulte en la neurodegeneración o un síntoma de la misma. Por ejemplo, se sabe que la hipoxia/isquemia puede ocurrir durante la cirugía de injerto de bypass de arteria coronaria (CABG). Por lo tanto, se puede pre-tratar un paciente con un compuesto de esta invención antes de ser colocado en un sistema de oxigenación extracorpórea. En algunas realizaciones, puede ser deseable administrar un compuesto de esta invención que inicie aproximadamente 4 horas antes de la cirugía o antes de un evento que es probable que conduzca a lesión traumática u otra neurológica. En otras realizaciones, puede ser deseable infundir un compuesto de esta invención durante la cirugía o durante un procedimiento quirúrgico para reparar una lesión neurológica. Los compuestos de esta invención también se pueden utilizar en situaciones de emergencia, por ejemplo, en un paciente que solo ha experimentado una apoplejía, evento hipóxico, lesión cerebral traumática u otro traumatismo agudo. En dichas situaciones, se puede administrar un compuesto de esta invención

inmediatamente después de que se hace el diagnóstico de lesión neural.

En algunas situaciones, se pueden preparar los conjuntos que contienen el compuesto de esta invención en avance de uso en el campo. Un conjunto puede contener un frasco que contiene un compuesto de la invención en una formulación farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, para inyección o administración oral), junto con un jeringa u otro dispositivo de suministro, e instrucciones para uso. En situaciones en las que se diagnostica una convulsión, se puede administrar un compuesto de esta invención junto con un anticonvulsivo. Se conocen muchos anticonvulsivos en la técnica y no necesitan ser descritos en detalle aquí.

Adicionalmente, pueden ocurrir lesiones neurológicas "secundarias" después de un traumatismo primario tal como una lesión traumática, apoplejía o procedimiento quirúrgico. Por ejemplo, después de una apoplejía, lesión cerebral penetrante o un procedimiento CABG, la inflamación del tejido neuronal puede llevar a neurodegeneración.

Se pueden reflejar las lesiones secundarias mediante activación incrementada de las células inflamatorias (por ejemplo, astrocitos y/o microglia), y las acciones de mediadores inflamatorios pueden provocar el daño neurológico. por lo tanto, en algunas realizaciones, puede ser deseable administrar un compuesto de esta invención durante periodos que inician antes del traumatismo, hasta aproximadamente 100 horas después del traumatismo. En otras realizaciones, puede

ser deseable administrar un compuesto de esta invención antes que inicie el traumatismo, durante el traumatismo y después del traumatismo, ya sea de forma continua, como una infusión, o en dosis discretas mediante un intervalo de tiempo deseado.

Los compuestos de esta invención también se pueden administrar de forma adecuada por un sistema de liberación sostenida o material de gel con G-2-MePE incorporado allí. Los ejemplos adecuados de composiciones de liberación sostenida incluyen matrices de polímero semi-permeables en la forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida incluyen polilacturos (Patente Estadounidense No. 3,773,919; EP 58,481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman et al., 1983), poli(2-hidroxietil metacrilato) (Langer et al., 1981), acetato de vinil etileno (Langer et al., supra), o ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico acid (EP 133,988). Adicionalmente, se pueden utilizar las composiciones de gel con base en polisacáridos (por ejemplo, carboximetil celulosa, carboxietil celulosa, quitosán u otros derivados de celulosa) y derivados de óxid de polietileno (por ejemplo, polietilenglicoles). Estas composiciones de gel son solubles en soluciones acuosas, son biocompatibles, no tóxicas y por lo tanto se pueden utilizar para administrar los compuestos de esta invención a cualquier superficie mucosa que incluye la cavidad oral, nasofaringe, tracto urogenital, intestino o recto.

Las composiciones de liberación sostenida también incluyen un compuesto atrapado liposomalmente.

Los liposomas que contienen el compuesto se preparan mediante métodos conocidos per se: documentos DE 3,218,121; Epstein et al., 1985; Hwang et al., 1980; EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; solicitud de Patente Japonesa 83-118008; Patente Estadounidense Nos. 4,485,045 y 4,544,545; y EP 102,324. De forma ordinaria, los liposomas son del tipo unilamelar pequeño (desde o aproximadamente 200 a 800 Angstroms) en los que el contenido lípido es mayor de aproximadamente 30 mol por ciento del colesterol, la proporción seleccionada se ajusta para la terapia más eficaz. Todas y cada una de las publicaciones identificadas anteriormente se incorporan expresamente aquí totalmente mediante referencia, como si cada una se hubiera incorporado de forma separada.

Los compuestos de esta invención también se pueden adherir al polietilenglicol ("PEGilado") para aumentar su tiempo de vida *in vivo*, con base en, por ejemplo, la tecnología de conjugado descrita en el documento WO 95/32003.

De forma deseable, si es posible, cuando se administra como un agente anti-inflamatorio, un agente anti-apoptótico, un agente anti-necrótico, o un agente anti-neurodegenerativo, los compuestos de esta invención se pueden administrar oralmente. La cantidad de un compuesto de esta invención en la composición puede variar ampliamente dependiendo del tipo de composición, tamaño de una dosificación unitaria, clase de excipientes, y otros factores bien conocidos por aquellos medianamente expertos en la técnica. En general, la

composición final puede comprender desde aproximadamente 0.0001 por ciento en peso (% en peso) a aproximadamente 10% en peso del compuesto de esta invención, preferiblemente aproximadamente 0.001 % en peso a aproximadamente 1% en peso, con el resto que es un excipiente o excipientes.

Una composición puede contener opcionalmente, además de un compuesto de esta invención, por lo menos un agente seleccionado de, por ejemplo, factores de crecimiento y derivados asociados (factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF-I), factor de crecimiento similar a insulina-II (1GF-II), factor de crecimiento de transformación-β1, activina, hormona de crecimiento, factor de crecimiento de nervio, factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), proteína de unión de hormona de crecimiento, proteínas de unión IGF (especialmente IGFBP-3), factor de crecimiento de fibroblasto básico, factor de crecimiento de fibroblasto ácido, el producto de gen hst/fgk, FGF-3, FGF-4, FGF-6, factor de crecimiento de queratinocito, factor de crecimiento inducido por andrógeno. Los miembros adicionales de la familia FGF incluyen, por ejemplo, int-2, homólogo de factor de crecimiento de fibroblasto factor-1 (FHF-1), FHF-2, FHF-3 y FHF-4, factor de crecimiento de queratinocito 2, factor de activaciión de glial, FGF- 10 y FGF- 16, factor neurotrófico ciliar, factor de crecimiento derivado de cerebro, neurotrofina 3, neurotrofina 4, proteína morfogenética de hueso 2 (BMP-2), factor neurotrófico derivado de estirpe celular glial, factor neurotrófico dependiente de actividad, factor de inhibición de citoquina leucemia, oncostatina M, interleucina), α-, β-, γ-, o interferón consenso, y TNF-ct.

Otras formas de agentes terapéuticos neuroprotectores incluyen, por ejemplo, clometiazol; ácido quinurénico, Semax, tacrolimus, L-treo-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol, análogo de andrenocorticotropina-(4-9) [ORG 2766] y dizolcipina (MK-801), selegilina; antagonistas de glutamato tales como mematina (Namenda) NPS 1506, GV 1505260. M -801, GV 1 50526; antagonistas AMPA tales como 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoilbenzo(f)quinoxalina (NBQX), LY303070 y LY300164; agentes anti-inflamatorios dirigidos contra la adresina MAdCAM- 1 y/o sus receptores oc4 de integrina ($\alpha4\beta1$ y $\alpha4\beta7$), tales como anti-MAdCAM-1 mAb MECA-367 (acceso ATCC No. HB-9478). También puede ser útil terapia de combinación con los antagonistas del receptor de glutamato metabotrópico tales como fenobam. También, además de un compuesto de esta invención, una composición puede incluir un inhibidor de recaptación de serotonina selectivo tal como fluoxetina, un inhibidor de recaptación de norepinefina selectivo tal como viloxazina, o un anti-sicótico atípico tal como risperidona. La mayoría de estos agentes, especialmente los péptidos tales como los factores de crecimiento, etc., son no activos oralmente, y requerirán administración mediante inyección o infusión.

Preparación de Composiciones

Los materiales de partida y reactivos utilizados en preparar estos compuesto están disponibles de proveedores comerciales tales como Aldrich Chemical Company (Milwaukee, Wis.), Bachem (Torrance, Calif), Sigma (St. Louis, Mo.), o se preparan mediante métodos bien conocidos por la persona medianamente experta en la técnica luego de los

procedimientos descritos en dichas referencias como Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, vols 1 - 1 7, John Wiley y Sons, New York, N.Y., 1991; Rodd's Chemistry of Carbon Compound, vols. 1 -5 and supplements, Elsevier Science Publishers, 1989; Organic Reactions, vols. 1 -40. John Wiley y Sons, New York, N.Y., 1991; March J; Advanced Organic Chemistry, 4th ed. John Wiley y Sons, New York, N.Y., 1992; y Larock: Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, 1989. En algunos casos, los aminoácidos y sus ésteres o amidas, y aminoácidos protegidos, están ampliamente disponibles comercialmente; y la preparación de aminoácidos modificados y sus amidas o ésteres se describen extensamente en la bibliografía química y bioquímica y por lo tanto son bien conocidos a personas medianamente expertas en la técnica. Por ejemplo, ácido N-pirrolidina acético se describe en Dega-Szafran Z and Pryzbylak R. Synthesis, IR, and NMR studies of zwitterionic -(1-pyrrolidine)alkanocarboxylic acids and their N-methyl derivatives. J. Mol. Struct.: 436-7, 107- 121, 1997; y ácido N-piperidina acético se describe en Matsuda O, Ito S, and Sekiya M. Reaction of N-(alkoxymethil)dialkylamines and N,N'-methylenebisdialkylamines con isocyanides. Chem. Pharm. Bull.: 23(1), 219-221, 1975. Cada una de las publicaciones identificadas anteriormente se incorpora expresamente completamente aquí mediante referencia como si de esta manera se incorpora individualmente.

Los materiales de partida, intermedios, y compuestos de esta invención se pueden aislar y purificar utilizando técnicas convencionales, que incluyen filtración,

destilación, cristalización, cromatografía, y similares. Se pueden utilizar métodos convencionales, que incluyen constantes físicas y datos de espectros.

Se pueden preparar los compuestos de esta invención mediante los métodos descritos adelante y como se dan en los Ejemplos.

Los compuestos de la Fórmula 1 son análogos de GPE, o modificaciones de los mismos, tal como ésteres o amidas. En general, se pueden preparar mediante métodos tales como son bien conocidos por personas medianamente expertas en la técnica de péptido y síntesis de péptido modificada, siguiendo los esquemas de reacción establecidos en las Figuras 1-11 que acompañan esta especificación, o al seguir otros métodos bien conocidos por aquellos medianamente expertos en la técnica de la síntesis de péptidos y análogos.

Convenientemente, la producción sintética de los polipéptidos de la invención puede estar de acuerdo con el método sintético en fase sólida descrito por Merrifield. et al. Solid phase peptide synthesis. I. La síntesis de a tetrapeptide: J. Amer. Chem. Soc: 85, 2149-21 56, 1963. Esta técnica es bien conocida y es un método común para la preparación de péptidos. El concepto general de este método depende de la unión del primer aminoácido de la cadena a un polímero sólido mediante un enlace covalente. Se agregan aminoácidos protegidos sucesivos, uno a la vez (estrategia por etapas) o en bloques (estrategia de segmento), hasta que se ensambla la secuencia deseada. Finalmente, el péptido

protegido se elimina del soporte de resina sólido y se escinden los grupos protectores. Mediante este procedimiento, los reactivos y los subproductos se eliminan mediante filtración, eliminando así la necesidad de intermediarios de purificación.

Los aminoácidos se pueden adherir a cualquier polímero adecuado como una resina. La resina debe contener un grupo funcional al que el primer aminoácido protegido puede estar firmemente unido por un enlace covalente. Diversos polímeros son adecuados para este propósito, tales como celulosa, alcohol polivinílico, polimetilmetacrilato y poliestireno. Las resinas adecuadas están disponibles comercialmente y son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. Los grupos protectores adecuados que puedan utilizarse en dicha síntesis incluyen terc-butiloxicarbonilo (BOC), bencilo (Bzl), t-amiloxicarbonilo (AOC), tosilo (Tos), o-bromo-fenilmetoxicarbonilo (BrZ), 2,6-diclorobencil ($BzlCl_2$), y fenilmetoxicarbonilo (Z o CBZ). Los grupos de protección adicionales se identifican en Merrifield, citada anteriormente, así como en JFW McOmie: Protective Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, Nueva York, 1973, ambas referencias incorporadas expresamente completamente aquí.

Los procedimientos generales para preparar los péptidos de esta invención implican inicialmente adherir un aminoácido protegido de terminal carboxilo a la resina. Después de la adhesión, la resina se filtra, se lava y se elimina el grupo protector (deseablemente BOC) en el grupo amino I del aminoácido de terminal carboxilo. La eliminación de este

grupo protector debe tener lugar, por supuesto, sin romper el enlace entre ese aminoácido y la resina. El siguiente aminoácido, y si es necesario, el aminoácido protegido de cadena lateral, luego se acopla al grupo amino I libre del aminoácido sobre la resina. Este acoplamiento se lleva a cabo mediante la formación de un enlace amida entre el grupo carboxilo libre del segundo aminoácido y el grupo amino del primer aminoácido adherido a la resina. Esta secuencia de acontecimientos se repite con los aminoácidos sucesivos hasta que todos los aminoácidos se adhieren a la resina. Finalmente, el péptido protegido se divide de la resina y los grupos protectores eliminados revelan el péptido deseado. Las técnicas de división utilizadas para separar el péptido de la resina y para eliminar los grupos protectores dependen de la selección de la resina y los grupos protectores y son conocidos por aquellos familiarizados con la técnica de síntesis de péptidos.

Las técnicas alternativas para la síntesis de péptidos se describen en Bodanszky et al, Peptide Synthesis, 2nd ed, John Wiley and Sons, Nueva York, 1976. Por ejemplo, también se pueden sintetizar los péptidos de la invención utilizando metodologías de síntesis de péptidos en solución estándar, que implican ya sea acoplamiento en forma de etapas o un bloque de aminoácidos o fragmentos de péptidos utilizando métodos químicos o enzimáticos de formación de enlace amida. (Véase, por ejemplo, H. D. Jakubke in The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Academic Press, New York, 1987, p. 103-165; J. D. Glass, ibid., pp. 167-1 84, y la Patente Europea 0324659 A2, que describen los métodos de síntesis enzimática

de péptidos). Estos métodos de síntesis de solución son bien conocidos en la técnica. Cada una de las publicaciones identificadas anteriormente se incorpora expresamente aquí totalmente mediante referencia como si individualmente se incorporan.

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

Una persona medianamente experta en la técnica no tendrá que realizar una experimentación excesiva, teniendo en cuenta esa capacidad y el conocimiento disponible, y de esta descripción, en el desarrollo de uno o más métodos sintéticos adecuados para los compuestos de esta invención.

Por ejemplo, los análogos en los que el residuo de glicina del GPE se reemplaza por un aminoácido alternativo, o por un no aminoácido, se pueden preparar convenientemente mediante la preparación de un dipéptido de ácido prolina-glutámico (tal como el éster de dibencilo), y acoplamiento de ese dipéptido con un análogo de glicina N-protegida, tal como BOC-N-metilglicina, BOC-L-valina, ácido N-pirrolidinacético, y similares, seguido de desprotección, como se ilustra en las Figuras 2 y 3. Los análogos en los que el residuo de ácido glutámico de GPE se reemplaza por un aminoácido alternativo o una amida o éster de aminoácido se pueden preparar convenientemente mediante la preparación de un dipéptido glicina-L-prolina N-protegido (tal como BOC-glicil-L-prolina), y el acoplamiento de ese dipéptido con un ácido

glutámico C-protegido o análogo del mismo, tal como terc-butil γ-aminobutirato, metil 4-amino-4-dimetilcarbamoilbutirato, éster metílico de L-glutamina, dimetil I-metilglutamato, etc. Se pueden preparar las lactonas mediante la preparación de un derivado mono-ácido-mono-éster apropiado y reducción. Se pueden preparar simplemente análogos en los que R^2 es alquilo convenientemente mediante el uso de la 2-alquilprolina apropiado en la síntesis, y de manera similar se pueden preparar convenientemente análogos en los que R^3 es alquilo mediante el uso del ácido N-alquilglutámico apropiado o análogo en la síntesis. Donde se deben hacer modificaciones a dos o más aminoácidos, las técnicas de acoplamiento seguirán siendo las mismas, con sólo más de un aminoácido modificado o análogo que se utiliza en la síntesis. La selección de los grupos protectores apropiados para el método elegido (en fase sólida o en fase de solución), y de sustratos adecuados si se utiliza la síntesis en fase sólida, estarán dentro de la capacidad de una persona medianamente experta en la técnica.

Se pueden preparar los compuestos de Fórmula 2 a partir de 5-oxo-L-prolina adecuadamente protegida o análogos o derivados de la misma, siguiendo métodos tales como el acoplamiento del grupo carboxilo prolina con un ácido glutámico protegido o análogo o derivado para dar un análogo de intermedio A de la Figura 2, comparable con la reacción de acoplamiento mostrada en la Figura 2 y, luego, la alquilación del nitrógeno de la pirrolidina con un grupo de la fórmula A---$(CH_2)_m$---$CH(R^1)$---CH_2R, protegido en A, si es necesario, en el que R es un grupo saliente bajo condiciones de

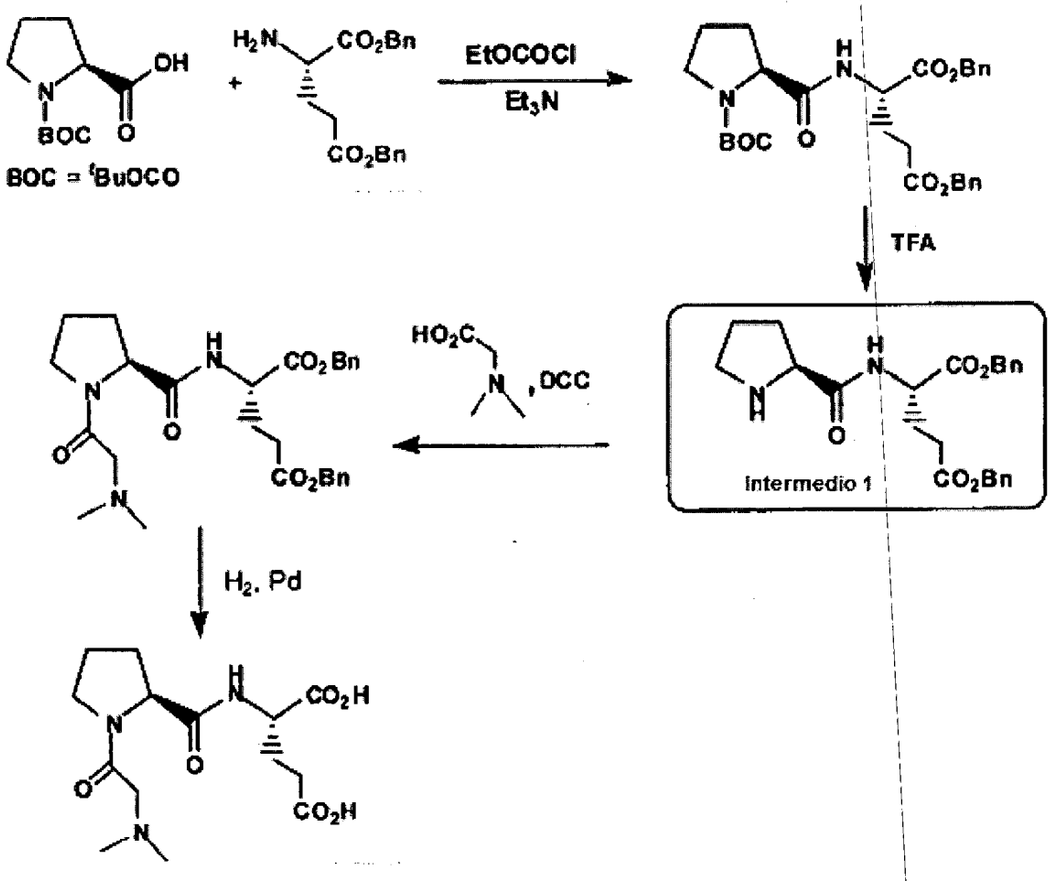
alquilación. Alternativamente, la 5-oxo-L-prolina adecuadamente protegida se puede alquilar primero en el nitrógeno de la pirrolidina para dar un análogo del intermedio B de la Figura 4, y luego acoplar este con un ácido glutámico protegido de forma adecuada o análogo o derivado de la manera mostrada en las Figuras 4 al 9.

EJEMPLOS

Se destinan los siguientes ejemplos para ilustrar las realizaciones de esta invención, y no se destinan para limitar el alcance a estos ejemplos específicos. Las personas medianamente expertas en la técnica pueden aplicar las descripciones y enseñanzas presentadas aquí para desarrollar otras realizaciones sin la experimentación excesiva y con una probabilidad de éxito. Todas dichas realizaciones se consideran parte de esta invención.

Ejemplo 1: Síntesis de ácido *N,N*-Dimetilglicil-L-prolil)-L-glutámico

Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran la síntesis de un compuesto de la invención, ácido N,N-Dimetilglicil-L-prolil-L-glutámico



Todos los materiales de partida y otros reactivos se compran de Aldrich; BOC=terc-butoxicarbonilo; Bn=bencilo.

Éster de bencilo de ácido BOC-L-prolina-(P-bencil)-L-glutámico

A una solución de BOC-prolina [Anderson GW and McGregor AC: J. Amer. Chem. Soc: 79, 6810. 1994] (10 mmol) en diclorometano (50 ml), enfriada a 0° C, se agrega trietilamina (1.39 ml, 10 mmol) y cloroformato de etilo (0.96 ml, 10 mmol). La mezcla resultante se agita a 0° C durante 30 minutos. Una solución de dibencil-L-glutamato (10 mmol) luego se agrega y la mezcla se agita a 0° C durante 2 horas luego se calienta a temperatura ambiente y se agita durante la noche. La mezcla de reacción se lava con bicarbonato de sodio

acuoso y ácido cítrico (2 mol 1^{-1}) luego se seca ($MgSO_4$) y se concentra a presión reducida para dar éster de dibencilo de ácido BOC-L-prolina-L-glutámico (5.0 g, 95%).

Éster de dibencilo de ácido L-prolina-L-glutámico

Una solución de éster de dibencilo de BOC-L-glutamil-L-prolina (3.4 g, 10 mmol), enfriada a 0° C, se trata conácido trifluoroacético (25 ml) durante 2 h. a temperatura ambiente. Después de eliminación de los volátiles a presión reducida el residuo se tritura con éter para dar éster de dibencilo de ácido L-prolina-L-glutámico.

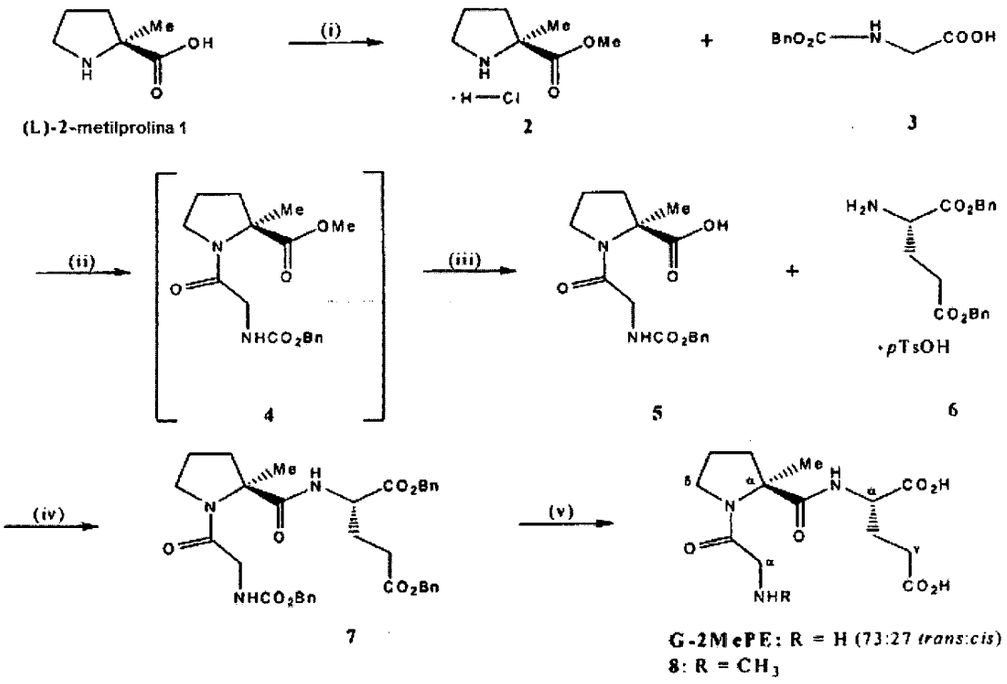
Ácido N,N-Dimetilglicil-L-prolil-L-glutámico

Una solución de diciclohexilcarbodiimida (10.3 mmol) en diclorometano (10 ml) se agrega a una solución de éster de dibencilo de ácido L-prolina-L-glutámico agitada y enfriada (0° C) (10 mmol), N,N-dimetilglicina (10 mmol) y trietilamina (10.3 mmol) en diclorometano (30 ml). La mezcla se agita a 0° C durante la noche y luego a temperatura ambiente durante 3 h. Después de filtración, el filtrado se evapora a presión reducida. El éster de dibencilo crudo resultante se disuelve en una mezcla de acetato de etilo (30 ml) y metanol (30 ml) que contiene 10% de paladio sobre carbono (0.5 g) luego se hidrogena a temperatura ambiente y presión hasta que cesa la absorción de hidrógeno. La solución filtrada se evapora y el residuo se recristaliza a partir de acetato de etilo para producir el derivado de tripéptido.

Se puede apreciar que se sigue el método de los Ejemplos, y se utilizan aminoácidos alternativos o sus amidas o ésteres, se producirán otros compuestos de la Fórmula 1 .

Ejemplo 2: Síntesis de Glicil-L-2-Metil-L-Prolil-L-Glutamato

Ácido Glicil-L-2-Metilprolil-1-Glutámico (G-2M ePE)



Esquema 1 Reactivos, condiciones y rendimientos, (i) $SOCl_2$, MeOH, 79° C, N_2, 24 h (104%); (ii) Et_3N, DCC, CH_2Cl_2, 0° C a TA, N_2, 20 h; (iii) NaOH ac. 1M, 1,4-dioxano, 19 h (60%, 2 etapas); (iv) Et_3N, BoPCl, CH_2Cl_2, TA, N_2, 17 h (89%); (v) H2, 10% de Pd/C, 91:9 MeOH-H_2O, TA, 23 h (86%).

La L-2- etilprolina y el p-toluenosulfonato de éster de dibencilo de ácido L-glutámico se compran de Bachem, N-benciloxicarbonil-glicina de Acros Organics y cloruro de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BoPCl, 97%) de Aldrich Chem. Co.

Clorhidrato de Metil L-2-metilprolinato 2

Se agrega con precaución cloruro de tionilo (5.84 cm^3, 80.1 mmol) en forma de gotas a una solución agitada de (L)-2-metilprolina 1 (0.43 g, 3.33 mmol) en metanol anhidro (30 cm^3) a -5° C bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se calienta bajo reflujo durante 24 h, y la solución de color amarillo pálido resultante se concentra hasta secado en vacío. El residuo se disuelve en mezcla 1:1 de metanol y tolueno (30 cm^3) luego se concentra hasta secado para eliminar el cloruro de tionilo residual. Este procedimiento se repite dos veces más, produciendo clorhidrato 2 (0.62 g, 104%) como un sólido blancuzco, higroscópico, espectroscópicamente puro: pf 127- 131° C; $[\alpha]_D$ -59.8 (c 0.24 en CH_2Cl_2); ν_{max} (película)/cm^{-1} 3579, 3398 br, 2885, 2717, 2681, 2623, 2507, 1743, 1584, 1447, 1432, 1374, 1317, 1294, 1237, 1212, 1172, 1123, 981, 894, 861 y 764; δ_h (300 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si) 1.88 (3H, s, Proα-CH_3), 1.70-2.30 (3H, br m, Proβ-H_AH_B y Proγ-H_2), 2.30-2.60 (1 H, br m, Proβ- H_AH_B), 3.40-3.84 (2H, br m, Proδ-H_2), 3.87 (3H, s, CO_2CH_3), 9.43 (1 H, br s, NH) y 10.49 (1 H, br s, HC1); δ_c (75 MHz; $CDCl_3$) 21.1 (CH_3, Proα-CH_3), 22.4 (CH_2, Proγ-C), 35.6 (CH_2, Proβ-C), 45.2 (CH_2, Proδ-C), 53.7 (CH_3, CO_2CH_3), 68.4 (cuat., Proα-C) y 170.7 (cuat., CO); *m/z* (FAB+) 323.1745 [$M_2.H^{35}Cl.H^+$: $(C_7H_{13}NO_2)_2.H^{35}Cl.H$ requiere 323.1738] y 325.171 8 [$M_2.H^{37}Cl.H^+$: $(C_7H_{13}NO_2)_2.H_{37}Cl.H$ requiere 325.1 708].

N-Benciloxicarbonil-glicil-L-2-metilprolina 5

Se agrega trietilamina anhidra (0.45 cm3, 3.23 mmol) en forma de gotas a una mezcla de clorhidrato de Metil L-2-

metilprolinato 2 (0.42 g, 2.34 mmol) y N-benciloxicarbonil-glicina (98.5%) 3 (0.52 g, 2.45 mmol) en cloruro de metileno (16 cm^3), a 0° C, bajo una atmósfera de nitrógeno. La solución resultante se agita durante 20 min y una solución de 1,3-diciclohexilcarbodiimida (0.56 g, 2.71 mmol) en cloruro de metileno (8 cm^3) a 0° C se agrega en forma de gotas y la mezcla de reacción se calienta a temperatura ambiente y se agita durante unas 20 h adicionales. La mezcla blanca resultante se filtra a través de una almohadilla de Celite™ para eliminar parcialmente 1,3-diciclohexilurea, y la almohadilla se lava con cloruro de metileno (50 cm^3). El filtrado se lava sucesivamente con 10% de ácido clorhídrico acuoso (50 cm^3) y hidrógeno carbonato de sodio acuoso saturado (50 cm_3), se seca ($MgSO_4$), se filtra y se concentra hasta secado en vacío. La purificación adicional del residuo mediante cromatografía de columna flash (35 g SiO_2; 30-70% de acetato de etilo - hexano; gradiante de elución) produce tentativamente N-benciloxicarbonil-glicil-L-2-metilprolinato de metilo 4 (0.56 g), que contiene 1,3-diciclohexilurea, como un semi-sólido blanco: R_f 0.65 (EtOAc); m/z (EI+) 334.1534 (M^+. $C_{17}H_{22}N_2O_5$ requiere 334.1529) y 224 (1,3-diciclohexilurea).

A una solución de prolinato impuro 4 (0.56 g, ca. 1 .67 mmol) en 1,4-dioxano (33 cm^3) se agrega en forma de gotas hidróxido de sodio acuoso 1 M (10 cm^3, 10 mmol) y la mezcla se agita durante 19 h a temperatura ambiente. Luego se agrega cloruro de metileno (100 cm^3) y la capa orgánica extraída con hidrógeno carbonato de sodio acuoso saturado (2 x 100 cm^3). Las capas acuosas combinadas se acidifican cuidadosamente con

ácido clorhídrico (32%), se extraen con cloruro de metileno (2 x 100 cm^3), y las capas orgánicas combinadas se secan ($MgSO_4$), se filtran, y se concentran hasta secado en vacío. La purificación de el residuo resultante (0.47 g) mediante cromatografía de columna flash (17 g SiO_2; 50% de acetato de etilo - hexano a 30% de metanol - diclorometano; gradiante de elución) proporciona dipéptido N-protegido 5 (0.45 g, 60%) como una espuma blanca en dos etapas a partir de clorhidrato 2. El dipéptido 5 se muestra por ser exclusivamente el confórmero *trans*-orientado mediante análisis de RMN: R_f 0.50 (20% MeOH - CH_2Cl_2); $[\alpha]_D$ -62.3 (c 0.20 en CH_2Cl_2); ν_{max} (película)/cm^{-1} 3583, 3324 br, 2980. 2942, 1722, 1649, 1529, 1454, 1432, 1373, 1337, 1251, 1219, 1 179, 1053, 1027, 965, 912, 735 y 698; δ_h (300 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si) 1.59 (3H, s, Proα-CH_3), 1.89 (1 H, 6 líneas, J 18.8, 6.2 y 6.2, Proβ-H_AH_B), 2.01 (2H, dtt, J 18.7, 6.2 y 6.2, Proγ-H_2), 2.25-2.40 (1 H, m, Proβ- H_AH_B), 3.54 (2H, t, J 6.6, Proδ-H_2), 3.89 (1 H, dd, J 17.1 y 3.9, Glyα-H_AH_B), 4.04 (1 H, dd, J 17.2 y 5.3, Glyα-H_AH_B), 5.11 (2H, s, OCH_2Ph), 5.84 (1 H, br t, J4.2, N-H), 7.22-7.43 (5H, m, Ph) y 7.89 (1 H, br s, -COOH); (75 MHz; $CDCl_3$) 21.3 (CH_3, Proα-CH_3), 23.8 (CH_2) Proγ-C), 38.2 (CH_2, Proβ-C), 43.6 (CH_2, Glyα-C), 47.2 (CH_2, Proδ-C), 66.7 (cuat, Proα-C), 66.8 (CH_2, OCH_2Ph), 127.9 (CH, Ph), 127.9 (CH, Ph), 128.4, (CH, Ph), 136.4 (cuat., Ph), 156.4 (cuat., NCO_2), 167.5 (cuat., Gly-CON) y 176.7 (cuat., CO); *m/z* (EI+) 320.1368 (M^+. $Cl_6H_{20}N_2O_5$ requiere 320.1372).

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

Se agrega en forma de gotas trietilamina (0.50 cm^3, 3.59 mmol) a una solución de dipéptido 5 (0.36 g, 1.12 mmol) y *p*-toluenosulfonato de éster de dibencilo de ácido L-glutámico 6 (0.73 g, 1 .46 mmol) en cloruro de metileno (60 cm^3) abjo nitrógeno a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción se agita durante 10 min. Se agrega cloruro de Bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BoPCl, 97%) (0.37 g, 1.41 mmol) y la solución incolora se agita durante 17 h. la solución de cloruro de metileno se lava sucesivamente con 10% de ácido clorhídrico acuoso (50 cm^3) e hidrógeno carbonato de sodio acuoso saturado (50 cm^3), se seca ($MgSO_4$), se filtra, y se evapora hasta secado en vacío. La purificación del residuo resultante mediante cromatografía de columna flash repetida (2x) (24 g SiO_2; 30-70% de acetato de etilo - hexano; gradiente de elución) produciendo completamente tripéptido protegido 1 (0.63 g, 89%) como un aceite incoloro. El tripéptido 7 se muestra a ser exclusivamente el confórmero trans -orientado mediante análisis de RMN: R_f 0.55 (EtOAc); $[\alpha]_D$ -41 .9 (c 0.29 en CH_2Cl_2); ν_{max} (película)/cm^{-1} 3583, 3353 br, 2950. 1734, 1660. 1521, 1499, 1454, 1429, 1257, 1214, 1188, 1166, 1051, 911, 737 y 697; δ_H (400 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si) 1.64 (3H, s, Proα-CH_3), 1.72 (1 H, dt, J 12.8, 7.6 y 7.6, 1.92 (2H, 5 líneas, J 6.7, Proγ-H_2), 2.04 (1 H, 6 líneas, J 7.3 Gluβ-H_AH_B), 2.17-2.27 (1 H, m, Gluβ-H_AH_B), 2.35-2.51 (3H, m, Proβ-H_AH_B y Gluγ-H_2), 3.37-3.57 (2H, m, ProLδ-H_2), 3.90 (1H, dd, J 17.0 y 3.6, Glyα-H_AH_B), 4.00 (1 H, dd, J 17.1 y 5.1, Glyα -H_AH_B), 4.56 (1 H, td, J 7.7 y 4.9, Gluα-H), 5.05-5.20 (6H, m, 3 x OCH_2Ph), 5.66-5.72 (1 H, br m, Gly-NH), 7.26-7.37 (15H, m, 3 x Ph) y 7.44 (1 H, d, J 7.2, Glu-NH); δ_c (100 MHz; $CDCl_3$) 21.9 (CH_3, Proα-CH_3), 23.4 (CH_2, Proγ-C),

26.6 (CH_2, Gluβ-C), 30.1 (CH_2, Gluγ-C), 38.3 (CH_2, Proβ-C), 43.9 (CH_2, Glyα-C), 47.6 (CH_2, Proδ-C), 52.2 (CH, Gluα-C), 66.4 (CH_2, OCH_2Ph), 66.8 (CH_2, OCH_2Ph), 67.1 (CH_2, OCH_2Ph), 68.2 (cuat, Proα-C), 127.9 (CH, Ph), 128.0 (CH, Ph), 128.1, (CH, Ph), 128.2, (CH, Ph), 128.2, (CH, Ph), 128.3, (CH, Ph), 128.4, (CH, Ph), 128.5, (CH, Ph), 128.5, (CH, Ph), 135.2 (cuat., Ph), 135.7 (cuat, Ph), 136.4 (cuat., Ph), 156.1 (cuat., NCO_2), 167.3 (cuat., Gly-CO), 171 .4 (cuat., CO), 172.9 (cuat., CO) y 173.4 (cuat., CO); *m/z* (FAB+) 630.2809 (MH^+. requiere 630.2815).

Ácido Glicil-L-2-Metilprolil-L-Glutámico (G-2-MePE)

Una mezcla del tripéptido protegido 7 (0.63 g, 1.00 mmol) y 10% en peso de paladio sobre carbono activado (0.32 g, 0.30 mmol) en 91:9 metanol - agua (22 cm^3) se agita bajo una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente, protegido de la luz, durante 23 h. La mezcla de reacción se filtra a través de un almohadilla de Celite™ y la almohadilla se lava con 75:25 metanol - agua (200 cm^3). El filtrado se concentra hasta secado bajo presión reducida y el residuo se tritura con éter de dietilo anhidro para producir una mezcla 38: 1 de G-2-MePE y tentativamente metilamina 8 (0.27 g, 86%) como un sólido blanco extremadamente higroscópico. Estudios de HPLC de fase inversa analíticos sobre la mezcla [columna C_{18} Si Altech Econosphere, 150 x 4.6 mm, 5 □m; 5 min enjuague con H_2O (0.05% de TFA) luego gradiente estable durante 25 min a MeCN como eluyente en un índice de flujo de 1 ml/min; detección utilizando matriz de diodo] indican que es una mezcla 38: 1 de dos picos de elución con tiempos de retención

de 13.64 y 14.44 min a 207 y 197 nm, respectivamente. Se muestra que el G-2-MePE es una mezcla 73:27 trans.cis de confórmeros mediante análisis de ^1H RMN (se estima la relación a partir de las intensidades relativas del doble doblete y triplete en δ 4.18 y 3.71, asignado a los protones Gluα-H de los confórmeros mayor y menor, respectivamente): pf 144° C$^{\emptyset}$; $[\alpha]_D$ -52.4 (c 0.19 en H_2O); δ_H (300 MHz; D_2O; MeOH interno) 1.52 (3H, s, Proα-CH_3), 1.81-2.21 (6H, m, Proβ-H_2, Proγ-H_2 y Gluβ-H_2), 2.34 (1.46H, t, J 7.2, Gluγ-H_2), 2.42* (0.54H, t, J 7.3, Gluγ-H_2), 3.50-3.66 (2H, m, Proδ-H_2), 3.71* (0.27H, t, J 6.2, Gluα-H), 3.85 (1 H, d, J 16.6, Glyα-H_AH_B), 3.92 (1 H, d, J 16.6, Glyα-H_AH_B) y 4.18 (0.73H, dd, J 8.4 y 4.7, Gluα-H); (75 MHz; D_2O; MeOH interno) 21.8 (CH_3, Proα-CH_3), 25.0 (CH_2, Proγ-C), 27.8* (CH_2, Gluβ-C), 28.8 (CH_2, Gluβ-C), 32.9 (CH_2, Gluγ-C), 40.8 (CH_2, Proβ-C), 42.7 (CH_2, Glyα-C), 49.5 (CH_2, Proδ-C), 56.0* (CH, Gluα-C), 56.4 (CH, Gluα-C), 69.8 (cuat, Proα-C), 166.5 (cuat., Gly-CO), 177.3 (cuat., Pro-CON), 179.2 (cuat., Gluα-CO), 180.2* (cuat., Gluγ-CO) y 180.6 (cuat., Gluγ-CO); *m/z* (FAB+) 316.1508 ($MH^+.C_{13}H_{22}N_3O_6$ requiere 316.1509).

Ejemplo 3: Neuroprotección *in vitro*

Se examinan los efectos terapéuticos de los análogos de GPE en una serie de experimentos *in vitro* para determinar sus efectos sobre la neurodegeneración de células neuronales de diferente origen. Los sistemas *in vitro* descritos aquí son bien establecidos en la técnica y se conocen por ser predictivos de los efectos neuroprotectores observados *in vivo*, que incluyen efectos en humanos que sufren de trastornos neurodegenerativos.

Materiales y Métodos

El siguiente protocolo experimental sigue las directrices aprobadas por la Universidad de Auckland Comité de Ética Animal.

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

Se utiliza un hemisferio cortical de una rata de 1 día de nacida y se recoge en 4 ml de DMEM. La trituración se realiza utilizando una pipeta de vidrio de 5 ml y una aguja de de calibre 18. La suspensión celular se tamiza a través de un filtro celular de 100 µm y se lava en 50 ml de DMEM (centrifugación durante 5 min a 250 g). El sedimento se resuspende en 20 ml de DMEM + 10% de suero de ternero fetal. La suspensión se agrega en dos matraces de 25 cm^3 (10 ml por matraz) y se cultiva a 37° C en presencia de 10% de CO_2 seguido por un cambio del medio dos veces a la semana. Cuando las células alcanzan la confluencia, se lavan tres veces con PBS, se ajusta a Neurobasal/B27 y se incuban durante otros 3 días. Este sobrenadante se congela para almacenamiento transitorio a -80° C.

Preparación de Tejido Cortical y Estriado de Embriones E18/E19 de Rata

Se sacrifica una rata mediante tratamiento con CO_2, y luego se prepara para la cesárea. Después de la cirugía, los embriones se retiran de sus bolsas amnióticas y se decapitan. Las cabezas se colocan en hielo en medio DMEM/F12 para el

cuerpo estriado y PBS + 0.65% de D (+) - glucosa para la corteza.

Procedimiento de extracción de tejido Estriado y Preparación de las Células

Se retira todo un cerebro del cráneo con el lado ventral mirando hacia arriba en medio DMEM F12. El cuerpo estriado se diseca fuera de ambos hemisferios bajo un estereomicroscopio y el tejido estriado se coloca en un tubo Falcon en hielo. El tejido estriado luego se tritura utilizando una pipeta P1000 de 1 ml de volumen. El tejido se tritura al pipetear suavemente la solución hacia arriba y hacia abajo en la punta de la pipeta aproximadamente 15 veces, utilizando fuerza de corte en las salidas alternas. Las piezas de tejido asientan en el fondo del tubo Falcon en 30 segundos. El sobrenadante que contiene una suspensión de células individuales disociadas luego se transfiere a un nuevo tubo Falcon estéril en hielo. Las piezas de tejido se trituran de nuevo para evitar las células ya disociadas excesivamente dañadas, mediante más de trituración de las mismas. Se agrega 1 mililitro de medio DMEM F12 enfriado con hielo a las piezas de tejido en el primer tubo y se trituran como antes. Las piezas de tejido se dejan sedimentar y se retira el sobrenadante a un nuevo tubo Falcon estéril en hielo. Las células se centrifugan a 250 g durante 5 minutos a 4° C.

Plantación y Cultivo de Células estriadas

Las células estriadas se siembran en poli-L-lisina (0.1 mg/ml) recubiertas con placas de 96 pozos (sólo los 60 pozos internos) a una densidad de 200.000 células/cm^2 en medio

Neurobasal/B27 (Invitrogen). Las células se cultivan en presencia de 5% de CO_2 a 37° C bajo 100% de humedad. Se cambia el medio en los días 1, 3 y 6.

Procedimiento de Extracción de Tejido Cortical y Preparación de las Células

Los dos hemisferios corticales se retiran cuidadosamente con espátula de todo el cerebro con el lado ventral mirando al revés en una caja de Petri que contiene una solución de PBS+0.65% de D (+) - glucosa. Los fórceps se colocan en la parte rostral (cerca de Bulbo olfatorio) de la corteza para fijar el tejido y se realizan dos cortes orientados lateral-sagital para retirar el paraformaldehído y las cortezas entorrinales. Se hace un corte orientado frontal en el extremo posterior para retirar la formación hipocampal. Un corte frontal final se realiza a unos pocos milímetros de distancia del último corte con el fin de controlar el área 17/18 de la corteza visual.

Las cortezas se colocan en hielo en PBS 0.65% (+) - glucosa y se centrifugan a 350 g durante 5 minutos. El sobrenadante se retira y se agrega tripsina/EDTA (0.05%/0.53 mM) durante 8 minutos a 37° C. La reacción se detiene mediante al agregar una cantidad igual de DMEM y 10% de suero de ternero fetal. El sobrenadante se elimina por centrifugación seguida de dos lavados posteriores en medio Neurobasal/B27.

Las células se trituran una vez con una pipeta Pasteur de vidrio en 1 ml de medio Neurobasal/B27 y posteriormente

dos veces al utilizar una jeringa de insulina de 1 ml con una aguja de calibre 22. La suspensión celular se pasa a través de un filtro celular de 100 µm y se enjuaga por 1 ml de medio Neurobasal/B27. Las células se cuentan y se ajustan a 50.000 células por 60 µl.

Plantación y Cultivo de Células Corticales

Placas de 96 pozos se recubren con 0.2 mg de poli-L-lisina y posteriormente con 2 µg/ml se laminina en PBS, después de lo cual 60 µl de medio acondicionado de astrocitos corticales se agrega a cada pozo. Posteriormente, se agrega 60 µl de suspensión celular cortical. Las células se cultivan en presencia de 10% de CO_2 a 37° C bajo 100% de humedad. En el día 1, se produce un cambio de medio completo (medico acondicionado 1:1 - Neurobasal/B27 y astrocitos) con adición de 1 µM de citosina-BD-arabino-furanosido (inhibidor de mitosis). Los días 2 y 5, se cambia 2/3 del medio.

Microexplantes cerebelosos de Animales P8: Preparación, Cultivo y Fijación

Se extirpan cortezas cerebelosas laminadas de los dos hemisferios de una rata P8, se cortan en piezas pequeñas en solución de PBS + 0.65% D (+)glucosa y se trituran con una aguja de calibre 23 y posteriormente se presionan a través de un tamiz de tamaño de poro 125 µm. Los microexplantes obtenidos se centrifugan (60 g) dos veces (cambio de medio) en medio STARTV complementado con BSA libre de suero (Biochrom). Para el cultivo, 40 µl de suspensión celular se adhiere durante 3 horas en un cubreobjetos de 0.1 mg/ml de poli-L-lisina recubierto colocado en placas de 6 pozos de 35

mm de tamaño en presencia de 5% de CO_2 bajo 100% de humedad a 34° C. Posteriormente, se agrega 1 ml de medio StarTV junto con las toxinas y fármacos. Los cultivos se monitorean (evaluado) después de 2-3 días de cultivo en presencia de 5% de CO_2 bajo 100% de humedad. Para el análisis del recuento de células, los cultivos se fijan en concentraciones crecientes de paraformaldehído (0.4%, 1.2%, 3% y 4% durante 3 minutos cada uno) seguido de un lavado en PBS.

Administración de Toxina y Fármaco a Células Neurales *in vitro* y Análisis de Datos

Para estudiar los efectos neuroprotectores de los análogos de GPE, llevamos a cabo una serie de experimentos *in vitro* utilizando ácido ocadaico para provocar una lesión tóxica a las células neuronales. El ácido okadaico es una toxina reconocida en la técnica que se sabe provoca daño a las neuronas. Adicionalmente, la recuperación de las células neuronales o de la función de células neurales después de la lesión por el ácido okadaico se reconoce que es predictiva de la recuperación de las lesiones provocadas por otras toxinas.

Para provocar lesión tóxica a las neuronas, expusimos neuronas a 1: 100 partes de ácido okadaico en concentraciones de 30 nM o 100 nM y 0.5 mM de ácido 3-nitropropiónico (sólo para microexplantes cerebelosos). Se utiliza GPE (1 nM-1 mM) o G-2-MEPE (1 nM-1 mM) a los 8 días *in vitro* (DIV) para cultivos corticales y 9DIV para cultivos estriados. El tiempo de incubación es de 24 horas. El índice de supervivencia se determina por un ensayo MTT de valoración colorimétrica a 595 nm en un lector de placas de múltiples pozos. Para los

microexplantes cerebelosos se seleccionan cuatro ventanas (campo de 0.65 mm^2) con más alta densidad celular y se cuentan las células que exhiben crecimiento de neuritas.

Resultados

El análogo de GPE G-2-Mepe exhibe efectos neuroprotectores comparables dentro de los tres sistemas *in vitro* probados (Figuras 12-15).

Los cultivos corticales responden a concentraciones de GPE de 10 µM (Figura 12) o G-2-MEPE (10 µM, Figura 13) con 64% y 59% de neuroprotección, respectivamente.

Los otros 2 tipos de cultivos demuestran neuroprotección en dosis más bajas de G-2-Mepe (microexplantes cerebelos: Figura 14 y células estriadas: Figura 15). Las células estriadas demuestran neuroprotección dentro del rango de 1 nM a 1 mM de G-2-MEPE (Figura 15), mientras que los microexplantes cerebelosos posnatales demuestran neuroprotección con G-2-MEPE en el rango de dosis entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 100 nM (Figura 14). Por lo tanto, llegamos a la conclusión que el G-2-MEPE es un agente neuroprotector y puede tener efectos terapéuticos en los humanos que sufren de trastornos neurodegenerativos. Debido a que el G-2-Mepe puede ser neuroprotector cuando se administra directamente a las neuronas en cultivo, ese G-2-Mepe puede ser eficaz *in vivo* cuando se administra directamente a los cerebros de los animales afectados.

Ejemplo 4: Efectos de G-2-Mepe sobre las Neuronas Colinérgicas Estriadas en Ratas de Edad Avanzada

Para determinar si el G-2-Mepe puede afectar a las neuronas colinérgicas, se estudian ratas de edad avanzada. La colina acetiltransferasa (ChAT) es una enzima que está involucrada en la biosíntesis del neurotransmisor para los nervios colinérgicos, acetilcolina. Se sabe bien que la inmunodetección de ChAT se puede utilizar para determinar el número de nervios colinérgicos presentes en un tejido. También se sabe que la cantidad nervios colinérgicos presentes se asocia con la función fisiológica de las rutas neuronales colinérgicas en el cerebro.

En este experimento, hemos probado los efectos de G-2-MEPE en la cantidad de neuronas positivas para ChAT en cerebros de ratas de 18 meses.

Métodos

Ratas macho de dieciocho meses reciben uno de cinco tratamientos. Un grupo de control se trata con vehículo (solo solución salina (n = 4) y cuatro grupos se tratan con una sola dosis de G-2-MEPE. Las dosis de 0.012 (n = 4), 0.12 (n = 5), 1.2 (In = 5) y 12 mg/kg (n = 3), respectivamente, se dan subcutáneamente. Las ratas se sacrifican con una sobredosis de pentobarbital 3 días después del tratamiento de fármaco. Los cerebros se perfunden con solución salina normal y 4% de paraformaldehído y se fijan en fijador de perfusión durante la noche. Los cerebros se almacenan en 25% de sacarosa en PBS 0.1 M (pH 7.4) hasta que el tejido se hunde. Se cortan

secciones de corona congeladas del cuerpo estriado con un microtomo y se almacenan en 0.1% de azida de sodio en PBS 0.1 M a 4° C. La inmunorreactividad para la colina acetiltransferasa (ChAT) se establece mediante la tinción utilizando un método de sección de flotación libre. Brevemente, los anticuerpos se diluyen en 1% de suero de cabra. Las secciones se incuban en 0.2% de Triton en PBS0.1 M /Triton™ a 4° C. durante la noche antes de tinción inmunohistoquímica. Las secciones se pre-tratan con 1% de H_2O_2 en 50% de metanol durante 20 min. Las secciones luego se incuban con anticuerpos anti-ChAT de conejo (Rb) (1: 5000) (los anticuerpos primarios) en 4D en un agitador durante dos días. Se lavan las secciones con PBS/Triton™ (15 minutos x 3d) y luego se incuban con anticuerpos secundarios biotinilados anti-conejo de cabra (1: 1000) a temperatura ambiente durante la noche. Las secciones se lavan y se incuban en ExtrAvidin™ (Sigma) (1: 1000) durante 3 horas y seguido de H_2O_2 (0.01%) en tetrahidrocloruro de 3,3-diaminobencina (DAB, 0.05%) para producir un producto de reacción coloreado Estas secciones se montan en portaobjetos recubiertos de alumbre cromo, se secan, deshidran y recubren.

Las neuronas estriadas en ambos hemisferios exhiben inmunorreactividades específicas correspondientes a Chat se cuentan utilizando un microscopio de luz y una rejilla de 1 mm 2x1000. El tamaño de la región estriada utilizada para el recuento se mide utilizando un analizador de imágenes. Los recuentos totales de neuronas/mm^2 se comparan entre los grupos.

Los datos se analizan utilizando una prueba t pareada y se presentan como media +/- EEM. Los resultados se presentan en la Figura 16.

Resultados

La Figura 16A muestra que el número de neuronas immunopositive ChAT aumenta en los cerebros de los animales tratados con G-2-MEPE. Esto indica claramente que la administración de G-2-MEPE es efectiva en el aumento del nivel de ChAT en los cerebros de ratas de edad avanzada. Debido a que el Chat es una enzima implicada en la síntesis del neurotransmisor colinérgico acetilcolina, se concluye que G-2-Mepe puede aumentar la cantidad del transmisor colinérgico en el cerebro de las ratas de mediana edad.

Ejemplo 5: Efectos de la G-2-Mepe en Memoria de Referencia Espacial en Ratas

Se ha demostrado que el G-2-Mepe puede aumentar el ChAT y por lo tanto, tiene el potencial de mejorar la función neuronal colinérgica, luego examinamos si la G-2-Mepe puede ser útil en el tratamiento de los cambios relacionados con la edad en la cognición y/o memoria. Por lo tanto, llevamos a cabo una serie de estudios realizados en ratas utilizando pruebas para la memoria bien establecidas.

Experimento 1: La prueba de Laberinto de Agua de Morris

La prueba de laberinto de agua de Morris es una prueba bien reconocida para evaluar la memoria de referencia espacial en ratas.

Sujetos

Se utilizan ratas Wistar macho de 12, 8 o 4 meses de edad.

Métodos

Pruebas de Ambiente y Aparatos

La prueba del laberinto de agua de Morris se realiza utilizando una piscina de plástico negra llena hasta una profundidad de 25 cm con agua de color negro con un tinte no tóxico. La piscina tiene un inserto negro circular de manera que las paredes también parecen ser uniformes negras. La piscina se divide en cuatro cuadrantes (norte, sur, este y oeste) por dos líneas perpendiculares imaginarias que se cruzan en el centro de la piscina. Una plataforma de metal se coloca en el centro geográfico del cuadrante SE 50 cm desde el borde de la piscina, de tal manera que está 2 cm por debajo de la superficie del agua e invisible. La plataforma se mantiene en esa posición, en todo el entrenamiento.

El experimento utiliza señales extra-laberinto (es decir objetos en la habitación alrededor de la piscina) que las ratas podían utilizar para navegar a la plataforma. Se cuelgan carteles distintivos o pinturas en las paredes. Los muebles de la habitación no se mueven durante el periodo de prueba. La colocación de la piscina permite al experimentador un fácil acceso a la misma por todos los lados. La piscina se vacía y se rellena todos los días durante la prueba, con agua a 25° C +/- 2° C.

El punto más lejano en la piscina (con relación a la posición del investigador) se designado como "norte", y el resto de los puntos cardinales "este", "sur" y "oeste", son los puntos más a la derecha, abajo y más a la izquierda de la piscina, respectivamente. Estos puntos se marcan con cinta en el exterior de la piscina.

Fase de adquisición

Las ratas de cada grupo se entrenan para nadar hasta la plataforma sumergida. Las ratas reciben seis ensayos de 60 segundos por día durante cuatro días consecutivos. Un ensayo se inicia al colocar la rata en el agua frente a la pared de la piscina, en una de las cuatro posiciones de inicio (norte, sur, este, oeste). La secuencia de las posiciones de inicio se eligen seudoaleatoriamente, de modo que la ubicación de inicio de cualquier ensayo dado es diferente de aquel de la prueba anterior, y no se utiliza ubicación de inicio más de dos veces durante el entrenamiento diario. La misma secuencia de ubicaciones se utiliza para todas las ratas en un día determinado, pero varia entre días. El ensayo termina cuando la rata ha encontrado la plataforma, o en 60 segundos, lo que ocurra primero. Los ensayos se cronometran con un cronómetro. Si la rata encuentra la plataforma, se le permite permanecer allí durante 15 segundos antes de ser trasladada a un recipiente contenedor. Si no ha encontrado la plataforma, la rata se guiado allí manualmente y se coloca en la plataforma durante 15 segundos. El intervalo entre ensayos es de 60 segundos. El recipiente contendor se cubre con el fin de reducir al mínimo las interferencias entre los ensayos. En la realización de las pruebas diarias para una rata, el animal

se seca con una toalla y se coloca bajo la lámpara de calor en el cubo contenedor hasta que se seca su pelaje. El tiempo necesario para ubicar la plataforma (latencia, ss) se obtiene para cada rata en cada ensayo de entrenamiento. Si la rata no encuentra la plataforma en un ensayo dado su puntuación de latencia es la duración máxima de esa prueba (60 segundos).

Tratamiento con Fármacos

Tres días después de la finalización de la fase de adquisición, se implantan bombas mini-osmóticas (Alzet) subcutáneamente bajo anestesia con halotano) para suministrar fármaco o vehículo de forma continua durante 1 o 3 semanas. A la finalización de la infusión de las bombas se retiran y se vuelven a suturar las heridas.

Los 5 grupos de tratamiento son:

1. solución salina 1 semana (n es originalmente 7, pero una rata que perdía peso rápidamente se excluyó y luego se encuentra que tenía un tumor hipofisario);
2. solución salina 3 semanas (n = 8);
3. dosis baja de G-2-Mepe (0.96 mg/día) 1 semana (n = 8);
4. dosis baja de G-2-Mepe (0.96 mg/día) 3 semanas (n = 8);
5. dosis alta de G-2-Mepe (4.8 mg/día) 3 semanas (n = 7).

El cuarto grupo (n = 3) y las ratas de control de ocho meses de edad (n = 9) no reciben ningún tratamiento con fármacos. Las ratas de 12 meses de edad se asignan a uno de cinco grupos sobre la base de sus tiempos de natación durante adquisición, de tal manera que los grupos son aproximadamente equivalentes en su rendimiento promedio antes de recibir cualquier fármaco.

Fase de Retención (Memoria de Referencia)

Se prueba la capacidad de las ratas para recordar o para volver a aprender la ubicación de la plataforma original cuatro semanas después del entrenamiento inicial. Esto significa que el fármaco residual podrí haber sido lavado durante un mínimo de 7 días en el caso de las bombas de 3 semanas, y 21 días en el caso de las bombas 1 semana. El procedimiento de prueba de retención es idéntico a aquel de la adquisición. Los estudios farmacocinéticos indican que la concentración de G-2-MEPE administrado subcutáneamente en el plasma se eleva a un pico y luego disminuye con aproximadamente un primer patrón de orden cinético, con una vida media en plasma (t ½) de entre aproximadamente 30 y 60 minutos. Por lo tanto, en el momento en que se realiza el estudio de retención, por lo menos 7 días después de la eliminación de las minibombas que contienen G-2-MEPE, casi todo el G-2-Mepe ha sido eliminado de la circulación de los animales.

Análisis de Datos

La latencia de nado para cada rata se registra para cada ensayo para cada día de las fases de adquisición y retención

y los cambios entre las fases se examinan mediante Análisis de Varianza.

Se comparan el vehículo de 3 semanas y alta dosis de G-2-MEPE de 3 semanas en la adquisición y retención. La alta dosis de G-2-MEPE, dada durante 3 semanas, mejora la retención de la tarea original del laberinto de agua después de un retraso de 4 semanas.

Resultados

La Figura 17 muestra la comparación entre ratas de edad avanzada tratadas con dosis alta de G-2-Mepe (4.8 mg/día) y dosis baja de G-2-Mepe (0.96 mg/día), y solución salina, con los controles jóvenes (4 meses) utilizadas como controles. Antes del tratamiento con G-2-MEPE, no hubo diferencias entre los grupos de edad avanzada (12 meses de edad). En contraste, los animales de 4 meses de edad requieren menos tiempo para alcanzar la plataforma que los animales más viejos. Después de un período de 3 semanas sin prueba, tiempo durante el cual se les administra ya sea solución salina o G-2-MEPE, los animales que recibien sólo solución salina no meuestran habilidad mejorada para alcanzar la plataforma, como se indica por los tiempos similares requeridos en el día de prueba 4 de la fase de adquisición y el día de prueba 1 de la fase de retención. En contraste, los animales que reciben tratamiento con G-2-MEPE en cualquiera de las dosis alta o baja, han mejorado la memoria como se refleja en una disminución en el tiempo necesario para alcanzar la plataforma en comparación con los controles tratados con solución salina. Adicionalmente, los animales tratados con G-

2-Mepe tienen un rendimiento similar a los animales jóvenes de 4 meses de edad (Figura 17) y animales de 8 meses de edad (datos no mostrados). Por lo tanto, llegamos a la conclusión de que el G-2-Mepe puede mejorar la memoria en ratas de mediana edad, animales que habían mostrado previamente déficit de memoria en relación con ratas jóvenes. Adicionalmente, debido a que el tiempo de repetición de pruebas, el G-2-Mepe se había lavado de la circulación, llegamos a la conclusión de que los efectos que mejoran la memoria de G-2-Mepe eran probablemente debido a la mejora en la función de las neuronas colinérgicas.

Experimento 2: Prueba del Laberinto Radial de 8 Brazos

Cinco meses después del experimento original las ratas que ahora tienen 17 meses de edad se reexaminan para la memoria de trabajo espacial en un laberinto radial.

Métodos

Aparato

El aparato consiste en una plataforma central que se comunica con 8 brazos idénticos, cada uno con una taza de alimento en el extremo del mismo

Prueba de Procedimiento

Las ratas se privan parcialmente de alimentos durante por lo menos 10 días antes de, y durante todo el procedimiento de laberinto radial.

Se ensambla el laberinto y se coloca de modo que el experimentador pueda observar claramente el comportamiento de las ratas desde una ubicación predeterminada. El experimentador numera los brazos del laberinto de acuerdo con su orientación de uno a ocho en dirección horaria.

Pre-entranamiento (Pre-Fármacos)

En el primer día se insertan las puertas en los brazos y cada rata se confina en la plataforma central con 20 gránulos de alimento durante 5 minutos. Esto continúa una vez al día durante cuatro días, y se observan que todas las ratas consumen algunos de los gránulos. Al día siguiente, se les permite a las ratas explorar durante todo el laberinto cinco minutos. Todos los brazos se ceban con dos gránulos de alimento en la taza de alimentos situada en el extremo de cada brazo, y un gránulo, tanto en la entrada como a la mitad de cada brazo. Esto se repite por lo menos durante cinco días, pero hasta ocho días para las ratas que exploran poco de aquellos ocho brazos en dos sesiones consecutivas. Todas las ratas tienen una sesión final en el noveno día de pre-entrenamiento. En este punto, se decide que una de las ratas de edad avanzada que había hecho una sola entrada al brazo en ocho de los nueve días debe ser excluida de futuras pruebas en este procedimiento. De otra forma todas las ratas se incluyen, independientemente de la cantidad de exploración realizada en el pre-entrenamiento. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos viejos en el número de ingresos a los brazos en la sesión de pre-entrenamiento final (Fármacos: $F(2,31) = 0.44$, $p = 0.65$).

Tratamiento con Fármacos

30 días antes de la prueba (cinco días después del pre-entrenamiento) se implantan a las ratas macho Wistar de 17 meses de edad (bajo anestesia con halotano) minibombas osmóticas subcutáneas (Alzet) para suministrar fármacos de forma continua durante 3 semanas. A la finalización de la infusión, se retiran las bombas y se vuelven a suturar las heridas (lavado permitido de 9 días).

Los grupos de tratamiento fueron:

1. controles jóvenes (4 meses de edad), n = 6;
2. solución salina n = 10;
3. dosis baja de G-2-Mepe (2.4mg/kg/día) n = 13
4. dosis alta de G-2-Mepe (12.4mg/kg/día) n = 5

Los grupos de solución salina y de dosis bajas están comprendidos de todas las ratas que recibieren tratamientos en fase 1 de este experimento (cuando las ratas tenían 12 meses de edad), independientemente de si tenían una o tres semanas de tratamiento. Una rata en cada uno de los grupos de de solución salina y de dosis alta se ha retirado debido a tumores en la piel. Una de las ratas de dosis baja no participó en este experimento debido al hecho de que no se pudo ser entrenada previamente (ver adelante).

Pruebas (Post-Fármacos)

Se inicia la prueba de memoria de trabajo en el noveno día de lavado. Las ratas reciben 10 sesiones de entrenamiento al día durante 12 días. El procedimiento es el mismo que para el pre-entrenamiento, pero sólo se ceban las tazas de

alimentos. Las ratas tienen 6 minutos para hacer hasta 16 elecciones al visitar cualquiera de los ocho brazos. Una elección se define como algo que ocurre cuando todas las cuatro patas están en el interior de un brazo. El experimentador con lapiz y papel registra la secuencia de entradas en los brazos. Las sesiones se terminan después de haberse introducido en todos los ocho brazos, 16 elecciones realizadas, o de haber transcurrido 6 minutos. El tiempo necesario para entrar en todos los ocho brazos, cuando esto ocurre, se registra.

Análisis de Datos

Una elección de brazo se considera correcta cuando la rata entra en un brazo no visitado anteriormente. El desempeño se clasifica diariamente de acuerdo con los siguientes parámetros:

1) Elección correcta (CC) 8 - 12 es el número de elecciones correctas hechas dividido por el número total de elecciones hechas. Para los animales que no visitan todos los 8 brazos en una prueba, el denominador de esta relación se considera que es 12.

2) Elección Correcta de Trabajo (WCC) 8 - 12 es la medida de la que se derivan los datos de memoria de trabajo. Los datos se recogen como se describe para CC 8-12 anteriormente, pero para este parámetro, sólo se incluyen las ratas que entran en todos los 8 brazos en una sesión.

Las ratas que hacían menos entradas en los 8 brazos no se utilizan para determinar la memoria de trabajo porque no pueden recordar que brazos habían visitado previamente y por lo tanto tienen la memoria tan afectada que no pudieron completar la prueba, a diferencia de los animales que, por cualquier razón, no exploran el laberinto.

Resultados

CC8-12: Se presenta una mejora general para todos los grupos durante los 10 días ($F(9,324) = 4.01$, $p<0.0001$), pero sin efecto de grupo significativo ($F(3,36) = 1.19$, ns) o Grupo X días interacción ($F(27,324) = 1.05$, ns) (datos no mostrados)

WCC8-12: La Figura 18A muestra el perfil de adquisición de acuerdo con la clasificación WCC8-12 durante los 10 días de pruebas. Se presenta un efecto significativo de Grupo ($F(3,12) = 4.27$, $p = 0.029$) y días ($F(9,108) = 2.09$, $p = 0.036$), pero la interacción entre estos factores no es significativa ($F(27,108) = 1.06$, ns). El grupo de alta dosis de G-2Me-PE mostró la mayor mejora a través de los días, seguido por los controles jóvenes. Se presenta muy poca diferencia entre la dosis baja de G-2Me-PE y la solución salina.

La Figura 18B muestra los resultados que indican que las ratas expuestas a la dosis más alta de G-2-MEPE ($n = 5$) han realizado más entradas correctas para obtener gránulos de aliemnto en comparación con las ratas tratadas con vehículo (* $p <0.05$, $n = 10$). Llegamos a la conclusión a partir de

este estudio que el G-2-Mepe mejora la memoria espacial en ratas de edad avanzada.

Ejemplo 6: G-2-Mepe Aumenta Proliferación de Neuroblastos y disminuye la Astrocitosis en los Cerebros de Ratas de Edad Avanzada

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

También se sabe que una correlación histológica de la función cognitiva deteriorada es un aumento en el número de células astrocíticas en el cerebro de los animales afectados.

Por lo tanto, para determinar si el G-2-Mepe podría ser útil en estimular la proliferación de neuroblastos y en el tratamiento de astrocitosis, llevamos a cabo una serie de estudios en ratas de edad avanzada.

Métodos y Materiales

Inmunohistoquímica

Para llevar a cabo estos estudios, los tejidos se fijan y se incluyen en parafina y las secciones se obtienen utilizando métodos estándar. Las secciones coronales (6 µm) que contienen el nivel del hipocampo se cortan y montan en portaobjetos recubiertos con cromo-alúmina para tinción. Las secciones se desparafinan en xileno, se deshidratan en una serie de etanol y se incuban en regulado de fosfato salino 0.1 M (PBS).

Se utilizan anticuerpos primarios contra proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) para marcar las células y las células gliales reactivas que experimentan apoptosis y proliferación, respectivamente. Para desenmascarar el antígeno (caspasa-3 y tinción con PCNA), las secciones se calientan en 10 mM de regulador de citrato de sodio (pH 6.0) durante 1 min a alta potencia. Todas las secciones se pretratan con 1% de H_2O_2 en 50% de metanol durante 30 min para inactivar la actividad de la peroxidasa endógena. Luego, se aplica ya sea 1.5% de suero de caballo normal o 2.5% de suero de oveja normal en PBS durante 1 h a temperatura ambiente para bloquear la tinción de fondo no específica. Las secciones luego se incuban con

los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo anti-GFAP de ratón monoclonal (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU. diluido 1: 500); anticuerpo anti-PCNA de ratón (DAKA, A/S, Dinamarca, diluido 1: 100). Después de incubación con anticuerpos primarios a 4° C durante 2 d (excepto para tinción de PCNA que se incuba durante la noche) las secciones se incuban con anticuerpo secundario de cabra anti-conejo o anti-ratón de caballo biotinilado (1: 200. Sigma) a 4° C durante la noche. La ExtrAvidin™ (Sigma, 1: 200), que se había preparado 1 h antes de su uso, se aplica durante 3 h a temperatura ambiente, y luego se hace reaccionar en 0.05% de 3,3-diaminobencidina (DAB) y PBS para producir un producto de reacción de color pardo. Las secciones se deshidratan en una serie de alcoholes a xileno y se colocan en cubreobjetos con medio de montaje.

La tinción inmunohistoquímica se realiza en muestras de cerebro tomadas de grupos de control y tratados con G-2-Mepe de ratas jóvenes (4 meses de edad), de mediana edad (9 meses) y (18 meses) de edad avanzada.

Las secciones de control se procesan de la misma manera excepto el anticuerpo primario se omite de la solución de incubación. El número de células positivas a PCNA se cuentan en las zonas subventriculares y las células positivas a GFAP se clasifican en la corteza cerebral.

Experimento 1: G-2-Mepe Estimula Proliferación de Neuroblastos en Cerebros de Ratas de Edad Avanzada

La zona subventricular (SVZ) y el giro dentado (DG) son dos regiones del cerebro que alojan neurogenia adulta. Se ha reportado que la reducción de la neurogenia en SVZ y DG se co-relaciona con el declive de la memoria con el envejecimiento y se reportan que los efectos del factor de crecimiento nervioso y factor de crecimiento epidérmico en la mejora de la memoria se deben al aumento en la proliferación de progenitores de los SVZ. Se utiliza el PCNA como un marcador de proliferación celular, la proliferación celular en la SVZ se examina mediante el recuento del número de células que son positivas para PCNA. En los animales seleccionados, por lo menos algunas de las células proliferantes fueron identificadas como neuroblastos, ya que se tiñen con el agente específico celular-neuronal, doblecortina.

Se tratan ratas macho de edad avanzada de dieciocho meses intraperitonealmente con solo dosis de G2-MEPE (Dosis de cualquiera de 0, 0.012, 0.12. 1.2, 12 mg/kg). Los cerebros se recogen 3 días después de los tratamientos y se lleva a cabo la tinción inmunohistoquímica de PCNA y GFAP. El número de células PCNA positivas se cuenta en la SVZ y el número de células luego se promedia como células/mm dependiendo de la longitud de la pared del ventrículo utilizado para contar (Figura 19A). El grupo tratado con la dosis más alta (12 mg/kg, n = 5) muestra un aumento significativo en el número de células positivas a PCNA en comparación con el grupo tratado con vehículo (* $p < 0.05$, n = 7). Los datos indican un efecto dependiente de dosis de G-2PE en la mejora de la neurogenia.

El etiquetado de doble fluorescencia indica la co-ubicación de PCNA con doblecortina, un marcador de neuroblastos. La Figura 19B es una fotografía de una porción del cerebro de una rata que muestra un aumento en PCNA (verde, x20) y doblecortina (rojo, x20) en la rata tratada con la dosis más alta de G-2-MEPE (panel derecho) en comparación con la rata tratada con vehículo (panel izquierdo). Los dos marcadores claramente se co-localizan (Figura 19B, foto, x100). Llegamos a la conclusión que el G-2-Mepe puede estimular la proliferación de las células del cerebro, que incluyen los neuroblastos. Debido a que los neuroblastos son células precursoras para las neuronas, concluimos adicionalmente que, el G-2-Mepe puede aumentar la población de neuronas en los cerebros de los animales tratados con el compuesto de esta invención.

Experimento 2: G-2-Mepe Estimula Proliferación de Neuroblastos en la SVZ de Cerebros de Ratas de Mediana Edad

Se estudian los efectos de la G-2-Mepe (1.2 mg/kg) en un grupo de ratas de mediana edad, 9 meses de edad. La G-2-EPE (1.2 mg/kg) o vehículo se administra intraperitonealmente (ip). La proliferación de las células en la SVZ se examina a los 3 días después del tratamiento utilizando tinción inmunohistoquímica de PCNA. La Figura 19C muestra un aumento significativo en el número de células positivas a PCNA después del tratamiento de G-2-MEPE (** $p < 0.005$, $n = 4$). Debido a que algunas de las células proliferantes teñidas con PCNA se identifican como neuroblastos (véase el Experimento 1 anterior), llegamos a la conclusión que el G-2-Mepe puede

estimular la proliferación de neuroblastos en los cerebros de ratas de mediana edad.

Experimento 3: Astrocitosis en Cerebros Envejecidos

La creciente evidencia sugiere que la disfunción de los astrocitos en la edad avanzada puede desencadenar la inflamación, lo que lleva a la degeneración neuronal. La regulación ascendente de los astrocitos activados ha sido bien reportada y está estrechamente asociada con la pérdida de memoria con la edad, quizás a través de neurogenia endógena deprimida.

Utilizando el GFAP como un marcador para astrocitos reactivos, el número de células positivas a GFAP se cuenta en la sub-región CA4del hipocampo de ratas de edad avanzada tratadas con G-2MeP o vehículo. Se encuentra un aumento significativo en los astrocitos reactivos en el hipocampo de los animales de edad avanzada (Figura 20A), y en la corteza cerebral. Algunos de los astrocitos se asocian con capilares (Figura 20B foto, flechas) en ratas de edad avanzada en comparación con ratas jóvenes (* $p < 0,01$) y de mediana edad (* # $p < 0,01$).

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

Experimento 4: G-2-Mepe Reduce Astrocitosis en Cerebros Envejecidos

También se evalúan los efectos de la G-2-Mepe en astrocitosis en la sub-región CA4 del hipocampo de ratas de edad avanzada. Ratas Wistar macho de 18 meses de edad se asignan a 5 grupos de tratamiento como sigue: vehículo, 0.12 mg/kg/día, 0.12, 1.2 y 12 mg/kg/día (cada uno n = 6).

Se cuentan las células positivas a GFAP utilizando un programa informático (Discovery 1). Los resultados se muestran en las Figuras 20C y 20D. Se administra G-2-MEPE intraperitonealmente y se evalúan los números de células positivas a GFAP 3d después de la inyección. Utilizando un sistema visual de clasificación (0 = sin astrocitos, 1 = pocos astrocitos, 2 <50%, 3> 50%) estimamos el número de astrocitos en 5 regiones corticales diferentes.

El tratamiento con G-2-Mepe reduce el número de astrocitos reactivos en la región CA4 del hipocampo en comparación con el grupo tratado con vehículo (Figura 20C; * $p < 0.05$), particularmente los grupos tratados con dosis de 0.12 y 12 mg/kg. Se observa un efecto similar para G-2-MEPE en la corteza cerebral (Figura 20D).

Normalmente hay pocos astrocitos positivos a GFAP localizados en la capa profunda de la corteza del cerebro de las ratas y aquellos que están presentes están usualmente en estrecha asociación con las rutas de la materia blanca. Sin embargo, hemos encontrado que existen células positivas a

GFAP en la capa media de la corteza, estrechamente asociadas con los vasos sanguíneos.

Resultados de los estudios presentados en aquí indican que el envejecimiento está asociado con varios cambios en el cerebro. En primer lugar, se presenta una pérdida de memoria y función cognitiva dependiente de la edad. En segundo lugar, se presenta un aumento en los astrositos dependiendo de la edad. Todos estos hallazgos en la rata son consistentes entre sí y las funciones conocidas de los nervios colinérgicos en el mantenimiento de la función cognitiva y la memoria en animales experimentales y en humanos.

Hemos encontrado inesperadamente que un análogo de GPE, G-2-MEPE, suministrado a animales de edad avanzada, por lo menos, invierte parcialmente todo lo cambios asociados con la edad anteriores. En primer lugar, la G-2-Mepe aumenta la cantidad de ChAT presente en las células cerebrales de los animales expuestos a la neurotoxinas de ácido ocadaico o 3-NP. Este efecto de G-2-Mepe imita aquel de un agente neuroprotector bien conocido, GPE. Estos efectos se observan en las células corticales, las células del cerebelo y en las células del cuerpo estriado, lo que indica que los efectos son muy extendidos en diferentes partes del cerebro. En segundo lugar, la G-2-Mepe aumenta el Chat en el cuerpo estriado, lo que indica que las neuronas colinérgicas son sensibles a la G-2-Mepe. Estos cambios químicos e histológicos observados son paralelos a cambios en el comportamiento. Los animales de edad avanzada tratados con G-2-Mepe exhiben memoria mejorada en dos sistemas de ensayo

bien conocidos en comparación con los controles tratados con vehículo. Luego, la G-2-Mepe induce proliferación de neuroblastos en los cerebros con envejecimiento. Por último, el tratamiento con G-2-Mepe invierte el aumento de la astrocitosis observada en el hipocampo y la corteza de cerebro con envejecimiento. Los efectos de G-2-Mepe no se deben a los efectos agudos del agente; porque en muchos de los estudios citados aquí, había transcurrido tiempo suficiente desde el cese del suministro de fármaco hasta la prueba, que era probable que hubiera poco o nada de fármaco presente.

Ejemplo 7: Comparación de la Farmacocinética de la GPE y el G-2-Mepe

El propósito de estos estudios es comparar los perfiles farmacocinéticos de GPE y G-2-MEPE en animales *in vivo* utilizando métodos farmacocinéticos estándar.

Métodos

Se utilizan ratas macho adultas Wistar que pesan entre 180 y 240 g para determinar la farmacocinética de GPE y G-2-MePE. Para facilitar las inyecciones de bolo intravenoso y de toma de muestras de sangre, todas las ratas se implantaron quirúrgicamente con una cánula venosa yugular permanente bajo anestesia con halotano tres días antes del experimento. A grupos de seis ratas se les dio una sola inyección en bolo intravenoso de 30 mg/kg de GPE o 10 mg/kg de G2MePE disuelto en regulador de succinato 0.1 M (pH 6.5). Las muestras de sangre (aproximadamente 220 µl cada una) se recogen en tubos heparinizados que contienen cóctel inhibidor de proteasa

Sigma para tejidos de mamíferos en 10 y 0 min antes de la inyección de cualquiera de GPE o G2MePE, y 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 min después de la inyección de cualquiera de GPE o G2MePE. Las muestras se centrifugaron a 3000 g durante 15 min a 4° C y el plasma se retira y almacena a -80° C hasta la extracción y ensayo ya sea por radioinmunoensayo ("RIA") o HPLC de fase inversa. Los métodos de RIA y HPLC utilizados son convencionales.

Se encuentra que la eliminación del fármaco después de una única inyección intravenosa en bolo es un proceso de primer orden siguiendo la ecuación $C = C_0e^{-kt}$, donde C representa la concentración de fármaco en cualquier punto de tiempo, C_0 es la concentración cuando el tiempo (t) es igual a cero y k es la constante de velocidad de primer orden expresada en unidades de concentración por hora. La k y la vida media ($t_{1/2}$) se calculan a partir de la pendiente de la recta de regresión lineal en la fase de eliminación de la gráfica semi-logarítmica de la concentración de plasma en función del tiempo como: Log C = -kt/2.3 + log C_0. Los resultados se expresan como la media ± error estándar.

Resultados

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

Las concentraciones de plasma de GPE y el G-2-Mepe aumentan notablemente el plazo de 1 min después de inyección. Después de inyección de 30 mg/GPE/kg, se observa una concentración máxima de 40.0 ± 10.8 mg/ml. Las concentraciones de plasma de GPE luego declinan rápidamente de acuerdo con un proceso cinético de primer orden. Se encuentra que la constante de velocidad de primer orden para la GPE es 0.15 ± 0.014 ng/ml/min, se encuentra que la $T_{1/2}$ es 4.95 ± 0.43 min y se encuentra que la depuración estimada de GPE de plasma es 137.5 ± 12.3 ml/hora

Después de inyección de 10 mg/kg de G-2-MEPE, se encuentra que la concentración de pico es 191 ± 16,1 mg/ml. Las concentraciones de plasma de G-2-Mepe luego se reducen de acuerdo con un proceso cinético de primer orden. Se encuentra que la constante de velocidad de primer orden para G-2-Mepe es 0.033 ± 0.001 ng/ml/min, se encuentra que el $t_{1/2}$ es 20.7 + 0.35 min y se encuentra que la depuración estimada es 30.1 + 0.5 ml/h.

Después de la inyección, la concentración máxima en plasma de G-2-Mepe era aproximadamente 4.8 veces mayor que la concentración máxima en plasma de GPE, a pesar de la dosis más grande de GPE suministrada (30 mg/kg) en comparación con la dosis de G-2- Mepe suministrada (10 mg/kg).

El hallazgo de mayores concentraciones de plasma de G-2-Mepe que de GPE en todos los puntos de tiempo de menos de 125 minutos, a pesar de una dosis más baja de suministro de G-2-MEPE, fue totalmente inesperado sobre la base de las

concentraciones de plasma conocidas de GPE. El t de G-2-Mepe fue de 4 veces más que el $t_{1/2}$ de GPE.

El hallazgo de la vida media aumentada de G-2-MEPE en comparación con la de GPE fue completamente inesperado sobre la base de $t_{1/2}$ de GPE. El aumento de la $t_{1/2}$ de G-2-Mepe significa que el G-2-MEPE se elimina más lentamente de la circulación. Este hallazgo es totalmente inesperado en base del índice de depuración de GPE.

Llegamos a la conclusión a partir de estos estudios que el G-2-MEPE es un potente agente capaz de revertir muchos de los efectos adversos del envejecimiento en los cerebros de los animales, incluyendo los humanos. Por lo tanto los análogos de GPE, que incluyen G-2-Mepe, pueden producir efectos terapéuticos deseables, que incluyen la neuroprotección, memoria mejorada, proliferación de neuroblastos incrementada y reducción en la astrocitosis, y pueden ser valiosos en la reversión o la mitigación de los efectos adversos del envejecimiento en humanos.

Aunque se ha descrito esta invención en términos de ciertas realizaciones preferidas, será evidente para una persona medianamente experta en la técnica teniendo en cuenta ese conocimiento y esta descripción, que los equivalentes del compuesto de esta invención se pueden preparar y administrar para las afecciones describen en esta solicitud, y dichos equivalentes están destinados a ser incluidos dentro de las reivindicaciones de esta solicitud.

Ejemplo 8: Tratamiento del Síndrome de Rett I

Efectos de la G-2-Mepe sobre Longevidad y Potenciación a Largo Plazo en el Modelo de Síndrome de Rett (RTT)

Para determinar si el tratamiento con G-2-Mepe puede impactar en el desarrollo y progreso del síndrome de Rett en un modelo murino de la enfermedad, se utilizan ratones machos con MeCP2 hemicigoto (1 lox). El sistema de ratón MeCP2 modificado genéticamente (MeCP2-O) es ampliamente aceptado en la técnica ya que imitan estrechamente el rango y la severidad de las anomalías fisiológicas y neurológicas características del trastorno humano, Síndrome de Rett.

Todos los experimentos se llevan a cabo en la Universidad de Texas Southwestern Medical Center y se aprueban por la Universidad de Texas Southwestern Medical Center Animal Care and Use Committee. La G-2-MEPE es sintetizada por Albany Molecular Research Inc. (Albany, NY) y se suministra por Neuren Pharmaceuticals Limited.

Métodos

Tratamiento

Se tratan ratones machos con MeCP2 hemicigoto (1 lox) con 20 mg/kg/día de G-2-MEPE o solución salina, (0,01% de BSA, n = 15 por grupo en el experimento de supervivencia y n = 20 en el experimento LTP). Los tratamientos se administran intraperitonealmente a partir de 4 semanas después del nacimiento. Para los experimentos de supervivencia se mantiene el tratamiento a través del curso del experimento. Para el experimento de LTP los ratones se tratan hasta la semana 9 cuando se utilizan para la preparación por tajada.

Supervivencia

Los ratones mutantes deficientes MeCP2 desarrollan síntomas RTT en alrededor de 4-6 semanas de edad y mueren entre 10-12 semanas (Chen et al., 2001 Nat. Genet 27 327-331). Comparamos la supervivencia de los controles de tipo natural y los animales deficientes MeCP2 en grupos de vehículos y tratados con G-2-Mepe. La supervivencia se mide semanalmente desde el inicio del tratamiento (4 semanas) y se utiliza para producir las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para mostrar la proporción de ratones que sobrevivieron (eje y) en cada intervalo de una semana (eje x) (véase Figura 22).

Potenciación a largo plazo (Electrofisiología)

Se han reportado previamente ratones con deficiencia de MeCP2 que sufren de disfunción sináptica funcional y ultraestructural, con un deterioro significativo de la memoria dependiente del hipocampo y la potenciación a largo plazo del hipocampo (LTP) (Ivloretti et al. The Journal of Neuroscience 2006 26 (1): 319 -327). Para probar los efectos del tratamiento con G-2-MEPE en la función sináptica en el modelo de RTT comparamos el LTP del hipocampo en animales tratados con vehículo y con G-2-Mepe a 9 semanas de edad. Para ello, se mide la pendiente del fEPSP como un % de potencial de valor inicial en las neuronas en tajadas de hipocampo de ratones deficientes MeCP2 tratados con solución salina o G-2-MEPE (Figura 23).

Resultados

La Figura 22 muestra que el tratamiento con G-2-Mepe aumenta la supervivencia ratones con deficiencia de MeCP2. Los ratones de tipo natural (línea superior) son animales de control, y por lo tanto su supervivencia fue del 100% en cada momento. Los ratones con deficiencia de MeCP2 tratados con sólo solución salina mueren mucho más rápidamente (línea de puntos) que los ratones de tipo natural, de tal manera que por aproximadamente 11 semanas, sólo sobrevive el 50% de los ratones deficientes MeCP. En marcado contraste, sin embargo, inesperadamente encontramos que los ratones con deficiencia de MeCP2 tratados con G-2-Mepe sobrevivieron sustancialmente mucho más tiempo que los ratones tratados con solución salina. En aproximadamente 15 semanas, sobrevivieron el 50% de los animales. Los datos presentados inicialmente muestran que los ratones MeCP2 se ven afectados en términos de supervivencia de tal manera que el 50 por ciento de los animales habían muerto en la semana 11 en el caso de no tratados. Los animales tratados con G-2-Mepe muestran mejoría en la supervivencia, el 50 por ciento ha muerto a las 16 semanas. En este estudio, los datos de la longevidad se vieron comprometidos por procedimientos veterinarios inconsistentes, de tal manera que los ratones muertos no se han cortado sus dientes consistentemente - un requisito en ratones MeCP2 no reconocidos en el inicio del experimento. Una consecuencia fue la observación de muertes tempranas de animales no relacionadas con el síndrome de Rett (particularmente en el grupo de control). El reexamen de los datos muestra que el efecto de G-2-Mepe persiste cuando el grupo de control se vuelve a ejecutar, aunque la diferencia en los grupos sean más pequeñas (tiempo para el 50 por ciento

de muerte 13.5 semanas en los controles, 16 semanas en animales tratados con G-2 -Mepe). No se plantearon problemas de seguridad por el tratamiento con G-2-Mepe de ratones mecp2.

Estos resultados demuestran que el G-2-Mepe puede aumentar sustancialmente la supervivencia de ratones con deficiencia de MeCP2. Debido a que los ratones con deficiencia de MeCP2 son predictivos de la patología y eficacia de la terapéutica en seres humanos con síndrome de Rett, concluimos que la G-2-Mepe puede aumentar la duración de la vida de los seres humanos con síndrome de Rett.

La Figura 23 muestra los resultados de nuestros estudios para determinar si el tratamiento con G-2-Mepe aumenta la potenciación del hipocampo a largo plazo (LTP) tal como se mide por la pendiente de fEPSP en animales con deficiencia de MeCP2 en comparación con ratones mutantes tratados con solución salina. Como se muestra en la Figura 23, hemos encontrado inesperadamente que el G-2-Mepe aumenta la pendiente de fESPS en ratones deficientes de MeCP2 en comparación con los animales tratados con sólo solución salina.

Estos resultados demuestran que el G-2-Mepe puede ser eficaz en el tratamiento de ratones con deficiencia de MeCP2 *in vivo*. Debido a que los ratones con deficiencia de MeCP2 son predictivos de la patología y eficacia terapéutica de seres humanos con el síndrome de Rett, llegamos a la

conclusión de que el G-2-Mepe puede ser una terapia efectiva para las personas con el síndrome de Rett.

Ejemplo 9: G-2-Mepe Mejora la Arborización Dendrítica y Aumenta la Médula Dendrítica

Longitud

Evaluamos los efectos del tratamiento con G-2-Mepe en dendritas. Los ratones MeCP2 modificados genéticamente transgénicos (n = 15 a 20) se administran intraperitonealmente con G-2-Mepe a una dosis de 20 mg/kg una vez al día. Después del sacrificio se examinan la densidad de médula dendrítica, longitud de médula y arborización después de la tinción de Golgi después de nueve semanas, de acuerdo con la Tabla 1 adelante:

Tabla 1: Tamaño de muestra para todo los análisis de médula *y morfológico de neuronas*

Análisis	EDAD (Semanas)	Tamaño de la muestra (No. de ratones) MACHO		Tamaño de la muestra (promedio de número de neuronas o dendritas por animal)	
		KO-vehículo	KO-NNZ - G-2MePE	KO-vehículo	KO-NNZ - G-2MePE
Neurona	9	3	3	4	4

Análisis de Morfología de la médula	9	3	3	10	10

Se evalúa la longitud dendrítica por la distancia desde la soma de las neuronas del hipocampo CA1 representativas de ratones mutantes machos mecp2 nulos de 9 semanas de edad tratados con solución salina (3 neuronas analizadas de 3 ratones separados, n = 9) o G-2-MEPE (20 mg/kg ip 1/día, a partir de 4 semanas; 3 neuronas analizadas de 3 ratones separados, n = 9).

Hemos observado que el G-2-Mepe mejora la arborización dendrítica y aumenta la longitud de la médula dendrítica. La Figura 24 representa los resultados de este estudio. La longitud dendrítica en µm (eje vertical) se grafica frente a la distancia (en µm; eje horizontal) desde el soma de las células. Para células con dendritas cerca a los somas, las dendritas son cortas. Sin embargo, como el tratamiento con solución salina aumenta la distancia desde los somas (cuadrados abiertos) se producen longitudes dendríticas que aumentan a un máximo a una distancia de 70 µm del soma y se reducen a distancias más alejadas desde los somas. En contraste, el tratamiento con G-2MePE (cuadrados rellenos) produce dendritas más largas sobre gran parte del rango de distancias de los somas.

Ejemplo 10: Tratamiento del síndrome de Rett en ratones II

Apareamiento y Genotipificación de Ratones

Se utilizan ratones alelo nulos de línea germinal MeCP2 (Chen et al., 2001). La genotipificación se lleva a cabo como en Chen et al. (Chen et al., 2001).

Tratamiento con G-2-Mepe

Para las mediciones de supervivencia, el análisis de la actividad nocturna y el análisis de inmunoblot, la G-2-MEPE (sintetizada por Albany Molecular Research Inc. (Albany, NY) y suministrada por Neuren Pharmaceuticals Limited) se administra diariamente a través de inyecciones intraperitoneales (20 mg/kg, vehículo = solución salina, .01% de BSA). El tratamiento comienza en P15 y se mantiene durante todo el curso de los experimentos. Para los experimentos de fisiología intracelular, los ratones se inyectan diariamente con G-2-MEPE (20 mg/kg de peso corporal, vehículo = solución salina, 0.01% de BSA) durante 2 semanas, a partir de P15 hasta P28-P32 cuando se utilizan para la preparación tajada exacta. Para los experimentos de formación de imágenes ópticas, los ratones se inyectan con G-2-MEPE (20 mg/kg de peso corporal, vehículo = solución salina, 0.01% de BSA) a diario desde el día de la sutura de párpado hasta el día de la formación de imagen.

Preparación de Fisiología de Tajada

Las secciones de corona (300 µm de espesor) en o cerca de la corteza sensoriomotora se cortan en <4° C ACSF en un vibrátomo. Las tajadas se incuban a 37° C durante 20 minutos después de cortar, y a temperatura ambiente durante el resto del experimento. Las tajadas se transfiren a una cámara Warner y se toman registros de las neuronas piramidales

identificadas visualmente situadas en la capa 5. El líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) que contiene 126 mM de NaCl, 25 mM de $NaHCO_3$, 1 mM de $NaHPO_4$, 3 mM de KCl, 2 mM de $MgSO_4$, 2 mM $CaCl_2$, y 14 mM de dextrosa, se ajusta a 315-320 mOsm y pH 7.4, y se burbujea con 95%O_2/5.2% de CO_2. La solución de la pipeta intracelular contiene 100 mM de gluconato de potasio, 20 mM de Cl, 10 mM de HEPES, 4 mM de MgATP, .3 mM de NaGTP, y 10 mM de Na-fosfocreatina.

Registros de células completas Intracelulares

Las pipetas de borosilicato (3-5 MΩ, WPI) se extraen mediante un extractor Sutter P-80 (Sutter Instruments). Las células se visualizan con un objetivo de inmersión en agua 40x Achroplan con óptica infrarroja-DIC (Zeiss) y se detectan con una cámara de infrarrojos (Hamamatsu) que se proyecta a un monitor de vídeo. Los experimentos son impulsados por software de análisis de adquisición personalizada y en tiempo real por escrito en Matlab (Mathworks, Natick, Mass.) utilizando un amplificador Multiclamp 700B (Axon Instruments) conectado a un bloque 10 conector BNC-21 y una tarjeta de adquisición de doble canal serie M (National Instruments). Se alcanza un gigasello y rotura y los registros de células completas se verifican continuamente para los bajos niveles de fuga y resistencia en serie. Para cada grabación, se aplica un pulso de de ensayo 5 mV en la pinza de voltaje ~ 10 veces para medir la entrada y resistencia en serie. Luego, en la pinza de corriente se aplican ~10 pulsos (500 ms, 40-140 pA en incrementos de 10 Pa), para cuantificar los índices de disparo evocados y excitabilidad celular. La resistencia de acceso, escape, y la excitabilidad intrínseca celular se

verifican para que sean consistentes en todos los grupos. Por último, los EPSC espontáneos bajo pinza de voltaje a -60 mV se muestrean a 10 kHz y se filtran a paso bajo a 1 kHz. El análisis se realiza utilizando un paquete de software personalizado escrito en Matlab, con todos los eventos detectados de acuerdo con umbrales automatizados y verificada a ciegas para cada caso de forma individual por el experimentador.

Tinción de Golgi

Las muestras (<1 cm) de los ratones P28 se fijan en formalina al 10% y bicromato de potasio al 3% durante 24 horas. El tejido se transfiere después a 2% de nitrato de plata durante 2 días en oscuridad a temperatura ambiente. Las secciones de estas muestras luego se cortan a 50 µm de espesor en agua destilada. Las secciones correspondientes a la corteza motora se montan en portaobjetos, se secan al aire durante 10 minutos, y después se deshidratan a través de enjuagues secuenciales de alcohol al 95%, alcohol al 100%, y xileno, y luego se sellan con un cubreobjetos. Las imágenes de vuelven a adquirir en 10x (células enteras) y 100X (formación de imagen de médula) utilizando un microscopio confocal Zeiss Pascal 5 Exciter.

Formación de Imagen Óptica de Señales Intrínsecas

Adultos (> P60) de tipo natural (SVEV o BL6) y hembras mutantes MeCP2 (+/-) (BL6) se utilizan para este experimento. El grupo de control de tipo natural se compone ambos hermanos de camada de tipo natural de hembras MeCP2 +/- o hembras de tipo natural SVEV de la misma edad. Mediante privación

monocular, los animales son anestesiados con Avertin (0.016 ml/g) y los párpados de un ojo se sutura durante 4 días. Antes de la formación de imágenes, se retira la sutura y el ojo privado se reabre. Sólo los animales en el que las suturas de privación están intactas y la condición del ojo privado aparece sano se utilizan para la sesión de formación de imágenes. Para la activación de señalización del G-2-Mepe, se inyecta una solución que contiene G-2-Mepe intraperitonealmente (ip) diariamente durante todo el período de privación. Para las sesiones de formación de imágenes los ratones son anestesiados con uretano (1.5 g/kg; 20% de la dosis total se administra IP cada 20-30 minutos hasta el final de dosificación, también se inyecta 0.02 ml de cloroprotixen al 1% junto con la primera la administración). El cráneo se expone y una placa hecha por encargo se pega en la cabeza para minimizar el movimiento. El cráneo se adelgaza sobre VI con un taladro Dremel y se cubre con una solución de agarosa en solución salina (1.5%) y un cubreobjetos de vidrio. Durante la sesión de formación de imágenes, el animal se oxigena constantemente, su temperatura se mantiene con una manta de calefacción y los ojos se tratan periódicamente con aceite de silicona; las condiciones fisiológicas se monitorean constantemente. El ratón anestesiado se coloca delante de un monitor que exhibe un estímulo periódico presentado a uno de los ojos, monocularmente; el estímulo consiste de una barra blanca vertical u horizontal derivada de las dimensiones de 9° x72°, derivación a 9 seg/ciclo, sobre un fondo uniformemente gris. La superficie del cráneo se ilumina con una luz roja (630 nm) y el cambio de luminancia se captura por una cámara CCD (Cascade 512B, Roper

Scientific) a razón de 15 cuadros/seg durante cada sesión de estímulo de 25 minutos. Un filtro temporal de paso alto (135 cuadros) se emplea para eliminar el ruido de señal lenta, después de lo cual la señal se procesa en ordenador con el fin de extraer, en cada píxel, el componente Transformada de rápida de Fourier temporal (FFT) correspondiente a la frecuencia del estímulo. La amplitud de FFT se utiliza para medir la fuerza de la respuesta visual evocada a cada ojo. El índice de dominancia ocular se deriva de la respuesta de cada ojo (R) en cada píxel como ODI = (Rcontra-Ripsi)/(Rcontra + Ripsi). La zona binocular se define como la región activada por la estimulación del ojo ipsilateral al hemisferio formado en imagen.

Mediciones del Ritmo Cardíaco

Se mide el tiempo de la frecuencia de pulso cardiaco real utilizando un sensor de pinza de cola (oxímetro de ratón OX - Oakmont, PA). Los ratones no son anestesiados pero físicamente se refrenan en un tubo de plástico abierto equipado. Antes de la sesión de grabación se coloca el tubo durante la noche en las jaulas que alojan los animales de experimentación para permitir la habituación. La temperatura corporal se mantiene a ~82-84° C durante todo el tiempo de grabación. Grabamos 3 ensayos de 1 5 minutos para cada ratón, los ratones tienen 8 semanas de edad y se tratan con vehículo o G-2-Mepe desde P15.

Mediciones de Actividad Nocturna

La actividad motora espontánea se mide a utilizar una cámara de vigilancia de movimiento activada con haz de

infrarrojos (Opto-Varimax-MINIA; Columbus Instruments, Columbus, Ohio). Para cada experimento, un ratón se coloca en la cámara por lo menos 3 h antes de que empiecen los registros. El movimiento se monitorea durante el ciclo de oscuridad de 12 h normal (7 p.m.-7 a.m.). Se recolecta un ciclo de oscuridad por animal por punto de tiempo.

Resultados

Para probar si el tratamiento con G-2-Mepe tendrá impacto en el desarrollo de las características cardinales de la enfermedad de RTT, a animales mutantes de 2 semanas de edad se les dan diariamente inyecciones intra-peritoneales durante el curso de su vida útil. Las mediciones de la fisiología sináptica, composición molecular sináptica, y la plasticidad cortical luego se adquirieron como se detalla a continuación, junto con las mediciones relacionadas con la salud tales como el ritmo cardíaco, niveles de actividad locomotora, y vida útil.

Efectos de la G-2-Mepe en la Fisiología Sináptica de Ratones MeCP2 Mutantes

Los estudios recientes han informado de que las neuronas a través de múltiples regiones del cerebro de ratones MeCP2-/y muestran una profunda reducción en la actividad espontánea (Chang et al., 2006;. Chao et al., 2007; Dani et al., 2005;. Nelson et al., 2006) un fenotipo que es rescatado por la sobre expresión de BDNF (Chang et al., 2006). Del mismo modo, se ha demostrado que la aplicación aguda de un derivado de IGF-1 eleva amplitudes de corriente excitadoras postsinápticas evocadas (EPSC) en un 40% en cultivos de

hipocampo de rata (Ramsey et al., 2005; Xing et al., 2007). Para probar la eficacia de la G-2-MEPE en el rescate del fenotipo fisiológico MeCP2-/y, adquirimos registros de células completas intracelulares en tajadas exactas de cerebro, medimos la unidad sináptica excitadora (amplitud y frecuencia EPSC espontánea) en neuronas corticales de la capa 5. Aquí, los EPSC registrados de animales -/y se reducen significativamente en comparación con EPSC medidos en los animales de tipo natural. La tendencia se revierte parcialmente en EPSCs grabados de animales MeCP2-/y tratados con G-2-Mepe, que son significativamente mayores en amplitud que los EPSCs de ratones MeCP2-/y tratados con vehículo. Estas diferencias también se observan cuando se promedian través de las células. A través de estas medidas, la resistencia al acceso, escape, y la excitabilidad intrínseca celular también se verifican para que sean consistentes en todos los grupos. Los intervalos EPSC de cuantificación también muestran un ligero aumento en el intervalo entre eventos EPSC (reducción de la frecuencia EPSC) entre los animales de tipo natural y Mecp2/y ($P = 0.04$, prueba de Kolmogorov-Smirnov). Nuestros resultados por lo tanto indican que la reducción de la conducción sináptica excitadora en las células corticales de ratones MeCP2-/y, y su rescate parcial tras el tratamiento con G-2-MEPE, se deben en parte a un cambio en la amplitud EPSC como consecuencia de un cambio en la fuerza de las sinapsis que median la transmisión excitadora en esta región.

Tratamiento de G-2-Mepe Estimula la Maduración de Médula Cortical

Utilizamos la tinción de Golgi para marcar las neuronas escasamente y con claridad, y la aplicamos en formación de imagen confocal de alta resolución para medir la densidad de la médula dendrítica y la morfología de las células marcadas, lo que restringe el análisis a las neuronas piramidales de la capa 5 en las secciones de la corteza motora de los ratones en período crítico (P28).

Mientras que la formación de imagen de baja magnificación delinea claramente el alcance de las dendritas de las células piramidales utilizamos mayores magnificaciones para contar los contactos sinápticos y determinar la clase morfológica de cada médula. Clasificamos médulas como grande y bulbosa ("hongo", M), cortas y regordeta ("regordeta ", S), corta y delgada ("delgada", T) o con filopodios (F). La comparación de la densidad de las médulas por rama de unidad muestra una tendencia a la disminución de la densidad de la médula en las neuronas en modificadas genéticamente que se mejora en gran medida en las modificadas genéticamente con tratamiento.

En conjunto, estos resultados indican el potencial de déficit en el número y el estado de maduración de los contactos dendríticos en células modificadas para apoyar los defectos funcionales en la transmisión excitadora, de una manera que se pueda tratar después de la administración de G-2-MEPE.

La plasticidad de dominancia ocular (OD) en ratones MeCP2 +/- Adulto se reduce por G-2-Mepe

Los cambios del desarrollo en plasticidad OD se controlan en parte por la activación de la ruta IGF-1, y la administración de (1 -3) IGF-1 puede reducir la plasticidad OD de tipo natural en ratones jóvenes (Tropea et al., 2006). Nosotros por lo tanto, probamos si el tratamiento con G-2-Mepe puede estabilizar la plasticidad OD prolongada observada en mutantes MeCP2 adultos. Ratones MeCP2 +/- hembra, P60 o más, se privan monocularmente durante 4 días y se tratan simultáneamente con el G-2-Mepe. El tratamiento con G-2-Mepe reduce la plasticidad OD en ratones Mecp2+/- privados, lo que indica que, efectivamente, G-2-Mepe puede inducir rápidamente a la estabilización de sinapsis o maduración.

La bradicardia en Ratones MeCP2-/y se trata mediante G-2-Mepe

Además de examinar la eficacia de la G-2-Mepe para mejorar los síntomas neurofisiológicos, tratamos de caracterizar sus efectos en la salud general del organismo. La evidencia clínica y experimental muestra disfunciones del sistema autonómico tales como ritmos respiratorios lábiles y tono vagal cardíaco reducido de valor inicial en pacientes con Síndrome de Rett (Julu et al., 2001). Un pobre control de los mecanismos de retroalimentación que regulan la homeostasis de la presión arterial a través del sistema simpático, por ejemplo disminución inducida por la hiperventilación de la frecuencia cardiaca, es común en los pacientes con Síndrome de Rett y puede provocar arritmias cardiacas potencialmente mortales (Acampa and Guideri, 2006; Julu et al ., 2001).

La patogenia de la disautonomía cardiaca, aunque no se entiende bien, sugiere que las conexiones neuronales inmaduras en el tronco cerebral podrían ser la causa. Para examinar anomalías del ritmo cardíaco en ratones Mecp2-/y y el efecto del tratamiento con G-2-Mepe, se monitorea la frecuencia del pulso cardíaco en tiempo real en animales de tipo natural y MECP2/y sin anestesia tratados con vehículo o G-2-Mepe. Los ratones de tipo natural exhiben una distribución regular de las mediciones del ritmo cardíaco centrada cerca de 750 latidos por minuto. En contraste, los ratones MeCP2-/y muestran un ritmo cardíaco más irregular con un índice promedio más bajo, la ocurrencia de que se reduce significativamente luego del tratamiento con G-2-MEPE.

La administración de G-2-Mepe mejora la actividad locomotriz y Duración de la vida

Los ratones MeCP2-/y desarrollan síntomas de Rett-que empiezan a las 4-6 semanas de edad cuando progresivamente se vuelven letárgicos, desarrollan ataxia de marcha y mueren entre 10 y 12 semanas de edad (Chen et al., 2001). La actividad locomotora de valor inicial también se registra en ratones después de 6 semanas por contar los eventos de cruce de haz de infrarrojos nocturnos dentro de un área enjaulada. Los ratones MeCP2 modificados genéticamente (O) exhiben niveles de actividad locomotora marcadamente reducidos en comparación con los ratones de tipo natural (WT), pero el tratamiento con G-2-Mepe (OT) eleva los niveles.

Por último, en comparación con compañeros de camada MeCP2 KO, los ratones MeCP2-/y tratados con G-2-Mepe también

muestran un aumento ~50% en la esperanza de vida (un aumento en la el índice de probabilidad de supervivencia 0.5).

También medimos el efecto del tratamiento con G-2-Mepe sobre el tamaño de soma neuronal en el hipocampo. Los ratones son tratados con G-2-MEPE como se ha descrito anteriormente para la actividad locomotora. El tamaño del soma en las neuronas en la región CA3 del hipocampo se ve deteriorado de manera significativa en animales MeCP2 KO con relación a los animales de tipo natural. El tratamiento con G-2-Mepe aumenta el tamaño medio del soma en los animales KO, pero tiene poco o ningún efecto sobre el tamaño soma en animales de tipo natural.

Ejemplo 11: Efecto de G-2-Mepe Oral sobre la Supervivencia en el Síndrome de Rett en Ratones

Debido a que el síndrome de Rett es un trastorno crónico y debilitante que implica la pérdida de las habilidades motoras, es conveniente tratar el síndrome de Rett con preparaciones administradas fácilmente. Para ello, podemos aprovechar las propiedades terapéuticas y farmacocinéticas inesperadamente benéficas de los compuestos G-2-Mepe y compuestos relacionados (Patente Estadounidense Nos. 7,041,314, 7,605,177, 7,714,070. 7,863,309 y Solicitud Estadounidense Nos. 11/315,784 y 12/903,844).

Por lo tanto, administramos G-2-Mepe por vía oral a ratones con deficiencia de MeCP2 como se describe en US 2009/0074865. Brevemente, una solución acuosa, una emulsión de agua-en-aceite (micro-emulsión, emulsión gruesa o de

cristal líquido), o una composición de gel que contiene una cantidad farmacéuticamente efectiva de G-2-MEPE (20 o 80 mg/kg por animal) se administra diariamente. En el control de animales con deficiencia de MeCP2, administramos solamente suero, y los animales de tipo natural se utilizan para obtener datos de referencia similar al diseño de los estudios descritos en el Ejemplo 8.

En los animales de tipo natural, la supervivencia se define como el 100% en cada punto de tiempo. En Animales con deficiencia de MeCP2, la supervivencia se reduce sustancialmente. Sin embargo, después de la administración oral de G-2-Mepe a ratones con deficiencia de MeCP2, la supervivencia se incrementa sustancialmente.

Ejemplo 12: Efecto del G-2MePE en la Actividad Convulsiva en el síndrome de Rett en Ratones

Debido a que las convulsiones son prominentes, peligrosas y difíciles para tratar aspectos del Síndrome de Rett, determinamos los efectos del G-2MePE de actividad de convulsión en animales con deficiencia de MeCP2. El G-2-Mepe puede ser efectivo en el tratamiento de la actividad convulsiva en los animales con enfermedad neurodegenerativa (Patente Estadounidense No. 7,714,020). Por lo tanto, llevamos a cabo experimentos para determinar si el G-2-Mepe también puede tratar las convulsiones en ratones con deficiencia de MeCP2.

Los registros electroencefalográficos de ratones de tipo natural y ratones con deficiencia de MeCP2 tratados con

solución salina o G-2-Mepe se obtienen utilizando los métodos descritos en la Patente Estadounidense No. 7,714,020.

Encontramos que el G-2MePE puede ser efectivo en la disminución de ambas crisis motoras y convulsiones no convulsivas.

Conclusiones

Sobre la base de nuestros estudios *in vivo* e *in vitro* en animales con deficiencia de MeCP2, llegamos a la conclusión que el G-2-Mepe puede ser una terapia efectiva para el tratamiento de seres humanos con el Síndrome de Rett. Por otra parte, debido a que el G-2-MEPE tiene inesperadamente vida media más larga que un compuesto que se produce naturalmente ((1 -3) IGF-1; glicil-prolil-glutamato o GPE) (Figura 21), llegamos a la conclusión de que el uso de G-2 - Mepe tiene ventajas claras y sustanciales con respecto a otros agentes farmacológicos, que incluyen GPE.

Por ejemplo, el G-2-Mepe no es degradado por las células gastrointestinales, es absorbido por las células gastrointestinales, y es activo en el sistema nervioso central después de administración oral (Wen et al., Solicitud Estadounidense No. 12/283,684; U.S. 2009/0074865, Patente Estadounidense No. 7,887,839, que se incorpora completamente aquí mediante referencia), por lo tanto,el G-2MePE no necesita ser suministrado por vía intravenosa, subcutánea, intraventricular, o parenteral. De hecho, las formulaciones orales que comprenden micro-emulsiones, emulsiones gruesas,

preparaciones de cristal líquido, nanocápsulas e hidrogeles se pueden utilizar en la fabricación de preparaciones administradas por vía oral tales como comprimidos, cápsulas y geles que pueden mejorar la función neurológica y el tratamiento de condiciones neurodegenerativas (Patente Estadounidense No. 7,887,839). Los compuestos de esta invención se pueden utilizar en situaciones en las que el funcionamiento motor de un paciente es inferior al necesario para tragar un comprimido o cápsula. Hay varios tipos de geles solubles para la administración oral de compuestos, y estos pueden ser utilizados para suministrar un compuesto o composición de esta invención a un paciente. Debido a que se puede administrar fácilmente el G-2-Mepe por vía oral y es efectivo por esta vía en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, que incluyen el síndrome de Rett, llegamos a la conclusión de que el G-2-Mepe puede ser conveniente y beneficioso para la terapia a largo plazo de los pacientes con el síndrome de Rett.

Adicionalmente, debido que el síndrome de Rett comparte características clave con otros trastornos del espectro autista, los compuestos de esta invención pueden ser útiles para proporcionar un beneficio terapéutico a animales que tienen otro ASD, y en humanos con autismo, Síndrome de Asperger, Trastorno Desintegrativo de la Infancia, Y Trastorno Generalizado Del Desarrollo - No Específico (PDD-NOS).

Ejemplo 13: Tratamiento de los ASD

Modelo de Ratón con Deficiencia de Shank3

Los ratones con deficiencia de Shank3 se utilizan en el estudio como un modelo de síndrome de supresión 22q13 asociado con ASD.

El síndrome de supresión 22q13 se ha relacionado con supresiones o mutaciones en el gen Shank3 (Bonaglia et al, 2006). Los códigos del gen Shank3 para una proteína de andamiaje maestro que forma la estructura principal en las sinapsis glutamatérgicas (Boeckers et al, 2006). El Shank3 es una parte crucial del núcleo de la densidad postsináptica (PSD) y recluta a muchos de los elementos funcionales clave para el PSD y para la sinapsis, que incluyen los componentes del ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA), receptores de glutamato metabotrópico (mGlu), y glutamato N-metil-D-aspártico (NMDA), así como los elementos del citoesqueleto. Estudios recientes que exploran el índice de supresiones 22q13 /mutaciones Shank3 sugieren que la haploinsuficiencia de Shank3 puede provocar una forma monogénica de ASD con una frecuencia de 0.5% a 1% de los casos con ASD (Durand et al, 2007; Moessner et al, 2007; Gauthier et al, 2008).

La generación del modelo de ratón con la expresión alterada de Shank3 de longitud completa se ha descrito previamente en la técnica (Bozdagi et al., Molecular Autism 2010, 1: 15, p4). Brevemente, se utilizan citoblastos embrionarios Bruce4 C57BL/6 para generar una estirpe de ratón que tenga sitios loxP insertados antes del exón 4 y el exón 9. El alelo floxed se divide y se mantiene una estirpe con

una supresión de los exones 4 a 9, es decir, una supresión completa de los dominios de anquirina repetidos de Shank3. se produce ratones de tipo natural (+/+), heterocigotos (+/-) y modificados genéticamente (-/-), con frecuencias mendelianas de cruces heterocigotos-heterocigotos. Una reducción del 50% de la longitud completa de ARNm Shank3 se confirma en los heterocigotos (qPCR), así como una expresión reducida de proteína Shank3 (por inmunotransferencia con anticuerpo Shank3 N69/46).

Los ratones heterocigotos generados por el cruce de los ratones de tipo natural con heterocigotos se utilizan en este ejemplo para el mejor modelo de haploinsuficiencia de Shank3, responsable de síndrome de supresión 22q13.

Métodos

Tratamiento con Fármacos

Se dividen ratones de 1 a 3 meses de edad, de tipo natural y heterocigotos en 4 grupos de tratamiento: tipo natural tratados con placebo, grupo tratado con placebo, y dos grupos tratados G-2-Mepe con deficiencia de Shank3. A los animales se les da un placebo (agua) o se les formula G-2-Mepe en agua administrada por vía oral, b.i.d. durante 14 días. El G-2-MEPE se administra en dos dosis: 15 o 60 mg/kg.

Metodología

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

Análisis De Comportamiento

Las evaluaciones de comportamiento se hacen en varios puntos de tiempo, e incluyen el análisis de interacciones sociales y la comunicación social, por ultrasonido, de acuerdo con la metodología descrita por Bozdagi et al. En pocas palabras, se evalúan las interacciones sociales entre machos y hembras en cada grupo de tratamiento. Los sujetos machos se alojan en grupo, y se prueban individualmente en jaulas limpias con arena limpia. Cada sesión de prueba dura 5 min. Cada uno de los ratones sometidos está emparejado con una hembra diferente C57BL/6J estro desconocida. Una cámara de circuito cerrado de televisión digital (Panasonic, Secaucus, NJ, EE.UU.) se coloca horizontalmente a 30 cm de la jaula. Un micrófono ultrasónico (cápsula de condensador de micrófono Avisoft UltraSoundGate CM 15; bioacústica Avisoft, Berlín, Alemania) se monta 20 cm por encima de la jaula. La frecuencia de muestreo para el micrófono es de 250 kHz, y la resolución es de 16 bits. Mientras que el equipo utilizado no puede distinguir entre las llamadas emitidas por el sujeto masculino y la pareja femenina, la preponderancia de las llamadas durante las interacciones macho-hembra en ratones se emite por lo general por el macho. Todo el aparato está contenido en una cámara de atenuación del sonido del ambiente (ENV-018V; Med Associates, St. Albans, VT, EE.UU.) iluminada por una sola luz roja 25 vatios. Los videos de los sujetos masculinos son posteriormente calificados por un investigador desinformado del genotipo del sujeto y el grupo de tratamiento en las medidas de olfateado nariz a nariz, olfateado nariz a anogenital y olfateado de otras regiones del cuerpo, utilizando el software Observador Noldus (Noldus

Information Technology, Leesburg, VA, EE.UU.). las vocalizaciones ultrasónicas se identifican manualmente por dos investigadores altamente capacitados cegados a la información del grupo de genotipo/tratamiento y las estadísticas de resumen se calculan utilizando el paquete Avisoft. La confiabilidad es del 95%. Los datos se analizan mediante una prueba de t de Student no pareada para datos independientes.

Se realizan pruebas de habituación/deshabituación olfativa en ratones machos y hembras de cada grupo. La metodología es como se describe previamente (Silverman et al 201. Yang et al 2009 y Silverman et al 2010). Los olores no sociales y sociales se presentan en una serie de hisopos de algodón insertados en la jaula de alojamiento en secuencia, cada uno por 2 min, en el siguiente orden: agua, agua, agua (agua destilada), almendra, almendra, almendras (1: 100 de dilución extracto de almendra); plátano, plátano, plátano (1: 100 dilución saborizante artificial de plátano); sociales 1, sociales 1, sociales 1 (palpado del fondo de una jaula que aloja un ratón B6 desconocido emparejado por sexo); y social 2, social 2, social 2, (palpado del fondo de un segundo alojamiento que aloja un grupo diferente de ratones no familiares 129/SvImJ emparejados por sexo). Se llevan a cabo mediciones repetidas de una vía ANOVA dentro de cada grupo de tratamiento para cada conjunto de eventos de habituación y cada evento de deshabituación, seguido de un prueba post hoc de Tukey.

Electrofisiología de Tajada de Hipocampo

Post-mortem, tajadas de hipocampo agudas (350 µm) se preparan a partir de ratones utilizando un cortador de tejidos. Las tajadas se mantienen y los experimentos se llevan a cabo a 32° C. Las láminas se sometieron a perfusión con solución de Ringer que contiene (en mM): NaCl, 125.0; Cl, 2.5; $MgSO_4$, 1.3; NaH_2PO_4, 1.0; $NaHCO_3$, 26.2; $CaCl_2$, 2.5; glucosa, 11.0. La solución de Ringer se hace burbujear con 95% de O_2/5% de CO_2, a 32° C, durante los registros extracelulares (solución de electrodo: NaCl3 M). Las tajadas se mantuvieron durante 1 hora antes de establecer un valor de referencia de campos potenciales postsinápticos excitadores (fEPSPs) grabados de estrato radiado en el área de CA1, evocados por la estimulación de las fibras aferentes colateral comisurales de Schaffer (100 µs pulsos cada 30 s) con electrodos tungsteno bipolares colocados en el área CA3. La prueba de intensidad del estímulo se ajusta para obtener fEPSPs con amplitudes que son la mitad de la respuesta máxima. La pendiente inicial EPSP (mV/ms) se determina a partir de la forma de onda promedio de cuatro respuestas consecutivas. Las curvas de entrada-salida (I/O) se generan al graficar la pendiente fEPSP versus la amplitud de descarga de fibra en Mg^{2+} bajo (0.1 m) de solución. Las relaciones IO mediadas por el receptor NMDA y mediadas por el receptor AMPA se miden en presencia de antagonistas de los receptores ionotrópicos de glutamato: APV ácido 2-amino-2-fosfonopentanoico (50 µM) y 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona CNQX (100 µM). Las respuestas de pulsos emparejados se miden con intervalos interestímulo de 10 a 200 ms, y se expresan como la relación de las respuestas promedio al

segundo impulso de estimulación hacia el primer impulso de estimulación.

La LTP se induce ya sea por un estímulo de alta frecuencia (cuatro trenes de 100 Hz, 1 s de estimulación separado por 5 min), o por estimulación de teta-descarga (TBS) (10 descargas de cuatro pulsos a 100 Hz separados por 200 ms), o por una sola estimulación de100 Hz, para el control y los ratones genéticamente modificados. Para inducir depresión a largo plazo (LTD), las colaterales de Schaffer son estimuladas por una baja frecuencia de pulsos emparejados de estímulo de baja frecuencia (900 pulsos a 1 Hz durante 15 minutos) para inducir LTD dependiente del receptor de mGlu. Los datos se expresan como la media ± desviación estándar, y los análisis estadísticos se realizan mediante análisis de la varianza (ANOVA) o prueba t de student, con la significación fijada en un nivel de 0.05.

Resultados

Comportamiento

La duración acumulativa del olfateado social total por los sujetos de prueba macho es menor en el grupo con deficiencia de Shank3 tratado con placebo que en el grupo de tipo natural tratado con placebo. Adicionalmente, un menor número de vocalizaciones ultrasónicas son emitidas por el grupo con deficiencia de Shank3 tratado con placebo que por los controles de tipo natural durante las interacciones sociales entre machos y hembras.

El tratamiento con G-2-MEPE en los dos grupos resulta en un aumento significativo en la duración acumulada del total de olfateado social en comparación con el grupo con deficiencia de Shank3 tratado con placebo. Por otra parte, los grupos tratados con G-2-Mepe muestran un aumento del número de vocalizaciones ultrasónicas que el grupo tratado con placebo mutante.

En el estudio de habituación/deshabituación olfativa, la intención para confirmar que los ratones son capaces de detectar las feromonas sociales, todos los 4 grupos exhiben niveles normales de habituación (indicado por la disminución del tiempo pasado en oler la secuencia de los tres mismos olores), y la deshabituación esperada (indicada por el aumento de estado en olfatear los olores diferentes).

Electrofisiología

La gráfica de la pendiente de campo de potencial excitador postsináptico (fEPSP) versus la intensidad de estímulo demuestra una reducción en las curvas de I/O en el grupo tratado con placebo versus el grupo de control. En el grupo tratado con placebo heterocigoto también se observa una disminución de los potenciales de campo mediados por el receptor AMPA, que se refleja en una disminución del 50% en la pendiente promedio de la función I/O en comparación con el grupo de control de tipo natural. En contraste, cuando se analiza la relación I/OO en la presencia del antagonista del receptor kainato/AMPA competitivo CNQX para medir la función del receptor de NMDA sináptico, no hay diferencia entre el tipo natural y los grupo heterocigotos tratados con placebo.

Estos resultados indican que hay una reducción específica de transmisión basal mediada por el receptor AMPA en los ratones heterocigotos Shank3.

El tratamiento con G-2-MEPE en ambos grupos heterocigotos normaliza los potenciales de campo mediadas por el receptor AMPA y provoca un aumento de la pendiente media de la función de I/O en comparación con el grupo tratado con placebo.

El mantenimiento de la LTP en el grupo con deficiencia de Shank3 tratado con placebo se deteriora claramente en comparación con el control de tipo natural. Las pruebas TBS para LTP (10 descargas de cuatro pulsos a 100 Hz separados por 200 ms) también muestran una disminución significativa en la potenciación 60 min después del TBS en el grupo con deficiencia de Shank3 tratado con placebo. En contraste con la plasticidad sináptica alterada observada con LTP, la depresión a largo plazo (LTD) no se cambia significativamente en el grupo mutante.

El tratamiento con G-2-Mepe aumenta la potenciación a largo plazo del hipocampo (LTP) y su mantenimiento en el grupo en comparación con el grupo con deficiencia de Shank3 tratado con placebo.

Discusión

La competencia social deficiente y conductas repetitivas son las características comunes y las medidas de diagnóstico claves de todas las formas de ASD. El desarrollo intelectual

retardado y las habilidades de lenguaje subdesarrolladas son también una característica común presente en todos los ASD, excluyendo el síndrome de Asperger.

Los modelos animales descritos anteriormente han sido aceptados en la técnica ya que demuestran síntomas similares a las condiciones clínicas humanas. Todos los modelos mutantes mencionados anteriormente (NLGN3, NLGN4, CADM 1, NRXN 1, FMR1, Shank3) exhiben habilidades sociales deterioradas o aumento de la ansiedad social. La transmisión excitadora reducida en el hipocampo se ha identificado en modelos animales mutantes NRXN1, Shank3, MeCP2 y FMR1. En la actualidad no se han descrito modelos poligénicos o multifactoriales de ASD. Los modelos animales descritos anteriormente, sobre la base de defectos genéticos que so concodiso por producir ASD en la población humana, proporcionan la mejor oportunidad para poner a prueba la eficacia de las terapias ASD.

Por lo tanto la eficacia de la G-2-MEPE en modelos animales de ASD es razonablemente predictiva de la eficacia en un sujeto humano que sufre de ASD.

Ejemplo 14: El Tratamiento G-2-Mepe Cambia la Morfología de las Neuronas en un Modelo Humano in vitro del Síndrome de Rett

Para probar los efectos de la G-2-Mepe en la morfología neuronal, hemos utilizado un modelo *in vitro* de RTT descrito en Marchetto et al., Un modelo para el desarrollo neural y el

tratamiento del síndrome de Rett con citoblastos pluripotentes inducidos humanos, Cell 143:527-539 (2010) (que incluyen información complementaria). El modelo utiliza los citoblastos pluripotentes inducidos (iPSCs) generados a partir de fibroblastos de pacientes RTT humanos que llevan diferentes mutaciones MeCP2.

Métodos

Cultivo de Células e Infección por Retrovirus

Fibroblastos RTT (que llevan a 4 mutaciones MeCP2distintas) y fibroblastos de control se generan a partir de explantes de biopsias dérmicas. El shRNA contra el objetivo gen MeCP2 se clona en el vector de lentivirus LentiLox3.7 (como se describe en Marchetto et al.). Los fibroblastos están infectados con vectores retrovirales de reprogramación (Sox2, Oct4, c-Myc y 1f4). Dos días después de la infección, los fibroblastos se colocan en placas en fibroblastos embrionarios de ratón inactivados mitóticamente con medio hESC. Después de 2 semanas, las colonias IPSC que emergen del fondo de los fibroblastos se recogen manualmente y se transfieren a condiciones libres de alimentador en placas recubiertas con gel de matriz (BD) utilizando medios de cultivo de citoblastos embrionarios mTeSR™ (Stem Cell Technologies) y se pasan manualmente. Los perfiles de expresión génica de los clones generados se miden utilizando matrices de genoma humano Affymetrix Gene Chip™ para confirmar que la reprogramación se realiza correctamente.

Diferenciación Neural: NPCs y neuronas maduras

Para obtener células progenitoras neuronales (CPN), los cuerpos embrioides (EB) se forman por disociación mecánica de grupos de células y plateados en placas de baja adherencia en medio de citoblastos sin FGF2 durante 5-7 días. Después de eso, el EBS se coloca en placas recubiertas de poli-ornitina/laminina en medio DMEM/F12 más N_2 (suplemento libre de suero para el crecimiento y expresión de las células postmitóticas). Las rosetas resultantes se recogen después de 7 días y se disocian con acutasa y se colocan en placas recubiertas con medios NPC (DMEM/F12; 0.5X N2; 0.5X B27 y FGF2). Las poblaciones homogéneas de NPC se alcanzan después de 1 -2 pasos con acutasa en la misma condición. Para obtener las neuronas maduras, se trata flotación de EBS con 1 uM o ácido retinoico durante 3 semanas (dando el tiempo total de diferenciación de 4 semanas). Los EBs maduros se disocian con papaína y DNAsa durante 1 h a 37° C y se colocan en placas recubiertas de poli-ornitina/laminita en medio NPC sin FGF2.

Tratamiento con G-2-Mepe

Los cultivos neuronales RTT son tratados con G-2-MEPE (1 nM-10 µM) durante 1 semana.

Inmunocitoquímica y Cuantificación de la Morfología Neuronal

Las células se fijan en paraformaldehído al 4% y se permeabilizan con 0.5% de Triton X-100 en PBS. Las células luego se bloquean en PBS que contiene 0.5% de Triton-X 100 y 5% de suero de burro durante 1 h a temperatura ambiente. Las señales fluorescentes se detectan utilizando un microscopio invertido Zeiss y las imágenes se procesan con Photoshop CS3.

Se utilizan los siguientes anticuerpos primarios: TRA-1 -60. TRA-1 -81 (1: 100), Nanog y Lin28 (1:500), Nestina humana (1: 100), Tuj-1 (1:500), Map2 (1: 100); meCP2 (1: 1000; VGLUT1 (1:200), Psd95 (1:500), GFP (1:200), Soxl (1:250), Mushasi 1 (1:200) y me3H3 27 (1:500). El tamaño del soma celular se mide mediante el software adecuado (por ejemplo ImageJ) después de la identificación de las neuronas que utilizan la Syn::EGFP™. La morfología de las dendritas neuronales y las médulas se estudian desde una proyección individual de secciones ópticas de z-pilas y se escanea en incrementos de 0.5um que se correlacionan con la resolución valorada en el plano z. Cada sección óptica es el resultado de 3 escaneos a 500 LPS seguido de filtrado de Kalman. Para la cuantificación de sinapsis, las imágenes son tomadas por una etapa z de 1 um utilizando microscopio confocal Biorad radiance™ 2100. La cuantificación de sinapsis se hace cegada al genotipo. Sólo se cuentan los VGLUT1 que puntean a lo largo de los procesos positivos a Map2. La significancia estadística se prueba utilizando ANOVA de 2 vías y prueba posteriormente Bonferroni.

Formación de Imagen de calcio

Las redes neuronales derivadas de iPSCs humanos se infectan con el vector lentiviral que lleva la construcción reportera Syn: DsRed. Los cultivos de células se lavan dos veces con regulador de HEPES kreb estéril (KHB) y se incuban con 2-5 µM de Fluo-4AM™ (Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA) en KHB durante 40 minutos a temperatura ambiente. El exceso de tinte se elimina al lavar dos veces con KHB, y se realiza 20 minutos adicionales de incubación

para equilibrar la concentración de colorante intracelular y permitir desesterificación. Las secuencias de imágenes con lapso de tiempo (aumento de 100X) de 5000 marcos se adquieren a 28 Hz con una región de 336*256 píxeles, utilizando una cámara digital Hamamatsu ORCA-ER™ (Hamamatsu Photonics KK, Japón) con un filtro de 488 nm (FITC) en un microscopio invertido de fluorescencia confocal Olympus 1X81 (Olympus Optical, Japón). Las imágenes se adquieren con MetaMorph 7.7™ (MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA). Las imágenes se procesan posteriormente utilizando ImageJ™ y rutinas escritas personalizadas en Matlab7.2™ (Mathworks, Natick, MA).

Electrofisiología

Se realizan registros de pinzamiento zonal de células completas a partir de células co-cultivadas con astrocitos después de 6 semanas de diferenciación. El baño se perfunde constantemente con solución salina fresca regulada con HEPES (ver métodos complementarios para la receta). Las micropipetas de grabación (resistencia punta 3-6 MΩ) están llenan de solución interna descrita en los materiales suplementarios. Los registros se realizan utilizando amplificador™ (Axon Instruments). Las señales se filtran a 2 kHz y se toman muestras a 5 kHz. La capacitancia de célula entera está totalmente compensada. La resistencia en serie no se compensada sino que se monitorea durante el experimento por la amplitud de la corriente capacitiva en respuesta a un pulso de 10 mV. Todos los registros se realizan a temperatura ambiente y los productos químicos se adquieren de Sigma. La frecuencia y amplitud de las corrientes postsinápticas espontáneos se miden con el software de Programa de Mini

Análisis™ (Synaptosoft, Leonia, NJ). Las comparaciones estadísticas de grupos WT y RTT se realizan mediante la prueba no paramétrica olmogorov-Smirnov de dos colas, con un criterio de significancia de p = .05. EPSCs son bloqueados por CNQX o DNQX (10-20 μM) y los IPSP son inhibidas por bicuculina (20 μM).

Resultados

Las neuronas IPSC derivadas de RTT se caracterizan por la disminución del número de sinapsis glutamatérgica, a menor densidad de la médula y es menor el tamaño soma. Las neuronas RTT también muestran ciertos defectos electofisiológicos, es decir, una disminución significativa en la frecuencia y amplitud de las corrientes sinápticas espontáneas en comparación con los controles. Las neuronas RTT muestran una disminución de la frecuencia de transitorios de calcio intracelulares.

Probamos la G-2-MEPE en el modelo anterior para probar si se puede atenuar cualquiera de las patologías del fenotipo RTT.

El tratamiento de los cultivos de células con cada concentración de fármaco mejora todos los parámetros morfológicos y fisiológicos de los cultivos de células RTT tratados en comparación con los controles RTT no tratados. Específicamente, se observa un aumento significativo en el número de sinapsis glutamatérgica en las células RTT tratadas con G-2-MEPE. Todas las concentraciones de tratamiento con G-2-Mepe aumentan el número VGLUT1 puntuales en las neuronas

derivadas de RTT. El tratamiento con G-2-Mepe normaliza la frecuencia y la amplitud de las corrientes espontáneas post-sináptica, así como tmbien la frecuencia de los transitorios de calcio generados por la actividad sináptica de las neuronas RTT tratadas con G-2-MEPE.

En el presente modelo *in vitro* de RTT humana, las células iPSC derivadas de pacientes RTT y las neuronas diferenciadas a partir de ellas se caracterizan por anormalidades en la expresión de MeCP2. Como se discute en la descripción detallada de la invención anteriormente, la gran mayoría de los casos de RTT se asocian con mutaciones en el gen MECP2. Por lo tanto la eficacia de la G-2-MEPE en el presente modelo *in vitro* de RTT humano es razonablemente predictivo de la eficacia en un sujeto humano que sufre de RTT.

Ejemplo 15: Efectos de la G-2-Mepe en Personas con Síndrome de Rett

Métodos

Se reclutan treinta sujetos con síndrome de Rett. Los sujetos son mujeres y de edades comprendidas entre 16 y 29 años (media = 12.1 DE = 4,4). Todos los sujetos tienen un IQ <60 y mutaciones del gen MECP2. Los sujetos también muestran actividad de pico de éter en el EEG o un aumento en las bandas de frecuencia inferiores del EEG según se detecta por la Transformada Rápida de Fourier (FFT). Los sujetos se les instruye que los medicamentos concomitantes son para ser estable durante al menos seis semanas antes del estudio. Los

sujetos que reciben la medicación para tratar síntomas de falta de atención son probados por la mañana y se dan instrucciones para tomar la medicación por la tarde. Se excluyen los sujetos con un intervalo QTc> 451 ms.

El estudio es un estudio paralelo de placebo, doble ciego, aleatorio controlado con tres dosis de placebo, 10 mg kg de T.I.D. oral de G-2-Mepe durante cinco días, o 30 mg/kg T.I.D. oral de G-2-Mepe.

Los sujetos se prueban al inicio del estudio con los siguientes instrumentos: Escala de Severidad Histórica/Clínica Natural del síndrome de Rett, Comportamiento Aberrante Checklist Community Edition (ABC), Vinelands, Impresión Clínica Global de Severidad (CGI-S) y sus cuidadores completando el Cuestionario de Esfuerzo de Cuidador (CSQ).

Los sujetos son llevados a la clínica como pacientes internos para permitir mediciones de referencia iniciales de EEG, ECG y la frecuencia respiratoria de forma continua durante 24 horas utilizando la tecnología de la polisomnografía. Los movimientos de manos también se registran utilizando el Q-Sensor™. Las medidas de EEG derivadas incluyen: picos por unidad de tiempo en el EEG, potencia total de las bandas de frecuencia del EEG, QTc y variabilidad del ritmo cardíaco (HRV), e irregularidades respiratorias.

Los efectos adversos también se registran utilizando las medidas de seguridad estándar y la provocación SMURF de eventos adversos

Estadísticamente, el efecto del tratamiento con G-2-MEPE se analiza mediante la realización de un análisis de covarianza repetido (ANCOVA) en el efecto del tratamiento en el cambio de las calificaciones de valor de referencia.

Resultados

El tratamiento con G-2-Mepe no produce más efectos adversos que están presentes durante el tratamiento con placebo, siendo todos los efectos adversos de corta duración y de intensidad leve. Se informan los eventos adversos graves. No se reportan casos de aumentos de QTC.

No se observan efectos sobre la frecuencia respiratoria o variabilidad del ritmo cardíaco.

El tratamiento con G-2-Mepe produce una importante reducción global de espigas por unidad de tiempo en el EEG. El tratamiento con 30 mg/kg t.i.d. oral de G-2-Mepe disminuye la actividad de pico en comparación con el placebo. Esta dosis de G-2-Mepe también disminuye la potencia de la banda delta del EEG en comparación con el placebo.

El tratamiento con G-2-EPE también reduce el total de movimientos de mano por un período de veinticuatro horas, según se cuenta utilizando el dispositivo Q-Sensor™. Este

efecto es significativo para los 30 mg/kg de dosis T.I.D. en comparación con placebo.

El tratamiento con G-2-MEPE no tiene ningún efecto significativo en general en la clasificación de Escala de Severidad Histórica/Clínica Natural de Síndrome de Rett. Sin embargo, 30 mg kg T.I.D. oral de G-2-Mepe, en comparación con el placebo, produce efectos significativos en las siguientes subescalas: "La comunicación no verbal en esta visita mediante examen", "Epilepsia/convulsiones en esta visita", y el "uso de mano".

Conclusiones

El tratamiento con G-2-Mepe produce mejoras significativas en la función del sistema nervioso central en el presente estudio. A pesar de tratamiento relativamente a corto plazo, se reducen las anormalidades en la actividad eléctrica del cerebro, una señal clara de la eficacia. Este efecto es dependiente de dosis, visto después de tratamiento de 30 mg/kg T.I.D. oral de G-2-Mepe. Estos efectos reflejan las mejoras en la función del SNC visto en el modelo de ratón MeCP2 modificado genéticamente transgénico del síndrome de Rett luego de la administración de G-2-Mepe.

También se observan efectos dependientes de dosis en el uso de las manos, según se evalúa por un dispositivo de conteo objetivo y calificación subjetiva. Esto es de interés debido a que retorcerse las manos sin sentido es a la vez característico del fenotipo clínico del síndrome Rett y es exclusivo de este trastorno.

La calificación de comunicación no verbal de la Escala de Severidad Histórica/Clínica Natural del Síndrome de Rett se mejora con el tratamiento. Esta medida evalúa fundamentalmente el contacto visual. Esto plantea la posibilidad de que el tratamiento a largo plazo con la G-2-Mepe puede mejorar las relaciones sociales en la población.

La G-2-Mepe es bien tolerada en esta población. No se observan efectos en ninguna de las medidas estándar o áreas de interés específico en la población de pacientes, tal como la prolongación del intervalo QTc o apnea.

Ejemplo 16: Efectos de la G-2MePE en los Seres Humanos con Trastornos del Espectro Autista

Métodos

Para determinar si el G-2-Mepe puede tratar los síntomas de ASD, llevamos a cabo un estudio en seres humanos con ASD. Se reclutan veinte sujetos con trastorno del espectro autista. Los sujetos son hombres y con edades comprendidas entre 16 y 65 años (media = 18.1 DE = 3.4). Todos los sujetos tienen un CI> 60 y estricto diagnóstico DSM-IV-TR de Trastorno Autista o Trastorno de Asperger. Los sujetos también cumplen los criterios para un Trastorno del Espectro Autista, de acuerdo con los instrumentos de ADOS-G ADI-R, y cumplen con los criterios del DSM-V propuestos para el Trastorno del Espectro Autista. A los sujetos se les instruye de que los medicamentos concomitantes son para ser estables durante al menos seis semanas antes del estudio. Los sujetos

que reciben la medicación para el tratamiento de síntomas de falta de atención son probados por la mañana y dan instrucciones para tomar la medicación por la tarde. Se excluyen sujetos tratados con medicamentos antisicóticos atípicos indicados para el autismo. Los sujetos se seleccionan para trastornos genéticos conocidos que incluyen y aquellos que tienen el síndrome del Cromosoma X Frágil o la esclerosis tuberosa excluida. Se excluyen sujetos con epilepsia no controlada.

El estudio es un estudio cruzado controlado con placebo doble ciego con tres fases.

Los sujetos entran en cada fase del cruce en un orden aleatorio. En las fases de prueba, los sujetos reciben ya sea placebo, 10 mg kg de T.I.D. oral de G-2-Mepe durante cinco días, o 30 mg/kg T.I.D. oral de G-2-Mepe. Cada fase del filtro de cruce está separada por un período de lavado de catorce días.

Los sujetos se evalúan en valor de referencia los siguientes instrumentos: IQ de Wechsler, Comportamiento Aberrante de Checklist Community Edition (ABC), Vinelands, Escala Compulsiva Obsesiva Yale-Brown (YBOCS) subescala de compulsión, Escala de Sensibilidad Social (SRS), Impresión Clínica Global de Severidad (CGI -S) y sus cuidadores completan el Cuestionario de Esfuerzo de Cuidador (CSQ).

Los sujetos se administran dos tareas - la Prueba de lectura de la Mente en los ojos Revisada (RMET) y un

Seguimiento de los Ojos (ET) de tareas, así como la Impresión Clínica Global de Mejora (CGI-I). Las tareas inician dos horas después de la administración de placebo o con cualquiera de las dosis de G-2-Mepe. El RMET es una tarea con base en ordenador que evalúa la capacidad para leer las emociones de los ojos en sutiles expresiones faciales afectivas y es una prueba ampliamente utilizada de reconocimiento de emociones en los pacientes con autismo (2001). Es importante destacar que, el RMET es capaz de detectar la mejora, incluso con una dosis única de un agente farmacológico (Guastella et al., 2010). Cuestiones de seguimiento de los ojos son característicos de los pacientes con autismo que pasan menos tiempo mirando a los ojos de fotografías de rostros humanos. Una vez más, una única administración de una intervención farmacológica puede mejorar déficits de seguimiento del ojo en el autismo (Andari et al, 2010).

Los efectos adversos también se registran utilizando medidas de seguridad estándar.

Estadísticamente, el efecto del tratamiento con G-2-MEPE se analiza mediante la realización de un análisis repetido de la covarianza (ANCOVA) en el efecto del tratamiento sobre el cambio de las calificaciones de valor inicial.

Resultados

El tratamiento con G-2-Mepe no produce más efectos adversos de aquellos que estuvieron presentes durante el tratamiento con placebo, todos los efectos adversos son de

corta duración y de intensidad leve. Se repotan eventos adversos graves.

El tratamiento con G-2-Mepe produce una mejoría generalmente significativa en el rendimiento de la prueba RMET. El tratamiento con 30 mg/kg T.I.D. oral de G-2-Mepe aumenta las respuestas correctas por ciento en el RMET.

El tratamiento con G-2-Mepe produce una mejoría general significativa en el tiempo dedicado a buscar en la región de los ojos en la prueba de ET. Las clasificaciones CGI-I al final de los períodos de tratamiento muestran una diferencia significativa. Los efectos de tratamiento positivos se correlacionan con clasificaciones CSQ de valor inicial

El tratamiento con G-2-Mepe produce mejoras significativas en el rendimiento de la Lectura de la Mente en la Prueba de Ojos - Revisada y en el desempeño de una tarea de Seguimiento de los Ojos. Este efecto es dependiente de la dosis, visto después de tratamiento de 30 mg/kg T.I.D. oral de G-2-Mepe.

La mejora de estas medidas es el reflejo de una mejora en el procesamiento de procesamiento de información social. Los déficits de interacción social son un síntoma básico de diagnóstico para los trastornos del espectro autista, y por lo tanto esta es un de los principales hallazgos.

El G-2-Mepe también produce una mejora general en función de un índice por la Impresión Clínica Global de

Mejora. La anotación de texto libre de las Formas de Casos Reportados del estudio indica este efecto relacionado con una mejora en las relaciones sociales. Esto implica que los cambios observados en la tarea RMET y ET pueden tener relevancia para la actividad social en la vida diaria.

El G-2-Mepe es bien tolerado en esta población.

Ejemplo 17: Modelos Animales para Determinar los Efectos de la G-2-Mepe de Espectro Autista

Los efectos de la G-2-Mepe se prueban adicionalmente en los siguientes modelos genéticos de ASD: el ratón heterocigoto Tbx1, el ratón Cntnap2 modificado genéticamente y Slc9a6 modificado genéticamente. También se prueba el G-2-Mepe en el modelo fmr1 de síndrome de Cromosoma X Frágil.

Tbx1. Las mutaciones del gen TBX1 se asocian con trastornos del espectro autista (Paylor et al., 2006). Los ratones transgénicos Tbx1 se deterioran de forma selectiva en interacción social, vocalización ultrasónica, conductas repetitivas y memoria de trabajo (Hiramoto et al., 2011).

Cntnap2. Dos tercios de los pacientes con mutaciones de la proteína asociada contactina similar a gen 2 (CNTNAP2) se diagnostican con un Trastorno del Espectro Autista (Alarcón et al., 2008; Arking et al., 2008; Bakkaloglu et al., 2008; Strauss et al., 2006; Vernes et al., 2008). Los ratones Cntnap2 modificados genéticamente (O) exhiben fenotipos relacionados con ASD en el comportamiento social, la

vocalización ultrasónica y comportamientos repetitivas (Penagarikano et al., 2011).

Slc9a6. Este gen ha sido implicado en ASD sindrómica y codifica el intercambiador sodim-hidrigen 6 (NHE6). Las mutaciones en SLC9A6 se asocian con discapacidad intelectual (Gilfillan et al., 2008) y el comportamiento autista (Garbern et al., 2010). En el Slc9a6 los ratones KO muestran hiperactividad motora y disfunción cerebelosa (Stromme et al., 2011).

Fmr1. El silenciamiento del gen FMR1 produce el Síndrome del Cromosoma X Frágil, el fenotipo del cual incluye el autismo, dos tercios de los pacientes con Síndrome del Cromosoma X Frágil cumplen con los criterios de selección para un Trastorno del Espectro Autista (Harris et al., 2008). Los pacientes pediátricos con Síndrome del Cromosoma X Frágil también muestran umbral convulsivo disminuido. El ratón modificado genéticamente fmrl replica gran parte del fenotipo del síndrome del Cromosoma X frágil, que incluye susceptibilidad a la convulsión juvenil (Yan et al., 2004).

Métodos

Los animales en cada uno de los modelos anteriores se generan de acuerdo con la metodología descrita en la literatura citada. Los equivalentes de tipo natural también se obtienen para cada modelo genético.

Los animales en cada modelo se dividen en tres grupos (n = 10 para n = 20): ratones tratados con placebo de tipo

natural, grupo tratado con G-2-Mepe mutante y grupo de control tratado con placebo mutante.

Los tratamientos se administran intraperitonealmente ly: placebo (solución salina) o 20 mg/kg/día de G-2-MEPE.

Las medidas de las características clave de ASD como se muestran en cada modelo se toman de acuerdo con la bibliografía citada.

Resultados

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

Referencias

Las siguientes referencias y todas las patentes, solicitudes de patentes y otras publicaciones citadas aquí se incorporan completamente mediante referencia.

Alarcon, M., Abrahams, B.S., Stone, J.L., Duvall, J.A., Perederiy, J.V., Bomar, J.M., SebatJ., Wigler, M., Martin.C.L., Ledbetter, D.H., Nelson.S.F., Cantor, R.M., and Geschwind, D.H. (2008). Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene. Am. J. Hum. Genet. 82, 150-159.

Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. Nat Genet. 1999 23: 185-188

Andari E, Duhamel JR, Zalla T, Herbrecht E, Leboyer M, Sirigu A. (2010) Promoting social behavior with oxytocin in high-functioning autism spectrum disorders. PNAS 107:4389-4394

Arking, D.E., Cutler, D.J., Brune, C.W., Teslovich, T.M., West, ., Ikeda, M., Rea, A., Guy, M., Lin, S., Cook, E.H., and Chakravarti, A. (2008). A common genetic variant in the neurexin superfamily member CNTNAP2 increases familial risk of autism. Am. J. Hum. Genet. 82, 160-164.

Bakkaloglu, B., 0'Roak, B.J., Louvi.A., Gupta, A.R., Abelson, J.F., Morgan, T.M., Chawarska, ., Πη, A., Ercan-Sencicek, A.G., Stillman, A.A., Tanriover, G., Abrahams, B.S., Duvall, J.A., Robbins, E.M., Geschwind, D.H., Biederer, T., Gunel, M., Lifton, R.P., and State MW (2008).

Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders.

Bakkaloglu, B., 0'Roak, B.J., Louvi, A., Gupta, A.R., Abelson, J.F., Morgan, T.M., Chawarska, ., lin, A., Ercan-Sencicek, A.G., Stillman, A.A., Tanriover, G., Abrahams.B.S., Duvall.J.A., Robbins.E.M., Geschwind, D.H., Biederer.T., Gunel, M., Lifton, R.P., and State MW (2008).

Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders. Am. J. Hum. Genet. 82, 165-173.

Baron-Cohen S, Wheelwright S, Hill J, Raste Y, Plumb I (2001) The "Reading the Mind in the Eyes" test, revised version: A study with normal adults, and adults with Asperger's syndrome or high-functioning autism. J Child Psychol Psychiatry 42:241-251.

Belichenko PV, Oldfors A, Hagberg B, Dahlstrom A. Rett syndrome: 3-D confocal microscopy of cortical pyramidal dendrites and afferents. Neuroreport. 1994 5: 1509-1513

Biederer T, Sara Y, Mozhayeva M, Atasoy D, Liu X, Kavalali ET, Sudhof TC. (2002) SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. Science 297(5586): 1525-1531.

Chapieau CA, Larimore JL, Theibert A, Pozzo-Miller L. (2009) Modulation of dendritic spine development and plasticity by BDNF and vesicular trafficking: fundamental roles in neurodevelopmental disorders associated with mental retardation and autism. J. Neurodev. Disord. 1: 185-196.

Cheng CM, Mervis RF, Niu SL, Salem N Jr, Witters LA, Tseng V, Reinhardt R, Bondy CA. Insulin-like growth factor 1 is essential for normal dendritic growth. J Neurosci Res. 2003 73: 1 -9

Comery TA, Harris JB, Willems PJ, Oostra BA, Irwin SA, Weiler IJ, Greenough WT. (1997) Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. Proc. Natl Acad. Sci. USA 94: 5401 -5404.

Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, Nygren G, Rastam M, Gillberg IC, Anckarsater H, Sponheim E, Goubran-Botros H, Delorme R, Chabane N, Mouren-Simeoni MC, de Mas P, Bieth E, Roge B, Heron D, Burglen L, Gillberg C, Leboyer M, Bourgeron T. (2007) Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHAN 3 are associated with autism spectrum disorders. Nat Genet. 39: 25-27.

Etherton MR, Blaiss CA, Powell CM, Siidhof TC. (2009) Mouse neurexin-1 a deletion causes correlated electrophysiological and behavioural changes consistent with cognitive impairments. Proc. Nat. Acad. Sci. 106: 17998-18003.

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

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

Gilfillan, G.D., Selmer, K. ., Roxrud ., Smith, R., yllerman, M., Eiklid, ., roken.M., Mattingsdal, M., Egeland, T., Stenmark, H., Sjoholm, H., Server, A., Samuelsson, L., Christianson, A., Tarpey, P., Whibley, A., Stratton, M.R.,

Futreal.P.A., Teague.J., Edkins.S., Gecz, J., Turner, G., Raymond, F.L., Schwartz, C, Stevenson, R.E., Undlien, D.E., and Stromme, P. (2008). SLC9A6 mutations cause X-linked mental retardation, microcephaly, epilepsy, and ataxia, a phenotype mimicking Angelman syndrome. Am. J. Hum. Genet. 82, 1003-1010.

Gilman SR, Iossifov I, Levy D, Ronemus M, Wigler M, Vitkup D. Rare de novo variants associated with autism implicate a large functional network of genes involved in formation and function of synapses. Neuron. 201 1 70:898-907

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

Guastella AJ, Einfeld SL, Gray KM, Rinehart NJ, Tonge BJ, Lambert TJ, Hickie IB. (2010) Intranasal oxytocin improves emotion recognition for youth with autism spectrum disorders. Biol Psychiatry. 67:692-694

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

Harris SW, Hessl D, Goodlin-Jones B, Ferranti J, Bacalman S, Barbato I, Tassone F, Hagerman PJ, Herman H, Hagerman RJ.

(2008) Autism profiles of males with fragile X syndrome. Am J ent Retard. 1 13:427-438.

Hiramoto T, Kang G, Suzuki G, Satoh Y, Kucherlapati R, Watanabe Y, Hiroi N. (201 1) Tbxl: identification of a 22ql 1.2 gene as a risk factor for autism spectrum disorder in a mouse model. Hum Mol Genet. 201 1 20:4775-4785.

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

Irwin SA, Galvez R, Greenough WT. Dendritic spine structural anomalies in fragile-X mental retardation syndrome. Cereb Cortex. 2000 10: 1038-1044

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

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

Kim HG, Kishikawa S, Higgins AW, Seong IS, Donovan DJ, Shen Y, Lally E, Weiss LA, Najm J, Kutsche K, Descartes M, Holt L, Braddock S, Troxell R, Kaplan L, Volkmar F, Klin A, Tsatsanis K, Harris DJ, Noens I, Pauls DL, Daly MJ, MacDonald ME, Morton CC, Quade BJ, Gusella JF. (2008) Disruption of neurexin 1 associated with autism spectrum disorder. Am. J. Hum. Genet. 82: 199-207.

Klemmer P, Meredith RM, Holmgren CD, Klychnikov OI, Stahl-Zeng J, Loos M, van der Schors RC, Wortel J, de Wit H, Spijker S, Rotaru DC, Mansvelder HD, Smit AB, Li KW. Proteomics, ultrastructure, and physiology of hippocampal synapses in a fragile X syndrome mouse model reveal presynaptic phenotype. J Biol Chem. 201 1 286:25495-25504

rueger DD, Osterweil E, Chen SP, Tye LD, Bear MF. (2011) Cognitive dysfunction and prefrontal synaptic abnormalities in a mouse model of fragile X syndrome. Proc. Natl Acad. Sci. USA 108: 2587-2592.

Lauterborn JC, Rex CS, Kramar E, Chen LY, Pandyarajan V, Lynch G, Gall CM. (2007) Brain-derived neurotrophic factor rescues synaptic plasticity in a mouse model of fragile X syndrome. J. Neurosci. 27: 10685-10694.

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

Makkonen I, okki H, Kuikka J, Turpeinen U, Riikonen R. Effects of fluoxetine treatment on striatal dopamine

transporter binding and cerebrospinal fluid insulin-like growth factor- 1 in children with autism. Neuropediatrics. 201 1 42:207-209

Marchetto et al. (2010) A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. Cell 143:527-539 (incl. supplemental information)

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

Minshew NJ, Williams DL. The new neurobiology of autism: cortex, connectivity, and neuronal organization. Arch Neurol. 2007 64:945-950

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

Moretti P, Levenson JM, Battaglia F, Atkinson R, Teague R, Antalffy B, Armstrong D, Arancio O, Sweatt JD, Zoghbi HY. (2006) Learning and memory and synaptic plasticity are

impaired in a mouse model of Rett syndrome. J. Neurosci. 26: 319-327.

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

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

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

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

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

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

Silverman JL, Turner SM, Barkan CL, Tolu SS, Saxena R, Hung AY, Sheng M, Crawley JN: Sociability and motor functions in Shank 1 mutant mice. Brain Res 2010.

Silverman JL, Yang M, Lord C, Crawley JN: Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. Nat Rev Neurosci 2010, 1 1:490-502.

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

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

Strauss, .A., Puffenberger, E.G., Huentelman, M.J., Gottlieb, S., Dobrin, S.E., Parod.J.M., Stephan, D.A., and Morton.D.H. (2006). Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant

contactin-associated protein-like 2. N. Engl. J. Med. 354, 1370-1377.

Stromme, P., Dobrenis, K., Sillitoe, R.V., Gulinello, M., Ali, N.F., Davidson, C, Micsenyi, M.C, Stephney, G., Ellevog, L., lungland.A., and Walkley, S.U. (201 1). X-linked Angelman-like syndrome caused by Slc9a6 knockout in mice exhibits evidence of endosomal-lysosomal dysfunction. Brain. 134:3369-3383.

Sykes NH, Toma C, Wilson N, Volpi EV, Sousa I, Pagnamenta AT, Tancredi R, Battaglia A, Maestrini E, Bailey AJ, Monaco AP; International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (IMGSAC). (2009) Copy number variation and association analysis of SHAN 3 as a candidate gene for autism in the IMGSAC collection. Eur. J. Hum. Genet. 17: 1347- 1353.

Tabuchi, Blundell J, Etherton MR, Hammer RE, Liu X, Powell CM, Sudhof TC. (2007) A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. Science 318(5847): 71 r76.

Takayanagi Y, Fujita E, Yu Z, Yamagata T, Momoi MY, Momoi T, Onaka T. (2010) Impairment of social and emotional behaviors in Cadm 1 -knockout mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. 396: 703-708.

Tropea D, Giacometti E, Wilson NR, Beard C, McCurry C, Fu DD, Flannery R, Jaenisch R, Sur M. (2009) Partial reversal of

Rett Syndrome-like symptoms in MeCP2 mutant mice. Proc. Natl Acad. Sci. USA 106: 2029-2034.

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

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

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

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

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

Zhao MG, Toyoda H, Ko SW, Ding HK, Wu LJ, Zhuo M. (2005) Deficits in trace fear memory and long-term potentiation in a mouse model for fragile X syndrome. J. Neurosci. 25: 7385-7392. (Erratum in: J Neurosci. 2005, 25: 81 12)

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

REIVINDICACIONES

Reivindicamos:

1. Un método para tratar un animal que sufre de un síntoma de un Trastorno del Espectro Autista (ASD), que comprende administrar a dicho animal una cantidad efectiva de Glicil-2-Metil-L-prolil-L-glutamato (G-2-MePE), dicho tratamiento que produce una mejora en said dicho síntoma según se evalúa por una o más ppruebas de comportamiento seleccionadas del grupo que consiste de Escala de Severidad Histórica/Clínica Natural del síndrome de Rett, Comportamiento Aberrante Checklist Community Edition (ABC), Vinelands, Impresión Clínica Global de Severidad (CGI-S) y sus cuidadores completando el Cuestionario de Esfuerzo de Cuidador (CSQ) o una o más pruebas fisiológicas seleccionadas del grupo que consiste de frecuencia de pico de electroencefalograma (EEG), potencia total en bandas de frecuencia de un EEG, movimiento de manos, QTc y variabilidad de frecuencia cardiaca (HRV), e irregularidades respiratorias en comparación con animales de control que no sufren de dicho síntoma.

2. El método de la Reivindicación 1, en donde dicho ASD se selecciona del grupo que consiste de autismo, Síndrome del Cromosoma X Frágil, Síndrome de Rett (RTT), Trastorno Autista, Síndrome de Asperger, Trastorno Desintegrativo de la Infancia y Trastorno Generalizado de Desarrollo No Especificado (PDD-NOS), y Evitación Patológica de la Demanda (PDA)..

3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, dicha cantidad efectiva de G-2-MePE está en el rango de aproximadamente 0.001 mg/Kg a aproximadamente 100 mg/Kg.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, dicha cantidad efectiva de G-2-MePE está en el rango de aproximadamente 0.001 mg/Kg a aproximadamente 0.1 mg/Kg cuando se administra directamente al cerebro.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, dicha cantidad efectiva de G-2-MePE está en el rango de aproximadamente 1 mg/Kg a aproximadamente 100 mg/Kg cuando se administra sistémicamente.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, dicho G-2-MePE se administra sistémicamente, parenteralmente o directamente en el cerebro.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, dicho G-2-MePE se administra en un ventrículo del cerebro.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde dicho G-2-MePE se administra a través de una ruta intravenosa, subcutánea u oral.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicho G-2-MePE se administra oralmente en una

dosis de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 60 mg/kg.

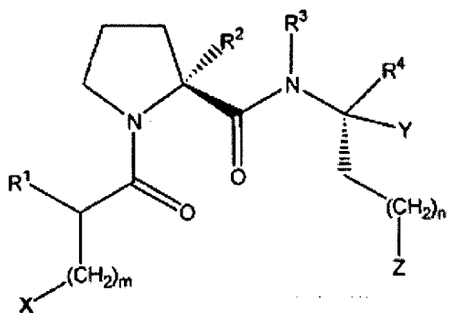
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, dicho G-2-MePE está en una solución acuosa fisiológicamente compatible, microemulsión agua-en-aceite, emulsión gruesa agua en aceite, cristal líquido agua en aceite, nanocápsula, o comprimido.

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, dicho G-2-MePE se incorpora en un gel soluble en una solución acuosa.

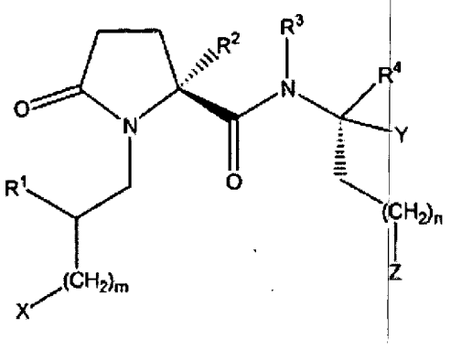
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde dicho G-2-MePE se administra a una mucosa de dicho animal.

13. El método de la Reivindicación 11, dicho gel se coloca en la boca de dicho animal, y se libera dicho G-2- MePE de dicho gel.

14. Un método para tratar un animal que tiene un síntoma de un Trastorno del Espectro Autista (ASD), que comprende administrar a dicho animal, un compuesto de la Fórmula 1 o Fórmula 2:



Fórmula 1



Fórmula 2

donde m es 0 o 1;

n es 0 o 1;

X es H o - NR^6R^7;

Y es H, alquilo, $-CO_2R^5$, o - $CONR^6R$

Z es H, alquilo, $-CO_2R^5$ o - $CONR^6R^7$

R^1 es H, alquilo, o aralquilo;

R^2, R^3, y R^4 son independientemente H o alquilo;

cada R^5 es independientemente H, alquilo, o un resido de alcohol graso;

cada R^6 y R^7 es independientemente H, alquilo, o aralquilo, o $-NR^6R^7$ es pirrolidino, piperidino, o morfolino;

o una lactona formada cuando un compuesto donde Y es - CO_2(alquilo) y Z es $-CO_2H$ o donde Y es $-CO_2H$ y Z es - CO_2(alquilo) se lactoniza;

y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, dado que el compuesto no es GPE, N-Me-GPE, GPE amida, APE, GPQ o una sal de los mismos.

En algunos aspectos, esta invención incluye:

(a) los compuestos son compuestos de la Fórmula 1;

(b) m es 0;

(c) n es 1;

(d) por lo menos uno de X, Y, R^1, R^2, R^3, R^4, y R^5 no es hidrógeno;

(e) X es- NR^6R^7; y

(f) Y es $-CO_2R^5$ o - $CO_2NR^6R^7$; y

(g) Z es $-CO_2R^5$ o - $CO_2NR^6R^7$.

15. El método de la Reivindicación 14, donde el compuesto es una cantidad efectiva de G-2-MePE.

16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 15 que comprende adicionalmente administrar al animal un segundo agente terapéutico seleccionado de un grupo que consiste de: factor de crecimiento similar a insulina-I (IGF-I), factor de crecimiento similar a insulina-II (IGF-II), glicil-prolil-glutamato (GPE), factor de crecimiento de transformación-β1, activina, hormona de crecimiento, factor de crecimiento de nervio, factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), proteína de unión de hormona de crecimiento, proteínas de unión IGF (especialmente IGFBP-3), factor de crecimiento de fibroblasto básico, factor de crecimiento de fibroblasto ácido, producto de gen hst Kfgk, FGF-3, FGF-4, FGF-6, factor de crecimiento de queratinocito, factor de crecimiento inducido por andrógeno, int-2, homólogo de factor de crecimiento de fibroblasto factor- 1 (FHF- 1), FHF-2, FHF-3 y FHF-4, factor de crecimiento de queratinocito 2, factor de activaciión de glial, FGF-10 y FGF-16, factor neurotrófico ciliar, factor de crecimiento derivado de cerebro, neurotrofina 3, neurotrofina 4, proteína morfogenética de hueso 2 (BMP-

2), factor neurotrófico derivado de estirpe celular glial, factor neurotrófico dependiente de actividad, factor de inhibición de citoquina leucemia, oncostatina M, interleucina), α-, β-, γ-, o interferón consenso, TNF-a, clometiazol; ácido quinurénico, Semax, tacrolimus, L-treo-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol, análogo de adrenocorticotropina-(4-9) [ORG 2766] y dizolcipina (MK-801), selegilina; antagonistas de glutamato tales como, mematina (Namenda) NPS 1506, GV 1505260. MK-801, GV 150526; antagonistas AMPA tales como 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoilbenzo(f)quinoxalina (NBQX), LY303070 y LY300164; agentes anti-inflamatorios dirigidos contra la adresina MAdCAM-1 y/o sus receptores de integrina a4 (α4β1 y α4β7), tal como anti-MAdCAM-1 mAb MECA-367 (acceso ATCC No. HB-9478), fenobam, un inhibidor de recaptación de serotonina selectivo tal como fluoxetina, o un anti-sicótivo atípico tal como risperidona.

17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 -15, donde dichas dosis de dicho compuesto es 10 mg/kg tres veces por día o 30 mg/kg tres veces por día.

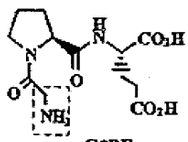
18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 -17, donde dicho animal es un ser humano.

TRATAMIENTO DE TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA QUE UTILIZA ÁCIDO GLICIL-L-2-METILPROLIL-L-GLUTÁMICO

RESUMEN

Esta invención proporciona compuestoS, composiciones y métodos PARA tratar Trastornos del Espectro Autista (ASD) utilizando ácido glicil-2-metilprolil-glutámico (G-2-MePE) y análogos de los mismos. Los Trastornos del Espectro Autista incluyen autismo, Trastorno Autista, Síndrome de Asperger, Trastorno Desintegrativo de la Infancia, Trastorno del Desarrollo Generalizado no Específico (PDD-NOS), Síndrome del Cromosoma X Frágil, y Síndrome de Rett. Las composiciones que contienen el compuesto incluyen formulaciones solubles en agua, micro-emulsiones agua en aceite, emulsiones gruesas agua en aceite, cristales líquidos agua en aceite, nanocápsulas, comprimidos, y geles administrados oralmente. El compuesto y composiciones de esta invención se pueden administrar intravenosamente, intraventricularmente, parenteralmente, u oralmente, y pueden ser efectivos en tratar la neurodegeneración, promover la función neurológica, tratar actividad de convulsión y otros síntomas de ASD, y puede prolongar la vida en animales que incluyen seres humanos que tienen Trastornos del Espectro Autista.

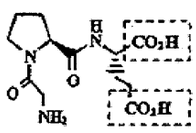
I. MODIFICA RESIDUO DE GLICINA



G*PE

II. MODIFICA RESIDUO DE ÁCIDO GLUTÁMICO

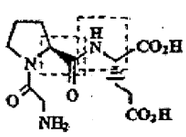
i. residuo de ácido α-carboxílico
ii. residuo de ácido γ-carboxílico
iii. diésteresde GPE



GPE*

III. MODIFICA ENLACES DE PÉPTIDO

i. modifica Pro- α-metilprolina
ii. modifica Glu-N-ácido metilglutámico
α-ácido metilglutámico



GP*E y GPE#

Figura 1

162

2/26

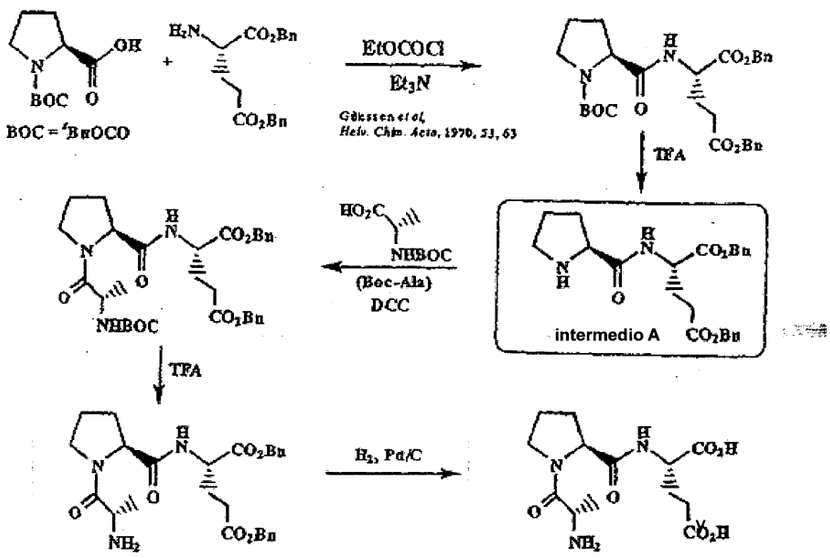


Figura 2

En forma similar

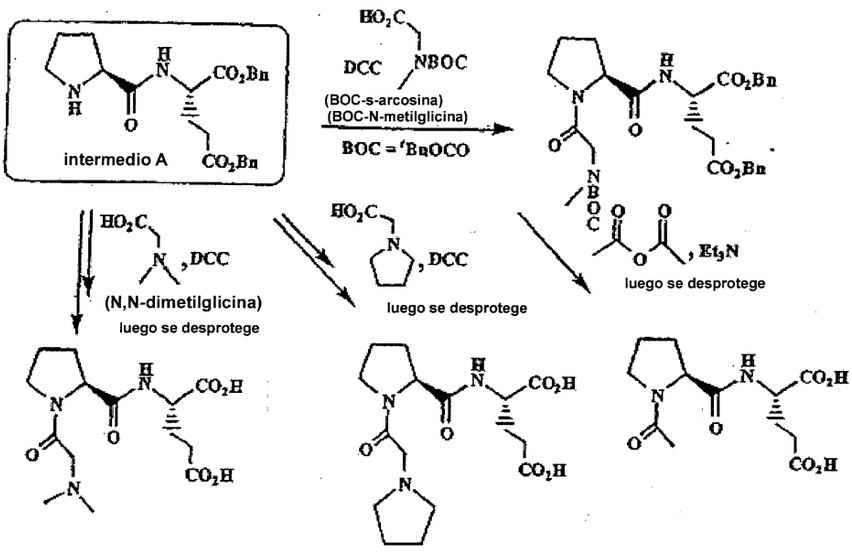


Figura 3

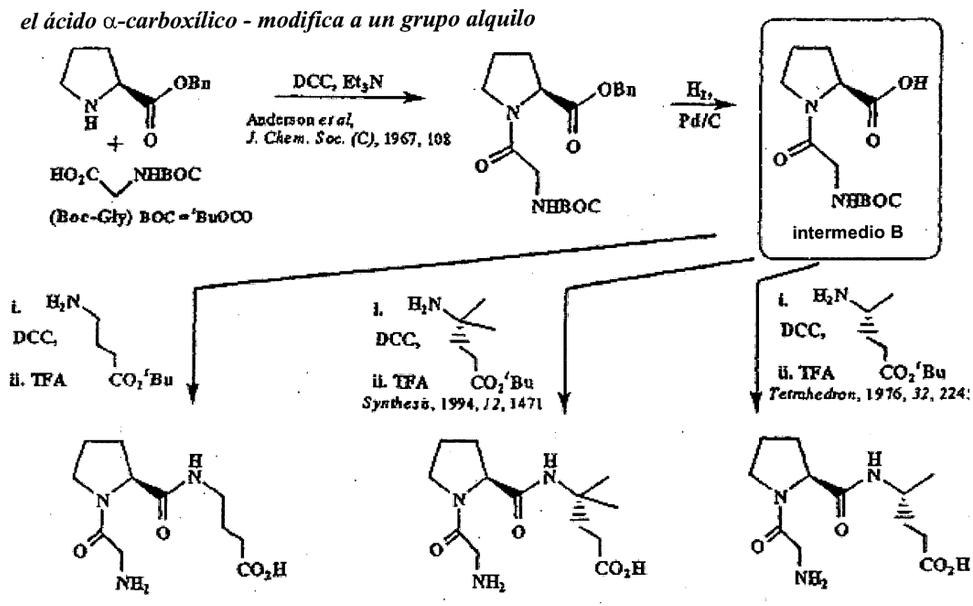
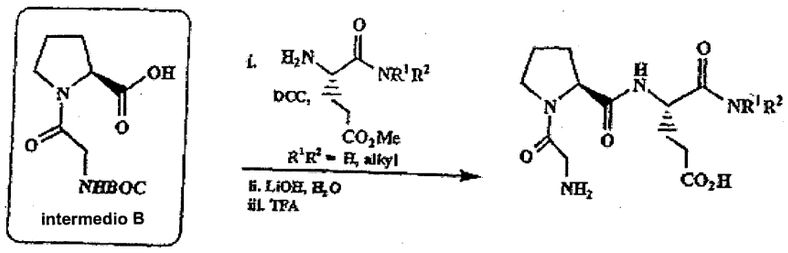

el ácido α-carboxílico - modifica a un grupo alquilo
OBn
DCC, Et3N
Anderson et al,
J. Chem. Soc. (C), 1967, 108
H2, Pd/C
OH
NHBOC
intermedio B
HO2C NHBOC
(Boc-Gly) BOC = tBuOCO
i. H2N
DCC,
ii. TFA CO2tBu
Synthesis, 1994, 12, 1471
Tetrahedron, 1976, 32, 224
NH2
CO2H

Figura 4

el ácido α-carboxílico - modifica a una amida



Síntesis de amida

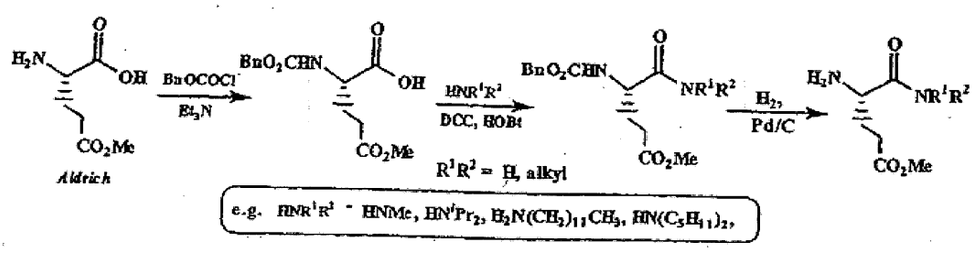


Figura 5

reduce ácido γ-carboxílico - profármaco de lactona

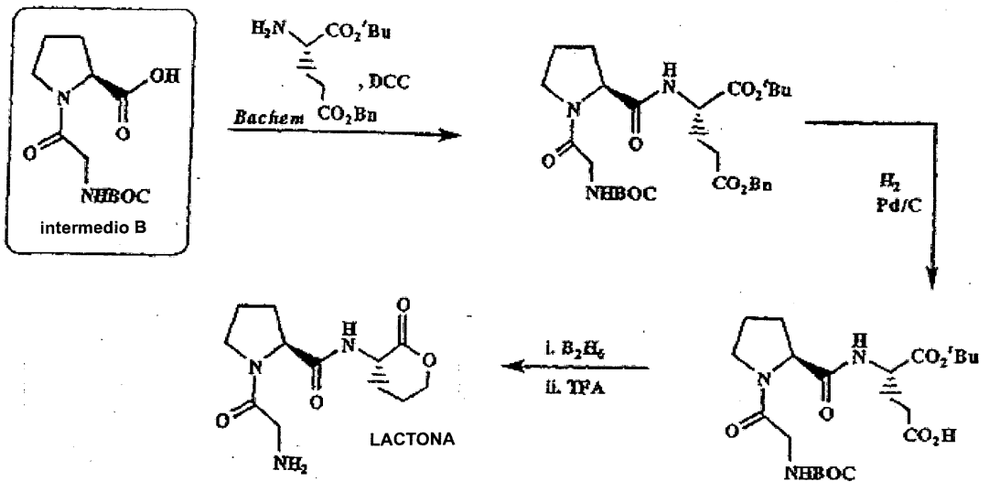


Figura 6

166
6/26

ácido γ-carboxílico - modifica al grupo alquilo

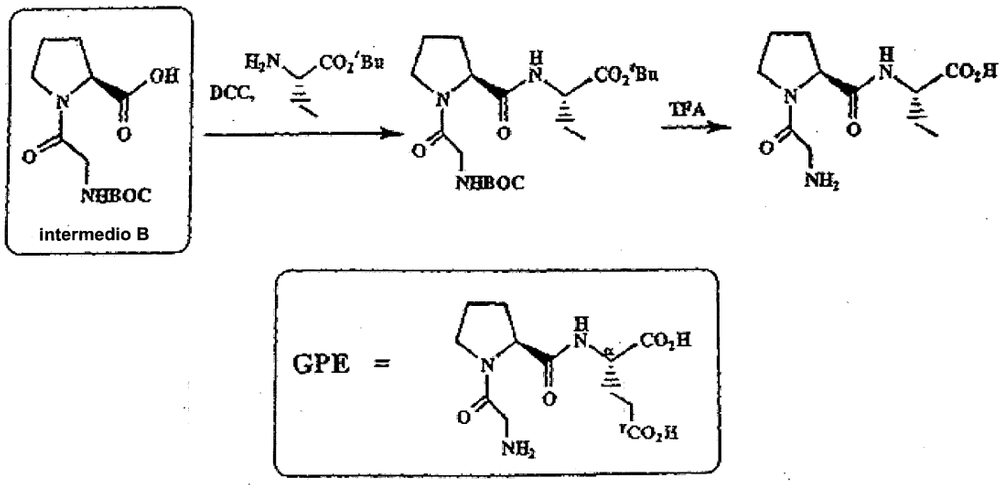
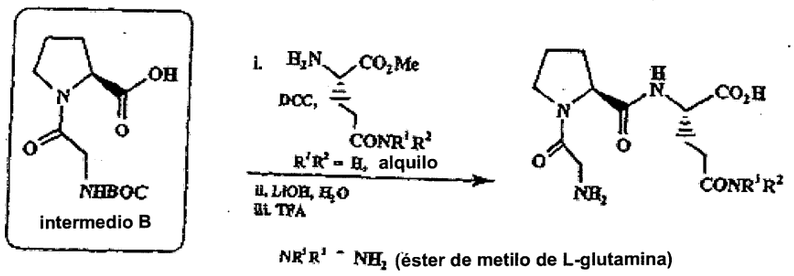


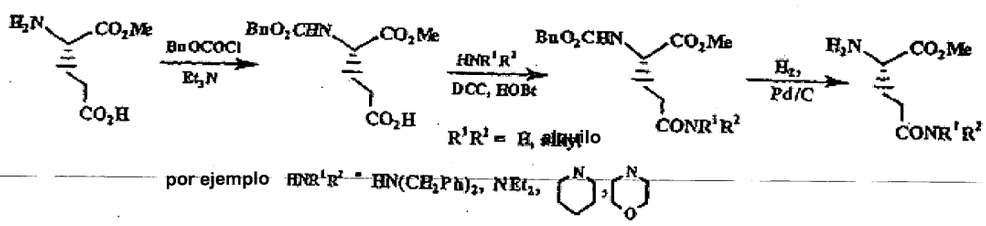
Figura 7

el ácido γ-carboxílico - modifica a una amida



NR^1R^2 = NH_2 (éster de metilo de L-glutamina)

Síntesis de amida



por ejemplo HNR^1R^2 = $HN(CH_2Ph)_2$, NEt_2,

Figura 8

reduce ácido γ-carboxílico - profármaco de lactona

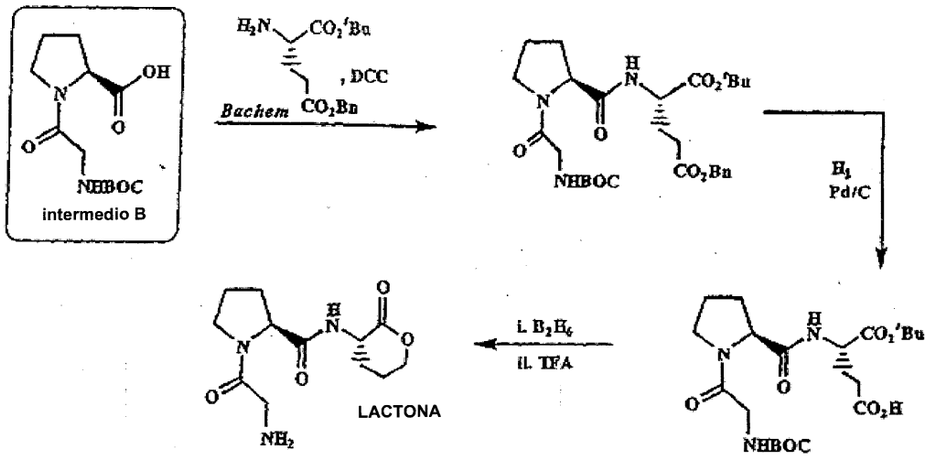
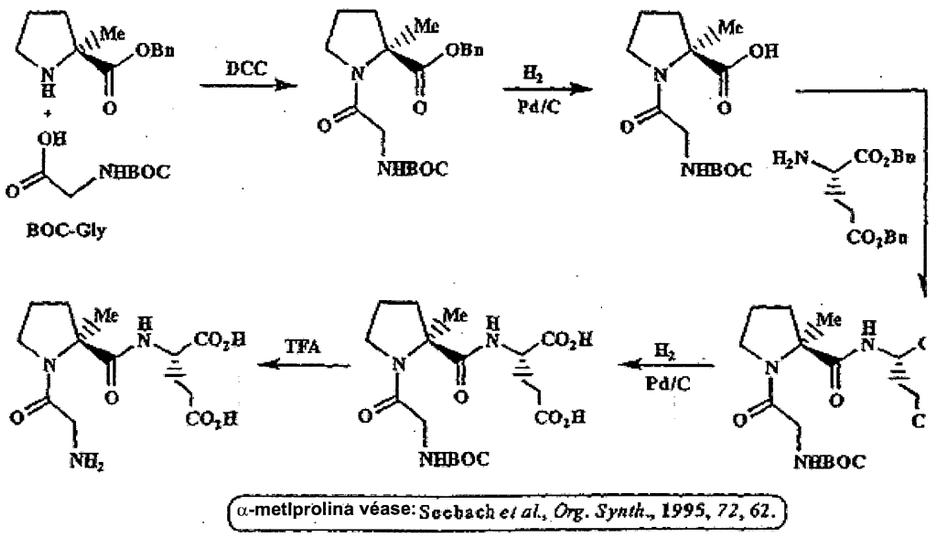


Figura 9

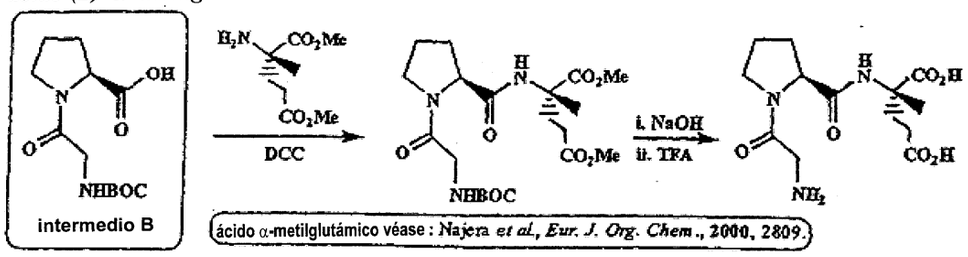
(S)- -metilprolina



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

Figura 10

ácido (S)-α -metilglutámico-



Ácido N-metilglutámico

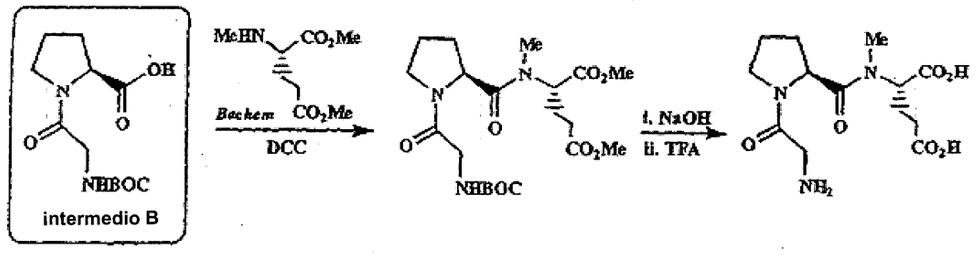


Figura 8

171
11/26

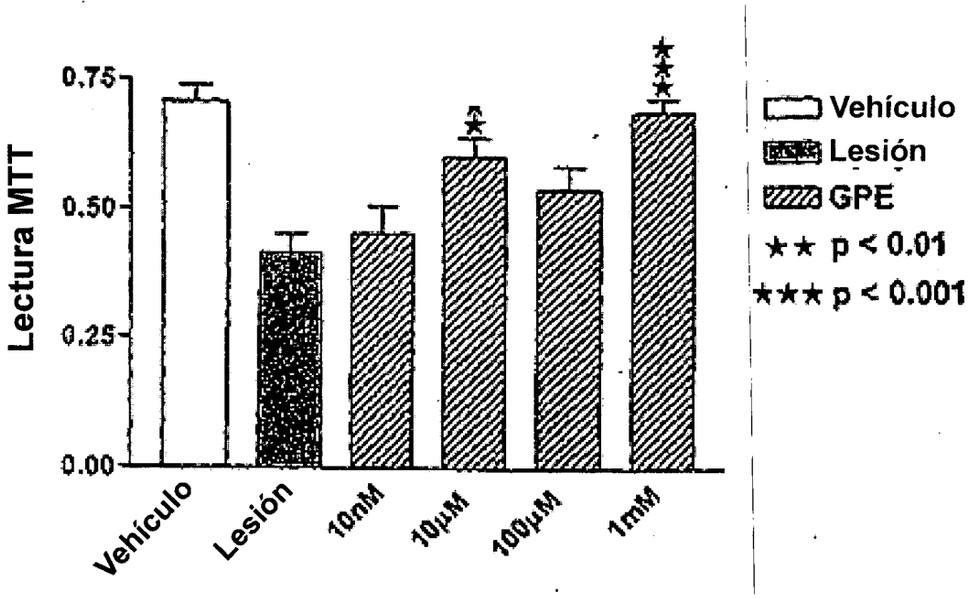

Lectura MTT
0.75
0.50
0.25
0.00
Vehículo
Lesión
10nM
10µM
100µM
1mM
Vehículo
Lesión
GPE
★★ p < 0.01
★★★ p < 0.001

Figura 12

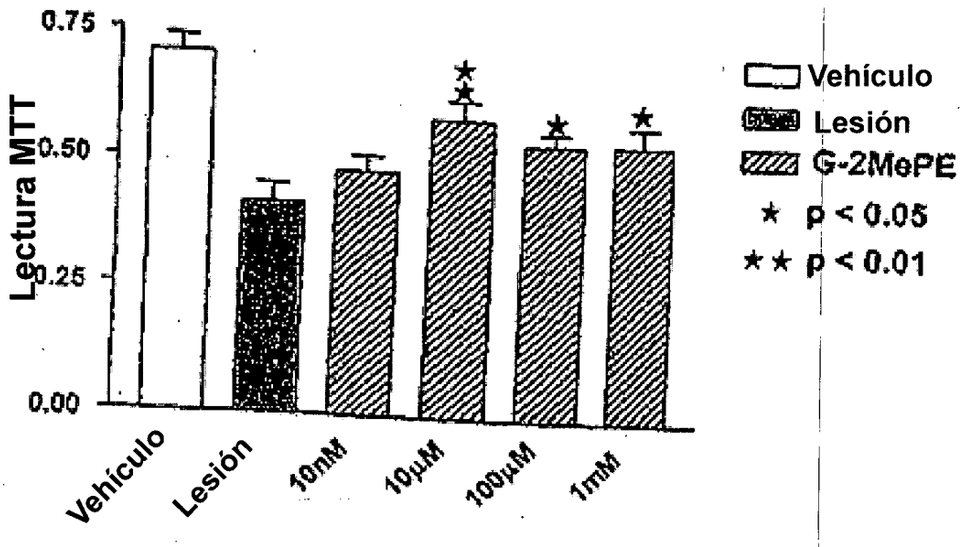

0.75
0.50
0.25
0.00
Lectura MTT
Vehículo
Lesión
10nM
10µM
100µM
1mM
Vehículo
Lesión
G-2MePE
★ p < 0.05
★★ p < 0.01

Figura 13

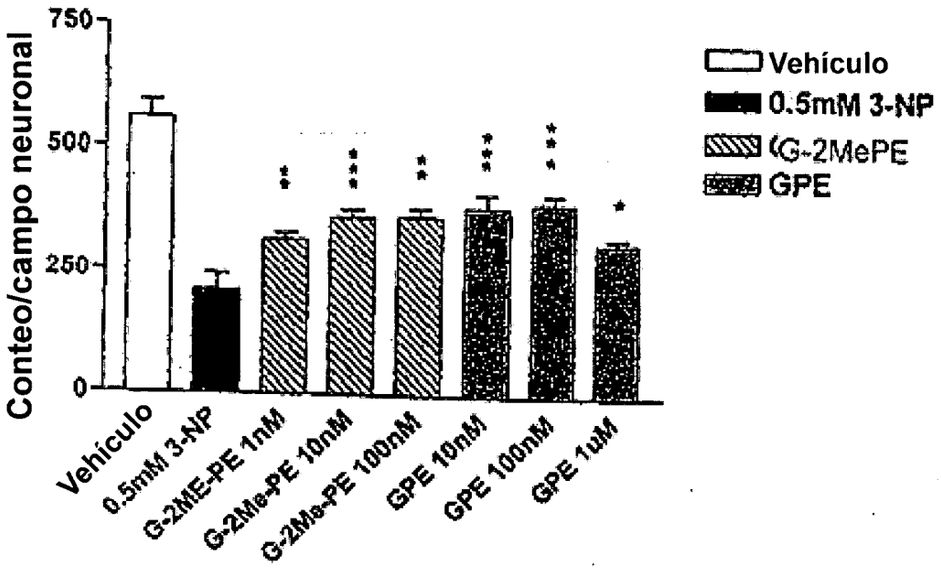

Conteo/campo neuronal
750
500
250
0
Vehículo
0.5mM 3-NP
G-2ME-PE 1nM
G-2Me-PE 10nM
G-2Me-PE 100nM
GPE 10nM
GPE 100nM
GPE 1uM
Vehículo
0.5mM 3-NP
G-2MePE
GPE

Figura 14

222

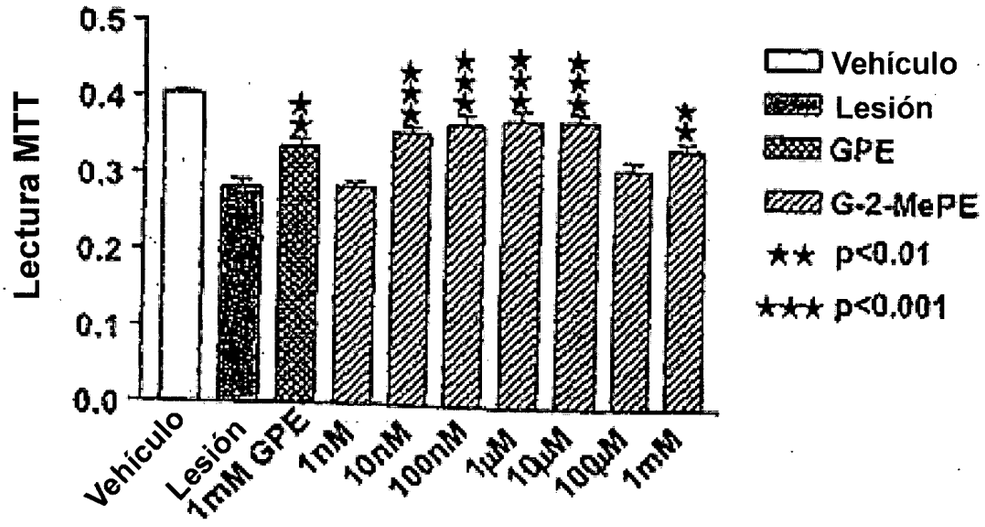


Figura 15

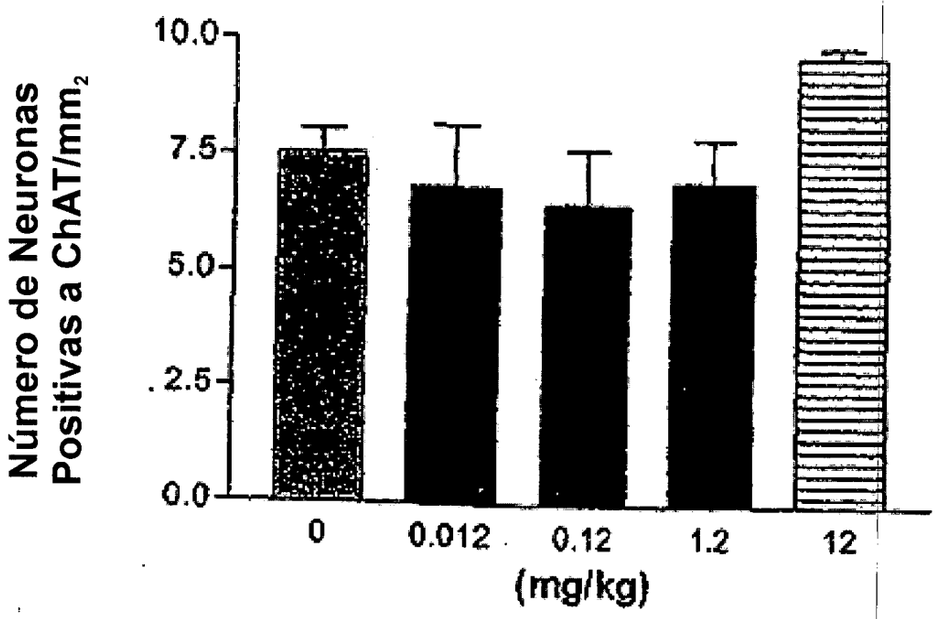

Número de Neuronas Positivas a ChAT/mm2
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
0
0.012
0.12
1.2
12
(mg/kg)

Figura 18

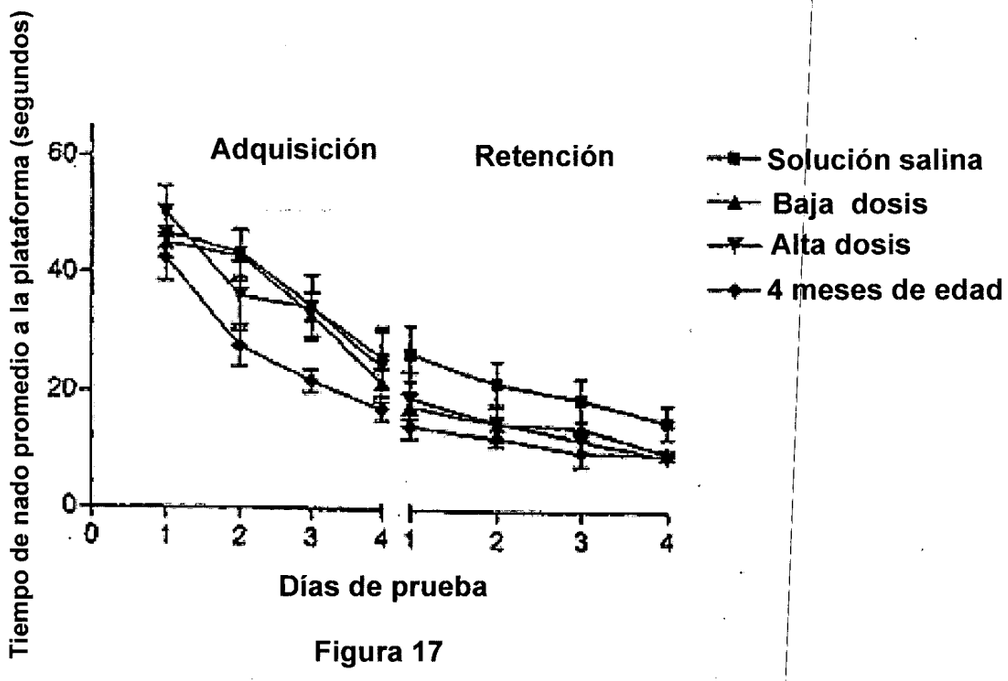

Tiempo de nado promedio a la plataforma (segundos)
60
40
20
0
Adquisición
Retención
0
1
2
3
4
1
2
3
4
Días de prueba
Solución salina
Baja dosis
Alta dosis
4 meses de edad

Figura 17

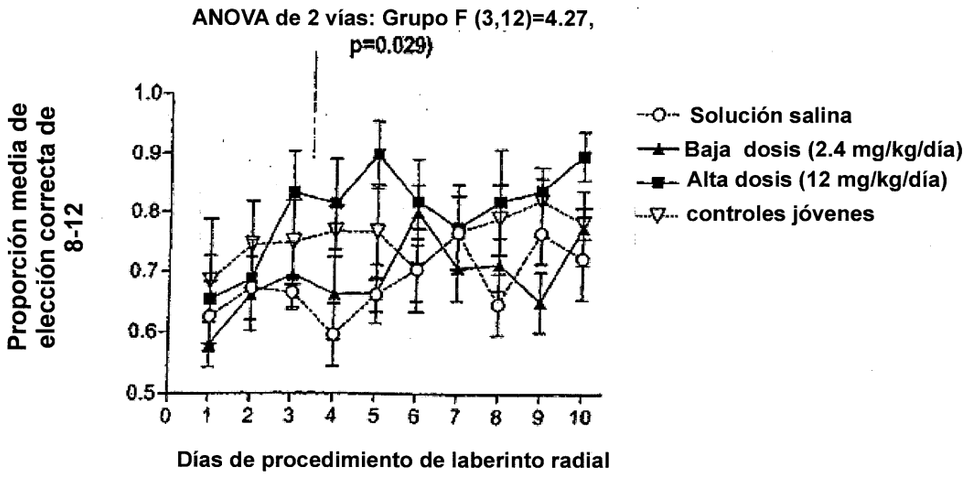

ANOVA de 2 vías: Grupo F (3,12)=4.27, p=0.029)
Proporción media de elección correcta de 8-12
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Días de procedimiento de laberinto radial
Solución salina
Baja dosis (2.4 mg/kg/día)
Alta dosis (12 mg/kg/día)
controles jóvenes

Figura 18A

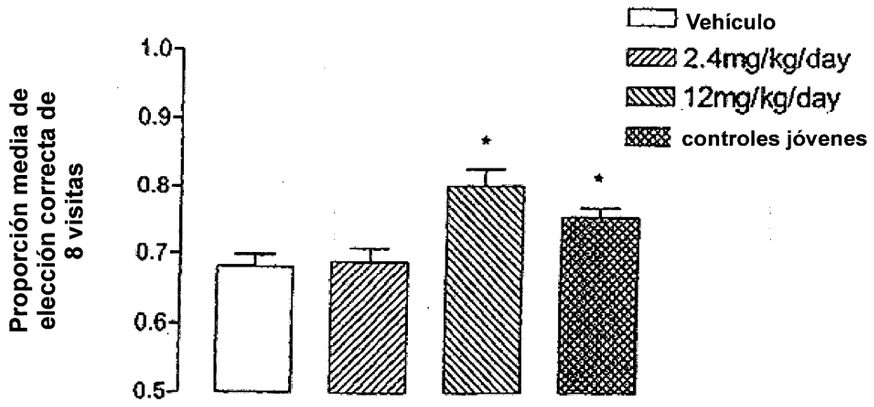

Vehículo
2.4mg/kg/day
12mg/kg/day
controles jóvenes
Proporción media de elección correcta de 8 visitas
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
*
*

Figura 18B

227

20/26

G-2MePE promueve proliferación celular en SVZ de ratas envejecidas

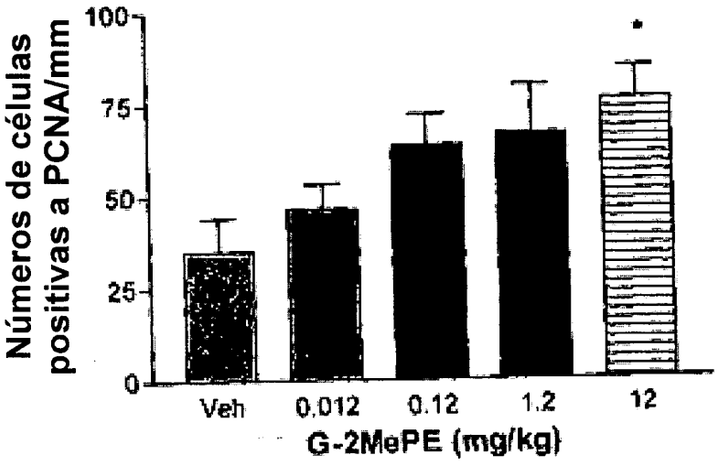


Figura 19A

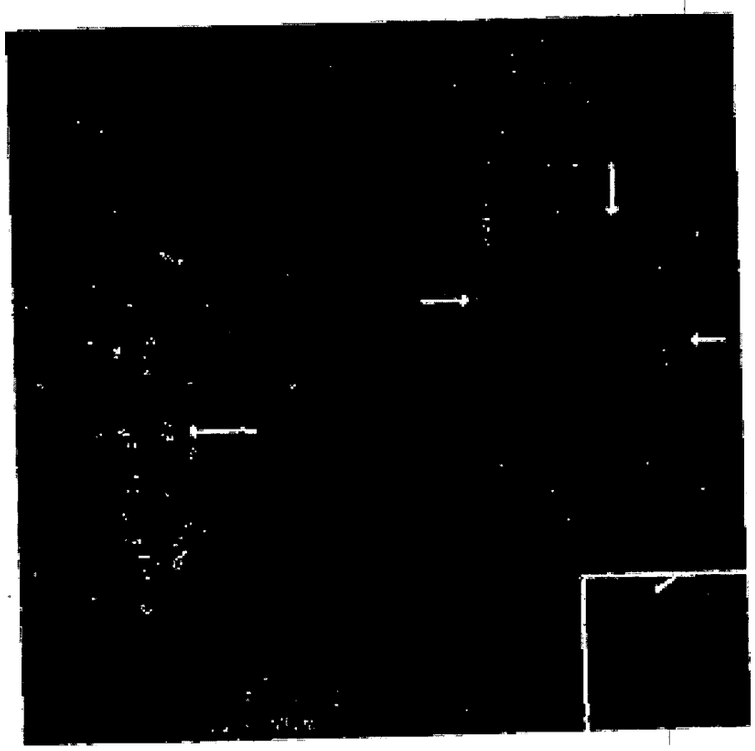


Figura 19B

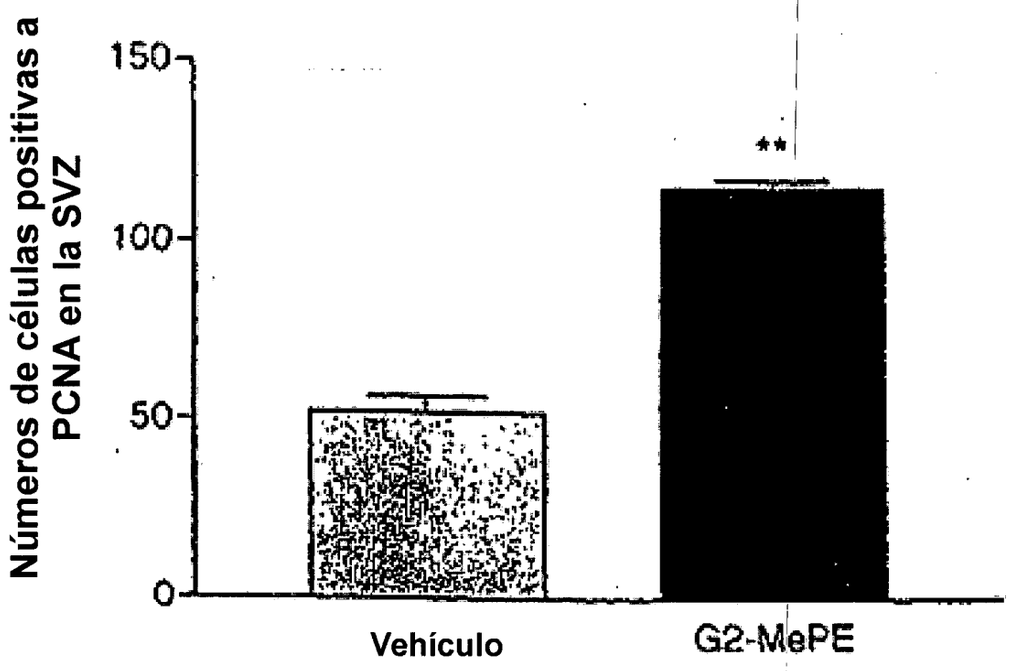

Números de células positivas a PCNA en la SVZ
150
100
50
0
**
Vehículo
G2-MePE

Figura 19C

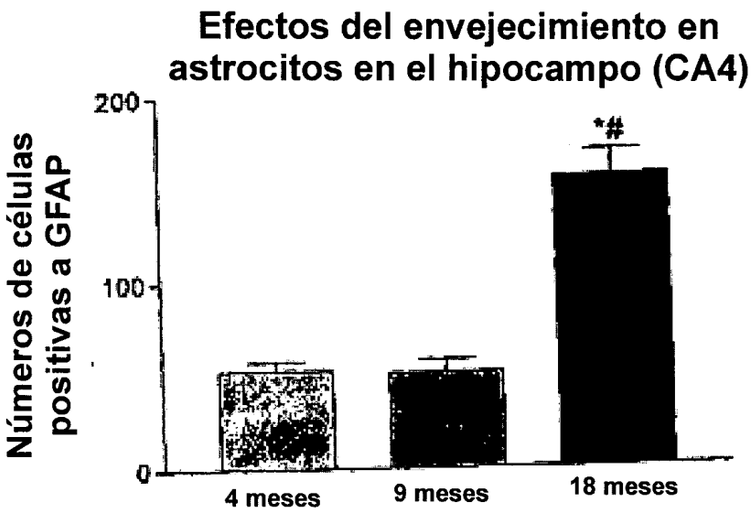


Figura 20A



Figura 20B

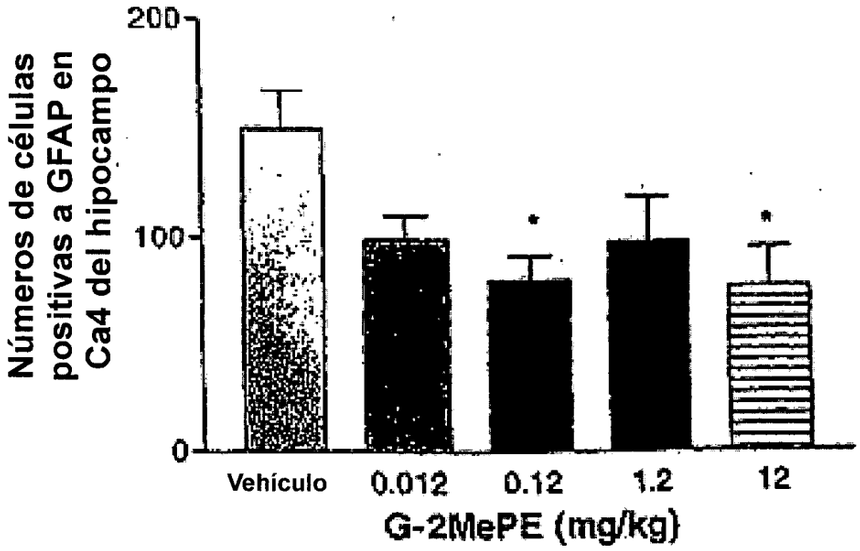


Figura 20C

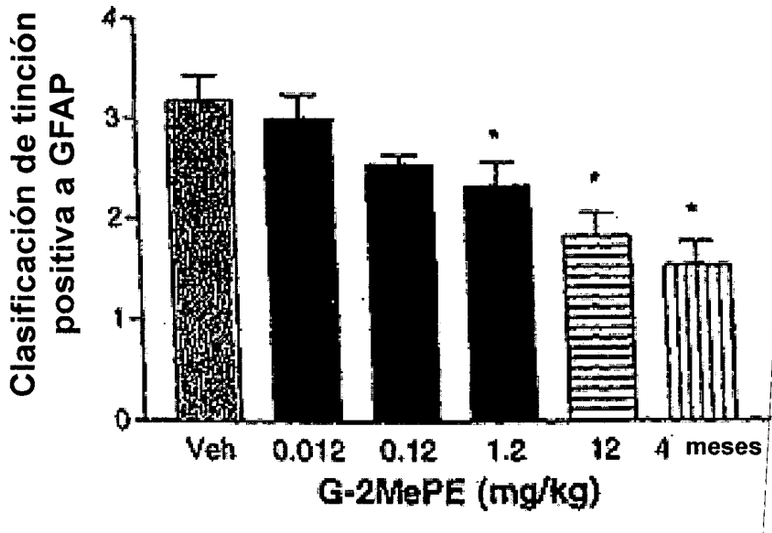


Figura 20D

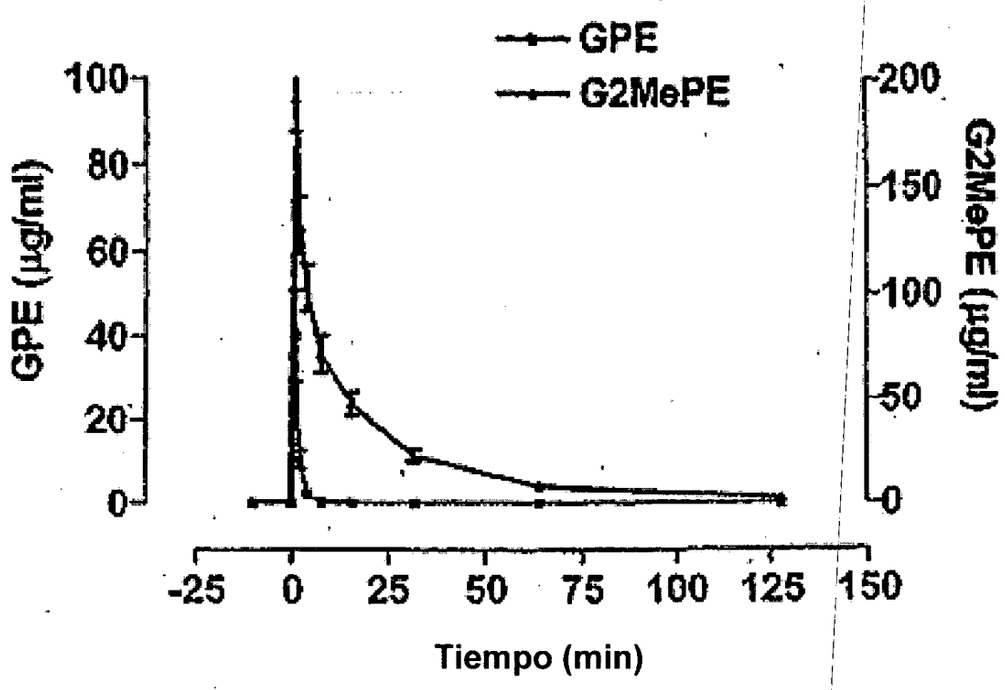

GPE
G2MePE
GPE (µg/ml)
G2MePE (µg/ml)
100
80
60
40
20
0
200
150
100
50
0
-25
0
25
50
75
100
125
150
Tiempo (min)

Figura 21

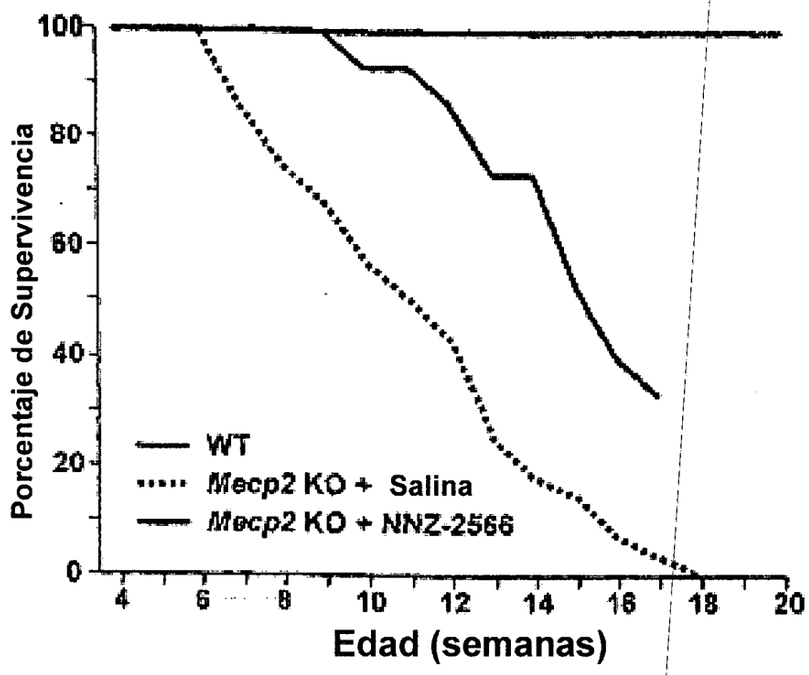

Porcentaje de Supervivencia
100
80
60
40
20
0
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Edad (semanas)
WT
Mecp2 KO + Salina
Mecp2 KO + NNZ-2566

FIG. 22

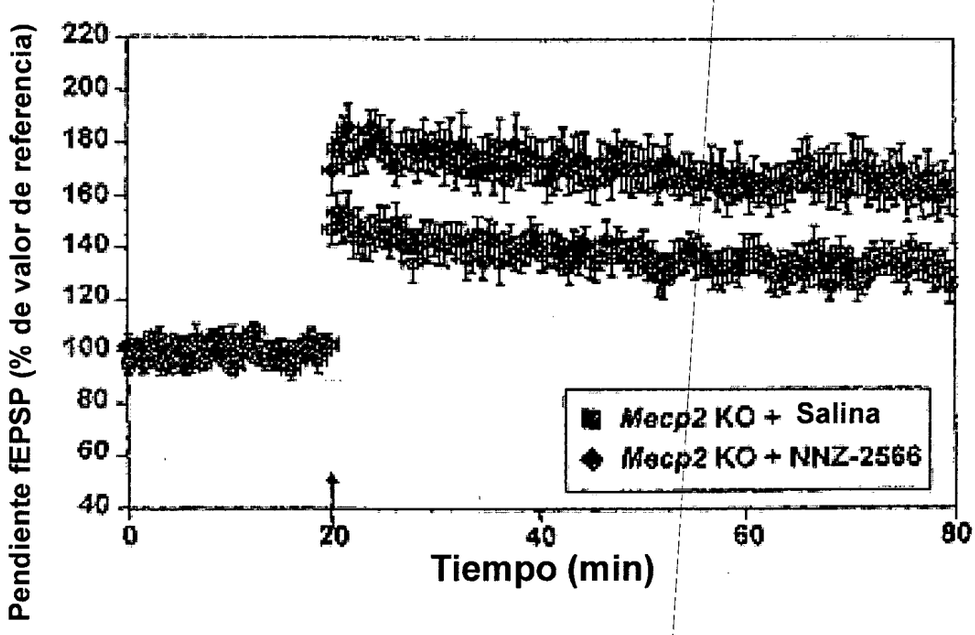

Pendiente fEPSP (% de valor de referencia)
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
0
20
40
60
80
Tiempo (min)
Mecp2 KO + Salina
Mecp2 KO + NNZ-2566

FIG. 23

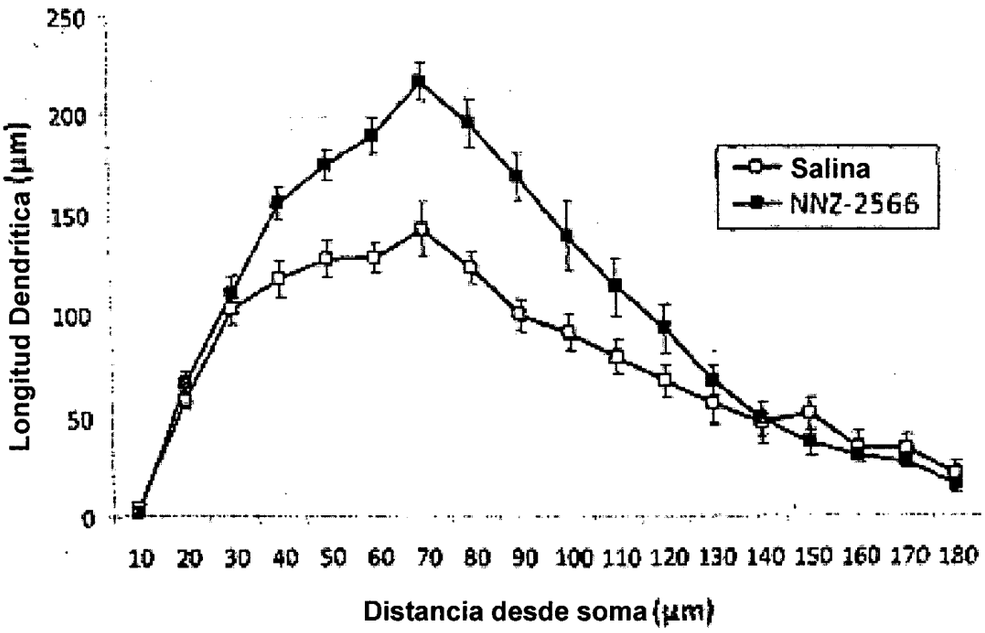

250
200
150
100
50
0
Longitud Dendrítica (µm)
Salina
NNZ-2566
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180
Distancia desde soma (µm)

FIG. 24

TREATMENT OF AUTISM SPECTRUM DISORDERS USING GLYCYL-L-2-METHYLPROLYL-L-GLUTAMIC ACID

Claim of Priority

This application claims priority to United States Provisional Patent Application No. 61/462,141 entitled "Rett Syndrome Therapy Using Glycyl-2-Methylprolyl-L-Glutamate," Larry Glass et al., inventors, filed 27 January 2011, and to United States Provisional Patent Application No. 61/492,248 entitled "Treatment of Autism Spectrum Disorders Using Glycyl-2-L-Methylprolyl-L-Glutamate," Michael John Bickerdike et al. inventors, filed 1 June 2011. Both of these applications are incorporated herein fully as if separately so incorporated.

Field of the Invention

This invention relates generally to therapy of Autism Spectrum Disorders (ASD), including autism, Fragile X Syndrome, Rett Syndrome (RTT), Autistic Disorder, Asperger Syndrome, Childhood Disintegrative Disorder and Pervasive Developmental Disorder Not Otherwise Specified (PDD-NOS), and Pathological Demand Avoidance (PDA). In particular, this invention relates to treatment of ASD using Glycyl-2-methyl-Prolyl-Glutamate (G-2-MePE).

BACKGROUND

Description of Related Art

Autism Spectrum Disorders are becoming increasingly diagnosed. Autism spectrum disorders (ASD) are a collection of linked developmental disorders, characterized by abnormalities in social interaction and communication, restricted interests and repetitive behaviours. Current classification of ASD recognises five distinct forms: classical autism or Autistic Disorder, Asperger syndrome, Rett syndrome, childhood disintegrative disorder and pervasive developmental disorder not otherwise specified (PDD-NOS). A sixth syndrome, pathological demand avoidance (PDA), is a further specific pervasive developmental disorder.

EP 0 366 638 discloses GPE (a tri-peptide consisting of the amino acids Gly-Pro-Glu) and its di-peptide derivatives Gly-Pro and Pro-Glu. EP 0 366 638 discloses that GPE is effective as a neuromodulator and is able to affect the electrical properties of neurons.

WO95/172904 discloses that GPE has neuroprotective properties and that administration of GPE can reduce damage to the central nervous system (CNS) by the prevention or inhibition of neuronal and glial cell death.

WO 98/14202 discloses that administration of GPE can increase the effective amount of choline acetyltransferase (ChAT), glutamic acid decarboxylase (GAD), and nitric oxide synthase (NOS) in the central nervous system (CNS).

WO99/65509 discloses that increasing the effective amount of GPE in the CNS, such as by administration of GPE, can increase the effective amount of tyrosine hydroxylase (TH) in the CNS to increase TH-mediated dopamine production in the treatment of diseases such as Parkinson's disease.

WO02/16408 discloses certain GPE analogs having amino acid substitutions and certain other modification that are capable of inducing a physiological effect equivalent to GPE within a patient. The applications of the GPE analogs include the treatment of acute brain injury and neurodegenerative diseases, including injury or disease in the CNS.

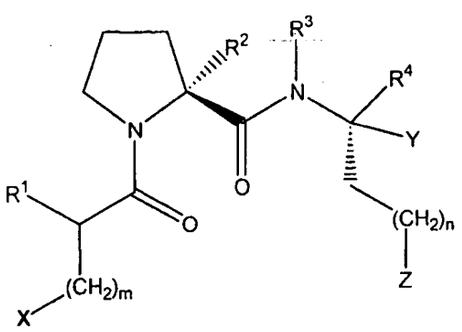
SUMMARY

There is no current, effective, treatment of ASD and patient care is limited to management of the symptoms.

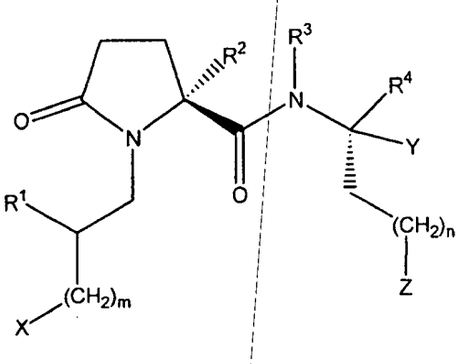
This invention relates to synthetic analogs and peptidomimetics of glycyl–L-prolyl-L-glutamic acid (GPE). In particular, this invention relates to GPE analogs and peptidomimetics that are anti-apoptotic and anti-necrotic, to methods of making them, to pharmaceutical compositions containing them, and to their use to enhance cognitive function and/or treat memory disorders and to improve neuronal connectivity in animals. More specifically, this application relates to the methods of use of the GPE analog, G-2Methyl-Prolyl-Glutamic acid (G-2-MePE) in the treatment of ASD.

The U.S. Patent No. 7,041,314 discloses compositions of matter and methods of use of G-2-MePE

In one aspect, this invention provides compounds of Formula 1 and Formula 2:



Formula 1



Formula 2

where m is 0 or 1;

n is 0 or 1;

X is H or —NR^6R^7;

Y is H, alkyl, —CO_2R^5, or —$CONR^6R^7$;

Z is H, alkyl, —CO_2R^5 or —$CONR^6R^7$;

R^1 is H, alkyl, or aralkyl;

R^2, R^3, and R^4 are independently H or alkyl;

each R^5 is independently H, alkyl, or a fatty alcohol residue;

each R^6 and R^7 is independently H, alkyl, or aralkyl, or -NR^6R^7 is pyrrolidino, piperidino, or morpholino;

or a lactone formed when a compound where Y is —CO_2(alkyl) and Z is —CO_2H or where Y is —CO_2H and Z is —CO_2(alkyl) is lactonized;

and the pharmaceutically acceptable salts thereof,

provided that the compound is not GPE, N-Me-GPE, GPE amide, APE, GPQ or a salt thereof.

Another aspect the invention provides methods for treatment of an animal having a Autism Spectrum Disorder comprising administration of an effective amount of Glycyl-L-2-Methylprolyl-L-Glutamic Acid (G-2-MePE) to the animal.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

This invention is described with reference to specific embodiments thereof. Other aspects and features of this invention can be understood with reference to the Figures, in which:

FIG. 1 is a general scheme for preparation of synthetic analogs of GPE of the invention.

FIGs. 2 and **3** depict schemes for modifying glycine residues on GPE.

FIGs. 4 through **9** depict schemes for modifying glutamic acid residues of GPE.

FIGs. 10 and **11** depict schemes for modifying peptide linkages of GPE.

FIGs. 12 - 15 depict graphs summarizing results of testing neurons in vitro with GPE or G-2-MePE and okadaic acid.

FIG. 12 depicts a graph showing effects of GPE on cortical neurons injured with okadaic acid.

FIG. 13 depicts a graph showing effects of G-2-MePE on cortical neurons injured with okadaic acid.

FIG. 14 depicts a graph showing effects of G-2-MePE, GPE on cerebellar microexplants injured with okadaic acid.

FIG. 15 depicts a graph showing effects of G-2-MePE or GPE on striatal cells injured with okadaic acid.

FIG. 16 shows the effects of subcutaneous injection of G-2-MePE (at doses of 0.012, 0.12, 1.2 and 12 mg/kg) on the number of ChAT-positive neurons in the striatum of 18-month old rats.

FIG. 17 shows effects of G-2-MePE treatment on spatial memory retention in middle-aged 12-month old rats.

FIGs. 18A and **18B** show effects of G-2-MePE on spatial working memory of aged (17-month old) rats in an 8-arm radial maze following 3-weeks of treatment and a nine day washout. **FIG. 18A** shows the maze acquisition profiles across days for the different groups. **FIG. 18B** shows the proportion of correct maze choices averaged across days for the groups.

FIG. 19A shows effects of a single intraperitoneal administration of 4 doses of G-2-MePE on neuroblast proliferation as assessed by the number of PCNA positive cells in the subventricular zone (SVZ) of aged rats.

FIG. 19B shows effects of a single intraperitoneal administration of 4 doses of G-2-MePE on co-localisation of PCNA and doublecortin staining in a rat treated with the highest dose of G-2-MePE (right panel) compared to the vehicle treated rat (left panel).

FIG. 19C shows effects of G-2-MePE on neuroblast proliferation as assessed by PCNA immunohistochemical staining in middle-aged rats.

FIG. 20A shows a significant increase in the number of reactive astrocytes as assessed by GFAP staining in the hippocampus in aged rats compared to young rats (*$p<0.01$) and middle aged rats (*$p<0.01$).

FIG. 20B shows a photograph of a section of cerebral cortex of an aged rat, showing astrocytes as assessed with GFAP staining, some of which are associated with formation of capillaries (arrows).

FIG. 20C shows dose-dependent effects of G-2-MePE treatment (at doses of 0.12, 0.12, 1.2 and 12 mg/kg/day) on reduction of the number of astrocytes as assayed using GFAP staining in the CA4 sub-region of the hippocampus in aged rats.

FIG. 20D shows dose-dependent effects of G-2-MePE treatment (at doses of 0.12, 0.12, 1.2 and 12 mg/kg/day) on reduction of the number of astrocytes as assayed using GFAP staining in the cerebellar cortex.

FIG. 21 shows pharmacokinetic properties of GPE and G-2-MePE in the circulation of rats after intravenous injection.

FIG. 22 shows the effects of G-2-MePE on increased survival duration in MeCP2 deficient mice compared to saline-treated MeCP2 deficient mice.

FIG. 23 shows the effects of G-2-MePE on the hippocampal long-term potentiation as measured by the fEPSP slope in MeCP2 deficient mice, compared to saline-treated MeCP2 deficient mice.

FIG. 24 depicts a graph showing effects of G-2-MePE on dendrite length as a function of distance from the cell soma.

DETAILED DESCRIPTION

Definitions

The term "about" with reference to a dosage or time refers to a particular variable and a range around that variable that is within normal measurement error is within 20% of the value of the variable. The term "about" with reference to a result observed means the variation is within 20% of the value of the observed variable.

The term "alkyl" means a linear saturated hydrocarbyl group having from one to six carbon atoms, or a branched or cyclic saturated hydrocarbyl group having from three to six carbon atoms. Exemplary alkyl groups include straight and branched chain, or cyclic alkyl groups, methyl, ethyl, isopropyl, cyclopropyl, tert-butyl, cyclopropylmethyl, and hexyl.

The term "animal" includes humans and non-human animals, such as domestic animals (cats, dogs, and the like) and farm animals (cattle, horses, sheep, goats, swine, and the like).

The term "aralkyl" means a group of the formula $—(CH_2)_{1\text{-}2}Ar$, where Ar is a 5- or 6-membered carbocyclic or heterocyclic aromatic ring, optionally substituted with 1 to 3 substituents selected from Cl, Br, —OH, —O—alkyl, $—CO_2R^8$ (where R^8 is H or alkyl), or $—NR^8R^9$, where R^8 is as described previously and R^9 is H or alkyl. Exemplary aralkyl groups include benzyl, 2-chlorobenzyl, 4-(dimethylamino)benzyl, phenethyl, 1-pyrrolylmethyl, 2-thienylmethyl, and 3-pyridylmethyl.

The term "disease" includes any unhealthy condition of an animal including particularly Parkinson's disease, Huntington's disease, Alzheimer's disease, multiple sclerosis, diabetes, motor disorders, seizures, cognitive dysfunctions due to aging and Autism Spectrum Disorders including autism, Fragile X Syndrome, Rett Syndrome (RTT), Autistic Disorder, Asperger Syndrome, Childhood Disintegrative Disorder and Pervasive Developmental Disorder Not Otherwise Specified (PDD-NOS), and Pathological Demand Avoidance (PDA). .

The term "fatty alcohol residue" is a linear hydrocarbyl group having from seven to twenty carbon atoms, optionally containing up to three carbon-carbon double bonds. Exemplary fatty alcohol residues include decyl, pentadecyl, hexadecyl (cetyl), octadecyl (stearyl), oleyl, linoleyl, and eicosyl.

The term "growth factor" means an extracellular polypeptide-signaling molecule that stimulates a cell to grow or proliferate.

The term "injury" includes any acute damage of an animal including non-hemorrhagic stroke, traumatic brain injury, perinatal asphyxia associated with fetal distress such as that following abruption, cord occlusion or associated with intrauterine growth retardation, perinatal

asphyxia associated with failure of adequate resuscitation or respiration, severe CNS insults associated with near miss drowning, near miss cot death, carbon monoxide inhalation, ammonia or other gaseous intoxication, cardiac arrest, coma, meningitis, hypoglycemia and status epilepticus, episodes of cerebral asphyxia associated with coronary bypass surgery, hypotensive episodes and hypertensive crises, cerebral trauma and toxic injury.

"Memory disorders" or "cognitive disorders" are disorders characterized by permanent or temporary impairment or loss of ability to learn, memorize or recall information. Memory disorder can result from normal aging, injury to the brain, tumors, neurodegenerative disease, vascular conditions, genetic conditions (Huntington's disease), hydrocephalus, other diseases (Pick's disease, Creutzfeld-Jakob disease, AIDS, meningitis), toxic substances, nutritional deficiency, biochemical disorders, psychological or psychiatric dysfunctions. The presence of memory disorder in a human can be established thorough examination of patient history, physical examination, laboratory tests, imagining tests and neuropsychological tests. Standard neuropsychological tests include but are not limited to Brief Visual Memory Test-Revised (BVMT-R), Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery (CANTAB), Children's Memory Scale (CMS), Contextual Memory Test, Continuous Recognition Memory Test (CMRT), Controlled Oral Word Association Test and Memory Functioning Questionnaire, Denman Neuropsychology Memory Scale, Digit Span and Letter Number Sequence sub-test of the Wechsler Adult Intelligence Scale-III, Fuld Object Memory Evaluation (FOME), Graham-Kendall Memory for Designs Test, Guild Memory Test, Hopkins Verbal Learning Test, Learning and Memory Battery (LAMB), Memory Assessment Clinic Self-Rating Scale (MAC-S), Memory Assessment Scales (MAS), Randt Memory Test, Recognition memory Test (RMT), Rey Auditory and Verbal Learning Test (RAVLT), Rivermead Behavioral Memory Test, Russell's Version of the Wechsler Memory Scale (RWMS), Spatial Working Memory, Test of Memory and Learning (TOMAL), Vermont Memory Scale (VMS), Wechsler Memory Scale, Wide Range Assessment of Memory and Learning (WRAML).

The term "pharmaceutically acceptable excipient" means an excipient that is useful in preparing a pharmaceutical composition that is generally safe, non-toxic, and desirable, and includes excipients that are acceptable for veterinary use as well as for human pharmaceutical use. Such excipients may be solid, liquid, semisolid, or, in the case of an aerosol composition, gaseous.

The term "pharmaceutically acceptable salt" means a salt that is pharmaceutically acceptable and has the desired pharmacological properties. Such salts include salts that can be formed where acidic protons present in the compounds react with inorganic or organic bases. Suitable inorganic salts include those formed with the alkali metals, e.g. sodium and potassium, magnesium, calcium, and aluminum. Suitable organic salts include those formed with organic

bases such as amines e.g. ethanolamine, diethanolamine, triethanolamine, tromethamine, N-methylglucamine, and the like. Salts also include acid addition salts formed by reaction of an amine group or groups present in the compound with an acid. Suitable acids include inorganic acids (e.g. hydrochloric and hydrobromic acids) and organic acids (e.g. acetic acid, citric acid, maleic acid, and alkane- and arene-sulfonic acids such as methanesulfonic acid and benzenesulfonic acid). When there are two acidic groups present in a compound, a pharmaceutically acceptable salt may be a mono-acid mono-salt or a di-salt; and similarly where there are more than two acidic groups present, some or all of such groups can be salified. The same reasoning can be applied when two or more amine groups are present in a compound.

The term "protecting group" is a group that selectively blocks one or more reactive sites in a multifunctional compound such that a chemical reaction can be carried out selectively on another unprotected reactive site and such that the group can readily be removed after the selective reaction is complete.

The term "therapeutically effective amount" means the amount of an agent that, when administered to an animal for treating a disease, is sufficient to effect treatment for that disease as measured using a test system recognized in the art.

The term "treating" or "treatment" of a disease may include preventing the disease from occurring in an animal that may be predisposed to the disease but does not yet experience or exhibit symptoms of the disease (prophylactic treatment), inhibiting the disease (slowing or arresting its development), providing relief from the symptoms or side-effects of the disease (including palliative treatment), and relieving the disease (causing regression of the disease).

The term "functional deficit" means a behavioral deficit associated with neurological damage. Such deficits include deficits of gait, as observed in patients with Parkinson's disease, motor abnormalities as observed in patients with Huntington's disease. Functional deficit also includes abnormal foot placement and memory disorders described herein.

The terms "G-2-MePE" and "NNZ-2566" means L-Glycyl-2-methyl-L-Prolyl-L-Glutamate.

The term "seizure" means an abnormal pattern of neural activity in the brain that results in a motor deficit or lack of motor control resulting in abnormal motion, including spasmodic motion. "Seizure" includes electroencephalographic abnormalities, whether or not accompanied by abnormal motor activity.

Implicit hydrogen atoms (such as hydrogen atoms on a pyrrolidine ring, etc.) are omitted from the formulae for clarity, but should be understood to be present.

Autism Spectrum Disorders

Autism spectrum disorders (ASDs) are a collection of linked developmental disorders, characterized by abnormalities in social interaction and communication, restricted interests and repetitive behaviours. Current classification of ASDs recognises five distinct forms: classical autism or Autistic Disorder, Asperger syndrome, Rett syndrome, childhood disintegrative disorder and pervasive developmental disorder not otherwise specified (PDD-NOS). A sixth syndrome, pathological demand avoidance (PDA), is a further specific pervasive developmental disorder. However, while PDA is increasingly recognised as an ASD, it is not yet part of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV), published by the American Psychiatric Association, nor is it part of the proposed revision, the DSM-V.

Autism

Classical autism is a highly variable neurodevelopmental disorder. It is typically diagnosed during infancy or early childhood, with overt symptoms often apparent from the age of 6 months, and becoming established by 2-3 years. According to the criteria set out in the DSM-IV, diagnosis of autism requires a triad of symptoms to be present, including (a) impairments in social interaction, (b) impairments in communication and (c) restricted and repetitive interests and behaviours. Other dysfunctions, such as atypical eating, are also common but are not essential for diagnosis. Of these impairments, social interaction impairments are particularly important for diagnosis, and two of the following impairments must be present for a diagnosis of autism:

(i) impairments in the use of multiple nonverbal behaviors (e.g. eye contact) to regulate social interaction;

(ii) failure to develop peer relationships appropriate to developmental level;

(iii) lack of spontaneous seeking to share enjoyment, interests, or achievements;

(iv) lack of social or emotional reciprocity.

Communication impairments in autism may be manifest in one or more of the following ways: delay in (or total lack of) the development of spoken language; marked impairment in the ability to initiate or sustain a conversation; stereotyped and repetitive use of language; and/or a lack of spontaneous make-believe play. Restricted, repetitive and stereotyped patterns of behavior is also required for diagnosis, such as preoccupation with one or more interest considered abnormal in intensity, inflexible adherence to routines or rituals, repetitive motor mannerisms and/or persistent focus on parts of objects.

Lastly, for a diagnosis of autism, it is necessary that the impairment in the functioning of at least one area (i.e. social interaction, language, or imaginative play) should have an onset at less than 3 years of age.

Autism is commonly associated with epilepsy or epileptiform activity in the electroencephalogram (EEG). As many as 60 percent of patients with autism have epileptiform activity in their EEGs (Spence and Schneider, 2009 *Ped Res* 65: 599-606).

Autism is also associated with disturbances in function of IGF-1, which is depleted in the Central Nervous System (CNS) in patients with autism (Riikonen et al., 2006 *Devel Med Child Neurol* 48: 751-755). IGF-1 levels in the CNS increase in patients with autism after treatment with agents that reduce symptoms such as fluoxetine (Makkonen et al., 2011 *Neuropediatrics* 42:207-209).

Importantly, autism shares features of Rett Syndrome and Fragile X Syndrome in relation to neuronal connectivity. All three disorders are characterised by defects in synaptic function and neuronal connectivity. This is reflected in studies of post mortem human brain in these patient groups, which all show failure to form normal synaptic connections. This is reflected in altered morphological characteristics, being either a reduction in neuron dendritic spine density, or enhanced dendritic spine density but associated with immature synapses. This is reflected in animal models of autism, Rett Syndrome and Fragile X Syndrome, which are based on genetic changes known to be pathological in these disorders. In these animal models, neuronal connectivity defects are revealed morphologically, and also as a failure of Long Term Potentiation (LTP). This is important since IGF-1, IGF-1[1-3] and G-2-MePE increase synapse formation.

Asperger Syndrome

Asperger syndrome or Asperger Disorder is similar to autism, and shares certain features. Like autism, Asperger syndrome is also characterized by impairment in social interaction and this is accompanied by restricted and repetitive interests and behavior. Thus, diagnosis of Asperger syndrome is characterized by the same triad of impairments as autism. However, it differs from the other ASDs by having no general delay in language or cognitive development and no deficit in interest in the subject's environment. Moreover, Asperger syndrome is typically less severe in symptomology than classical autism and Asperger's patients may function with self-sufficiency and lead relatively normal lives.

Childhood Disintegrative Disorder

Childhood disintegrative disorder (CDD), also known as Heller syndrome, is a condition in which children develop normally until age 2-4 years (i.e. later than in Autism and Rett syndrome), but then demonstrate a severe loss of social, communication and other skills. Childhood disintegrative disorder is very much like autism and both involve normal development followed by significant loss of language, social play and motor skills. However, childhood

disintegrative disorder typically occurs later than autism, involves a more dramatic loss of skills and is far less common.

Diagnosis of CDD is dependent on dramatic loss of previously acquired skills in two or more of the following areas: language, social skills, play, motor skills (such as a dramatic decline in the ability to walk, climb, grasp, etc), bowel or bladder control (despite previously being toilet-trained). The loss of developmental skills may be abrupt and take place over the course of days to weeks or may be more gradual.

Pervasive Developmental Disorder - Not Otherwise Specified (PDD-NOS)

Pervasive Developmental Disorder - Not Otherwise Specified (PDD-NOS) is an ASD that describes patients exhibiting some, but not all, of the symptoms associated with other well defined ASDs. The key criteria for diagnosis of an ASD include difficulty socializing with others, repetitive behaviors, and heightened sensitivities to certain stimuli. These are all found in the ASDs described above. However, autism, Asperger syndrome, Rett syndrome and childhood disintegrative disorder all have other features that enable their specific diagnosis. When specific diagnosis of one of these four disorders cannot be made, but ASD is apparent, a diagnosis of PDD-NOS is made. Such a diagnosis may result from symptoms starting at a later age than is applicable for other conditions in the spectrum.

Rett Syndrome

Rett Syndrome (RTT) is a neurodevelopmental disorder that almost exclusively affects females (1 in 10:000 live births). RTT is classified as an autism spectrum disorder (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition – Revised (DSM-IV-R). Approximately 16,000 patients are currently affected by it in the U.S.A. (*Rett Syndrome Research Trust data*). For a diagnosis of Rett syndrome, the following symptoms are characteristic: impaired development from age 6-18 months; slowing of the rate of head growth starting from between age 3 months and 4 years; severely impaired language; repetitive and stereotypic hand movements; and gait abnormalities, e.g. toe-walking or unsteady stiff-legged walk. There are in addition, a number of supportive criteria that may help diagnosis of Rett Syndrome, but are not essential for a diagnosis. These include breathing difficulties, EEG abnormalities, seizures, muscle rigidity and spasticity, scoliosis (curving of the spine), teeth-grinding, small hands and feet in relation to height, growth retardation, decreased body fat and muscle mass, abnormal sleep patterns, irritability or agitation, chewing and/or swallowing difficulties, poor circulation and constipation.

The onset of RTT usually begins between 6-18 months of age with a slowing of development and growth rates. This is followed by a regression phase (typically in children aged

1-4 years of age), pseudo-stationary phase (2-10 years of age) and a subsequent progressive late motor deterioration state. RTT symptoms include sudden deceleration of growth and regression in language and motor skills including purposeful hand movements being replaced by stereotypical movements, autistic features, panic-like attacks, sleep cycle disturbances, tremors, seizures, respiratory dysfunctions (episodic apnea, hyperpnea), apraxia, dystonia, dyskinesia, hypotonia, progressive kyphosis or scoliosis and severe cognitive impairment. Most RTT patients survive into adulthood with severe disabilities and require 24-hour-a-day care.

Between 85% and 95% cases of RTT are reported to be caused by a mutation of the *Mecp2* gene (Amir et al. 1999. Nat Genet 23:185-188; *Rett Syndrome Research Trust*) - a gene encoding methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2). *Mecp2* maps to the X-chromosome (location Xq28) and for this reason, mutations to the gene in males are usually lethal. While RTT is a genetic disorder, less than 1% of recorded cases are inherited; almost all mutations of *Mecp2* occur *de novo*, with two thirds caused by mutations at 8 CpG dinucleotides (R106, R133, T158, R168, R255, R270, R294 and R306) located on the third and fourth exons.

MeCP2 is a protein that binds methylated CpG dinucleotides to exert transcriptional silencing of DNA in the CNS. The key effect of a reduction or absence of MeCP2 appears to be an impairment of dendritic spine development and the formation of synapses. MeCP2 expression appears to temporally correlate with brain maturation, explaining why symptoms typically appear around 18 months of age.

Presenting Features Common to ASDs

Taking the ASDs together, it is clear that there are commonalities in presenting symptoms among all 5 forms. These common features are impairments in normal social competences, and repetitive behaviours. In all but Asperger syndrome there is also a consistent presentation of delayed intellectual development most commonly manifest as a shortfall in language skills. Cognitive loss relative to normal parameters for the age is often quite marked in autism, Rett Syndrome, CDD and PDD-NOS. The presence of epilepsy or abnormal activity in the EEG is also common to autism, Fragile X Syndrome and Rett Syndrome. Epilepsy arises in situations of abnormal neuronal connectivity. Impaired neuronal connectivity and deranged synaptic function is a common feature of autism, Fragile X Syndrome and Rett Syndrome and of animal models of these conditions.

Genetic Models of ASD

To offer validity, animal models of ASDs must demonstrate similar symptoms to the clinical conditions and have a reasonable degree of face validity regarding the etiology of those symptoms. It is known that classical autism may be caused by many different genetic

impairments and no single genetic defect is thought to account for more than a few percent of autism cases. Indeed, recent studies have revealed numerous *de novo* structural variations of chromosome locations thought to underlie ASD, in addition to rare inherited genetic defects (Marshall et al, 2008; Sebat et al, 2007). Thus, copy number variation (CNV), translocation and inversion of gene sequences at 20 key sites or more, including 1p, 5q, 7q, 15q, 16p, 17p and Xq, have been mapped as ASD loci.

However, despite the polygenetic background underlying ASD, and the complexity of the etiology, it is known that certain genetic defects can produce ASD. Some of the best characterized defects arise from chromosomal aberrations of genes that code for a cluster of postsynaptic density proteins, including neuroligin-3 (NLGN3), neuroligin-4 (NLGN4), neurexin-1α (NRXN1) and shank3 (Sebat et al, 2007). Importantly, these defects point to altered synaptic function and therefore disturbed neuronal connectivity as a final common pathway in autism and related disorders (Minshew and Williams 2007 *Arch Neurol.* 64:945-950; Gilman et al., 2011 *Neuron*. 70:898-907). Such connectivity deficits are reflected in morphological findings in post mortem examination, which reveal increased dendritic spine density in autism (Hutsler and Zhang 2010 *Brain Res.* 1309:83-94).

NLGN3 and NLGN4 are postsynaptic cell-adhesion molecules present in glutamatergic synapses. They play a role in coordinating presynaptic contact to the postsynaptic site and also interact with the postsynaptic scaffolding protein shank3. Mutations to NLGN3 and NLGN4 have been observed in the ASD population and account for perhaps 1% of all ASD cases (Lintas & Persico, 2008). Jamain and colleagues first reported a missense to NLGN3 and a frameshift to NLGN4 in two unrelated subjects, resulting in Asperger syndrome and classical autism respectively (Jamain et al, 2003). While the incidence of NLGN3 or NLGN4 mutations in the ASD population is low (indeed, no much mutations were observed in a study of 96 ASD patients in a Canadian study; Gauthier et al, 2005), it has been confirmed in preclinical studies that neuroligin mutations can indeed produce of model of autistic symptoms. Thus, introduction to mice of the same R451C missense to NLGN3 that has been reported clinically results in a mutant mouse strain showing reduced social interaction and enhanced inhibitory synaptic transmission (Tabuchi et al, 2007).

The R451C mutant therefore mouse represents a model for ASD based upon NLGN3 mutation. In this case, mutation at the R451 position of NLGN3 results in a 'gain-of-function' mutation.

In contrast, modeling the clinical mutation of NLGN4 in mice is achieved by a 'loss-of-function' mutation of NLGN4 (a classical knockout model). In this model, mutant mice display a social interaction deficit and reduced ultrasonic vocalization (Jamain et al, 2008). Communication deficits are central to clinical ASDs and in the NLGN4 knockout mice a

reduction in ultrasonic vocalizations from male mice exposed to wild-type female counterparts supports the face validity of the strain as a model of ASD.

Presynaptic neurexin proteins induce postsynaptic differentiation in opposing dendrites through interactions with postsynaptic neuroligin counterparts. Mutations of the neurexin-1α (NRXN1) gene have been reported in numerous studies (Sebat et al, 2007; Marshall et al, 2008; Kim et al, 2008; Yan et al, 2008) and these have been observed in the form of copy-number variants. As with NLGN mutations, when a mutation of the NRXN1 gene is introduced to mice (in the form of gene knockout), a mutant strain with certain ASD-like features is produced (Etherton et al, 2009). These NRXN1 knockout mice show a decrease in hippocampal miniature excitatory postsynaptic current (mEPSC) frequency and a decreased input-output relationship of evoked currents. These electrophysiological effects relate to decreased excitatory transmission in the hippocampus. In addition to decreased excitatory neurotransmission, NRXN1 knockout mice exhibit a decrease in pre-pulse inhibition, though social behaviour appears to be unaffected (Etherton et al, 2009).

Sharing certain features with the neurexin-NLGN trans-synaptic construct, cell adhesion molecule 1 (CADM1) is an immunogolbulin family protein present both pre- and post-synaptically that is also involved in synaptic trans-cell adhesion activity (Biederer et al, 2002). Mutations to the CADM1 gene have been detected in ASD patients and appear to represent a further possible cause of these conditions (Zhiling et al, 2008).

Analysis of CADM1 knockout mice reveals that these animals show increased anxiety-related behavior, impaired social interaction and impaired social memory and recognition. In addition CADM1 knockout mice demonstrate poorer motor skills (Takayanagi et al, 2010). These dysfunctions are again consistent with ASD symptomatology.

22q13 deletion syndrome (also known as Phelan-McDermid Syndrome), is a rare genetic disorder caused by a microdeletion at the q13.3 terminal end of chromosome 22. This microdeletion is rarely uncovered by typical genetic screening and a fluorescence *in situ* hybridization test is recommended to confirm the diagnosis. Recent work indicates the syndrome is caused by errors in the gene shank3, a postsynaptic density protein critical for normal neuronal functioning. Interestingly, errors in this gene have also been associated with ASD and 22q13 deletion syndrome can commonly lead to an ASD diagnosis (Durand et al, 2007; Moessner et al, 2007; Sykes et al, 2009). Given the close association of 22q13 deletion syndrome and the consequential diagnosis of ASD, a mutant mouse model of this mutation has been developed.

The shank3 knockout mouse exhibits several deficits that mirror ASD symptoms, including reduced ultrasonic vocalizations (i.e. diminished social communication) as well as impaired social interaction time between mice. In addition, these mice have impaired hippocampal CA1 excitatory transmission, measured by input-output relationship of evoked

currents and impaired long-term potentiation (LTP). LTP is believed to be a physiological process underlying memory formation and consolidation. Thus, the model exhibits a similar phenotype to the NLGN4 knockout, consistent with ASD.

As has been noted, 22q13 deletion syndrome itself is very rare. However, it provides important information that involvement specific genes may have in the etiology of ASDs. In addition to shank3, this disorder reveals a further possible gene defect in ASD. Of the 50 or so cases of 22q13 deletion syndrome described, all but one have a gene deletion that extends beyond shank3 to include a further gene, known as the Islet Brain-2 gene (IB2) (Sebat et al, 2007). The IB2 protein interacts with many other proteins including MAP kinases and amyloid precursor protein, appears to influence protein trafficking in neurites, and is enriched at postsynaptic densities (Giza et al, 2010). Mice lacking the protein (IB2-/- knockout mice) exhibit impaired social interaction (reduced social sniffing and interaction time), reduced exploration and cognitive and motoric deficits (Giza et al, 2010). This behavioral phenotype was associated with reduced excitatory transmission in cerebellar cells. As with shank3 knockout, the phenotype of IB2 mutation is therefore also consistent with ASD.

In addition to the animal models of postsynaptic density protein defects described above, other monogenetic syndromes that share various features with ASDs can lead to autism offer another avenue for drug targeting of ASD. An excellent example of this is Fragile X Syndrome.

Fragile X Syndrome (FXS) is caused by the expansion of a single trinucleotide gene sequence (CGG) on the X-chromosome that results in failure to express the protein coded by the *fmr1* gene. FMR1 (fragile X mental retardation 1) is a protein required for normal neural development. FXS can cause a child to have autism (Hagerman et al, 2010); in 2-6% of all children diagnosed with autism the cause is FXS gene mutation. Moreover, approximately 30% of FXS children have some degree of autism and a further 30% are diagnosed with PDD-NOS (Hagerman et al, 2010). Indeed, Fragile X Syndrome is the most common known single gene cause of autism. FMR1 knockout mice have been developed as a model of FXS and, therefore, as a further model of ASD. Knockout mutation of the FMR1 gene has been shown to result in neuronal connectivity deficits such as abnormal dendritic spine development and pruning (Comery et al, 1997), along with an associated dysregulation of dendritic scaffold proteins (including shank1) and glutamate receptor subunits in postsynaptic densities (Schütt et al, 2009). These effects on dendrite morphology results deficits in functional measures of connectivity such as impaired LTP in the cortex and amygdala (Zhao et al, 2005) and hippocampus (Lauterborn et al, 2007), as well as impaired cognition (Kreuger et al, 2011) and an enhancement in social anxiety (Spencer et al, 2005). These connectivity deficits are mirrored in FXS patients, who show enhanced dendritic spine density in post mortem analyses (Irwin et al., 2000 *Cereb Cortex* 10:1034-1048). This enhanced dendritic spine density is accompanied by immature synapses

(Klemmer et al., 2011 *J Biol Chem.* 286:25495-25504), i.e. may represent a functionally immature state.

In contrast to the ASDs of autism, Asperger, CDD and PDD-NOS, Rett syndrome appears to have an almost monogenetic basis and may be modeled in mice with good face validity. Rett syndrome is thought be caused, in up to 96% of cases, by a defect in the *Mecp2* gene (Zoghbi, 2005). As a result, MeCP2 knockout mutant mice provide an animal model with all the hallmarks of clinical Rett syndrome, with a phenotype showing some overlap with the NLGN4, shank3 and IB2 knockout models of ASD. Thus, MeCP2 knockout mice display a clear impairment in LTP in the hippocampus along with a corresponding decrease in social and spatial memory (Moretti et al, 2006) and impaired object recognition (Schaevitz et al, 2010). This impairment in LTP is accompanied by a decrease in dendritic spine density. Patients with Rett Syndrome show reduced dendritic spine density (Belichenko et al., 1994 *Neuroreport* 5:1509-1513).

Thus, ASDs in human beings share many features of cognitive or developmental disorders in animals, including rodents. Therefore, studies of therapies of ASDs in rodents such as mice and rats are reasonably predictive of results obtained in human beings. A common feature seen in autism, Fragile X Syndrome and Rett Syndrome is the presence of neuronal connectivity deficits, reflected in either decreased dendritic spine density or enhanced dendritic spine density with immature synapses. The functional consequences of these morphological changes are similar in animal models of these disorders, reflected as deficits in LTP, for example.

Treatment of Clinical ASD and ASD Animal Models With G-2-MePE

As described above, a conserved pathology is observed in ASDs that comprises impaired neurite development, impaired synaptic connectivity and a corresponding impairment in social and cognitive functioning as a result. Such synaptic dysfunctions result from genetically altered functions of postsynaptic density proteins. Normal neurite growth and postsynaptic development may be regulated and augmented by growth factors such as brain derived neurotrophic factor (BDNF; Chapleau et al, 2009) and insulin-like growth factor-1 (IGF-1; Riikonen et al, 2006; Tropea et al, 2009). Indeed, IGF-1 is essential for normal dendritic spine growth and synapse formation (Cheng et al., 2003 *J Neurosci Res.* 73:1-9). Drugs that promote growth factor function are therefore of use in the treatment of progressive developmental disorders such as ASDs. G-2-MePE is a small molecule methylated analog of the terminal tripeptide of IGF-1, IGF1(1-3). As an IGF-1 mimetic analog, G-2-MePE exerts trophic and neuroprotective effects in various animal models. G-2-MePE is therefore effective at treating ASD symptoms such as those relating to synaptic dysfunctions resulting from the gene mutations described above.

In clinical terms, ASD patients, presenting with autism, Asperger syndrome, Rett syndrome, childhood disintegrative disorder and PDD-NOS, as well as patients with 22q13

deletion syndrome, Fragile X Syndrome and pathological demand avoidance are treated with G-2-MePE. Patients exhibit social and communication impairments as well as cognitive deficit. Treatment with G-2-MePE, for example, on a daily basis and in another example, by the oral route, is observed to induce an improvement in stereotypic repetitive movements, improved social functioning and improved cognitive performance following drug treatment.

In animal models of ASDs, daily G-2-MePE treatment by oral gavage or intraperitoneal injection to knockout mice will improve ASD-like symptoms. G-2-MePE is effective in the following ASD mutant mouse models: NLGN3 (R451C) mutant, NLGN4 knockout, NRXN1 knockout, CADM1 knockout, shank3 knockout, IB2 knockout, FMR1 knockout and MeCP2 knockout. When administered sub-chronically (1-10 weeks) on a daily basis, G-2-MePE is effective at improving LTP in the hippocampus following burst stimulation or high frequency stimulation. Similarly, G-2-MePE increases excitatory neurotransmission as measured by field extracellular postsynaptic potential electrophysiological recordings in cortex, hippocampus and cerebellum. As a result of improved excitatory neurotransmission (reversal of observed ASD-like neurotransmission deficit), G-2-MePE is observed to improve cognitive and motoric outcome tests of cognitive performance. Thus, G-2-MePE improves performance in the Morris water maze and radial arm maze tests. In models of social interaction, G-2-MePE, administered to ASD mutant mice, increases time spent by knockout males in social interaction with wild-type females. In addition, ultrasonic vocalizations to female wild type mice is increased. In models in which longevity is observed to be reduced in mutant mice compared to wild-type controls (such as the MeCP2 knockout mouse model of Rett Syndrome), treatment with G-2-MePE increases the lifespan of the animals.

G-2-MePE has been found to inhibit non-convulsive seizures (NCS) in animals with hypoxic-ischemic injuries caused by middle cerebral artery occlusion (MCaO; U.S. Pat. No. 7,714,020; Lu et al., *NNZ-2566, a glypromate analog, attenuates brain ischemia-induced nonconvulsive seizures in rats*, J Cerebral Blood Flow metabolism (2009) 1-9) and inhibits neuroinflammation in animals with penetrating ballistic injury (pTBI; Wei et al., *NNZ-2566 treatment inhibits neuroinflammation and pro-inflammatory cytokine expression induced by experimental penetrating ballistic-like brain injury in rats*, J. Neuroinflammation (2009) 6:19, 1-10).

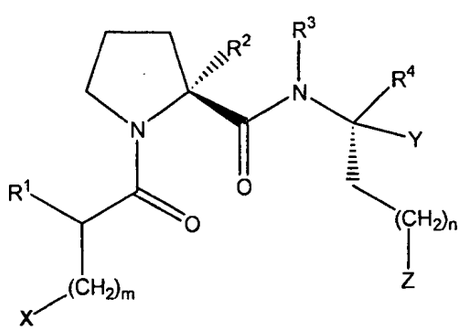
Our findings that G-2-MePE also are effective in treating Rett Syndrome and ASDs, are completely unexpected based on the prior art. This is because the NCS in the MCaO model is caused by hypoxia-ischemia and the inflammatory cytokine expression in the pTBI model is caused by penetrating trauma, both of which are acute insults that are very different from the chronic effects of MECP2 or other mutations on synaptic maturation.

Because G-2-MePE is a member of the compounds of GPE analogs disclosed herein, any of the disclosed compounds also can be effective in treating symptoms of ASDs. Further, because compounds and methods of this invention address underlying neurological mechanisms (e.g., decrease neural inflammation by inhibiting release of inflammatory cytokines), this invention can provide more than short-term management of symptoms. Rather, compounds and methods of this invention can improve neural function, promote neuronal cell migration, promote neurogenesis, promote neuronal stem cell differentiation, promote axonal and dendritic outgrowth, and promote synaptic transmission, thereby relieving adverse symptoms of ASDs.

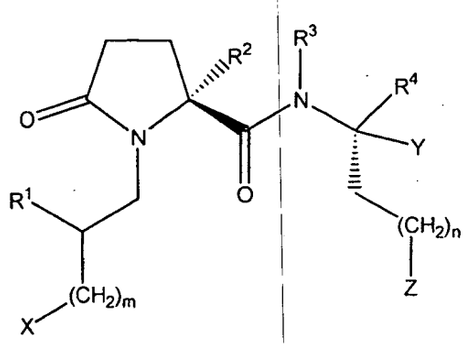
Compounds of the Invention

While the broadest definition of the invention is set out in the Summary, certain compounds of this invention are presently described.

In one aspect, this invention provides compounds of Formula 1 and Formula 2:



Formula 1



Formula 2

where m is 0 or 1;

n is 0 or 1;

X is H or —NR^6R^7;

Y is H, alkyl, —CO_2R^5, or —$CONR^6R^7$;

Z is H, alkyl, —CO_2R^5 or —$CONR^6R^7$;

R^1 is H, alkyl, or aralkyl;

R^2, R^3, and R^4 are independently H or alkyl;

each R^5 is independently H, alkyl, or a fatty alcohol residue;

each R^6 and R^7 is independently H, alkyl, or aralkyl, or -NR^6R^7 is pyrrolidino, piperidino, or morpholino;

or a lactone formed when a compound where Y is —CO_2(alkyl) and Z is —CO_2H or where Y is —CO_2H and Z is —CO_2(alkyl) is lactonized;

and the pharmaceutically acceptable salts thereof,

provided that the compound is not GPE, N-Me-GPE, GPE amide, APE, GPQ or a salt thereof.

In some aspects, this invention includes:

(a) the compounds are compounds of Formula 1;

(b) m is 0;

(c) n is 1;

(d) at least one of X, Y, R^1, R^2, R^3, R^4, and R^5 is not hydrogen;

(e) X is —NR^6R^7; and

(f) Y is —CO_2R^5 or —$CO_2NR^6R^7$; and

(g) Z is —CO_2R^5 or —$CO_2NR^6R^7$.

Other compounds of the invention are compounds of Formula 1 wherein X is -NR^6R^7 and R^6 and R^7 are independently alkyl or aralkyl. The more preferred embodiment is a compound of Formula I wherein X is -NR^6R^7 and both R^6 and R^7 are alkyl.

Yet another compound of the invention is G-2-MePE, a compound of Formula 1 wherein m is 0, n is 1, R1=R3=R4=H, R2 is methyl, X is NR^6R^7 where R^6=R^7=H, Y is CO_2R^5 where R^5 =H, Z is CO_2R^5 where R^5 =H.

Pharmacology and Utility

Compounds of this invention can have anti-inflammatory, anti-apoptotic, anti-necrotic and neuroprotective effects. Their activity *in vivo* can be measured by cell counts, specific staining of desired markers, or by methods such as those discussed in Klempt ND et al: Hypoxia-ischemia induces transforming growth factor β1 mRNA in the infant rat brain. Molecular Brain Research: 13: 93-101. Their activity can also be measured *in vitro* using methods known in the art or described herein.

Conditions affecting brain function become prevalent in aging populations. Memory loss and memory impairment are distressing to patients affected and their families. Memory loss or impairment can result from normal aging, injury to the brain, neurodegenerative disease and psychological or psychiatric dysfunctions. It is therefore of great benefit to patients, their families and to society that novel compounds are identified and characterized that enhance memory and/or cognitive function, and treat or prevent memory loss or impairment.

It is desirable to study effects of potential therapeutic agents in animal systems. One such useful system is the rat. It is known that with aging, rats and other animals (including human

beings) can exhibit symptoms of memory loss, memory impairment and other cognitive dysfunctions. Further, it is known that studies in rats of therapeutic agents are predictive of therapeutic effects in humans. Thus, studies of effects of GPE and G-2-MePE and cognitive function in aging rats are reasonably predictive of therapeutic effects of those agents in aging human beings that have or are prone to acquiring memory deficits or other cognitive dysfunction. Compounds of this invention can enhance cognitive function and/or treat memory disorders. The cognitive enhancing activity and therapeutic activity *in vivo* can be measured by standard neuropsychological or behavioral tests known to individuals skilled in the art. Such tests can be chosen from a wide range of available tests described above, and will vary depending on the cognitive function to be tested and the condition of the animal.

Standard behavioral tests useful for testing cognitive function in experimental animals include but are not limited to the Morris Water Maze test, passive avoidance response test, novel object recognition test, olfactory discrimination test, the 8-arm radial maze test and the T-maze test. These tests are directly applicable to studies of effects of GPE and G-2-MePE on cognitive function in aging rats.

The compounds of this invention are also expected to have pharmacological and therapeutic activities similar to those of GPE, and these activities may be measured by the methods known in the art, and discussed in the documents cited herein, and by methods used for measuring the activity of GPE.

The therapeutic ratio of a compound can be determined, for example, by comparing the dose that gives effective anti-inflammatory, anti-apoptotic and anti-necrotic activity in a suitable in vivo model such as a hypoxic-ischemic injury (Sirimanne ES, Guan J, Williams CE and Gluckman PD: Two models for determining the mechanisms of damage and repair after hypoxic-ischemic injury in the developing rat brain (Journal of Neuroscience Methods: 55: 7-14, 1994) in a suitable animal species such as the rat, with the dose that gives significant observable side-effects in the test animal species.

The therapeutic ratio of a compound can also be determined, for example by comparing the dose that gives effective cognitive function enhancement or treats a memory disorder in a suitable in vivo model (Examples 4, 5 and 6 below) in a suitable animal species such as the rat, with the dose that gives significant weight loss (or other observable side-effects) in the test animal species.

Compounds of this invention can be useful in treatment of a variety of neurodegenerative disorders, including hypoxia/ischemia and neuronal degeneration (U.S. Pat. No. 7,041,314), traumatic brain injury, motor disorders and seizures, stroke, and cardiac artery bypass graft surgery (U.S. Pat. No. 7,605,177), non-convulsive seizures (U.S. Pat. No. 7,714,020), and disorders of cognitive function (U.S. Appl. No. 12/903,844). Additionally, as described more fully herein below, compounds of this invention can be useful for treating Rett Syndrome,

including prolonging life, increasing neuronal activity and treating seizures associated with Rett Syndrome.

In one study of Rett Syndrome in mice (using the MeCP2 knock-out model), GPE was found to have effects to prolong life and increase neuronal function (U.S. Publication No. 2009/0099077). However, as disclosed further herein, GPE, being a naturally occurring peptide, is rapidly degraded *in vivo* and *in vitro*, and its utility in chronic therapy of patients with Rett Syndrome is therefore unclear.

Pharmaceutical Compositions and Administration

In general, compounds of this invention can be administered in therapeutically effective amounts by any of the usual modes known in the art, either singly or in combination with at least one other compound of this invention and/or at least one other conventional therapeutic agent for the disease being treated. A therapeutically effective amount may vary widely depending on the disease or injury, the severity of the disease, the age and relative health of the animal being treated, the potency of the compound(s), and other factors. As anti-inflammatory, anti-apoptotic, anti-necrotic, anti-neurodegenerative, therapeutically effective amounts of compounds of this invention can range from about 0.001 milligrams per kilogram (mg/kg) to about 100 (mg/kg) mass of the animal, for example, about 0.1 to about 10 mg/kg, with lower doses such as about 0.001 to about 0.1 mg/Kg, e.g. about 0.01 mg/Kg, being appropriate for administration through the cerebrospinal fluid, such as by intracerebroventricular administration, and higher doses such as about 1 to about 100 mg/Kg, e.g. about 10 mg/Kg, being appropriate for administration by methods such as oral, systemic (e.g. transdermal), or parenteral (e.g. intravenous) administration. A person of ordinary skill in the art will be able without undue experimentation, having regard to that skill and this disclosure, to determine a therapeutically effective amount of a compound of this invention for a given disease or injury.

In general, compounds of this invention can be administered as pharmaceutical compositions by one of the following routes: oral, topical, systemic (e.g. transdermal, intranasal, or by suppository), or parenteral (e.g. intramuscular, subcutaneous, or intravenous injection), by administration to the CNS (e.g. by intraspinal or intercisternal injection); by implantation, and by infusion through such devices as osmotic pumps, implantable pumps, transdermal patches, and the like. Compositions can take the form of tablets, pills, capsules, semisolids, powders, sustained release formulation, solutions, suspensions, elixirs, aerosols, soluble gels or any other appropriate compositions; and comprise at least one compound of this invention in combination with at least one pharmaceutically acceptable or physiological acceptable excipient. Suitable excipients are well known to persons of ordinary skill in the art, and they, and the methods of formulating the compositions, may be found in such standard references as Gennaro AR: Remington: The Science

and Practice of Pharmacy, 20th ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 2000. Suitable liquid carriers, especially for injectable solutions, include water, aqueous saline solution, aqueous dextrose solution, glycols, and the like, with isotonic solutions being preferred for intravenous, intraspinal, and intracisternal administration and vehicles such as artificial cerebrospinal fluid being also especially suitable for administration of the compound to the CNS. The above text is expressly incorporated herein fully by reference.

Compounds of this invention can be administered orally, in tablets or capsules. In some embodiments, compounds of this invention can be prepared in water-in-oil emulsions in the form of microemulsions, coarse emulsions, liquid crystals, or nanocapsules (U.S. Appl. No. 12/283,684, now U.S. Pat. No. 7,887,839 issued February 15, 2011). Because compounds of this invention can have substantial oral bioavailability, they can be advantageously used for convenient and chronic administration. Additionally, orally available compositions include soluble hydrogels containing active compounds, thus permitting oral administration of neuroprotective compounds without the need for a patient to swallow a tablet or capsule. Such slow-release materials and gels are known in the art.

Compounds of this invention can be administered after or before onset of a condition that is likely to result in neurodegeneration or a symptom thereof. For example, it is known that hypoxia/ischemia can occur during coronary artery bypass graft (CABG) surgery. Thus, a patient can be pre-treated with a compound of this invention before being placed on an extracorporeal oxygenation system. In some embodiments, it can be desirable to administer a compound of this invention beginning about 4 hours before surgery or before an event that is likely to lead to traumatic or other neurological injury. In other embodiments, it can be desirable to infuse a compound of this invention during the surgery or during a surgical procedure to repair a neurological injury. Compounds of this invention can also be used in emergency situations, for example in a patient that has just experienced a stroke, hypoxic event, traumatic brain injury or other acute insult. In such situations, a compound of this invention can be administered immediately after a diagnosis of neural injury is made.

In some situations, kits containing compound of this invention can be prepared in advance of use in the field. A kit can contain a vial containing a compound of the invention in a pharmaceutically acceptable formulation (e.g., for injection or oral administration), along with a syringe or other delivery device, and instructions for use. In situations in which a seizure is diagnosed, a compound of this invention can be administered along with an anticonvulsant. Many anticonvulsants are known in the art and need not be described in detail herein.

Additionally, "secondary" neurological injuries can occur after a primary insult such as a traumatic injury, stroke or surgical procedure. For example, after a stroke, penetrating brain injury or a CABG procedure, inflammation of neural tissue can lead to neurodegeneration.

Secondary injuries can be reflected by increased activation of inflammatory cells (e.g., astrocytes and/or microglia), and actions of inflammatory mediators can cause neurological damage. Thus, in some embodiments, it can be desirable to administer a compound of this invention for periods beginning before the insult, to up to about 100 hours after the insult. In other embodiments, it can be desirable to administer a compound of this invention beginning before the insult, during the insult and after the insult, either continuously, as an infusion, or in discrete doses separated by a desired time interval.

Compounds of this invention can also be suitably administered by a sustained-release system or gel material with G-2-MePE incorporated therein. Suitable examples of sustained-release compositions include semi-permeable polymer matrices in the form of shaped articles, e.g., films, or microcapsules. Sustained-release matrices include polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919; EP 58,481), copolymers of L-glutamic acid and gamma-ethyl-L-glutamate (Sidman et al., 1983), poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (Langer et al., 1981), ethylene vinyl acetate (Langer et al., supra), or poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid (EP 133,988). Additionally, gel compositions based on polysaccharides (e.g., carboxymethyl cellulose, carboxyethyl cellulose, chitosan or other cellulose derivatives) and polyethylene oxide derivatives (e.g., polyethylene glycols) can be used used. These gel compositions are soluble in aqueous solutions, are biocompatible, non-toxic and therefore can be used for administering compounds of this invention to any mucosal surface, including the oral cavity, nasopharynx, urogenital tract, intestine or rectum.

Sustained-release compositions also include a liposomally entrapped compound. Liposomes containing the compound are prepared by methods known per se: DE 3,218,121; Epstein et al., 1985; Hwang et al., 1980; EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; Japanese Pat. Appln. 83-118008; U.S. Pat. Nos. 4,485,045 and 4,544,545; and EP 102, 324. Ordinarily, liposomes are of the small (from or about 200 to 800 Angstroms) unilamellar type in which the lipid content is greater than about 30 mole percent cholesterol, the selected proportion being adjusted for the most efficacious therapy. Each and every of the above-identified publications is expressly herein incorporated fully by reference, as if each had been separately so incorporated.

Compounds of this invention can also be attached to polyethylene glycol ("PEGylated") to increase their lifetime *in vivo*, based on, e.g., the conjugate technology described in WO 95/32003.

Desirably, if possible, when administered as an anti-inflammatory, an anti-apoptotic agent, an anti-necrotic agent, or an anti-neurodegenerative agent, compounds of this invention can be administered orally. The amount of a compound of this invention in the composition can vary widely depending on the type of composition, size of a unit dosage, kind of excipients, and other factors well known to those of ordinary skill in the art. In general, the final composition can

comprise from about 0.0001 percent by weight (% w) to about 10% w of the compound of this invention, preferably about 0.001% w to about 1% w, with the remainder being an excipient or excipients.

A composition may optionally contain, in addition to a compound of this invention, at least one agent selected from, for example, growth factors and associated derivatives (insulin-like growth factor-I (IGF-I), insulin-like growth factor-II (IGF-II), transforming growth factor-β1, activin, growth hormone, nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), growth hormone binding protein, IGF-binding proteins (especially IGFBP-3), basic fibroblast growth factor, acidic fibroblast growth factor, the hst/Kfgk gene product, FGF-3, FGF-4, FGF-6, keratinocyte growth factor, androgen-induced growth factor. Additional members of the FGF family include, for example, int-2, fibroblast growth factor homologous factor-1 (FHF-1), FHF-2, FHF-3 and FHF-4, karatinocyte growth factor 2, glial-activating factor, FGF-10 and FGF-16, ciliary neurotrophic factor, brain derived growth factor, neurotrophin 3, neurotrophin 4, bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), glial-cell line derived neurotrophic factor, activity-dependant neurotrophic factor, cytokine leukaemia inhibiting factor, oncostatin M, interleukin), α-, β-, γ-, or consensus interferon, and TNF-α. Other forms of neuroprotective therapeutic agents include, for example, clomethiazole; kynurenic acid, Semax, tacrolimus, L-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol, andrenocorticotropin-(4-9) analog [ORG 2766] and dizolcipine (MK-801), selegiline; glutamate antagonists such as mematine (Namenda) NPS1506, GV1505260, MK-801, GV150526; AMPA antagonists such as 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo(f)quinoxaline (NBQX), LY303070 and LY300164; anti-inflammatory agents directed against the addressin MAdCAM-1 and/or its integrin α4 receptors (α4β1 and α4β7), such as anti-MAdCAM-1mAb MECA-367 (ATCC accession no. HB-9478). Combination therapy with metabotropic glutamate receptor antagonists such as fenobam may also be useful. Also, in addition to a compound of this invention, a composition may include a selective serotonin reuptake inhibitor such as fluoxetine, a selective norepinephine reuptake inhibitor such as viloxazine, or an atypical anti-psychotic such as risperidone. Most of these agents, especially the peptides such as the growth factors, etc., are not orally active, and will require administration by injection or infusion.

Preparation of Compositions

The starting materials and reagents used in preparing these compounds are either available from commercial suppliers such as Aldrich Chemical Company (Milwaukee, Wis.), Bachem (Torrance, Calif.), Sigma (St.Louis, Mo.), or are prepared by methods well known to the person of ordinary skill in the art following procedures described in such references as Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, vols 1-17, John Wiley and Sons, New York, N.Y., 1991;

Rodd's Chemistry of Carbon Compounds, vols. 1-5 and supplements, Elsevier Science Publishers, 1989; Organic Reactions, vols. 1-40, John Wiley and Sons, New York, N.Y., 1991; March J; Advanced Organic Chemistry, 4th ed. John Wiley and Sons, New York, N.Y., 1992; and Larock: Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, 1989. In most instances, amino acids and their esters or amides, and protected amino acids, are widely commercially available; and the preparation of modified amino acids and their amides or esters are extensively described in the chemical and biochemical literature and thus well-known to persons of ordinary skill in the art. For example, *N*-pyrrolidineacetic acid is described in Dega-Szafran Z and Pryzbylak R. Synthesis, IR, and NMR studies of zwitterionic α-(1-pyrrolidine)alkanocarboxylic acids and their N-methyl derivatives. J. Mol. Struct.: 436-7, 107-121, 1997; and *N*-piperidineacetic acid is described in Matsuda O, Ito S, and Sekiya M. Reaction of N-(alkoxymethyl)dialkylamines and N,N'-methylenebisdialkylamines with isocyanides. Chem. Pharm. Bull.: 23(1), 219-221, 1975. Each of the above-identified publications is herein expressly incorporated fully by reference as though individually so incorporated.

Starting materials, intermediates, and compounds of this invention may be isolated and purified using conventional techniques, including filtration, distillation, crystallization, chromatography, and the like. They may be characterized using conventional methods, including physical constants and spectral data.

Compounds of this invention may be prepared by the methods described below and as given in the Examples.

Compounds of Formula 1 are analogs of GPE, or modifications thereof, such as esters or amides. In general, they may be prepared by methods such as are already well-known to persons of ordinary skill in the art of peptide and modified peptide synthesis, following the reaction schemes set forth in the **FIGs 1-11** accompanying this specification, or by following other methods well-known to those of ordinary skill in the art of the synthesis of peptides and analogs.

Conveniently, synthetic production of the polypeptides of the invention may be according to the solid-phase synthetic method described by Merrifield.et al. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide: J. Amer. Chem. Soc.: 85, 2149-2156, 1963. This technique is well understood and is a common method for preparation of peptides. The general concept of this method depends on attachment of the first amino acid of the chain to a solid polymer by a covalent bond. Succeeding protected amino acids are added, one at a time (stepwise strategy), or in blocks (segment strategy), until the desired sequence is assembled. Finally, the protected peptide is removed from the solid resin support and the protecting groups are cleaved off. By this procedure, reagents and by-products are removed by filtration, thus eliminating the necessity of purifying intermediaries.

Amino acids may be attached to any suitable polymer as a resin. The resin must contain a functional group to which the first protected amino acid can be firmly linked by a covalent bond. Various polymers are suitable for this purpose, such as cellulose, polyvinyl alcohol, polymethylmethacrylate and polystyrene. Suitable resins are commercially available and well known to those of skill in the art. Appropriate protective groups usable in such synthesis include tert-butyloxycarbonyl (BOC), benzyl (Bzl), t-amyloxycarbonyl (Aoc), tosyl (Tos), o-bromo-phenylmethoxycarbonyl (BrZ), 2,6-dichlorobenzyl ($BzlCl_2$), and phenylmethoxycarbonyl (Z or CBZ). Additional protective groups are identified in Merrifield, cited above, as well as in McOmie JFW: Protective Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, New York, 1973, both references expressly incorporated fully herein.

General procedures for preparing peptides of this invention involve initially attaching a carboxyl-terminal protected amino acid to the resin. After attachment the resin is filtered, washed and the protecting group (desirably BOC) on the I-amino group of the carboxyl-terminal amino acid is removed. The removal of this protecting group must take place, of course, without breaking the bond between that amino acid and the resin. The next amino, and if necessary, side chain protected amino acid, is then coupled to the free I-amino group of the amino acid on the resin. This coupling takes place by the formation of an amide bond between the free carboxyl group of the second amino acid and the amino group of the first amino acid attached to the resin. This sequence of events is repeated with successive amino acids until all amino acids are attached to the resin. Finally, the protected peptide is cleaved from the resin and the protecting groups removed to reveal the desired peptide. The cleavage techniques used to separate the peptide from the resin and to remove the protecting groups depend upon the selection of resin and protecting groups and are known to those familiar with the art of peptide synthesis.

Alternative techniques for peptide synthesis are described in Bodanszky et al, Peptide Synthesis, 2nd ed, John Wiley and Sons, New York, 1976. For example, the peptides of the invention may also be synthesized using standard solution peptide synthesis methodologies, involving either stepwise or block coupling of amino acids or peptide fragments using chemical or enzymatic methods of amide bond formation. (See, e.g., H. D. Jakubke in The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Academic Press, New York, 1987, p. 103-165; J. D. Glass, ibid., pp. 167-184; and European Patent 0324659 A2, describing enzymatic peptide synthesis methods.) These solution synthesis methods are well known in the art. Each of the above-identified publications is expressly incorporated herein fully by reference as though individually so incorporated.

Commercial peptide synthesizers, such as the Applied Biosystems Model 430A, are available for the practice of these methods.

A person of ordinary skill in the art will not have to undertake undue experimentation, taking account of that skill and the knowledge available, and of this disclosure, in developing one or more suitable synthetic methods for compounds of this invention.

For example, analogs in which the glycine residue of GPE is replaced by an alternative amino acid, or by a non-amino acid, may conveniently be prepared by the preparation of a C-protected proline-glutamic acid dipeptide (such as the dibenzyl ester), and coupling that dipeptide with an N-protected glycine analog, such as BOC-*N*-methylglycine, BOC-L-valine, *N*-pyrrolidineacetic acid, and the like, followed by deprotection, as illustrated in **FIGs. 2** and **3**. Analogs in which the glutamic acid residue of GPE is replaced by an alternative amino acid or an amino acid amide or ester may conveniently be prepared by the preparation of an N-protected glycine-L-proline dipeptide (such as BOC-glycyl-L-proline), and coupling that dipeptide with a C-protected glutamic acid or analog thereof, such as *tert*-butyl γ-aminobutyrate, methyl 4-amino-4-dimethylcarbamoylbutyrate, L-glutamine methyl ester, dimethyl I-methylglutamate, etc. Lactones may be prepared by the preparation of an appropriate mono-acid-mono-ester derivative and reduction Analogs in which R^2 is alkyl may conveniently be prepared simply by use of the appropriate 2-alkylproline in the synthesis, and similarly analogs in which R^3 is alkyl may conveniently be prepared by the use of the appropriate *N*-alkylglutamic acid or analog in the synthesis. Where modifications are to be made to two or more amino acids, the coupling techniques will still be the same, with just more than one modified amino acid or analog being used in the synthesis. The choice of appropriate protecting groups for the method chosen (solid-phase or solution-phase), and of appropriate substrates if solid-phase synthesis is used, will be within the skill of a person of ordinary skill in the art.

Compounds of Formula 2 may be prepared from suitably protected 5-oxo-L-proline or analogs or derivatives thereof, following methods such as the coupling of the proline carboxyl group with a protected glutamic acid or analog or derivative to give an analog of intermediate A of **FIG. 2**, comparable to the coupling reaction shown in **FIG. 2**, and then alkylating the pyrrolidine nitrogen with a group of the formula A----$(CH_2)_m$---$CH(R^1)$---CH_2R, protected at A if necessary, where R is a leaving group under alkylation conditions. Alternatively, the suitably protected 5-oxo-L-proline may first by alkylated at the pyrrolidine nitrogen to give an analog of intermediate B of **FIG. 4**, and then coupling this with a suitably protected glutamic acid or analog or derivative in the manner shown in **FIGs. 4** though **9**.

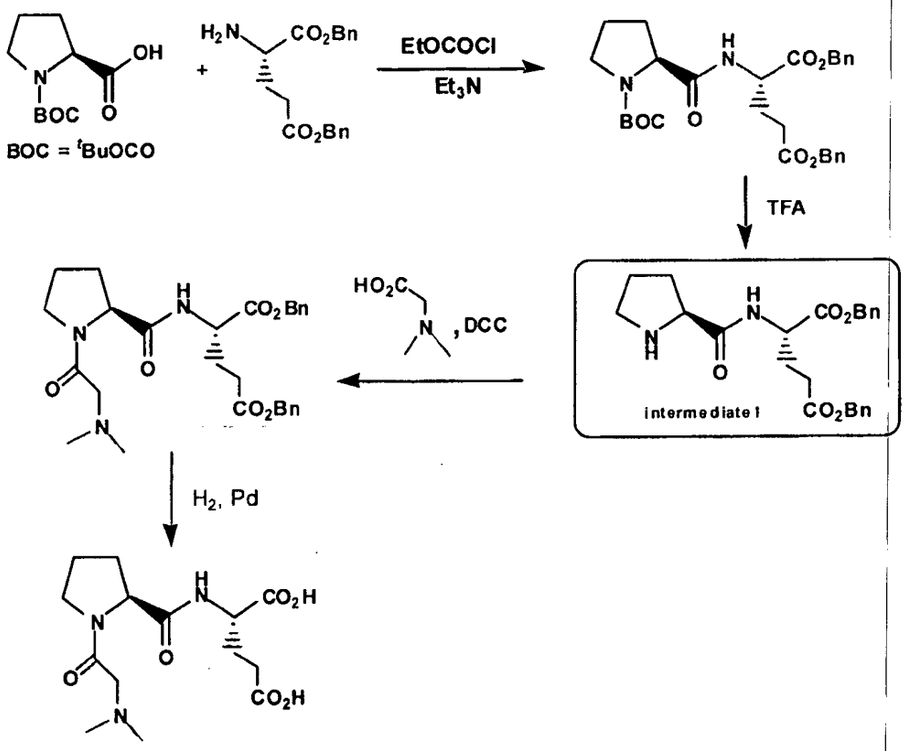
EXAMPLES

The following examples are intended to illustrate embodiments of this invention, and are not intended to limit the scope to these specific examples. Persons of ordinary skill in the art can apply the disclosures and teachings presented herein to develop other embodiments without undue

experimentation and with a likelihood of success. All such embodiments are considered part of this invention.

Example 1: Synthesis of *N,N*-Dimethylglycyl-L-prolyl)-L-glutamic acid

The following non-limiting example illustrates the synthesis of a compound of the invention, *N,N*-Dimethylglycyl-L-prolyl-L-glutamic acid



All starting materials and other reagents were purchased from Aldrich; BOC=tert-butoxycarbonyl; Bn=benzyl.

BOC-L-proline-(β-benzyl)-L-glutamic acid benzyl ester

To a solution of BOC-proline [Anderson GW and McGregor AC: J. Amer. Chem. Soc.: 79, 6810, 1994] (10 mmol) in dichloromethane (50 ml), cooled to 0°C, was added triethylamine (1.39 ml, 10 mmol) and ethyl chloroformate (0.96 ml, 10 mmol). The resultant mixture was stirred at 0 °C for 30 minutes. A solution of dibenzyl-L-glutamate (10 mmol) was then added and the mixture stirred at 0° C for 2 hours then warmed to room temperature and stirred overnight. The reaction mixture was washed with aqueous sodium bicarbonate and citric acid (2 mol l^{-1}) then dried ($MgSO_4$) and concentrated at reduced pressure to give BOC-L-proline-L-glutamic acid dibenzyl ester (5.0 g, 95%).

L-proline-L-glutamic acid dibenzyl ester

A solution of BOC-L-glutamyl-L-proline dibenzyl ester (3.4 g, 10 mmol), cooled to 0 °C, was treated with trifluoroacetic acid (25 ml) for 2 h. at room temperature. After removal of the volatiles at reduced pressure the residue was triturated with ether to give L-proline-L-glutamic acid dibenzyl ester.

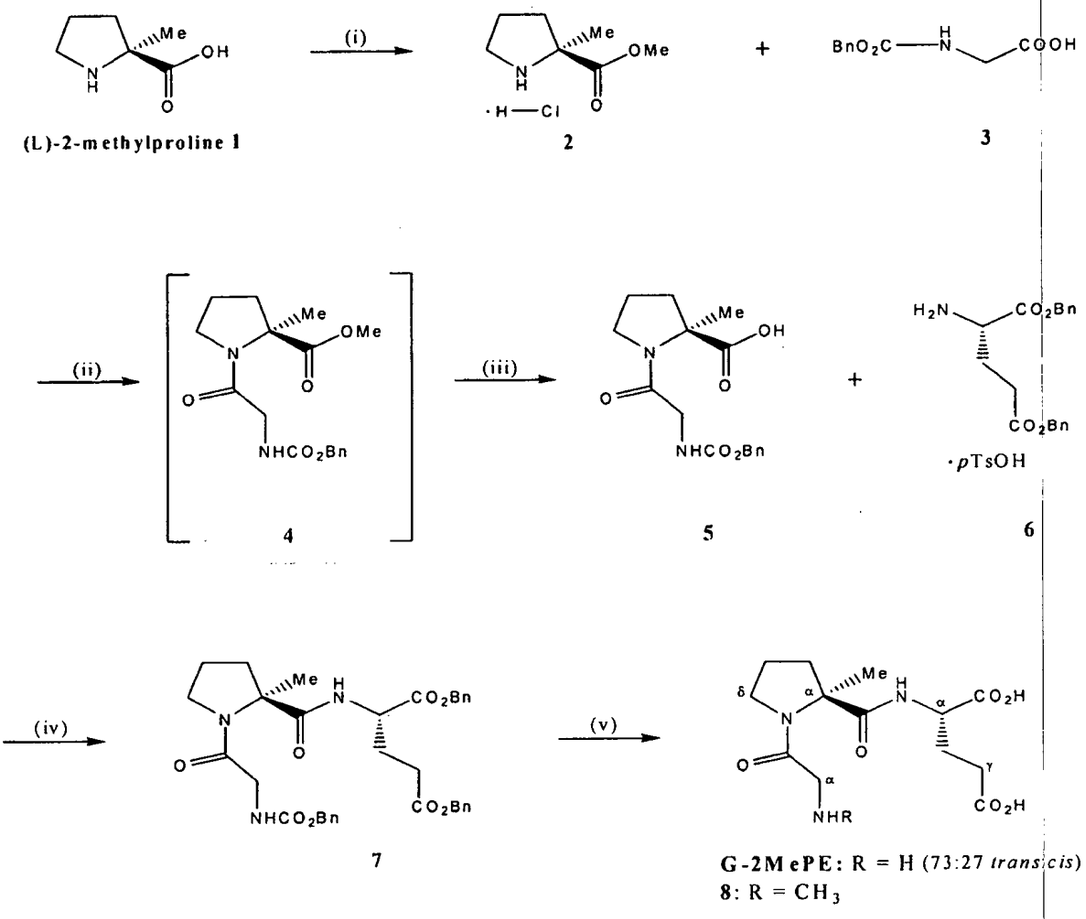
***N,N*-Dimethylglycyl-L-prolyl-L-glutamic acid**

A solution of dicyclohexylcarbodiimide (10.3 mmol) in dichloromethane (10 ml) was added to a stirred and cooled (0 °C) solution of L-proline-L-glutamic acid dibenzyl ester (10 mmol), *N,N*-dimethylglycine (10 mmol) and triethylamine (10.3 mmol) in dichloromethane (30 ml). The mixture was stirred at 0°C overnight and then at room temperature for 3 h. After filtration, the filtrate was evaporated at reduced pressure. The resulting crude dibenzyl ester was dissolved in a mixture of ethyl acetate (30 ml) and methanol (30 ml) containing 10% palladium on charcoal (0.5 g) then hydrogenated at room temperature and pressure until the uptake of hydrogen ceased. The filtered solution was evaporated and the residue recrystallised from ethyl acetate to yield the tripeptide derivative.

It can be appreciated that following the method of the Examples, and using alternative amino acids or their amides or esters, will yield other compounds of Formula 1.

Eample 2: Synthesis of Glycyl-L-2-Methyl-L-Prolyl-L-Glutamate

Glycyl-L-2-Methylprolyl-L-Glutamic Acid (G-2MePE)



Scheme 1 ***Reagents, conditions and yields***: (i) $SOCl_2$, MeOH, 79 °C, N_2, 24 h (104%); (ii) Et_3N, DCC, CH_2Cl_2, 0 °C to RT, N_2, 20 h; (iii) 1M aq. NaOH, 1,4-dioxane, 19 h (60%, 2 steps); (iv) Et_3N, BoPCl, CH_2Cl_2, RT, N_2, 17 h (89%); (v) H_2, 10% Pd/C, 91:9 MeOH-H_2O, RT, 23 h (86%).

L-2-Methylproline and L-glutamic acid dibenzyl ester *p*-toluenesulphonate were purchased from Bachem, *N*-benzyloxycarbonyl-glycine from Acros Organics and bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinic chloride (BoPCl, 97%) from Aldrich Chem. Co.

***Methyl L-2-methylprolinate hydrochloride* 2**

Thionyl chloride (5.84 cm^3, 80.1 mmol) was cautiously added dropwise to a stirred solution of (L)-2-methylproline **1** (0.43 g, 3.33 mmol) in anhydrous methanol (30 cm^3) at -5 °C under an atmosphere of nitrogen. The reaction mixture was heated under reflux for 24 h, and the

resultant pale yellow-coloured solution was concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was dissolved in a 1:1 mixture of methanol and toluene (30 cm^3) then concentrated to dryness to remove residual thionyl chloride. This procedure was repeated twice more, yielding *hydrochloride* **2** (0.62 g, 104%) as an hygroscopic, spectroscopically pure, off-white solid: mp 127-131 °C; $[\alpha]_D$ -59.8 (*c* 0.24 in CH_2Cl_2); ν_{max} (film)/cm^{-1} 3579, 3398 br, 2885, 2717, 2681, 2623, 2507, 1743, 1584, 1447, 1432, 1374, 1317, 1294, 1237, 1212, 1172, 1123, 981, 894, 861 and 764; δ_H (300 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si) 1.88 (3H, s, Proα-CH_3), 1.70-2.30 (3H, br m, Proβ-H_AH_B and Proγ-H_2), 2.30-2.60 (1H, br m, Proβ-H_AH_B), 3.40-3.84 (2H, br m, Proδ-H_2), 3.87 (3H, s, CO_2CH_3), 9.43 (1H, br s, NH) and 10.49 (1H, br s, HCl); δ_C (75 MHz; $CDCl_3$) 21.1 (CH_3, Proα-CH_3), 22.4 (CH_2, Proγ-C), 35.6 (CH_2, Proβ-C), 45.2 (CH_2, Proδ-C), 53.7 (CH_3, CO_2CH_3), 68.4 (quat., Proα-C) and 170.7 (quat., CO); *m/z* (FAB+) 323.1745 [$M_2.H^{35}Cl.H^+$: $(C_7H_{13}NO_2)_2$. $H^{35}Cl.H$ requires 323.1738] and 325.1718 [$M_2.H^{37}Cl.H^+$: $(C_7H_{13}NO_2)_2$. $H^{37}Cl.H$ requires 325.1708].

***N-Benzyloxycarbonyl-glycyl-L-2-methylproline* 5**

Anhydrous triethylamine (0.45 cm^3, 3.23 mmol) was added dropwise to a mixture of methyl L-2-methylprolinate hydrochloride **2** (0.42 g, 2.34 mmol) and *N*-benzyloxycarbonyl-glycine (98.5%) **3** (0.52 g, 2.45 mmol) in methylene chloride (16 cm^3), at 0 °C, under an atmosphere of nitrogen. The resultant solution was stirred for 20 min and a solution of 1,3-dicyclohexylcarbodiimide (0.56 g, 2.71 mmol) in methylene chloride (8 cm^3) at 0 °C was added dropwise and the reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for a further 20 h. The resultant white mixture was filtered through a Celite™ pad to partially remove 1,3-dicyclohexylurea, and the pad was washed with methylene chloride (50 cm^3). The filtrate was washed successively with 10% aqueous hydrochloric acid (50 cm^3) and saturated aqueous sodium hydrogen carbonate (50 cm^3), dried ($MgSO_4$), filtered, and concentrated to dryness *in vacuo*. Further purification of the residue by flash column chromatography (35 g SiO_2; 30-70% ethyl acetate – hexane; gradient elution) afforded tentatively *methyl N-benzyloxycarbonyl-glycyl-L-2-methylprolinate* **4** (0.56 g), containing 1,3-dicyclohexylurea, as a white semi-solid: R_f 0.65 (EtOAc); *m/z* (EI+) 334.1534 (M^+. $C_{17}H_{22}N_2O_5$ requires 334.1529) and 224 (1,3-dicyclohexylurea).

To a solution of impure prolinate **4** (0.56 g, *ca.* 1.67 mmol) in 1,4-dioxane (33 cm^3) was added dropwise 1M aqueous sodium hydroxide (10 cm^3, 10 mmol) and the mixture was stirred for 19 h at room temperature. Methylene chloride (100 cm^3) was then added and the organic layer extracted with saturated aqueous sodium hydrogen carbonate (2 × 100 cm^3). The combined aqueous layers were carefully acidified with hydrochloric acid (32%), extracted with methylene chloride (2 × 100 cm^3), and the combined organic layers dried ($MgSO_4$), filtered, and

concentrated to dryness *in vacuo*. Purification of the ensuing residue (0.47 g) by flash column chromatography (17 g SiO_2; 50% ethyl acetate – hexane to 30% methanol – dichloromethane; gradient elution) gave *N-protected dipeptide* **5** (0.45 g, 60%) as a white foam in two steps from hydrochloride **2**. Dipeptide **5** was shown to be exclusively the *trans*-orientated conformer by NMR analysis: R_f 0.50 (20% MeOH – CH_2Cl_2); $[\alpha]_D$ -62.3 (*c* 0.20 in CH_2Cl_2); ν_{max} (film)/cm^{-1} 3583, 3324 br, 2980, 2942, 1722, 1649, 1529, 1454, 1432, 1373, 1337, 1251, 1219, 1179, 1053, 1027, 965, 912, 735 and 698; δ_H (300 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si) 1.59 (3H, s, Proα-CH_3), 1.89 (1H, 6 lines, *J* 18.8, 6.2 and 6.2, Proβ-H_AH_B), 2.01 (2H, dtt, *J* 18.7, 6.2 and 6.2, Proγ-H_2), 2.25-2.40 (1H, m, Proβ-H_AH_B), 3.54 (2H, t, *J* 6.6, Proδ-H_2), 3.89 (1H, dd, *J* 17.1 and 3.9, Glyα-H_AH_B), 4.04 (1H, dd, *J* 17.2 and 5.3, Glyα-H_AH_B), 5.11 (2H, s, OCH_2Ph), 5.84 (1H, br t, *J* 4.2, N-H), 7.22-7.43 (5H, m, Ph) and 7.89 (1H, br s, -COOH); δ_C (75 MHz; $CDCl_3$) 21.3 (CH_3, Proα-CH_3), 23.8 (CH_2, Proγ-C), 38.2 (CH_2, Proβ-C), 43.6 (CH_2, Glyα-C), 47.2 (CH_2, Proδ-C), 66.7 (quat, Proα-C), 66.8 (CH_2, OCH_2Ph), 127.9 (CH, Ph), 127.9 (CH, Ph), 128.4, (CH, Ph), 136.4 (quat., Ph), 156.4 (quat., NCO_2), 167.5 (quat., Gly-CON) and 176.7 (quat., CO); *m/z* (EI+) 320.1368 (M^+. $C_{16}H_{20}N_2O_5$ requires 320.1372).

***Dibenzyl N-benzyloxycarbonyl-glycyl-L-2-methylprolyl-L-glutamate* 7**

Triethylamine (0.50 cm^3, 3.59 mmol) was added dropwise to a solution of dipeptide **5** (0.36 g, 1.12 mmol) and L-glutamic acid dibenzyl ester *p*-toluenesulphonate **6** (0.73 g, 1.46 mmol) in methylene chloride (60 cm^3) under nitrogen at room temperature, and the reaction mixture stirred for 10 min. Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinic chloride (BoPCl, 97%) (0.37 g, 1.41 mmol) was added and the colourless solution stirred for 17 h. The methylene chloride solution was washed successively with 10% aqueous hydrochloric acid (50 cm^3) and saturated aqueous sodium hydrogen carbonate (50 cm^3), dried ($MgSO_4$), filtered, and evaporated to dryness *in vacuo*. Purification of the resultant residue by repeated (2x) flash column chromatography (24 g SiO_2; 30-70% ethyl acetate – hexane; gradient elution) yielded *fully protected tripeptide* **7** (0.63 g, 89%) as a colourless oil. Tripeptide 7 was shown to be exclusively the *trans*-orientated conformer by NMR analysis: R_f 0.55 (EtOAc); $[\alpha]_D$ -41.9 (*c* 0.29 in CH_2Cl_2); ν_{max} (film)/cm^{-1} 3583, 3353 br, 2950, 1734, 1660, 1521, 1499, 1454, 1429, 1257, 1214, 1188, 1166, 1051, 911, 737 and 697; δ_H (400 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si) 1.64 (3H, s, Proα-CH_3), 1.72 (1H, dt, *J* 12.8, 7.6 and 7.6, Proβ-H_AH_B), 1.92 (2H, 5 lines, *J* 6.7, Proγ-H_2), 2.04 (1H, 6 lines, *J* 7.3 Gluβ-H_AH_B), 2.17-2.27 (1H, m, Gluβ-H_AH_B), 2.35-2.51 (3H, m, Proβ-H_AH_B and Gluγ-H_2), 3.37-3.57 (2H, m, Proδ-H_2), 3.90 (1H, dd, *J* 17.0 and 3.6, Glyα-H_AH_B), 4.00 (1H, dd, *J* 17.1 and 5.1, Glyα-H_AH_B), 4.56 (1H, td, *J* 7.7 and 4.9, Gluα-H), 5.05-5.20 (6H, m, 3 x OCH_2Ph), 5.66-5.72 (1H, br m, Gly-NH), 7.26-7.37 (15H, m, 3 × Ph) and 7.44 (1H, d, *J* 7.2, Glu-NH); δ_C (100 MHz; $CDCl_3$) 21.9 (CH_3, Proα-CH_3), 23.4 (CH_2,

Proγ-C), 26.6 (CH_2, Gluβ-C), 30.1 (CH_2, Gluγ-C), 38.3 (CH_2, Proβ-C), 43.9 (CH_2, Glyα-C), 47.6 (CH_2, Proδ-C), 52.2 (CH, Gluα-C), 66.4 (CH_2, OCH_2Ph), 66.8 (CH_2, OCH_2Ph), 67.1 (CH_2, OCH_2Ph), 68.2 (quat, Proα-C), 127.9 (CH, Ph), 128.0 (CH, Ph), 128.1, (CH, Ph), 128.2, (CH, Ph), 128.2, (CH, Ph), 128.3, (CH, Ph), 128.4, (CH, Ph), 128.5, (CH, Ph), 128.5, (CH, Ph), 135.2 (quat., Ph), 135.7 (quat., Ph), 136.4 (quat., Ph), 156.1 (quat., NCO_2), 167.3 (quat., Gly-CO), 171.4 (quat., CO), 172.9 (quat., CO) and 173.4 (quat., CO); *m/z* (FAB+) 630.2809 (MH^+. $C_{35}H_{40}N_3O_8$ requires 630.2815).

***Glycyl-L-2-methylprolyl-L-glutamic acid* (G-2-MePE)**

A mixture of the protected tripeptide **7** (0.63 g, 1.00 mmol) and 10 wt. % palladium on activated carbon (0.32 g, 0.30 mmol) in 91:9 methanol – water (22 cm^3) was stirred under an atmosphere of hydrogen at room temperature, protected from light, for 23 h. The reaction mixture was filtered through a Celite™ pad and the pad washed with 75:25 methanol – water (200 cm^3). The filtrate was concentrated to dryness under reduced pressure and the residue triturated with anhydrous diethyl ether to afford a 38:1 mixture of *G-2-MePE* and tentatively *methylamine* **8** (0.27 g, 86%) as an extremely hygroscopic white solid. Analytical reverse-phase HPLC studies on the mixture [Altech Econosphere C_{18} Si column, 150 × 4.6 mm, 5 □m; 5 min flush with H_2O (0.05% TFA) then steady gradient over 25 min to MeCN as eluent at flow rate of 1 ml/min; detection using diode array] indicated it was a 38:1 mixture of two eluting peaks with retention times of 13.64 and 14.44 min at 207 and 197 nm, respectively. G-2-MePE was shown to be a 73:27 *trans:cis* mixture of conformers by ^1H NMR analysis (the ratio was estimated from the relative intensities of the double doublet and triplet at δ 4.18 and 3.71, assigned to the Gluα-H protons of the major and minor conformers, respectively): mp 144 °C$^{\phi}$; $[\alpha]_D$ -52.4 (*c* 0.19 in H_2O); δ_H (300 MHz; D_2O; internal MeOH) 1.52 (3H, s, Proα-CH_3), 1.81-2.21 (6H, m, Proβ-H_2, Proγ-H_2 and Gluβ-H_2), 2.34 (1.46H, t, *J* 7.2, Gluγ-H_2), 2.42* (0.54H, t, *J* 7.3, Gluγ-H_2), 3.50-3.66 (2H, m, Proδ-H_2), 3.71* (0.27H, t, *J* 6.2, Gluα-H), 3.85 (1H, d, *J* 16.6, Glyα-H_AH_B), 3.92 (1H, d, *J* 16.6, Glyα-H_AH_B) and 4.18 (0.73H, dd, *J* 8.4 and 4.7, Gluα-H); δ_C (75 MHz; D_2O; internal MeOH) 21.8 (CH_3, Proα-CH_3), 25.0 (CH_2, Proγ-C), 27.8* (CH_2, Gluβ-C), 28.8 (CH_2, Gluβ-C), 32.9 (CH_2, Gluγ-C), 40.8 (CH_2, Proβ-C), 42.7 (CH_2, Glyα-C), 49.5 (CH_2, Proδ-C), 56.0* (CH, Gluα-C), 56.4 (CH, Gluα-C), 69.8 (quat, Proα-C), 166.5 (quat., Gly-CO), 177.3 (quat., Pro-CON), 179.2 (quat., Gluα-CO), 180.2* (quat., Gluγ-CO) and 180.6 (quat., Gluγ-CO); *m/z* (FAB+) 316.1508 (MH^+. $C_{13}H_{22}N_3O_6$ requires 316.1509).

Example 3: *In Vitro* Neuroprotection

Therapeutic effects of GPE analogs were examined in a series of experiments *in vitro* to determine their effects on neurodegeneration of neural cells of different origin. The *in vitro* systems described herein are well-established in the art and are known to be predictive of neuroprotective effects observed *in vivo*, including effects in humans suffering from neurodegenerative disorders.

Material and Methods

The following experimental protocol followed guidelines approved by the University of Auckland Animal Ethics Committee.

Preparation of cortical astrocyte cultures for harvest of metabolised cell culture supernatant

One cortical hemisphere from a postnatal day 1 rat was used and collected into 4ml of DMEM. Trituration was performed using a 5ml glass pipette and an 18-gauge needle. The cell suspension was sieved through a 100µm cell strainer and washed in 50 ml DMEM (centrifugation for 5 min at 250g). The sediment was resuspended in 20ml DMEM+10% fetal calf serum. The suspension was added into two $25cm^3$ flasks (10 ml per flask) and cultivated at 37°C in the presence of 10% CO_2 followed by a change of the medium twice a week. When cells reached confluence, they were washed three times with PBS, adjusted to Neurobasal/B27 and incubated for another 3 days. This supernatant was frozen for transient storage at -80°C.

Preparation of Stratial and Cortical Tissue from Rat E18/E19 Embryos

A dam was sacrificed by CO_2-treatment, and then was prepared for caesarean section. After surgery, the embryos were removed from their amniotic sacs and decapitated. The heads were placed on ice in DMEM/F12 medium for striatum and PBS + 0.65% D(+)- glucose for cortex.

Striatal Tissue Extraction Procedure and Preparation of Cells

A whole brain was removed from the skull with the ventral side facing upwards in DMEM/F12 medium. The striatum was dissected out from both hemispheres under a stereomicroscope and the striatal tissue was placed into a Falcon tube on ice. Striatal tissue was then triturated using a P1000 pipettor in 1 ml of volume. The tissue was triturated by gently pipetting the solution up and down into the pipette tip about 15 times, using shearing force on alternate outflows. The tissue pieces settled to the bottom of the Falcon tube within 30 seconds. The supernatant containing a suspension of dissociated single cells was then transferred to a new

sterile Falcon tube on ice. The tissue pieces were triturated again to avoid excessively damaging already dissociated cells, by over triturating them. 1 milliliter of ice-cold DMEM/F12 medium was added to the tissue pieces in the first tube and triturated as before. The tissue pieces were allowed to settle and the supernatant was removed to a new sterile Falcon tube on ice. The cells were centrifuged at 250g for 5 minutes at 4°C.

Plating and Cultivation of Striatal Cells

Striatal cells were plated into Poly-L-Lysine (0.1mg/ml) coated 96-well plates (the inner 60 wells only) at a density of 200,000 cells/cm^2 in Neurobasal/B27 medium (Invitrogen). The cells were cultivated in the presence of 5% CO_2 at 37°C under 100% humidity. Medium was changed on days 1, 3 and 6.

Cortical Tissue Extraction Procedure and Preparation of Cells

The two cortical hemispheres were carefully removed by spatula from the whole brain with the ventral side facing upside into a PBS +0.65%D(+)- glucose containing petri dish. Forceps were put into the rostral part (near B. olfactorius) of the cortex in order to fix the tissue and two lateral-sagittal oriented cuts were made to remove the paraform and entorhinal cortices. A frontal oriented cut at the posterior end was made to remove the hippocampal formation. A final frontal cut was done a few millimetres away from the last cut in order to get hold of area 17/18 of the visual cortex.

Cortices were placed on ice in PBS+0.65%(+)- glucose and centrifuged at 350g for 5 minutes. The supernatant was removed and trypsin/EDTA (0.05%/0.53mM) was added for 8min at 37°C. The reaction was stopped by adding an equal amount of DMEM and 10% fetal calf serum. The supernatant was removed by centrifugation followed by two subsequent washes in Neurobasal/B27 medium.

The cells were triturated once with a glass Pasteur pipette in 1 ml of Neurobasal/B27 medium and subsequently twice by using a 1 ml insulin syringe with a 22 gauge needle. The cell suspension was passed through a 100µm cell strainer and rinsed by 1ml of Neurobasal/B27 medium. Cells were counted and adjusted to 50,000 cells per 60µl.

Plating and Cultivation of Cortical Cells

96-well plates were coated with 0.2mg/ml Poly-L-Lysine and subsequently coated with 2µg/ml laminin in PBS, after which 60µl of cortical astrocyte-conditioned medium was added to each well. Subsequently, 60µl of cortical cell suspension was added. The cells were cultivated in the presence of 10% CO_2 at 37°C under 100% humidity. At day 1, there was a complete medium change (1:1 – Neurobasal/B27 and astrocyte-conditioned medium) with addition of 1 µM

cytosine-ß-D-arabino-furanoside (mitosis inhibitor). On days 2 and 5, 2/3 of the medium was changed.

Cerebellar Microexplants from P8 Animals: Preparation, Cultivation and Fixation

Laminated cerebellar cortices of the two hemispheres were explanted from a P8 rat, cut into small pieces in PBS +0.65% D(+) glucose solution and triturated with a 23gauge needle and subsequently pressed through a 125µm pore size sieve. The obtained microexplants were centrifuged (60g) twice (media change) into serum-free BSA-supplemented STARTV-medium (Biochrom). For cultivation, 40µl of cell suspension was adhered for 3 hours on a 0.1mg/ml Poly-L-Lysine coated cover slip placed in 35 mm sized 6 well plates in the presence of 5% CO_2 under 100% humidity at 34°C. Subsequently, 1 ml of STARTV-medium was added together with the toxins and drugs. The cultures were monitored (evaluated) after 2-3 days of cultivation in the presence of 5% CO_2 under 100% humidity. For cell counting analysis, the cultures were fixed in rising concentrations of paraformaldehyde (0.4%, 1.2%, 3% and 4% for 3 min each) followed by a wash in PBS.

Toxin and Drug Administration to Neural Dells *In Vitro* and Analysis of Data

To study neuroprotective effects of GPE analogs, we carried out a series of experiments in vitro using okadaic acid to cause toxic injury to neural cells. Okadaic acid is an art-recognized toxin that is known to cause injury to neurons. Further, recovery of neural cells or neural cell function after injury by okadaic acid is recognized to be predictive of recoveries from injuries caused by other toxins.

To cause toxic injury to neurons, we exposed neurons to 1:100 parts of okadaic acid at concentrations of 30nM or 100nM and 0.5mM 3-nitropropionic acid (for cerebellar microexplants only). GPE (1nM-1mM) or G-2-MePE (1nM-1mM) was used at 8 days in vitro (DIV) for cortical cultures and 9DIV for striatal cultures. The incubation time was 24 hours. The survival rate was determined by a colorimetric end-point MTT-assay at 595nm in a multi-well plate reader. For the cerebellar microexplants four windows (field of 0.65 mm^2) with highest cell density were chosen and cells displaying neurite outgrowth were counted.

Results

The GPE analog G-2-MePE exhibited comparable neuroprotective effects within all three tested *in vitro* systems (**FIGs 12-15**).

Cortical cultures responded to 10µM concentrations of GPE (**FIG. 12**) or G-2-MePE (10µM, **FIG. 13**) with 64% and 59% neuroprotection, respectively.

The other 2 types of cultures demonstrated neuroprotection at lower doses of G-2-MePE (cerebellar microexplants: **FIG. 14** and striatal cells: **FIG. 15**). Striatal cells demonstrated neuroprotection within the range of 1nM to 1mM of G-2-MePE (**FIG. 15**), while the postnatal cerebellar microexplants demonstrated neuroprotection with G-2-MePE in the dose range between about 1nM and about100nM (**FIG. 14**). Thus, we conclude that G-2-MePE is a neuroprotective agent and can have therapeutic effects in humans suffering from neurodegenerative disorders. Because G-2-MePE can be neuroprotective when directly administered to neurons in culture, that G-2-MePE can be effective *in vivo* when directly administered to the brains of affected animals.

Example 4: Effects of G-2-MePE on Striatal Cholinergic Neurons in Aging Rats

To determine whether G-2-MePE can affect cholinergic neurons, we studied aging rats. Choline acetyltransferase (ChAT) is an enzyme that is involved in the biosynthesis of the neurotransmitter for cholinergic nerves, acetylcholine. It is well known that immunodetection of ChAT can be used to determine the numbers of cholinergic nerves present in a tissue. It is also known that the numbers of cholinergic nerves present is associated with the physiological function of cholinergic neural pathways in the brain.

In this experiment, we tested the effects of G-2-MePE on the number of ChAT-positive neurons in brains of 18-month old rats.

Methods

Eighteen-month old male rats received one of five treatments. A control group was treated with vehicle (saline alone (n=4) and four groups were treated with a single dose of G-2-MePE. Doses of 0.012 (n=4), 0.12 (n=5), 1.2 (In=5) and 12 mg/kg (n=3), respectively, were given sub-cutaneously. Rats were sacrificed with an overdose of pentobarbital 3 days after drug treatment. Brains were perfused with normal saline and 4% paraformaldehyde and fixed in perfusion fixative overnight. Brains were stored in 25% sucrose in 0.1M PBS (pH7.4) until the tissue sank. Frozen coronal sections of striatum were cut with a microtome and stored in 0.1% sodium azide in 0.1M PBS at 4°C. Immunoreactivity for choline acetyltransferase (ChAT) was established by staining using a free floating section method. Briefly, antibodies were diluted in 1% goat serum. The sections were incubated in 0.2% triton in 0.1M PBS/Triton™ at 4°C. overnight before Immunohistochemical staining. The sections were pre-treated with 1% H_2O_2 in 50% methanol for 20 min. The sections were then incubated with rabbit (Rb) anti-ChAT (1:5000) antibodies (the primary antibodies) in 4D on a shaker for two days. The sections were washed using PBS/Triton™ (15 minutes x 3d) and then incubated with goat anti-rabbit biotinylated secondary antibodies (1:1000) at room temperature overnight. The sections were washed and incubated in ExtrAvidin™ (Sigma) (1:1000) for 3 hours and followed by H_2O_2 (0.01%) in 3,3-

diaminobenzine tetrahydrochloride (DAB, 0.05%) to produce a coloured reaction product. These sections were mounted on chrome alum-coated slides, dried, dehydrated and covered.

The striatal neurons in both hemispheres exhibiting specific immunoreactivities corresponding to ChAT were counted using a light microscope and a 1 mm 2x1000 grid. The size of the striatal region used for the count was measured using an image analyser. The total counts of neurons/mm^2 were compared between the groups.

Data were analysed using a paired t-test and presented as mean +/- SEM. Results are presented in **FIG. 16**.

Results

FIG. 16A shows that the number of ChAT-immunopositive neurons increased in the brains of animals treated with G-2-MePE. This clearly indicates that administration of G-2-MePE is effective in increasing the level of ChAT in the brains of aged rats. Because ChAT is an enzyme involved in the synthesis of the cholinergic neurotransmitter acetylcholine, we conclude that G-2-MePE can increase the amount of cholinergic transmitter in the brains of middle-aged rats.

Example 5: Effects of G-2-MePE on Spatial Reference Memory in Rats

Having demonstrated that G-2-MePE can increase ChAT and therefore has the potential to improve cholinergic neural function, we then examined whether G-2-MePE can be useful in treating age-related changes in cognition and/or memory. Therefore, we carried out a series of studies in rats using well-established tests for memory.

Experiment 1: The Morris Water Maze Test

The Morris water maze test is a well-recognized test to assess spatial reference memory in rats.

Subjects

We used male Wistar rats 12, 8 or 4 months of age.

Methods

Testing Environment and Apparatus

The Morris water maze test was conducted using a black plastic pool filled to a depth of 25 cm with water colored black with a non-toxic dye. The pool had a circular black insert so that the walls also appeared uniform black The pool was divided into four quadrants (north, south, east and west) by two imaginary perpendicular lines crossing at the pool's center A metal platform was placed in the geographical centre of the SE quadrant 50cm from the edge of the pool, so that

it was 2cm below the water surface and invisible. The platform remained in that position though the training.

The experiment used extra-maze cues (i.e. objects in the room surrounding the pool) that the rats could use to navigate to the platform. Distinctive posters or paintings were hung on the walls. Furniture in the room was not moved during the testing period. The placement of the pool allowed the experimenter an easy access to it from all sides. The pool was emptied and refilled daily during testing, with water at 25°C +/- 2°C.

The furthermost point in the pool (relative to the position of the experimenter) was designated as "north", and the other compass points "east", "south" and "west" were the right-most, bottom and left-most points of the pool respectively. These points were marked with tape on the outside of the pool.

Acquisition Phase

Rats in each group were trained to swim to the submerged platform. The rats received six 60-second trials per day for four consecutive days. A trial began by placing the rat into the water facing the wall of the pool, at one of four start locations (north, south, east, west). The sequence of start locations was chosen pseudorandomly, so that the start location of any given trial was different from that of the previous trial, and no start location was used more than twice during daily training. The same sequence of locations was used for all the rats on a given day but varied between days. The trial ended when the rat had found the platform, or in 60 seconds, which ever occurred first. The trials were timed with a stop watch. If the rat found the platform, it was allowed to remain there for 15 seconds before being removed to a holding container. If the platform was not found, the rat was guided there manually and placed on the platform for 15-seconds. The inter-trial interval was 60 seconds. The holding container was covered in order to minimize any inter-trial interference. At the completion of daily testing for a rat, the animal was towel-dried and placed under the heat lamp in the holding bucket until his coat was dry. The time needed to locate the platform (latency, secs) was obtained for each rat in each training trial. If the rat did not find the platform in a given trial their latency score was the maximum length of that trial (60 seconds).

Drug Treatment

Three days after the completion of the acquisition phase, mini-osmotic pumps (Alzet) were implanted subcutaneously under halothane anesthesia) to dispense drug or vehicle continuously for 1 or 3 weeks. At the completion of the infusion the pumps were removed and the wounds re-sutured.

The 5 treatment groups were:

1. saline 1 week (n was originally 7, but one rat that lost weight rapidly was excluded and later found to have had a pituitary tumor);
2. saline 3 weeks (n=8);
3. G-2-MePE low dose (0.96 mg/day) 1 week (n=8);
4. G-2-MePE low dose (0.96 mg/day) 3 weeks (n=8);
5. G-2-MePE high dose (4.8 mg/day) 3 weeks (n=7).

The four (n=3) and eight month old (n=9) control rats received no drug treatment. The 12-month old rats were assigned to one of five groups on the basis of their swim times over acquisition, such that the groups were approximately equivalent in their mean performance prior to receiving any drug.

Retention (Reference Memory) Phase

The ability of the rats to remember or to relearn the original platform location was tested four weeks after original training. This means that residual drug would have been washed out for a minimum of 7 days in the case of the 3-week pumps, and 21 days in the case of the 1-week pumps. The retention testing procedure was identical to that of acquisition. Pharmacokinetic studies indicate that the plasma concentration of subcutaneously administered G-2-MePE rose to a peak and then declined with an approximately first order kinetic pattern, with a plasma half-life (t ½) of between about 30 and 60 minutes. Thus, by the time the retention study was performed, at least 7 days after removal of the G-2-MePE containing minipumps, nearly all of the G-2-MePE had been cleared from the animals' circulation.

Data Analysis

The swim latency for each rat was recorded for each trial for each day of the acquisition and retention phases and changes between phases were examined using Analysis of Variance.

The 3-week vehicle and 3-week high dose G-2-MePE were compared in acquisition and retention. The high dose of G-2-MePE, given over 3 weeks improved the retention of the original water maze task after a 4-week delay.

Results

FIG. 17 shows the comparison between high-dose (4.8 mg/day) G-2-MePE-treated and low-dose-treated (0.96 mg/day) aged rats and saline treated aged rats, with the young controls (4 months) used as controls. Prior to treatment with G-2-MePE, there were no differences between the aged (12 month old) groups. In contrast, the 4 month old animals required less time to reach the platform than older animals. After a 3-week period of no testing, during which time either saline or G-2-MePE were administered, animals that received saline only did not show improved ability to reach the platform, as indicated by the similar times required at test day 4 of the

acquisition phase and test day 1 of the retention phase. In contrast, animals that received treatment with G-2-MePE at either the high or low doses, had improved memory as reflected in a decrease in the time needed to reach the platform compared to saline-treated controls. Further, the G-2-MePE-treated animals had similar performance to the 4 month old young animals (**FIG. 17**) and 8 month old animals (data not shown). Thus, we conclude that G-2-MePE can improve memory in middle-aged rats animals that had previously shown memory deficits in relation to young rats. Further, because by the time of retesting, the G-2-MePE had washed out from the circulation, we conclude that the memory-enhancing effects of G-2-MePE were likely due to the improvement in function of cholinergic neurons.

Experiment 2: 8-Arm Radial Maze Test

Five months after the original experiment the now 17 month old rats were retested for spatial working memory in a radial arm maze.

Methods

Apparatus

The apparatus consists of a central platform communicating with 8 identical arms, each with a food cup at the end of the arm

Testing Procedure

Rats were partially food-deprived for at least 10 days prior to, and throughout the radial maze procedure.

The maze was assembled and positioned so that the experimenter could clearly observe the rats' behavior from a predetermined location. The experimenter numbered the arms of the maze according to their orientation from one to eight in a clock-wise direction.

Pre-Training (Pre-Drug)

On day one the doors were inserted into the arms and each rat was confined in the central platform with 20 food pellets for 5 minutes. This continued once a day for four days, and all of the rats were observed to consume some of the pellets. The following day the rats were allowed five minutes to explore the whole maze. All arms were baited with two food pellets in the food cup located at the end of each arm, and one pellet at both the entrance and middle of each arm. This was repeated for at least five, but up to eight days for rats that explored fewer than eight arms in two consecutive sessions. All rats had a final session on the ninth day of pre-training. At this point it was decided that one of the old rats that had made only one arm entry on eight of the nine days should be excluded from future testing in this procedure. Otherwise all rats were

included regardless of the amount of exploring they performed in pre-training. There was no statistically significant difference between the old groups in the number of arms entered on the final pre-training session (Drug: $F(2,31)=0.44$, $p=0.65$).

Drug Treatment

30 days before the test (five days after pre-training) the 17 Male Wistar month old rats were implanted (under halothane anesthesia) with sub-cutaneous mini-osmotic pumps (Alzet) to dispense drug continuously for 3 weeks. At the completion of the infusion the pumps were removed and the wounds re-sutured (9-day washout allowed).

The treatment groups were:

1. young controls (4 months old), n =6;
2. saline n=10;
3. G-2-MePE low dose (2.4mg/kg/day) n=13
4. G-2-MePE high dose (12.4mg/kg/day) n=5

Saline and the low dose groups are comprised of all the rats that received those treatments in phase 1 of this experiment (when the rats were 12 months old) regardless of whether they had the one or three week treatment. One rat in each of the saline and high dose groups have been dropped because of skin tumors. One of the low dose rats did not participate in this experiment due to the fact that it could not be pre-trained (see below).

Testing (Post-Drug)

Working memory testing commenced on the ninth day of washout. Rats received 10 daily training sessions over 12 days. The procedure was the same as for pre-training but only the food cups were baited. Rats had 6 minutes to make up to 16 choices by visiting any of the eight arms. A choice was defined as occurring when all four paws were inside an arm. The experimenter recorded the sequence of arm entries with pen and paper. Sessions were terminated after all eight arms had been entered, 16 choices made, or 6 minutess had elapsed. The time taken to enter all eight arms, when this occurred, was recorded.

Data Analysis

An arm choice was considered correct when the rat entered an arm not previously visited. Performance was classified daily according to the following parameters:

1) Correct Choice (CC) 8-12 is the number of correct choices made divided by the total number of choices made. For animals that failed to visit all 8 arms in a test, the denominator of this ratio is considered to be 12.

2) Working Correct Choice (WCC) 8-12 is the measure from which the working memory data are derived. Data were collected as described for CC 8-12 above, but for this parameter, only the rats that entered all 8 arms in a session were included.

Rats that made fewer than 8 arm entries were not used to ascertain working memory because they couldn't remember which arms they had previously visited and therefore had memory so impaired that they could not complete the test, as opposed to the animals that, for whatever reason, did not explore the maze.

Results

CC8-12: There was a general improvement by all of the groups across the 10 days ($F(9,324)=4.01$, $p<0.0001$), but no significant group effect ($F(3,36)=1.19$, ns) or Group X Days interaction ($F(27,324)=1.05$, ns) (data not shown)

WCC8-12: **FIG. 18A** shows the acquisition profile according to WCC8-12 score across the 10 days of testing. There was a significant effect of Group ($F(3,12)=4.27$, $p=0.029$) and Days ($F(9,108)=2.09$, $p=0.036$) but the interaction between these factors was not significant ($F(27,108)=1.06$, ns). The high dose G-2Me-PE group showed the greatest improvement across days, followed by the young controls. There was very little difference between the low dose G-2Me-PE and saline.

FIG. 18B shows results indicating that rats exposed to the higher dose of G-2-MePE (n=5) had made more correct entries for getting food pellets compared to the vehicle treated rats (*$p<0.05$, n=10). We conclude from this study that G-2-MePE improves spatial memory in aged rats.

Example 6: G-2-MePE Increases Neuroblast Proliferation and Decreases Astrocytosis in Brains of Aged Rats

Because neuronal degeneration can result in decreased numbers of neurons, one desirable therapeutic aim is increasing the numbers of neurons in the brain. Neurons are derived from neuroblasts, a less differentiated cell than a neuron, but within the neural lineage. Typically, a neuroblast is exposed to conditions that cause it to mature into a mature phenotype, having a defined soma, neural processes (axons and dendrites) and ultimately, making connections with other neurons (e.g., synapses). Thus, measuring neuroblast proliferation has become a well-known early marker for nerve cell proliferation. Thus, detecting an increase in neuroblast proliferation induced by a pharmaceutical agent is an accepted method for predicting growth of neural cells in animals. Because rats and humans share similar mechanisms in neural cell proliferation, detection of changes in neuroblast proliferation in rats *in vivo* is predictive of similar effects in human beings.

It is also known that one histological correlate of impaired cognitive function is an increase in the numbers of astrocytic cells in the brain of affected animals. Thus, to determine whether G-2-MePE might be useful in stimulating neuroblast proliferation and in treating astrocytosis, we carried out a series of studies in aging rats.

Methods and Materials

Immunohistochemistry

To carry out these studies, tissues were fixed and embedded in paraffin and sections obtained using standard methods. Coronal sections (6 μm) containing the level of the hippocampus were cut and mounted on chrome-alum-coated slides for staining. The sections were deparaffinized in xylene, dehydrated in a series of ethanol and incubated in 0.1 M phosphate buffered saline (PBS).

Primary antibodies against glial fibrillary acidic protein (GFAP) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) were used to mark reactive glial cells and cells undergoing apoptosis and proliferation, respectively. For antigen unmasking (caspase-3 and PCNA staining), sections were heated in 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0) for 1 min at high power. All sections were pretreated with 1% H_2O_2 in 50% methanol for 30 min to quench the endogenous peroxidase activity. Then either 1.5% normal horse serum or 2.5% normal sheep serum in PBS was applied for 1 h at room temperature to block nonspecific background staining. The sections were then incubated with following primary antibodies: monoclonal mouse anti-GFAP antibody (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A. diluted 1:500); mouse anti-PCNA antibody (DAKA, A/S, Denmark, diluted 1: 100). After incubation with primary antibodies at 4°C for 2 d (except for PCNA staining which was incubated overnight) the sections were incubated with biotinylated horse anti-mouse or goat anti-rabbit secondary antibody (1:200, Sigma) at 4°C overnight. The ExtrAvidin™ (Sigma, 1:200), which had been prepared 1 h before use, was applied for 3 h at room temperature, and then reacted in 0.05% 3,3-diaminobenzidine (DAB) and PBS to produce a brown reaction product. Sections were dehydrated in a series of alcohols to xylene and coverslipped with mounting medium.

Immunohistochemical staining was performed on brain samples taken from both control and G-2-MePE treated groups of young (4 months old), middle-aged (9 months old) and aged rats (18 months old).

Control sections were processed in the same way except the primary antibody was omitted from the incubation solution. The number of PCNA positive cells was counted in the subventricular zone and the GFAP positive cells was scored in the cerebral cortex.

Experiment 1: G-2-MePE Stimulates Neuroblast Proliferation in Brains of Aged Rats

The subventricular zone (SVZ) and the dentate gyrus (DG) are two brain regions hosting adult neurogenesis. The reduction of neurogenesis in both SVZ and the DG has been well reported to be co-related to the memory decline with aging and effects of Nerve Growth Factor and Epidermal Growth Factor on memory improvement are reported to be due to increase in progenitors proliferation of the SVZ. Using PCNA as a marker of cell proliferation, cellular proliferation in the SVZ was examined by counting the numbers of cells that are positive for PCNA. In selected animals, at least some of the proliferating cells were identified as neuroblasts, as stained with the neural-cell specific agent, doublecortin.

Eighteen month old male rats were treated intraperitoneally with single does of G2-MePE (doses of either 0, 0.012, 0.12. 1.2, 12mg/kg). Brains were collected 3 days after the treatments and the immunohistochemical staining of PCNA and GFAP were performed. The number of PCNA positive cells was counted in the SVZ and the number of cells was then averaged as cells/mm depending on the length of ventricle wall used for counting (**FIG. 19A**). The group treated with the highest dose (12 mg/kg, n=5) showed a significant increase in the number of PCNA positive cells compared to the group treated with vehicle (*$p<0.05$, n=7). The data indicated a dose-dependent effect of G-2PE on improving neurogenesis.

Fluorescence double labelling indicated co-localisation of PCNA with doublecortin, a marker for neuroblasts. **FIG. 19B** is a photograph of a portion of a rat's brain showing an increase in both PCNA (green, x20) and doublecortin (red, x20) in the rat treated with the highest dose of G-2-MePE (right panel) compared to the vehicle treated rat (left panel). The two markers clearly co-localised (Figure 19B, photo, x100). We conclude that G-2-MePE can stimulate proliferation of brain cells, including neuroblasts. Because neuroblasts are precursor cells for neurons, we further conclude that G-2-MePE can increase the population of neurons in the brains of animals treated with the compound of this invention.

Experiment 2: G-2-MePE Stimulates Neuroblast Proliferation in the SVZ of Brains of Middle-Aged Rats

Effects of G-2-MePE (1.2mg/kg) were studied in a group of middle-aged, 9 month old rats. G-2-MePE (1.2 mg/kg) or vehicle was administered intraperitoneally (i.p.). The proliferation of cells in the SVZ was examined 3 days after the treatment using PCNA immunohistochemical staining. **FIG. 19C** shows a significant increase in number of PCNA positive cells after the treatment of G-2-MePE (**$p<0.005$, n=4). Because some of the proliferating cells stained with PCNA were identified as neuroblasts (see Experiment 1 above), we conclude that G-2-MePE can stimulate neuroblast proliferation in middle-aged rat brains.

Experiment 3: Astrocytosis in Aging Brains

Growing evidence suggests that dysfunction of astrocytes in advanced age can trigger inflammation, leading to further neuronal degeneration. Up-regulation of activated astrocytes has been well reported and is closely associated with memory decline with aging, perhaps through depressed endogenous neurogenesis.

Using GFAP as a marker for reactive astrocytes, the number of GFAP-positive cells was counted in the CA4 sub-region of the hippocampus of aged rats treated with G-2MeP or vehicle. We found a significant increase in reactive astrocytes in the hippocampus of aged animals (Figure 20A), and in the cerebral cortex. Some of the astrocytes were associated with capillaries (Figure 20B photo, arrows) in aged rats compared to both young (*$p<0.01$) and middle aged rats (*#$p<0.01$).

As part of the vascular component, GFAP positive astrocytes also play a role in angiogenesis (**FIG. 20B**, arrows), which also contribute to inflammatory response in brains. Therefore the elevated GFAP astrocytes seen in aged brains may indicate a chronic stage of brain degeneration.

Experiment 4: G-2-MePE Reduces Astrocytosis in Aged Brains

We also evaluated effects of G-2-MePE on astrocytosis in the CA4 sub-region of the hippocampus in aged rats. 18-month old male Wistar rats were assigned to 5 treatment groups as follows: vehicle, 0.12 mg/kg/day, 0.12, 1.2 and 12 mg/kg/day (each n=6).

GFAP-positive cells were counted using a computerised program (Discovery 1). Results are shown in **FIGs 20C** and **20D**. G-2-MePE was administered intra-peritoneally and the numbers of GFAP-positive cells were assessed 3d after the injection. Using a visual scoring system (0 = no astrocytes, 1 = few astrocytes, 2 <50%, 3>50%) we estimated the number of astrocytes in 5 different cortical regions.

Treatment with G-2-MePE reduced number of reactive astrocytes in the CA4 region of the hippocampus compared to the vehicle treated group (**FIG. 20C**; *$p<0.05$), particularly the groups treated with doses of 0.12 and 12 mg/kg. A similar effect was observed for G-2-MePE in the cerebral cortex (**FIG. 20D**).

Normally there are few GFAP-positive astrocytes located in the deep layer of cortex of rat brains and those that are present are usually in close association with white matter tracks. However, we have found there were GFAP-positive cells in the middle layer of the cortex, closely associated with blood vessels.

Results of the studies presented herein indicate that aging is associated with several changes in the brain. First, there is an age-dependent loss of memory and cognitive function. Second, there is an age-depended increase in astrocytes. All of these findings in the rat are

consistent with each other and the known roles of cholinergic nerves in maintaining cognitive function and memory in experimental animals and in humans.

We unexpectedly found that a GPE analog, G-2-MePE, delivered to aged animals at least partially reverses all of the above age-associated changes. First, G-2-MePE increases the amount of ChAT present in the brain cells of animals exposed to the neurotoxins okadaic acid or 3-NP. This effect of G-2-MePE mimicked that of a well-known neuroprotective agent, GPE. These effects were seen in cortical cells, cerebellar cells and in striatal cells, indicating that the effects were widespread in different portions of the brain. Second, G-2-MePE increased ChAT in the striatum, indicating that cholinergic neurons are sensitive to G-2-MePE. These observed chemical and histological changes were paralleled by behavioral changes. Aged animals treated with G-2-MePE exhibited improved memory in two well-known test systems compared to vehicle-treated controls. Next, G-2-MePE induced neuroblast proliferation in aging brains. Finally, treatment with G-2-MePE reversed the increase in astrocytosis observed in the hippocampus and cortex of aging brains. The effects of G-2-MePE were not due to acute effects of the agent; because in many of the studies cited herein, sufficient time had elapsed from cessation of drug delivery to the test, that there was likely little or no drug present.

Example 7: Comparison of the Pharmacokinetics of GPE and G-2-MePE

The purpose of these studies was to compare pharmacokinetic profiles of GPE and G-2-MePE in animals *in vivo* using standard pharmacokinetic methods.

Methods

Adult male Wistar rats weighing between 180 and 240g were used to determine the pharmacokinetics of GPE and G2MePE. To facilitate intravenous bolus injections and blood sampling, all rats were surgically implanted with an indwelling jugular venous cannula under halothane anesthesia three days before the experiment. Groups of six rats were given a single intravenous bolus injection of either 30 mg/kg GPE or 10 mg/kg G2MePE dissolved in 0.1M succinate buffer (pH 6.5). Blood samples (about 220 µl each) were collected into heparinized tubes containing Sigma protease inhibitor cocktail for mammalian tissues at 10 and 0 min before injection of either GPE or G2MePE, and 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 and 128 min after injection of either GPE or G2MePE. The samples were centrifuged at 3000g for 15 min at 4°C and the plasma removed and stored at -80°C until extraction and assay by either radioimmunoassay ("RIA") or reverse phase HPLC. The RIA and HPLC methods used were conventional.

Drug elimination after a single intravenous bolus injection was found to be a first-order process following the equation $C = C_0 e^{-kt}$, where C represents drug concentration in any time point, C_0 is the concentration when time (t) equals zero and k is the first-order rate constant

expressed in units of concentration per hour. The k and half-life ($t_{1/2}$) were calculated from the slope of the linear regression line in the elimination phase of the semi-logarithmic plot of plasma concentration versus time as: Log C = -kt/2.3 + log C_0. Results were expressed as mean ± standard error.

Results

FIG. 21 shows a graph of plasma concentrations *in vivo* of GPE and G-2-MePE after intravenous (i.v.) injection. Filled squares represent concentrations of GPE at each time point, and filled triangles represent concentrations of G-2-MePE at each time point.

Plasma concentrations of GPE and G-2-MePE were markedly increased within 1 min after injection. After injection of 30 mg/kg GPE, a peak concentration of 40.0 ± 10.8 mg/ml was observed. Plasma concentrations of GPE then rapidly declined according to a first-order kinetic process. The first order rate constant for GPE was found to be 0.15 ± 0.014 ng/ml/min, the $t_{1/2}$ was found to be 4.95 ± 0.43 min and the estimated clearance of GPE from plasma was found to be 137.5 ± 12.3 ml/hr.

After injection of 10 mg/kg G-2-MePE, the peak concentration was found to be 191 ± 16.1 mg/ml. Plasma concentrations of G-2-MePE then declined according to a first-order kinetic process. The first order rate constant for G-2-MePE was found to be 0.033 ± 0.001 ng/ml/min, the $t_{1/2}$ was found to be 20.7 ± 0.35 min and the estimated clearance was found to be 30.1 ± 0.5 ml/hr.

After injection, the maximal plasma concentration of G-2-MePE was about 4.8 times greater than the maximal plasma concentration of GPE, in spite of the larger dose of GPE delivered (30 mg/kg) compared to the dose of G-2-MePE delivered (10 mg/kg).

The finding of greater plasma concentrations of G-2-MePE than for GPE at all time points less than 125 minutes, in spite of a lower delivered dose of G-2-MePE, was totally unexpected based on known plasma concentrations of GPE. The $t_{1/2}$ for G-2-MePE was over 4 times longer than the $t_{1/2}$ for GPE.

The finding of increased half-life of G-2-MePE compared to that of GPE was completely unexpected based on the $t_{1/2}$ of GPE. The increased $t_{1/2}$ of G-2-MePE means that G-2-MePE is cleared more slowly from the circulation. This finding is totally unexpected based on the clearance rate of GPE.

We conclude from these studies that G-2-MePE is a potent agent capable of reversing many of the adverse effects of aging in the brains of animals, including humans. GPE analogs, including G-2-MePE therefore, can produce desirable therapeutic effects, including neuroprotection, improved memory, increased neuroblast proliferation and reduction in astrocytosis, and can be valuable in reversing or mitigating adverse effects of aging in humans.

While this invention has been described in terms of certain preferred embodiments, it will be apparent to a person of ordinary skill in the art having regard to that knowledge and this disclosure that equivalents of the compound of this invention may be prepared and administered for the conditions described in this application, and all such equivalents are intended to be included within the claims of this application.

Example 8: Treatment of Rett Syndrome I
Effects of G-2-MePE on Lifespan and Long-Term Potentiation in Rett Syndrome (RTT) Model

To determine whether G-2-MePE treatment can impact the development and progression of Rett Syndrome in a murine model of the disorder, we used hemizygous MeCP2(1lox) male mice. The MeCP2 knock-out (MeCP2-KO) mouse system is widely accepted in the art as closely mimicking the range and the severity of physiological and neurological abnormalities characteristic of the human disorder, Rett Syndrome.

All experiments were performed at the University of Texas Southwestern Medical Center and approved by the University of Texas Southwestern Medical Center Animal Care and Use Committee. G-2-MePE was synthesised Albany Molecular Research Inc. (Albany, NY) and supplied by Neuren Pharmaceuticals Limited.

Methods

Treatment

We treated hemizygous MeCP2(1lox) male mice with 20 mg/kg/day of G-2-MePE or saline, (0.01%BSA, n=15 per group in survival experiment and n=20 in the LTP experiment). The treatments were administered intraperitoneally from 4 weeks after birth. For the survival experiments the treatment was maintained through the course of the experiment. For the LTP experiment the mice were treated until week 9 when they were used for slice preparation.

Survival

MeCP2 deficient mutant mice develop RTT symptoms at about 4-6 weeks of age and die between 10-12 weeks (Chen et al., 2001. Nat Genet 27: 327-331). We compared the survival of the wild type controls and the MeCP2 deficient animals in vehicle- and G-2-MePE-treated groups. Survival was measured weekly from start of treatment (4 weeks) and used to produce Kaplan-Meier survival curves to show the proportion of mice that survived (y axis) at each weekly interval (x axis) (see **FIG. 22**).

Long-Term Potentiation (Electrophysiology)

MeCP2 deficient mice have been previously reported to suffer from functional and ultrastructural synaptic dysfunction, significant impairment of hippocampus-dependent memory and hippocampal long-term potentiation (LTP) (Moretti et al. The Journal of Neuroscience. 2006. 26(1):319-327). To test the effects of the G-2-MePE treatment on synaptic function in the RTT model we compared hippocampal LTP in both vehicle and G-2-MePE treated animals at 9 weeks of age. To do so, we measured the slope of the fEPSP as a % of baseline potential in neurons in slices of hippocampus from MeCP2 deficient mice treated with either saline or G-2-MePE (**FIG. 23**).

Results

FIG. 22 shows that G-2-MePE treatment increased survival of MeCP2 deficient mice. Wild-type mice (top line) are control animals, and therefore their survival was 100% at each time point. MeCP2 deficient mice treated with saline only died much more rapidly (dotted line) than wild-type mice, such that by about 11 weeks, only 50% of the MeCP deficient mice survived. In striking contrast, however, we unexpectedly found that MeCP2 deficient mice treated with G-2-MePE survived substantially longer than saline-treated mice. At about 15 weeks, 50% of the animals survived. Data initially presented showed that MeCP2 mice were impacted in terms of survival such that 50 percent of animals had died by 11weeks in the untreated case. G-2-MePE treated animals showed improved survival, with 50 percent having died at 16 weeks. In this study, the longevity data were compromised by inconsistent veterinary procedures, such that mice did not have their teeth clipped consistently – a requirement in *mecp2* mice unrecognized at the start of the experiment. A consequence was the observation of early animal deaths unrelated to Rett Syndrome (particularly in the control group). Re-examination of the data showed that the effect of G-2-MePE persisted when the control group was re-run, albeit the difference in groups being smaller (time to 50 percent death 13.5 weeks in controls, 16 weeks in G-2-MePE treated animals). No safety concerns were raised by G-2-MePE treatment of *mecp2* mice.

These results demonstrated that G-2-MePE can substantially increase survival of MeCP2 deficient mice. Because MeCP2 deficient mice are predictive of the pathology and therapeutic efficacy in human beings with Rett Syndrome, we conclude that G-2-MePE can increase life span of human beings with Rett Syndrome.

FIG. 23 shows results of our studies to determine if G-2-MePE treatment increased hippocampal long-term potentiation (LTP) as measured by the fEPSP slope in MeCP2 deficient animals compared to saline-treated mutant mice. As shown in **FIG. 23**, we unexpectedly found that G-2-MePE increased the slope of fESPS in MeCP2 deficient mice compared to animals treated with saline only.

These results demonstrated that G-2-MePE can be effective in treating MeCP2 deficient mice *in vivo*. Because MeCP2 deficient mice are predictive of the pathology and therapeutic efficacy in human beings with Rett Syndrome, we conclude that G-2-MePE can be an effective therapy for people with Rett Syndrome.

Example 9: G-2-MePE Improves Dendritic Arborization and Increases Dendritic Spine Length

We assess the effects of G-2-MePE treatment on dendrites. Transgenic *mecp2* knockout mice (n = 15 to 20) were administered G-2-MePE intraperitoneally at a dose of 20 mg/kg once daily. Following sacrifice dendritic spine density, spine length and aborization were examined after Golgi staining after nine weeks, as per the Table 1 below:

Table 1: Sample size for all neuron morphologic and spine analysis

		MALE			
Analysis	AGE (Weeks)	Sample size (no. of mice)		Sample size (average number of neurons or dendrites per animal)	
		KO-vehicle	KO-NNZ-G-2MePE	KO-vehicle	KO-NNZ-G-2MePE
Neuron morphology	9	3	3	4	4
Spine Analysis	9	3	3	10	10

Dendritic length was assessed by distance from the soma of representative hippocampal CA1 neurons from 9 week old male *mecp2* null mutant mice treated with either saline (3 neurons analysed from 3 separate mice, n=9) or G-2-MePE (20 mg/kg i.p. 1/day, from week 4; 3 neurons analysed from 3 separate mice, n=9).

We observed that G-2-MePE improved dendritic arborization and increased dendritic spine length. **FIG. 24** depicts results of this study. Dendritic length in μm (vertical axis) is plotted against the distance (in μm; horizontal axis) from the soma of the cells. For cells with dendrites close to the somas, the dendrites were short. However, as the distance from the somas increased saline-treatment (open squares) produced dendritic lengths that increased to a maximum at a distance of 70 μm from the soma and declined at distances further away from the somas. In contrast, treatment with G-2MePE (filled squares) produced longer dendrites over much of the range of distances from the somas.

Example 10: Treatment of Rett Syndrome in Mice II

Mice Mating and Genotyping

The MeCP2 germline null allele mice are used (Chen et al., 2001). Genotyping is performed as in Chen et al. (Chen et al., 2001).

G-2-MePE Treatment

For the survival measurements, the nocturnal activity analysis and the immunoblot analysis, G-2-MePE (synthesised Albany Molecular Research Inc. (Albany, NY) and supplied by Neuren Pharmaceuticals Limited) is administered daily via intra-peritoneal injections (20 mg/kg, vehicle=saline, 0.01% BSA). The treatment starts at P15 and is maintained throughout the course of the experiments. For intracellular physiology experiments, the mice are injected daily with G-2-MePE (20 mg/kg body weight, vehicle=saline, 0.01% BSA) for 2 weeks, from P15 to P28-P32 when they are used for acute slice preparation. For optical imaging experiments, mice are injected with G-2-MePE (20 mg/kg body weight, vehicle=saline, 0.01% BSA) daily from the day of the lid suture to the day of imaging.

Slice Physiology Preparation

Coronal sections (300 μm thick) at or near sensorimotor cortex are cut in <4°C ACSF using a Vibratome. Slices are incubated at 37°C for 20 minutes after slicing, and at room temperature for the remainder of the experiment. Slices are transferred to a Warner chamber and recordings are taken from visually identified pyramidal neurons located in layer 5. Artificial cerebral spinal fluid (ACSF) containing 126 mM NaCl, 25 mM $NaHCO_3$, 1 mM $NaHPO_4$, 3 mM KCl, 2 mM $MgSO_4$, 2 mM $CaCl_2$, and 14 mM dextrose, is adjusted to 315-320 mOsm and 7.4 pH, and bubbled with 95% O_2/5% CO_2. The intracellular pipette solution contained 100 mM potassium gluconate, 20 mM KCl, 10 mM HEPES, 4 mM MgATP, 0.3 mM NaGTP, and 10 mM Na-phosphocreatine.

Intracellular Whole-Cell Recordings

Borosilicate pipettes (3-5 MΩ, WPI) are pulled using a Sutter P-80 puller (Sutter Instruments). Cells are visualized with an Achroplan 40x water-immersion lens with infrared-DIC optics (Zeiss) and detected with an infrared camera (Hamamatsu) projecting to a video monitor. Experiments are driven by custom acquisition and real-time analysis software written in Matlab (Mathworks, Natick, Mass.) using a Multiclamp 700B amplifier (Axon Instruments) connected to a BNC-2110 connector block and M-Series dual-channel acquisition card (National Instruments). Gigaseal and rupture is achieved and whole-cell recordings are continuously verified for low levels of leak and series resistance. For each recording, a 5 mV test pulse is applied in voltage

clamp ~10 times to measure input and series resistance. Then in current clamp ~10 pulses (500 ms, 40-140 pA at 10 pA increments), are applied to quantify evoked firing rates and cellular excitability. Access resistance, leak, and cellular intrinsic excitability are verified to be consistent across groups. Finally, spontaneous EPSCs under voltage clamp at -60 mV are sampled at 10 kHz and low-pass filtered at 1 kHz. Analysis is performed using a custom software package written in Matlab, with all events detected according to automated thresholds and blindly verified for each event individually by the experimenter.

Golgi Staining

Samples (<1 cm) from P28 mice are fixed in 10% formalin and 3% potassium bichromate for 24 hours. Tissue is then transferred into 2% silver nitrate for 2 days in the dark at room temperature. Sections from these samples are then cut at 50 μm thickness into distilled water. Sections corresponding to motor cortex are mounted onto slides, air dried for 10 minutes, and then dehydrated through sequential rinses of 95% alcohol, 100% alcohol, and xylene, and then sealed with a coverslip. Images re acquired at 10x (whole cell) and 100x (spine imaging) using a Zeiss Pascal 5 Exciter confocal microscope.

Optical Imaging of Intrinsic Signals

Adult (>P60) wild type (SVEV or BL6) and MeCP2 (+/-) mutant females (BL6) are used for this experiment. The wild type control group is composed of both wild type littermates of MeCP2+/- females or wild type age matched SVEV females. For monocular deprivation, animals are anesthetized with Avertin (0.016 ml/g) and the eyelids of one eye is sutured for 4 days. Prior to imaging, the suture is removed and the deprived eye re-opened. Only animals in which the deprivation sutures are intact and the condition of the deprived eye appears healthy are used for the imaging session. For G-2-MePE signaling activation, a solution containing G-2-MePE is injected intra-peritoneally (IP) daily for the entire period of deprivation. For the imaging sessions mice are anesthetized with urethane (1.5 g/kg; 20% of the full dosage is administered IP each 20-30 minutes up to the final dosage, 0.02 ml of cloroprothixene 1% is also injected together with the first administration). The skull is exposed and a custom-made plate is glued on the head to minimize movement. The skull is thinned over V1 with a dremel drill and covered with an agarose solution in saline (1.5%) and a glass coverslip. During the imaging session, the animal is constantly oxygenated, its temperature maintained with a heating blanket and the eyes periodically treated with silicone oil; physiological conditions are constantly monitored. The anesthetized mouse is placed in front of a monitor displaying a periodic stimulus presented to either eye, monocularly; the stimulus consisted of a drifting vertical or horizontal white bar of dimensions 9°x72°, drifting at 9 sec/cycle, over a uniformly gray background. The skull surface is

illuminated with a red light (630 nm) and the change of luminance is captured by a CCD camera (Cascade 512B, Roper Scientific) at the rate of 15 frames/sec during each stimulus session of 25 minutes. A temporal high pass filter (135 frames) is employed to remove the slow signal noise, after which the signal is computer processed in order to extract, at each pixel, the temporal Fast Fourier Transform (FFT) component corresponding to the stimulus frequency. The FFT amplitude is used to measure the strength of the visual evoked response to each eye. The ocular dominance index is derived from each eye's response (R) at each pixel as ODI=(Rcontra-Ripsi)/(Rcontra+Ripsi). The binocular zone is defined as the region activated by the stimulation of the eye ipsilateral to the imaged hemisphere.

Heart Rate Measurements

Real time cardiac pulse rate is measured using a tail clip sensor (Mouse OX Oximeter--Oakmont, PA). Mice are not anesthetized but physically restrained in a fitted open plastic tube. Prior to the recording session the tube is placed overnight in the cages housing the experimental animals to allow habituation. Body temperature is maintained at ~82-84°F throughout the recording time. We record 3 trials of 15 minutes for each mouse, mice are 8 weeks old and treated with vehicle or G-2-MePE from P15.

Nocturnal Activity Measurements

Spontaneous motor activity is measured by using an infrared beam-activated movement-monitoring chamber (Opto-Varimax-MiniA; Columbus Instruments, Columbus, Ohio). For each experiment, a mouse is placed in the chamber at least 3 h before recordings started. Movement is monitored during the normal 12-h dark cycle (7 p.m. to 7 a.m.). One dark cycle per animal per time point is collected.

Results

To test whether G-2-MePE treatment will impact the development of cardinal features of the RTT disease, 2 week old mutant animals are given daily intra-peritoneal injections for the course of their lifespan. Measurements of synaptic physiology, synaptic molecular composition, and cortical plasticity are then acquired as detailed below, along with health-related measurements such as heart rate, locomotor activity levels, and lifespan.

Effects of G-2-MePE on the Synaptic Physiology of MeCP2 Mutant Mice

Recent studies have reported that neurons across multiple brain regions of MeCP2-/y mice display a profound reduction in spontaneous activity (Chang et al., 2006; Chao et al., 2007; Dani et al., 2005; Nelson et al., 2006) a phenotype that is rescued by over-expression of BDNF

(Chang et al., 2006). Similarly, acute application of an IGF1 derivative has been shown to elevate evoked excitatory postsynaptic current (EPSC) amplitudes by 40% in rat hippocampal cultures (Ramsey et al., 2005; Xing et al., 2007). To test the efficacy of G-2-MePE in rescuing the MeCP2-/y physiological phenotype, we acquire intracellular whole cell recordings in acute brain slices, measuring excitatory synaptic drive (spontaneous EPSC amplitude and frequency) in layer 5 cortical neurons. Here, EPSCs recorded from -/y animals are significantly reduced in amplitude compared to EPSCs measured in wild-type animals. The trend is partially reversed in EPSCs recorded from MeCP2-/y animals treated with G-2-MePE, which are significantly larger in amplitude than EPSCs from MeCP2-/y mice treated with vehicle. These differences are also seen when averaging across cells. Throughout these measurements, access resistance, leak, and cellular intrinsic excitability are also verified to be consistent across groups. Quantifying EPSC intervals also shows a slight increase in the interval between EPSC events (reduced EPSC frequency) between wild-type and MeCP2-/y animals (P=0.04, Kolmogorov-Smirnov test). Our findings thus indicate that the reduction of excitatory synaptic drive in cortical cells of MeCP2-/y mice, and its partial rescue following G-2-MePE treatment, are due in part to a change in EPSC amplitude as a consequence of a change in the strength of the synapses mediating excitatory transmission in this region.

G-2-MePE Treatment Stimulates Cortical Spine Maturation

We use Golgi staining to label neurons sparsely and distinctly, and applied high-resolution confocal imaging to measure dendritic spine density and morphology in the labelled cells, restricting analysis to layer 5 pyramidal neurons in sections of motor cortex from critical period mice (P28).

While low-magnification imaging clearly delineates the extent of the dendrites of the pyramidal cells we use higher magnifications to count synaptic contacts and determine the morphological class of each spine. We classify spines as either large and bulbous ("mushroom", M), short and stubby ("stubby", S), short and thin ("thin", T) or filopodia (F). Comparing the density of spines per unit branch exhibits a trend of decreased spine density in knockout neurons that is largely ameliorated in the knockout with treatment.

Together these results indicate the potential for deficits in the number and maturational status of dendritic contacts in the knockout to underpin functional defects in excitatory transmission, in a manner that can be treated following administration of G-2-MePE.

Ocular Dominance (OD) Plasticity in Adult MeCP2+/- Mice Is Reduced By G-2-MePE

Developmental changes in OD plasticity are controlled in part by the activation of the IGF-1 pathway, and administration of (1-3)IGF-1 can reduce OD plasticity in wild type young mice (Tropea et al., 2006). We therefore test if G-2-MePE treatment could stabilize the prolonged OD plasticity observed in adult MeCP2 mutants. Female MeCP2+/- mice, aged P60 or more, are monocularly deprived for 4 days and treated concurrently with G-2-MePE. G-2-MePE treatment reduces the OD plasticity in the adult Mecp2+/- mice, indicating that indeed G-2-MePE can rapidly induce synapse stabilization or maturation.

Bradycardia in MeCP2-/y Mice Is Treated By G-2-MePE

In addition to examining the efficacy of G-2-MePE in ameliorating neurophysiological symptoms, we seek to characterize its effects on the general health of the organism. Clinical and experimental evidence shows autonomic system dysfunctions such as labile breathing rhythms and reduced baseline cardiac vagal tone in Rett Syndrome patients (Julu et al., 2001). A poor control of the feedback mechanisms that regulate blood pressure homeostasis through the sympathetic system, for example hyperventilation-induced decrease in heart rate, is common in Rett Syndrome patients and can cause life threatening cardiac arrhythmias (Acampa and Guideri, 2006; Julu et al., 2001).

The pathogenesis of the cardiac dysautonomia, although not well understood, suggests that immature neuronal connections in the brainstem could be the cause. To examine heart rate abnormalities in MeCP2-/y mice and the effect of G-2-MePE treatment, we monitor real time cardiac pulse rate in non-anesthetized wild type and MeCP2-/y animals treated with vehicle or G-2-MePE. Wild type mice exhibit a regular distribution of heart rate measurements centred near 750 beats per minute. In contrast, MeCP2-/y mice exhibit a more irregular heart rate with a lower average rate, the occurrence of which is significantly reduced following treatment with G-2-MePE.

G-2-MePE Administration Improves Locomotor Activity and Life Span

MeCP2-/y mice develop Rett-like symptoms beginning at 4-6 weeks of age when they progressively become lethargic, develop gait ataxia and die between 10 and 12 weeks of age (Chen et al., 2001). Baseline locomotor activity is also recorded in mice after 6 weeks by counting nocturnal infrared beam crossing events within a caged area. MeCP2 knockout mice (KO) exhibits markedly reduced locomotor activity levels compared to wild-type mice (WT), but treatment with G-2-MePE (KO-T) elevates these levels.

Finally, compared to MeCP2 KO littermates, MeCP2-/y mice treated with G-2-MePE also show a ~50% increase in life expectancy (an increase in the 0.5 probability survival rate).

We also measure the effect of G-2-MePE treatment on neuron soma size in the hippocampus. Mice are treated with G-2-MePE as described above for locomotor activity. Soma size in neurons in the CA3 region of the hippocampus is significantly impaired in MeCP2 KO animals relative to wild-type animals. G-2-MePE treatment increases average soma size in KO animals, but has little or no effect on soma size in wild type animals.

Example 11: Effect of Oral G-2-MePE on Survival in Rett Syndrome in Mice

Because Rett Syndrome is a chronic, debilitating disorder involving loss of motor skills, it is desirable to treat Rett Syndrome using easily administered preparations. To this end, we can take advantage of unexpectedly beneficial therapeutic and pharmacokinetic properties of G-2-MePE and related compounds (U.S. Pat. Nos. 7,041,314, 7,605,177, 7,714, 070, 7,863,309 and U.S. Appl. Nos. 11/315,784 and 12/903,844).

Therefore, we administer G-2-MePE orally to MeCP2 deficient mice as described in US 2009/0074865. Briefly, an aqueous solution, a water-in-oil emulsion (micro-emulsion, coarse emulsion or liquid crystal), or a gel composition containing a pharmaceutically effective amount of G-2-MePE (20 or 80 mg/kg per animal) is administered daily. In control MeCP2 deficient animals, we administer saline only, and wild-type animals are used to obtain baseline data similar to the design of studies described in Example 8 above.

In wild-type animals, survival is defined to be 100% at each time point. In MeCP2 deficient animals, survival is decreased substantially. However, after oral administration of G-2-MePE to MeCP2 deficient mice, survival is increased substantially.

Example 12: Effect of G-2MePE on Seizure Activity in Rett Syndrome in Mice

Because seizures are a prominent, hazardous and a difficult to treat aspect of Rett Syndrome, we determine the effects of G-2MePE on seizure activity in MeCP2 deficient animals. G-2-MePE can be effective in treating seizure activity in animals with neurodegenerative disease (U.S. Pat. No. 7,714,020). Therefore, we carry out experiments to determine whether G-2-MePE can also treat seizure activity in MeCP2 deficient mice.

Electroencephalograpic recordings of wild-type mice and MeCP2 deficient mice treated with either saline or G-2-MePE are obtained using methods described in U.S. Pat. No. 7,714,020.

We find that G-2MePE can be effective in decreasing both motor seizures and non-convulsive seizures.

Conclusions

Based on our *in vivo* and *in vitro* studies in MeCP2 deficient animals, we conclude that G-2-MePE can be an effective therapy for treating human beings with Rett Syndrome. Moreover, because G-2-MePE has unexpectedly longer half life than a naturally occurring compound ((1-3) IGF-1; Glycyl-Prolyl-Glutamate or GPE) (**FIG. 21**), we conclude that use of G-2-MePE has distinct and substantial advantages over other pharmacological agents, including GPE.

For example, G-2-MePE is not degraded by gastrointestinal cells, is taken up by gastrointestinal cells, and is active in the central nervous system after oral administration (Wen et al., U.S. Appl. No. 12/283,684; U.S. 2009/0074865, U.S. Pat. No. 7,887,839, incorporated herein fully by reference), Therefore, G-2MePE need not be delivered intravenously, subcutaneously, intraventricularly, or parenterally. In fact, oral formulations comprising micro-emulsions, coarse emulsions, liquid crystal preparations, nanocapsules and hydrogels can be used in manufacture of orally administered preparations such as tablets, capsules and gels that can improve neurological function and treat neurodegenerative conditions (U.S. Pat. No. 7,887,839). Compounds of this invention can be used in situations in which a patient's motor functioning is below that needed to swallow a table or capsule. There are several types of soluble gels for oral administration of compounds, and these can be used to deliver a compound or composition of this invention to a patient. Because G-2-MePE can be easily administered orally and is orally effective in treating neurodegenerative disorders, including Rett Syndrome, we conclude that G-2-MePE can be convenient and beneficial for long-term therapy of patients with Rett Syndrome.

Further, because Rett Syndrome shares key features with other autism spectrum disorders, compounds of this invention can be useful in providing therapeutic benefit from animals having other ASD, and in humans with autism, Asperger Syndrome, Childhood Disintegrative Disorder, and Pervasive Developmental Disorder - Not Otherwise Specified (PDD-NOS).

Example 13: Treatment of ASD

***Shank3*-Deficient Mouse Model**

Shank3- deficient mice are used in the study as a model of 22q13 deletion syndrome associated with ASD.

22q13 deletion syndrome has been linked with deletions or mutations in *Shank3* gene (Bonaglia et al, 2006). The *Shank3* gene codes for a master scaffolding protein which forms the framework in glutamatergic synapses (Boeckers et al, 2006). *Shank3* is a crucial part of the core of the postsynaptic density (PSD) and recruits many key functional elements to the PSD and to the synapse, including components of the α-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid (AMPA), metabotropic glutamate (mGlu), and *N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA) glutamate receptors, as well as cytoskeletal elements. Recent studies exploring the rate of 22q13 deletions/

Shank3 mutations suggest that haploinsufficiency of *Shank3* can cause a monogenic form of ASD with a frequency of 0.5% to 1% of ASD cases (Durand et al, 2007; Moessner et al, 2007; Gauthier et al, 2008).

The generation of the mouse model with disrupted expression of full-length *Shank3* has been previously described in the art (Bozdagi et al., Molecular Autism 2010, 1:15, p4). Briefly, Bruce4 C57BL/6 embryonic stem cells were used to generate a mouse line that had loxP sites inserted before exon 4 and exon 9. The floxed allele was excised and a line was maintained with a deletion of exons 4 to 9, i.e. a complete deletion of the ankyrin repeat domains of *Shank3*. Wild-type (+/+), heterozygous (+/-) and knockout (-/-) mice were produced, with Mendelian frequencies from heterozygote-heterozygote crosses. A 50% reduction of full length *Shank3* mRNA was confirmed in heterozygotes (qPCR) as well as a reduced expression of *Shank3* protein (by immunoblotting with *Shank3* antibody N69/46).

Heterozygous mice generated by crossing wild-type mice with heterozygotes are used in this example to best model the haploinsufficiency of *Shank3*, responsible for 22q13 deletion syndrome.

Methods

Drug Treatment

1 to 3 month old wild type and heterozygous *Shank3*-deficient mice are divided into 4 treatment groups: placebo treated wild-type, placebo treated *Shank3*-deficient group and two *Shank3*-deficient G-2-MePE treated groups. The animals are given placebo (water) or G-2-MePE formulated in water administered orally, b.i.d for 14 days. G-2-MePE is administered at two doses: 15 or 60 mg/kg.

Methodology

A detailed description of the methodology can be found in Bozdagi et al. (Molecular Autism 2010, 1:15).

Behavioral Analyses

Behavioral assessments are made at several time points, and include analysis of social interactions and ultrasonic social communication, in line with the methodology described by Bozdagi et al. Briefly, male-female social interactions in each treatment group are evaluated. The subject males are group-housed and individually tested in clean cages with clean litter. Each testing session lasts 5 min. Each of the subject mice is paired with a different unfamiliar estrus C57BL/6J female. A digital closed circuit television camera (Panasonic, Secaucus, NJ, USA) is positioned horizontally 30 cm from the cage. An ultrasonic microphone (Avisoft UltraSoundGate

condenser microphone capsule CM15; Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany) is mounted 20 cm above the cage. Sampling frequency for the microphone is 250 kHz, and the resolution is 16 bits. While the equipment used cannot distinguish between calls emitted by the male subject and female partner, the preponderance of calls during male-female interactions in mice is usually emitted by the male. The entire apparatus is contained in a sound-attenuating environmental chamber (ENV-018V; Med Associates, St Albans, VT, USA) illuminated by a single 25-Watt red light. Videos from the male subjects are subsequently scored by an investigator uninformed of the subject's genotype and treatment group on measures of nose-to-nose sniffing, nose-to-anogenital sniffing and sniffing of other body regions, using Noldus Observer software (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA). Ultrasonic vocalizations are identified manually by two highly trained investigators blinded to genotype/treatment group information, and summary statistics are calculated using the Avisoft package. Interrater reliability is 95%. Data are analysed using an unpaired Student's *t*-test.

Olfactory habituation/dishabituation testing is conducted in male and female mice for each group. The methodology is as previously described (Silverman et al 2010, Yang et al 2009 and Silverman et al 2010). Non-social and social odors are presented on a series of cotton swabs inserted into the home cage sequentially, each for 2 min, in the following order: water, water, water (distilled water); almond, almond, almond (1:100 dilution almond extract); banana, banana, banana (1:100 dilution artificial banana flavouring); social 1, social 1, social 1 (swiped from the bottom of a cage housing unfamiliar sex-matched B6 mice); and social 2, social 2, social 2 (swiped from the bottom of a second cage housing a different group of unfamiliar sex-matched 129/SvImJ mice). One-way repeated measures ANOVA is performed within each treatment group for each set of habituation events and each dishabituation event, followed by a Tukey *post hoc* test.

Hippocampal Slice Electrophysiology

Post-mortem, acute hippocampal slices (350 μm) are prepared from mice using a tissue chopper. Slices are maintained and experiments are conducted at 32°C. Slices are perfused with Ringer's solution containing (in mM): NaCl, 125.0; KCl, 2.5; $MgSO_4$, 1.3; NaH_2PO_4, 1.0; $NaHCO_3$, 26.2; $CaCl_2$, 2.5; glucose, 11.0. The Ringer's solution is bubbled with 95% O2/5% CO2, at 32°C, during extracellular recordings (electrode solution: 3 M NaCl). Slices are maintained for 1 hr prior to establishment of a baseline of field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) recorded from stratum radiatum in area CA1, evoked by stimulation of the Schaffer collateral-commissural afferents (100 μs pulses every 30 s) with bipolar tungsten electrodes placed into area CA3. Test stimulus intensity is adjusted to obtain fEPSPs with amplitudes that are one-half of the maximal response. The EPSP initial slope (mV/ms) is determined from the average waveform of

four consecutive responses. Input-output (I/O) curves are generated by plotting the fEPSP slope versus fiber volley amplitude in low-Mg^{2+} (0.1 mM) solution. AMPA receptor-mediated and NMDA receptor-mediated I/O relationships are measured in the presence of ionotropic glutamate receptor antagonists: 2-amino-2-phosphonopentanoic acid APV (50μM) and 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione CNQX (100μM). Paired-pulse responses are measured with interstimulus intervals of 10 to 200 ms, and are expressed as the ratio of the average responses to the second stimulation pulse to the first stimulation pulse.

LTP is induced either by a high-frequency stimulus (four trains of 100 Hz, 1 s stimulation separated by 5 min), or by theta-burst stimulation (TBS) (10 bursts of four pulses at 100 Hz separated by 200 ms), or by a single 100 Hz stimulation, for control and genetically-modified mice. To induce long-term depression (LTD), Schaffer collaterals are stimulated by a low frequency or paired-pulse low frequency stimulus (900 pulses at 1 Hz for 15 min) to induce mGlu receptor-dependent LTD. Data are expressed as means ± SD, and statistical analyses are performed using analysis of variance (ANOVA) or student's t-test, with significance set at an α level of 0.05.

Results

Behavioral

Cumulative duration of total social sniffing by the male test subjects is lower in placebo treated *Shank3*-deficient group than in placebo treated wild-type group. In addition, fewer ultrasonic vocalizations are emitted by the placebo treated *Shank3*-deficient group than by the wild-type controls during the male-female social interactions.

G-2-MePE treatment in the two *Shank3*-deficient groups results in a significant increase in the cumulative duration of total social sniffing in comparison to the placebo treated *Shank3*-deficient group. Moreover, the G-2-MePE treated groups display an increased number of ultrasonic vocalizations than the placebo treated mutant group.

In the olfactory habituation/dishabituation study, intended to confirm that the mice are able to detect social pheromones, all 4 groups display normal levels of habituation (indicated by decreased time spent in sniffing the sequence of three same odors), and the expected dishabituation (indicated by increased spent in sniffing the different odor).

Electrophysiology

Plotting field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) slope versus stimulus intensity demonstrates a reduction in the I/O curves in the placebo treated *Shank3*-deficient group versus the control group. In the heterozygous placebo treated group we also observe a decrease in AMPA receptor-mediated field potentials, reflected in a 50% decrease in the average slope of I/O

function compared to the wild-type control group. In contrast, when the I/O relationship is analysed in the presence of the competitive AMPA/kainate receptor antagonist CNQX to measure synaptic NMDA receptor function, there is no difference between the wild-type and placebo treated heterozygous groups. These results indicate that there is a specific reduction in AMPA receptor-mediated basal transmission in the *Shank3* heterozygous mice.

G-2-MePE treatment in both heterozygous groups normalizes the AMPA receptor-mediated field potentials and causes an increase in the average slope of I/O function compared to the placebo treated *Shank3*-deficient group.

The maintenance of LTP in the placebo treated *Shank3*-deficient group is clearly impaired in comparison to the wild-type control. TBS LTP tests (10 bursts of four pulses at 100 Hz separated by 200 ms) also show a significant decrease in the potentiation at 60 min after TBS in the placebo treated *Shank3*-deficient group. In contrast to the altered synaptic plasticity observed with LTP, long-term depression (LTD) was not significantly changed in the mutant group.
G-2-MePE treatment increased hippocampal long-term potentiation (LTP) and its maintenance in both *Shank3*-deficient group in comparison to the placebo treated *Shank3*-deficient group.

Discussion

Poor social competencies and repetitive behaviors are the common features and key diagnostic measures of all forms of ASD. Delayed intellectual development and underdeveloped language skills are also a common feature present in all ASD, excluding Asperger syndrome.

The animal models described above have been accepted in the art as demonstrating similar symptoms to the clinical human conditions. All mutant models discussed above (NLGN3, NLGN4, CADM1, NRXN1, FMR1, shank3) exhibit impaired social skills or increased social anxiety. Decreased excitatory transmission into the hippocampus has been identified in NRXN1, shank3, MeCP2 and FMR1 mutant animal models. At present no polygenetic or multifactorial models of ASD have been described. The animal models described above, based on genetic defects that are known to produce ASD in human population, provide the best opportunity to test the efficacy of ASD therapies.

Therefore the efficacy of G-2-MePE in animal models of ASD is reasonably predictive of its efficacy in a human subject suffering from ASD.

Example 14: G-2-MePE Treatment Changes the Morphology of Neurons in an *in vitro* Human Model of Rett Syndrome

To test the effects of G-2-MePE on neuronal morphology, we used an *in vitro* model of RTT described in Marchetto et al., *A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells*, Cell 143:527-539 (2010) (including

supplemental information). The model uses induced pluripotent stem cells (iPSCs) generated from fibroblasts of human RTT patients carrying different MeCP2 mutations.

Methods

Cell Culture and Retrovirus Infection

RTT fibroblasts (carrying 4 distinct MeCP2 mutations) and control fibroblasts are generated from explants of dermal biopsies. The shRNA against target MeCP2 gene is cloned into the LentiLox3.7 lentivirus vector (as described in Marchetto et al.). The fibroblasts are infected with retroviral reprogramming vectors (Sox2, Oct4, c-Myc and Klf4). Two days after infection, fibroblasts are plated on mitotically inactivated mouse embryonic fibroblasts with hESC medium. After 2 weeks, iPSC colonies that emerge from the background of fibroblasts are manually picked and transferred to feeder-free conditions on matrigel-coated dishes (BD) using embryonic stem cell culture media mTeSR™ (Stem Cell Technologies) and passaged manually. Gene expression profiles of the generated clones are measured using human genome Affymetrix Gene Chip™ arrays to confirm that reprogramming is successful.

Neural Differentiation: NPCs and Mature Neurons

To obtain neural progenitor cells (NPCs), embryoid bodies (EBs) are formed by mechanical dissociation of cell clusters and plating onto low-adherence dishes in hESC medium without FGF2 for 5-7 days. After that, EBs are plated onto poly-ornithine/laminin-coated dishes in DMEM/F12 plus N2 medium (serum-free supplement for growth and expression of post-mitotic cells). Resulting rosettes are collected after 7 days and dissociated with accutase and plated onto coated dishes with NPC media (DMEM/F12; 0.5X N2; 0.5X B27 and FGF2). Homogeneous populations of NPCs are achieved after 1-2 passages with accutase in the same condition. To obtain mature neurons, floating EBs are treated with 1uM or retinoic acid for 3 weeks (giving the total time of differentiation of 4 weeks). Mature EBs are dissociated with papain and DNAse for 1h at 37°C and plated in poly-ornithine/laminin-coated dishes in NPC media without FGF2.

Treatment with G-2-MePE

RTT neuronal cultures are treated with G-2-MePE (1nM-10μM) for 1 week.

Immunocytochemistry and Quantification of Neuronal Morphology

Cells are fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.5% Triton-X100 in PBS. Cells are then blocked in PBS containing 0.5% Triton-X100 and 5% donkey serum for 1h at room temperature. Fluorescent signals are detected using a Zeiss inverted microscope and images

are processed with Photoshop CS3. The following primary antibodies are used: TRA-1-60, TRA-1-81 (1:100), Nanog and Lin28 (1:500), human Nestin (1:100), Tuj-1 (1:500), Map2 (1:100); meCP2 (1:1000; VGLUT1 (1:200), Psd95 (1:500), GFP (1:200), Sox1 (1:250), Mushasi1 (1:200) and me3H3K27 (1:500). Cell soma size is measured using suitable software (e.g. ImageJ) after identification of neurons using the Syn::EGFP™. The morphologies of neuronal dendrites and spines are studied from an individual projection of z-stacks optical sections and scanned at 0.5um increments that correlate with the resolution valued at z-plane. Each optical section is the result of 3 scans at 500 lps followed by Kalman filtering. For synapse quantification, images are taken by a z-step of 1um using Biorad radiance 2100™ confocal microscope. Synapse quantification is done blinded to genotype. Only VGLUT1 puncta along Map2-positive processes are counted. Statistical significance is tested using 2-way ANOVA test and Bonferroni post-test.

Calcium Imaging

Neuronal networks derived from human iPSCs are infected with the lentiviral vector carrying the Syn:DsRed reporter construct. Cell cultures are washed twice with sterile Krebs HEPES Buffer (KHB) and incubated with 2–5 μM Fluo-4AM™ (Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA) in KHB for 40 minutes at room temperature. Excess dye is removed by washing twice with KHB, and an additional 20 minutes incubation is done to equilibrate intracellular dye concentration and allow de-esterification. Time-lapse image sequences (100X magnification) of 5000 frames are acquired at 28 Hz with a region of 336 × 256 pixels, using a Hamamatsu ORCA-ER™ digital camera (Hamamatsu Photonics K.K., Japan) with a 488 nm (FITC) filter on an Olympus IX81 inverted fluorescence confocal microscope (Olympus Optical, Japan). Images are acquired with MetaMorph 7.7™ (MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA). Images are subsequently processed using ImageJ™ and custom written routines in Matlab 7.2™ (Mathworks, Natick, MA).

Electrophysiology

Whole-cell patch clamp recordings are performed from cells co-cultured with astrocytes after 6 weeks of differentiation. The bath is constantly perfused with fresh HEPES-buffered saline (see supplemental methods for recipe). The recording micropipettes (tip resistance 3–6 MΩ) are filled with internal solution described in the Supplemental materials. Recordings are made using Axopatch 200B™ amplifier (Axon Instruments). Signals are filtered at 2 kHz and sampled at 5 kHz. The whole-cell capacitance is fully compensated. The series resistance is uncompensated but monitored during the experiment by the amplitude of the capacitive current in response to a 10-mV pulse. All recordings are performed at room temperature and chemicals are purchased from Sigma. Frequency and amplitude of spontaneous postsynaptic currents are measured with the

Mini Analysis Program™ software (Synaptosoft, Leonia, NJ). Statistical comparisons of WT and RTT groups are made using the non-parametric Kolmogorov-Smirnov two-tailed test, with a significance criterion of $p = 0.05$. EPSCs are blocked by CNQX or DNQX (10–20 μM) and IPSPs are inhibited by bicuculine (20 μM).

Results

RTT iPSC-derived neurons are characterized by decreased number of glutamatergic synapses, reduced spine density and smaller soma size. RTT neurons also show certain electophysiological defects, i.e. a significant decrease in frequency and amplitude of spontaneous synaptic currents when compared to controls. The RTT neurons show a decreased frequency of intracellular calcium transients.

We test G-2-MePE in the above model to test whether any of the pathologies of the RTT phenotype can be attenuated.

Treatment of the cell cultures with each drug concentration improves all of the morphological and physiological parameters of the treated RTT cell cultures in comparison to the non-treated RTT controls. Specifically, we observe a significant increase in glutamatergic synapse numbers in the G-2-MePE treated RTT cells. All concentrations of G-2-MePE treatment increase VGLUT1 puncta number in the RTT-derived neurons. G-2-MePE treatment normalizes the frequency and amplitude of spontaneous post-synaptic currents as well as the frequency of calcium transients generated by synaptic activity of the G-2-MePE treated RTT neurons.

In the present *in vitro* model of human RTT, the iPSCs derived from RTT patients and neurons differentiated from them are characterized by abnormalities in the MeCP2 expression. As discussed in the detailed description of the invention above, the vast majority of RTT cases are associated with mutations of the MeCP2 gene. Therefore the efficacy of G-2-MePE in the present *in vitro* model of human RTT is reasonably predictive of its efficacy in a human subject suffering from RTT.

Example 15: Effects of G-2-MePE in Human Beings with Rett Syndrome

Methods

Thirty subjects with Rett Syndrome are recruited. Subjects are female and aged between 16 and 29 years (Mean = 12.1 SD = 4.4). All subjects have an IQ <60 and mutations of the MECP2 gene. Subjects also show ether spike activity in the EEG or an increase in lower frequency bands of the EEG as detected by Fast Fourier Transform (FFT). Subjects are instructed that concomitant medications are to be stable for at least six weeks prior to study. Subjects receiving medication to treat signs of inattention are tested in the morning and instructed to take their medication in the afternoon. Subjects with QTc interval >451 msec are excluded.

The study is a randomized double blind placebo controlled parallel study with three doses of either placebo, 10 mg/kg T.I.D oral G-2-MePE for five days, or 30 mg/kg T.I.D. oral G-2-MePE.

Subjects are tested at baseline using the following instruments: The Rett Syndrome Natural History / Clinical Severity Scale, Aberrant Behavior Checklist Community Edition (ABC), Vinelands, Clinical Global Impression of Severity (CGI-S) and their carers completed the Caregiver Strain Questionnaire (CSQ).

Subjects are brought into clinic on an inpatient basis to enable initial baseline recordings of EEG, ECG and respiratory rate continuously for 24 hours using polysomnography technology. Hand movements are also recorded using the Q-Sensor™. Derived EEG measures include: spikes per unit time in the EEG, overall power of frequency bands of the EEG, QTc and heart rate variability (HRV), and respiratory irregularities.

Adverse events are also recorded using standard safety measures and the SMURF elicitation of adverse events

Statistically, the effect of treatment with G-2-MePE is analysed by conducting a repeated analysis of covariance (ANCOVA) on the effect of treatment on change from baseline scores.

Results

Treatment with G-2-MePE produces no more adverse events than are present during treatment with placebo, with all adverse events being of short duration and mild severity. No Serious Adverse Events are reported. No instances of increases in QTC are reported.

No effects are seen on respiratory rate or heart rate variability.

Treatment with G-2-MePE produces a significant overall reduction of spikes per unit time in the EEG. Treatment with 30 mg/kg T.I.D. oral G-2-MePE decreases spike activity compared to placebo. This dose of G-2-MePE also decreases the power of the delta band of the EEG compared to placebo.

Treatment with G-2-MePE also reduces total hand movements per twenty-four hour period as counted using the Q-Sensor™ device. This effect is significant for the 30 mg/kg T.I.D. dose compared to placebo.

Treatment with G-2-MePE has no significant effect overall on the Rett Syndrome Natural History / Clinical Severity Score. However, 30 mg/kg T.I.D. oral G-2-MePE, compared to placebo, produces significant effects on the following subscales: "Nonverbal Communication at this visit by exam"; "Epilepsy/Seizures at this visit: and "Hand use".

Conclusions

Treatment with G-2-MePE produces significant improvements in Central Nervous System function in the present study. Despite relatively short term treatment, abnormalities in the electrical activity of the brain is reduced, a clear signal of efficacy. This effect is dose dependent, seen after treatment 30 mg/kg T.I.D. oral G-2-MePE. These effects mirror the improvements in CNS function seen in the *mecp2* knockout transgenic mouse model of Rett Syndrome after administration of G-2-MePE.

Dose dependent effects are also seen on hand use, as assessed by an objective counting device and subjective rating. This is of interest because purposeless hand wringing is both characteristic to the Rett Syndrome clinical phenotype and is unique to this disorder.

The Non-verbal communication rating of the Rett Syndrome Natural History / Clinical Severity Scale is improved by treatment. This measure primarily assesses eye contact. This raises the prospect that longer term treatment with G-2-MePE may improve social relatedness in the population.

G-2-MePE is well tolerated in this population. No effects are seen in either standard measures or areas of specific concern in the patient population, such as QTc interval prolongation or apnea.

Example 16: Effects of G-2MePE on Human Beings with Autism Spectrum Disorders

Methods

To determine whether G-2-MePE can treat symptoms of ASD, we carry out a study in human beings with ASD. Twenty subjects with an Autism Spectrum Disorder are recruited. Subjects are male and aged between 16 and 65 years (Mean = 18.1 SD = 3.4). All subjects have an IQ >60 and strict DSM-IV-TR diagnosis of Autistic Disorder or Asperger Disorder. Subjects also meet criteria for an Autism Spectrum Disorder according the ADI-R and ADOS-G instruments, and fulfill the proposed DSM-V criteria for and Autism Spectrum Disorder. Subjects are instructed that concomitant medications are to be stable for at least six weeks prior to study. Subjects receiving medication to treat signs of inattention are tested in the morning and instructed to take their medication in the afternoon. Subjects better treated with atypical anti-psychotic medications indicated for autism are excluded. Subjects are screened for known genetic disorders including and those with Fragile X Syndrome or tuberous sclerosis excluded. Subjects with uncontrolled epilepsy are excluded.

The study is a double blind placebo-controlled crossover study with three phases. Subjects enter each phase of the crossover in a randomized order. In the test phases, subjects

receive either placebo, 10 mg/kg T.I.D oral G-2-MePE for five days, or 30 mg/kg T.I.D. oral G-2-MePE. Each phase of the crossover is separated by a washout period of fourteen days.

Subjects are tested at baseline using the following instruments: Wechsler IQ, Abberant Behavior Checklist Community Edition (ABC), Vinelands, Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale (YBOCS) compulsion subscale, Social Responsiveness Scale (SRS), Clinical Global Impression of Severity (CGI-S) and their carers complete the Caregiver Strain Questionnaire (CSQ).

Subjects are administered two tasks – the Reading the Mind in the Eyes Test- Revised (RMET) and an Eye Tracking (ET) task, as well as Clinical Global Impression of Improvement (CGI-I). Tasks commence two hours following administration of placebo or either dose of G-2-MePE. The RMET is a computer based task that assesses one's ability to read emotions from the eyes of subtle affective facial expressions and is a widely used test of emotion recognition in patients with autism (2001). Importantly, the RMET is capable of detecting improvement with even a single dose of a pharmacological agent (Guastella et al., 2010). Eye tracking issues are characteristic of patients with autism who spend less time looking at the eyes of photographs of human faces. Again, a single administration of a pharmacologic intervention can ameliorate eye tracking deficits in autism (Andari et al, 2010).

Adverse events are also recorded using standard safety measures.

Statistically, the effect of treatment with G-2-MePE is analysed by conducting a repeated analysis of covariance (ANCOVA) on the effect of treatment on change from baseline scores.

Results

Treatment with G-2-MePE produces no more adverse events than were present during treatment with placebo, with all adverse events being of short duration and mild severity. No Serious Adverse Events are reported.

Treatment with G-2-MePE produces a significant overall improvement in performance of the RMET test. Treatment with 30 mg/kg T.I.D. oral G-2-MePE increases the percent correct responses on the RMET.

Treatment with G-2-MePE produces a significant overall improvement in time spent looking at the eye region in the ET test. CGI-I scores at the end of treatment periods show a significant difference. Positive treatment effects are correlated with baseline CSQ scores.

Conclusions

Treatment with G-2-MePE produces significant improvements in performance in the Reading the Mind in the Eyes Test – Revised, and in performance of an Eye Tracking task. This effect is dose dependent, seen after treatment 30 mg/kg T.I.D. oral G-2-MePE.

Improvement in these measures is reflective of an improvement in processing of social information processing. Social interaction deficits are a core symptom diagnostic for autism spectrum disorders, and this is therefore a key finding.

G-2-MePE also produces an overall improvement in function as indexed by the Clinical Global Impression of Improvement. Free text annotation of the Case Report Forms from the study indicate this effect related to an improvement in social relatedness. This implies that the changes seen in the RMET and ET task may have relevance to social activity in daily life.

G-2-MePE is well tolerated in this population.

Example 17: Animal Models for Determining Effects of G-2-MePE on Autism Spectrum Disorders

Effects of G-2-MePE are further tested in the following genetic models of ASD: the Tbx1 heterozygous mouse, the Cntnap2 knockout mouse and the Slc9a6 knockout mouse. G-2-MePE is also tested in the fmr1 knockout mouse model of Fragile X Syndrome.

Tbx1. Mutations of the *TBX1* gene are associated with Autism Spectrum Disorders (Paylor et al., 2006). Transgenic *Tbx1* mice are selectively impaired in social interaction, ultrasonic vocalization, repetitive behaviors and working memory (Hiramoto et al., 2011).

Cntnap2. Two-thirds of patients with mutations of the contactin associated protein-like 2 (*CNTNAP2*) gene are diagnosed with an Autism Spectrum Disorder (Alarcon et al., 2008; Arking et al., 2008; Bakkaloglu et al., 2008; Strauss et al., 2006; Vernes et al., 2008). *Cntnap2* knockout (KO) mice exhibit ASD-related phenotypes in social behavior, ultrasonic vocalization and repetitive behaviors (Penagarikano et al., 2011).

Slc9a6. This gene has been implicated in syndromic ASD and encodes the sodim-hydrigen exchanger 6 (NHE6). Mutations in SLC9A6 are associated with intellectual disability (Gilfillan et al., 2008) and autistic behavior (Garbern et al., 2010). On *Slc9a6* KO mice exhibit motor hyper-activity and cerebellar dysfunction (Stromme et al., 2011).

Fmr1. Silencing of the *FMR1* gene produces Fragile X Syndrome, the phenotype of which includes autism; two thirds of patients with Fragile X Syndrome meet screening criteria for an Autism Spectrum Disorder (Harris et al., 2008). Pediatric patients with Fragile X Syndrome also show lowered seizure threshold. The *fmr1* knockout mouse replicates much of the phenotype of Fragile X Syndrome, including juvenile seizure susceptibility (Yan et al., 2004).

Methods

Animals in each of the above models are generated in accordance with the methodology described in the cited literature. Wild type equivalents are also obtained for each genetic model.

Animals in each model are divided into three groups (n=10 to n=20): placebo treated wild type mice, mutant G-2-MePE-treated group and mutant placebo-treated control group.

The treatments are administered intraperitoneally: placebo (saline) or 20 mg/kg/day of G-2-MePE.

Measures of key features of ASD as displayed in each model are taken in accordance with the cited literature.

Results

G-2-MePE treatment significantly improves all measures associated with the ASD phenotype.

References

The following references and all patents, patent applications and other publications cited herein are incorporated fully by reference.

Alarcon,M., Abrahams,B.S., Stone,J.L., Duvall,J.A., Perederiy,J.V., Bomar,J.M., Sebat,J., Wigler,M., Martin,C.L., Ledbetter,D.H., Nelson,S.F., Cantor,R.M., and Geschwind,D.H. (2008). Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene. Am. J. Hum. Genet. 82, 150-159.

Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. Nat Genet. 1999 23:185-188

Andari E, Duhamel JR, Zalla T, Herbrecht E, Leboyer M, Sirigu A. (2010) Promoting social behavior with oxytocin in high-functioning autism spectrum disorders. PNAS 107:4389-4394

Arking,D.E., Cutler,D.J., Brune,C.W., Teslovich,T.M., West,K., Ikeda,M., Rea,A., Guy,M., Lin,S., Cook,E.H., and Chakravarti,A. (2008). A common genetic variant in the neurexin superfamily member CNTNAP2 increases familial risk of autism. Am. J. Hum. Genet. 82, 160-164.

Bakkaloglu,B., O'Roak,B.J., Louvi,A., Gupta,A.R., Abelson,J.F., Morgan,T.M., Chawarska,K., Klin,A., Ercan-Sencicek,A.G., Stillman,A.A., Tanriover,G., Abrahams,B.S., Duvall,J.A., Robbins,E.M., Geschwind,D.H., Biederer,T., Gunel,M., Lifton,R.P., and State MW (2008).

Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders.

Bakkaloglu,B., O'Roak,B.J., Louvi,A., Gupta,A.R., Abelson,J.F., Morgan,T.M., Chawarska,K., Klin,A., Ercan-Sencicek,A.G., Stillman,A.A., Tanriover,G., Abrahams,B.S., Duvall,J.A., Robbins,E.M., Geschwind,D.H., Biederer,T., Gunel,M., Lifton,R.P., and State MW (2008). Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders. Am. J. Hum. Genet. 82, 165-173.

Baron-Cohen S, Wheelwright S, Hill J, Raste Y, Plumb I (2001) The "Reading the Mind in the Eyes" test, revised version: A study with normal adults, and adults with Asperger's syndrome or high-functioning autism. J Child Psychol Psychiatry 42:241–251.

Belichenko PV, Oldfors A, Hagberg B, Dahlström A. Rett syndrome: 3-D confocal microscopy of cortical pyramidal dendrites and afferents. Neuroreport. 1994 5:1509-1513

Biederer T, Sara Y, Mozhayeva M, Atasoy D, Liu X, Kavalali ET, Südhof TC. (2002) SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. Science 297(5586): 1525-1531.

Chapleau CA, Larimore JL, Theibert A, Pozzo-Miller L. (2009) Modulation of dendritic spine development and plasticity by BDNF and vesicular trafficking: fundamental roles in neurodevelopmental disorders associated with mental retardation and autism. J. Neurodev. Disord. 1: 185-196.

Cheng CM, Mervis RF, Niu SL, Salem N Jr, Witters LA, Tseng V, Reinhardt R, Bondy CA. Insulin-like growth factor 1 is essential for normal dendritic growth. J Neurosci Res. 2003 73:1-9

Comery TA, Harris JB, Willems PJ, Oostra BA, Irwin SA, Weiler IJ, Greenough WT. (1997) Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. Proc. Natl Acad. Sci. USA 94: 5401-5404.

Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, Nygren G, Rastam M, Gillberg IC, Anckarsäter H, Sponheim E, Goubran-Botros H, Delorme R, Chabane N, Mouren-Simeoni MC, de Mas P, Bieth E, Rogé B, Héron D, Burglen L, Gillberg C, Leboyer M, Bourgeron T. (2007) Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. Nat Genet. 39: 25-27.

Etherton MR, Blaiss CA, Powell CM, Südhof TC. (2009) Mouse neurexin-1α deletion causes correlated electrophysiological and behavioural changes consistent with cognitive impairments. Proc. Nat. Acad. Sci. 106: 17998-18003.

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

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

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

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

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

Guastella AJ, Einfeld SL, Gray KM, Rinehart NJ, Tonge BJ, Lambert TJ, Hickie IB. (2010) Intranasal oxytocin improves emotion recognition for youth with autism spectrum disorders. Biol Psychiatry. 67:692-694

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

Harris SW, Hessl D, Goodlin-Jones B, Ferranti J, Bacalman S, Barbato I, Tassone F, Hagerman PJ, Herman H, Hagerman RJ. (2008) Autism profiles of males with fragile X syndrome. Am J Ment Retard. 113:427-438.

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

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

Irwin SA, Galvez R, Greenough WT. Dendritic spine structural anomalies in fragile-X mental retardation syndrome. Cereb Cortex. 2000 10:1038-1044

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

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

Kim HG, Kishikawa S, Higgins AW, Seong IS, Donovan DJ, Shen Y, Lally E, Weiss LA, Najm J, Kutsche K, Descartes M, Holt L, Braddock S, Troxell R, Kaplan L, Volkmar F, Klin A, Tsatsanis K, Harris DJ, Noens I, Pauls DL, Daly MJ, MacDonald ME, Morton CC, Quade BJ, Gusella JF. (2008) Disruption of neurexin 1 associated with autism spectrum disorder. Am. J. Hum. Genet. 82: 199-207.

Klemmer P, Meredith RM, Holmgren CD, Klychnikov OI, Stahl-Zeng J, Loos M, van der Schors RC, Wortel J, de Wit H, Spijker S, Rotaru DC, Mansvelder HD, Smit AB, Li KW. Proteomics, ultrastructure, and physiology of hippocampal synapses in a fragile X syndrome mouse model reveal presynaptic phenotype. J Biol Chem. 2011 286:25495-25504

Krueger DD, Osterweil EK, Chen SP, Tye LD, Bear MF. (2011) Cognitive dysfunction and prefrontal synaptic abnormalities in a mouse model of fragile X syndrome. Proc. Natl Acad. Sci. USA 108: 2587-2592.

Lauterborn JC, Rex CS, Kramár E, Chen LY, Pandyarajan V, Lynch G, Gall CM. (2007) Brain-derived neurotrophic factor rescues synaptic plasticity in a mouse model of fragile X syndrome. J. Neurosci. 27: 10685-10694.

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

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

Marchetto et al. (2010) A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. Cell 143:527-539 (incl. supplemental information)

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

Minshew NJ, Williams DL. The new neurobiology of autism: cortex, connectivity, and neuronal organization. Arch Neurol. 2007 64:945-950

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Stromme,P., Dobrenis,K., Sillitoe,R.V., Gulinello,M., Ali,N.F., Davidson,C., Micsenyi,M.C., Stephney,G., Ellevog,L., Klungland,A., and Walkley,S.U. (2011). X-linked Angelman-like syndrome caused by Slc9a6 knockout in mice exhibits evidence of endosomal-lysosomal dysfunction. Brain. 134:3369-3383.

Sykes NH, Toma C, Wilson N, Volpi EV, Sousa I, Pagnamenta AT, Tancredi R, Battaglia A, Maestrini E, Bailey AJ, Monaco AP; International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (IMGSAC). (2009) Copy number variation and association analysis of SHANK3 as a candidate gene for autism in the IMGSAC collection. Eur. J. Hum. Genet. 17: 1347-1353.

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

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

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

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

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

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

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

Zhiling Y, Fujita E, Tanabe Y, Yamagata T, Momoi T, Momoi MY. (2008) Mutations in the gene encoding CADM1 are associated with autism spectrum disorder. Biochem. Biophys. Res. Commun. 377: 926-929.

Zhao MG, Toyoda H, Ko SW, Ding HK, Wu LJ, Zhuo M. (2005) Deficits in trace fear memory and long-term potentiation in a mouse model for fragile X syndrome. J. Neurosci. 25: 7385-7392. (Erratum in: J Neurosci. 2005, 25: 8112)

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

We Claim:

1. A method for treating an animal suffering from a symptom of an autism spectrum disorder (ASD), comprising administering to said animal an effective amount of Glycyl-2-Methyl-L-prolyl-L-glutamate (G-2-MePE), said treatment producing an improvement in said symptom as assessed by one or more behavioral test selected from the group consisting of The Rett Syndrome Natural History / Clinical Severity Scale, Aberrant Behavior Checklist Community Edition (ABC), Vinelands, Clinical Global Impression of Severity (CGI-S) and their carers completed the Caregiver Strain Questionnaire (CSQ), or one or more physiological test selected from the group consisting of electroencephalogram (EEG) spike frequency, overall power in frequency bands of an EEG, hand movement, QTc and heart rate variability (HRV), and respiratory irregularities compared to control animals not suffering from said symptom.

2. The method of Claim 1, wherein said ASD is selected from the group consisting of autism, Fragile X Syndrome, Rett Syndrome (RTT), Autistic Disorder, Asperger Syndrome, Childhood Disintegrative Disorder and Pervasive Developmental Disorder Not Otherwise Specified (PDD-NOS), and Pathological Demand Avoidance (PDA)..

3. The method of any of claims 1 to 2, said effective amount of G-2-MePE being in the range of about 0.001 mg/Kg to about 100 mg/Kg.

4. The method of any of claims 1 to 3, said effective amount of G-2-MePE being in the range of about 0.001 mg/Kg to about 0.1 mg/Kg when administered directly to the brain.

5. The method of any of claims 1 to 2, said effective amount of G-2-MePE being in the range of about 1 mg/Kg to about 100 mg/Kg when administered systemically.

6. The method of any of claims 1 to 2, said G-2-MePE being administered systemically, parenterally or directly into the brain.

7. The method of any of claims 1 to 2, said G-2-MePE being administered into a ventricle of the brain.

8. The method of any of claims 1 to 2, where said G-2-MePE is administered via an intravenous, subcutaneous or oral route.

9. The method of any of Claims 1 to 8, where said G-2-MePE in administered orally in a dose of from about 10 mg/kg to about 60 mg/kg.

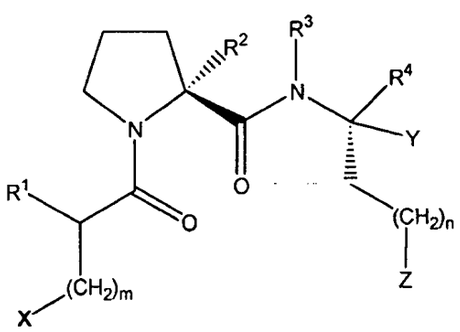
10. The method of any of claims 1 to 9, said G-2-MePE being in a physiologically compatible aqueous solution, water-in-oil micro-emulsion, water-in-oil coarse emulsion, water-in-oil liquid crystal, nanocapsule, or tablet.

11. The method of any of claims 1 to 10, said G-2-MePE being incorporated into a gel soluble in an aqueous solution.

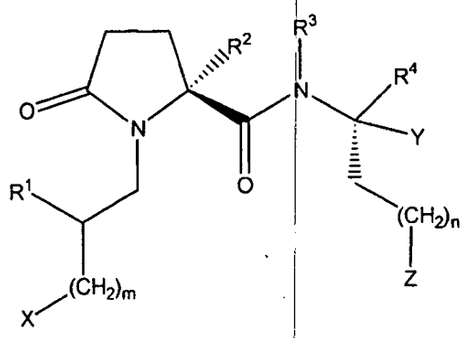
12. The method of any of claims 1 to 11, where said G-2-MePE is administered to a mucosa of said animal.

13. The method of claim 11, said gel being placed in the mouth of said animal, and said G-2-MePE being released from said gel.

14. A method for treating an animal having a symptom of an autism spectrum disorder (ASD), comprising administering to said animal, a compound of Formula 1 or Formula 2:



Formula 1



Formula 2

where m is 0 or 1;

n is 0 or 1;

X is H or —NR^6R^7;

Y is H, alkyl, —CO_2R^5, or —$CONR^6R^7$;

Z is H, alkyl, —CO_2R^5 or —$CONR^6R^7$;

R^1 is H, alkyl, or aralkyl;

R^2, R^3, and R^4 are independently H or alkyl;

each R^5 is independently H, alkyl, or a fatty alcohol residue;

each R^6 and R^7 is independently H, alkyl, or aralkyl, or $-NR^6R^7$ is pyrrolidino, piperidino, or morpholino;

or a lactone formed when a compound where Y is $—CO_2$(alkyl) and Z is $—CO_2H$ or where Y is $—CO_2H$ and Z is $—CO_2$(alkyl) is lactonized;

and the pharmaceutically acceptable salts thereof,

provided that the compound is not GPE, N-Me-GPE, GPE amide, APE, GPQ or a salt thereof.

In some aspects, this invention includes:

(a) the compounds are compounds of Formula 1;

(b) m is 0;

(c) n is 1;

(d) at least one of X, Y, R^1, R^2, R^3, R^4, and R^5 is not hydrogen;

(e) X is $—NR^6R^7$; and

(f) Y is $—CO_2R^5$ or $—CO_2NR^6R^7$; and

(g) Z is $—CO_2R^5$ or $—CO_2NR^6R^7$.

15. The method of Claim 14, where the compound is an effective amount of G-2-MePE.

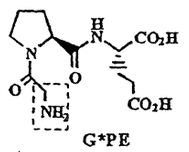
16. The method of any of claims 1-15 further comprising administering to the animal a second therapeutic agent selected from a group consisting of: insulin-like growth factor-I (IGF-I), insulin-like growth factor-II (IGF-II), glycyl-prolyl-glutamate (GPE), transforming growth factor-β1, activin, growth hormone, nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), growth hormone binding protein, IGF-binding proteins (especially IGFBP-3), basic fibroblast growth factor, acidic fibroblast growth factor, the hst/Kfgk gene product, FGF-3, FGF-4, FGF-6, keratinocyte growth factor, androgen-induced growth factor, int-2, fibroblast growth factor homologous factor-1 (FHF-1), FHF-2, FHF-3 and FHF-4, karatinocyte growth factor 2, glial-activating factor, FGF-10 and FGF-16, ciliary neurotrophic factor, brain derived growth factor, neurotrophin 3, neurotrophin 4, bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), glial-cell line derived neurotrophic factor, activity-dependant neurotrophic factor, cytokine leukaemia inhibiting factor, oncostatin M, interleukin), α-, β-, γ-, or consensus interferon, TNF-α, clomethiazole; kynurenic acid, Semax, tacrolimus, L-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol, andrenocorticotropin-(4-9) analog [ORG 2766] and dizolcipine (MK-801), selegiline; glutamate antagonists such as, mematine (Namenda) NPS1506, GV1505260, MK-801, GV150526; AMPA antagonists such as 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo(f)quinoxaline (NBQX), LY303070

and LY300164; anti-inflammatory agents directed against the addressin MAdCAM-1 and/or its integrin α4 receptors (α4β1 and α4β7), such as anti-MAdCAM-1mAb MECA-367 (ATCC accession no. HB-9478), fenobam, a selective serotonin reuptake inhibitor such as fluoxetine, or an atypical anti-psychotic such as risperidone.

17. The method of any of claims 1-15, where said dose of said compound is 10 mg/kg three times per day or 30 mg/kg three times per day.

18. The method of any of claims 1-17, where said animal is a human being.

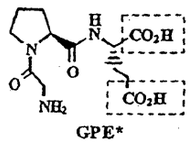
I. MODIFY GLYCINE RESIDUE



G*PE

II. MODIFY GLUTAMIC ACID RESIDUE

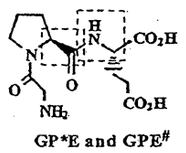
i. α-carboxylic acid residue
ii. γ-carboxylic acid residue
iii. GPE diesters



GPE*

III. MODIFY PEPTIDE LINKAGES

i. modify Pro - α-methylproline
ii. modify Glu - *N*-Methylglutamic acid
α-Methylglutamic acid



GP*E and GPE#

Figure 1

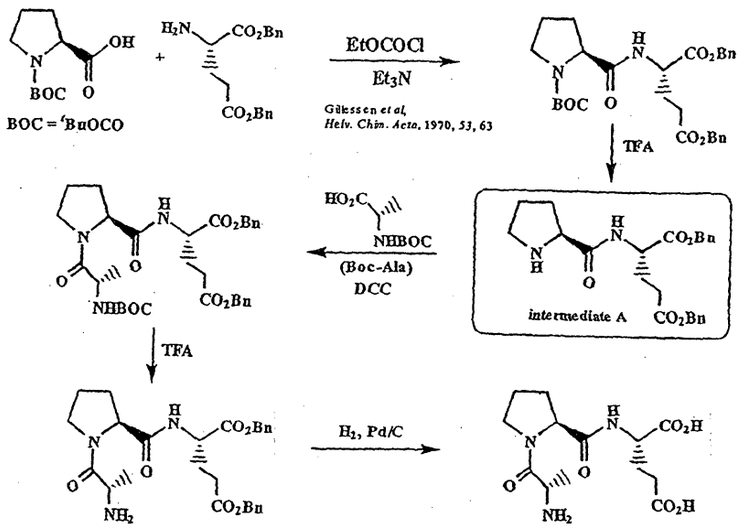

BOC = tBuOCO
EtOCOCl
Et3N
Gilessen et al,
Helv. Chim. Acta, 1970, 53, 63
TFA
intermediate A
(Boc-Ala)
DCC
TFA
H2, Pd/C

Figure 2

Similarly:

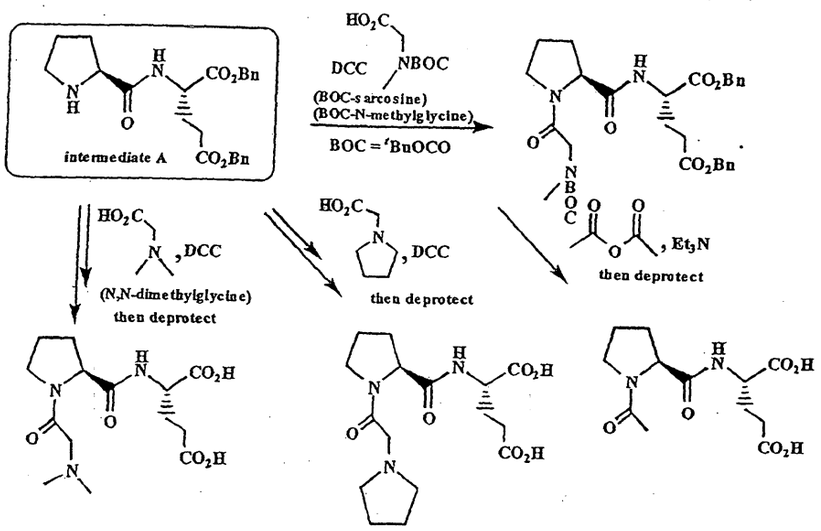


Figure 3

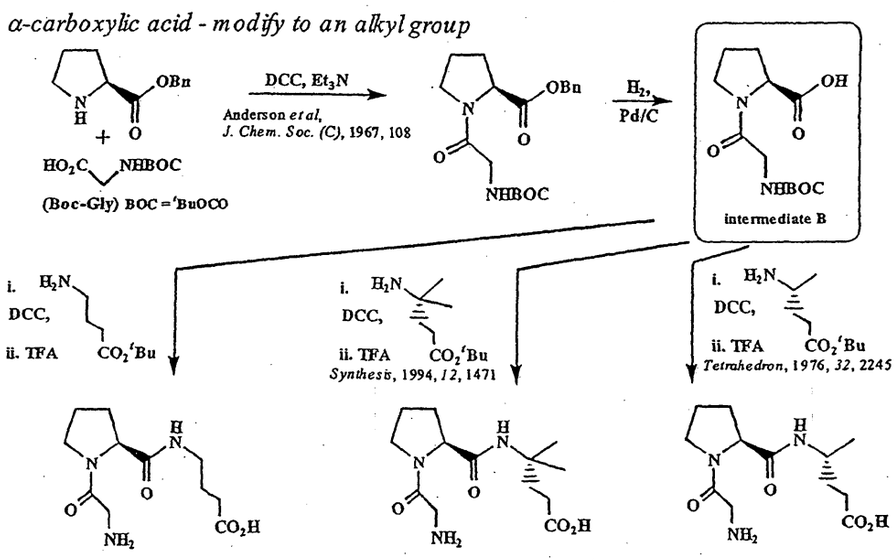
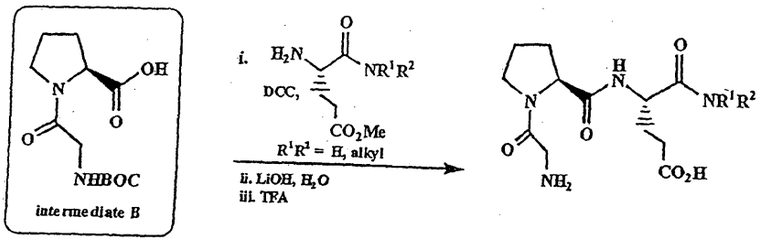
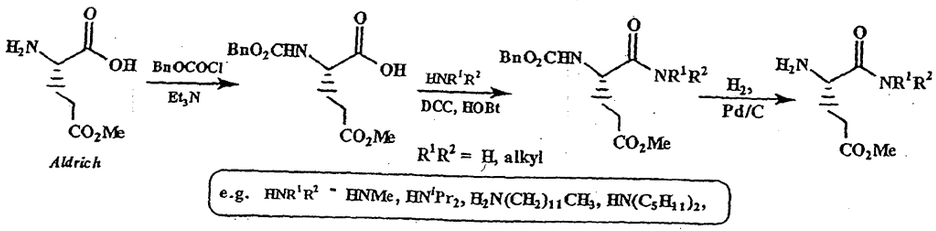

α-carboxylic acid - modify to an alkyl group
OBn
DCC, Et3N
Anderson et al,
J. Chem. Soc. (C), 1967, 108
H2,
Pd/C
OH
NHBOC
intermediate B
HO2C
NHBOC
(Boc-Gly) BOC = tBuOCO
i. H2N
DCC,
ii. TFA
CO2tBu
Synthesis, 1994, 12, 1471
Tetrahedron, 1976, 32, 2245
NH2
CO2H

Figure 4

α-carboxylic acid - modify to an amide



synthesis of amide



e.g. HNR^1R^2 = HNMe, HN^iPr_2, $H_2N(CH_2)_{11}CH_3$, $HN(C_5H_{11})_2$,

Figure 5

WO 2012/102832

reduce γ-carboxylic acid - lactone prodrug

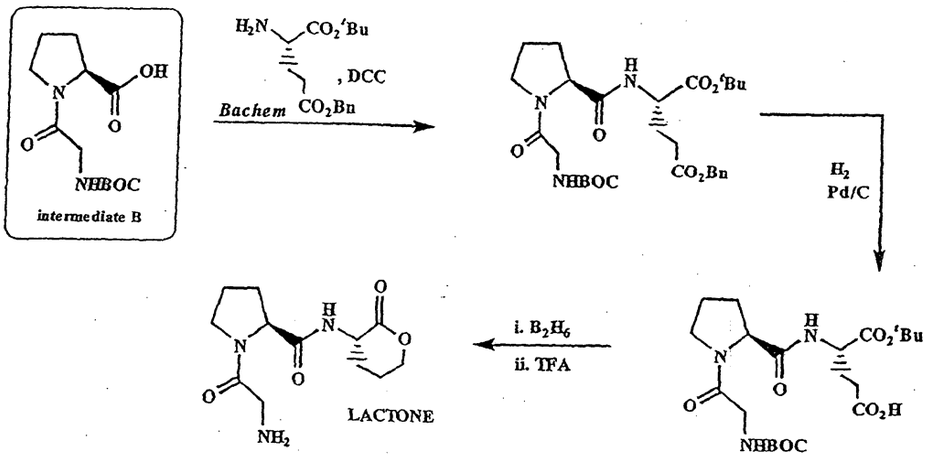


Figure 6

γ-carboxylic acid - modify to an alkyl group

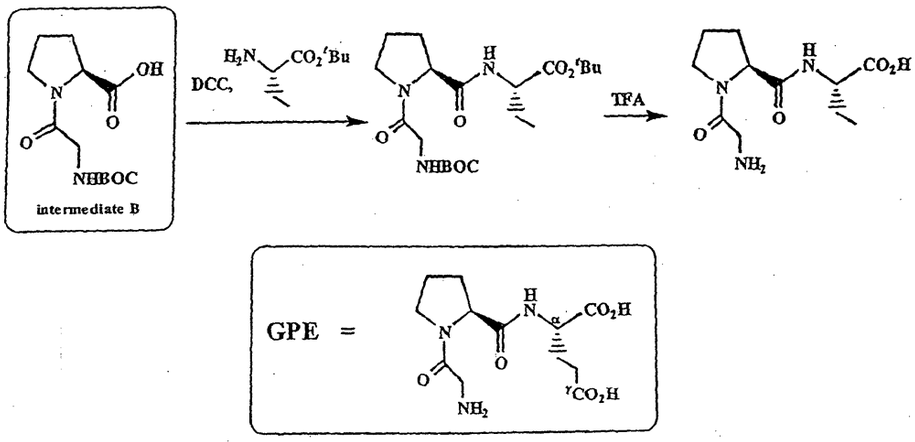
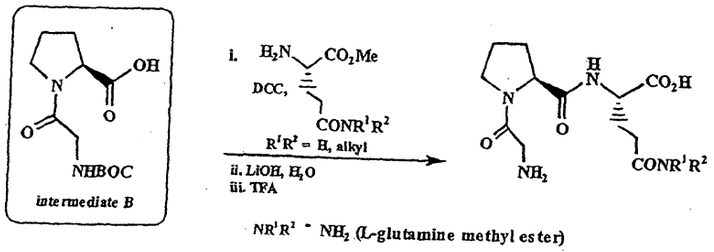


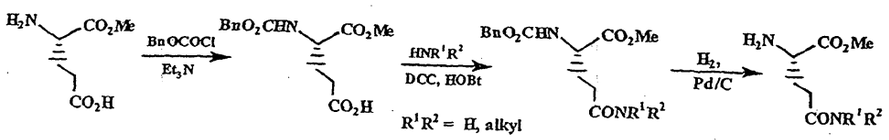
Figure 7

γ-carboxylic acid - modify to an amide



NR^1R^2 = NH_2 (L-glutamine methyl ester)

synthesis of amide



R^1R^2 = H, alkyl

e.g. HNR^1R^2 = $HN(CH_2Ph)_2$, NEt_2, 

Figure 8

reduce γ-carboxylic acid - lactone prodrug

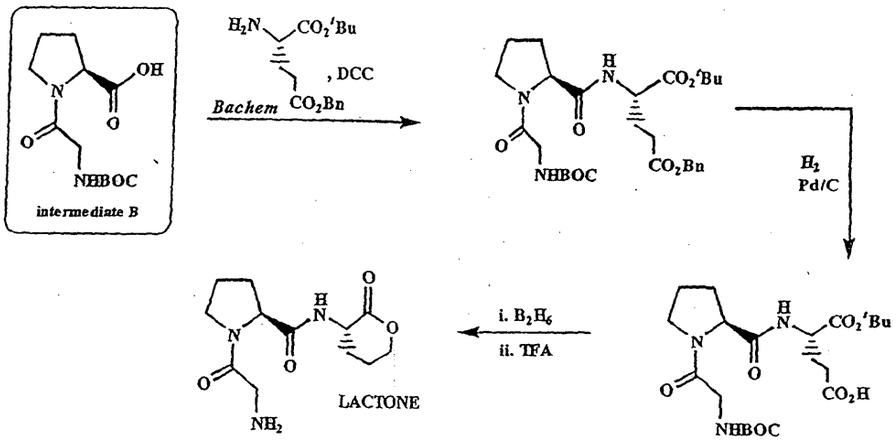
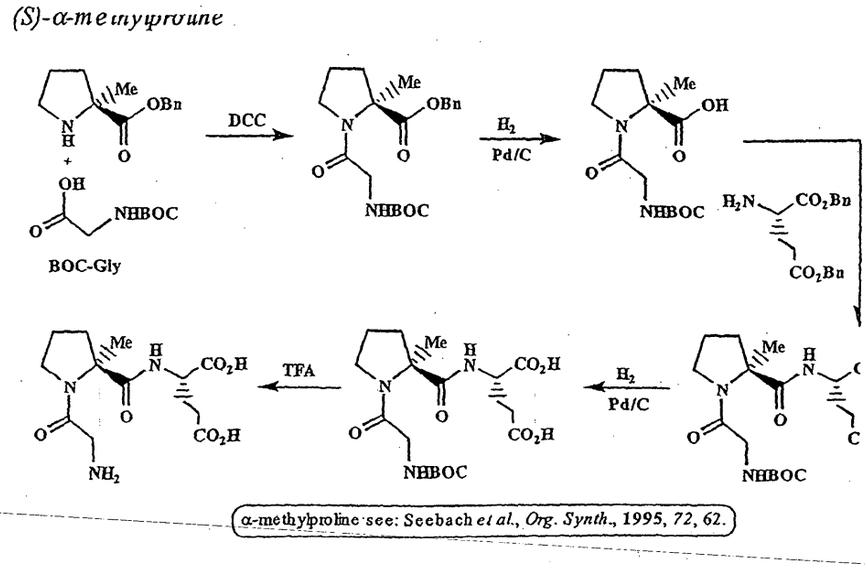


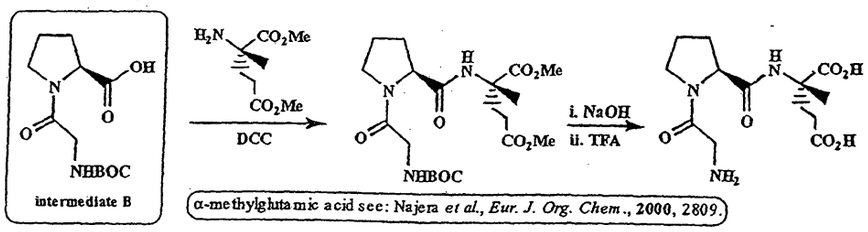
Figure 9



α-methylproline see: Seebach *et al.*, *Org. Synth.*, 1995, *72*, 62.

Figure 10

(S)-α-methylglutamic acid



N-methylglutamic acid

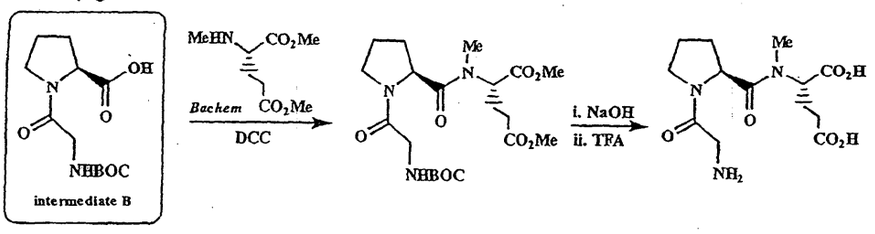


Figure 11

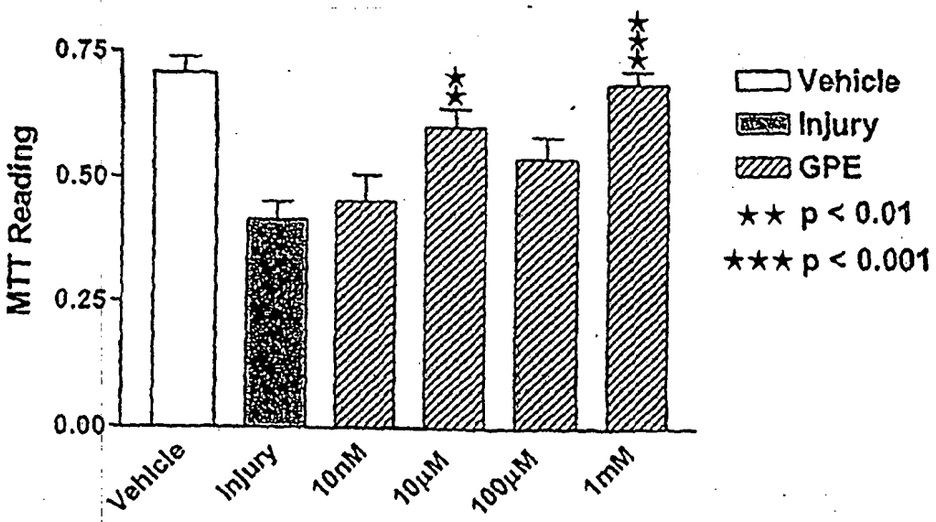

MTT Reading
0.75
0.50
0.25
0.00
Vehicle
Injury
10nM
10μM
100μM
1mM
Vehicle
Injury
GPE
★★ p < 0.01
★★★ p < 0.001

Figure 12

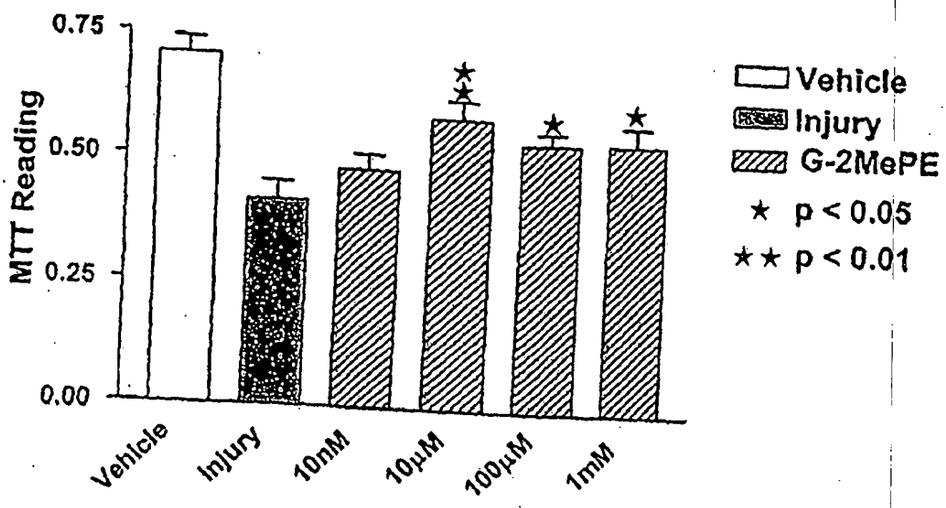

0.75
0.50
0.25
0.00
MTT Reading
Vehicle
Injury
10nM
10μM
100μM
1mM
Vehicle
Injury
G-2MePE
★ p < 0.05
★★ p < 0.01

Figure 13

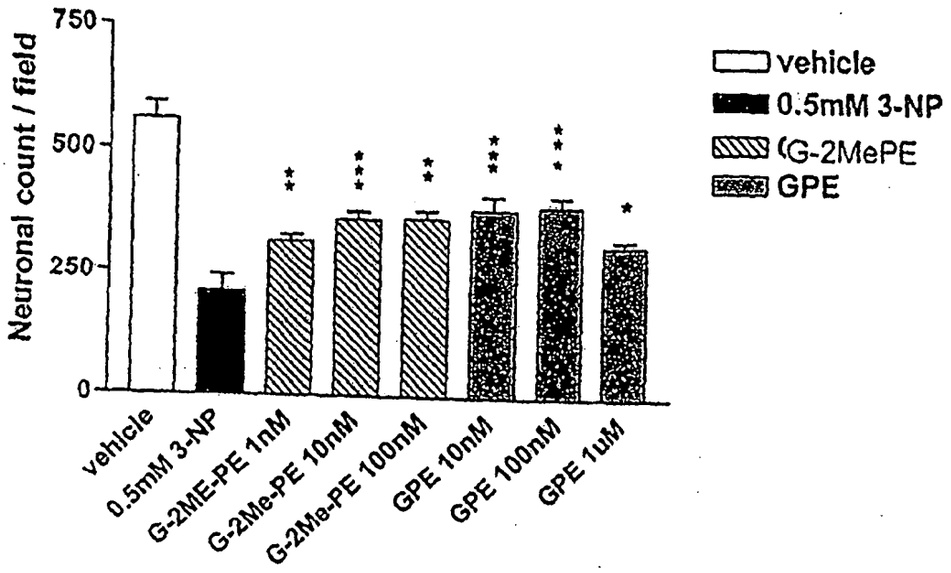

Neuronal count / field
750
500
250
0
vehicle
0.5mM 3-NP
G-2ME-PE 1nM
G-2Me-PE 10nM
G-2Me-PE 100nM
GPE 10nM
GPE 100nM
GPE 1uM
vehicle
0.5mM 3-NP
G-2MePE
GPE

Figure 14

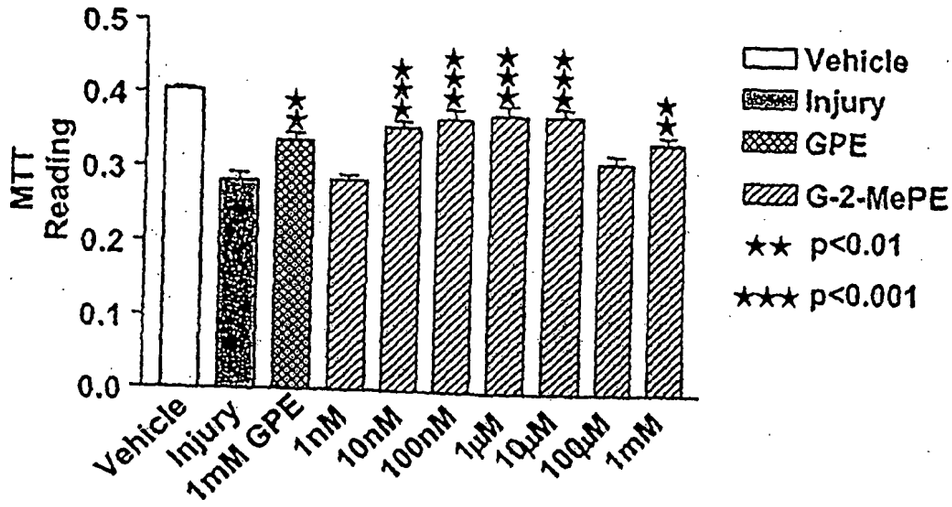

0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
MTT Reading
Vehicle
Injury
1mM GPE
1nM
10nM
100nM
1μM
10μM
100μM
1mM
Vehicle
Injury
GPE
G-2-MePE
★★ p<0.01
★★★ p<0.001

Figure 15

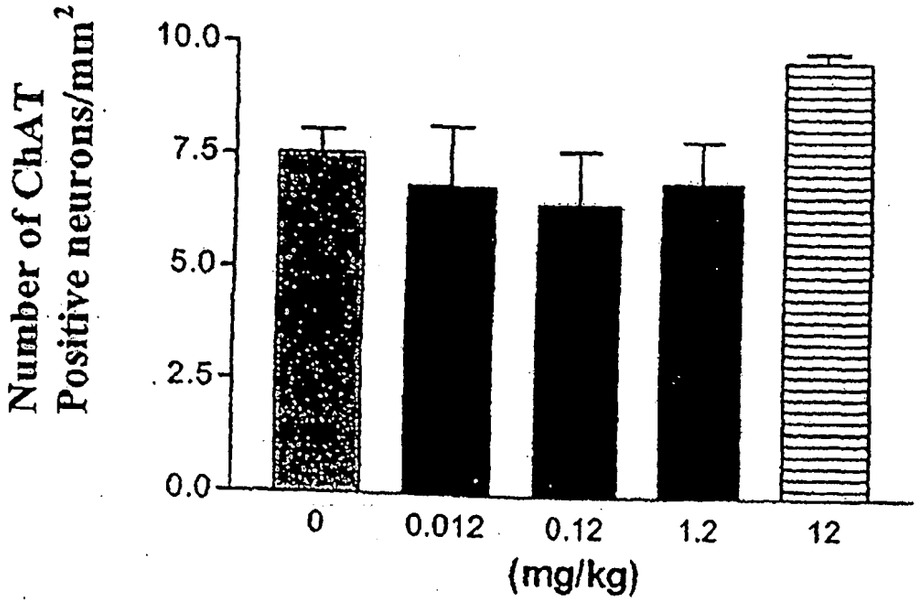

Number of ChAT Positive neurons/mm^2
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
0
0.012
0.12
1.2
12
(mg/kg)

Figure 16

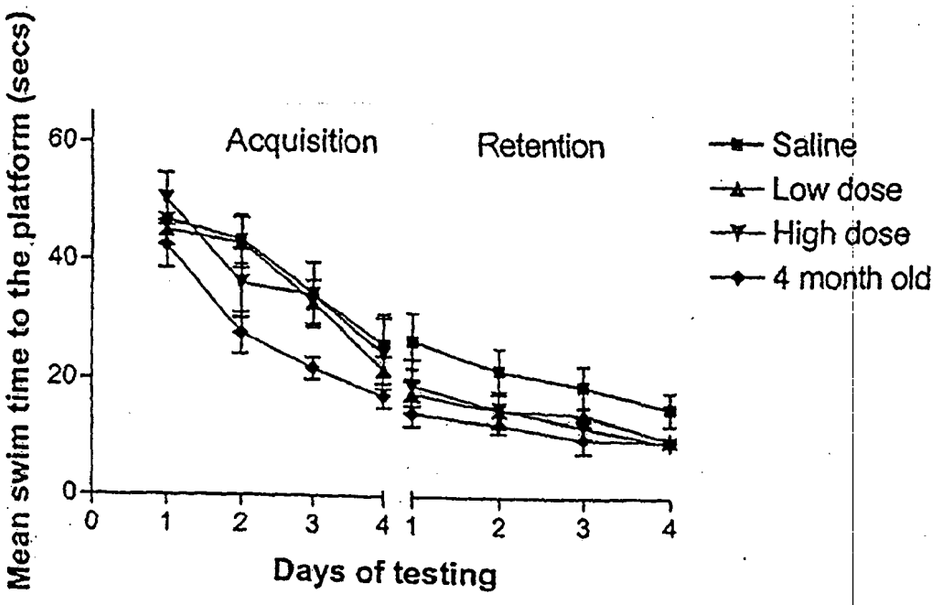

Mean swim time to the platform (secs)
60
40
20
0
Acquisition
Retention
0 1 2 3 4 1 2 3 4
Days of testing
Saline
Low dose
High dose
4 month old

Figure 17

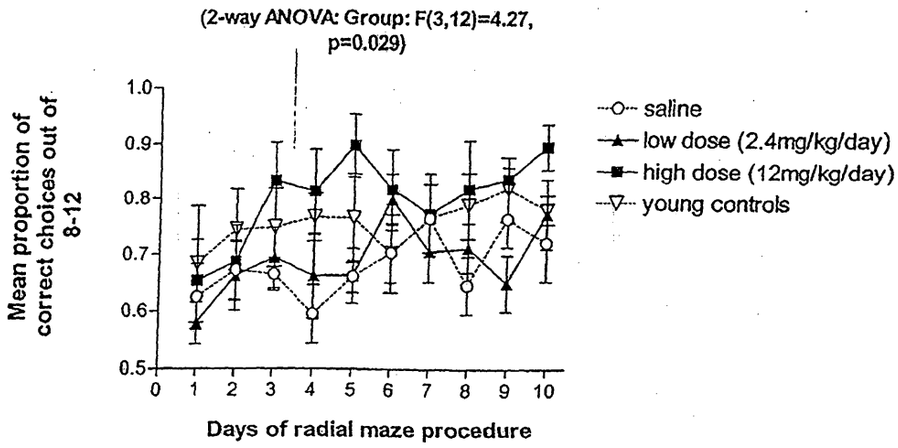

(2-way ANOVA: Group: F(3,12)=4.27, p=0.029)
Mean proportion of correct choices out of 8-12
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Days of radial maze procedure
saline
low dose (2.4mg/kg/day)
high dose (12mg/kg/day)
young controls

Figure 18A

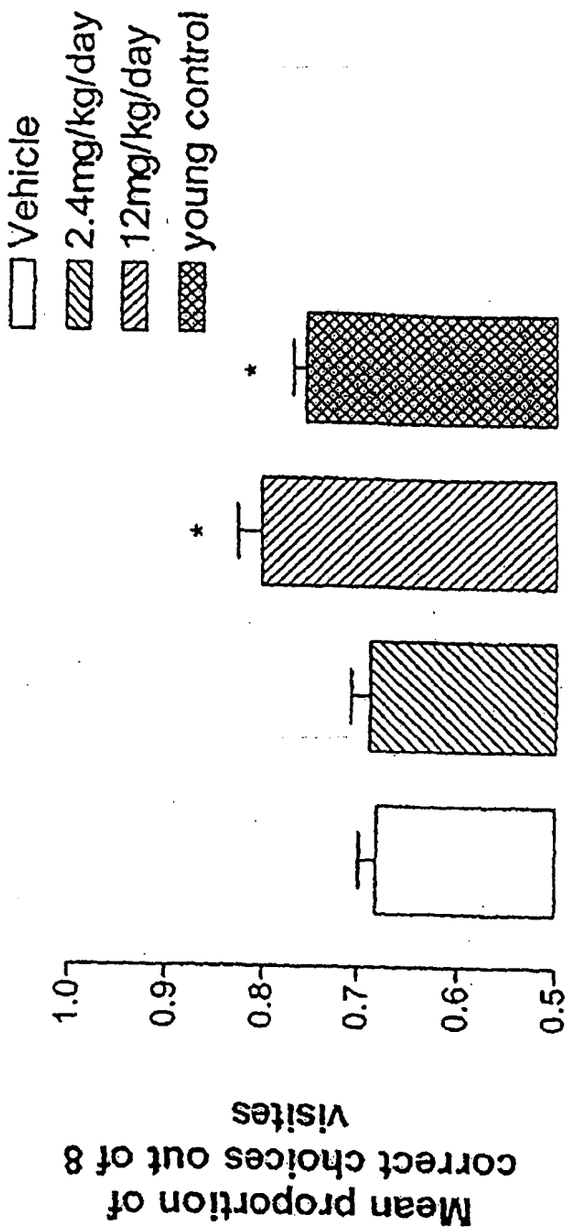

Vehicle
2.4mg/kg/day
12mg/kg/day
young control
*
*
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
Mean proportion of
correct choices out of 8
visites

Figure 18B

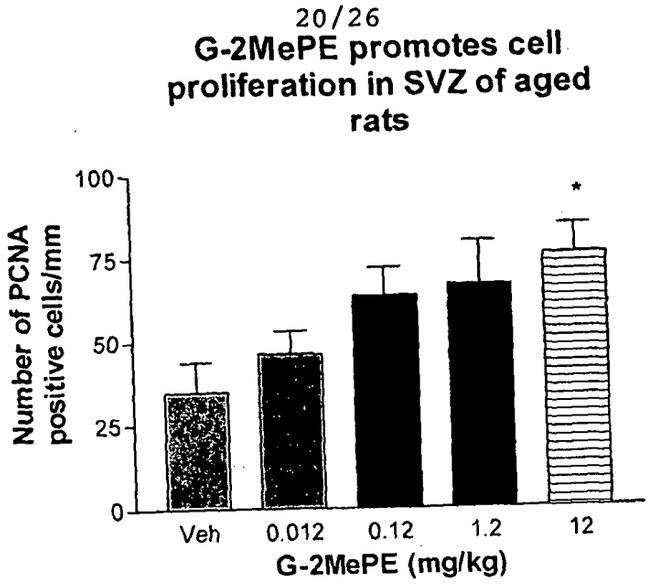


Figure 19A



Figure 19B

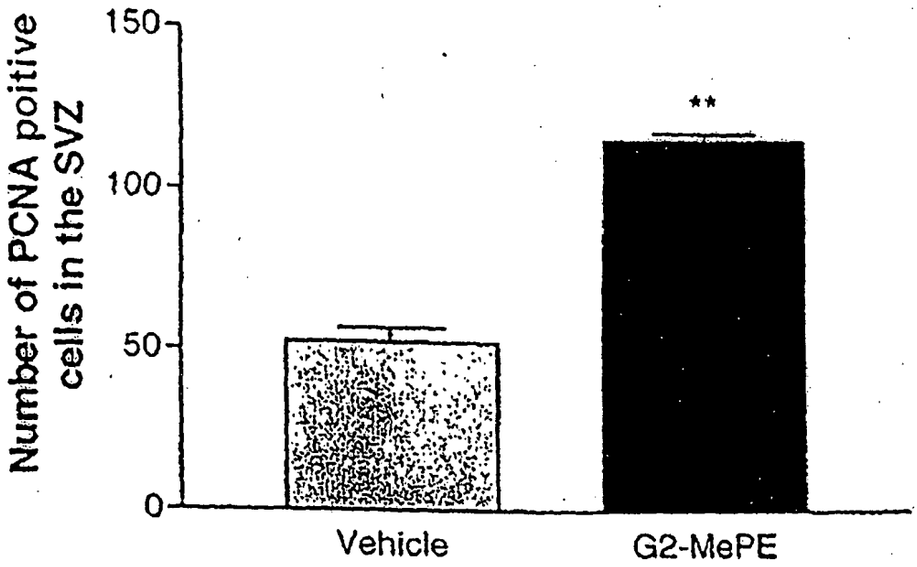

Number of PCNA poitive cells in the SVZ
150
100
50
0
**
Vehicle
G2-MePE

Figure 19C

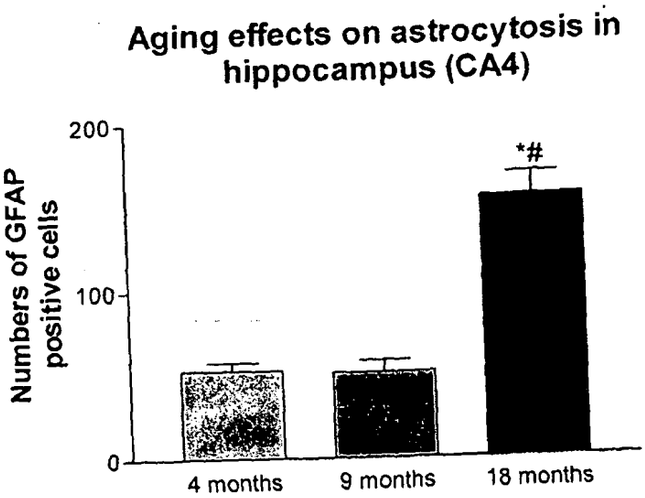


Figure 20A



Figure 20B

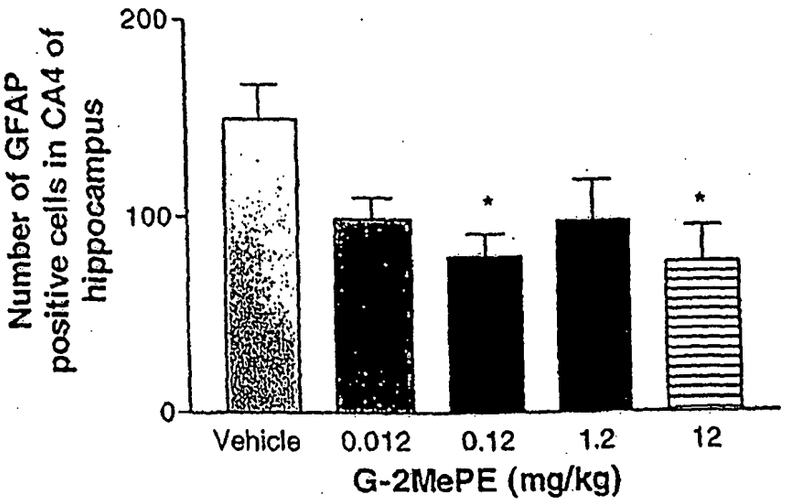


Figure 20C

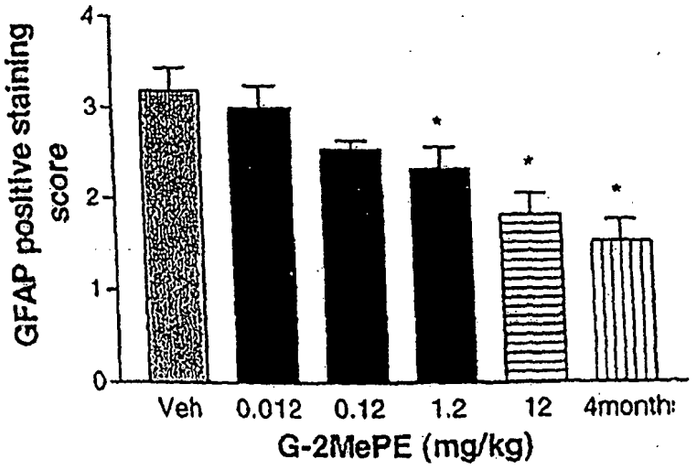


Figure 20D

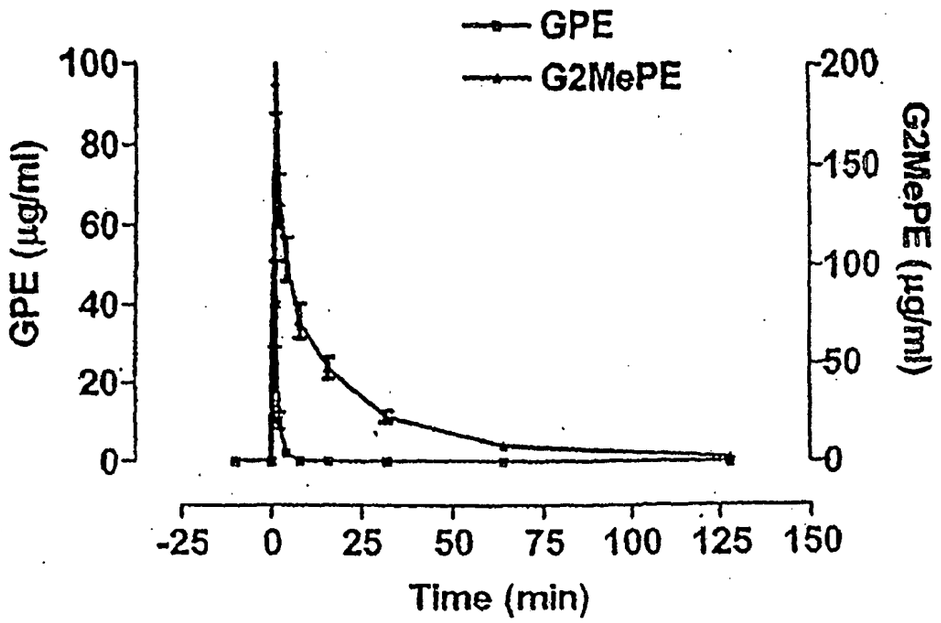

GPE
G2MePE
100
80
60
40
20
0
GPE (µg/ml)
200
150
100
50
0
G2MePE (µg/ml)
-25
0
25
50
75
100
125
150
Time (min)

Figure 21

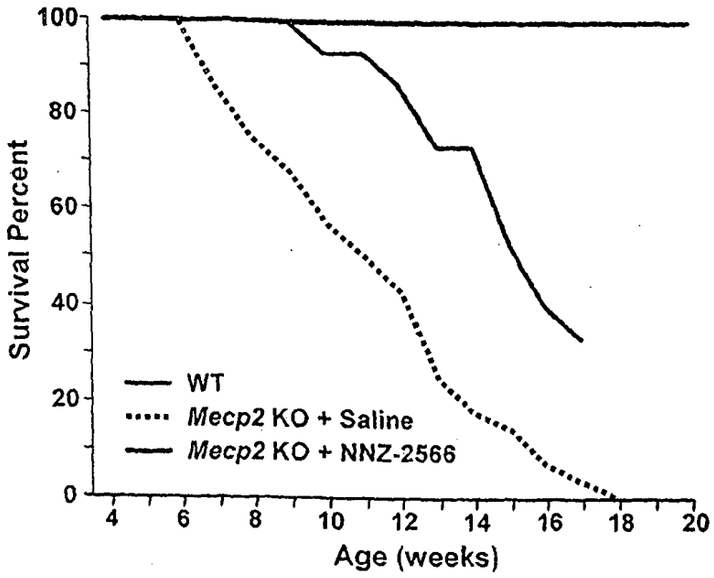

Survival Percent
100
80
60
40
20
0
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Age (weeks)
WT
Mecp2 KO + Saline
Mecp2 KO + NNZ-2566

FIG. 22

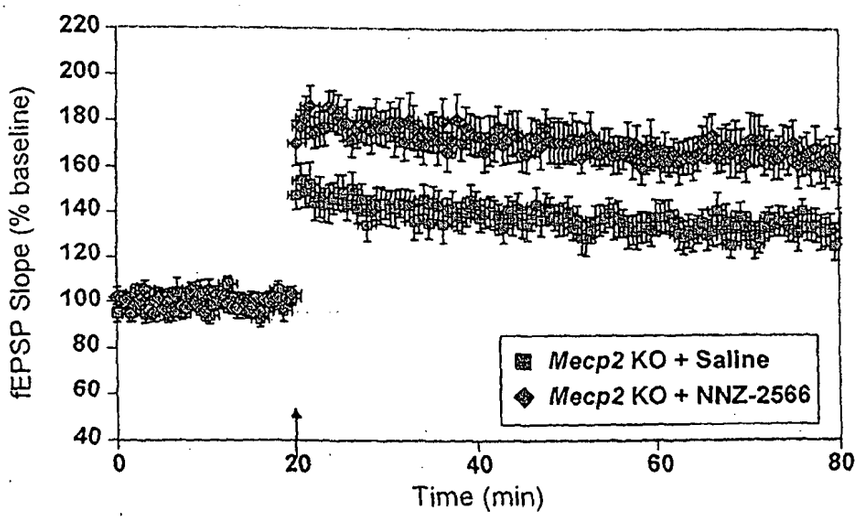

fEPSP Slope (% baseline)
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
0
20
40
60
80
Time (min)
Mecp2 KO + Saline
Mecp2 KO + NNZ-2566

FIG. 23

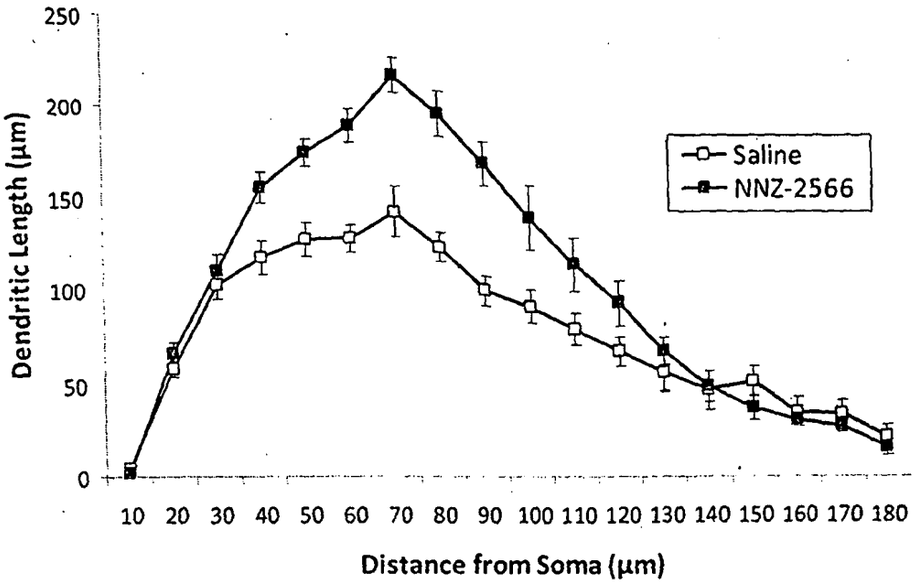

250
200
150
100
50
0
Dendritic Length (µm)
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180
Distance from Soma (µm)
Saline
NNZ-2566

FIG. 24

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
2 August 2012 (02.08.2012)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2012/102832 A1

(51) International Patent Classification:
A01N 43/64 (2006.01) *A61K 31/41* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2012/000047

(22) International Filing Date:
27 January 2012 (27.01.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/462,141 27 January 2011 (27.01.2011) US
61/492,248 1 June 2011 (01.06.2011) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **NEUREN PHARMACEUTICALS LIMITED** [NZ/NZ]; P.O. Box 9923, Newmarket, Auckland, 1149 (NZ).

(72) Inventors; and
(71) Applicants : **GLASS, Larry** [US/US]; 7410 Piney Branch Road, Takoma Park, Maryland 20912 (US). **BICKERDIKE, Michael John** [GB/NZ]; 41 Waimarie Street, St. Heliers, Auckland (NZ). **SNAPE, Michael Frederick** [GB/GB]; 111 Thorkhill Road, Thames Ditton, Surrey KT7 0UW (GB).

(74) Agent: **BORSON, D. Benjamin**; Suite 200, 1078 Carol Lane, Lafayette, California 94549 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

WO 2012/102832 A1

(54) **Title**: TREATMENT OF AUTISM SPECTRUM DISORDERES USING GLYCYL-L-2-METHYLPROLYL-L-GLUTAMIC ACID

(57) **Abstract**: This invention provides compounds, compositions and methods for treating Autism Spectrum Disorders (ASD) using glycyl-2-methylprolyl-glutamic acid (G-2-MePE) and analogs thereof. Autism Spectrum Disorders include Autism, Autistic Disorder, Asperger Syndrome, Childhood Disintegrative Disorder, Pervasive Developmental Disorder - Not Otherwise Specified (PDD-NOS), Fragile X Syndrome, and Rett Syndrome. Compositions containing compounds include water-soluble formulations, water-in-oil micro-emulsions, water-in-oil coarse emulsions, water-in-oil liquid crystals, nanocapsules, tablets, and orally administered gels. The compounds and compositions of this invention can be administered intravenously, intraventricularly, parenterally, or orally, and can be effective in treating neurodegeneration, promoting neurological function, treating seizure activity and other symptoms of ASD, and can prolong life in animals including human beings having Autism Spectrum Disorders.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/00047

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A01N 43/64; A61K 31/41 (2012.01)
USPC - 514/359
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
USPC: 514/359

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC: 514/408; 514/427 (see search terms below)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WEST: PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB
Google: Scholar/Patents: glycol methyl propyl glutamic acid G-2MePE autism spectrum disorder animal control respiratory irregularities diagnosis treatment administration methyl propyl glutamate abc aberrant behavior checklist

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 7,605,177 B2 (GLUCKMAN et al.) 20 October 2009 (20.10.2009) col 1, ln 15-21; col 2, ln 30-50; col 3, ln 1-18; col 7,ln 50-63; col 14, ln 45-67; col 15, ln 1-40, Scheme 1; col 21, Table 1; col 22, ln 25-55; col 28, ln 52-60	1-3, 5-8, 14-15
Y	US 2008/0249082 A1 (HOLLANDER) 09 October 2008 (09.10.2008) para [0021], [0025]-[0026], [0068]	1-3, 5-8, 14-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
01 May 2012 (01.05.2012)	23 MAY 2012
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/00047

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 4, 9-13 and 16-18
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-200227- -00000-0000

Fecha: 2013-08-23 13:29:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 338 342

...IES

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODE ...5/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐