



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 370 210**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01) **A61K 48/00** (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01) **A61P 25/30** (2006.01)

A61P 25/20 (2006.01) **G01N 33/50** (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08701838 .8**

96 Fecha de presentación : **17.01.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2114130**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.11.2009**

54

Título: **Modelo animal para ADHD.**

30

Prioridad: **17.01.2007 GB 0700894**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.12.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.12.2011

73

Titular/es: **Ucl Business Plc**
The Network Building 97 Tottenham Court Road
London, W1T 4Tp, GB

72

Inventor/es: **Stanford, Susan Clare;**
Gurling, Hugh y
Hunt, Steven

74

Agente: **Campello Estebaranz, Reyes**

ES 2 370 210 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Modelo animal para ADHD.

5 La invención se refiere a un modelo animal para el trastorno de hiperactividad con déficit de atención, métodos para producir tales modelos y métodos para utilizar dichos modelos.

10 El trastorno de hiperactividad con déficit de atención (ADHD) afecta aproximadamente al 5% de los niños en el UK y los Estados Unidos. Los síntomas de ADHD incluyen hiperactividad, falta de atención, impulsividad y torpeza. El ADHD es acusadamente heredable y tiene estrecha relación con la dependencia de las drogas, especialmente del alcohol. Estudios previos han llevado a la conclusión de que ADHD está asociado con una transmisión monoaminérgica anormal, especialmente de dopamina y noradrenalina en circuitos cerebrales importantes. El efecto tranquilizador de los psicoestimulantes tales como d-anfetamina (d-AMP) y metilfenidato en individuos con ADHD respalda esta opinión.

15 ADHD no está especialmente bien comprendido y es todavía difícil de diagnosticar. Se han desarrollado varios supuestos modelos animales para ADHD pero ninguno expresa todas sus características fundamentales (Davids, 2003, Brain Res. Reviews 42, 1-21). Sería sumamente ventajoso disponer de un modelo animal para ayudar a investigaciones posteriores acerca de la afección y tratamientos potenciales de la misma.

20 Adicionalmente, sería útil identificar un marcador para una predisposición a ADHD y condiciones afines que pudiera ser utilizado para identificar individuos más propensos a sufrir ADHD y afecciones afines y ayudar a confirmar el diagnóstico de las mismas.

25 Se ha demostrado que los ratones que carecen de los receptores preferentes funcionales de la sustancia P (NK1-/-) exhiben una transmisión noradrenérgica central incrementada y anomalías en su comportamiento cuando se comparan con sus homólogos NK1+/+ (Herpfer, 2005, Neuropharmacology 48, 706-719). Los autores de la invención han encontrado ahora sorprendentemente que estos ratones exhiben también transmisión deteriorada de dopamina y noradrenalina, hiperactividad, imposibilidad y falta de atención, comportamiento paradójico en respuesta a d-AMP y metilfenidato y otros signos de ADHD.

30 Por tanto, de acuerdo con la invención, se proporciona el uso de un roedor NK1-/- como modelo animal para ADHD. Enfermedades afines pueden ser estudiadas también con este modelo: adicción al alcohol, dispraxia, trastorno de conducta, auto-daño o probabilidad de suicidio. Se proporciona también el uso de un roedor que tiene un receptor funcional de la sustancia P al cual se ha administrado un antagonista del receptor de la sustancia P como modelo animal para ADHD. Enfermedades afines pueden ser estudiadas también con este modelo: adicción al alcohol, dispraxia, trastorno de conducta, auto-lesión o probabilidad de suicidio.

35 Los animales NK1-/- son muy conocidos en la técnica. El término animal NK1-/- se utiliza en esta memoria para significar cualquier animal que carece de receptores funcionales de la sustancia P o que tiene un número significativamente reducido de receptores de la sustancia P cuando se compara con un animal de tipo salvaje. El animal puede carecer de los receptores o tener un número reducido de receptores por cualquier razón, tal como la carencia de un gen codificante del receptor NK1, o la posesión de un gen codificante de un receptor no funcional de NK1. El mismo incluye animales existentes naturalmente y animales que han sido criados o alterados para carecer de los receptores. Un experto en la técnica podría producir tales animales.

40 Un procedimiento para la ruptura direccionada del gen del receptor NK1 se describe en de Felipe *et al.*, (1998) y estaba basado en el descrito en Nehls *et al.* (1996). Resumidamente, la recombinación homóloga en células madre embrionarias puede utilizarse para crear una línea de ratones en la cual el gen del receptor NK1 está roto en el exón 1. Para la ruptura, los inventores utilizaron una cásete que contiene la región codificante de β -galactosidasa precedida por una secuencia de entrada ribosómica interna (IRES), seguida por la región codificante de neomicina.

45 Puede utilizarse cualquier otro método de ruptura del gen del receptor NK1 o reducción de la expresión del producto del gen NK1. Tales métodos incluyen ácidos nucleicos antisentido, métodos de triple hélice y cualesquiera otros métodos bien conocidos.

50 Aunque en la técnica anterior se ha demostrado que los animales NK1-/- exhiben ciertas características asociadas con ADHD, no se ha demostrado con anterioridad que tales ratones puedan exhibir todas las características fundamentales, ni se han considerado dichos animales como modelos para ADHD u otras afecciones. (Herpfer, 2005).

55 Como se ha indicado arriba, ADHD es trastorno de hiperactividad con déficit de atención. En la definición de ADHD utilizada en esta memoria se incluye ADD, trastorno de déficit de atención. ADHD es un trastorno común del desarrollo y del comportamiento, observado en los niños, pero que puede persistir en la edad adulta. Se caracteriza por concentración deficiente, tendencia a la distracción, hiperactividad, e impulsividad que son inadecuadas para la edad infantil. Los niños y adultos con ADHD se distraen fácilmente por las imágenes y sonidos en su entorno, no pueden concentrarse durante largos periodos de tiempo, son inquietos e impulsivos, o tienen tendencia a soñar despiertos y son lentos en completar las tareas. Las características fundamentales de ADHD se describen en la Tabla 1. En el modelo animal de la invención, el roedor muestra actividad locomotora reducida en respuesta a metilfenidato o d-anfetamina.

ES 2 370 210 T3

Hasta ahora no se ha demostrado que las características de los animales NK1-/- puedan reproducirse en animales que son de tipo salvaje para el gen NK1 (NK1+/+) o que exhiben una función normal del receptor de la sustancia P por administración de un antagonista para el receptor de la sustancia P. Los antagonistas para el receptor de la sustancia P incluyen, pero sin carácter limitante, CGP 49823, CP 122721, CP 99994, CP 96345, FK 224, FK 888, GR 597599, GR 82334, GR 203040, GR 205171, GR 679769, GW 823296, GW 597599, L303870, L703606, L733060, L 668169, L 732138, L 754030/MK869, L 760735, LY 686017, MDL 103392, MK 869/L 754030, MPC 4505, NKP 608, R 116301, RP 67580, RPR 100893, SD2 NKT 343, SR 140333, Netupitant, y Befetupitant. Todos los antagonistas anteriores son bien conocidos en la técnica y están disponibles en el comercio o pueden ser sintetizados por un experto en la técnica.

El receptor de la sustancia P, llamado también receptor 1 de taquiquinina (TACR1) o receptor NK1 es bien conocido en la técnica; sin embargo, su papel en la transmisión de las monoaminas no está totalmente comprendido. Los inventores creen que el receptor de la sustancia P está deteriorado en los individuos con ADHD, explicando los cambios exhibidos en la transmisión de las monoaminas en los individuos ADHD.

El animal es un roedor, especialmente una rata, jerbo, cobayo o ratón. El animal es muy preferiblemente un ratón.

Un modelo animal, como se conoce en la técnica, es un animal no humano que tiene o exhibe las características de una enfermedad o afección. El uso como modelo animal significa cualquier uso de un animal para estudiar la enfermedad o afección, tal como el uso para estudiar la progresión o el desarrollo o la respuesta a tratamientos nuevos o existentes.

El alcoholismo o adicción al alcohol, como se utiliza en esta memoria, significa una dependencia del alcohol, caracterizada por uso repetido excesivo de bebidas alcohólicas y el desarrollo de síntomas de abstinencia cuando se reduce o se interrumpe la toma de alcohol.

El trastorno de conducta es un tipo de trastorno disruptivo del comportamiento observado generalmente en la infancia y adolescencia, que implica un patrón persistente de comportamiento en el cual se violan los derechos de los otros o las normas o reglas de la sociedad con mala conducta que incluye agresión a las personas o los animales, destrucción de las propiedades, falsedad o robo, y violaciones graves de las reglas.

La dispraxia se considera como un deterioro o inmadurez de la organización del movimiento, con inclusión de problemas de lenguaje, percepción y pensamiento. Otros nombres para la dispraxia incluyen Síndrome de Niño Torpe, Trastorno de Coordinación del Desarrollo, Disfunción Cerebral Mínima, Dificultad de Aprendizaje Motor, y Disfunción Perceptuo-motora.

El auto-daño o auto-lesión tienen lugar cuando alguien se daña o lesiona deliberadamente a sí mismo. Esto puede presentar varias formas que incluyen, pero sin carácter limitante, cortes, ingestión de sobredosis de tabletas o medicamentos, arañazos, automutilación o desgarros en la propia piel, causándose llagas y cicatrices, o por quemadura e inhalación o esnifado de sustancias nocivas.

La probabilidad de suicidio significa ideas o comportamiento suicida e incluye la consideración o el intento de acciones autodestructivas.

Se ha predicho también, aunque no se ha descrito en detalle, el uso de una célula, tejido u órgano de un animal NK1-/- o una célula NK1-/- o un tejido u órgano constituido por tales células en un modelo celular para ADHD. Tales modelos celulares incluyen cualquier muestra que contenga células o material genético, tal como sangre, orina, cerebro y fluido cerebroespinal.

La descripción proporciona también para propósitos de referencia un animal transgénico que tiene una expresión alterada del gen NK1. Pueden utilizarse animales de cualquier especie, que incluyen, pero sin carácter limitante, ratones, ratas, conejos, cobayos, cerdos, lechones, cabras, ovejas, y primates no humanos, v.g. babuinos, monos, y chimpancés para generar animales transgénicos en el gen NK1. Tales animales pueden expresar una secuencia del gen NK1 de una especie diferente (v.g., ratones que expresan secuencias del gen NK1 humano), o pueden haber sido modificados genéticamente para sobreexpresar secuencias endógenas del gen NK1.

Puede utilizarse cualquier método conocido en la técnica para introducir un transgén del gen NK1 en animales a fin de producir las líneas básicas de los animales transgénicos. Tales técnicas incluyen, pero sin carácter limitante, microinyección pronuclear (Hoppe y Wagner, 1989, U.S. Pat. No. 4.873.191); transferencia génica mediada por retrovirus en las líneas germinales (Van der Putten, *et al.*, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci, USA 82, 6148-6152); direccionamiento de genes en células madre embrionarias (Thompson, *et al.*, 1989, Cell 56, 313-321); electroporación de embriones (Lo, 1983, Mol. Cell. Biol. 3,1803-1814); y transferencia de genes mediada por semen (Lavitrano *et al.*, 1989, Cell 57, 717-723). (Para una revisión de dichas técnicas, véase Gordon, 1989, Transgenic Animals, Intl. Rev Cytol. 115; 171-229).

Cualquier método conocido en la técnica puede utilizarse para producir clones de animales transgénicos que contienen un transgén del gen NK1; por ejemplo, la transferencia nuclear en oocitos enucleados de núcleos de células cultivadas embrionarias, fetales o adultas inducidas a quietud (Campbell *et al.*, 1996, Nature 380, 64-66; Wilmut, *et al.*, Nature 385, 810-813).

ES 2 370 210 T3

En este contexto, la presente descripción proporciona animales transgénicos que llevan un transgén del gen NK1 en todas sus células, así como animales que llevan el transgén en algunas, pero no todas sus células, es decir, animales mosaico. El transgén puede estar integrado como un transgén simple o en concatámeros, v.g., tándems cabeza-con-cabeza o tándems cabeza-con-cola. El transgén puede introducirse también selectivamente en y activarse en un tipo particular de célula siguiendo, por ejemplo, la doctrina de Lasko *et al.* (Lasko, *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6232-6236). Las secuencias reguladoras requeridas para dicha activación específica del tipo de célula dependerán del tipo particular de célula de interés, y serán evidentes para los expertos en la técnica. Cuando se desea que el transgén del gen NK1 esté integrado en el sitio cromosómico del gen NK1 endógeno, se prefiere direccionamiento de genes. Resumidamente, cuando debe utilizarse dicha técnica, se diseñan vectores que contengan ciertas secuencias de nucleótidos homólogas al gen NK1 endógeno para el propósito de integración, por recombinación homóloga con secuencias cromosómicas en y ruptura de la función de la secuencia de nucleótidos del gen NK1 endógeno. El transgén puede introducirse también selectivamente en un tipo de célula particular, desactivando así el gen NK1 endógeno solamente en dicho tipo de célula, siguiendo, por ejemplo, la doctrina de Gu, *et al.*, (Gu, *et al.*, 1994, Science 265, 103-106). Las secuencias reguladoras requeridas para dicha desactivación específica del tipo de célula dependerán del tipo particular de célula de interés, y serán evidentes para los expertos en la técnica.

Una vez que se han generado los animales transgénicos, puede ensayarse la expresión del gen NK1 recombinante utilizando técnicas estándar. El escrutinio inicial puede realizarse por análisis de transferencias Southern o técnicas PCR para analizar tejidos animales a fin de ensayar si ha tenido lugar la integración del transgén. El nivel de expresión de mRNA del transgén en los tejidos de los animales transgénicos puede evaluarse también utilizando técnicas que incluyen, pero sin carácter limitante, análisis de transferencias Northern de muestras de tejido obtenidas del animal, análisis por hibridación *in situ*, y RT-PCR (PCR de transcriptasa inversa). Muestras del tejido que expresa el gen NK1 pueden evaluarse también inmunocitoquímicamente utilizando anticuerpos específicos para el producto transgénico del gen NK1.

La invención proporciona también un método para identificar un compuesto que afecta al ADHD y posiblemente a las enfermedades afines alcoholismo, dispraxia, trastorno de conducta, auto-daño o auto-lesión deliberados o probabilidad de suicidio, que comprende administrar un compuesto de test a un animal NK1-/- o un animal tratado con un antagonista para el receptor de la sustancia P, y determinar los efectos sobre el comportamiento del animal.

El método de la invención tiene por objeto preferiblemente identificar un compuesto que reduce los síntomas o signos de tales condiciones.

Un compuesto que reduce tales síntomas o signos conducirá a un cambio en la actividad locomotora del roedor en respuesta a metilfenidato o d-anfetamina. Asimismo, el compuesto puede tener preferiblemente al menos uno de los efectos siguientes sobre el modelo de roedor reducción de la actividad locomotora, especialmente en un ambiente estresante (v.g. nuevo aversivo) tal como una caja de exploración luz/oscuridad o campo abierto; latencia incrementada a regresar a una nueva arena desde una zona familiar; visitas más o menos frecuentes a una nueva área; coordinación motora y/o aprendizaje mejorados; impulsividad reducida y aumento ulterior de la actividad locomotora en respuesta a d-AMP.

Un método alternativo al de la invención podría comprender la administración de un compuesto de test a un animal NK1-/- o un animal tratado con un antagonista del receptor de la sustancia P y determinar cambios en la función de neurotransmisores tales como una reducción en la liberación de noradrenalina en el córtex frontal o un aumento en la dopamina extracelular en el córtex frontal. La monitorización del comportamiento exhibirá también cambios y podría utilizarse en el escrutinio.

Asimismo, el método puede utilizarse para testar los efectos secundarios de un compuesto que afecta a ADHD, alcoholismo, dispraxia, trastorno de conducta, auto-daño o auto-lesión deliberados o probabilidad de suicidio. Por ejemplo, las terapias que activan los receptores NK1 podrían causar náusea. Esto puede testarse utilizando el test de Evitación Condicionada de Gustos, en el cual un compuesto de test se saboriza o se combina con una sustancia saborizada inactiva. Si el compuesto de test causa náusea, el animal evitará dicho sabor en el futuro.

Con respecto a la intervención, cualesquiera tratamientos que inviertan cualquier aspecto de los síntomas de un trastorno del gen NK1 podrían considerarse como candidatos para la intervención terapéutica humana en dicho trastorno. Las dosificaciones de los agentes de test pueden determinarse, por ejemplo, por obtención de curvas dosis-respuesta.

Se describe también para propósitos de referencia una proteína aislada codificada por la secuencia de un gen NK1 que contenga al menos un polimorfismo o que codifique un receptor no funcional de NK1.

Se describe también para propósitos de referencia una molécula de RMA aislada que es complementaria a la secuencia de DNA de un gen NK1 que contiene al menos un polimorfismo o que codifica un receptor no funcional de NK1.

Proteínas y moléculas de RNA aisladas como se han mencionado arriba se conocen en esta memoria como productos génicos.

ES 2 370 210 T3

Se describen adicionalmente anticuerpos que se fijan a la proteína o molécula de RNA aislada. Se prefiere que los anticuerpos no se fijan a la proteína NK1 de tipo salvaje, o a un RNA que es complementario al gen NK1 de tipo salvaje. Debe entenderse que el término anticuerpo hace referencia a un anticuerpo entero o un fragmento funcional del mismo, es decir cualquier parte de un anticuerpo que sea capaz de fijarse a la proteína. Tales anticuerpos pueden incluir, pero sin carácter limitante, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAbs), anticuerpos humanizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id), y fragmentos de fijación de epítope de cualquiera de los anteriores.

Tales anticuerpos pueden ser útiles en la diagnosis o el tratamiento de ADHD, alcoholismo, dispraxia, trastorno de conducta, auto-daño o auto-lesión deliberados o probabilidad de suicidio. Tales anticuerpos pueden utilizarse, por ejemplo, en la detección de un producto del gen NK1 en una muestra biológica y pueden utilizarse, por consiguiente, como parte de una técnica de diagnóstico o pronóstico por la cual pueden testarse los pacientes respecto a la presencia de formas anormales de productos del gen NK1. Tales anticuerpos pueden utilizarse también en conjunción, por ejemplo, con esquemas de escrutinio de compuestos para la evaluación del efecto de los compuestos de test sobre los niveles y/o la actividad del producto del gen NK1.

Se anticipan también, pero no se describen en todos sus detalles, métodos de identificación de compuestos candidato para uso en el tratamiento de ADHD, adicción al alcohol, dispraxia, trastorno de conducta, auto-lesión o probabilidad de suicidio que comprenden la identificación de compuestos que se fijan a un producto del gen NK1, proteínas o porciones de proteínas intracelulares que interaccionan con un producto del gen NK1, compuestos que interfieren con la interacción de un producto del gen NK1 con proteínas intracelulares y compuestos que modulan la actividad del gen NK1 (es decir, que modulan el nivel de expresión del gen NK1 y/o modulan el nivel de actividad del producto del gen NK1). Adicionalmente, pueden utilizarse ensayos que identifican compuestos que se fijan a secuencias reguladoras del gen NK1 (v.g., secuencias promotoras; véase v.g., Platt, 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 28558-28562), y que pueden modular el nivel de expresión del gen NK1. Adicionalmente, una vez identificado, puede testarse el efecto de un compuesto sobre una cualquiera o más de las afecciones, por administración del compuesto a un individuo que presenta una afección o a un modelo animal y observación de los efectos sobre la afección. Los compuestos pueden incluir, pero sin carácter limitante, moléculas orgánicas pequeñas, tales como aquéllas que pueden atravesar la barrera hematoencefálica, que consiguen entrar en una célula apropiada y que afectan a la expresión del gen NK1 o cualquier otro gen implicado en un camino regulador de NK1, o proteínas intracelulares.

Los compuestos pueden incluir, pero sin carácter limitante, péptidos tales como, por ejemplo, péptidos solubles, con inclusión pero sin imitación de péptidos de fusión con colas Ig, y miembros de bibliotecas de péptidos aleatorios; (véase, v.g. Lam, *et al.*, 1991, *Nature* 354, 82-84; Houghten, *et al.*, 1991, *Nature* 354, 84-86), y bibliotecas moleculares derivadas por química combinatoria constituidas por aminoácidos de configuración D y/o L, fosfopéptidos (con inclusión, pero sin carácter limitante, de miembros de bibliotecas aleatorias o parcialmente degeneradas de fosfopéptidos direccionados; véase v.g. Songyang, *et al.*, 1993, *Cell* 72, 767-778), anticuerpos (con inclusión, pero sin carácter limitante, de anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, anti-idiotípicos, quiméricos o monocatenarios, y fragmentos de bibliotecas de expresión Fab, F(ab')₂ y Fab, y fragmentos de fijación de epítope de los mismos), y moléculas pequeñas orgánicas o inorgánicas. Tales compuestos pueden comprender adicionalmente compuestos, en particular fármacos o miembros de clases o familias de fármacos, que se sabe mejoran o exacerban los síntomas de un trastorno neuropsiquiátrico tal como trastorno de conducta, trastorno de personalidad antisocial, trastorno de hiperactividad con déficit de atención y alcoholismo. Tales compuestos incluyen anfetamina, metilfenidato, d-anfetamina, modafanil, y otros estimulantes, guanfacina y antidepresivos, tales como fluoxetina e imipramina, y atomoxetina.

Los compuestos identificados por ensayos tales como los descritos en esta memoria pueden ser útiles, por ejemplo, en la elaboración de la función biológica del producto del gen NK1, y para mejorar trastornos del gen NK1 o trastornos neuropsiquiátricos, tales como trastorno de conducta, trastorno de hiperactividad con déficit de atención y alcoholismo. Ensayos para testar la eficacia de los compuestos se exponen más adelante.

El principio de los ensayos utilizados para identificar compuestos que se fijan al producto del gen NK1 implica preparar una mezcla de reacción del producto del gen NK1 y el compuesto de test en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que los dos componentes interaccionen y se liguen, formando así un complejo que puede ser eliminado y/o detectado en la mezcla de reacción. Estos ensayos pueden conducirse de diversas maneras. Por ejemplo, un método para conducir un ensayo de este tipo podría implicar el anclaje del producto del gen NK1 o la sustancia de test a una fase sólida y detectar los complejos producto del gen NK1/compuesto de test anclados a la fase sólida al final de la reacción. En una realización de un método de este tipo, el producto del gen NK1 puede anclarse a una superficie sólida, y el compuesto de test, que no está anclado, puede marcarse, directa o indirectamente.

En la práctica, pueden utilizarse convenientemente como fase sólida placas de microtitulación. El componente anclado puede inmovilizarse por uniones no covalentes o covalentes. La unión no covalente puede realizarse por simple recubrimiento de la superficie sólida con una solución de la proteína y secado. Alternativamente, puede utilizarse un anticuerpo inmovilizado, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, específico para la proteína a inmovilizar para anclar la proteína a la superficie sólida. Las superficies pueden prepararse con anterioridad y guardarse.

Con objeto de realizar el ensayo, el componente no inmovilizado se añade a la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Una vez completada la reacción, se separan los componentes que no han reaccionado (v.g.,

ES 2 370 210 T3

por lavado) en condiciones tales que cualesquiera complejos formados se mantendrán inmovilizados en la superficie sólida. La detección de los complejos anclados a la superficie sólida puede realizarse de diversas maneras. En el caso en que el componente no inmovilizado previamente está premarcado, la detección del marcador inmovilizado en la superficie indica que se han formado los complejos. En el caso en que el componente no inmovilizado previamente no está premarcado, puede utilizarse un marcador indirecto para detectar los complejos anclados a la superficie; v.g. utilizando un anticuerpo marcado específico para el componente no inmovilizado previamente (a su vez, el anticuerpo, puede marcarse directamente o marcarse indirectamente con un anticuerpo marcado anti-Ig).

Alternativamente, puede realizarse una reacción en fase líquida, separarse los productos de reacción de los componentes que no han reaccionado, y detectarse los complejos; v.g. utilizando un anticuerpo inmovilizado específico para el producto del gen NK1 o el compuesto de test a fin de anclar cualesquiera complejos formados en solución, y un anticuerpo marcado específico para otro componente del posible complejo a fin de detectar los complejos anclados.

Cualquier método adecuado para la detección de interacciones proteína-proteína puede emplearse para identificar las interacciones proteína del gen NK1-proteína.

Entre los métodos tradicionales que pueden emplearse se encuentran co-inmunoprecipitación, reticulación y copurificación por gradientes o columnas cromatográficas. La utilización de procedimientos tales como estos permite la identificación de proteínas, con inclusión de proteínas intracelulares, que interaccionan con los productos del gen NK1. Una vez aislada, una proteína de este tipo puede identificarse y puede utilizarse, en conjunción con técnicas estándar, para identificar proteínas con las que interacciona la misma. Por ejemplo, al menos una porción de la secuencia de aminoácidos de una proteína que interacciona con el producto del gen NK1 puede averiguarse utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo por la técnica de la degradación de Edman (véase, v.g. Creighton, 1983, "Proteins: Structures and Molecular Principles", W. H. Freeman & Co., N. Y., pp 34-49). La secuencia de aminoácidos obtenida puede utilizarse como guía para la generación de mezclas de oligonucleótidos que se pueden utilizar para escrutar secuencias génicas que codifican dichas proteínas. La escrutinio puede realizarse, por ejemplo, por hibridación estándar o técnicas PCR. Las técnicas para la generación de mezclas de oligonucleótidos y el escrutinio son bien conocidas. (Véase, v.g., Ausubel, *supra*, y 1990, "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Innis, *et al.*, eds. Academic Press, Inc., Nueva York).

Adicionalmente, pueden emplearse métodos que dan como resultado la identificación simultánea de genes que codifican una proteína que interacciona con una proteína del gen NK1. Estos métodos incluyen, por ejemplo, sondar bibliotecas de expresión con proteína del gen NK1 marcada, utilizando proteína del gen NK1 de una manera similar a la técnica bien conocida de sondar anticuerpos de bibliotecas lambda.gt10 y lambda.gt10.

Un método que detecta interacciones de proteínas *in vivo*, el sistema de dos híbridos, se describe en detalle únicamente para ilustración y no como limitación. Una versión de este sistema ha sido descrita (Chien, *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 9578-9582) y está disponible comercialmente de Clontech (Palo Alto, Calif.).

Resumidamente, utilizando un sistema de este tipo, se construyen plásmidos que codifican dos proteínas híbridas: una está constituida por el dominio de fijación de DNA de una proteína activadora de la transcripción fusionada al producto del gen NK1 y la otra está constituida por el dominio de activación de la proteína activadora de la transcripción fusionado a una proteína desconocida que es codificada por un cDNA que ha sido recombinado en este plásmido como parte de una biblioteca de cDNA. El plásmido de fusión del dominio de fijación de DNA y la biblioteca de cDNA se transforman en una cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que contiene un gen informador (v.g., HBS o lacZ) cuya región reguladora contiene el sitio de fijación del activador de la transcripción. Cualquier proteína híbrida sola no puede activar la transcripción del gen informador el híbrido DNA-dominio de fijación no puede porque no proporciona función de activación y el híbrido del dominio de activación no puede porque no se puede localizar en los sitios de fijación del activador. La interacción de las dos proteínas híbridas reconstituye la proteína activadora funcional y da como resultado la expresión del gen informador, que es detectado por un ensayo para el producto del gen informador.

El sistema de dos híbridos o una metodología afín pueden utilizarse para escrutar bibliotecas de dominios de activación para proteínas que interaccionan con el producto del gen "cebo". A modo de ejemplo, y no como limitación, los productos del gen NK1 se pueden utilizar como el producto del gen cebo. Secuencias genómicas totales o secuencias de cDNA se fusionan al DNA que codifica un dominio de activación. Esta biblioteca y un plásmido que codifica un híbrido de un producto del gen NK1 cebo fusionado al dominio de fijación de DNA se co-transforman en una cepa informadora de levadura, y los transformantes que resultan se escrutan respecto a aquéllos que expresan el gen informador. Por ejemplo, y sin carácter de limitación, una secuencia del gen NK1 cebo, tal como el marco de lectura abierto del gen NK1, puede clonarse a un vector de tal modo que la misma se fusione por traducción al DNA codificante del dominio de fijación de DNA de la proteína GAL4. Estas colonias se purifican y los plásmidos de la biblioteca responsables de la expresión del gen informador se aíslan. Se utiliza luego la secuenciación del DNA para identificar las proteínas codificadas por los plásmidos de la biblioteca.

Una biblioteca de cDNA de la línea de células a partir de la cual deben detectarse las proteínas que interaccionan con el producto del gen NK1 cebo puede construirse utilizando métodos practicados rutinariamente en la técnica. De acuerdo con el sistema particular descrito en esta memoria, por ejemplo, los fragmentos de cDNA pueden insertarse en un vector de tal modo que los mismos se fusionan por traducción al dominio de activación transcripcional de GAL4.

ES 2 370 210 T3

Esta biblioteca puede co-transformarse junto con el plásmido de fusión gen NK1 cebo-GAL4 en una cepa de levadura que contiene un gen lacZ dirigido por un promotor que contiene la secuencia de activación de GAL4. Una proteína codificada por cDNA, fusionada al dominio de activación transcripcional de GAL4, que interacciona con el producto del gen NK1 cebo reconstituirá una proteína GAL4 activa y por consiguiente dirigirá la expresión del gen HIS3. Las colonias que expresan HIS3 pueden detectarse por su crecimiento en cápsulas Petri de medios semisólidos basados en agar deficientes en histidina. El cDNA puede purificarse luego de estas cepas, y utilizarse para producir y aislar la proteína de interacción con el gen NK1 cebo utilizando métodos practicados rutinariamente en la técnica.

Los productos del gel NK1 de la invención pueden interactuar *in vivo* con una o más macromoléculas, con inclusión de macromoléculas intracelulares, tales como proteínas. Dichas macromoléculas pueden incluir, pero sin carácter limitante, moléculas de ácido nucleico y aquellas proteínas identificadas por métodos conocidos en la técnica. Para los propósitos de esta exposición, se hace referencia en esta memoria a las macromoléculas como "parejas de fijación". Los compuestos que causan la ruptura de la fijación del gen NK1 de este modo pueden ser útiles en la regulación de la actividad del producto del gen NK1, especialmente productos del gen NK1 mutantes.

El principio básico de los sistemas de ensayo utilizados para identificar compuestos que interfieren con la interacción entre el producto del gen NK1 y su pareja o parejas de fijación implica preparar una mezcla de reacción que contenga el producto del gen NK1 y la pareja de fijación en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que ambos interactúen y se unan, formando así un complejo. Con objeto de testar un compuesto respecto a actividad inhibitoria, la mezcla de reacción se prepara en presencia y ausencia del compuesto de test. El compuesto de test puede incluirse inicialmente en la mezcla de reacción, o puede añadirse en un momento posterior a la adición del producto del gen NK1 y su pareja de fijación. Las mezclas de reacción de control se incuban sin el compuesto de test o con un placebo. La formación de cualesquiera complejos entre la proteína del gen NK1 y la pareja de fijación se detecta posteriormente. La formación de un complejo en la reacción de control, pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de test, indica que el compuesto interfiere con la interacción de la proteína del gen NK1 y la pareja de fijación interactiva. Adicionalmente, la formación de complejos en mezclas de reacción que contienen el compuesto de test y la proteína del gen NK1 normal puede compararse también a la formación de complejos en mezclas de reacción que contienen el compuesto de test y una proteína del gen NK1 mutante. Esta comparación puede ser importante en aquellos casos en los cuales es deseable identificar compuestos que causan la ruptura de las interacciones de las proteínas del gen NK1 mutante pero no de las proteínas del gen NK1 normal.

El ensayo para compuestos que interfieren con la interacción de los productos de gen NK1 y las parejas de fijación puede conducirse en un formato heterogéneo u homogéneo. Ensayos heterogéneos implican anclaje del producto del gen NK1 o la pareja de fijación en una fase sólida y detección de los complejos anclados en la fase sólida al final de la reacción. En los ensayos homogéneos, la reacción entera se lleva a cabo en una fase líquida. En cualquier enfoque, el orden de adición de las sustancias reaccionantes puede modificarse para obtener información diferente acerca de los compuestos que se testan. Por ejemplo, compuestos de test que interfieren con la interacción entre los productos del gen NK1 y las parejas de fijación, v.g., por competición, pueden identificarse realizando la reacción en presencia de la sustancia de test; es decir, por adición de la sustancia de test a la mezcla de reacción antes de o simultáneamente con la proteína del gen NK1 y la pareja de fijación intracelular interactiva. Alternativamente, pueden testarse compuestos de test que causan la ruptura de los complejos preformados, v.g., compuestos con constantes de fijación más altas que desplazan uno de los componentes del complejo, por adición del compuesto de test a la mezcla de reacción después que se han formado los complejos. Los diversos formatos se describen resumidamente más adelante.

En un sistema de ensayo heterogéneo, el producto del gen NK1 o la pareja de fijación interactiva, se ancla en una fase sólida, mientras que la especie no anclada se marca directa o indirectamente. En la práctica, se utilizan convenientemente placas de microtitulación. La especie anclada puede inmovilizarse por enlaces no covalentes o covalentes. La unión no covalente puede realizarse simplemente recubriendo la superficie sólida con una solución del producto del gen NK1 o pareja de fijación y secado. Alternativamente, un anticuerpo inmovilizado específico para la especie a anclar puede utilizarse para anclar la especie a la superficie sólida. Las superficies pueden prepararse con anterioridad y guardarse.

Para realizar el ensayo, la pareja de la especie inmovilizada se expone a la superficie recubierta con o sin el compuesto de test. Una vez completada la reacción, los componentes que no han reaccionado se separan (vg., por lavado) y cualesquiera complejos formados se mantendrán inmovilizados en la superficie sólida. La detección de los complejos anclados en la superficie sólida puede realizarse de diversas maneras. En el caso en que la especie no inmovilizada está pre-marcada, la detección del marcador inmovilizado en la superficie indica que se han formado complejos. En el caso en que la especie no inmovilizada no está pre-marcada, puede utilizarse un marcador indirecto para detectar los complejos anclados en la superficie; v.g., utilizando un anticuerpo marcado específico para la especie no inmovilizada inicialmente (a su vez, el anticuerpo puede estar marcado directa o indirectamente con un anticuerpo marcado anti-Ig). Dependiendo del orden de adición de los componentes de la reacción, pueden detectarse los compuestos de test que inhiben la formación del complejo o que rompen los complejos preformados.

Alternativamente, la reacción puede conducirse en una fase líquida en presencia o ausencia del compuesto de test, los productos de reacción pueden separarse de los componentes que no han reaccionado, y detectarse los complejos; v.g., utilizando un anticuerpo inmovilizado específico para uno de los componentes de fijación a fin de anclar cualesquiera complejos formados en solución, y un anticuerpo marcado específico para la otra pareja a fin de detectar los complejos anclados. De nuevo, dependiendo del orden de adición de las sustancias reaccionantes a la fase líquida

da, pueden identificarse los compuestos de test que inhiben la formación de complejos o que rompen los complejos preformados.

5 En una realización alternativa de la invención, puede utilizarse un ensayo homogéneo. En este enfoque, se prepara un complejo preformado de la proteína del gen NK1 y la pareja de fijación interactiva en el cual el producto del gen NK1 o sus parejas de fijación están marcados, pero la señal generada por el marcador se atenúa debido a la formación de complejo (véase, v.g., U.S. Pat. No. 4.109.496 por Rubenstein que utiliza este enfoque para inmunoensayos). La adición de una sustancia de test que compite con y desplaza una de las especies del complejo preformado dará como resultado la generación de una señal superior al ruido de fondo. De este modo, pueden identificarse las sustancias de test que rompen la interacción proteína de gen NK1/pareja de fijación.

10 El producto del gen NK1 se puede preparar para inmovilización utilizando técnicas estándar de DNA recombinante. Por ejemplo, la región codificante del gen NK1 puede fusionarse a un gen de glutatión-S-transferasa (GST) utilizando un vector de fusión, tal como pGEX-5X-1, de tal modo que su actividad de fijación se mantiene en la proteína de fusión resultante. La pareja de fijación interactiva puede purificarse y utilizarse para producir un anticuerpo monoclonal, utilizando métodos practicados rutinariamente en la técnica.

15 Este anticuerpo puede marcarse con el isótopo radiactivo 125I, por ejemplo, por métodos practicados rutinariamente en la técnica. En un ensayo heterogéneo, v.g., la proteína de fusión GST-gen NK1 puede anclarse a cuentas de glutatión-agarosa. La pareja de fijación interactiva puede añadirse luego en presencia o ausencia de la proteína de test de una manera que permite que tengan lugar la interacción y la fijación. Al final del periodo de reacción, el material no fijado puede eliminarse por lavado, y el anticuerpo monoclonal marcado puede añadirse al sistema y permitir que se fije a los componentes complejados. La interacción entre la proteína del gen NK1 y la pareja de fijación interactiva puede detectarse por medida de la cantidad de radiactividad que se mantiene asociada con las cuentas de glutatión-agarosa. Una inhibición con éxito de la interacción por el compuesto de test dará como resultado una disminución en la radiactividad medida.

20 Alternativamente, la proteína de fusión GST-gen NK1 y la pareja de fijación interactiva pueden mezclarse una con otra en fase líquida en ausencia de las cuentas sólidas de glutatión-agarosa. El compuesto de test puede añadirse durante o después que se dejan interaccionar ambas especies. Esta mezcla puede añadirse luego a las cuentas de glutatión-agarosa y el material no fijado se elimina por lavado. Una vez más, la extensión de la inhibición de la interacción producto de gen NK1/pareja de fijación puede detectarse por adición del anticuerpo marcado y medida de la radiactividad asociada con las cuentas.

25 Estas mismas técnicas pueden emplearse utilizando fragmentos de péptidos que corresponden a los dominios de fijación de la proteína del gen NK1 y/o la pareja interactiva o de fijación (en los casos en que la pareja de fijación es una proteína), en lugar de una o las dos proteínas de longitud total. Cualquier número de métodos practicados rutinariamente en la técnica pueden utilizarse para identificar y aislar los sitios de fijación. Estos métodos incluyen, pero sin carácter limitante, mutagénesis del gen que codifica una de las proteínas y escrutinio de la ruptura de la fijación en un ensayo de co-inmunoprecipitación. Después de ello pueden seleccionarse mutaciones compensadoras en el gen codificante de la segunda especie en el complejo. El análisis de la secuencia de los genes que codifican las proteínas respectivas revelará las mutaciones que corresponden a la región de la proteína implicada en la fijación interactiva. Alternativamente, una proteína puede anclarse a una superficie sólida utilizando los métodos arriba descritos, y dejar que interaccione con y se fije a su pareja de fijación marcada, que se ha tratado con una enzima proteolítica, tal como tripsina. Después del lavado, un péptido corto marcado que comprende el dominio de fijación puede mantenerse asociado con el material sólido, el cual puede aislarse e identificarse por secuenciación de aminoácidos. Asimismo, en algunos casos el gen codificante de los segmentos puede manipularse por ingeniería genética para expresar fragmentos peptídicos de la proteína, los cuales pueden testarse luego respecto a actividad de fijación y purificarse o sintetizarse.

30 Por ejemplo, y sin carácter de limitación, un producto del gen NK1 puede anclarse a un material sólido por construcción de una proteína de fusión GST-gen NK1 y permisión de que la misma se fije a cuentas de glutatión-agarosa. La pareja de fijación interactiva obtenida puede marcarse con un isótopo radiactivo, tal como 35S, y escindirse con una enzima proteolítica tal como tripsina. Los productos de escisión pueden añadirse luego a la proteína de fusión GST-gen NK1 anclada y dejarse fijar. Después de eliminación por lavado de los péptidos no fijados, el material fijado marcado, que representa el dominio de fijación de la pareja de fijación, puede eluirse, purificarse y analizarse respecto a secuencia de aminoácidos por métodos bien conocidos. Los péptidos así identificados pueden producirse sintéticamente o fusionarse a proteínas facilitadoras apropiadas utilizando tecnología de DNA recombinante.

35 Los compuestos, que incluyen pero sin carácter limitante compuestos de fijación identificados por técnicas de ensayo tales como las descritas pueden testarse respecto a la capacidad para mejorar los síntomas de un trastorno del gen NK1, con inclusión de trastorno de conducta, trastorno de hiperactividad con déficit de atención y alcoholismo. Debe tenerse en cuenta que los ensayos descritos en esta memoria pueden identificar compuestos que afectan a la actividad del gen NK1 sea por afectar a la expresión del gen NK1 o por afectar al nivel de actividad del producto del gen NK1. Por ejemplo, pueden identificarse compuestos que están implicados en otro paso del camino en el que está implicado el gen NK1 y/o el producto del gen NK1 y, por afectar a este mismo camino, pueden modular el efecto del gen NK1 sobre el desarrollo de un trastorno neuropsiquiátrico tal como trastorno de conducta, trastorno de hiperactividad con déficit de atención y alcoholismo. Tales compuestos pueden utilizarse como parte de un método terapéutico para el tratamiento del trastorno.

Asimismo, pueden utilizarse sistemas basados en células para identificar compuestos que pueden actuar para mejorar los síntomas de un trastorno del gen NK1 o un trastorno neuropsiquiátrico, tal como trastorno de conducta, trastorno de hiperactividad con déficit de atención y alcoholismo. Tales sistemas de células pueden incluir, por ejemplo, células recombinantes o no recombinantes, tales como líneas de células, que expresan el gen NK1.

5

En la utilización de tales sistemas de células, las células que expresan el gen NK1 pueden exponerse a un compuesto sospechoso de exhibir capacidad para mejorar los síntomas de un trastorno de gen NK1 o un trastorno neuropsiquiátrico, tal como trastorno de conducta, trastorno de hiperactividad con déficit de atención y alcoholismo, en una concentración suficiente y durante un tiempo suficiente para ser eficaz. Después de la exposición, las células pueden ensayarse para medir las alteraciones en la expresión del gen NK1, v.g., por ensayo de lisados de células para transcritos de mRNA del gen NK1 (v.g., por análisis Northern) o respecto a productos de gen NK1 expresados por la célula, los compuestos que modulan la expresión del gen NK1 son buenos candidatos como agentes terapéuticos. Alternativamente, se examinan las células a fin de determinar si uno o más fenotipos celulares asociados con un trastorno del gen NK1 o un trastorno neuropsiquiátrico, tal como trastorno de conducta, trastorno de hiperactividad con déficit de atención y alcoholismo, se ha alterado para asemejarse a un fenotipo no afectado más normal o no deteriorado, o un fenotipo más probable de producir una menor incidencia o gravedad de los síntomas del trastorno.

15

Adicionalmente, anticuerpos de este tipo pueden utilizarse en asociación con las técnicas de terapia génica para, por ejemplo, evaluar las células normales y/o modificadas por ingeniería genética que expresan el gen NK1 antes de su introducción en el paciente.

20

Adicionalmente, pueden utilizarse anticuerpos anti-producto de gen NK1 como método para la inhibición de la actividad anormal del producto del gen NK1. Así, tales anticuerpos pueden utilizarse, por consiguiente, como parte de métodos de tratamiento para un trastorno del gen NK1 o un trastorno neuropsiquiátrico, tal como trastorno de conducta, trastorno de hiperactividad con déficit de atención y alcoholismo. De acuerdo con ello, se proporciona el uso de un anticuerpo para una proteína codificada por una molécula de RNA complementaria a un gen NK1 que codifica un receptor NK1 no funcional en la preparación de un medicamento para el tratamiento de ADHD, dispraxia, alcoholismo, trastorno de conducta, auto-daño o auto-lesión o probabilidad de suicidio.

25

Para la producción de anticuerpos contra un producto del gen NK1, diversos animales hospedadores pueden inmunizarse por inyección con un producto del gen NK1, o una porción del mismo. Tales animales hospedadores pueden incluir, pero sin carácter limitante, conejos, ratones, y ratas. Pueden utilizarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie hospedadora, con inclusión pero sin carácter limitante de Freund's (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles Pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa bocallave, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

35

Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas de los sueros de animales inmunizados con un antígeno, tal como un producto del gen NK1, o un derivado antigénico funcional del mismo. Para la producción de anticuerpos policlonales, pueden inmunizarse animales hospedadores tales como los arriba descritos por inyección con producto del gen NK1 complementado con adyuvantes como se ha descrito también arriba.

40

Los anticuerpos monoclonales, que son poblaciones homogéneas de anticuerpos para un antígeno particular, pueden obtenerse por cualquier técnica que permita la producción de moléculas de anticuerpo por líneas continuas de células en cultivo. Éstas incluyen, pero sin carácter limitante, la técnica del hibridoma de Kohler and Milstein, (1975, Nature 256, 495-497; y U.S. Pat No. 4.376.110), la técnica del hibridoma de las células B humanas (Kosbor *et al.*, 1983, Immunology Today 4, 72; Cole *et al.*, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2026-2030), y la técnica del hibridoma EBV (Cole *et al.*, 1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina con inclusión de IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce el mAb de esta invención puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*. La producción de títulos altos de mAbs *in vivo* hace que éste sea el método de producción preferido actualmente.

50

Adicionalmente, pueden utilizarse las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison, *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 6851-6855; Neuberger, *et al.*, 1984, Nature 312, 604-608; Takeda, *et al.*, 1985, Nature, 314, 452-454) por remodelación de los genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad antigénica apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la cual diferentes porciones se derivan de especies animales diferentes, tales como aquéllas que tienen una región variable variada de un mAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana. (Véase, v.g., Cabilly *et al.*, U.S. Pat. No. 4.816.567; y Boss *et al.*, U.S. Pat. No. 4.816.397).

55

Adicionalmente, se han desarrollado técnicas para la producción de anticuerpos humanizados. (Véase, v.g., Queen, U.S. Pat No. 5.585.089). Una región variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina está constituida por una región "de entramado" interrumpida por tres regiones hipervariables, a las que se hace referencia como regiones determinantes de ta complementariadad (CDRs). La extensión de la región de entramado y las CDRs han sido definidas con precisión (véase, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E. *et al.*, U.S. Department of Health and Human Services (1983). Resumidamente, los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies

65

ES 2 370 210 T3

no humanas que tienen una o más CDRs de la especie no humana y una región de entramado de una molécula de inmunoglobulina humana.

5 Alternativamente, técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (U.S. Pat. No. 4.946.778; Bird, 1988, Science 242, 423-426; Huston, *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879-5883; y Ward, *et al.*, 1989, Nature 334, 544-546) pueden adaptarse para producir anticuerpos monocatenarios contra productos del gen NK1. Los anticuerpos monocatenarios se forman uniendo los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv por un puente de aminoácido, dando como resultado un polipéptido monocatenario.

10 Fragmentos de anticuerpo que reconocen epítopes específicos pueden generarse por técnicas conocidas. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen, pero sin carácter limitante: los fragmentos F(ab')₂, que pueden producirse por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab, que pueden generarse por reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, pueden construirse bibliotecas de expresión Fab (Huse, *et al.*, 1989, Science, 246, 1975-1981) para permitir una identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada.

20 Se describe también un método de determinación de una predisposición de un individuo a ADHD, alcoholismo, dispraxia, trastorno de conducta, auto-daño o auto-lesión deliberados o probabilidad de suicidio, que comprende identificar un polimorfismo, mutación u otra ruptura en el gen NK1 o en las regiones flanqueantes del gen en la muestra obtenida de dicho individuo, en donde la presencia del polimorfismo es indicativa de una predisposición a ADHD, alcoholismo, dispraxia, trastorno de conducta, auto-daño o auto-lesión deliberados o probabilidad de suicidio.

25 Los términos polimorfismo y mutación se utilizan en esta memoria para significar una variación en el DNA respecto del DNA de tipo salvaje que da como resultado receptores NK1 funcionales. En esta memoria, el término polimorfismo se refiere preferiblemente a un polimorfismo que tiene efecto sobre el fenotipo del individuo, específicamente un polimorfismo que aumenta la susceptibilidad a ADHD, alcoholismo, dispraxia, trastorno de conducta, auto-daño o auto-lesión deliberados o probabilidad de suicidio.

30 El término región flanqueante se refiere al DNA situado a ambos lados del gen NK1. En particular, el término se refiere a secciones que tienen aproximadamente 5000 pares de bases de longitud, más preferiblemente alrededor de 2500 pares de bases, y más preferiblemente alrededor de 1000 pares de bases.

35 Si bien el polimorfismo, mutación o ruptura puede encontrarse en el propio gen NK1, el mismo puede encontrarse también en una región que afecta a la expresión del gen. Por ejemplo, el polimorfismo, mutación o ruptura puede encontrarse en una región reguladora, por ejemplo en el promotor de NK1.

40 El polimorfismo puede ser cualquier tipo de polimorfismo, pero preferiblemente es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP). El mismo se encuentra preferiblemente en el genoma humano, y es más preferiblemente rs3771856. El polimorfismo se encuentra preferiblemente en la posición 75257522 en el cromosoma 2 y es un cambio de A a G. Este polimorfismo es conocido en la técnica anterior, pero su asociación con ADHD y otras afecciones no ha sido identificada con anterioridad. Sorprendentemente, los autores de la invención han podido ligar este polimorfismo, es decir la presencia del alelo G con dichas afecciones, especialmente con el alcohol.

45 Un polimorfismo de un solo nucleótido es una variación en la secuencia de DNA que implica un cambio de un nucleótido en un sitio particular.

50 El término "predisposición" se utiliza para significar una probabilidad incrementada de que un individuo presente un cierto patrón de comportamiento comparado con un individuo que no presenta el polimorfismo. Con preferencia, dicho término significa que el individuo es al menos 20%, más preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 50%, más propenso a exhibir el patrón de comportamiento.

55 La identificación del SNP puede realizarse por métodos conocidos en la técnica, como se expone en la descripción. En particular, pueden utilizarse métodos basados en la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR), que comprenden amplificar la región del DNA que comprende el polimorfismo. Por ejemplo, el polimorfismo rs3771856 puede identificarse utilizando el método "Amplifluor" que utiliza la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar el SNP del DNA de un caso o control combinado con un tercer oligonucleótido marcado fluorimétricamente de tal modo que el mismo puede discriminar entre los alelos SNP de rs3771856. Alternativamente, rs3771856 puede genotipificarse utilizando el método "ensayos TaqMan de libre disposición" que emplea un atenuador y una señal informadora fluorimétrica en el mismo oligonucleótido para discriminar entre alelos.

60 El individuo puede ser cualquier individuo, pero preferiblemente es un humano. El individuo puede exhibir características de una enfermedad o afección particular, tal como ADHD. Asimismo, el método puede combinarse con observación del comportamiento del individuo, o de los familiares del individuo respecto a signos de la afección de interés.

65 El método puede utilizarse también para predecir la probabilidad de un individuo de responder a un curso de tratamiento particular o para predecir los resultados probables de otros tests en dicho individuo, tales como obtención de imágenes del cerebro.

ES 2 370 210 T3

Pueden emplearse una diversidad de métodos para la evaluación de diagnóstico y pronóstico de trastornos del gen NK1 y trastornos neuropsiquiátricos, tales como trastorno de conducta, trastorno de hiperactividad con déficit de atención y alcoholismo, y para la identificación de individuos que tengan cierta predisposición para tales trastornos.

5 Dichos métodos pueden utilizar, por ejemplo, reactivos tales como las secuencias de nucleótidos del gen NK1 y anticuerpos dirigidos contra productos del gen NK1, con inclusión de fragmentos peptídicos del mismo. Específicamente, dichos reactivos pueden utilizarse, por ejemplo, para:

10 (1) La detección de la presencia de mutaciones del gen NK1, o la detección de sobre- o infra-expresión de mRNA del gen NK1 con relación al estado de un trastorno de NK1 o un trastorno neuropsiquiátrico, tal como trastorno de conducta, trastorno de hiperactividad con déficit de atención y alcoholismo;

(2) la detección de una sobre- o infra-abundancia de producto del gen NK1 con relación al estado no afectado; y

15 (3) la detección de un nivel aberrante de actividad del producto del gen NK1 con relación al estado no afectado.

Las secuencias de nucleótidos del gen NK1 pueden utilizarse, por ejemplo, para diagnosticar un trastorno del gen NK1 o trastorno neuropsiquiátrico utilizando, por ejemplo, las técnicas para detección de mutaciones del gen NK1 arriba descritas.

20 Los métodos descritos en esta memoria pueden realizarse, por ejemplo, utilizando kits de diagnóstico pre-empaquetados que comprenden al menos un reactivo de ácido nucleico específico del gen NK1 o anticuerpo anti-gen NK1 descrito en esta memoria, que puede utilizarse convenientemente, v.g., en escenarios clínicos, para diagnosticar pacientes que exhiban anomalías de un trastorno del gen NK1 o un trastorno neuropsiquiátrico, tal como trastorno de conducta, trastorno de hiperactividad con déficit de atención y alcoholismo.

Para la detección de mutaciones del gen NK1, puede utilizarse cualquier célula nucleada como fuente de partida para ácido nucleico génomico. Para la detección de la expresión del gen NK1 o productos del gen NK1, puede utilizarse cualquier tipo de célula o tejido en el cual se exprese el gen NK1.

30 Pueden emplearse una diversidad de métodos para escrutar respecto a la presencia de mutaciones del gen NK1 y para detectar y/o ensayar niveles de secuencias de ácido nucleico del gen NK1.

35 Las mutaciones del gen NK1 pueden detectarse utilizando diversas técnicas. El ácido nucleico procedente de cualquier célula nucleada puede utilizarse con punto partida para tales técnicas de ensayo, y puede aislarse de acuerdo con procedimientos estándar de preparación de ácido nucleico que son bien conocidos por los expertos en la técnica.

40 Las secuencias de ácido nucleico del gen NK1 pueden utilizarse en ensayos de hibridación o amplificación de muestras biológicas a fin de detectar anomalías que impliquen la estructura del gen NK1, con inclusión de mutaciones puntuales, inserciones, deleciones, inversiones, translocaciones y transposiciones cromosómicas. Tales ensayos pueden incluir, pero sin carácter limitante, análisis Southern, análisis de polimorfismo conformacional monocatenario (SSEP), y análisis PCR.

45 Los métodos de diagnóstico para la detección de mutaciones específicas del gen NK1 pueden implicar, por ejemplo, poner en contacto e incubar ácidos nucleicos que incluyen moléculas de DNA recombinante, genes clonados o variantes degeneradas de los mismos, obtenidos a partir de una muestra, v.g. derivados de una muestra de paciente u otra fuente de células apropiada, con uno o más reactivos de ácido nucleico marcados que incluyen moléculas de DNA recombinante, genes clonados o variantes degeneradas de los mismos, en condiciones favorables para la reasociación específica de estos reactivos a sus secuencias complementarias en el gen NK1. Preferiblemente, las longitudes de estos reactivos de ácido nucleico son al menos 15 a 30 nucleótidos. Después de la incubación, todos los ácidos nucleicos no reasociados se separan del híbrido ácido nucleico:molécula del gen NK1. Se detecta luego la presencia de ácidos nucleicos que se han hibridado, en caso de existir alguna de tales moléculas. Utilizando un esquema de detección de este tipo, el ácido nucleico procedente del tipo de célula o tejido de interés puede inmovilizarse, por ejemplo, a un soporte sólido tal como una membrana, o una superficie de plástico tal como la de una placa de microtitulación o cuentas de poliestireno. En este caso, después de la incubación, los reactivos de ácido nucleico marcados y no reasociados se eliminan fácilmente. La detección de los reactivos de ácido nucleico del gen NK1 remanentes reasociados y marcados se realiza utilizando métodos estándar bien conocidos por los expertos en la técnica. Las secuencias del gen NK1 a las cuales se han reasociado los reactivos de ácido nucleico pueden compararse con el patrón de reasociación esperado de una secuencia normal del gen NK1 a fin de determinar si está presente una mutación del gen NK1

60 Métodos alternativos de diagnóstico para la detección de moléculas de ácido nucleico específicas del gen NK1, en muestras de pacientes u otras fuentes de células apropiadas, pueden implicar su amplificación, v.g., por PCR (la realización experimental expuesta en Mullis, 1987, U.S. Pat. No. 4683202), seguida por la detección de las moléculas amplificadas utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Las secuencias amplificadas resultantes pueden compararse con aquéllas que serían de esperar si el ácido nucleico que se amplifica contuviera únicamente copias normales del gen NK1 a fin de determinar si existe una mutación del gen NK1.

Adicionalmente, pueden realizarse técnicas de genotipificación bien conocidas a fin de identificar individuos portadores de mutaciones del gen NK1. Tales técnicas incluyen, por ejemplo, el uso de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs), que implican variaciones de secuencia en uno de los sitios de reconocimiento para la enzima de restricción específica utilizada.

Adicionalmente, se han descrito métodos mejorados para análisis de polimorfismos de DNA que pueden utilizarse para identificación de mutaciones del gen NK1, aprovechando la presencia de números variables de secuencias de DNA cortas y repetidas en tándem entre los sitios de las enzimas de restricción. Por ejemplo, Weber (U.S. Pat. No. 5075217) describe un marcador de DNA basado en polimorfismos de longitud en bloques de repeticiones cortas en tándem (dC-dA)_n-(dG-dT)_n. Se estima que la separación media de los bloques (dC-dA)_n-(dG-dT)_n es 30.000-60.000 pb. Los marcadores que están tan próximos exhiben una heredabilidad de alta frecuencia, y son extremadamente útiles en la identificación de mutaciones genéticas, tales como, por ejemplo, mutaciones en el gen NK1, y el diagnóstico de enfermedades y trastornos relacionados con mutaciones del gen NK1.

Asimismo, Caskey *et al.* (U.S. Pat No. 5364759) describen un ensayo de determinación del perfil de DNA para detectar secuencias cortas de repetición de 3 y 4 nucleótidos. El proceso incluye extraer el DNA de interés, tal como el gen NK1, amplificar el DNA extraído, y marcar las secuencias repetidas para formar un mapa genotípico del DNA del individuo.

También puede ensayarse el nivel de expresión del gen NK1. Por ejemplo, RNA de un tipo de célula o tejido que se sabe o se sospecha que expresa el gen NK1, tal como cerebro, puede aislarse y testarse utilizando hibridación o técnicas PCR tales como las arriba descritas. Las células aisladas pueden derivarse de cultivo de células o de un paciente. El análisis de las células tomadas del cultivo puede ser un paso necesario en la evaluación de las células a utilizar como parte de una técnica de terapia génica basada en células o, alternativamente, para testar el efecto de los compuestos sobre la expresión del gen NK1. Tales análisis pueden revelar aspectos tanto cuantitativos como cualitativos del patrón de expresión del gen NK1, que incluyen activación o desactivación de la expresión del gen NK1.

En una realización de un esquema de detección de este tipo, se sintetiza una molécula de cDNA a partir de una molécula de RNA de interés (v.g., por transcripción inversa de la molécula de RNA en cDNA). Se utiliza luego una secuencia del cDNA como molde para una realización de amplificación de ácido nucleico, tal como una reacción de amplificación PCR, o análoga. Los reactivos de ácido nucleico utilizados como reactivos de iniciación de la síntesis (v.g., cebadores) en la transcripción inversa y los pasos de amplificación del ácido nucleico de este método podrían ser preparados por un experto en la técnica. Las longitudes preferidas de tales reactivos de ácido nucleico son al menos 9-30 nucleótidos. Para detección del producto amplificado, la amplificación del ácido nucleico puede realizarse utilizando nucleótidos marcados radiactiva o no radiactivamente. Alternativamente, puede prepararse suficiente producto amplificado tal que el producto pueda visualizarse por tinción estándar con bromuro de etidio o por utilización de cualquier otro método adecuado de tinción de ácido nucleico.

Adicionalmente, es posible realizar dichos ensayos de expresión del gen NK1 “*in situ*”, es decir, directamente sobre secciones tisulares (fijadas y/o congeladas) de tejido del paciente obtenidas de biopsias o resecciones, tales que no es necesaria purificación alguna del ácido nucleico. Para tales procedimientos *in situ* pueden utilizarse reactivos de ácido nucleico como sondas y/o cebadores (véase, por ejemplo, Nuevo, G. J, 1992, “PCR *In Situ* Hybridization: Protocols and Applications”, Raven Press, NY).

Alternativamente, si se puede obtener una cantidad suficiente de las células apropiadas, pueden realizarse análisis Northern estándar para determinar el nivel de expresión de mRNA del gen NK1.

Anticuerpos dirigidos contra productos del gen NK1 no deteriorados o mutantes o variantes conservadas o fragmentos peptídicos de los mismos, que se han expuesto anteriormente, pueden utilizarse también como herramientas de diagnóstico y pronóstico para un trastorno del gen NK1 o un trastorno neuropsiquiátrico, tal como trastorno de conducta, trastorno de hiperactividad con déficit de atención y alcoholismo, como se describe en esta memoria. Dichos métodos se pueden utilizar para detectar anomalías en el nivel de síntesis o expresión del producto del gen NK1, o anomalías en la estructura, expresión temporal, y/o localización física del producto del gen NK1. Los anticuerpos y métodos de inmunoensayo descritos a continuación tienen, por ejemplo, aplicaciones importantes *in vitro* en la evaluación de la eficacia de los tratamientos para trastornos del gen NK1 o trastornos neuropsiquiátricos, tales como trastorno de conducta, trastorno de hiperactividad con déficit de atención y alcoholismo. Los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos, tales como los descritos más adelante, pueden utilizarse para escrutar compuestos potencialmente terapéuticos *in vitro* a fin de determinar sus efectos sobre la expresión del gen NK1 y la producción de péptidos del gen NK1. Los compuestos que tengan efectos beneficiosos sobre un trastorno del gen NK1 o un trastorno neuropsiquiátrico, tal como trastorno de conducta, trastorno de hiperactividad con déficit de atención y alcoholismo, pueden identificarse, y determinarse una dosis terapéuticamente eficaz.

Pueden utilizarse ensayos *in vitro*, por ejemplo, para evaluar la eficacia de la terapia génica basada en células para un trastorno del gen NK1 o un trastorno neuropsiquiátrico, tal como trastorno de conducta, trastorno de hiperactividad con déficit de atención y alcoholismo. Pueden utilizarse *in vitro* Anticuerpos dirigidos contra péptidos del gen NK1 a fin de determinar, por ejemplo, el nivel de expresión del gen NK1 alcanzado en células modificadas por ingeniería genética a fin de producir péptidos del gen NK1. En el caso de productos intracelulares del gen NK1, dicha evaluación se hace, preferiblemente, utilizando lisados o extractos de células. Dicho análisis permitirá una determinación del

número de células transformadas necesario para conseguir eficacia terapéutica *in vivo*, así como optimización del protocolo de reemplazamiento del gen.

5 El tejido o tipo de célula a analizar incluirá generalmente aquéllos que se sabe o se sospecha que expresan el gen NK1. Los métodos de aislamiento de proteínas empleados en esta memoria pueden ser, por ejemplo, tales como los descritos en Harlow y Lañe (1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York). Las células aisladas pueden derivarse de cultivos de células o de un paciente. El análisis de células tomadas de un cultivo puede ser un paso necesario en la evaluación de las células a utilizar como parte de una técnica de terapia génica basada en células o, alternativamente, para testar el efecto de los compuestos sobre la expresión del gen NK1.

15 Métodos de diagnóstico preferidos para la detección de productos del gen NK1 o variantes conservadas o fragmentos peptídicos de los mismos pueden implicar, por ejemplo, inmunoensayos en los cuales los productos del gen NK1 o variantes conservadas o fragmentos peptídicos se detectan por su interacción con un anticuerpo específico anti-producto del gen NK1.

20 Por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos útiles en la presente invención pueden utilizarse para detectar cuantitativa o cualitativamente la presencia de productos del gen NK1 o variantes conservadas o fragmentos peptídicos de los mismos. Esto puede realizarse, por ejemplo, por técnicas de inmunofluorescencia que emplean un anticuerpo marcado fluorescentemente acoplado con detección por microscopía óptica, citometría de flujo, o detección fluorimétrica. Dichas técnicas son especialmente preferidas para productos del gen NK1 que se expresan en la superficie de las células.

25 Los anticuerpos (o fragmentos de los mismos), útiles en la presente invención pueden emplearse además histológicamente, como en microscopía de inmunofluorescencia o inmunoelectrónica, para detección *in situ* de productos del gen NK1 o variantes o fragmentos peptídicos conservados del mismo. La detección *in situ* puede realizarse por extracción de un espécimen histológico de un paciente, y aplicación al mismo de un anticuerpo marcado de la presente invención. El anticuerpo (o fragmento) se aplica preferiblemente por superposición del anticuerpo (o fragmento) marcado sobre una muestra biológica. Por el uso de un procedimiento de este tipo, es posible determinar no sólo la presencia del producto del gen NK1, o variantes o fragmentos peptídicos conservados, sino también su distribución en el tejido examinado. Utilizando la presente invención, las personas con experiencia ordinaria percibirán fácilmente que cualquiera de una gran diversidad de métodos histológicos (tales como procedimientos de tinción) pueden modificarse a fin de lograr dicha detección *in situ*.

35 Los inmunoensayos para productos del gen NK1 o variantes o fragmentos peptídicos conservados del mismo comprenderán típicamente incubar una muestra, tal como un fluido biológico, un extracto de tejido, células recogidas recientemente, o lisados de células, que se han incubado en cultivo de células, en presencia de un anticuerpo marcado detectablemente capaz de identificar productos del gen NK1 o variantes o fragmentos peptídicos conservados del mismo, y detectar el anticuerpo fijado por cualquiera de diversos métodos bien conocidos en la técnica.

40 La muestra biológica puede ponerse en contacto con e inmovilizarse sobre un soporte o vehículo en fase sólida tal como nitrocelulosa, u otro soporte sólido que sea capaz de inmovilizar células, partículas de células o proteínas solubles. El soporte puede lavarse luego con tampones adecuados seguido por tratamiento con el anticuerpo específico del gen NK1 marcado detectablemente. El soporte en fase sólida puede lavarse luego con el tampón una segunda vez para eliminar el anticuerpo no fijado. La cantidad de marcador fijado sobre el soporte sólido puede detectarse luego por medios convencionales.

50 Por "soporte o vehículo en fase sólida" se entiende cualquier soporte capaz de fijar un antígeno o un anticuerpo. Soportes o vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, gabros, y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble en cierto grado o insoluble para los propósitos de la presente invención. El material soporte puede tener virtualmente cualquier configuración estructural posible con tal que la molécula acoplada sea capaz de fijarse a un antígeno o anticuerpo. Así, la configuración del soporte puede ser esférica, como una cuenta o cilíndrica, como en la superficie interior de un tubo de ensayo, o la superficie externa de una varilla. Alternativamente, la superficie puede ser plana tal como una hoja, tira de test, etc. Soportes preferidos incluyen cuentas de poliestireno. Los expertos en la técnica conocerán muchos otros vehículos adecuados para fijación de un anticuerpo o antígeno, o podrán determinar los mismos mediante el uso de experimentación rutinaria.

60 La actividad de fijación de un lote dado de anticuerpo anti-producto del gen NK1 puede determinarse de acuerdo con métodos bien conocidos. Los expertos en la técnica podrán determinar condiciones de ensayo operativas y óptimas para cada determinación empleando experimentación de rutina.

65 Una de las maneras en las cuales puede marcarse detectablemente el anticuerpo específico del péptido del gen NK1 es por enlace del mismo a una enzima y utilización de un inmunoensayo enzimático (EIA) ((Voller, A, "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)", 1978, Diagnostic Horizons 2, 1-7, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md); Voller, A *et al.*, 1978, J. Clin. Pathol. 31, 507-520; Butler, J. E., 1981, Meth. Enzymol. 73, 482-523; Maggio, E. (ed.), 1980, Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Ratón, Fla.; Ishikawa, E. *et al.*, (eds.), 1981, Enzyme Immunoassay, Kigaku Shoin, Tokyo). La enzima que se fija al anticuerpo reaccionará con un

sustrato apropiado, preferiblemente un sustrato cromógeno, de tal manera que produzca un resto químico que puede ser detectado, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorimétricos o visuales. Enzimas que pueden utilizarse para marcar detectablemente el anticuerpo incluyen, pero sin carácter limitante, malato-deshidrogenasa, nucleasa esta-filocócica, delta-5-esteroide-isomerasa, alcohol-deshidrogenasa de levadura, α -glicerofosfato, deshidrogenasa, triosa-fosfato-isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa-oxidasa, β -galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. La detección puede realizarse por métodos colorimétricos que emplean un sustrato cromógeno para la enzima. La detección puede realizarse también por comparación visual de la extensión de la reacción enzimática de un sustrato en comparación con estándares preparados análogamente.

La detección puede realizarse también utilizando cualquiera de una diversidad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, por marcación radiactiva de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, es posible detectar péptidos del gen NK1 mediante el uso de un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principios de Radioinmunoensayos, Séptimo Curso de Entrenamiento en Técnicas de Ensayo de Radioligandos, The Endocrine Society, marzo de 1986). El isótopo radiactivo puede detectarse por medios tales como el uso de un contador gamma o un contador de centelleo o por autorradiografía.

También es posible marcar el anticuerpo con un compuesto fluorescente. Cuando el anticuerpo marcado fluorescentemente se expone a luz de la longitud de onda apropiada, su presencia puede detectarse luego debido a fluorescencia. Entre los compuestos marcadores fluorescentes utilizados más comúnmente se encuentran isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído y fluorescamina.

El anticuerpo puede marcarse también detectablemente utilizando metales que emiten fluorescencia tales como ¹⁵²Eu, u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales pueden unirse al anticuerpo utilizando grupos formadores de quelatos metálicos tales como ácido dietilenotriaminapentaacético (DTPA) o ácido etilendiaminatetraacético (EDTA).

El anticuerpo puede marcarse también detectablemente acoplado el mismo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo marcado por quimioluminiscencia se determina luego detectando la presencia de la luminiscencia que se produce durante el curso de una reacción química. Ejemplos de compuestos marcadores quimioluminiscentes particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster oxalato.

Análogamente, puede utilizarse un compuesto bioluminiscente para marcar el anticuerpo de la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia encontrado en sistemas biológicos en los cuales una proteína catalítica aumenta la eficiencia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina por detección de la presencia de luminiscencia. Compuestos bioluminiscentes importantes para propósitos de marcación son luciferina, luciferasa, proteína fluorescente verde y equorina.

Se describe adicionalmente el uso de un polimorfismo en el primer intrón del gen NK1 como marcador para una predisposición a ADHD, alcoholismo, trastorno de conducta o probabilidad de suicidio.

Se proporcionan también por la invención una diversidad de enfoques terapéuticos. La invención proporciona el uso de un gen NK1 de tipo salvaje en la preparación de un medicamento para el tratamiento del ADHD. La invención proporciona también un gen NK1 de tipo salvaje para uso en el tratamiento del ADHD. Enfoques similares se describen para las condiciones afines alcoholismo, dispraxia, trastorno de conducta, auto-daño o auto-lesión deliberado o probabilidad de suicidio.

En una realización particular, debe utilizarse un vector que comprende un gen NK1 de tipo salvaje.

Se proporciona además el uso de un agonista de NK1 en la preparación de un tratamiento para ADHD. Se proporciona también un agonista de NK1 para uso en el tratamiento de ADHD. Se describen enfoques similares para las afecciones afines alcoholismo, dispraxia, trastorno de conducta, auto-daño o auto-lesión deliberado o probabilidad de suicidio.

Se proporciona además el uso de un inhibidor de la Enzima Convertidora de las Angiotensinas (ACE) en la preparación de un tratamiento para ADHD. Se proporciona también un inhibidor de la ACE para uso en el tratamiento de ADHD. Se describen enfoques similares para las condiciones afines alcoholismo, dispraxia, trastorno de conducta, auto-daño o auto-lesión deliberado o probabilidad de suicidio.

Un inhibidor de la ACE es un inhibidor de la enzima convertidora de las angiotensinas. El término es bien conocido en la técnica. Sin quedar ligados por una teoría particular, la idea de los inventores es que los inhibidores de la ACE mejoran la activación del receptor de NK1 por prevención de la descomposición de la sustancia P en el cerebro.

Las composiciones farmacéuticas utilizadas en esta invención comprenden cualquiera de los compuestos de la presente invención, y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos, con cualquier portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. Portadores, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden utilizarse en las composiciones farmacéuticas de esta invención incluyen, pero sin carácter limitante, cambiadores

ES 2 370 210 T3

de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas del suero, tales como seroalbúmina humana, sustancias tampón tales como fosfatos, glicerina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mixturas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliácridatos, ceras, polímeros de bloques polietileno-políoxipropileno, polietilenglicol y lanolina.

Las composiciones farmacéuticas utilizadas en esta invención pueden administrarse por vía oral, parenteral, mediante pulverización de inhalación, o las vías rectal, nasal, bucal, vaginal o por un depósito implantado. Se prefiere la administración oral. Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden contener cualesquiera portadores, adyuvantes o vehículos convencionales no tóxicos farmacéuticamente aceptables. El término parenteral como se utiliza en esta memoria incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intrasinoval, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal.

Las composiciones farmacéuticas pueden encontrarse en la forma de una preparación inyectable estéril, por ejemplo, como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica utilizando agentes dispersantes o humectantes adecuados (tales como, por ejemplo, Tween 80) y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran manitol, agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Adicionalmente, se emplean convencionalmente aceites estériles fijos como disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, puede emplearse cualquier aceite fijo no irritante con inclusión de mono- o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, como lo son aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones de aceite pueden contener también un diluyente o dispersante alcohólico de cadena larga tal como Ph. Helv o un alcohol similar.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse por vía oral en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable con inclusión, pero sin carácter limitante, de cápsulas, tabletas, y suspensiones y soluciones acuosas. En el caso de las tabletas para uso oral, vehículos que se utilizan comúnmente incluyen lactosa y almidón de maíz. Se añaden también típicamente agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para administración oral en forma de cápsula, diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se administran por vía oral suspensiones acuosas, el ingrediente activo se combina con agentes emulsionantes y agentes de suspensión. Si se desea, pueden añadirse ciertos agentes edulcorantes y/o saborizantes y/o colorantes.

Las composiciones farmacéuticas utilizadas en esta invención pueden administrarse también en forma de supositorios para administración rectal. Estas composiciones se pueden preparar por mezcla de un compuesto de esta invención con un excipiente adecuado no irritante que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura rectal y por consiguiente fundirá en el recto para liberar los componentes activos. Tales materiales incluyen, pero sin carácter limitante, manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

Las composiciones farmacéuticas utilizadas en esta invención se pueden administrar por aerosol nasal o inhalación. Tales composiciones se preparan de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica y pueden prepararse como soluciones en medio salino, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de absorción para mejorar la biodisponibilidad, fluorocarbonos, y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes conocidos en la técnica.

Puede ser útil explorar y controlar la acción periférica de los agonistas de NK1, por administración de un antagonista de NK1 que no sea capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. Por ejemplo, los agonistas de NK1 aumentan *in vitro* la motilidad intestinal (de Ahepper *et al* (2006) *Autonom Neurosci* 126-127: 273-6), inhiben la contracción esofágica (Shiina *et al.*, (2006), *Neurosci* 139: 495-503), inducen relajación del estómago (Muke *et al.*, (2006) *Br J Pharmacol* 147:430-436), aumentan la secreción bronquial (Phillips *et al.*, *Br J Pharmacol*. (2003) 138: 254-260) e incrementan las contracciones del miometrio en los ratones cebados con estrógenos (Patak *et al.*, *Br J Pharmacol* (2002) 137: 1247-1254). Tales acciones *in vivo* podrían presentarse como efectos secundarios indeseables del tratamiento con un agonista del receptor NK1. Las mismas podrían evitarse por administración de un antagonista de NK1 que no penetre en el cerebro. De acuerdo con ello, cuando se administra un agonista de NK1 para el tratamiento de ADHD, alcoholismo, dispraxia, trastorno conductual, autolesión o autodaño deliberado o tendencias suicidas, puede administrarse también un antagonista de NK1 que no atraviese la barrera hematoencefálica.

Una diversidad de enfoques terapéuticos están abarcados por la invención. Por ejemplo, tales métodos pueden comprender la administración de compuestos que modulan la expresión de un gen NK1 de mamífero y/o la síntesis o actividad de un producto del gen NK1 de mamífero de tal modo que se mejoran los síntomas del trastorno. Alternativamente, en aquellos casos en los cuales los trastornos neuropsiquiátricos son resultado de mutaciones en el gen NK1, dichos métodos pueden comprender suministrar al individuo una molécula de ácido nucleico que codifique un producto del gen NK1 no deteriorado de tal modo que se exprese un producto del gen NK1 sin deterioro y se reduzcan o mejoren los síntomas del trastorno.

Los síntomas de ciertos trastornos de NK1 o trastornos neuropsiquiátricos, tales como trastorno conductual, trastorno de hiperactividad con déficit de atención y alcoholismo pueden reducirse por disminución del nivel de expresión anormal del gen NK1 y/o actividad anormal del producto del gen NK1 por utilización de secuencias del gen NK1 en asociación con métodos bien conocidos antisentido, de “desactivación” (“knockout”) del gen, de ribozima y/o de triple hélice para reducir el nivel de expresión anormal del gen NK1. Entre los compuestos que pueden exhibir la capacidad para modular la actividad, expresión o síntesis del gen NK1, con inclusión de la capacidad para mejorar los síntomas de un trastorno del gen NK1 o un trastorno neuropsiquiátrico, tal como un trastorno de la conducta, trastorno de hiperactividad con déficit de atención y alcoholismo, se encuentran moléculas antisentido, ribozimas, y moléculas de triple hélice. Tales moléculas pueden estar diseñadas para reducir o inhibir cualquier actividad del gen mutante diana deteriorado, o en caso apropiado, actividad del gen diana mutante. Métodos para la producción y uso de tales moléculas son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Las moléculas de RNA y DNA antisentido actúan para bloquear directamente la traducción del mRNA por hibridación a mRNA y prevención de la traducción de las proteínas. Los enfoques antisentido implican el diseño de oligonucleótidos que son complementarios para un mRNA del gen diana. Los oligonucleótidos antisentido se fijarán a los transcritos complementarios de mRNA del gen diana e impedirán la traducción. No se requiere complementariedad absoluta, aunque se prefiere.

Una secuencia “complementaria” para una porción de un RNA como se denomina en esta memoria, significa una secuencia que tiene suficiente complementariedad para poder hibridarse con el RNA, formando un dúplex estable; en el caso de ácidos nucleicos antisentido bicatenarios, puede testarse de este modo una sola cadena del DNA dúplex, o puede ensayarse la formación de triplex. La capacidad para hibridarse dependerá tanto del grado de complementariedad como de la longitud del ácido nucleico antisentido. Generalmente, cuanto más largo es el ácido nucleico que se hibrida, tantos más desapareamientos de bases con un RNA puede contener y formar todavía un dúplex (o triplex) estables, según sea el caso. Un experto en la técnica puede averiguar un grado de desapareamiento tolerable por el uso de procedimientos estándar a fin de determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

En una realización, podrían utilizarse oligonucleótidos complementarios para regiones no codificantes del gen NK1 en un enfoque antisentido a fin de inhibir la traducción del mRNA del gen NK1 endógeno. Los ácidos nucleicos antisentido deberían tener una longitud de 6 nucleótidos como mínimo, y preferiblemente son oligonucleótidos que tienen una longitud comprendida entre 6 y aproximadamente 50 nucleótidos. En aspectos específicos, el oligonucleótido tiene una longitud de al menos 10 nucleótidos, al menos 17 nucleótidos, al menos 25 nucleótidos o al menos 50 nucleótidos.

Con indiferencia de la elección de la secuencia diana, se prefiere que se realicen primeramente estudios *in vitro* para cuantificar la capacidad del oligonucleótido antisentido para inhibir la expresión génica. Se prefiere que estos estudios utilicen controles que distingan entre inhibición de un gen antisentido y efectos biológicos inespecíficos de los oligonucleótidos. Se prefiere también que estos estudios comparen niveles del RNA o proteína diana con el de un RNA o proteína de control interno. Adicionalmente, se contempla que los resultados obtenidos utilizando el oligonucleótido antisentido se comparen con los obtenidos utilizando un oligonucleótido de control. Se prefiere que el oligonucleótido de control sea aproximadamente de la misma longitud que el oligonucleótido de test, y que la secuencia nucleotídica del oligonucleótido difiera de la secuencia antisentido no más de lo que es necesario para prevenir la hibridación específica a la secuencia diana.

Los oligonucleótidos pueden ser DNA o RNA o mixturas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos, monocatenarias o bicatenarias. El oligonucleótido puede estar modificado en el resto base, el resto azúcar, o la cadena principal de fosfato, por ejemplo, a fin de mejorar la estabilidad de la molécula, la hibridación, etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos unidos como apéndice tales como péptidos (v.g. para el direccionamiento de receptores de células hospedadoras *in vivo*), o agentes que faciliten el transporte a través de la membrana celular (véase, v.g. Letsinger, *et al*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U SA 86,6553-6556; Lemaitre, *et al*, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 648-652; Publicación PCT No. WO88/09810, publicada el 15 de diciembre de 1988) o la barrera hematoencefálica (véase, v.g. Publicación PCT No. WO89/10134, publicada el 25 de abril de 1988), agentes de escisión excitados por hibridación (véase, v.g. Krol *et al*, 1988, BioTechniques 6, 958-976) o agentes de intercalación (véase, v.g. Zon, 1988, Pharm. Res. 5, 539-549). A este fin, el oligonucleótido puede estar conjugado a otra molécula, v.g. un péptido, agente de reticulación excitado por hibridación, agente de transporte, agente de escisión excitado por hibridación, etc.

El oligonucleótido antisentido puede comprender al menos un resto base modificado que se selecciona del grupo que incluye, pero sin carácter limitante, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxi)metil-uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouacilo, beta-D-galadosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3) w, y 2,6-diaminopurina.

El oligonucleótido antisentido puede comprender también al menos un resto azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye, pero sin carácter limitante, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xifulosa, y hexosa.

ES 2 370 210 T3

El oligonucleótido antisentido puede comprender al menos una cadena principal de fosfato modificada seleccionada del grupo constituido por un fosforotioato, un fosfortioato, un fosforamidotioato, un fosforamidato, un fosfordiamidato, un metilfosfonato, un alquil-fosfotriéster, y un formacetal o análogo del mismo.

5 El oligonucleótido antisentido puede ser un oligonucleótido alfa-anomérico. Un oligonucleótido alfa-anomérico forma híbridos específicos bicatenarios con RNA complementario en los cuales, contrariamente a las unidades β usuales, las cadenas son paralelas una a otra (Gautier, *et al.*, 1987, *Nuc. Acids Res.* 15, 6625-6641). El oligonucleótido es un 2'-O-metilribonucleótido (Inoue, *et al.*, 1987, *Nucl. Acids Res.* 15, 6131-6148) o un análogo quimérico RNA-DNA (Inoue, *et al.*, 1987, *FEBS Lett.* 215, 327-330).

10 Los oligonucleótidos de la invención pueden sintetizarse por métodos estándar conocidos en la técnica, v.g. por el uso de un sintetizador automático de DNA (tales como los que están disponibles comercialmente de Biosearch, Applied Biosystems, etc.). Como ejemplos, pueden sintetizarse oligonucleótidos de fosforotioato por el método de Stein, *et al.*, (1988), *Nucl. Acids Res.* 16, 3909), y se pueden preparar oligonucleótidos de metilfosfonato por el uso de
15 soportes polímeros de vidrio de poro controlado (Salin, *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7448-7451), etc.

Si bien podrían utilizarse nucleótidos antisentido complementarios a la secuencia de la región codificante del gen diana, son más preferidos aquéllos que son complementarios a la región transcrita no traducida.

20 Las moléculas antisentido deberían suministrarse a las células que expresan el gen diana *in vivo*. Se han desarrollado varios métodos para suministrar DNA o RNA antisentido a células; v.g., las moléculas antisentido pueden inyectarse directamente en el sitio tisular, o bien pueden administrarse sistémicamente moléculas antisentido modificadas, diseñadas para direccionar las células deseadas (v.g., enlazadas en antisentido a péptidos o anticuerpos que fijan específicamente receptores o antígenos expresados en la superficie de la célula diana).

25 Las ribozimas de la presente invención incluyen también RNA-endorribonucleasas (en lo sucesivo "ribozimas tipo Cech") tales como la que existe naturalmente en *Tetrahymena thermophila* (conocida como el IVS, o L-19 IVS RNA) y que ha sido descrita extensamente por Thomas Cech y colaboradores (Zaug, *et al.*, 1984, *Science*, 224, 574-578; Zaug y Cech, 1986, *Science*, 231, 470-475; Zaug, *et al.*, 1986, *Nature*, 324, 429-433; solicitud de patente internacional publicada No. WO 88/04300 por University Patents Inc.; Been y Cech, 1986, *Cell*, 47, 207-216). Las ribozimas tipo Cech tienen un sitio activo de 8 pares de bases que se hibrida a una secuencia de RNA diana, después de lo cual tiene
30 lugar la escisión del RNA diana.

Como en el enfoque antisentido, las ribozimas pueden estar compuestas de oligonucleótidos modificados (v.g., para estabilidad y/o direccionamiento mejorados, etc.) y deberían suministrarse a las células que expresan el gen diana
35 *in vivo*. Un método preferido de suministro implica utilizar un constructo de DNA que "codifica" la ribozima bajo el control de un promotor constitutivo fuerte pol III o pol II, de tal modo que las células transfectadas producirán cantidades suficientes de la ribozima para destruir los mensajes del gen diana endógeno e inhibir la traducción. Las ribozimas, al contrario que las moléculas antisentido, son catalíticas, y por tanto se requiere para su eficiencia una
40 concentración intracelular menor.

Alternativamente, la expresión de gen diana endógeno puede reducirse por direccionamiento de secuencias de desoxirribonucleótidos complementarias para la región reguladora del gen diana (es decir, el promotor y/o los intensificadores del gen diana) a fin de formar estructuras de triple hélice que impidan la transcripción del gen diana en las
45 células diana del cuerpo. (Véase en general, Helene, 1991, *Anticancer Drug Des.*, 6(6), 569-584; Helene, *et al.*, 1992, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 660, 27-36; y Maher, 1992, *Bioassays* 14(12), 807-815).

Las moléculas de ácido nucleico a utilizar en la formación de la triple hélice para la inhibición de la transcripción deberían ser monocatenarias y estar compuestas de desoxinucleótidos. La composición base de estos oligonucleótidos
50 tiene que diseñarse para promover la formación de la triple hélice por las reglas de apareamiento de bases de Hoogsteen, que requieren generalmente que estén presentes tramos considerables de purinas o pirimidinas en una cadena de un dúplex. Las secuencias de nucleótidos pueden estar basadas en pirimidinas, lo cual dará como resultado tripletes TAT y CGC⁺ a través de las tres cadenas asociadas de la triple hélice resultante. Las moléculas ricas en pirimidina proporcionan complementariedad de bases para una región rica en purinas de una monocadena del dúplex en una
55 orientación paralela a dicha cadena. Adicionalmente, pueden seleccionarse moléculas de ácido nucleico que sean ricas en purina, por ejemplo, que contengan un tramo de residuos G. Estas moléculas formarán una triple hélice con un dúplex de DNA que es rico en pares GC, en los cuales la mayor parte de los residuos purina están localizados en una cadena simple del dúplex direccionado, dando como resultado tripletes GGC a través de las tres cadenas del triplex.

60 Alternativamente, las secuencias potenciales que pueden direccionarse para la formación de triple hélice pueden aumentarse por creación de una denominada molécula de ácido nucleico "en zigzag". Las moléculas en zigzag se sintetizan de una manera alternante 5'-3', 3-5', de tal modo que las mismas aparean sus bases primeramente con una cadena de un dúplex y luego con la otra, eliminando la necesidad de que esté presente un tramo considerable de purinas o pirimidinas en una cadena del dúplex.

65 En los casos en que las moléculas antisentido, ribozimas, y/o de triple hélice descritas en esta memoria se utilizan para inhibir la expresión de genes mutantes, es posible que la técnica pueda reducir o inhibir tan eficientemente la transcripción (triple hélice) y/o la traducción (antisentido, ribozima) del mRNA producido por los alelos normales del

gen diana que puede presentarse la posibilidad de que la concentración del producto del gen diana normal presente pueda ser menor que lo necesario para un fenotipo normal. En tales casos, por consiguiente, con objeto de asegurar que se mantengan niveles sustancialmente normales de actividad del gen diana, las moléculas de ácido nucleico que codifican y expresan los polipéptidos del gen diana que exhiben actividad normal del gen diana pueden introducirse en células por métodos de terapia génica tales como los descritos que no contienen secuencias sensibles a la utilización de cualesquiera tratamientos antisentido, con ribozimas o de triple hélice que se estén utilizando. Alternativamente, en los casos en que el gen diana codifica una proteína extracelular, puede ser preferible co-administrar la proteína del gen diana normal a fin de mantener el nivel requerido de actividad del gen diana.

Las moléculas de RNA y DNA antisentido, de ribozima, y de triple hélice de la invención se pueden preparar por cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de moléculas de DNA y RNA, como se ha expuesto anteriormente. Éstos incluyen métodos para sintetizar químicamente oligodesoxirribonucleótidos y oligorribonucleótidos bien conocidos en la técnica, tales como por ejemplo síntesis química de fosforamiditos en fase sólida. Alternativamente, pueden generarse moléculas de RNA por transcripción *in vitro* e *in vivo* de secuencias de DNA que codifican la molécula de RNA antisentido. Tales secuencias de DNA pueden incorporarse en una gran diversidad de vectores que incorporan promotores de RNA-polimerasa adecuados tales como los promotores de polimerasa T7 o SP6. Alternativamente, pueden introducirse establemente en líneas de células constructos de cDNA antisentido que sintetizan RNA antisentido de modo constitutivo o inducible, dependiendo del promotor utilizado.

Con respecto a un aumento en el nivel de expresión del gen NK1 normal y/o de actividad del producto del gen NK1, pueden utilizarse, por ejemplo, secuencias de ácido nucleico del gen NK1 para el tratamiento de un trastorno del gen NK1 o un trastorno neuropsiquiátrico, tal como trastorno conductual, trastorno de hiperactividad con déficit de atención, auto-lesión y auto-daño, probabilidad de suicidio y alcoholismo. Dicho tratamiento puede administrarse, por ejemplo, en la forma de terapia de reemplazamiento génico. Específicamente, una o más copias de un gen NK1 normal o una porción del gen NK1 que dirige la producción de un producto del gen NK1 que exhibe la función normal del gen NK1, pueden insertarse en las células apropiadas de un paciente, utilizando vectores que incluyen, pero sin carácter limitante, adenovirus, virus adeno-asociado, y vectores retrovirales, además de otras partículas que introducen DNA en las células, tales como liposomas.

El gen NK1 se expresa en el cerebro y por consiguiente muchas técnicas de terapia de reconocimiento génico deberían ser capaces de suministrar secuencias del gen NK1 a estos tipos de células en el cuerpo de los pacientes. Así, en una realización, pueden utilizarse métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, v.g., la publicación PCT No WO 89/10134, publicada el 25 de abril de 1988) para hacer posible que las secuencias del gen NK1 atraviesen fácilmente la barrera hematoencefálica y suministren las secuencias a las células del cerebro. Con respecto a un suministro que sea capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, son preferibles vectores virales tales como, por ejemplo, los arriba descritos. Se incluyen también métodos que utilizan liposomas sea *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*, en los cuales se suministra DNA sentido o antisentido del gen NK1 al citoplasma y el núcleo de las células diana. Los liposomas pueden suministrar RNA sentido o antisentido del gen NK1 a humanos y al cerebro humano, o en mamíferos por suministro intratecal sea como parte de un vector viral o como DNA conjugado con proteínas de localización nuclear u otras proteínas que aumentan la absorción en el núcleo de la célula.

En otra realización, las técnicas para suministro implican administración directa de tales secuencias del gen NK1 al sitio de las células en el cual deben expresarse las secuencias del gen NK1. Métodos adicionales que pueden utilizarse para aumentar el nivel global de expresión del gen NK1 y/o la actividad del producto del gen NK1 incluyen la introducción de células apropiadas que expresan el gen NK1, preferiblemente células autólogas, en un paciente en posiciones y números que son suficientes para mejorar los síntomas de un trastorno del gen NK1 o un trastorno neuropsiquiátrico, tal como trastorno conductual, trastorno de hiperactividad con déficit de atención y alcoholismo. Tales células pueden ser recombinantes o no recombinantes.

Entre las células que se pueden administrar para aumentar el nivel global de expresión del gen NK1 en un paciente se encuentran células normales, preferiblemente células del cerebro así como células de plexo coroideo en el interior del CNS que son accesibles por inyecciones intratecales. Alternativamente, células, preferiblemente células autólogas, pueden modificarse por ingeniería genética para expresar secuencias del gen NK1, y pueden introducirse luego en un paciente en posiciones apropiadas para la mejora de los síntomas de un trastorno del gen NK1 o un trastorno neuropsiquiátrico, tal como trastorno conductual, trastorno de hiperactividad con déficit de atención y alcoholismo. Alternativamente, pueden utilizarse células que expresan un gen NK1 dañado y que pertenecen a un individuo con MHC coincidente, y pueden incluir, por ejemplo, células cerebrales. La expresión de las secuencias del gen NK1 está controlada por las secuencias reguladoras de genes apropiadas a fin de permitir dicha expresión en los tipos de células necesarios. Tales secuencias reguladoras de genes son bien conocidas por el profesional experto. Tales técnicas de terapia génica basada en células son bien conocidas por los expertos en la técnica, véase, v.g., Anderson, U.S. Pat. No. 5399349.

Cuando las células a administrar son células no autólogas, las mismas pueden administrarse utilizando técnicas bien conocidas que impiden el desarrollo de una respuesta inmune del hospedador contra las células introducidas. Por ejemplo, las células pueden introducirse en una forma encapsulada que, si bien permite un intercambio de componentes con el ambiente extracelular inmediato, no permite que las células introducidas sean reconocidas por el sistema inmune del hospedador.

ES 2 370 210 T3

Adicionalmente, pueden administrarse compuestos tales como los identificados por técnicas como las arriba descritas, que son capaces de modular la actividad del producto del gen NK1 utilizando métodos estándar que son bien conocidos por los expertos en la técnica. En los casos en que los compuestos a administrar impliquen una interacción con las células cerebrales, los métodos de administración deberían incluir técnicas bien conocidas que permitan el atravesamiento de la barrera hematoencefálica tales como inyección intratecal y conjugación con compuestos que permitan el paso a través de la barrera hematoencefálica.

La invención se describirá a continuación en detalle por vía de ejemplos únicamente, con referencia a las figuras, en las cuales:

La Figura 1 muestra la hiperactividad en ratones NK1^{-/-} en una caja de exploración luz/oscuridad. Efecto del genotipo NK1 sobre la actividad locomotora registrada como número de líneas atravesadas en una caja de exploración luz/oscuridad. Los valores muestran valor medio \pm s.e. del valor medio. N = 7 por grupo. *P < 0,05.

La Figura 2 muestra la hiperactividad de los ratones NK1^{-/-} en una cámara de actividad y su reducción por DMI (un fármaco utilizado para tratar el ADHD). Los valores muestran valor medio \pm s.e. del valor medio. N = 6 por grupo. Vehículo = agua. **P < 0,01 para comparaciones de grupos indicadas por las barras (ANOVA de una sola vía y test *post hoc*) Los datos confirman también que la desipramina (DMI), que es un tratamiento con fármaco para ADHD, reduce la actividad locomotora en los ratones NK1R^{-/-} pero no los ratones NK1R^{+/+}.

La Figura 3 muestra la hiperactividad de los ratones NK1^{-/-} en una caja de exploración luz/oscuridad y su reducción por DMI.

La Figura 4 muestra la impulsividad en ratones NK1^{-/-} inyectados con vehículo.

La Figura 5 muestra una comparación de la actividad de ratones de tipo salvaje y ratones knockout cuando se tratan con d-AMP o metilfenidato.

La Figura 6 muestra el efecto de los antagonistas de NK1R RP67580 o L 733060 y d-AMP sobre la actividad locomotora. Actividad locomotora de ratones NK1R^{+/+} (+) y ratones NK1R^{-/-} (-) después de la administración de solución salina (Sal) o d-anfetamina (dAMP; 2,5 mg/kg i.p.). Estos dos tratamientos se asignaron a ratones que habían sido tratados previamente con vehículo (Veh: Tween 80 en solución salina al 0,9%) o un antagonista de NK1R (RP67580 ("RP") o L 733060 ("L")) a las dosis indicadas entre paréntesis (5 ó 10 mg/kg i.p.). Las barras muestran el valor medio \pm s.e. del valor medio de la actividad locomotora media en la zona de luz de la LDEB por unidad de tiempo. Las líneas que unen los pares de grupos de tratamiento indican diferencias entre los valores medios para P \leq 0,05 (o menos).

La Figura 7 muestra que los ratones NK1^{-/-} tienen coordinación motora deteriorada.

La Figura 8 ilustra el flujo reducido de dopamina observado en el córtex frontal de los ratones NK1^{-/-}.

La Figura 9 ilustra el flujo incrementado de noradrenalina observado en el córtex frontal de los ratones NK1^{-/-}.

La Figura 10 ilustra que no existe ningún aumento inducido por d-AMP en el flujo de dopamina en los ratones NK1^{-/-}.

La Figura 11 ilustra la desensibilización de los adrenoceptores α^2_A sobre las neuronas noradrenérgicas en los ratones NK1^{-/-}.

La Figura 12 ilustra la ruptura en la dependencia predicha de d-AMP y morfina observada en los ratones NK1^{-/-}.

La Figura 13 ilustra el efecto de los bloqueantes de β -adrenoceptores sobre la hiperactividad de los ratones NK1^{-/-}.

Como se observa en la Tabla 1, los autores de la invención han identificado las características fundamentales en el ADHD y han encontrado características correspondientes en ratones NK1^{-/-}. Ciertas características han sido identificadas previamente, como se menciona en la tabla, pero la mayoría de las características no han sido identificadas previamente, ni han sido relacionadas con ADHD.

Ejemplos

Actividad locomotora e impulsividad

Protocolo de la Cámara de Exploración Luz-Oscuridad

1. Individuos

Se realizaron experimentos sobre ratones macho NK1^{-/-} ("knock-out"), y NK1^{+/+} (tipo salvaje), que pesaban 25-31 g (es decir, de aproximadamente 6-7 semanas). Los ratones se obtuvieron de un antecedente genético 129/Sv x

ES 2 370 210 T3

C57BL/6 que se había cruzado con una variedad MF1 exogámica (Harlan OLAC, Bicester, UK). Todos los ratones se obtuvieron de una colonia mantenida en el Colegio Universitario de Londres.

Los animales se alojaron en grupos de 2 a 5 por jaula bajo un ciclo 12:12 h luz/oscuridad (encendido de las luces a las 08:00 h). La temperatura y la humedad relativa se controlaron a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ y $45 \pm 5\%$, respectivamente. El alimento y el agua estaban disponibles libremente. El genotipo de cada animal se verificó *post mortem*, utilizando DNA aislado de la punta de la cola del animal, y PCR.

2. Procedimiento de comportamiento

Todos los experimentos se realizaron en ratones naif respecto al tratamiento, entre las 13:00 h y las 17:00 h. Los tests de comportamiento se realizaron en una caja de exploración luz/oscuridad fabricada de encargo (LDEB) (longitud 45 cm; anchura 20 cm; profundidad 25 cm). La caja de test estaba constituida por una pequeña “zona oscura” (longitud 15 cm; 4 lux) y una “zona de luz” mayor (longitud 30 cm; 20 lux). Las paredes y el suelo de la “zona oscura” eran de color negro. Las paredes y el suelo de la “zona de luz” eran de color blanco. El suelo de ambas zonas se marcó como una rejilla de cuadrados de 5 x 5 cm (12 en la zona oscura, 24 en la zona de luz), que se utilizó para registrar la actividad locomotora. La partición que separaba las dos zonas incorporaba una pequeña puerta de tipo guillotina (altura 10,5 cm, anchura 6,5 cm), que podía levantarse para dejar que los animales se desplazaran de lugar entre los dos compartimientos.

Ambos genotipos de ratones se asignaron aleatoriamente a uno de dos grupos de tratamiento (desipramina o vehículo; N = 7 por grupo). Los ratones individuales se habituaron primeramente, durante 90 minutos, a la zona oscura de la caja de exploración, con la puerta de guillotina cerrada. Después de los primeros 60 minutos, cada animal recibió una inyección i.p. (10 ml/kg) de [desipramina (10 mg/kg)] o vehículo (H_2O) y se pusieron luego nuevamente en la zona oscura durante 30 min más. El ratón se transfirió luego, con manipulación mínima, al centro de la zona blanca nueva (mirando a la pared). Al mismo tiempo, se levantó la puerta de guillotina para dejar que el ratón se desplace entre las dos zonas. El comportamiento del ratón se registró en vídeo durante los 30 min siguientes. Los comportamientos siguientes se registraron más tarde como “ciego”, en intervalos de 10 min:

- i) latencia para salir de la zona de luz después de entrada forzada (¿comportamiento de tipo ansiedad o impulsividad?)
- ii) latencia para volver primeramente a la zona de luz después de la primera salida (la aparición de las cuatro patas era el criterio para reentrada) (impulsividad)
- iii) número de regresos a la zona de luz (impulsividad)
- iv) número de líneas atravesadas por las cuatro patas del ratón (como índice de actividad locomotora).

3. Análisis de los datos

Los datos se analizaron por análisis de dos vías de la varianza (ANOVA) utilizando “genotipo” y “tratamiento” como factores principales. A continuación, se realizó un ANOVA de una sola vía, con “grupo” como factor, seguido por el test *post hoc* de Tukey para comparar pares de datos. Se utilizó el análisis de covarianza (ANCOVA) para controlar cualesquiera efectos de la actividad locomotora sobre otras medidas del comportamiento, utilizando la actividad locomotora como covariante en el análisis. Los datos se expresan como valores medios \pm s.e. del valor medio y se estableció $P \leq 0,05$ como el criterio para significación.

Los ratones NK1-/- exhibían actividad locomotora incrementada, especialmente en el área de luz, lo que sugería hiperactividad y latencia reducida a volver al área de luz, sugiriendo impulsividad cuando se comparaban con los ratones NK1+/. Esto se muestra en las Figuras 1, 3 y 4.

Protocolo del Medidor de Actividad

Se llevaron a cabo tests de comportamiento en una cámara estándar de actividad locomotora que comprendía una caja transparente de Perspex construida por encargo (longitud 30 cm; anchura 19 cm; profundidad 18 cm). La caja estaba situada en el centro de un medidor de actividad (410 x 410 mm, Columbia Instruments, EE.UU.) que estaba equipado con haces de rayos infrarrojos paralelos que atravesaban la cámara. La actividad ambulatoria se registró cada vez que el ratón interrumpía dos haces adyacentes. La intensidad de luz en el interior de la cámara era 82 lux.

Todos los experimentos se realizaron en ratones naif a los fármacos, entre las 14:00 h y las 18:30 h. Ambos genotipos recibieron una inyección i.p. (10 ml/kg) de vehículo (solución salina) y se repusieron luego en su jaula de residencia. 30 minutos después, se transfirió el ratón, con manipulación mínima, al centro de la cámara de actividad locomotora y se registró respecto a actividad ambulatoria. El aparato se limpió concienzudamente con agua después de cada experimento.

La Figura 2 muestra el número de interrupciones del haz para cada genotipo. Como puede verse, los ratones NK1-/- interrumpían el haz más que los ratones de tipo salvaje, lo que sugería hiperactividad.

ES 2 370 210 T3

La actividad locomotora es reducida por *d*-AMP en los ratones *NK1*^{-/-}, pero se incrementa en los ratones *NK1*^{+/+}, y el comportamiento de los ratones *NK1*^{+/+} dado un antagonista de *NK1* (RP67580 o L 733060) (“PSEUDOKNOC-KOUT”) mimetiza el de los ratones *NK1*^{-/-}.

5 Protocolo

1. Individuos

Los experimentos se realizaron sobre ratones *NK1*^{-/-} (“knockout”) y ratones *NK1*^{+/+} (“tipo salvaje”), que pesaban 10 25-35 g (es decir de aproximadamente 6-7 semanas). Los ratones se obtuvieron de un antecedente genético 129/Sv X C57BL6 que se habla cruzado con una variedad MS1 exogámica (Harlan OLAC, Bicester, UK). Todos los ratones procedían de una colonia mantenida en el Colegio Universitario de Londres.

Los ratones se alojaron en grupos de 2 a 5 por jaula bajo un ciclo luz/oscuridad 12:12 h (encendido de las luces 15 a las 08:00 h). La temperatura y la humedad relativa se controlaron a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ y $45 \pm 5\%$, respectivamente, estaban disponibles libremente comida y agua. Al final de cada experimento, se tomó una muestra de tejido de la punta de la cola de cada animal para verificación del genotipo *post mortem* por PCR.

2. Procedimientos de comportamiento

Todos los experimentos testaban el comportamiento de ratones naif (anteriormente al tratamiento) en la LDEB y se llevaron a cabo entre las 13:00 h y las 15:00 h. Cada LDEB estaba constituido por una pequeña “zona oscura” (longitud, 15 cm; anchura, 20 cm; 174 lux) y una “zona de luz” mayor (longitud 30 cm; anchura, 20 cm; 346 lux). Las paredes y el suelo de la “zona oscura” eran de color negro. Las paredes y el suelo de “jaula de luz” eran de color 25 blanco. El suelo de ambas zonas se marco como una rejilla de cuadrados de 5 x 5 cm (12 en la zona oscura, 24 en la zona de luz) que se utilizó para registrar la actividad locomotora. La partición que separaba las dos zonas incorporaba una pequeña puerta de tipo guillotina (blanca) (altura 10,5 cm, anchura 7,5 cm), que podía levantarse para dejar que los animales se desplazaran entre los dos compartimientos. Los ratones se testaron en parejas en dos LDEBs colocadas una al lado de la otra. A las 13:00 h, cada ratón se colocó en la zona oscura de un LDEB, con la puerta de comunicación 30 cerrada. Después de 30 min en la zona oscura, los ratones de cada genotipo se asignaron aleatoriamente a uno de 6 grupos de tratamiento ($n = 3 \sim 4$) y se les administró una inyección (10 ml/kg; i.p.) de vehículo (una gota de Tween 80 en solución salina hasta el volumen apropiado) o el antagonista de *NK1*, RP67580 (5 ó 10 mg/kg). Se administró a los mismos individuos una segunda inyección de solución salina o *d*-anfetamina (2,5 mg/kg, i.p), 30 minutos más tarde.

35 Para cada genotipo, los grupos de tratamiento eran:

	Inyección 1	Inyección 2
40	-- Vehículo	Vehículo
	-- RP67580 (5)	Vehículo
45	-- RP67580 (10)	Vehículo
	-- Vehículo	<i>d</i> -AMP
	-- RP67580 (5)	<i>d</i> -AMP
50	-- RP67580 (10)	<i>d</i> -AMP

A las 14:30 h, se transfirió cada ratón al centro de la nueva zona de luz, orientado hacia el lado opuesto a la puerta 55 de tipo guillotina. Se levantó inmediatamente la puerta para dejar que los animales se desplazaran libremente entre los dos compartimientos. Su comportamiento se registró con una grabadora de vídeo Sony Handycam Vision durante 30 minutos. El número de líneas atravesadas por las cuatro patas del ratón (como índice de la actividad locomotora) se registró “ciego” en intervalos de 5 min.

60 En un segundo experimento, se repitió este protocolo, sustituyendo el antagonista de *NK1*, L733060 (5 mg/kg) en lugar de RP67580. Todos los detalles restantes (con inclusión del vehículo Tween) eran iguales.

3. Fármacos y reactivos

65 Se administró RP67580 a 5 ó 10 mg/kg; se disolvió en una gota de Tween 80 y se ajustó a la concentración apropiada por adición de solución salina al 0,9%. Se utilizó la misma mixtura como vehículo para la primera inyección de ratones de control. Se disolvió *d*-AMP (2,5 mg/kg) (Sigma, Poole, UK) en solución salina al 0,9% que se utilizó como el vehículo para la segunda inyección. RP67580 y L733060 se adquirieron de Tocris (Avonmouth, UK).

ES 2 370 210 T3

4. Análisis de los datos

Los datos se analizaron por ANOVA de 3 vías (experimento de test de RP67580) o de dos vías (para L733050) utilizando “genotipo”, “fármaco” y “dosis” (en caso apropiado) como factores principales. A continuación, se analizó un ANOVA de una sola vía, con “grupo” como factor, seguido por el test *post hoc* de Tukey para comparar pares de grupos. Los datos se expresan como valores medios \pm s.e. del valor medio y se estableció $P \leq 0,05$ como el criterio para significación.

Como puede verse por las Figuras 5 y 6, la actividad locomotora se reduce por d-AMP en los ratones NK1-/-, pero aumenta en los ratones NK1+/, mimetizando el efecto que tiene d-AMP en los humanos con y sin ADHD.

La actividad locomotora se reduce por el metilfenidato en los ratones NK1-/- pero aumenta en los ratones NK1+/+.

Protocolo

1. Individuos

Se realizaron experimentos en ratones macho NK1-/- (“knock-out”) y NK1+/+ (tipo salvaje), que pesaban 25-35 g (es decir de aproximadamente 6-7 semanas). Los ratones se obtuvieron de un antecedente genético 129/Sv X C57BL/6 que había sido cruzado con una variedad exogámica MF1 (Harlan OLAC, Bicester, UK). Todos los ratones procedían de una colonia mantenida en el Colegio Universitario de Londres.

Los ratones se alojaron en grupos de 2 a 5 por jaula con un ciclo de 12:12 horas luz/oscuridad (encendido de las luces a las 08:00 h). La temperatura y la humedad relativa se controlaron a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ y $45 \pm 5\%$, respectivamente. Estaban disponibles libremente comida y agua. Al final de cada experimento, se tomó una muestra de tejido de la punta de la cola de cada animal para verificación del genotipo *post mortem* por PCR.

2. Procedimientos de comportamiento

Todos los experimentos testaron el comportamiento de los ratones naif (previamente al tratamiento) en la LDEB y se realizaron entre las 13:00 h y las 15:00 h. Cada LDEB estaba constituida por una pequeña “zona oscura” (longitud, 15 cm; anchura, 20 cm; 174 lux) y una “zona de luz” mayor (longitud, 30 cm; anchura 20 cm; 346 lux). Las paredes y el suelo de la “zona oscura” eran de color negro. Las paredes y el suelo de la “zona de luz” eran de color blanco. El suelo de ambas zonas estaba marcado como una rejilla de cuadrados de 5 x 5 cm (12 en la zona oscura, 24 en la zona de luz) que se utilizó para registrar la actividad locomotora. La partición que separaba las dos zonas incorporaba una pequeña puerta (blanca) de tipo guillotina (altura 10,5 cm, anchura 7,5 cm), que podía levantarse para dejar que los animales se desplazaran entre los dos compartimientos. Los ratones se testaron por pares en dos LDEBs, situadas una al lado de la otra. A las 13:00 h, se colocó cada ratón en la zona oscura de una LDEB, con la puerta de separación cerrada. Después de 60 minutos en la zona oscura, los ratones se asignaron aleatoriamente a uno de dos grupos de tratamiento para cada genotipo ($n = 9$ por grupo) y se les administró una inyección (10 ml/kg; i.p.) de vehículo (solución salina) o metilfenidato (2,5 mg/kg, i.p.). 30 minutos más tarde, se transfirieron los ratones al centro de la nueva zona de luz, orientados hacia el lado opuesto de la puerta de tipo guillotina. Se levantó inmediatamente la puerta para dejar que los animales se desplazaran libremente entre los dos compartimientos. Su comportamiento se registró con una grabadora de vídeo Sony Handycam Vision durante 30 min. El número de líneas cruzadas por las cuatro patas del ratón (un índice de la actividad locomotora) se registró como “ciego”, en intervalos de 10 min.

3. Fármacos y reactivos

El vehículo era solución salina al 0,9% (Sigma, Poole, UK). El metilfenidato se obtuvo de (Sigma, Poole, UK) y se administró a 2,5 mg/kg (i.p. 10 ml/kg); disuelto en solución salina al 0,9%.

4. Análisis de los datos

Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías utilizando “genotipo” y “tratamiento” como factores principales. A continuación, se realizó un ANOVA de una sola vía, con “grupo” como factor, seguido por el test *post hoc* Tukey para comparar pares de datos. Los datos se expresan como valores medios \pm s.e. del valor medio y se ajustó $P \leq 0,05$ como criterio para significación.

La Figura 5 ilustra la actividad locomotora incrementada observada en ratones NK1 +/+ y la actividad reducida observada en los ratones NK1-/- después de la administración de metilfenidato. Como en los experimentos anteriores, la latencia reducida para salir o volver de la zona de luz es sugestiva de impulsividad.

Coordinación motora y aprendizaje en la rotarod

1. Protocolo

Se colocaron individualmente los ratones sobre el tambor rotativo de un Tapiz Rodante RotaRod (para ratones: Ugo-Basile, Comerio, Italia) ajustado para girar a una velocidad fija (10, 20, 40 rpm), o para acelerar desde 5 a 40

ES 2 370 210 T3

rpm, durante 3 min. Se registró el tiempo transcurrido hasta la caída de cada ratón. Cada ratón se sometió a 10 pruebas en el RotaRod en la barra giratoria por día.

Como puede verse por la Figura 7, los ratones NK1-/- exhibían coordinación y aprendizaje deteriorados.

Dopamina extracelular basal reducida en el córtex frontal de los ratones NK1-/- que se mueven libremente.

Protocolos

1. Individuos

Se realizaron experimentos en ratones macho NK1-/- (“knock-out”) y NK1+/+ (tipo salvaje), que pesaban 25-35 g (es decir de aproximadamente 6-7 semanas). Los ratones se obtuvieron de un antecedente genético 129/Sv X C57BU6 que había sido cruzado con una variedad exogámica MF1 (Harlan OLAC, Bicester, UK). Todos los ratones procedían de una colonia mantenida en el Colegio Universitario de Londres.

Los ratones se alojaron en grupos de 2 a 5 por jaula con un ciclo de 12:12 horas luz/oscuridad (encendido de las luces a las 08:00 h). La temperatura y la humedad relativa se controlaron a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ y $45 \pm 5\%$, respectivamente. Estaban disponibles libremente comida y agua. Se tomó una muestra de tejido de la punta de la cola de cada animal para verificación del genotipo, *post mortem*, por PCR.

2. Procedimientos quirúrgicos y microdiálisis

Se construyeron sondas de microdiálisis en la propia empresa y se equiparon con membrana de cuprofán (diámetro interior 200 μm , diámetro exterior 250 μm , corte por peso molecular 5 kD; Medicell International Ltd., Inglaterra) formando una ventana activa de diálisis de 2 mm. Se indujo la anestesia en una cámara cerrada que suministraba 2,0% de halotano combinado con 95% O₂/5% CO₂ a 2 l/min. Los ratones se pusieron luego en un bastidor estereotáxico y se mantuvo la anestesia, por medio de una máscara facial, con 1,5% de halotano en 95% O₂/5% CO₂ (2 l/min).

Se practicó una pequeña incisión en el cuero cabelludo para dejar al descubierto el cráneo y descubrir el bregma. A continuación, después de craneotomía, se implantó una sonda de microdiálisis, cebada con solución de Ringer modificada (NaCl 145 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 1,3 mM, pH 6,8), en el córtex frontal (AP + 2,1 mm, ML + 1,0 mm, DV - 2,0 mm). Se monitorizaron continuamente los signos vitales para asegurar una frecuencia respiratoria de 100-190/min (valor medio: $135 \pm 20/\text{min}$). La temperatura corporal central se mantuvo a 38°C utilizando un lecho de agua templada.

Después de la implantación, la sonda se ancló al cráneo con cemento dental y los ratones se dejaron recuperar luego de la anestesia durante una noche. La microdiálisis se llevó a cabo al día siguiente, durante la cual las sondas se perfundieron con solución de Ringer modificada a una tasa de 1,5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Después de un periodo de eliminación por lavado (equilibración) de 1,5 h, se recogieron muestras de diálisis a intervalos de 20 min y se tomó como la línea base un flujo estable durante al menos 3 muestras consecutivas.

3. HPLC y detección electroquímica

La dopamina en las muestras de diálisis se separó por cromatografía de pares iónicos en fase inversa en una columna Hypersil ODS de 5 μm (250 x 4,6 ml) mantenida a la temperatura ambiente y protegida por una columna de guarda Aquapore (30 x 4,6 mm). La fase móvil contenía ácido octano-sulfónico 0,23 mM, dihidrogeno-ortofosfato de sodio 83 mM, EDTA 0,84 mM, metanol al 17%, ajustado a pH 4,0 y se bombeó a través del sistema a 1,0 ml/min. La dopamina en la muestra se detectó utilizando un detector Coulochem II (ESA) y la fase móvil se acondicionó por una célula de guarda (ESA modelo 5020). Los cromatogramas se procesaron utilizando un integrador Spectraphysics Chromjet. El contenido de dopamina de las muestras se calculó a partir de la altura de pico del cromatograma con referencia a estándares externos. No se hizo colección alguna para recuperación de la sonda.

4. Fármacos y reactivos

El halotano se adquirió de University College Hospital (Pharmacy). Los reactivos tampón eran de grado AnalaR o HPLC y se adquirieron de BDH/VWR.

5. Análisis de los datos

Los datos brutos de la microdiálisis se analizaron utilizando medidas ANOVA repetidas (SPSS PC⁺). La significación de la diferencia en el flujo de dopamina se evaluó utilizando medidas repetidas por ANOVA de dos vías en las cuales se trató “tiempo” como un factor “dentro de los individuos” y se trató “genotipo” como un factor “entre los individuos”. Se aplicó la corrección “ ϵ ” de Greenhouse - Geisser para corregir por cualquier violación de la esfericidad de la matriz varianza-covarianza. El criterio para significación estadística se ajustó a $P \leq 0,05$.

Como se ve en la Figura 8, los ratones NK1-/- exhibían un flujo basal reducido de dopamina cuando se comparaban con los ratones NK1+/+.

ES 2 370 210 T3

Aflujo basal incrementado de noradrenalina en el córtex frontal de los ratones NK-/-.

Protocolos

5 1. Individuos

Los experimentos se realizaron sobre ratones macho NK1-/- (“knock-out”) y NK1+/+ (tipo salvaje), que pesaban 25-31 g (es decir de aproximadamente 6-7 semanas). Los ratones se obtuvieron de un antecedente genético 129/Sv X C57BL/6 que había sido cruzado con una variedad exogámica MF1 (Harlan OLAC, Bicester, UK). Todos los ratones procedían de una colonia mantenida en el Colegio Universitario de Londres.

Los ratones se alojaron en grupos de 2 a 5 por jaula con un ciclo de 12:12 horas luz/oscuridad (encendido de las luces a las 08:00 h). La temperatura y la humedad relativa se controlaron a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ y $45 \pm 5\%$, respectivamente. Estaban disponibles libremente comida y agua. Al final de cada experimento se tomó una muestra de tejido de la punta de la cola de cada animal para verificación del genotipo *post mortem* por PCR.

2. Procedimientos quirúrgicos y microdiálisis

Se construyeron sondas de microdiálisis en la propia empresa y se equiparon con membrana de cuprofán (diámetro interior 200 μm , diámetro exterior 250 μm , corte por peso molecular 5 kD; Medicell International Ltd, Inglaterra) formando una ventana activa de diálisis de 1,5 mm. Se indujo la anestesia en una cámara cerrada que suministraba 2,0% de halotano combinado con 30% O_2 /70% N_2 a 2 l/min. Los ratones se pusieron luego en un bastidor estereotáxico y se mantuvo la anestesia, por medio de una máscara facial, con 1,5% de halotano en 30% O_2 /70% N_2 (2 l/min).

Se practicó una pequeña incisión en el cuero cabelludo para dejar al descubierto el cráneo y descubrir el bregma. A continuación, después de la craneotomía, se implantó una sonda de microdiálisis, cebada con solución de Ringer modificada (NaCl 145 mM, KCl 4 mM, CaCl_2 1,3 mM, pH 6,8), en 2,0 mm) en la región M2 del córtex cerebral (AP + 2,1 mm, ML \pm 1,0 mm, DV -2,0 mm).

Después de la implantación de la sonda, los ratones se mantuvieron bajo anestesia durante toda la duración del experimento. Los signos vitales se monitorizaron continuamente para asegurar una frecuencia respiratoria de 100-190/min (valor medio 135 ± 20 /min). La temperatura corporal central se mantuvo a 38°C utilizando un lecho de agua templada. Se inyectó subcutáneamente solución salina estéril (0,9%, 0,1 ml) una vez por hora, a fin de prevenir la deshidratación.

3. Microdiálisis

Se perfundieron sondas de microdiálisis con solución de Ringer modificada a una tasa de 1,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ y se recogieron muestras de diálisis a intervalos de 20 min, comenzando 20-40 min después de la implantación. Se tomó como línea base un eflujo estable durante un mínimo de 3 muestras consecutivas. Al final de cada experimento, los ratones se sacrificaron con una sobredosis de anestésico y dislocación cervical, seguida inmediatamente por extirpación del cerebro, que se guardó en formalina al 10% a 4°C . La posición correcta de la sonda se confirmó en secciones coronales por referencia al atlas de Paxinos y Franklin (2001). No fue necesario excluir dato alguno basándose en la implantación incorrecta de la sonda.

4. HPLC y detección electroquímica

El contenido de noradrenalina de las muestras de diálisis se determinó por HPLC acoplada a detección electroquímica. Los solutos se separaron por cromatografía de pares iónicos en fase inversa en una columna Hypersil ODS de 5 μm (250 x 4,6 mm) mantenida a la temperatura ambiente y protegida por una columna de guarda Aquapore (30 x 4,6 mm). La fase móvil contenía ácido octano-sulfónico 2 mM, dihidrogeno-ortofosfato de sodio 100 mM, EDTA 0,67 mM, metanol al 12%, ajustado a pH 3,75 y se bombeó a través del sistema a 1,0 ml/min. La noradrenalina se detectó utilizando un detector Coulochem II (ESA) y la fase móvil se acondicionó por una celdilla de guarda (ESA modelo 5020). Los cromatogramas se procesaron utilizando software Turtoochrome 4.1 (Perkin Elmer, EE.UU.). El contenido de noradrenalina de las muestras se calculó a partir de la altura de pico del cromatograma con referencia a un estándar externo. No se realizó corrección alguna para recuperación de la sonda.

5. Fármacos y reactivos

El halotano se adquirió de Rhodia (Bristol, UK). Los reactivos tampón eran de grado de AnalaR o HPLC.

6. Análisis de los datos

Los datos brutos de la microdiálisis se analizaron utilizando medidas ANOVA repetidas (SPSS PC⁺). La significación de la diferencia en el eflujo de noradrenalina se evaluó utilizando medidas repetidas por ANOVA de dos vías en las cuales se trató “tiempo” como un factor “dentro de los individuos” y se trató “genotipo” como un factor “entre los individuos”. Se aplicó la corrección “ ϵ ” de Greenhouse - Geisser para corregir por cualquier violación de la esfericidad de la matriz varianza-covarianza. El criterio para significación estadística se ajustó a $P \leq 0,05$.

ES 2 370 210 T3

La Figura 9 ilustra que se encontró que los ratones NK1-/- tienen un flujo incrementado de noradrenalina en el córtex frontal.

5 *La d-anfetamina aumenta la dopamina extracelular en el córtex frontal (M1)/cuerpo estriado dorsal de los ratones NK1+/+, pero no de los ratones NK1-/-.*

Protocolo

1. Individuos

10

Los experimentos se realizaron sobre ratones macho NK1-/- (“knock-out”) y NK1+/+ (tipo salvaje), que pesaban 25-35 g (es decir de aproximadamente 6-7 semanas). Los ratones se obtuvieron de un antecedente genético 129/Sv X C57BL/6 que había sido cruzado con una variedad exogámica MF1 (Harlan OLAC, Bicester, UK) Todos los ratones procedían de una colonia mantenida en el Colegio Universitario de Londres.

15

Los ratones se alojaron en grupos de 2 a 5 por jaula con un ciclo de 12:12 horas luz/oscuridad (encendido de las luces a las 08:00 h). La temperatura y la humedad relativa se controlaron a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ y $45 \pm 5\%$, respectivamente. Estaban disponibles libremente comida y agua. Se tomó una muestra de tejido de la punta de la cola de cada animal para verificación *post mortem* del genotipo por PCR.

20

2. Procedimientos quirúrgicos y microdiálisis

25

Se construyeron sondas de microdiálisis en la propia empresa y se equiparon con membrana de cuprofán (diámetro interior 200 μm , diámetro exterior 250 μm , corte por peso molecular 5 kD; Medicell International Ltd., Inglaterra) formando una ventana activa de diálisis de 3,5 mm. Se indujo la anestesia en una cámara cerrada que suministraba 2,0% de halotano combinado con 95% O₂/5% CO₂ a 2 l/min. Los ratones se pusieron luego en un bastidor estereotáxico y se mantuvo la anestesia, por medio de una máscara facial, con 1,5% de halotano en 95% O₂/5% CO₂ (2 l/min).

30

Se practicó una pequeña incisión en el cuero cabelludo para dejar al descubierto el cráneo y descubrir el bregma. A continuación, después de la craneotomía, se implantó en el cuerpo estriado (AP + 1,1 mm, ML + 1,5 mm, DV -3,3 mm) una sonda de microdiálisis, cebada con solución de Ringer modificada (NaCl 145 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 1,3 mM, pH 6,8). Los signos vitales se monitorizaron continuamente para asegurar una frecuencia respiratoria de 100-190/min (valor medio: $135 \pm 20/\text{min}$). La temperatura corporal central se mantuvo a 38°C utilizando un lecho de agua templada. La colocación de la sonda se fijó con gel de cianoacrilato, después de lo cual se dejó que los animales se recuperaran de la anestesia. Los experimentos se analizaron al día siguiente.

35

40

Las sondas de microdiálisis se perfundieron con solución de Ringer modificada a una tasa de 1,5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Después de un periodo de eliminación por lavado (equilibración) de 1,5 h, se recogieron muestras de diálisis a intervalos de 20 min. Las exposiciones a los fármacos iniciadas después de la recogida de un mínimo de 3 muestras basales consecutivas confirmaron una línea base estable.

3. Protocolos de microdiálisis

45

Se asignaron aleatoriamente ratones de ambos genotipos a uno de dos grupos de tratamiento, destinados para inyección i.p. de solución salina o d-anfetamina (5 mg/kg i.p). Después de la recogida de 3 muestras, mientras los animales se encontraban en su jaula de residencia se transfirieron los ratones (individualmente) a la zona oscura de una caja de exploración luz/oscuridad. Después de 60 min (durante cuyo tiempo el flujo de la línea base se estabilizó después de la manipulación/transferencia a la LDEB), se inyectaron luego los ratones con solución salina o d-anfetamina Después de 30 min más, se transfirieron y se confinaron los animales a/en la zona de luz del LDEB durante una hora. Se recogieron muestras de microdiálisis durante todo el tiempo a intervalos de 20 min.

50

55

Al final de cada experimento, se sacrificaron los ratones y se extirpó el cerebro. Se guardó éste en formalina al 10% a 4°C para confirmación de la posición correcta de la sonda. No fríe necesario excluir dato alguno basándose en la implantación incorrecta de la sonda.

4. HPLC y detección electroquímica

60

El contenido de dopamina de las muestras de diálisis se determinó por HPLC acoplada a detección electroquímica. Los solutos se separaron por cromatografía de pares iónicos en fase inversa en una columna Hypersil ODS de 5 μm (250 x 4,6 mm) mantenida a la temperatura ambiente y protegida por una columna de guarda Aquapore (30 x 4,6 mm). La fase móvil contenía ácido octano-sulfónico 0,23 mM, dihidrogeno-ortofosfato de sodio 83 mM, EDTA 0,84 mM, metanol al 17%. ajustado a pH 4,0 y se bombeó a través del sistema a 1,0 ml/min. La dopamina se detectó utilizando un detector Coulochem II (ESA) y la fase móvil se acondicionó por una celdilla de guarda (ESA modelo 5020). El contenido de noradrenalina de las muestras se calculó a partir de la altura de pico del cromatograma con referencia a un estándar externo. No se realizó corrección alguna por recuperación de la sonda.

65

5. Fármacos y reactivos

El sulfato de *d*-anfetamina se obtuvo de Sigma-Aldrich (Poole, UK). El halotano se adquirió de UCH (Pharmacy). Los reactivos tampón eran de grado AnalaR o HPLC.

6. Análisis de los datos

Los datos de la microdiálisis se analizaron utilizando medidas ANOVA repetidas (SPSS PC⁺). El cambio incremental en el flujo de dopamina, después de la inyección de *d*-anfetamina se calculó restando el flujo medio de las 3 muestras basales consecutivas (tomadas antes de la administración del fármaco y mientras el animal se encontraba todavía en su jaula) de todas las muestras experimentales. La diferencia en el cambio en flujo de noradrenalina inducido por *d*-anfetamina se evaluó utilizando las medidas ANOVA repetidas de dos vías. Se aplicó la corrección “ ϵ ” de Greenhouse-Geisser para corregir por cualquier violación de la esfericidad de la matriz varianza-covarianza. El criterio para significación estadística se ajustó a $P \leq 0,05$.

Como se muestra en la Figura 10, *d*-AMP aumentaba la dopamina extracelular en el córtex frontal/cuerpo estriado de los ratones NK1+/+ pero no de los ratones NK1-/-.

Los A2A-autorreceptores en los cuerpos de las células NA están desensibilizados en los ratones NK1-/-.

Protocolo

1. Fijación de [³⁵S]GTP γ S

El estatus funcional de los α_2 adrenoceptores acopiados a proteína G en los ratones NK1+/+ y NK1-/- se comparó después de la fijación estimulada por el agonista de [³⁵S]GTP γ S (no hidrolizable) a los adrenoceptores α_2 en el locus coeruleus y en el córtex frontal. La fijación de [³⁵S]GTP γ S a los adrenoceptores α_2 se estimó esencialmente como ha sido descrito por Sim *et al.* (1995). La recogida del cerebro y el almacenamiento, y la preparación del tejido de los ratones NK1+/+ y NK1-/- se realizó como se ha descrito arriba. Secciones coronales (15 μ m) se llevaron a la temperatura ambiente durante 30 min. Las mismas se incubaron luego (15 min) en HEPES 50 mM sal de sodio (pH 7,5) que contenía (mM) NaCl (100), MgCl₂ (3), EGTA (0,2), DTT (2). 15 minutos más tarde, la solución tampón se reemplazó por tampón HEPES, que contenía GDP, sal dilútica, a lo cual se había añadido el antagonista del receptor A₁ (adenosina), 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX) para reducir la marcación del ruido de fondo. Se incubaron luego secciones durante 3 horas a 30°C en tampón que contenía [³⁵S]GTP γ S 0,1 μ M. Secciones paralelas incluían bitartrato de adenosina 100 μ M para estimular el acoplamiento de los adrenoceptores α_{2A} a su proteína G. La fijación inespecífica se determinó por co-incubación con el antagonista del adrenoceptor α_2 , RX821002 (100 mM). La incubación se paró por inmersión en agua enfriada por hielo y, después de secado rápido en aire frío, se expusieron las secciones a película Biomax (Kodak) durante 2-3 días. La fijación específica de [³⁵S]GTP γ S se evaluó utilizando un dispositivo Microcomputer Imaging.

2. Análisis de los datos

Los datos de la autorradiografía cuantitativa se analizaron utilizando el test t apareado o ANOVA de una vía con tests *t post hoc* (con la corrección de Bonferroni, en caso apropiado).

3. Fármacos y reactivos

Bitartrato de adrenalina, 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX), glicilglicina-HCl, guanosina 5'-O-(3-tiotri-fosfato) (GTP γ S), guanosina-5'-difosfato de sodio (GDP), y ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter-N,N,N',N'-tetra-acético (EGTA), se adquirieron todos ellos de Sigma-Aldrich (Poole, UK). El ditiotreitol se adquirió de BDH (UK). RX 821002 (2-metoxi-idazoxan)-hidrocloruro (Tocris, Bristol, UK). Los reactivos tampón eran de grado AnalaR o HPLC. El GTP γ S se adquirió de NEN Life Sciences.

La Figura 11 muestra que los adrenoceptores α_2A en las neuronas noradrenérgicas estaban desensibilizados en el locus coeruleus de los ratones NK1-/-.

Ruptura del comportamiento en los roedores que predice dependencia de d-anfetamina y morfina en humanos.

Protocolo

1. Individuos

Los ratones NK1-/- y hermanos de carnada NK1+/+ se obtuvieron del apareamiento de ratones heterocigóticos NK1+/- . El constructo de direccionamiento se derivaba de una biblioteca genómica de la variedad de ratón 129/sv y se inyectaron clones direccionados en blastocistos C57BL/6. Los machos quiméricos se aparearon con hembras C57BL/6. Los ratones se criaron por generaciones sucesivas de ratones hermanos knockout y de tipo salvaje y pueden considerarse como representativos de una variedad recombinante endogámica. Para CPP se testaron también ratones que eran C57/B6 o 129/sv puros y éstos se comportaban exactamente como los ratones de tipo salvaje.

2. Preferencia de sitio

El aparato y el procedimiento de acondicionamiento se han descrito en Wise RA & Bozarth MAA. Psychol Rec 97:469. El análisis de CPP sin privación de alimento se evaluó en animales con acceso limitado a alimento (15% del peso del cuerpo del ratón como alimento con adición de sacarosa) durante 6 días antes del test. La fase de acondicionamiento se realizó con acceso a alimento durante los días 1, 3 y 5 y sin acceso alguno a alimento durante los días 2, 4 y 6. Los animales de control no tenían acceso alguno a alimento en los compartimientos asignados durante esta fase. En la condición de privación de alimento, los ratones se privaron de alimento la noche anterior al test.

3. Acondicionamiento de sitio aversivo

Véase Matthes HW *et al.* (1996). Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. Nature 383: 819. Se indujo dependencia de morfina con administración intraperitoneal de morfina dos veces al día. Las dosis de morfina inyectadas a las 9:00 y las 19:00 durante días consecutivos eran 1, 10 mg/kg; día 2, 20 mg/kg; día 3, 30 mg/kg; día 4, 40 mg/kg; y días 5-7, 50 mg/kg. La fase de acondicionamiento estaba constituida por dos días consecutivos de inyección alternativa de naloxona o vehículo. Una hora después de la inyección de morfina durante la mañana, los animales se inyectaron intraperitonealmente con naloxona (día 1, 1 mg/kg) o solución salina (día 2) y se confinaron inmediatamente durante 20 min en el compartimiento apropiado.

Como puede verse por la Figura 12, los comportamientos que predicen dependencia de *d*-anfetamina y morfina en humanos estaban alterados en los ratones NK1^{-/-}. (Murtra *et al.*, (2000) Rewarding effects of opiates are absent in mice lacking the receptor for substance P Nature. 405(6783): 180-3).

Efecto de betaxolol y desipramina sobre la actividad locomotora

El efecto de betaxolol y desipramina se testó utilizando protocolos similares a los empleados para testar el efecto de *d*-anfetamina. Los resultados se muestran en las Figuras 2, 3 y 13. Los resultados con betaxolol (Figura 13) confirman que no todos los fármacos que aumentan la actividad locomotora en los ratones de tipo salvaje reducen la misma en los ratones NK1^{-/-}.

Identificación del papel del gen NK1 en el trastorno de conducta, trastorno de hiperactividad con déficit de atención y alcoholismo

Materiales y métodos

Desequilibrio de Enlace. Se realizaron estudios de desequilibrio de enlace (LD) utilizando DNA de una muestra de población procedente de pacientes con trastorno neuropsiquiátrico (trastorno de conducta, trastorno de hiperactividad con déficit de atención y alcoholismo). La muestra de población y las técnicas LD hieran como se describe más adelante. El presente estudio LD aprovechó la ventaja del descubrimiento de marcadores físicos adicionales identificados por el mapeado físico y las técnicas de secuenciación descritas a continuación.

Mapeado del cromosoma bacteriano artificial (BAC). Para el mapeado físico, cromosomas bacterianos artificiales (BACs) que contenían secuencias humanas se mapearon a la región a analizar basándose en mapas disponibles al público (Base de Datos del Genoma Humano, Toronto 1999). Los BACs se ordenaron luego y se reconstruyó el cóntigo por realización de mapeado estándar con marcadores microsatélite y SNP's polimórficos.

Resultados

El alcoholismo está fuertemente asociado con el trastorno de conducta en la infancia, el trastorno de hiperactividad con déficit de atención y la probabilidad de suicidio. Por consiguiente, es muy probable que las características de personalidad heredadas que conducen a estos tres trastornos sean también factores que aumentan la sensibilidad al alcoholismo. Con objeto de identificar los loci genéticos para estos síndromes, el Gran Consorcio de los EE.UU. (COGA) ha venido realizando estudios de enlace genético del alcoholismo con los trastornos comórbidos. Este grupo ha publicado la evidencia de enlace con varios fenotipos clínicos en el cromosoma 2p13.1. Éstos consisten en probabilidad de suicidio (Lod 4.2) y trastorno de conducta (Lod 2.2) combinados con alcoholismo. Los registros Lod positivos están ambos muy próximos unos a otros y están localizados en la rama corta del cromosoma 2 en la región 2p13.1. El Receptor 1 de Taquiquinina Humana (NK1) está posicionado bajo la parte media de los picos máximos de registro Lod de COGA en 2p13.1 (Dick *et al.* 2004, Hesselbrock *et al.* 2004, Wiener *et al.* 2005). Por esta razón, cuando se observa a la luz de las características de comportamiento del ratón knockout NK1, el locus NK1 humano es un locus potencial para aumentar la susceptibilidad al alcoholismo humano, el trastorno de déficit de atención, el trastorno de conducta y la probabilidad de suicidio. Los autores han podido testar esta hipótesis realizando un mapeado fino en una muestra de un control de caso basada en UCL. Dicha muestra tiene el poder de implicar genes específicos en oposición a los estudios de enlaces de familia de COGA que pueden implicar únicamente regiones de cromosomas.

Antes de intentar identificar secuencias génicas, se realizaron estudios para estrechar ulteriormente la región del trastorno neuropsiquiátrico. Específicamente, se realizó un análisis de desequilibrio de enlace (LD), asociación alélica y análisis haplotípico utilizando muestras de población y técnicas que se describen en la Tabla 5 y más adelante.

Se genotipificaron siete polimorfismos, que se describen aquí por primera vez, en una muestra de 600 individuos alcohólicos de ascendencia en el Reino Unido y 600 controles normales apareados ancestralmente. Los alcohólicos tenían también trastorno de hiperactividad con déficit de atención, trastorno de déficit de atención, criminalidad, trastorno de conducta y trastorno antisocial asociados.

Ninguno de los marcadores SNP genotipificados por los autores de la invención en la muestra de control de caso exhibía desviación alguna del equilibrio de Hardy Weinberg, lo que respalda la exactitud de la genotipificación. Los resultados eran interesantes, dado que el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), rs3771856 en el intrón 1 de NK1 exhibía evidencia de asociación alélica ($p = 0,006$) y genotípica ($p = 0,026$) con el alcoholismo. Estos datos de control de caso se analizaron también en cuanto a asociación haplotípica con el alcoholismo. En este procedimiento los marcadores que están muy próximos unos a otros en NK1 se combinan en haplotipos y se comparan las frecuencias estimadas en los casos y los controles. Como se muestra en la Tabla 5, se encontró que un número de 2, 3 y 4 haplotipos marcadores de NK1 estaban significativamente asociados con el síndrome de dependencia del alcohol después de corrección por alelos múltiples y marcadores múltiples. Las significaciones empíricas eran $p = 0,002$ para un haplotipo de dos marcadores con frecuencias estimadas de 43% en los controles y 51% en los casos. Ambos test empíricos de significación de 3 y 4 marcadores exhibían también asociación haplotípica significativa con el alcoholismo ($p = 0,009$, $p = 0,006$ respectivamente). Esto demuestra que la variación en NK1 aumenta la susceptibilidad genética al alcoholismo y fenotipos afines tales como ADHD conducen a trastorno y probabilidad de suicidio. La determinación del genotipo del marcador rs3771856 se validó en el laboratorio de UCL utilizando un segundo método de determinación del genotipo (TaqMan).

TABLA 1

SUMARIO DE LAS CARACTERÍSTICAS FUNDAMENTALES DEL ADHD EN HUMANOS Y DESCUBRIMIENTOS EN RATONES NK1^{-/-}	
ADHD en humanos	Descubrimientos en ratones NK1^{-/-} comparados con ratones NK1^{+/+}
Efecto paradójico de los estimulantes psicomotores	La actividad locomotora se reduce por d-AMP y metilfenidato en los ratones NK1 ^{-/-} pero aumenta en los ratones NK1 ^{+/+}
Hiperactividad, especialmente en un entorno aversivo (v.g. nuevo)	*Actividad locomotora incrementada, especialmente en la zona nueva de una caja de exploración luz/oscuridad
Impulsividad y falta de atención incrementadas	Latencia reducida a regresar a la nueva arena desde una zona familiar. Visitas más breves pero más frecuentes a la nueva arena de test
'Propenso a accidentes'/torpe'	*Coordinación motora & aprendizaje deteriorados en el test RotaRod
Se asemeja a la hipofrontalidad (la determinación del genotipo y la obtención de neuroimágenes sugieren transmisión DA deteriorada)	*DA basal extracelular reducida en el córtex frontal de los ratones NK1 ^{-/-} d-AMP aumenta la DA extracelular en el cuerpo estriado de los ratones NK1 ^{+/+} , únicamente
Evidencia de transmisión de NA incrementada	*Liberación de NA incrementada en el córtex frontal
Función de los adrenoceptores α_{2A} posiblemente deteriorada (como en el modelo de rata Espontáneamente Hipertensa de ADHD)	*Autorreceptores α_{2A} en los cuerpos de las células NA desensibilizados
Menor incidencia de la dependencia de d-AMP en humanos con ADHD	Ruptura de los comportamientos en los roedores que predicen dependencia de d-anfetamina y morfina en humanos

Tabla 2, que muestra el valor p empírico (1ª columna) de un test de permutación para asociación entre dos, tres y finalmente cuatro haplotipos de marcadores SNP con el alcoholismo. Las frecuencias estimadas de haplotipo se muestran en los casos y los controles (columnas 2ª y 3ª), y en las columnas 4 a 10 se muestran los marcadores SNP en la fila 1, mostrándose abajo el nucleótido que presenta la asociación en cada haplotipo

Valor p empírico	Controles	Casos	rs3771807	rs10210154	rs3771827	rs17010822	rs12713835	rs4853116	rs3771856
0.003	43%	51%	C						G
0.049	47%	51%		A					G
	45%	39%		A					A
0.016	39%	46%	C	A					G
0.009	25%	26%	C		C				G
	16%	23%	C		T				G
	2%	4%	G		C				A
0.050	39%	33%	C			C			A
	7%	8%	G			C			A
0.008	22%	25%	C		C			A	G
	18%	22%	C		T			A	G
	1%	3%	G		C			G	A
0.006	26%	32%	C			C	G		G
	15%	17%	C			C	A		G
	22%	23%	C			C	A		A

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante se da únicamente para conveniencia del lector. La misma no forma parte del documento de patente europea. Aun cuando se ha puesto gran cuidado en la recopilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones, y la Oficina Europea de Patentes (EPO) declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- 10 • US 4873191 A, Hoppe and Wagner [0024]
- US 4109496 A, Rubenstein [0059]
- 15 • US 4376110 A [0072]
- US 4816567 A, Cabilly [0073]
- US 4816397 A, Boss [0073]
- 20 • US 5585089 A, Queen [0074]
- US 4946778 A [0075]
- US 4683202 A, Mullis [0096]
- 25 • US 5075217 A, Weber [0098]
- US 5364759 A, Caskey [0099]
- 30 • WO 8809810 A [0139]
- WO 8910134 A [0139] [0155]
- WO 8804300 A [0147]
- 35 • US 5399349 A [0157]

Bibliografía no correspondiente a patentes citada en la descripción

- 40 • **Dauids.** *Brain Res. Reviews*, 2003, vol. 42, 1-21 [0003]
- **Herpfer.** *Neuropharmacology*, 2005, vol. 48, 706-719 [0005]
- Van der **Putten et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 1985, vol. 82, 6148-6152 [0024]
- 45 • **Thompson et al.** *Cell*, 1989, vol. 56, 313-321 [0024]
- **Lo.** *Mol. Cell. Biol.*, 1983, vol. 3, 1803-1814 [0024]
- 50 • **Lavitrano et al.** *Cell*, 1989, vol. 57, 717-723 [0024]
- **Gordon.** *Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol.*, 1989, vol. 115, 171-229 [0024]
- **Campbell et al.** *Nature*, 1996, vol. 380, 64-66 [0025]
- 55 • **Wilmot et al.** *Nature*, vol. 385, 810-813 [0025]
- **Lasko et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 6232-6236 [0026]
- 60 • **Gu et al.** *Science*, 1994, vol. 265, 103-106 [0026]
- **Platt.** *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 28558-28562 [0039]
- **Lam et al.** *Nature*, 1991, vol. 354, 82-84 [0040]
- 65 • **Houghten et al.** *Nature*, 1991, vol. 354, 84-86 [0040]
- **Songyang et al.** *Cell*, 1993, vol. 72, 767-778 [0040]

ES 2 370 210 T3

- **Creighton**. Proteins: Structures and Molecular Principles. *W. H. Freeman & Co*, 1983, 34-49 [0047]
- PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. *Academic Press, Inc*, 1990 [0047]
- 5 • **Chien et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 9578-9582 [0049]
- **Kohler; Milstein**. *Nature*, 1975, vol. 256, 495-497 [0072]
- **Kosbor et al.** *Immunology Today*, 1983, vol. 4, 72 [0072]
- 10 • **Cole et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 2026-2030 [0072]
- **Cole et al.** Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy. *Alan R. Liss, Inc*, 1985, 77-96 [0072]
- 15 • **Morrison et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0073]
- **Neuberger et al.** *Nature*, 1984, vol. 312, 604-608 [0073]
- **Takeda et al.** *Nature*, 1985, vol. 314, 452-454 [0073]
- 20 • **Kabat, E. et al.** Sequences of Proteins of Immunological Interest. *U.S. Department of Health and Human Services*, 1983 [0074]
- **Bird**. *Science*, 1988, vol. 242, 423-426 [0075]
- 25 • **Huston et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 5879-5883 [0075]
- **Ward et al.** *Nature*, 1989, vol. 334, 544-546 [0075]
- 30 • **Huse et al.** *Science*, 1989, vol. 246, 1275-1281 [0076]
- **Nuovo, G. J.** PCR *In Situ* Hybridization: Protocols And Applications. *Raven Press*, 1992 [0102]
- **Harlow; Lane**. Antibodies: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1988 [0106]
- 35 • The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). **Voller, A.** Diagnostic Horizons. *Microbiological Associates Quarterly Publication*, 1978, vol. 2,1-7 [0114]
- **Voller, A. et al.** *J. Clin. Pathol.*, 1978, vol. 31, 507-520 [0114]
- 40 • **Butler, J. E.** *Meth. Enzymol.*, 1981, vol. 73, 482-523 [0114]
- Enzyme Immunoassay. *CRC Press*, 1980 [0114]
- 45 • Enzyme Immunoassay. *Kyaku Shoin*, 1981 [0114]
- **Weintraub, B.** Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society. *Principles of Radioimmunoassays*, March 1986 [0115]
- 50 • de **Ahepper et al.** *Autonom Neurosci*, 2006, vol. 126-127, 273-6 [0132]
- **Shiina et al.** *Neurosci*, 2006, vol. 139, 495-503 [0132]
- **Muke.** *Br J Pharmacol*, 2006, vol. 147, 430-436 [0132]
- 55 • **Phillips et al.** *Br J Pharmacol.*, 2003, vol. 138, 254-260 [0132]
- **Patak et al.** *Br J Pharmacol*, 2002, vol. 137, 1247-1254 [0132]
- 60 • **Letsinger et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 1989, vol. 86, 6553-6556 [0139]
- **Lemaitre et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1987, vol. 84, 648-652 [0139]
- **Krol et al.** *BioTechniques*, 1988, vol. 6, 958-976 [0139]
- 65 • **Zon.** *Pharm. Res.*, 1988, vol. 5, 539-549 [0139]
- **Gautier et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1987, vol. 15, 6625-6641 [0143]

ES 2 370 210 T3

- **Inoue et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1987, vol. 15, 6131-6148 [0143]
- **Inoue et al.** *FEBS Lett.*, 1987, vol. 215, 327-330 [0143]
- 5 • **Sarin et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, vol. 85, 7448-7451 [0144]
- **Zaug et al.** *Science*, 1984, vol. 224, 574-578 [0147]
- **Zaug; Cech.** *Science*, 1986, vol. 231, 470-475 [0147]
- 10 • **Zaug et al.** *Nature*, 1986, vol. 324, 429-433 [0147]
- **Been; Cech.** *Cell*, 1986, vol. 47, 207-216 [0147]
- 15 • **Helene.** *Anticancer Drug Des.*, 1991, vol. 6 (6), 569-584 [0149]
- **Helene et al.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, vol. 660, 27-36 [0149]
- **Maher.** *Bioassays*, 1992, vol. 14 (12), 807-615 [0149]
- 20 • **Matthes H W et al.** Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature*, 1996, vol. 383, 819 [0224]
- 25 • **Murtra et al.** Rewarding effects of opiates are absent in mice lacking the receptor for substance P. *Nature*, 2000, vol. 405 (6783), 180-3 [0225]

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. El uso de un roedor NK1^{-/-} o un roedor que tiene un receptor funcional de la sustancia P al cual se ha administrado un antagonista del receptor de la sustancia P como modelo animal para ADHD, que se **caracteriza** porque el roedor exhibe actividad locomotora reducida en respuesta a metilfenidato o d-anfetamina.

10 2. Un método para identificación de un compuesto que afecta al ADHD, que se **caracteriza** por comprender administrar un compuesto de test a un roedor de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto afecta al ADHD si la administración del compuesto da como resultado un cambio en la actividad locomotora del roedor en respuesta a metilfenidato o d-anfetamina.

15 3. Un gen NK1 de tipo salvaje o un agonista de NK1 o un inhibidor de ACE que se **caracteriza** por su uso en el tratamiento de ADHD.

4. Un vector que comprende un gen NK1 de tipo salvaje que se **caracteriza** por su uso en el tratamiento de ADHD.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

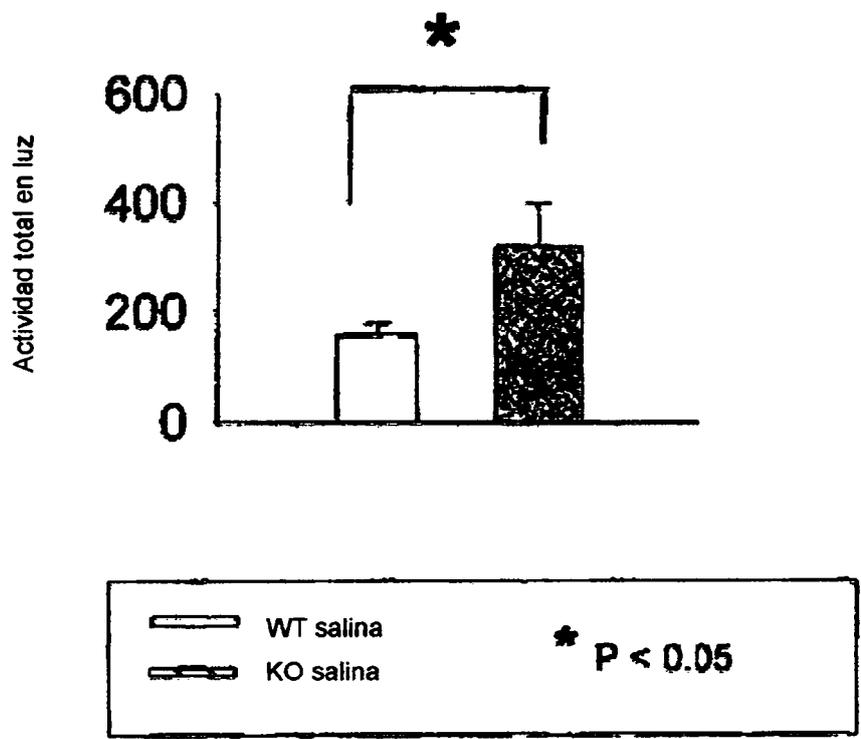


Figura 2.

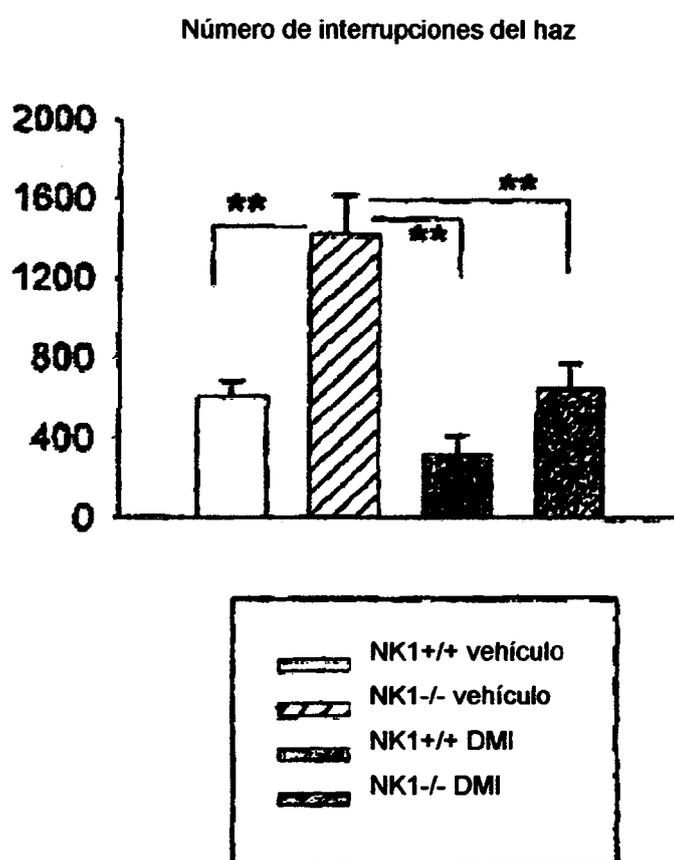


Figura 3.

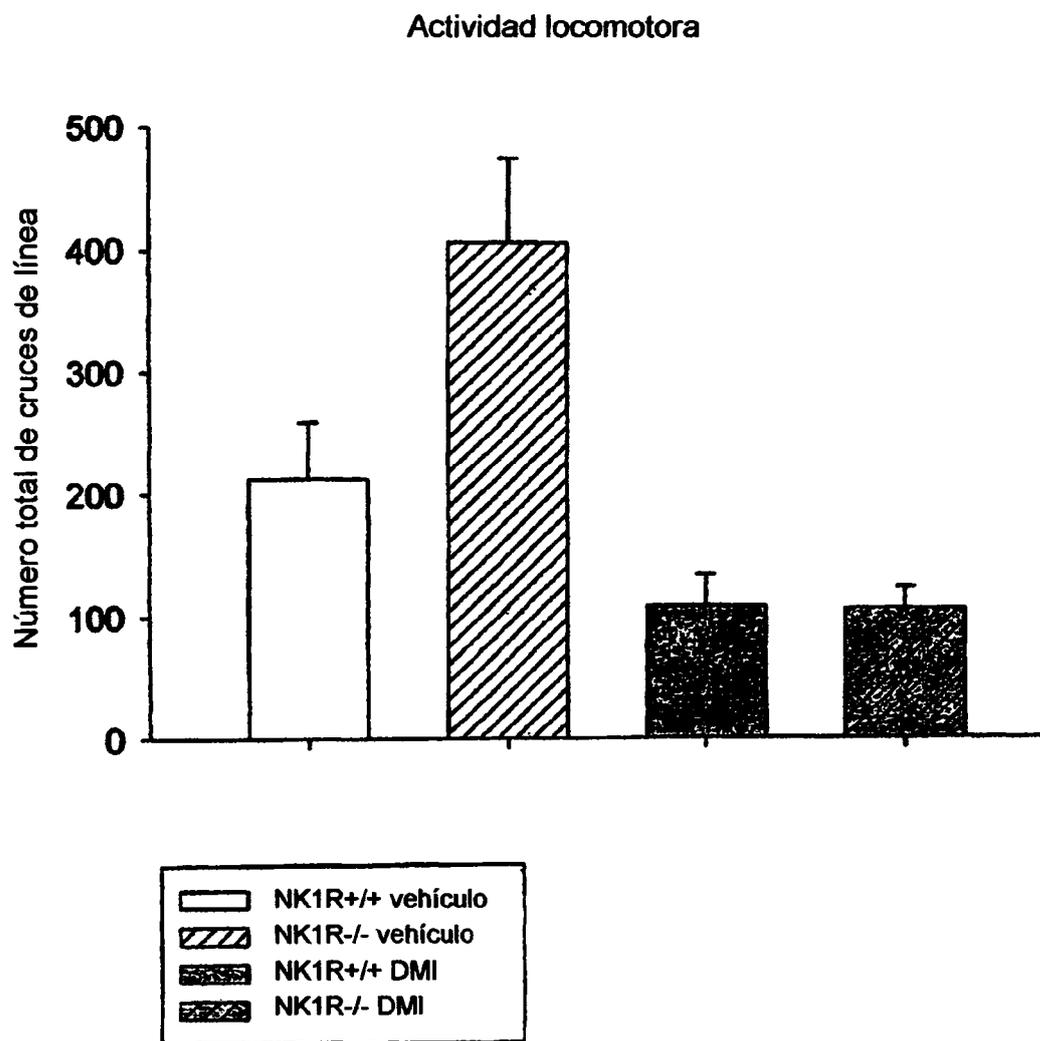


Figura 4

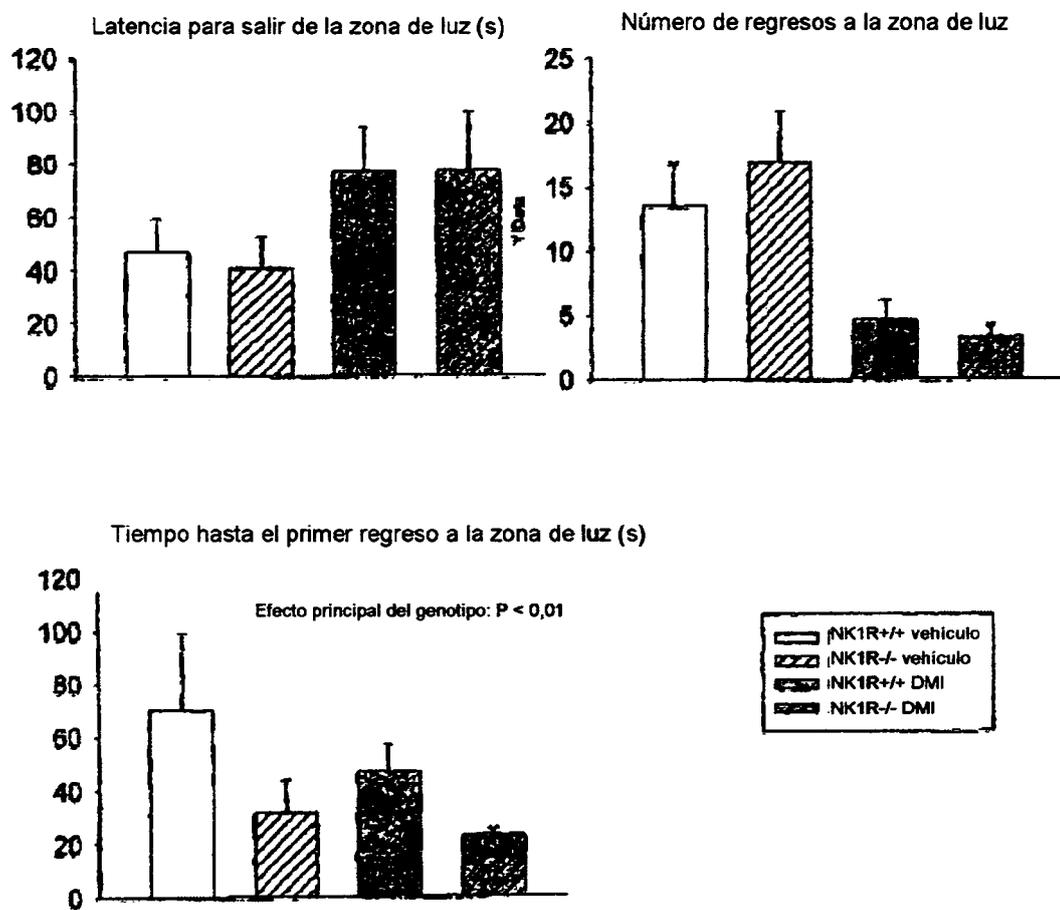


Figura 5.

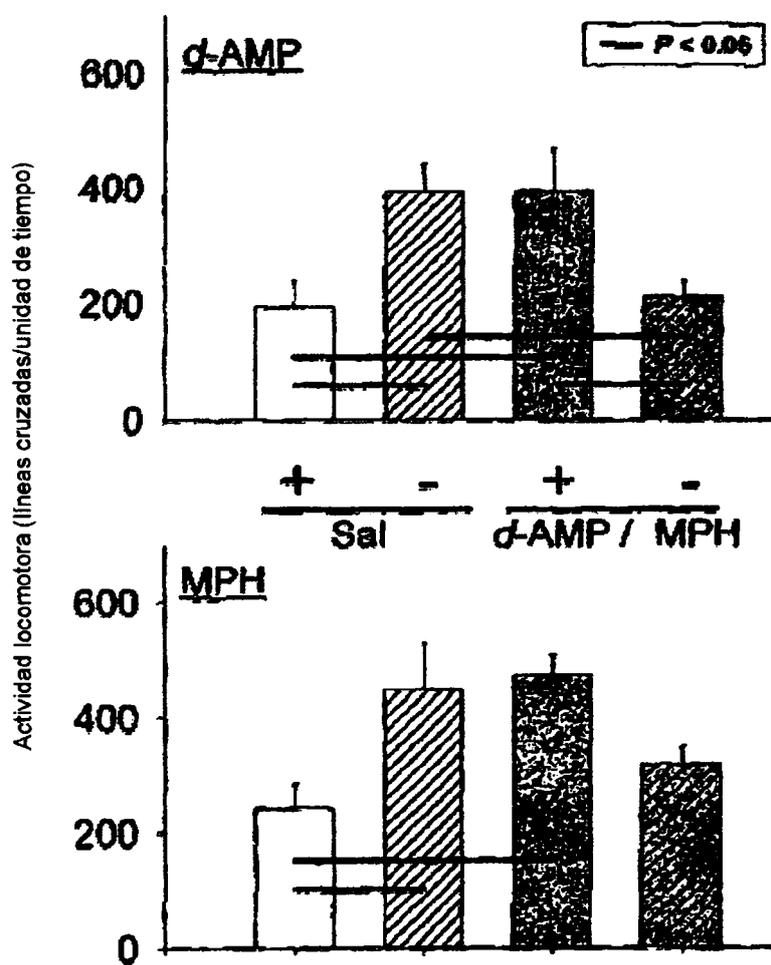


Figura 6

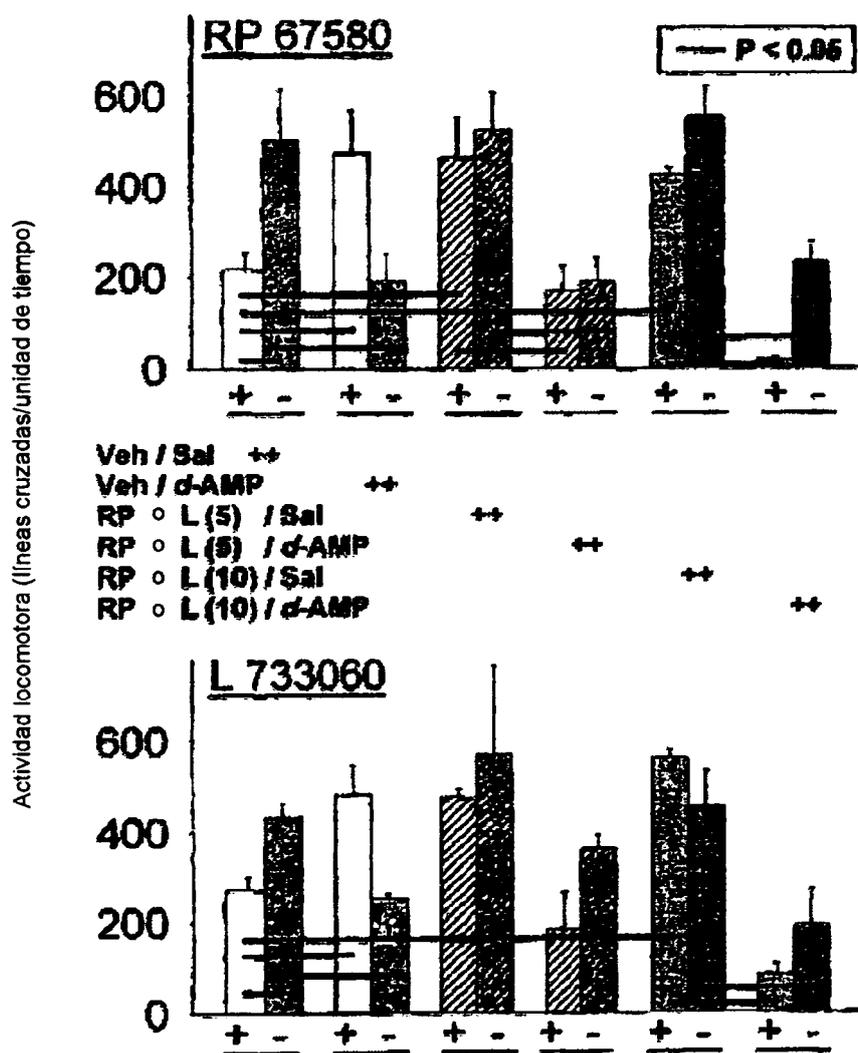


Figura 7

Adquisición de RotaRod a velocidad fija (FSRR) en NK1 MF1

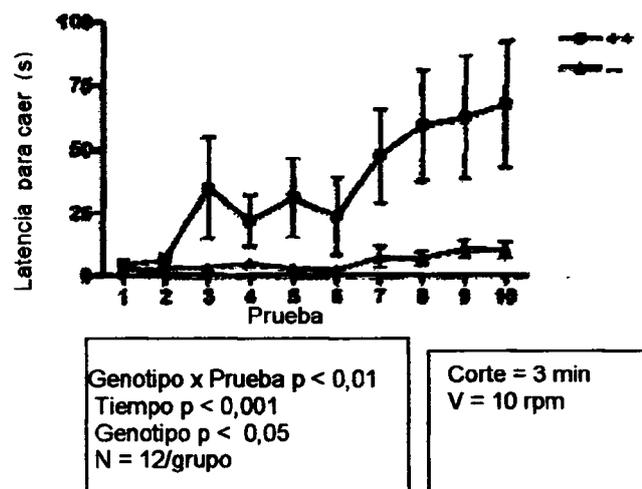


Figura 8.

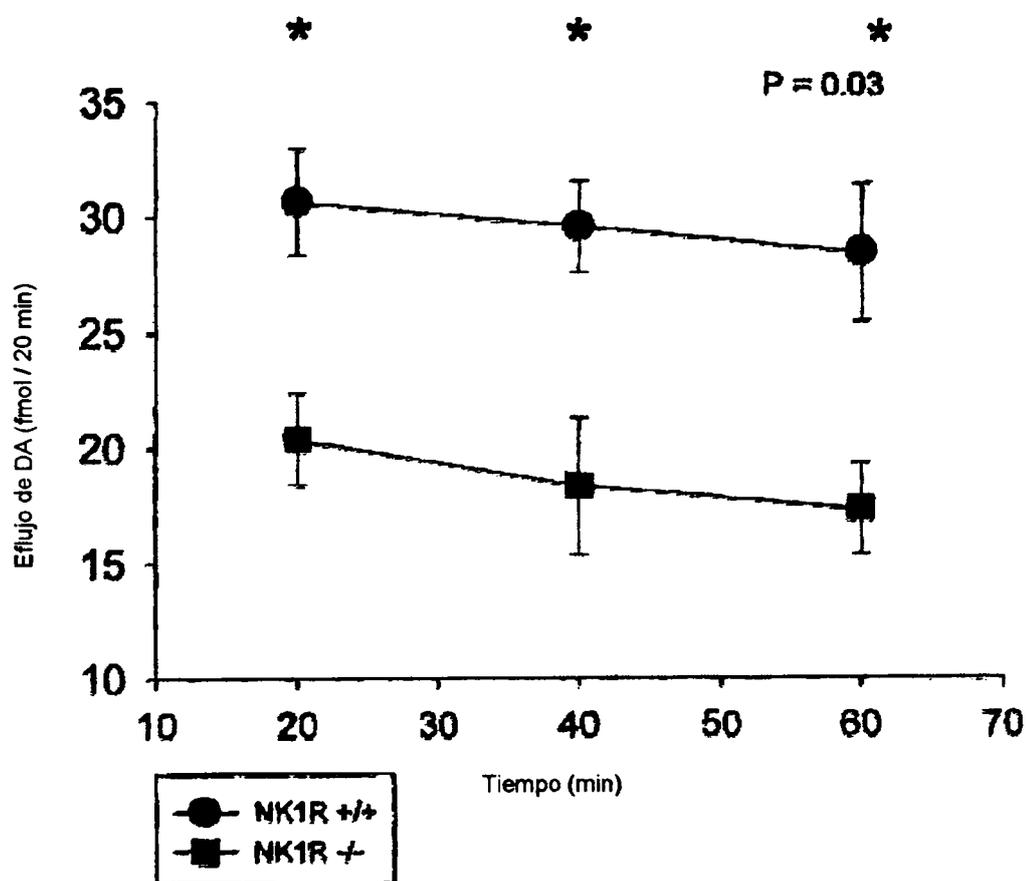


Figura 9

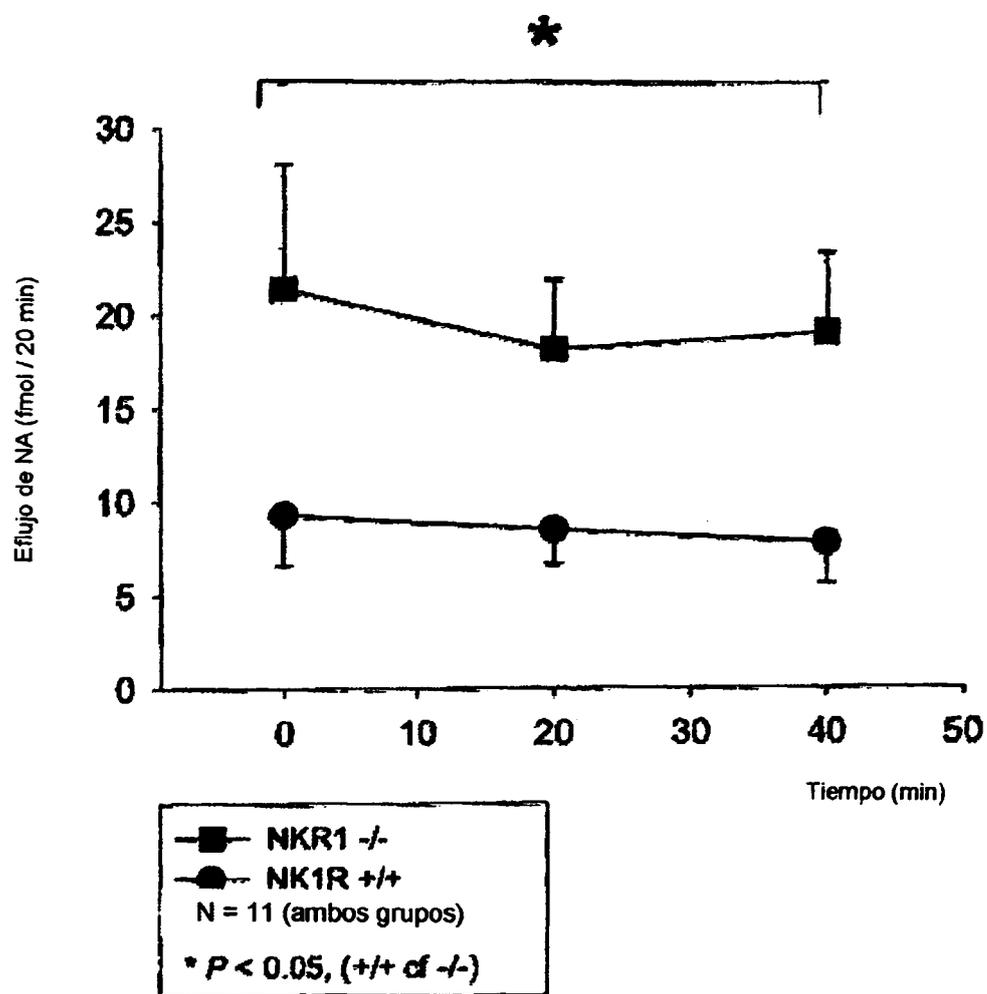


Figura 10

Respuesta de la dopamina (DA) a d-AMP en el cuerpo estriado

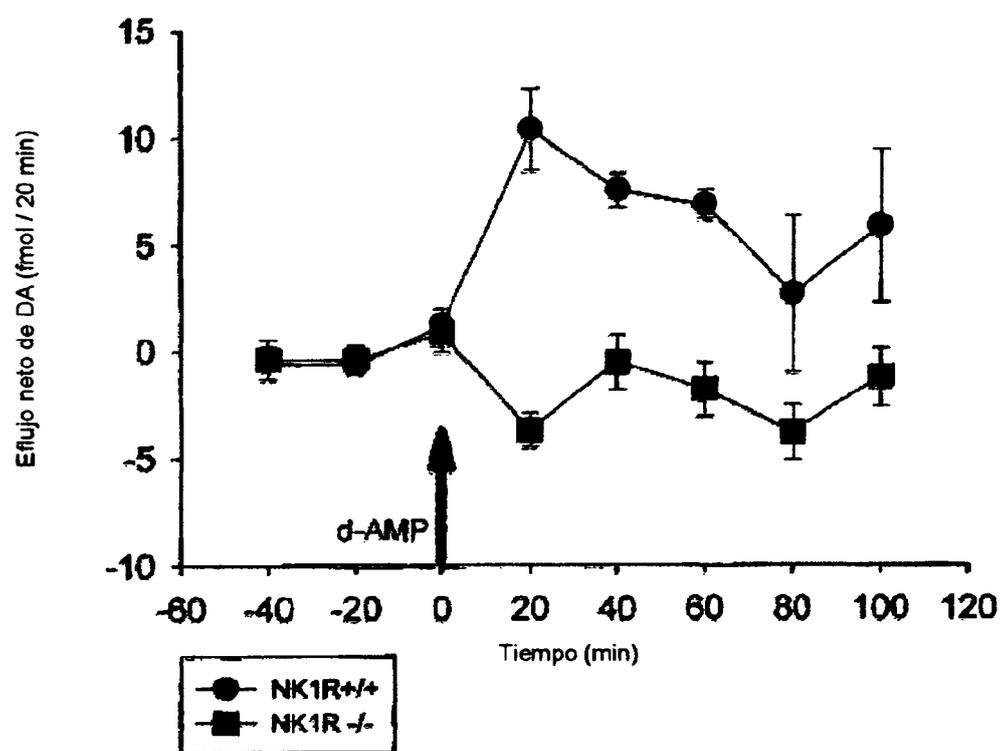


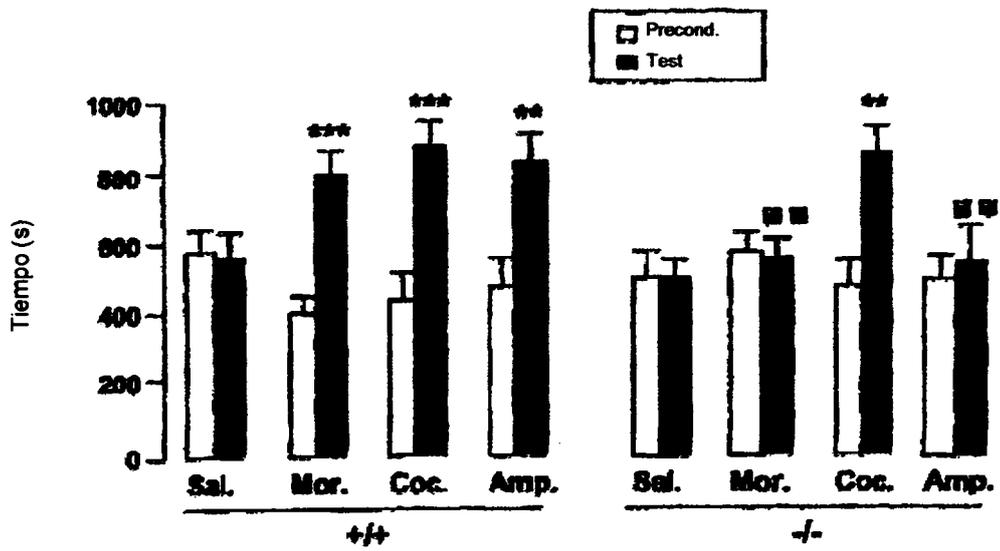
Figura 11.

Desensibilización funcional de los autorreceptores alfa2 en las neuronas adrenérgicas del locus coeruleus de los ratones NK1-/-

	Ffilm2	Ffilm3	Ffilm6	Ffilm8	Ffilm10	Val. med.	sd	sum
NK1+/+	108.8625	78.3671	32.87288	118.1132	202.0182	107.2442	82.41858	27.88544
NK1+/+ 100%	99.63478	71.20869	39.65235	110.1948	188.3884	100	58.20232	25.98318
NK1-/-	81.18042	-1.911238	10.81757	45.94449	28.93819	32.98749	32.45532	14.48898
NK1-/- % of WT	75.68885	-1.782137	10.08886	42.84101	26.8816	30.78924	30.26302	13.51928
								-74.25687



Figura 12.



Murta et al. Nature 408:189pp (2006)

Figura 13

