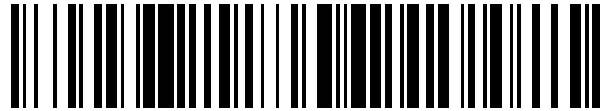


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 793**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2007** **E 07703327 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013** **EP 1982178**

54 Título: **Procedimientos para el tratamiento de trastornos afectivos**

30 Prioridad:

07.02.2006 EP 06002474

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.12.2013

73 Titular/es:

PHENOQUEST AG (50.0%)
Fraunhoferstrasse 13
82152 Martinsried, DE y
MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.
(50.0%)

72 Inventor/es:

PAEZ-PEREDA, MARCELO y
LABEUR, MARTA

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 435 793 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

Procedimientos para el tratamiento de trastornos afectivos

5 **[0001]** La presente invención desvela un procedimiento para identificar un modulador de TMEFF2, que comprende (a) poner en contacto una célula que expresa TMEFF2 con un compuesto candidato que va a probarse; (b) medir si dicho compuesto que va a probarse disminuye o aumenta el nivel de un constituyente de la ruta de señalización de CRH, preferentemente la ruta de señalización de AMPc, en dicha célula cuando se compara con una célula correspondiente que no expresa TMEFF2; (b') opcionalmente determinar si dicho compuesto puede reducir o
10 no la unión entre activina y TMEFF2; y (c) identificar dicho compuesto modulador. Además, se desvela un procedimiento para identificar un modulador de TMEFF2 que comprende determinar si dicho modulador de TMEFF2 puede reducir o no la unión entre activina y TMEFF2. La presente invención se refiere a un modulador de TMEFF2 para su uso en el tratamiento de trastornos afectivos en el que dicho modulador es un antagonista de TMEFF2.

15 EL EJE HIPOTALÁMICO-PITUITARIO-ADRENAL (EJE HPA) Y SU FUNCIÓN EN TRASTORNOS AFECTIVOS

[0002] Estudios clínicos y preclínicos han reunido pruebas sustanciales de que alteraciones del sistema de las hormonas del estrés desempeñan una función causal principal en el desarrollo de trastornos afectivos. El eje hipotalámico-pituitario-adrenal (eje HPA) es una parte importante del sistema neuroendocrino que controla
20 reacciones al estrés. El eje HPA representa una hipótesis basada en una respuesta al estrés por el hipotálamo, la hipófisis, las cortezas suprarrenales. El eje HPA incluye partes del hipotálamo, el lóbulo anterior de la hipófisis, las cortezas suprarrenales, hormonas, sistemas que transportan hormonas y mecanismos de retroalimentación que transportan cortisol de glándulas suprarrenales de nuevo al hipotálamo y a otras partes del cerebro. El hipotálamo libera hormona liberadora de corticotropina (CRH) de un área a lo largo de la eminencia mediana. La CRH es
25 transportada al lóbulo anterior de la pituitaria mediante el sistema de vasos sanguíneos portales del tallo hipofisario, que desciende del hipotálamo. En la hipófisis anterior, la CRH estimula la liberación de hormona adrenocorticotrópica almacenada (ACTH), que es transportada por la sangre a la corteza suprarrenal de la glándula suprarrenal, en la que estimula rápidamente la biosíntesis de corticosteroides a partir de colesterol. La activación crónica del eje HPA reduce la capacidad del cortisol para cortar la liberación de CRH y ACTH. Se cree que elevados
30 niveles de CRH y ACTH son una causa subyacente importante de trastornos afectivos.

[0003] La CRH desempeña una función central en la regulación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), mediando en respuestas endocrinas y de comportamiento a diversos estresores (Bale y Vale (2004) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 44: 525-557; Perrin y Vale (1999) Ann. N.Y. Acad. Sci. 885:312-328; Reul y Holsboer (2002) Curr. Opin. Pharmacol. 2:23-33; Grammatopoulos, 2002). Al nivel pituitario, la CRH es un potente estimulante de la expresión génica de pro-opiomelanocortina (POMC) y la producción de adrenocorticotropina (ACTH) (Gagner y Drouin (1987) Mol. Endocrinol. 1:677-682). La ACTH se produce por la escisión de POMC. La activación del receptor 1 de CRH (CRHR1) por CRH produce la estimulación mediada por Gs de adenilato ciclasa, conduciendo a niveles elevados de AMPc intracelular, que estimula diferentes factores de transcripción, que incluyen CREB y Nur77, que a
40 su vez activan el promotor de POMC. Un gran conjunto de puntos de evidencia preclínicos y clínicos para una función clave del CRHR1 en la mediación de efectos provocados por CRH en ansiedad, trastornos depresivos y patologías asociadas al estrés (Müller y Wurst (2004) Trends Mol. Med. 1: 409-415). En pacientes con depresión, los niveles de CRH en el líquido cefalorraquídeo son elevados y la expresión de CRH en el núcleo paraventricular hipotalámico es elevado con respecto a controles (Müller y Wurst (2004) Trends Mol. Med. 1: 409-415). Se ha
45 propuesto que la normalización del eje HPA, controlado por la señalización de CRH, podría ser la etapa común final de la acción antidepresora que es necesaria para la remisión estable de trastornos afectivos (Holsboer y Barden (1996) Endocr. Rev. 17, 187-205). Por consiguiente, pueden usarse novedosos procedimientos para regular la señalización de CRH para el tratamiento de trastornos afectivos.

50 LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE ACTIVINA

[0004] La activina es un miembro de la superfamilia TGF- β y participa en varios procedimientos biológicos tales como diferenciación celular, neurogénesis, secreción hormonal y supervivencia neuronal (Schubert y col., 1990, Nature 344:868-870; Ameerum y col., 1996, Cell Growth Differ 12:1679-1688; Iwahori y col., 1997, Brain Res 760:52-58; Sulyok y col., 2004, Mol Cell Endocrinol 225:127-132). La activina es una proteína secretada que se une al complejo de receptor de serina/treonina compuesto por un receptor de unión a ligando de tipo II y un receptor transductor de señales de tipo I (Figura 17). Hay dos subtipos del receptor de activina de tipo II en vertebrados, tipo IIA (ActRIIA) y IIB (ActRIIB). ActRIIA y ActRIIB son el receptor de activina primaria y son serina/treonina cinasas constitutivamente activas que reclutan el receptor de tipo I ALK4 (cinasa 4 similar a receptor de activina) por medio

de activina unida (Greenwald y col. (1999) Nat Struct Biol 6:18-22; Bernard y col. (2002) Mol Cell Endocrinol 196:79-93; Thompson y col. (2003) EMBO J 22:1555-1566). El complejo funcional de receptores de activina en la superficie celular consiste en dos receptores de tipo II y dos receptores de tipo I. Las respuestas celulares a activina están mediadas por fosforilación de los factores de transcripción Smad2, Smad3 y otras proteínas Smad (Abe y col., 2004, Growth Factors 22:105-110). Las proteínas Smad forman complejos homo- y heterómeros que pueden unirse a ADN y regular la expresión de genes diana.

[0005] La expresión de activina y la fosforilación de Smad2 aumentan durante el tratamiento con fármacos antidepresores (Dow y col., 2005, J Neuroscience 25:4908-4916). También se ha mostrado que la infusión de activina en el hipocampo de modelos animales de depresión tiene efectos similares a antidepresores. Por consiguiente, la regulación de activina y la señalización de Smad2 pueden contribuir a la acción de fármacos antidepresores.

[0006] Por tanto, pueden usarse procedimientos novedosos para regular y activar la señalización de Smad para el tratamiento de trastornos afectivos.

TRASTORNOS AFECTIVOS

[0007] Hasta un 10% de personas que visitan al médico están aquejadas de un trastorno afectivo (también conocido como trastorno del comportamiento, trastorno del estado de ánimo). Sin embargo, la mayoría de los casos siguen sin diagnosticar o se tratan inadecuadamente. Los trastornos afectivos incluyen, entre otros, depresión, ansiedad y trastorno bipolar. Estas enfermedades están muy descritas en la bibliografía; véase, por ejemplo, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-Revisión de texto de la 4ª edición (DMS-IV-TR), American Psychiatric Press, 2000.

[0008] La depresión, también conocida como trastorno afectivo unipolar, se caracteriza por una combinación de síntomas tales como estado de ánimo bajo, pérdida de energía, pérdida de interés, sensación de enfermedad física, escasa concentración, apetito alterado, sueño alterado y una ralentización de las funciones físicas y mentales que producen una incesante sensación de desesperanza, impotencia, culpabilidad y ansiedad. Los subtipos primarios de esta enfermedad son depresión mayor, distimia (depresión más suave) y depresión atípica. Otras formas importantes de depresión son trastorno disfórico premenstrual y trastorno afectivo estacional. El presente tratamiento de depresión consiste en psicoterapia, fármacos antidepresores, o una combinación de ambos. La mayoría de los fármacos antidepresores eligen como diana el transporte de los neurotransmisores serotonina y/o norepinefrina, o la actividad de la enzima monoamina oxidasa. Incluyen: inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (por ejemplo, fluoxetina, paroxetina, sertralina, fluvoxamina), antidepresores tricíclicos (por ejemplo, amitriptilina, imipramina, desipramina, nortriptilina), inhibidores de monoamina oxidasa (por ejemplo, fenelzina, isocarboxazida, tranilcipromina) y antidepresores de diseño tales como mirtazapina, reboxetina, nefazodona. Sin embargo, todos los fármacos antidepresores existentes poseen inconvenientes tales como larga latencia hasta la respuesta, alto grado de pacientes que no responden al tratamiento y efectos secundarios no deseables (Holsboer, Biol. Psychol. 57 (2001), 47-65). Por tanto, existe la necesidad en la comunidad médica de nuevos fármacos antidepresores con diferentes mecanismos de acción y perfil farmacológico mejorado (Baldwin (2001) Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp. 16:S93-S99; Greden (2002) J. Clin. Psychiatry 63(Suppl 2):3-7).

[0009] Los trastornos de ansiedad se definen por un estado arousal excesivo o inapropiado caracterizado por sentimientos de aprensión, incertidumbre y miedo. Se clasifican según la gravedad y duración de sus síntomas y características afectivas específicas. Las categorías incluyen: (1) trastorno de ansiedad generalizada, (2) trastorno de pánico, (3) fobias, (4) trastorno obsesivo-compulsivo, (5) trastorno por estrés postraumático, y (6) trastorno de ansiedad por separación. El tratamiento convencional para la mayoría de los trastornos de ansiedad es una combinación de terapia cognitiva de comportamiento con medicación antidepresora. Medicaciones adicionales incluyen benzodiazepinas tales como alprazolam, clonazepam, diazepam, lorazepam, halazepam, clordiazepóxido, y otros fármacos tales como buspirona, clonidina, pagoclon, risperidona, olanzapina, quetiapina, ziprasidona. Sin embargo, hay varias necesidades sin cumplir en el tratamiento de trastornos de ansiedad que incluyen la necesidad de medicaciones más eficaces, de acción rápida y mejor toleradas; tratamientos eficaces para trastornos resistentes al tratamiento; prevención de recaída; y promoción de la superación y respuesta de larga duración (Pollack, Psychopharmacol. Bull. 38(Suppl 1) (2004) 31-37).

El trastorno bipolar, también conocido como depresión maníaca, se caracteriza por oscilaciones del estado de ánimo entre periodos de manía (es decir, elevación del estado de ánimo que incluye euforia exagerada, irritabilidad) y periodos de depresión. El trastorno bipolar se clasifica según la gravedad de los síntomas. Los pacientes

diagnosticados con trastorno bipolar tipo I padecen episodios maníacos o mixtos con o sin depresión mayor. En trastorno bipolar tipo II, los pacientes tienen episodios de hipomanía y episodios de depresión mayor. Con la hipomanía, los síntomas de manía (euforia o irritabilidad) aparecen en formas más suaves y son de duración más corta. Los actuales fármacos usados para tratar trastornos bipolares son litio, valproato y lamotrigina, que estimulan la liberación del neurotransmisor glutamato. Al igual que con fármacos antidepresores, se necesitan semanas para ser eficaces y pueden producir efectos secundarios no deseables, por ejemplo, altos niveles de litio en la sangre pueden ser mortales (Sachs (2003) J. Clin. Psychopharmacol. 23(Suppl. 1):S2-S8).

5
10 **[0010]** Paez-Padera y col. (Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry 29 (2005), 1010-1016) desvelan posibles dianas de fármaco basadas en la señalización de rutas activadas por fármacos antidepresores existentes y describen la implicación de la ruta de señalización de CRH en trastornos afectivos.

15 **[0011]** Paez-Padera y col. (Expert Opinion on Therapeutic Patents 12 (2002), 1537-1546) desvelan dianas de fármaco y opciones terapéuticas para el tratamiento de síndrome de Cushing.

[0012] Los documentos WO 2005/117986 y US 2005/276812 describen compuestos conjugados de anticuerpo-fármaco que comprenden un anticuerpo (que puede ser un anticuerpo anti-TMEFF2) covalentemente unido por ligador a restos de fármaco maitansinoide que son útiles para inhibir el crecimiento de células tumorales.

20 **[0013]** El documento US 2005/209181 desvela más de 1000 genes, que incluyen TMEFF2, que se expresan diferencialmente en diversas áreas del cerebro de individuos diagnosticados con esquizofrenia, depresión mayor o trastornos afectivos bipolares.

25 **[0014]** En vista de lo anterior, existe la necesidad de proporcionar nuevos agentes terapéuticos y procedimientos para tratar trastornos afectivos. Por tanto, el problema técnico que subyace la presente invención es proporcionar medios y procedimientos para tratar trastornos afectivos.

30 **[0015]** La solución a dicho problema técnico se logra proporcionando las realizaciones caracterizadas en el presente documento más adelante y en las reivindicaciones.

35 **[0016]** Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que modulando TMEFF2 es posible proporcionar medios y procedimientos para tratar trastornos afectivos. La invención se basa, en parte, en las observaciones de que TMEFF2 participa, sin estar ligado a teoría, en dos rutas de señalización. Por una parte, TMEFF2 participa en la ruta de señalización de CRH, preferentemente en la ruta de señalización de AMPc, y por otra parte, en la ruta de señalización de activina.

[0017] Basándose en estos hallazgos, la presente invención proporciona la enseñanza de que el agonista de TMEFF2 aumenta su efecto sobre la ruta de señalización de CRH, preferentemente la ruta de AMPc.

40 **[0018]** Además, los hallazgos de que TMEFF2 participa en la ruta de señalización de activina respaldan la conclusión de que los moduladores de TMEFF2 que reducen la unión entre activina y TMEFF2 pueden usarse en el tratamiento de trastornos afectivos.

45 **[0019]** Por consiguiente, como se ha detallado en el presente documento más adelante y también se ha ilustrado en la parte experimental de la presente solicitud, la presente invención desvela un procedimiento para identificar un modulador de TMEFF2, preferentemente un modulador de TMEFF2 de la ruta de señalización de CRH, preferentemente la ruta de señalización de AMPc, que comprende

50 (a) poner en contacto una célula que expresa TMEFF2 con un compuesto candidato que va a probarse;

(b) medir si dicho compuesto que va a probarse disminuye o aumenta el nivel de un constituyente de la ruta de señalización de CRH, preferentemente la ruta de señalización de AMPc, en dicha célula cuando se compara con una célula correspondiente que no expresa TMEFF2; y

55 (c) identificar dicho compuesto modulador.

[0020] El modulador de TMEFF2 a identificar por el procedimiento anteriormente descrito es preferentemente un agonista de TMEFF2. Dicho agonista de TMEFF2 identificado por el procedimiento anteriormente descrito es preferentemente un agonista de TMEFF2 de la ruta de señalización de CRH, preferentemente la ruta de señalización

de AMPc, que se denomina en el presente documento “agonista de TMEFF2 de la ruta de señalización de CRH, preferentemente la ruta de señalización de AMPc” o como “ruta de señalización de CRH de TMEFF2, preferentemente agonista de la ruta de señalización de AMPc”. Por consiguiente, si el procedimiento anteriormente descrito se aplica a identificar un agonista de TMEFF2, entonces en la etapa (b) la disminución del nivel de un constituyente de la ruta de señalización de AMPc, preferentemente la ruta de señalización de CRH, se mide en una célula que expresa TMEFF2 y en comparación con una célula correspondiente que no expresa TMEFF2.

[0021] Sin embargo, por supuesto, el modulador de TMEFF2, identificado por el procedimiento anteriormente descrito, también puede ser un antagonista de TMEFF2 como se describirá en el presente documento más adelante. Dicho antagonista de TMEFF2 identificado por el procedimiento anteriormente descrito se denomina en el presente documento “antagonista de TMEFF2 de la ruta de señalización de CRH, preferentemente de la ruta de señalización de AMPc” o “ruta de señalización de CRH de TMEFF2, preferentemente antagonista de la ruta de señalización de AMPc”. Por consiguiente, entonces, en la etapa (b) del procedimiento anteriormente descrito, el aumento del nivel de un constituyente de la ruta de señalización de AMPc, preferentemente la ruta de señalización de CRH, se mide en una célula que expresa TMEFF2 y en comparación con una célula correspondiente que no expresa TMEFF2.

[0022] Los procedimientos para identificar moduladores de TMEFF2 se llevan a cabo preferentemente *in vitro*.

[0023] TMEFF2 se identificó por primera vez en biblioteca de ADNc de cerebro humano (véase Uchida y col. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266:593-602), y después se aisló de un cerebro fetal humano (véase Horie, y col. (2000) *Genomics* 67:146-152). Adicionalmente, ácidos nucleicos humanos o de ratón para TMEFF2 se desvelan en los números de acceso de GenBank NM_016192, NM_019790, BC034850, BC008973, AY412287, AY412288, AY412289, AB017270 y AB017269. TMEFF2 también se conoce como tomoregulina, TR, gen 1 de la poliposis hiperplásica, HPP 1 y TENB2.

[0024] El gen TMEFF2 codifica una proteína que contiene dos dominios similares a folistatina, y un dominio similar a EGF. La proteína también posee una cola citosólica que contiene un motivo activante de la proteína G; véase también el Ejemplo 1. Se ha sugerido que el dominio extracelular de TMEFF2 puede liberarse en la matriz extracelular mediante escisión proteolítica (Horie y col. (2002) *Genomics* 67:146-152); véase también el Ejemplo 1.

[0025] La Figura 1 ilustra la forma soluble de la proteína TMEFF2.

[0026] La expresión de TMEFF2 puede controlarse por andrógeno (Gery y col. (2002) *Oncogene* 21:4739-4746).

[0027] Se ha encontrado sorprendentemente que TMEFF2 participa en la ruta de señalización de activina. En particular, como se ha mencionado en el presente documento anteriormente, la proteína TMEFF2 posee una región extracelular que contiene dominios similares a folistatina y similares a EGF, una región transmembrana y una cola citoplásmica (Figura 1). Se ha mostrado que el dominio extracelular se escinde por proteasas próximas a la región transmembrana. Esta escisión proteolítica libera la porción extracelular de TMEFF2, que luego puede actuar de citocina o factor de crecimiento que pueden unirse a la familia erbB de receptores de EGF (Horie y col. (2002) *Genomics* 67:146-152).

[0028] La activina es un miembro de la superfamilia TGF- β y participa en varios procesos biológicos tales como diferenciación celular, neurogénesis, secreción hormonal y supervivencia neuronal (Schubert y col., 1990, *Nature* 344:868-870; Ameerum y col., 1996, *Cell Growth Differ* 12:1679-1688; Iwahori y col., 1997, *Brain Res* 760:52-58; Sulyok y col., 2004, *Mol Cell Endocrinol* 225:127-132). La activina es una proteína secretada que se une al complejo de receptor de serina/treonina compuesto por un receptor de unión a ligando de tipo II y un receptor transductor de señales de tipo I (Figura 17). Hay dos subtipos del receptor de activina de tipo II en vertebrados, tipo IIA (ActRIIA) y IIB (ActRIIB). ActRIIA y ActRIIB son el receptor de activina primaria y son serina/treonina cinasas constitutivamente activas que reclutan el receptor de tipo I ALK4 (cinasa 4 similar a receptor de activina) por medio de activina unida (Greenwald y col. (1999) *Nat Struct Biol* 6:18-22; Bernard y col. (2002) *Mol Cell Endocrinol* 196:79-93; Thompson y col. (2003) *EMBO J* 22:1555-1566). El complejo funcional de receptores de activina en la superficie celular consiste en dos receptores de tipo II y dos receptores de tipo I. Las respuestas celulares a activina están mediadas por fosforilación de los factores de transcripción Smad2, Smad3 y otras proteínas Smad (Abe y col., 2004, *Growth Factors* 22:105-110). Las proteínas Smad forman complejos homo- y heterómeros que pueden unirse a ADN y regular la expresión de genes diana.

[0029] La expresión de activina y la fosforilación de Smad2 aumentan durante el tratamiento con fármacos

antidepresores (Dow y col., 2005, J Neuroscience 25:4908-4916). También se ha mostrado que la infusión de activina en el hipocampo de modelos animales de depresión tiene efectos similares a antidepresores. Por consiguiente, la regulación de activina y la señalización de Smad2 pueden contribuir a la acción de fármacos antidepresores.

5

[0030] Los presentes inventores han obtenido ahora resultados experimentales que respaldan la conclusión de que TMEFF2 mediante sus dominios similares a folistatina puede unirse a activina, prevenir la unión de activina a receptores de activina de tipo II y, por consecuencia, inhibir la señalización de activina (Figura 18), reduciendo así la actividad de proteínas Smad. Así, las moléculas que reducen la unión de activina a TMEFF2 permiten que la activina se una a su receptor, active Smad y promueva efectos antidepresores, diferenciación celular y supervivencia neuronal (Figura 19).

10

[0031] Por consiguiente, los moduladores de TMEFF2 identificados según los procedimientos de la presente invención descritos anteriormente en este documento, es decir, agonistas o antagonistas de moduladores de TMEFF2, pueden probarse adicionalmente si pueden o no modular la ruta de señalización de activina mediante la acción sobre TMEFF2, en particular si pueden o no conducir a una unión reducida de activina a TMEFF2.

15

[0032] Por consiguiente, la presente invención desvela un procedimiento para identificar un modulador de TMEFF2 que comprende

20

(a) poner en contacto una célula que expresa TMEFF2 con un compuesto candidato que va a probarse;

25

(b) medir si dicho compuesto que va a probarse disminuye o aumenta el nivel de un constituyente de la ruta de señalización de CRH, preferentemente un constituyente de la ruta de señalización de AMPc, en dicha célula cuando se compara con una célula correspondiente que no expresa TMEFF2;

(b') determinar si dicho compuesto que va a probarse reduce o no la unión de activina a TMEFF2; y

(c) identificar dicho compuesto modulador.

30

[0033] Sin embargo, la presente invención no solo desvela moduladores de TMEFF2 identificados según los procedimientos anteriormente descritos (denominados "moduladores de la ruta de señalización de CRH, preferentemente ruta de señalización de AMPc"), sino que también desvela un procedimiento de cribado para identificar compuestos que pueden reducir la unión de activina a TMEFF2. Tales compuestos se denominan a continuación "moduladores de TMEFF2 que actúan sobre la ruta de señalización de activina" o "moduladores de TMEFF2 de la ruta de señalización de activina". Reduciendo la unión de activina a TMEFF2 aumenta el efecto de activina sobre la ruta de señalización de activina. Así, tales compuestos pueden usarse en procedimientos o usos para tratar trastornos afectivos.

35

[0034] Así, en esencia, un modulador de TMEFF2 que actúa sobre la ruta de señalización de activina también podría considerarse un "agonista de la ruta de señalización de activina". Como se ha descrito anteriormente, un modulador de TMEFF2 que reduce la unión de activina a TMEFF2 potencia la unión de activina a su receptor relacionado, que a su vez conduce a una activación más eficiente de la ruta de señalización de activina.

40

[0035] Por consiguiente, la presente invención desvela un procedimiento para identificar un modulador de TMEFF2, preferentemente con respecto a su participación en la ruta de señalización de activina, en particular un modulador que reduce la unión de activina a TMEFF2.

45

[0036] En particular, la presente invención desvela un procedimiento para identificar un modulador de TMEFF2 determinando si puede reducir o no la unión entre activina y TMEFF2. Un procedimiento tal puede llevarse a cabo por técnicas conocidas para el experto en la materia, por ejemplo

50

(a) poner en contacto TMEFF2 y activina con un compuesto candidato que va a probarse;

55

(b) medir si dicho compuesto que va a probarse reduce o inhibe la unión de activina a TMEFF2; y

(c) identificar dicho compuesto modulador.

[0037] El término "unión de activina a TMEFF2" o "unión entre activina o TMEFF" significa que la activina se

une a TMEFF2 y viceversa.

[0038] El término “reducida” o “reducir” como se usa en el presente documento define la reducción de la unión de activina a TMEFF2 cuando se compara con la unión normal/natural de activina a TMEFF2. Por consiguiente, se entenderá que la reducción mediada por el compuesto de prueba, preferentemente un modulador de TMEFF2 que actúa sobre la ruta de señalización de activina, tiene como objetivo “reducir” la unión de activina a TMEFF2. También se prevé que el compuesto de prueba, preferentemente un modulador de TMEFF2 que actúa sobre la ruta de señalización de activina, suprime totalmente la unión de activina a TMEFF2 cuando se compara con la unión normal/natural de activina a TMEFF2. El término “unión normal/natural” significa la capacidad de activina para unirse a TMEFF2 o viceversa. Como se describe en el presente documento, la unión de activina a su receptor relacionado conduce a la inducción de, entre otras, proteínas Smad. Se cree que TMEFF2 se une a activina y así reduce la capacidad para unirse a su receptor.

[0039] Por consiguiente, se prevé que el compuesto de prueba reduzca al menos la unión de activina a TMEFF2 el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o incluso el 100% cuando se compara con una unión normal/natural de activina a TMEFF2. La unión de activina a TMEFF2 puede medirse, por ejemplo, como se describe en el presente documento más adelante.

[0040] Antes de que la presente invención se describa en detalle, debe entenderse que la presente invención no se limita a la metodología particular, protocolos, líneas celulares, vectores y reactivos descritos en el presente documento, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es con el fin solo de describir realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención que se limitará solo por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que comúnmente son entendidos por un experto habitual en la materia.

[0041] Preferentemente, los términos usados en el presente documento se definen como se describe en “A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)”, Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. y Kölbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza).

[0042] En toda esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera de otro modo, la palabra “comprender”, y variaciones tales como “comprende” y “que comprende”, se entenderá que implica la inclusión de un número entero establecido o etapa o grupo de números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

[0043] Varios documentos se citan en todo el texto de esta memoria descriptiva. Nada en el presente documento debe interpretarse como una admisión que la invención no tenga derecho a anteceder tal divulgación en virtud de la invención anterior.

[0044] Debe observarse que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente de otro modo. Así, por ejemplo, referencia a “un reactivo” incluye uno o más de tales reactivos diferentes, y referencia a “el procedimiento” incluye referencia a etapas y procedimientos equivalentes conocidos para aquellos expertos habituales en la materia que podrían modificarse o sustituirse por los procedimientos descritos en el presente documento.

TMEFF2

[0045] Cuando se usa en el contexto de la presente solicitud, el término “TMEFF2” incluye un polinucleótido TMEFF2 (también conocido como tomoregulina, TR, gen 1 de poliposis hiperplásica, HPP 1 y TENB2) o polipéptido que tiene un nucleótido o secuencia de aminoácidos, respectivamente, como se conoce en la técnica; véase Uchida, y col. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:593-602; Horie y col. (2000) Genomics 67:146-152); o números de acceso de GenBank NM_016192, NM_019790, BC034850, BC008973, AY412287, AY412288, AY412289, AB017270 y AB017269. La Figura 16 muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de TMEFF2 humana como se describe en Uchida, y col. (1999), citada anteriormente. Cuando se refiere en el presente documento a secuencias de nucleótidos de TMEFF2 o secuencias de aminoácidos de TMEFF2, las secuencias mostradas en la Figura 16 se prefieren como “secuencias de referencia” cuando, por ejemplo, se determina el grado de identidad de secuencias de nucleótido o de aminoácidos que están englobadas por el término “TMEFF2”.

[0046] El término "TMEFF2" también incluye secuencias de nucleótidos que son el 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99% idénticas a las secuencias de nucleótidos de TMEFF2 que se conocen en la técnica y se describen en el presente documento, en las que este 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99% de secuencias de nucleótidos idénticas codifican un polipéptido de TMEFF2 que retiene la actividad de modular la ruta de señalización de AMPc como se describe en el presente documento. Las secuencias de nucleótidos según la invención pueden ser cualquier tipo de ácido nucleico, por ejemplo ADN, ARN o PNA (ácido nucleico peptídico).

[0047] El término "TMEFF2" también incluye secuencias de aminoácidos que son el 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99% idénticas a las secuencias de aminoácidos de TMEFF2 que se conocen en la técnica y se describen en el presente documento, en las que este 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99% de secuencias de aminoácidos idénticas retienen la actividad de modular la ruta de señalización de AMPc como se describe en el presente documento. Dicho término también incluye variantes de polipéptidos TMEFF2 que tienen una secuencia de aminoácidos, en las que en tales variantes uno o más, preferentemente 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350 ó 360 aminoácidos se añaden, delecionan y/o se sustituyen en cuanto a que tales variantes de polipéptido de TMEFF2 retengan la actividad de modular la ruta de señalización de AMPc como se describe en el presente documento. Dicho término también incluye fragmentos de polipéptidos de TMEFF2, preferentemente de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350 ó 360 aminoácidos de longitud, en los que tales fragmentos retienen la actividad de modular la ruta de señalización de AMPc como se describe en el presente documento.

[0048] Dicho término también incluye polinucleótidos que codifican dicho polipéptido de TMEFF2, fragmentos o variantes del mismo, respectivamente.

25 ACTIVINA

[0049] Cuando se usa en el contexto de la presente solicitud, el término "activina" incluye un polinucleótido o polipéptido de activina (también conocida como inhibina beta A; activina A; polipéptido activina AB alfa) que tiene una secuencia de nucleótidos o aminoácidos, respectivamente, como se conoce en la técnica; véase Risbridger y col. (2001) *Endocrine Reviews* 22:836-858; o números de acceso de GenBank NM_002192, AC005027, AU137531, BC007858, CCDS5464, NP_002183, AF218018, AK222742, AU137531, BC007858, BX648811, D49743, J03634, M13436, X72498, AAG17260, BAD96462, AAH07858, CA146003, BAA08577, AAA35787, AAA59168, CAA51163, P08476, Q53H39, Q5HYA2, Q9HBPO, NM_008380, NP_032406, X69619, CCDS26251, AK134991, AK135474, BC053527, CT010380, X69619, BAE22374, BAE22545, AAH53527, CAJ18587, CAA49325, Q04998, Q3UXL8, Q3UY39, Q4FJM4, Q9JJQ1, NM_017128, M37482, NP_058824 y AAA41436. La Figura 22 muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de activina humana como se desvela en el número de acceso de GenBank NM_002192. Cuando se refiere en el presente documento a secuencias de nucleótidos de activina o secuencias de aminoácidos de activina, las secuencias mostradas en la Figura 22 se prefieren como "secuencias de referencia" cuando, por ejemplo, se determina el grado de identidad de secuencias de nucleótidos o aminoácidos que están englobadas por el término "activina".

[0050] El término "activina" también incluye secuencias de nucleótidos que son el 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99% idénticas a las secuencias de nucleótidos de activina que se conocen en la técnica y se describen en el presente documento, en la que este 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99% de secuencias de nucleótidos idénticas codifican un polipéptido de activina que retiene la propiedad de unión a TMEFF2 como se describe en el presente documento. Las secuencias de nucleótidos según la invención pueden ser cualquier tipo de ácido nucleico, por ejemplo, ADN, ARN o PNA (ácido nucleico peptídico).

[0051] El término "activina" también incluye secuencias de aminoácidos que son el 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99% idénticas a las secuencias de aminoácidos de activina que se conocen en la técnica y se describen en el presente documento, en las que este 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99% de secuencias de aminoácidos idénticas retienen la propiedad de unión a TMEFF2 como se describe en el presente documento. Dicho término también incluye variantes de polipéptidos de activina que tienen una secuencia de aminoácidos, en las que en tales variantes uno o más, preferentemente 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350 ó 360 aminoácidos se añaden, delecionan y/o sustituyen en tanto que tales variantes de polipéptidos de activina retengan la propiedad de unión a TMEFF2 como se describe en el presente documento. Dicho término también incluye fragmentos de polipéptidos de activina, preferentemente de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350 ó 360 aminoácidos de

longitud, en los que tales fragmentos retienen la propiedad de unión a TMEFF2 como se describe en el presente documento.

[0052] Dicho término también incluye polinucleótidos que codifican dicho polipéptido de activina, fragmentos o 5 variantes de los mismos, respectivamente.

MODULADORES DE TMEFF2

[0053] En el contexto de la presente invención, el término “modulador de TMEFF2” (algunas veces también 10 denominado en el presente documento simplemente “modulador”) significa (a) compuesto(s), un complejo de compuestos, (a) sustancia(s) o complejo de sustancias que pueden modificar, es decir, modular la actividad de TMEFF2 o la expresión de TMEFF2 tanto directamente como indirectamente. La modulación puede producirse, por ejemplo, al nivel de proteína. Preferentemente, la proteína TMEFF2 interacciona con el modulador de forma que sea 15 menos activo. La modulación también puede producirse al nivel de ácido nucleico. Concretamente, el gen TMEFF2 se transcribe más frecuentemente o menos frecuentemente dando lugar a más o menos proteína. La modulación también puede influir en la estabilidad de ARN o proteína.

[0054] La presente invención desvela “moduladores de TMEFF2 de la ruta de señalización de activina” que se refieren a compuestos que reducen la unión de activina a TMEFF2 (y viceversa) y así influyen o actúan sobre la ruta 20 de señalización de activina. Por consiguiente, un modulador de TMEFF2 de la ruta de señalización de activina también podría considerarse un agonista de la ruta de señalización de activina. Como se describe en el presente documento y se muestra en la Figura 18, TMEFF2 participa, sin estar ligado a teoría, en la ruta de señalización de activina.

[0055] Según la presente invención, el término “antagonista de TMEFF2” también denominado en el presente documento “inhibidor de TMEFF2”, indica moléculas/sustancias que pueden inhibir y/o reducir un efecto agonista. Un antagonista de TMEFF22 comprende una sustancia endógena, un compuesto, una molécula pequeña, un agente o un fármaco que puede interaccionar con proteína TMEFF2 e inhibir una respuesta fisiológica o farmacológica 25 máxima o completa característica de TMEFF2. Alternativamente, un antagonista de TMEFF22 puede interaccionar con el gen TMEFF2 de manera que inhiba su transcripción. En otra alternativa, un antagonista de TMEFF2 puede interaccionar con un transcrito de TMEFF22, es decir, ARNm sin cortar y empalmar o cortado y empalmado de manera que inhiba su traducción y/o produzca la degradación de un transcrito de TMEFF22. El término “gen” se ha descrito anteriormente en el contexto de agonistas de TMEFF2 y también se aplicable en el contexto de 30 antagonistas de TMEFF2.

[0056] Un “antagonista de TMEFF22” engloba un antagonista completo y antagonistas parciales. Un antagonista parcial de TMEFF2 es una sustancia endógena, un compuesto, una molécula pequeña, un agente o un fármaco que posee afinidad por TMEFF2, pero a diferencia de un antagonista completo, inhibirá solo un pequeño 35 grado de respuesta fisiológica o farmacológica característica de TMEFF2. Por consiguiente, un antagonista de TMEFF2 parcial puede bloquear incompletamente la acción de agonistas mediante, entre otros, un mecanismo no competitivo.

[0057] El término “antagonista de TMEFF2” comprende antagonistas competitivos, no competitivos, funcionales y químicos como se describe, entre otros, en Mutschler, “Arzneimittelwirkungen” (1986), 45 Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Alemania.

[0058] En el contexto de la presente invención, un antagonista de TMEFF2 es preferentemente un fármaco que no provoca una respuesta por sí mismo, sino que bloquea las respuestas mediadas por agonistas. Es una 50 entidad química que se opone a las respuestas asociadas a receptor normalmente inducidas por otro agente bioactivo.

[0059] En los ejemplos adjuntos se ha demostrado que la inhibición de TMEFF2 tiene efectos antidepresores; véase el Ejemplo 13. Específicamente, con el fin de demostrar que la inhibición de TMEFF2 tiene efectos antidepresores, la función de TMEFF2 se inhibió específicamente administrando moléculas de ARN interferente 55 pequeño (ARNip) bicatenario al cerebro de ratones. Dos cánulas guía (23 de calibre, longitud 10 mm) se insertaron bilateralmente en la amígdala del cerebro de ratones DBA/2Jico macho. La inserción de la cánula guía se hizo usando un instrumento estereotáxico. Las coordenadas, en relación con el bregma, fueron -1,0 mm posterior, $\pm 3,1$ mm lateral y -1,6 mm ventral. Tras un periodo de recuperación de 10 días, los ratones se dividieron en dos grupos experimentales que se inyectaron con tanto ARN erróneo bicatenario de control (control) como con ARNip

bicatenario específico para TMEFF2 (ARNip de TMEFF2). La secuencia usada para el ARNip erróneo de control fue 5'-CGC GUA GAA GAU GAA GUU G TT-3' (SEQ ID NO: 15). Las secuencias usadas para ARNip de TMEFF2 fueron 5'-UCA GAA GGA UCC UGU GCU A-3' (SEQ ID NO: 16) y 5'-CGG UUA CGA UGA CAG AGA A-3' (SEQ ID NO: 17). En el día 10 después de la cirugía, el ARNip de control o de TMEFF2 se infundió en ratones sin anestesiarse a una concentración de 0,2 nmol/ μ l, y un volumen de 0,5 μ l por lado, durante un periodo de 2 min por lado, usando sistemas de infusión específicamente adaptados (33 de calibre, longitud 12 mm). Los animales se dejaron tranquilos hasta que tuvieron lugar las pruebas de comportamiento.

[0060] Los efectos de la inhibición de TMEFF2 sobre el comportamiento similar a depresivo se evaluó 24 horas (FST1) y 48 horas (FST2) después de la infusión de ARNip de control o de TMEFF2 según el paradigma de la prueba de natación forzada. La prueba de natación forzada es una prueba convencional que se basa en la suposición de que los animales normalmente intentarán escapar de un estímulo aversivo. Cuando la estimulación aversiva es inevitable, el animal dejará eventualmente de intentar escapar. El cese temprano de intentos para escapar se considera un análogo de roedor de depresión inducida por estrés. La prueba se usa para determinar la eficacia de antidepresores, probar nuevos compuestos farmacéuticos y validar modelos animales de depresión (Porsolt y col., Arch. Int. Pharmacodyn. 229 (1977), 327-336; Porsolt, Rev. Neurosci. 11 (2000), 53-58; Reneric y col., Behav. Brain Res. 136 (2002), 521-532; Page y col., Psychopharmacology 165 (2003), 194-201; Kellihier y col., Psychoneuroendocrinology 28 (2003), 332-347). La prueba consiste en colocar un ratón durante un periodo de 5 minutos en un cilindro de vidrio que contiene agua. Bajo tales circunstancias, el ratón no puede tocar el fondo del cilindro y es así obligado a nadar. El tiempo, latencia y frecuencia del esfuerzo frente a flotar se puntúan como parámetros de comportamiento. La flotación (es decir, movimientos hechos solo para mantener el equilibrio y la respiración) es un comportamiento pasivo asociado a la desesperación y representa un síntoma similar a depresivo ya que el animal no hace ningún esfuerzo para superar activamente la estresante situación. El elevado esfuerzo (es decir, intentos activos por escapar) indica comportamiento de superación activa que puede interpretarse como una mejora de síntomas similares a la depresión. Por ejemplo, el tratamiento con antidepresores serotoninérgicos reduce el tiempo total gastado en flotar (Borsini, Neurosci. Biobehav. Rev. 19 (1995), 377-395; Redrobe y Bourin, Psychopharmacology 138 (1998), 198-206), y en paralelo aumenta el tiempo de comportamiento activo (es decir, natación o esfuerzo; Lucki y col., Psychopharmacology 155 (2001), 315-322).

[0061] Se encontró que la inhibición de TMEFF2 por ARNip durante periodos de 24 y 48 horas aumentaba intentos activos por escapar (es decir, aumentos en el tiempo de esfuerzo) mientras que una disminución en el comportamiento pasivo (es decir, disminución en el tiempo y frecuencia de flotación) se midió cuando se compara con ratones de control inyectados con ARNip de control (Figura 20). Estos resultados demuestran que la inhibición de TMEFF2 tiene propiedades antidepresoras que producen mejoras del comportamiento similar a depresión.

[0062] Así, según la presente invención, se prefiere un modulador de TMEFF2 de la ruta de señalización de activina. Un modulador de TMEFF2 de la ruta de señalización de activina es un compuesto que reduce la unión de activina a TMEFF2 como se describe en el presente documento anteriormente. Por consiguiente, la activación de la señalización de smad puede facilitarse más eficientemente. Por tanto, un modulador tal también puede considerarse un agonista de TMEFF2 en cuanto a su efecto sobre la ruta de señalización de activina, es decir, un agonista de la ruta de señalización de activina.

[0063] Como se ha mencionado en el presente documento anteriormente, se ha mostrado que la infusión de activina en el hipocampo de modelos animales de depresión tiene efectos similares a antidepresores. Por consiguiente, se asume que una mayor cantidad de activina puede facilitar más eficientemente la inducción de la ruta de señalización de activina. Así se supone, sin estar ligado a teoría, que reducir/inhibir la unión de TMEFF2 a activina también conduce a una activación más eficiente de la ruta de señalización de activina; véase la Figura 19.

[0064] La unión de activina a receptores de activina de tipo II produce la fosforilación de las proteínas Smad tales como Smad2 y Smad3 que forman complejos homo- y heterómeros con otras proteínas que se unen a ADN y regulan la transcripción génica. Por consiguiente, la señalización de activina puede monitorizarse evaluando la unión y activación de genes diana Smad. Cuando se fosforila por receptores de activina, proteínas Smad tales como Smad3 y Smad4 pueden unirse a la secuencia de ADN específica CAGA (Dennler y col., 1998, EMBO J 17:3091-3100; Lin y col., 2005, J Immunol 175:547-554; Luo y col., 2006, Proc Natl Acad Sci USA 103:18326-18331). Con el fin de demostrar que la activación de TMEFF2 pueden inhibir la señalización de activina y la actividad de Smad, células AtT-20 se transfectaron con un vector de expresión que contiene el ADNc de TMEFF2 humano y plásmido que contiene 12 copias de la secuencia de CAGA delante de un indicador de luciferasa. El ADNc de TMEFF2 humana se insertó en el vector de expresión pcDNA3.1 (Invitrogen).

[0065] Células AtT-20 se cotransfectaron con tanto 1 µg/ml de TMEFF2 humana como plásmido de control de pcDNA3.1 y 1 µg/ml de plásmido 12xCAGA-luciferasa. El medio de cultivo se sustituyó con DMEM + 10% de SBF 24 horas después y 48 horas después de la transfección, las células se trataron con 50 ng/ml de activina durante 6 horas en medio que contiene 0% de SBF. La actividad de luciferasa se midió entonces en un luminómetro Wallac 5 como se ha descrito previamente (Páez-Pereda y col., 2001, J. Clin. Invest. 108: 1123-1131).

[0066] La expresión de TMEFF2 redujo la activación transcripcional del plásmido 12xCAGA-luciferasa por activina (Figura 21). Este resultado demuestra que TMEFF2 inhibe la ruta de señalización de activina y activación de proteínas Smad. Como se sabe que la señalización de activina activa y el aumento de la actividad de Smad2 10 participan en actividad antidepresora (Dow y col., 2005, J Neuroscience 25:4908-4916), puede usarse una reducción de la expresión de TMEFF2 para tratar trastornos afectivos promoviendo la señalización de activina y la actividad de Smad.

[0067] En vista del hallazgo de que TMEFF2 puede actuar sobre la ruta de señalización de activina, los 15 procedimientos para identificar moduladores de TMEFF2 de la ruta de señalización de activina se describen por la presente invención.

[0068] Se cree que los dominios similares a folistatina de TMEFF2 pueden unirse a activina mediante una 20 interacción proteína-proteína.

[0069] Por consiguiente, se describen procedimientos para identificar moduladores de TMEFF2 de la ruta de señalización de activina. Por ejemplo, pueden usarse ensayos de cribado que miden interacciones proteína-proteína para seleccionar compuestos que alteran la unión de TMEFF2 a activina, tal como análisis de Scatchard, ensayos de proximidad de centelleo (SPA), transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), polarización por 25 fluorescencia, ensayos de dos híbridos, ensayos de captura, y otros (para una revisión de procedimientos de cribado véase, por favor, Warner y col., 2004, Curr Med Chem 11:721-730; Yin, Hamilton, 2005, Angew Chem Int Ed 44:4130-4163; Chène, 2006, ChemMedChem 1:400-411).

[0070] Por ejemplo, la activina puede marcarse radiactivamente con I^{125} o H^3 y puede ponerse en contacto 30 con TMEFF2, fragmentos de TMEFF2 o células que expresan TMEFF2. La fracción de activina marcada libre puede separarse de la fracción unida a TMEFF2 mediante precipitación, filtración o cromatografía en columna. La cantidad de activina radiactivamente marcada que se une a TMEFF2 puede estimarse midiendo la radiactividad unida a TMEFF2 con un contador de partículas beta. Los datos pueden analizarse usando un análisis de Scatchard. Alternativamente, la activina puede marcarse con colorantes fluorescentes o con proteínas fluorescentes y la 35 cantidad de activina unida a TMEFF2 puede medirse por detección de fluorescencia.

[0071] Alternativamente, la unión de activina a TMEFF2 puede medirse por "ensayo de proximidad de centelleo" (SPA). En este caso, TMEFF2 o fracciones de TMEFF2 pueden unirse a perlas de centelleo de SPA y la 40 activina puede marcarse, por ejemplo, con I^{125} o H^3 . Si las dos moléculas están unidas, las partículas en desintegración de la activina marcada estimulan la emisión de luz de perlas de SPA. La fracción de activina libre no produce emisión de luz debido a que no está suficientemente próxima a las perlas. Este ensayo también puede realizarse marcando TMEFF2 y uniendo activina a perlas de SPA. Detalles de tales procedimientos son muy conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Wu y Lui, 2005, BioDrugs 19:383-392.

[0072] Todavía otro procedimiento para detectar inhibidores de TMEFF2 es medir la unión de TMEFF2 a 45 activina por FRET (Jares-Erijman y Jovin, 2003, Nat Biotechnol 21:1387-1395). Este procedimiento consiste en la transferencia de energía entre dos colorantes fluorescentes que están unidos a dos proteínas, en este caso activina y TMEFF2. Si la activina y TMEFF2 están unidas juntas, los colorantes unidos transfieren energía de tal forma que uno de los colorantes absorba la energía del otro y esto produce un aumento en la cantidad de fluorescencia emitida 50 por el colorante aceptor. Por ejemplo, una aplicación de este principio es la plataforma AlphaScreen. Las perlas donantes de AlphaScreen podrían unirse a activina y las perlasceptoras de AlphaScreen podrían unirse a TMEFF2 o viceversa. Las perlas donantes se estimulan por luz UV con una longitud de onda particular. La emisión del donante activado estimula las perlasceptoras, que emiten luz en una longitud de onda diferente y esta emisión puede registrarse. Las perlasceptoras no se activan si no se unen TMEFF2 y activina.

[0073] Todavía otra posibilidad para cribar compuestos que se unen a TMEFF2 sería usar un ensayo 55 funcional. La activina libre se une a los receptores de activina y esto produce activación de receptor, fosforilación y activación de Smad. Por tanto, la disociación entre TMEFF2 y activina puede medirse por un aumento de receptor o fosforilación de Smad, además de un aumento de la actividad transcripcional de Smad. La actividad de transcripción

de Smad puede medirse, por ejemplo, con una construcción indicadora que tiene una secuencia 12XCAGA clonada en la región potenciadora de un indicador de luciferasa (como se describe en detalle en el Ejemplo 14).

[0074] En los ejemplos anteriormente descritos para identificar compuestos que reducen la unión entre activina y TMEFF2 también pueden usarse células que expresan TMEFF2 y/o activina, es decir, ensayos basados en células.

EXPRESIÓN DE TMEFF2

10 **[0075]** “Una célula que expresa TMEFF2” es una célula como se describen en el presente documento que puede expresar TMEFF2 como se describe en el presente documento. Una célula que expresa TMEFF2 puede producirse naturalmente y, así expresar endógenamente TMEFF2. Alternativamente, una célula tal puede prepararse manipulando genéticamente dicha célula con un polinucleótido que codifica TMEFF2 como se describe en más detalle en el presente documento más adelante. Dicha célula puede seleccionarse del grupo que consiste en
15 una célula de animal, por ejemplo, una célula de mamífero, célula de insecto, célula de anfibio o célula de pez, una célula de planta, célula fúngica y célula bacteriana como se describirá en más detalle en el presente documento más adelante. Preferentemente, dicha célula es una célula AtT-20 (Leung y col. (1982) Virchows Arch. 396: 303-312; número de ATCC CCL-89).

20 **[0076]** A modo de ejemplo, en los procedimientos para identificar moduladores de TMEFF2, pueden usarse líneas celulares o células primarias que expresan endógenamente TMEFF2, tal como células AtT-20, para medir actividad de TMEFF2. Alternativamente, la expresión de TMEFF2 puede lograrse por la transfección de vectores de expresión en líneas celulares que normalmente no expresan TMEFF2 o la infección con virus modificados que expresan TMEFF2 como se explica en el presente documento en más detalle. La activación constitutiva de TMEFF2
25 puede usarse para cribar moduladores de TMEFF2. La activación constitutiva puede lograrse por expresión en exceso, mutación genética natural o mutagénesis dirigida a sitio (Behan y Chalmers (2001) Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 4:548-560; Chalmers y Behan (2002) Nat. Rev. Drug Discov. 1:599-608). Agonistas, antagonistas o agonistas inversos pueden usarse adicionalmente mediante química medicinal para encontrar moduladores de TMEFF2.

30 **[0077]** Como se describe en el presente documento, TMEFF2 se une a membrana (véase también el Ejemplo 3) y también se cree que se libera en la matriz extracelular mediante escisión proteolítica; véase Horie y col. (2002), citado anteriormente. Sin embargo, en el contexto de la presente invención, se prefiere que TMEFF2 no se libere de las células que expresan TMEFF2 y que se use para identificar un modulador de TMEFF2. Alternativamente, se prefiere que al menos una parte de TMEFF2 esté unida a la membrana, en la que dicha porción pueden modular la
35 ruta de señalización de AMPc, preferentemente la ruta de señalización de CRH y en la que dicha porción es accesible a la acción de un modulador de TMEFF2, preferentemente un agonista de TMEFF2 de la ruta de señalización de CRH, preferentemente la ruta de señalización de AMPc.

[0078] El Ejemplo 5 proporciona orientación sobre cómo probar si TMEFF2 está o no unido a la membrana o
40 si la porción anteriormente descrita de TMEFF2 es todavía activa o no y así evaluar si el efecto de un modulador de TMEFF2 puede o no ligarse a la forma o porción unida a la membrana de TMEFF2.

[0079] Además, aunque la porción extracelular de TMEFF2 pueda liberarse de células por liberaciones de la escisión proteolítica, que entonces pueden actuar de citocina o factor de crecimiento que puede unirse a la familia
45 erbB de receptores de EGF (Horie y col. (2002) Genomics 67:146-152), es de notar que esta familia de receptores no actúa mediante la ruta de AMPc, pero puede regular la proliferación celular mediante cinasas tales como MAPK y PKC (Moghal y Sternberg (1999) Curr Opin Cell Biol 11:190-196). Por tanto, se cree que cualquier efecto producido por una forma soluble de TMEFF2 no interfiere con la ruta de señalización de AMPc mediante la cual se cree que actúa la forma unida a la membrana de TMEFF2. Además, si se desea la unión del dominio extracelular de TMEFF2
50 soluble a la familia de receptores de EGF, puede inhibirse por anticuerpos para TMEFF2 que previenen la activación de la familia de receptores de EGF o por anticuerpos contra la forma soluble de TMEFF2.

[0080] Como se ha descrito anteriormente en el contexto de la participación de TMEFF2 en la ruta de señalización de CRH, preferentemente la ruta de señalización de AMPc, y en la ruta de señalización de activina,
55 respectivamente, es posible discriminar ambas rutas de señalización. Como se ha mencionado anteriormente, la ruta de señalización de activina no actúa mediante la ruta de AMPc y, así es posible discriminar entre ambas rutas de señalización.

[0081] Con el fin de expresar TMEFF2 en una célula, una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia

de nucleótidos que codifica TMEFF2 puede insertarse en el vector que, a su vez, puede usarse para manipular genéticamente una célula huésped.

- [0082]** En particular, moléculas de ácidos nucleicos que codifican TMEFF2 pueden insertarse en varios
 5 vectores comercialmente disponibles. Ejemplos no limitantes incluyen vectores de plásmido compatibles con células
 de mamífero, tales como pUC, pBluescript (Stratagene), pET (Novagen), pREP (Invitrogen), pCRTopo (Invitrogen),
 pcDNA3 (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pMC1 neo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-
 pSV2neo, pBPV-1, pdBPVMMTneo, pRSVgpt, pRSVneo, pSV2-dhfr, pUCTag, pIZD35, pLXIN y pSIR (Clontech) y
 10 pIRES-EGFP (Clontech). Vectores de baculovirus tales como pBlueBac, sistema de expresión de baculovirus
 BacPacz (CLONTECH) y sistema de expresión de baculovirus MaxBac™, células de insecto y protocolos
 (Invitrogen) están disponibles comercialmente y también pueden usarse para producir altos rendimientos de proteína
 biológicamente activa (véase, por tanto, Miller (1993), Curr. Op. Genet. Dev., 3, 9; O'Reilly, Baculovirus Expression
 Vectors: A Laboratory Manual, pág. 127). Además, vectores procariotas tales como pcDNA2; y vectores de levadura
 15 tales como pYes2, son ejemplos no limitantes de otros vectores adecuados para su uso con la presente invención.
 Para técnicas de modificación de vectores véase Sambrook y Russel (2001), citado en el presente documento. Los
 vectores pueden contener uno o más sistemas de replicación y herencia para la clonación o expresión, uno o más
 marcadores para la selección en el huésped, por ejemplo, resistencia a antibióticos, y uno o más casetes de
 expresión.
- 20 **[0083]** Las secuencias codificantes insertadas en el vector pueden sintetizarse mediante procedimientos
 convencionales, aislarse de fuentes naturales o prepararse como híbridos. La ligación de las secuencias codificantes
 con elementos reguladores de la transcripción (por ejemplo, promotores, potenciadores y/o aislantes) y/o con otras
 secuencias codificantes de aminoácidos puede llevarse a cabo usando procedimientos establecidos.
- 25 **[0084]** Además, los vectores pueden, además de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican TMEFF2,
 comprender elementos de control de la expresión, permitiendo la apropiada expresión de las regiones codificantes
 en huéspedes adecuados. Tales elementos de control son conocidos para el experto y pueden incluir un promotor,
 codón de iniciación de la traducción, sitio de traducción e inserción o sitios internos de entrada al ribosoma (IRES)
 (Owens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001), 1471-1476) para introducir un inserto en el vector. Preferentemente,
 30 la molécula de ácido nucleico que codifica TMEFF2 está operativamente ligada a dichas secuencias de control de la
 expresión permitiendo la expresión en células eucariotas o procariotas. Particularmente se prefiere en este contexto
 controlar secuencias que permiten la correcta expresión en células neuronales y/o células derivadas de tejido
 nervioso.
- 35 **[0085]** Elementos de control que aseguran la expresión en células eucariotas y procariotas son muy conocidos
 para aquellos expertos en la materia. Como se ha mencionado anteriormente, normalmente comprenden secuencias
 reguladoras que aseguran la iniciación de la transcripción y opcionalmente señales de poli-A que aseguran la
 terminación de la transcripción y estabilización del transcrito. Elementos reguladores adicionales pueden incluir
 40 potenciadores de la transcripción, además de la traducción, y/o regiones promotoras naturalmente asociadas o
 heterólogas. Posibles elementos reguladores que permiten la expresión en, por ejemplo, células huésped de
 mamífero comprenden el promotor de timidina cinasa CMV-HSV, SV40, promotor RSV (virus del sarcoma de Rous),
 promotor del factor 1 α de elongación humano, potenciador del CMV, promotor de CaM-cinasa o potenciador de
 SV40.
- 45 **[0086]** Para la expresión, por ejemplo, en tejido nervioso y/o células derivadas del mismo, varias secuencias
 reguladoras son muy conocidas en la técnica, como la secuencia promotora mínima de neurofilamento L humano
 (Charron, J. Biol. Chem. 270 (1995), 25739-25745). Para la expresión en células procariotas se ha descrito una
 multitud de promotores que incluyen, por ejemplo, el promotor tac-lac, el promotor lacUV5 o trp. Además de los
 50 elementos que son responsables de la iniciación de transcripción, tales elementos reguladores también pueden
 comprender señales de terminación de la transcripción, tales como sitio de SV40-poliA o el sitio tk-poli-A, aguas
 abajo del polinucleótido. En este contexto, vectores de expresión adecuados se conocen en la técnica tales como
 vector de expresión de ADNc de Okayama-Berg pcDV1 (Pharmacia), pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (In-Vitrogene,
 como se usa, entre otros, en los ejemplos adjuntos), pSPORT1 (GIBCO BRL) o pGEMHE (Promega), o vectores de
 55 expresión procariotas, tales como lambda gt11.
- [0087]** Un vector de expresión como se describe en el presente documento es al menos capaz de dirigir la
 replicación, y preferentemente la expresión, de los ácidos nucleicos y proteína. Orígenes de replicación adecuados
 incluyen, por ejemplo, los orígenes de replicación de Col E1, viral de SV40 y M 13. Promotores adecuados incluyen,
 por ejemplo, el promotor del citomegalovirus (CMV), el promotor lacZ, el promotor gai10 y el promotor poliédrico del

virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV). Secuencias de terminación adecuadas incluyen, por ejemplo, la hormona de crecimiento bovina, SV40, lacZ y señales de poliadenilación poliédricas de AcMNPV. Ejemplos de marcadores de selección incluyen resistencia a neomicina, ampicilina e higromicina y similares. Vectores específicamente diseñados permiten el barajado de ADN entre diferentes células huésped, tal como bacterias-levadura, o bacterias-células animales, o bacterias-células fúngicas, o bacterias-células invertebradas.

[0088] Además de las moléculas de ácidos nucleicos que codifican TMEFF2, el vector puede comprender además secuencias de ácidos nucleicos que codifican señales de secreción. Tales secuencias son muy conocidas para el experto en la materia. Además, dependiendo del sistema de expresión usado, las secuencias conductoras que pueden dirigir el polipéptido expresado a un compartimento celular pueden añadirse a la secuencia codificante de las moléculas de ácidos nucleicos de la invención y son muy conocidas en la técnica. La(s) secuencia(s) conductora(s) está(n) ensamblada(s) en fase apropiada con secuencias de traducción, iniciación y terminación, y preferentemente, una secuencia conductora que puede dirigir la secreción de proteína traducida, o una parte de la misma, en, entre otros, la membrana extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluye un péptido de identificación del extremo C o N que confiere propiedades deseadas, por ejemplo, estabilización o purificación simplificada de producto recombinante expresado. Una vez el vector se ha incorporado en el huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos y, según se desee, puede seguir la recogida y purificación de las proteínas, fragmentos antigénicos o proteínas de fusión de la invención.

[0089] La presente invención desvela cómo identificar compuestos, moléculas pequeñas y agentes que son antagonistas y agonistas inversos de TMEFF2. Un prototipo para identificar compuestos, moléculas pequeñas y agentes que son moduladores de TMEFF2 de la ruta de señalización de activina se presenta en el Ejemplo 15. Las células que expresan TMEFF2 pueden generarse a partir de células AtT-20, células HEK293 u otras líneas celulares (por ejemplo, HCN-1A, HCN-2, HIT-T15, RIN-m5F, betaTC3, PC12, HT22, SH-SY5Y, Neuro2A o CA77) que pueden transfectarse establemente con ADNc que codifica TMEFF2 y sembrarse en placas de 12, 96 y 384 pocillos. Las secuencias de ácidos nucleicos y ADNc de TMEFF2 son muy conocidos en la técnica, véanse, por ejemplo, los números de acceso de GenBank NM_016192, NM_019790, BC034850, BC008973, AY412287, AY412288, AY412289, AB017270 y AB017269. Una secuencia de ácidos nucleicos de TMEFF2 preferida o ADNc es una secuencia de ácidos nucleicos de TMEFF2 humana o ADNc como se muestra en la Figura 16. Dichas células se cultivan en medio apropiado. Ejemplos de tales medios son muy conocidos en la técnica, véase, por ejemplo Freshney, "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 4ª edición, Wiley-Liss Publishing, 2000.

[0090] El término "una célula correspondiente que no expresa TMEFF2" incluye células que son esencialmente idénticas a células que expresan TMEFF2, con la excepción de que estas células no expresan TMEFF2, por ejemplo, debido a inactivación completa o parcial del gen que codifica TMEFF2 conseguida por un ARNip de genes inactivados o similares.

[0091] El término "poner en contacto una célula" engloba que una célula que expresa TMEFF2 o una célula correspondiente que no expresa TMEFF2 se pone en contacto por cualquier medio conocido y procedimientos en la materia con un compuesto candidato.

[0092] El experto en la materia puede emplear fácilmente los compuestos y los procedimientos de la presente invención con el fin de elucidar los efectos moduladores y/o características de un compuesto de prueba que va a identificarse y/o caracterizarse según cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

[0093] El término "compuesto de prueba" o "compuesto que va a probarse" se refiere a una molécula o sustancia o compuesto o composición o agente o cualquier combinación de los mismos que va a probarse por uno o más procedimientos de cribado de la invención como modulador de TMEFF2 putativo. Un compuesto de prueba puede ser cualquier compuesto químico, tal como un compuesto químico inorgánico, un compuesto químico orgánico, una proteína, un péptido, un hidrato de carbono, un lípido, o una combinación de los mismos, o cualquiera de los compuestos, composiciones o agentes descritos en el presente documento. Debe entenderse que el término "compuesto de prueba", cuando se usa en el contexto de la presente invención, es intercambiable con los términos "molécula de prueba", "sustancia de prueba", "posible candidato", "candidato" o los términos mencionados anteriormente en este documento. La función moduladora del modulador puede medirse mediante procedimientos descritos en el presente documento. Tales procedimientos comprenden ensayos de interacción como ensayos de inmunoprecipitación, ELISA, RIA, además de inhibición/activación específica, como los ensayos proporcionados en los ejemplos adjuntos.

[0094] Otros compuestos candidatos que van a usarse como punto de partida para el cribado de moduladores de TMEFF2 son aptámeros, aptazimas, ARNi, ARNhp, ARNzimas, ribozimas, ADN antisentido, oligonucleótidos antisentido, ARN antisentido, anticuerpos, affybodies, trinectinas, anticalinas, o compuestos similares. Todavía, estos 5 compuesto candidatos no solo son puntos de partida, son preferentemente moduladores de TMEFF2 que actúan sobre la ruta de señalización de activina.

[0095] Un enfoque de ARNip se desvela, por ejemplo, en los documentos EPB1 1 214 945, EP-B1 1 144 623 o Elbashir ((2001), Nature 411, 494-498)). También se desvela según la presente invención que, por ejemplo, ARN 10 de horquilla pequeña (ARNhp) se emplea según la presente invención como composición farmacéutica. El enfoque de ARNhp para el silenciamiento de genes es muy conocido en la técnica y puede comprender el uso de ARNtp (temporal pequeño); véase, entre otros, Paddison (2002) Genes Dev. 16, 948-958.

[0096] Como se ha mencionado anteriormente, enfoques para el silenciamiento de genes se conocen en la 15 técnica y comprenden enfoques de "ARN" como ARNi o ARNip. El uso satisfactorio de tales enfoques se ha mostrado en Paddison (2002) Genes Dev. 16:948-58, Elbashir (2002) Methods 26, 199-213; Novina (2002) Mat. Med. 3 de junio de 2002; Donze (2002) Nucl. Acids Res. 30, e46; Paul (2002) Nat. Biotech 20, 505-508; Lee (2002) Nat. Biotech. 20, 500-505; Miyagashi (2002) Nat. Biotech. 20, 497-500; Yu (2002) PNAS 99, 6047-6052 o 20 Brummelkamp (2002), Science 296, 550-553. Estos enfoques pueden basarse en vector, por ejemplo el vector pSUPER, o pueden emplearse vectores polIII de ARN como se ilustra, entre otros, en Yu (2002) en el lugar citado; Miyagashi (2002) en el lugar citado o Brummelkamp (2002) en el lugar citado

[0097] Por consiguiente, el experto en la materia está fácilmente en posición de tener a su disposición 25 compuestos candidatos que pueden usarse en los procedimientos de cribado para moduladores de TMEFF2 como una base para, entre otros, mejorar o adicionalmente desarrollar la capacidad de tales compuestos para modular TMEFF2. Por consiguiente, el experto en la materia puede modificar fácilmente tales compuestos mediante procedimientos conocidos en la técnica para mejorar su capacidad de acción como un modulador en el sentido de la presente invención. La capacidad de uno o más de los compuestos anteriormente mencionados para modular TMEFF2 se prueba como se describe anteriormente en este documento.

[0098] Otra técnica para el cribado de fármacos que puede usarse proporciona cribado de alto rendimiento de 30 compuestos que tienen afinidad de unión adecuada a la proteína TMEFF2 como se describe en la solicitud PCT publicada WO 84/03564. En este procedimiento, como se aplica a las proteínas de la invención, grandes números de diferentes compuestos de prueba pequeños, por ejemplo, aptámeros, péptidos, compuestos de bajo peso molecular, etc., se proporcionan o sintetizan sobre un sustrato sólido, tal como clavos de plástico o alguna otra 35 superficie. Los compuestos de prueba se hacen reaccionar con proteínas o fragmentos de las mismas, y se lavan. Las proteínas unidas se detectan entonces mediante procedimientos muy conocidos en la técnica. Las proteínas purificadas también pueden recubrirse directamente sobre placas para su uso en las técnicas de cribado de fármacos anteriormente mencionadas. Alternativamente, anticuerpos no neutralizantes pueden usarse para capturar 40 el péptido e inmovilizarlo sobre un soporte sólido. En otra realización pueden usarse ensayos de cribado de fármacos competitivos en los que anticuerpos neutralizantes que pueden unirse a la proteína específicamente compiten con un compuesto de prueba para unirse a proteína. De este modo, los anticuerpos pueden usarse para detectar la presencia de cualquier péptido, que comparte uno o más determinantes antigénicos con la proteína.

[0099] La presente invención prevé en otra realización más preferida que el compuesto que va a probarse 45 para su capacidad para modular TMEFF2 sea sintéticamente, recombinantemente y/o químicamente producido como se ha descrito anteriormente en detalle en este documento.

[0100] Además, es concebible que los moduladores de TMEFF2 se criben en un ensayo de cribado de alto 50 rendimiento. El cribado de alto rendimiento (HTS) es el procedimiento de prueba de un gran número de diversas estructuras químicas contra dianas de enfermedad para identificar 'éxitos'. En comparación con procedimientos de cribado de fármacos tradicionales, el HTS se caracteriza por su simplicidad, rapidez, bajo coste y alta eficiencia, tomando las interacciones ligando-diana como principio, además de conducir a una mayor recogida de información. Como campo multidisciplinar, el HTS implica una plataforma de funcionamiento automatizada, sistema de prueba 55 altamente sensible, modelo de cribado específico (*in vitro*), una abundante biblioteca de componentes y un sistema de adquisición y procesamiento de datos. Diversas tecnologías están ahora disponibles, especialmente tecnologías novedosas tales como fluorescencia, resonancia magnética nuclear, cromatografía de afinidad, resonancia de plasmones superficiales y micromatriz de ADN, y el cribado de más de 100.000 muestras por día ya es posible (véase por ejemplo, Liu y col. (2004) Am. J. Pharmacogenomics 4:263-276). Los cribados de alto rendimiento

pueden llevarse a cabo robóticamente en placas de titulación de 1536 ó 3456 pocillos a pequeñas cantidades (submicrogramo) de compuesto (disuelto en volúmenes inferiores a microlitros). La química combinatoria puede suministrar enormes números de compuestos en un corto periodo de tiempo, que proporciona un elevado número de éxitos, es decir, compuestos que provocan un nivel predeterminado de actividad en el bioensayo (Silverman, "The organic chemistry of drug design and drug action" 2ª ed. Elsevier Academic Press, 2004).

[0101] Los procedimientos de cribado de alto rendimiento también se describen en las patentes de EE.UU. nº 5.585.277 y 5.679.582, en el documento US nº de serie 08/547.889 y en la solicitud PCT publicada PCT/US96/19698, y pueden usarse para identificar un modulador de TMEFF2 como se describe en el presente documento. Los procedimientos de cribado de alto rendimiento y enfoques similares que se conocen en la técnica Spencer, Biotechnol. Bioeng. 61 (1998), 61-67; Oldenburg, Annu. Rev. Med. Chem. 33 (1998), 301-311) se llevaron a cabo usando placas comercialmente disponibles de 96 pocillos, 384 pocillos, 1536 pocillos (y otras). En este procedimiento, grandes números de diferentes compuestos de prueba pequeños, por ejemplo, aptámeros, péptidos, compuestos de bajo peso molecular como se describe en el presente documento, se proporcionan o sintetizan sobre un sustrato sólido, tal como clavos de plástico o alguna otra superficie. Otros procedimientos que van a emplearse según la presente invención comprenden, pero no se limitan a, lecturas de fluorescencia homogénea en cribados de alta resolución (como se describe, entre otros, en Pope, Drug Discovery Today 4 (1999), 350-362).

[0102] La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un modulador de TMEFF2, en el que dicho modulador de TMEFF2 es un antagonista de TMEFF2 para el uso en el tratamiento de un trastorno afectivo.

[0103] El aumento o disminución del nivel de un constituyente de la ruta de señalización de CRH, preferentemente un constituyente de la ruta de señalización de AMPc o la reducción de la unión de activina a TMEFF2 y así la activación más eficiente de la ruta de señalización de activina, también dependerá de la dosificación y de la forma de administración de dicho modulador de TMEFF2. Por tanto, la pauta de dosificación utilizando dicho modulador de TMEFF2 de la presente invención se selecciona según una variedad de factores que incluyen tipo, especies, edad, peso, sexo y condición médica del paciente; la gravedad de la condición que va a tratarse; la vía de administración; y el compuesto particular empleado. Se reconocerá que un médico o veterinario generalmente experto puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de compuesto requerida para prevenir, contrarrestar o detener el progreso de la afección. Los sistemas de prueba que son adecuados para tales fines, es decir, que permiten medir el efecto de dicho modulador de TMEFF2, se describen en el presente documento.

[0104] En el contexto de la presente invención, el término "sujeto" significa un individuo en necesidad de un tratamiento de un trastorno afectivo. Preferentemente, el sujeto es un vertebrado, incluso más preferido un mamífero, particularmente preferido un ser humano.

[0105] El término "administrado" significa administración de una dosis terapéuticamente eficaz de dicho modulador de TMEFF2 a un individuo. Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se indica una dosis que produce los efectos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del fin del tratamiento, y podrá determinarse por un experto en la materia usando técnicas conocidas. Como se conoce en la técnica y se ha descrito anteriormente, pueden ser necesarios ajustes para administración sistémica frente a localizada, edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, interacción de fármacos y la gravedad de la condición, y podrán determinarse con experimentación rutinaria por aquellos expertos en la materia. Los procedimientos de uso para el tratamiento descrito en el presente documento son aplicables a tanto terapia humana con aplicaciones veterinarias. Los compuestos descritos en el presente documento que tienen la actividad terapéutica deseada pueden administrarse en un vehículo fisiológicamente aceptable a un paciente, como se describe en el presente documento. Dependiendo del modo de introducción, los compuestos pueden formularse en una variedad de formas como se trata más adelante. La concentración de compuesto terapéuticamente activo en la formulación puede variar de aproximadamente el 0,1-100% en peso. Los agentes pueden administrarse solos o en combinación con otros tratamientos.

[0106] La administración de la composición farmacéutica puede hacerse de una variedad de formas como se trata anteriormente, que incluyen, pero no se limitan a, intracerebral, por vía oral, subcutáneamente, intravenosamente, intra-arterial, intranodal, intramedularmente, intratecal, intraventricular, intranasalmente, intrabronquial, transdérmicamente, intranodalmente, intrarectalmente, intraperitonealmente, intramuscularmente, intrapulmonarmente, vaginalmente, rectalmente, o intraocularmente. En algunos casos, por ejemplo, en el tratamiento de heridas e inflamación, los agentes candidatos pueden aplicarse directamente como un espray seco

en disolución.

[0107] Para administración por vía oral, la composición farmacéutica de dicho modulador de TMEFF2 puede tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos, películas o cápsulas preparadas mediante medios convencionales con excipientes aceptables farmacéuticos tales como aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa), cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina, hidrogenofosfato de calcio), lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice), disgregantes (por ejemplo, almidón de patata, glicolato sódico de almidón), o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Preparaciones líquidas para administración por vía oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, disoluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de uso. Tal preparación líquida puede prepararse mediante medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, sorbitol, jarabe, derivados de celulosa, grasas comestibles hidrogenadas), agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina, goma arábica), vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres aceitosos, alcohol etílico, aceites vegetales fraccionados), conservantes (por ejemplo, p-hidroxicarbonatos de metilo o propilo, ácidos sórbicos). Las preparaciones también pueden contener sales tampón, aromas, colorantes y edulcorantes según se considere apropiado. Las preparaciones para administración por vía oral pueden formularse adecuadamente para dar liberación controlada del agente modulador de la actividad de TMEFF2.

[0108] Para administración por inhalación, dicho modulador de TMEFF2 puede administrarse convenientemente en forma de una presentación de espray en aerosol de un envase presurizado o un nebulizador, usando un propulsor adecuado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionándose una válvula para administrar una cantidad dosificada. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina, para su uso en un inhalador o insuflador que contiene una mezcla en polvo del agente modulador de la actividad de TMEFF2 y un polvo base adecuado tal como lactosa o almidón.

[0109] El modulador de TMEFF2 puede formularse para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Los sitios de inyección incluyen intravenosa, intraperitoneal o subcutánea. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria (por ejemplo, en vial, en recipiente multi-dosis) y con un conservante añadido. El modulador de TMEFF2 puede adoptar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes o dispersantes. Alternativamente, el agente puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua libre de pirógenos estéril) antes de uso.

[0110] El modulador de TMEFF2 puede presentarse, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen dicho agente. El envase puede comprender, por ejemplo, lámina de metal o de plástico, tal como envase alveolado. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración.

[0111] La dosificación, preparación farmacéutica y administración del modulador de TMEFF2 para el tratamiento de trastornos afectivos pueden formularse de manera convencional según procedimientos encontrados en la materia, usando uno o más vehículos fisiológicos o excipiente, véase, por ejemplo Ansel y col., "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems", 7ª edición, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 1999. Así, el agente modulador de TMEFF2 y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables pueden formularse para administración por inhalación, insuflación (tanto por la boca como la nariz), administración oral, bucal, parenteral o rectal.

[0112] El médico adjunto y los factores clínicos determinarán la pauta de dosificación. Como es muy conocido en las ciencias médicas, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, que incluyen el tamaño del paciente, área superficial del cuerpo, edad, el compuesto particular que va a administrarse, sexo, tiempo y vía de administración, salud general, y otros fármacos que se administran simultáneamente. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 a 1000 µg; sin embargo, se prevén dosis inferiores o superiores a este intervalo a modo de ejemplo, especialmente considerando los factores anteriormente mencionados.

[0113] Las dosificaciones se administran preferentemente una vez a la semana; sin embargo, durante la progresión del tratamiento, las dosificaciones pueden administrarse a intervalos de tiempo mucho más largos y en

necesidad pueden administrarse a intervalos de tiempo mucho más cortos, por ejemplo, diariamente. En un caso preferido, la respuesta inmunitaria se monitoriza usando procedimientos descritos en el presente documento y adicionalmente procedimientos conocidos para aquellos expertos en la materia y las dosificaciones se optimizan, por ejemplo, en tiempo, cantidad y/o composición. Si la pauta es una infusión continua, también debe estar en el intervalo de 1 µg a 10 mg por unidad de kilogramo de peso corporal por minuto, respectivamente. El progreso puede monitorizarse por evaluación periódica. La composición farmacéutica de la invención puede administrarse localmente o sistémicamente. La administración será preferentemente parenteralmente, por ejemplo, intravenosamente. Las preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, que incluyen solución salina y medios tamponados. Vehículos parenterales incluyen disolución de ión sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa e ión sodio, Ringer con lactato, o aceites no volátiles. Los vehículos intravenosos incluyen reforzadores fluidos y nutritivos, reforzadores de electrolitos (tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer), y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

[0114] La composición farmacéutica puede administrarse con un vehículo fisiológicamente aceptable a un paciente, como se describe en el presente documento. En una realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles tales como agua y aceites, que incluyen aquellos de petróleo, origen animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra intravenosamente. También pueden emplearse soluciones salinas y dextrosa acuosa, y disoluciones de glicerol como vehículos líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. Excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, ión sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos anteriormente mencionados, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo de manera que se proporcione la forma para la administración apropiada al paciente. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

[0115] En otra realización preferida, la composición se formula según procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son disoluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Si es necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para aliviar dolor en el sitio de inyección. Generalmente, los componentes se suministran tanto por separado como mezclados juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente cerrado tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad de agente activo. Si la composición va a administrarse por infusión, puede suministrarse como una botella de infusión que contiene agua de calidad farmacéutica estéril o solución salina. Si la composición se administra mediante inyección, una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina puede proporcionarse de manera que los componentes puedan mezclarse antes de administración.

[0116] La composición farmacéutica de la invención puede formularse como formas neutras o de sal. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con aniones tales como aquellos derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellas formadas con cationes tales como aquellos derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

[0117] Opcionalmente pueden emplearse ensayos *in vitro* para ayudar a identificar intervalos de dosificación

óptimos. La dosis precisa a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración, y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y debe decidirse según el juicio del médico y cada circunstancia del paciente. Dosis eficaces pueden extrapolarse de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o de modelos animales. Preferentemente, la composición farmacéutica se administra directamente o en combinación con un adyuvante.

[0118] La composición farmacéutica se diseña preferentemente para la aplicación en terapia génica. La técnica de terapia génica ya se había descrito anteriormente a propósito de las moléculas de ácidos nucleicos de la invención y todo lo que se ha dicho aquí también se aplica a propósito de la composición farmacéutica. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico en la composición farmacéutica está preferentemente en una forma que permite su introducción, expresión y/o integración estable en células de un individuo que va a tratarse.

[0119] El modulador de TMEFF2, en una realización, es un anticuerpo para TMEFF2, por ejemplo, un anticuerpo que interfiere con la unión de activina y TMEFF2. Puede probarse por el experto si un anticuerpo es o no agonista o antagonista para TMEFF2 aplicando las pruebas para actividad de TMEFF2 como se describen en el presente documento.

[0120] El anticuerpo de la presente invención puede ser, por ejemplo, policlonal o monoclonal. El término "anticuerpo" también comprende derivados o fragmentos del mismo que todavía retienen la especificidad de unión. Técnicas para la producción de anticuerpos son muy conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988.

[0121] La presente invención incluye además anticuerpos quiméricos, monocatenarios y humanizados, además de fragmentos de anticuerpos como, entre otros, fragmentos Fab. Los fragmentos de anticuerpos o derivados comprenden además fragmentos F(ab')₂, Fv o scFv; véase, por ejemplo, Harlow y Lane, en el lugar citado. En la técnica se conocen diversos procedimientos y pueden usarse para la producción de tales anticuerpos y/o fragmentos. Así, los derivados (de anticuerpo) pueden producirse por peptidomiméticos. Además, técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (véase, entre otros, la patente de EE.UU. 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos monocatenarios para polipéptido(s) de la presente invención. Por tanto, pueden usarse animales transgénicos para expresar anticuerpos humanizados para polipéptidos de la presente invención. Lo más preferentemente, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal. Para la preparación de anticuerpos monoclonales puede usarse cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos por cultivos continuos de líneas celulares. Ejemplos de tales técnicas incluyen la técnica de hibridomas (Köhler y Milstein Nature 256 (1975), 495-497), la técnica de triomas, la técnica de hibridomas de linfocitos B humanos (Kozbor, Immunology Today 4 (1983), 72) y la técnica de hibridomas de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96). Técnicas que describen la producción de anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, la patente de EE.UU. 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos monocatenarios para polipéptidos inmunogénicos como se ha descrito anteriormente. Además, pueden usarse ratones transgénicos para expresar anticuerpos humanizados dirigidos contra dichos polipéptidos inmunogénicos. Se prefiere en particular que los anticuerpos/construcciones de anticuerpos, además de fragmentos de anticuerpos o derivados, se empleen según la presente invención o puedan expresarse en una célula. Esto puede lograrse, entre otros, por inyección directa de las moléculas proteínicas correspondientes o mediante inyección de moléculas de ácidos nucleicos que codifican las mismas. Además, se prevén enfoques de terapia génica. Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, el término "molécula de anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina completas, además de a partes de tales moléculas de inmunoglobulina. Además, el término se refiere, como se trata anteriormente, a moléculas de anticuerpo modificadas y/o alteradas como anticuerpos quiméricos y humanizados. El término también se refiere a anticuerpos monoclonales o policlonales, además de a anticuerpos recombinantemente o sintéticamente generados/sintetizados. El término también se refiere a anticuerpos intactos, además de a fragmentos de anticuerpos de los mismos, como, cadenas ligeras y pesadas separadas, Fab, Fab/c, Fv, Fab', F(ab')₂. El término "molécula de anticuerpo" también comprende anticuerpos bifuncionales y construcciones de anticuerpos, como Fvs monocatenarios (scFv) o proteínas de fusión de anticuerpos. También se prevé en el contexto de la presente invención que el término "anticuerpo" comprenda construcciones de anticuerpos que pueden expresarse en células, por ejemplo, construcciones de anticuerpo que pueden transfectarse y/o transducirse mediante, entre otros, virus o vectores. Se prevé en particular que tales construcciones de anticuerpo reconozcan específicamente un polipéptido TMEFF2. Se prevé además que dicha construcción de anticuerpo se emplee en enfoques de terapia génica.

[0122] La presente invención se refiere a usos y procedimientos para tratar trastornos afectivos. Un trastorno afectivo está seleccionado del grupo que consiste en depresión mayor, trastorno de ansiedad generalizada y

trastorno bipolar.

[0123] Una depresión mayor está seleccionada del grupo que consiste en depresión mayor, distimia, depresión atípica, trastorno disfórico premenstrual y trastorno afectivo estacional.

5

[0124] Un trastorno de ansiedad generalizada está seleccionado del grupo que consiste en trastorno de pánico, fobias, agorafobia, fobia social, fobia específica, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno por estrés posttraumático, trastorno de ansiedad por separación, manía, hipomanía y trastorno ciclotímico.

10 **[0125]** Un trastorno bipolar es trastorno bipolar tipo I o trastorno bipolar tipo II.

[0126] Es concebible que el modulador de TMEFF2 como se describe en el presente documento se administre en combinación con otro compuesto que es adecuado para tratar un trastorno afectivo.

15 **[0127]** Preferentemente, un compuesto que se administra en combinación con el modulador de TMEFF2 para tratar un trastorno afectivo está seleccionado del grupo que consiste en amitriptilina, óxido de amitriptilina, desipramina, dibenzepina, dosulepina, doxepina, clorimipramina, imipramina, nortriptilina, mianserina, maprotilina, trimipramina, CP-122721, elzasonan, PD-171729, MK-869, DOV-216303, DOV-21947, licarbazepina, anfebutamona, radafaxina, vilazodona, GSK-679769, GW-597599, NS-2359, GSK-876008, pramipexol, duloxetina, atomoxetina, LY-628535, desvenlafaxina, escitalopram, LU-AA21004, saredutant, SR-58611, SSR-149415, SSR-146977, 20 moclobemida, R-673, R-1204, BMS-469458, DPC-368, Org-34517, Org-34850, inhibidores de los receptores de CRH, ONO-2333Ms, NBI-876008, AAG-561, NBI-34041, DPC-368, PD-171729, SSR-125543, viloxazina, trazodona, nefazodona, mirtazapina, venlafaxina, reboxetina, tranilcipromina, brofaromina, moclobemida, citalopram, paroxetina, fluoxetina, fluvoxamina, sertralina, *Hypericum* (hierba de San Juan), alprazolam, clonazepam, diazepam, lorazepam, 25 halazepam, clordiazepóxido, y otros fármacos tales como buspirona, clonidina, pagoclon, risperidona, olanzapina, quetiapina, ziprasidona, celecoxib, piroxicam, parecoxib, valdecoxib, PMI-001, PH-686464, SC-58236, etoricoxib, rofecoxib, L-776967, lumiracoxib, GW-406381, GW-644784, meloxicam, SVT-2016, PAC-10649, CS-706, LAS-34475, cimicoxib, A-183827.0 o nimesulida. Por supuesto, se prevé que uno o más de los compuestos anteriormente mencionados pueda usarse en combinación con un modulador de TMEFF2 para tratar un trastorno afectivo. 30 Además, se prevé que el modulador de TMEFF2 y otro compuesto adecuado para tratar un trastorno afectivo se administren simultáneamente, secuencialmente o por separado entre sí.

[0128] Las figuras muestran:

35 **Figura 1:** Diagrama que ilustra la forma soluble de la proteína TMEFF2.

Figura 2: Diagrama que ilustra la forma de membrana de la proteína TMEFF2 y su ruta de señalización correspondiente.

40 **Figura 3:** Células corticotrópicas que expresan TMEFF2. La expresión de TMEFF2 al nivel de ARN en las células tumorales corticotrópicas pituitarias AtT-20 se detectó por RT-PCR. Se usó GAPDH como control positivo y H₂O como control negativo.

Figura 4: Localización celular de TMEFF2. Las flechas indican la presencia de proteína TMEFF2 sobre la membrana 45 citoplásmica de células del plexo coroideo. Aumentos: 400X

Figura 5: La inhibición de TMEFF2 regula por incremento la actividad de transcripción de POMC. Células AtT-20 se 50 cotransfectaron con tanto ARNip de TMEFF2 como ARNip de control y POMC-luc. Después de 48 horas, las células se trataron con CRH 100 nM durante 6 horas. La actividad de luciferasa se midió como se describe en Materiales y procedimientos. Las barras representan la media y las DE correspondientes de triplicados para cada tratamiento de un experimento representativo de tres. *P<0,005 y **P<0,001 en comparación con el valor basal correspondiente (ARNip de control), ***P<0,001 en comparación con estimulación de CRH de células transfectadas con ARNip de control.

55 **Figura 6:** Niveles de proteína de TMEFF2 en células AtT-20 normales y células AtT-20 tratadas con ARNip que eligen como diana TMEFF2. El análisis de transferencia Western se hizo en células AtT-20 transitoriamente transfectadas con ARNip de control o ARNip de TMEFF2.

Figura 7: TMEFF2 soluble no regula la actividad de transcripción de POMC. El sobrenadante de células AtT-20

tratadas con ARNip de control o ARNip de TMEFF2 se aplicó a células AtT-20 naturales en presencia o ausencia de CRH. Ninguna diferencia significativa en la transcripción de POMC en células AtT-20 naturales tratadas con el sobrenadante de células de ARNip de control o células de ARNip de TMEFF2, tanto si tales células estuvieron tanto en presencia como en ausencia de CRH.

5

Figura 8: TMEFF2 soluble no regula la actividad de transcripción de POMC. El sobrenadante de células AtT-20 tratadas con ARNip de control o ARNip de TMEFF2 se aplicó sobre células AtT-20 transfectadas con ARNip de control o ARNip de TMEFF2. Ninguna diferencia significativa en la transcripción de POMC sobre tanto células AtT-20 transfectadas con ARNip de control o ARNip de TMEFF2 como tratadas con tanto el sobrenadante de células de ARNip de control como el sobrenadante de células de ARNip de TMEFF2.

10

Figura 9: La inhibición de la señalización de TMEFF2 de CRH no se inhibe por toxina Pertussis (PTX).

Figura 10: La inhibición de TMEFF2 regula por incremento la actividad de transcripción de Nur. Células AtT-20 se cotransfectaron con tanto ARNip de TMEFF2 como ARNip de control y NuRE-luc. Después de 48 horas, las células se trataron con CRH 100 nM durante 6 horas. La actividad de luciferasa se midió como se describe en Materiales y procedimientos. Las barras representan la media y las DE correspondientes de triplicados para cada tratamiento de un experimento representativo de tres. ***P<0,001 en comparación con estimulación de CRH de células transfectadas con ARNip de control.

15

Figura 11: La inhibición de TMEFF2 regula por incremento la actividad de transcripción de CREB. Células AtT-20 se cotransfectaron con tanto ARNip de TMEFF2 como ARNip de control y CRE-luc. Después de 48 horas, las células se trataron con CRH 100 nM durante 6 horas. La actividad de luciferasa se midió como se describe en Materiales y procedimientos. Las barras representan la media y las DE correspondientes de triplicados para cada tratamiento de un experimento representativo de tres. **P<0,001 en comparación con el valor basal correspondiente (ARNip de control), ***P<0,001 en comparación con estimulación de CRH de células transfectadas con ARNip de control.

20

Figura 12: La inhibición de TMEFF2 aumenta la estimulación inducida por CRH de AMPc. Células AtT-20 se transfectaron con tanto ARNip de TMEFF2 como ARNip de control. Después de 48 horas, las células se trataron con CRH 100 nM durante 1 hora. Se midieron niveles de AMPc intracelular como se describe en Materiales y procedimientos. Las barras representan la media y las DE correspondientes (n=6) de un experimento representativo de tres. *P<0,001 en comparación con el valor basal correspondiente (ARNc), **P<0,001 en comparación con la estimulación de CRH de células transfectadas con ARNip de control.

25

Figura 13: La inhibición de TMEFF2 aumenta la proliferación celular en la línea celular AtT-20. Células AtT-20 se transfectaron transitoriamente con tanto ARNip de TMEFF2 como ARNip de control. Después de 24 horas, las células se cultivaron en medio que contiene 10% de SBF. Las barras representan la media y las DE correspondientes (n=3) de un experimento representativo de tres. *P<0,05 en comparación con el valor basal correspondiente (ARNip de control).

35

Figura 14: Vector de expresión de TMEFF2. El ADNc de TMEFF2 de ratón se insertó en el sitio de restricción KpnI-NotI del vector de expresión pcDNA3.1.

40

Figura 15: La expresión en exceso de TMEFF2 inhibe la señalización de CRH. Se transfectaron AtT-20 con tanto un vector pcDNA3.1 de control como un vector pcDNA3.1 que contiene ADNc de TMEFF2 de ratón.

45

Figura 16: Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de TMEFF2 humana.

Figura 17: La activina es una proteína secretada que se une al complejo de receptores de serina/treonina que comprende un receptor de unión a ligando de tipo II y un receptor de transducción de señales de tipo I.

50

Figura 18: TMEFF2 puede unirse a activina mediante sus dominios similares a folistatina y puede prevenir la unión de activina a receptores de activina de tipo II, inhibiendo así la señalización de activina.

55

Figura 19: La inhibición de TMEFF2 permite que la activina se una a su receptor que conduce a activación de Smad y promoción de efectos antidepresores, diferenciación celular y supervivencia neuronal.

Figura 20: La inhibición de TMEFF2 por ARNip durante periodos de 24 y 48 horas aumenta los intentos activos de escapar y disminuye el comportamiento pasivo en comparación con ratones de control.

Figura 21: TMEFF2 inhibe la ruta de señalización de activina y la activación de proteínas Smad.

Figura 22: Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de activina humana.

5

[0129] Los siguientes ejemplos ilustran la invención. Estos ejemplos no deben interpretarse como que limitan el alcance de la presente invención. Los ejemplos están incluidos para los fines de ilustración y la presente invención solo está limitada por las reivindicaciones.

10 **Ejemplo 1**

Rutas de señalización de TMEFF2

[0130] La proteína TMEFF2 posee una región extracelular que contiene dominios similares a folistatina y similares a EGF, una región transmembrana y una cola citoplásmica (Figura 1). Se ha mostrado que el dominio extracelular es escindido por proteasas próximas a la región transmembrana. Esta escisión proteolítica libera la porción extracelular de TMEFF2, que luego puede actuar de citocina o factor de crecimiento que puede unirse a la familia erbB de receptores de EGF (Horie y col. (2002) Genomics 67:146-152). Esta familia de receptores no actúa mediante la ruta de AMPc, pero puede regular la proliferación celular mediante cinasas tales como MAPK y PKC (Moghal y Sternberg (1999) Curr Opin Cell Biol 11:190-196). La unión del dominio extracelular de TMEFF2 soluble a la familia de receptores de EGF puede inhibirse por anticuerpos para TMEFF2 que previenen la activación de la familia de receptores de EGF.

[0131] Además de los dominios extracelulares y transmembrana, la proteína TMEFF2 tiene un dominio intracelular. Este dominio intracelular contiene un motivo de unión a proteína G putativa (Figura 2). Las proteínas G transducen las señales de GPCR (receptores acoplados a proteína G) de la familia de siete proteínas transmembrana. Por ejemplo, después de la unión de CRH al receptor de CRH tipo 1 (CRHR1), la activación de la proteína Gs aumenta la actividad de la enzima adenilato ciclasa que produce AMPc (Ulisee y col. (1989) J Biol Chem 264:2156-2163). Esto produce la activación de los factores de transcripción CREB y Nur (Paez-Pereda y col. (2001) J Clin Invest 108:1123-1131). Estos factores de transcripción promueven la transcripción del gen POMC que produce un aumento de la producción de ACTH. La activación de TMEFF2 como receptor de membrana inhibe la proteína G y así inhibe AMPc, CREB, Nur, POMC y ACTH.

Ejemplo 2

35

Células corticotrópicas expresan TMEFF2.

[0132] La expresión de TMEFF2 se evaluó en la línea celular corticotrópica pituitaria AtT-20, que secreta ACTH (Leung y col. (1982) Virchows Arch. 396: 303-312; número de ATCC CCL-89). Para todos los experimentos, células AtT-20 se cultivaron en matraces de cultivo de 45 cm³ en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con 10% de suero bovino fetal (FCS), glutamina 2 mM, 105 U/litro de penicilina/estreptomicina y 2,5 mg/litro de anfotericina B. Las células se mantuvieron a 37 °C en 5% de CO₂. Las células AtT-20 se distribuyeron entonces en placas de 6 pocillos a 3,5 x 10⁵ células/ml. A menos que se establezca de otro modo, los materiales se obtuvieron de Invitrogen (Carlsbad, CA). Se realizaron RT-PCR como se ha descrito previamente (Páez-Pereda y col. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. 100:1034-1039). Brevemente, la amplificación por PCR se realizó con los siguientes cebadores: cebador de sentido directo de TMEFF2 5'-CTG ATG GGA AAT CTT ATG ATA ATG-3' (SEQ ID NO: 3) y cebador de sentido contrario 5'-CAG GAA CAA CGT AGA GAA CAC TGT-3' (SEQ ID NO: 4). El control interno se realizó amplificando β-actina de las mismas muestras humanas (cebador de sentido directo de β-actina humana: 5'-ACG GGG TCA CCC ACA CTG TGC-3' (SEQ ID NO: 5) y cebador de sentido contrario: 5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT G-3') (SEQ ID NO: 6) y GAPDH de las muestras de AtT-20 (cebador de sentido directo de GAPDH de ratón: 5'-ATG GTG AAG GTC GGT GTG AAC G-3' (SEQ ID NO: 7) y cebador de sentido contrario: 5'-GTT GTC ATG GAT GAC CTT GGC-3') (SEQ ID NO: 8). La expresión de TMEFF2 se detectó en células AtT-20 (Figura 3) confirmando que TMEFF2 se expresa en células pituitarias.

55 **Ejemplo 3**

Localización de membrana de TMEFF2

[0133] La localización celular de la proteína TMEFF2 se estudió por inmunohistoquímica de secciones en

serie de cerebros de ratón completos usando un anticuerpo policlonal contra TMEFF2 (R&D Systems). Brevemente, cerebros de ratones naturales se congelaron rápidamente, se cortaron en rebanadas de 16 μm y se fijaron con paraformaldehído durante 5 minutos. Las secciones se bloquearon entonces durante 30 minutos a temperatura ambiente con 1:10 de suero de caballo. Todos los anticuerpos se diluyeron en tampón TBST (solución salina tamponada con Tris-0,05% de Tween-20). El anticuerpo para TMEFF2 se usó en una dilución 1:200 y se incubó durante la noche. Todos los lavados se realizaron con tampón TBST. Un anticuerpo dirigido contra IgG de cabra conjugado con el colorante rojo Alexa-Fluor se usó como anticuerpo secundario (Molecular Probes). Las células se contratiñeron con bisbencimida permitiendo la visualización del núcleo celular. Se observó un fuerte marcado de fluorescencia en la membrana citoplásmica de células (Figura 4). Por tanto, TMEFF2 está presente en la membrana citoplásmica de células que soportan su función como receptor unido a membrana.

Ejemplo 4

La inhibición de TMEFF2 potencia los efectos de CRH sobre la actividad de transcripción de POMC

15

[0134] Con el fin de elucidar la función de TMEFF2 sobre la transcripción de POMC estimulada con CRH, células AtT-20 se cotransfectaron con tanto ARNip de TMEFF2 como ARNip de control y un plásmido indicador de POMC-luciferasa, que expresa todas las secuencias necesarias para la expresión de POMC *in vivo* en pituitaria de ratón. Brevemente, las secuencias de los dos oligonucleótidos de ARNip de TMEFF2 de ratón usados fueron 5'-UCA GAA GGA UCC UGU GCU A-3' (SEQ ID NO: 9) y 5'-CGG UUA CGA UGA CAG AGA A-3' (SEQ ID NO: 10). No se usaron oligonucleótidos de ARN de control específico (ARNip de control) con contenido de GC similar en comparación con ARNip como control (MWG-Biotech, Ebersberg, Alemania). Toda la transfección de células AtT-20 se realizó usando Lipofectamine 2000. Veinticuatro horas después de la siembra, las células se transfectaron en medio OPTIMEM usando 10 μl de Lipofectamine y ARNip de TMEFF2 50 nM o ARNip de control por pocillo. Después de 6 h, el medio de transfección se eliminó y las células se cultivaron en DMEM complementado con 2% de SBF. El plásmido de POMC-Luc que contiene el gen luciferasa bajo el control de 770 pb del promotor POMC de rata incluye todas las secuencias necesarias para la expresión y regulación de POMC (Therrien y Drouin. (1991) Mol. Cell. Biol. 11: 3492-3503; Liu y col. (1992) Mol. Cell. Biol. 12: 3978-3990). El vector pEGFP-C2 (Clontech, Palo Alto, CA) que codifica una variante optimizada de la proteína fluorescente verde (GFP) se usó como control para la eficiencia de transfección en todos los experimentos. Las células se transfectaron usando el ARNip de TMEFF2 o ARNip de control junto con 1 μg de plásmido indicador y 500 ng de plásmido pEGFP de control por pocillo. Después de 48 horas en medio de cultivo, las células se incubaron durante 6 h con CRH 100 nM. Al final del tratamiento, el lisado de proteínas se recogió y la actividad de luciferasa se midió en un luminómetro Wallac como se ha descrito previamente (Páez-Pereda y col. (2001) J. Clin. Invest. 108: 1123-1131). Los valores de fluorescencia del plásmido pEGFP de control se midieron en un fluorímetro Wallac usando una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm.

[0135] Las células transfectadas se incubaron en presencia o ausencia de CRH 100 nM, un estímulo fisiológico para la transcripción de POMC. CRH estimuló la actividad de transcripción de POMC en células transfectadas con ARNip de control (Figura 5). Los presentes inventores encontraron por primera vez que bajo estimulación de CRH, el ARNip de TMEFF2 indujo un aumento de tres veces en la actividad promotora de POMC con respecto a células transfectadas con ARNip de control (Figura 5). Además, el ARNip de TMEFF2 produjo un aumento significativo en la transcripción dependiente de POMC con respecto a células transfectadas con ARNip de control. Los resultados se expresan como media \pm DE. Las diferencias se evaluaron por ANOVA unilateral en combinación con la prueba de Scheffé, tomando valores de P inferiores a 0,05 como significativos. La inhibición de la expresión de TMEFF2 se evaluó determinando los niveles de proteína TMEFF2. Brevemente, células AtT-20 se transfectaron tanto con ARNip de TMEFF2 como con ARNip de control como se indica anteriormente. Después de dos días se recogieron los lisados celulares y se analizaron por transferencia Western como se ha descrito previamente (Páez-Pereda y col. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. 100:1034-1039) con un anticuerpo anti-TMEFF2 (R&D Systems, Wiesbaden, Alemania). La proteína TMEFF2 puede detectarse en células AtT-20 transfectadas con ARNip de control mientras que puede observarse inhibición significativa de proteína TMEFF2 en AtT-20 transfectadas con ARNip que eligen como diana TMEFF2 (Figura 6).

[0136] Tomados conjuntamente, estos resultados indican que la inhibición de TMEFF2 potencia la actividad de transcripción de POMC bajo estimulación de CRH y condiciones basales. Como el gen POMC codifica ACTH, la activación de TMEFF2 inhibirá por consiguiente la activación de CRH de la expresión de POMC y reducirá la producción de ACTH.

Ejemplo 5

TMEFF2 actúa de receptor de la membrana integral

[0137] Se ha propuesto liberar el dominio extracelular de TMEFF2 en la matriz extracelular mediante escisión proteolítica (Horie y col. (2002) Genomics 67:146-152). Por consiguiente, la forma extracelular de TMEFF2 puede encontrarse en el sobrenadante de células AtT-20.

[0138] Para evaluar si la actividad terapéutica de TMEFF2 sobre trastornos afectivos y síndromes de Cushing es o no debida a su forma unida a la membrana y no a su forma extracelular, los sobrenadantes de células AtT-20 tratadas con ARNip de control o de TMEFF2 se aplicaron a células AtT-20 naturales y se evaluó la transcripción del gen POMC. Como se ilustra en la Figura 7, no hubo diferencia significativa en la transcripción de POMC sobre células AtT-20 naturales tratadas con el sobrenadante de células de ARNip de control o células de ARNip de TMEFF2, tanto si aquellas células estuvieron o no en presencia o ausencia de CRH. Por tanto, el dominio extracelular de TMEFF2 no es responsable de la regulación de la transcripción de POMC.

[0139] Se observaron resultados similares cuando el sobrenadante de células AtT-20 tratadas con ARNip de control o ARNip de TMEFF2 se aplicó sobre células AtT-20 transfectadas con ARNip de control o ARNip de TMEFF2 (Figura 8). Por tanto, los sobrenadantes que contienen o no dominio de TMEFF2 soluble no produjeron efectos sobre células que expresan o no TMEFF2 unida a la membrana.

[0140] Otras pruebas de que la actividad terapéutica de TMEFF2 sobre trastornos afectivos y síndromes de Cushing es debida a su forma unida a la membrana y no a su forma extracelular se proporciona evaluando el efecto de TMEFF2 sobre la proteína G y la señalización de CRH. Se ha sugerido que TMEFF2 actúa mediante la activación de proteínas G (Uchida y col. (1999) Biochem Biophys Res Comm 266:595-60002). Las proteínas G incluyen proteínas Gs que participan en la activación de adenilil ciclasa unida a membrana y aumentan la producción de AMPc mientras que la activación de proteínas G inhibitoras (proteínas Gi) disminuye la producción de AMPc. La toxina Pertussis de *Bordetella pertussis* es conocida por bloquear los efectos de la proteína Gi (Codina y col. (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80:4276-4280). Sin embargo, los efectos de CRH, que son conocidos por estar mediados por la activación de proteínas Gs, no están afectados por toxina Pertussis (Ulisee y col. (1989) J Biol Chem 264:2156-2163). Por consiguiente, si el efecto de TMEFF2 sobre la ruta de AMPc fuera mediante la activación de proteína Gi, estos efectos se inhibirían mediante tratamiento con la toxina Pertussis.

[0141] Las células AtT-20 se cotransfectaron con el plásmido indicador CRE-Luc y el vector de expresión de TMEFF2 (pcDNA3.1/TMEFF2) o pcDNA3.1 vacío como control. Después de la transfección, las células se trataron con 0,1 ug/ml de toxina Pertussis (PTX) durante 16 horas y luego con CRH 100 nM durante 6 horas. La actividad de luciferasa se midió al final del experimento. Como se ilustra en la Figura 9, la expresión en exceso de TMEFF2 inhibe los efectos de CRH incluso en presencia de toxina Pertussis. Este resultado demuestra que TMEFF2 inhibe la señalización de CRH mediante proteína Gs y no mediante proteína Gi.

Ejemplo 6

La inhibición de TMEFF2 potencia efectos de CRH sobre la actividad de transcripción de Nur

[0142] Uno de los factores de transcripción que controla la expresión de POMC y, por tanto, la biosíntesis de ACTH en respuesta a CRH, es Nur77 y otros miembros de su familia, tales como Nurrl1. Con el fin de elucidar la función de TMEFF2 sobre la actividad de transcripción de Nur estimulada con CRH, las células AtT-20 se cotransfectaron con tanto ARNip de TMEFF2 como ARNip de control y una construcción indicadora de Nur: NurRE-luciferasa. Las células transfectadas se incubaron en presencia o ausencia de CRH 100 nM. Los presentes inventores encontraron por primera vez que bajo estimulación de CRH, el ARNip de TMEFF2 indujo un potenciamiento de la respuesta de Nur a CRH (Figura 10). Estos resultados indican que la inhibición de TMEFF2 potencia la respuesta a estimulación de CRH al nivel de actividad de transcripción de Nur. Por el contrario, la activación de TMEFF2 inhibirá la expresión de Nur en presencia de CRH

Ejemplo 7

La inhibición de TMEFF2 potencia los efectos de CRH sobre la actividad de transcripción de CREB

[0143] La ruta de AMPc activa la actividad de transcripción de CREB (proteína de unión a elemento sensible a AMPc). CREB desempeña una función importante en la transducción de señales de CRH. Con el fin de elucidar la

función de TMEFF2 sobre la actividad de transcripción de CREB estimulada por CRH, células AtT-20 se cotransfectaron con tanto ARNip de TMEFF2 como ARNip de control y una construcción indicadora de CREB: CRE-luciferasa. Las células transfectadas se incubaron en presencia o ausencia de CRH 100 nM. Los presentes inventores encontraron por primera vez que bajo la estimulación de CRH, el ARNip de TMEFF2 indujo una
 5 potenciación de la respuesta de CREB a CRH (Figura 11). Estos resultados indican que la inhibición de TMEFF2 potencia la respuesta a estimulación de CRH al nivel de actividad de transcripción de CREB. Por el contrario, la activación de TMEFF2 inhibirá la expresión de CREB en presencia de CRH.

Ejemplo 8

10

La inhibición de TMEFF2 aumenta la estimulación inducida por CRH de AMPc

[0144] La activación de la ruta de CRH aumenta los niveles intracelulares de AMPc. Para determinar si la estimulación de la transcripción de POMC inducida por CRH por ARNip de TMEFF2 está mediada o no por AMPc,
 15 células AtT-20 se transfectaron con tanto ARNip de control como ARNip de TMEFF2. Células transfectadas se trataron durante 1 hora con CRH 100 nM y al final del tratamiento los lisados celulares se recogieron y se evaluó AMPc intracelular. La determinación radioinmunológica de AMPc se realizó con un kit de RIA comercial de NENTM Life Science Products Inc. (Boston, MA). En resumen, 24 horas después de la transfección, las células AtT-20 se cultivaron en placas de 48 pocillos. Al día siguiente, las células se lavaron y se estimularon con CRH 100 nM
 20 (Bachem, Heidelberg, Alemania). El inhibidor de fosfodiesterasa IBMX (5 mM) se añadió a todas las disoluciones de estimulación. Los sobrenadantes se recogieron y se ensayaron después de 1 h de incubación con CRH como se ha descrito previamente (Stalla y col. (1989) Endocrinology 125: 699-706).

[0145] En presencia de CRH, ARNip de TMEFF2 produjo un aumento significativo en los niveles de AMPc con
 25 respecto a aquellos del ARNip de control (Figura 12), mientras que la inhibición de TMEFF2 usando ARNip no tuvo efecto significativo sobre los valores basales de AMPc. Este resultado indica que TMEFF2 regula la actividad de transcripción de POMC inducida por CRH mediante la modulación de AMPc.

Ejemplo 9

30

La inhibición de TMEFF2 aumenta la proliferación celular en la línea celular AtT-20

[0146] Estudios en células de cáncer de próstata mostraron efectos antiproliferativos de TMEFF2 (Afar y col.,
 2004, Mol. Cancer Ther. 3:921-932). Para determinar si esto también se produce o no en células tumorales
 35 corticotrópicas, células AtT-20 se transfectaron transitoriamente con ARNip de TMEFF2 o ARNip de control. 24 horas después de la transfección, las células se incubaron en medio DMEM que contenía 10% de SBF. Al día siguiente se usó un ensayo colorimétrico, el ensayo basado en WST-1 (Roche Molecular Biochemicals, Basilea, Suiza) para medir proliferación celular y viabilidad celular siguiendo las instrucciones del fabricante (Páez-Pereda y col. (2000) J. Clin. Endocrinol. Metab. 85:263-269). Los valores de absorbancia de referencia se restaron de la
 40 absorbancia de todas las muestras. Se usó tinción con naranja de acridina-bromuro de etidio para excluir muerte celular debida a efectos tóxicos.

[0147] 24 horas después de la transfección, las células se estimularon con 10% de SBF y se incubaron
 45 durante otras 24 horas. La proliferación celular se midió por el procedimiento de WST-1 (Figura 13). Se encontró que la inhibición de TMEFF2 produjo un aumento en la proliferación celular con respecto a las células transfectadas con ARNip de control.

Ejemplo 10

La expresión de TMEFF2 se regula por disminución en síndromes de Cushing

[0148] La expresión de TMEFF2 se analizó entonces en adenomas pituitarios productores de ACTH aislados
 de pacientes que padecen síndrome de Cushing (Tabla 1). La amplificación por PCR se realizó con los siguientes
 cebadores: cebador de sentido directo de TMEFF2 5'-CTG ATG GGA AAT CTT ATG ATA ATG-3' (SEQ ID NO: 11) y
 55 cebador de sentido contrario 5'-CAG GAA CAA CGT AGA GAA CAC TGT-3' (SEQ ID NO: 12). El control interno se realizó amplificando β -actina de las mismas muestras humanas (cebador de sentido directo de β -actina humana: 5'-ACG GGG TCA CCC ACA CTG TGC-3' (SEQ ID NO: 13) y cebador de sentido contrario: 5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT G-3') (SEQ ID NO: 14).

Tabla 1. Expresión de TMEFF2 en adenomas pituitarios normales humanos y pituitarios secretores de ACTH		
Muestra	Fenotipo	Niveles de expresión de TMEFF2¹
1	Pituitaria normal	+++
2	Pituitaria normal	+++
3	Pituitaria de Cushing	++
4	Pituitaria de Cushing	-
5	Pituitaria de Cushing	-
6	Pituitaria de Cushing	+
7	Pituitaria de Cushing	+
8	Pituitaria de Cushing	-
9	Pituitaria de Cushing	+
10	Pituitaria de Cushing	-
11	Pituitaria de Cushing	-
12	Pituitaria de Cushing	-
13	Pituitaria de Cushing	+
14	Pituitaria de Cushing	++
15	Pituitaria de Cushing	-
- : Sin expresión de TMEFF2 + : Débil expresión de TMEFF2 ++ : Moderada expresión de TMEFF2 +++ : Fuerte expresión de TMEFF2		

[0149] La expresión de TMEFF2 se redujo en adenomas pituitarios productores de ACTH de pacientes con síndromes de Cushing con respecto al pituitario normal humano. En corticotrofinomas no hubo ni señal ni baja expresión del gen en comparación con la expresión detectada en tejido normal (Tabla 1).

5

[0150] Estos datos demuestran que los síndromes de Cushing pueden diagnosticarse según los niveles de expresión de TMEFF2.

Ejemplo 11

10

La activación de TMEFF2 inhibe la señalización de la producción de CRH y ACTH

[0151] Con el fin de demostrar que la activación de TMEFF2 pueden inhibir la señalización de CRH, células AtT-20 se transfectaron con un vector de expresión que contiene el ADNc de TMEFF2 de ratón y un plásmido indicador POMC-luciferasa. Brevemente, el ADNc de TMEFF2 de ratón se insertó en el vector de expresión pcDNA3.1 (Invitrogen; Figura 14). Células AtT-20 se transfectaron entonces con 1 µg de plásmido indicador POMC-luc con tanto 1 µg de pcDNA3.1 de control (es decir, que no contiene TMEFF2) como 1 µg de pcDNA3.1 que contiene TMEFF2. Después de 48 horas en medio de cultivo, las células se incubaron durante 6 h con CRH 100 nM. Al final del tratamiento, el lisado de proteína se recogió y la actividad de luciferasa se midió en un luminómetro de Wallac como se ha descrito previamente (Páez-Pereda y col. (2001) J. Clin. Invest. 108: 1123-1131).

[0152] La expresión de TMEFF2 produce una reducción de la transcripción de POMC bajo condiciones basales e inhibe el efecto estimulante de CRH (Figura 15). Así, una mayor actividad de TMEFF2 reduce la transcripción de POMC e inhibe la transducción de señales de CRH. Como la señalización activa de la producción de CRH y ACTH participa en trastornos afectivos y síndromes de Cushing, la activación de TMEFF2 puede usarse para tratar trastornos afectivos y síndromes de Cushing inhibiendo la señalización de la producción de CRH y ACTH.

Ejemplo 12

Ruta de señalización de TMEFF2 - activina

[0153] La proteína TMEFF2 posee una región extracelular que contiene dominios similares a folistatina y similares a EGF, una región transmembrana y una cola citoplásmica (Figura 17). Se ha mostrado que el dominio extracelular se escinde por proteasas próximas a la región transmembrana. Esta escisión proteolítica libera la porción extracelular de TMEFF2, que luego puede actuar de citocina o factor de crecimiento que puede unirse a la familia erbB de receptores de EGF (Horie y col. (2002) Genomics 67:146-152). Las proteínas que contienen

35

dominios similares a folistatina pueden unirse al factor de crecimiento activina con alta afinidad (Schneyer y col., 2001, *Mol Cell Endocrinol* 180:33-38; Sidis y col., 2001, *J Biol Chem* 276:17718-17726).

[0154] La activina es un miembro de la superfamilia TGF- β y participa en varios procesos biológicos tales como diferenciación celular, neurogénesis, secreción hormonal y supervivencia neuronal (Schubert y col., 1990, *Nature* 344:868-870; Ameerum y col., 1996, *Cell Growth Differ* 12:1679-1688; Iwahori y col., 1997, *Brain Res* 760:52-58; Sulyok y col., 2004, *Mol Cell Endocrinol* 225:127-132). La activina es una proteína secretada que se une al complejo de receptor de serina/treonina compuesto por un receptor de unión a ligando de tipo II y un receptor transductor de señales de tipo I (Figura 17). Hay dos subtipos del receptor de activina de tipo II en vertebrados, tipo IIA (ActRIIA) y IIB (ActRIIB). ActRIIA y ActRIIB son el receptor de activina primaria y son serina/treonina cinasas constitutivamente activas que reclutan receptor de tipo I ALK4 (cinasa 4 similar a receptor de activina) por medio de activina unida (Greenwald y col. (1999) *Nat Struct Biol* 6:18-22; Bernard y col. (2002) *Mol Cell Endocrinol* 196:79-93; Thompson y col. (2003) *EMBO J* 22:1555-1566). El complejo funcional de receptores de activina en la superficie celular consiste en dos receptores de tipo II y dos receptores de tipo I. Las respuestas celulares a activina están mediadas por fosforilación de los factores de transcripción Smad2, Smad3 y otras proteínas Smad (Abe y col., 2004, *Growth Factors* 22:105-110). Las proteínas Smad forman complejos homo- y heterómeros que pueden unirse a ADN y regular la expresión de genes diana.

[0155] La expresión de activina y la fosforilación de Smad2 aumentan durante el tratamiento con fármacos antidepresores (Dow y col., 2005, *J Neuroscience* 25:4908-4916). También se ha mostrado que la infusión de activina en el hipocampo de modelos animales de depresión tiene efectos similares a antidepresores. Por consiguiente, la regulación de activina y la señalización de Smad2 pueden contribuir a la acción de fármacos antidepresores.

[0156] TMEFF2 mediante sus dominios similares a folistatina puede unirse a activina, prevenir la unión de activina a receptores de activina de tipo II y, por consecuencia, inhibir la señalización de activina (Figura 18) y reducir la actividad de proteínas Smad. Los inhibidores de TMEFF2 permiten que la activina se una a su receptor, active Smad y promueva efectos antidepresores, diferenciación celular y supervivencia neuronal (Figura 19).

30 **Ejemplo 13**

La inhibición de TMEFF2 tiene efectos antidepresores

[0157] Con el fin de demostrar que la inhibición de TMEFF2 tiene efectos antidepresores, la función de TMEFF2 se inhibió específicamente administrando moléculas de ARN interferente pequeño (ARNip) bicatenario al cerebro de ratones. Dos cánulas guía (23 de calibre, longitud 10 mm) se insertaron bilateralmente en la amígdala del cerebro de ratones DBA/2Jico macho. La inserción de la cánula guía se hizo usando un instrumento estereotáxico. Las coordenadas, en relación con el bregma, fueron -1,0 mm posterior, $\pm 3,1$ mm lateral y -1,6 mm ventral. Tras un periodo de recuperación de 10 días, los ratones se dividieron en dos grupos experimentales que se inyectaron con tanto ARN erróneo bicatenario de control (control) como con ARNip bicatenario específico para TMEFF2 (ARNip de TMEFF2). La secuencia usada para el ARNip erróneo de control fue 5'-CGC GUA GAA GAU GAA GUU G TT-3' (SEQ ID NO: 15). Las secuencias usadas para ARNip de TMEFF2 fueron 5'-UCA GAA GGA UCC UGU GCU A-3' (SEQ ID NO: 16) y 5'-CGG UUA CGA UGA CAG AGA A-3' (SEQ ID NO: 17). En el día 10 después de la cirugía, el ARNip de control o de TMEFF2 se infundió en ratones sin anestesiarse a una concentración de 0,2 nmol/ μ l, y un volumen de 0,5 μ l por lado, durante un periodo de 2 min por lado, usando sistemas de infusión específicamente adaptados (33 de calibre, longitud 12 mm). Los animales se dejaron tranquilos hasta que tuvieron lugar las pruebas de comportamiento.

[0158] Los efectos de la inhibición de TMEFF2 sobre el comportamiento similar a depresivo se evaluó 24 horas (FST1) y 48 horas (FST2) después de la infusión de ARNip de control o de TMEFF2 según el paradigma de la prueba de natación forzada. La prueba de natación forzada es una prueba convencional que se basa en la suposición de que los animales normalmente intentarán escapar de un estímulo aversivo. Cuando la estimulación aversiva es inevitable, el animal dejará eventualmente de intentar escapar. El cese temprano de intentos para escapar se considera un análogo de roedor de depresión inducida por estrés. La prueba se usa para determinar la eficacia de antidepresores, probar nuevos compuestos farmacéuticos y validar modelos animales de depresión (Porsolt y col., *Arch. Int. Pharmacodyn.* 229 (1977), 327-336; Porsolt, *Rev. Neurosci.* 11 (2000), 53-58; Rénéríc y col., *Behav. Brain Res.* 136 (2002), 521-532; Page y col., *Psychopharmacology* 165 (2003), 194-201; Kelliher y col., *Psychoneuroendocrinology* 28 (2003), 332-347). La prueba consiste en colocar un ratón durante un periodo de 5 minutos en un cilindro de vidrio que contiene agua. Bajo tales circunstancias, el ratón no puede tocar el fondo del

cilindro y es así obligado a nadar. El tiempo, latencia y frecuencia del esfuerzo frente a flotar se puntúan como parámetros de comportamiento. La flotación (es decir, movimientos hechos solo para mantener el equilibrio y la respiración) es un comportamiento pasivo asociado a la desesperación y representa un síntoma similar a depresivo ya que el animal no hace ningún esfuerzo para superar activamente la estresante situación. El elevado esfuerzo (es decir, intentos activos por escapar) indica comportamiento de superación activa que puede interpretarse como una mejora de síntomas similares a la depresión. Por ejemplo, el tratamiento con antidepresores serotoninérgicos reduce el tiempo total gastado en flotar (Borsini, Neurosci. Biobehav. Rev. 19 (1995), 377-395; Redrobe y Bourin, Psychopharmacology 138 (1998), 198-206), y en paralelo aumenta el tiempo de comportamiento activo (es decir, natación o esfuerzo; Lucki y col., Psychopharmacology 155 (2001), 315-322).

10

[0159] Se encontró que la inhibición de TMEFF2 por ARNip durante periodos de 24 y 48 horas aumentaba intentos activos por escapar (es decir, aumentos en el tiempo de esfuerzo) mientras que una disminución en el comportamiento pasivo (es decir, disminución en el tiempo y frecuencia de flotación) se midió cuando se compara con ratones de control inyectados con ARNip de control (Figura 20). Estos resultados demuestran que la inhibición de TMEFF2 tiene propiedades antidepresoras que producen mejoras del comportamiento similar a depresión.

15

Ejemplo 14

TMEFF2 inhibe la señalización de activina y reduce la actividad de proteínas Smad

20

[0160] La unión de activina a receptores de activina de tipo II produce la fosforilación de las proteínas Smad tales como Smad2 y Smad3 que forman complejos homo- y heterómeros con otras proteínas que se unen a ADN y regulan la transcripción génica. Por consiguiente, la señalización de activina puede monitorizarse evaluando la unión y activación de genes diana Smad. Cuando se fosforila por receptores de activina, proteínas Smad tales como Smad3 y Smad4 pueden unirse a la secuencia de ADN específica CAGA (Dennler y col., 1998, EMBO J 17:3091-3100; Lin y col., 2005, J Immunol 175:547-554; Luo y col., 2006, Proc Natl Acad Sci USA 103:18326-18331). Con el fin de demostrar que la activación de TMEFF2 pueden inhibir la señalización de activina y actividad de Smad, células AtT-20 se transfectaron con un vector de expresión que contiene el ADNc de TMEFF2 humana y plásmido que contiene 12 copias de la secuencia de CAGA delante de un indicador de luciferasa. El ADNc de TMEFF2 humana se insertó en el vector de expresión pcDNA3.1 (Invitrogen).

30

[0161] Células AtT-20 se cotransfectaron con tanto 1 µg/ml de TMEFF2 humana como plásmido de control pcDNA3.1 como 1 µg/ml de plásmido 12xCAGA-luciferasa. El medio de cultivo se sustituyó con DMEM + 10% de SBF 24 horas después y 48 horas después de la transfección, las células se trataron con 50 ng/ml de activina durante 6 horas en medio que contiene 0% de SBF. La actividad de luciferasa se midió entonces en un luminómetro Wallac como se ha descrito previamente (Páez-Pereda y col., 2001, J. Clin. Invest. 108: 1123-1131).

35

[0162] La expresión de TMEFF2 redujo la activación transcripcional del plásmido 12xCAGA-luciferasa por activina (Figura 21). Este resultado demuestra que TMEFF2 inhibe la ruta de señalización de activina y la activación de proteínas Smad. Como se sabe que la señalización de activina activa y el aumento de la actividad de Smad2 participan en la actividad antidepresora (Dow y col., 2005, J Neuroscience 25:4908-4916), la inhibición de TMEFF2 puede usarse para tratar trastornos afectivos promoviendo la señalización de activina y actividad Smad.

40

Ejemplo 15

45

Procedimientos para identificar inhibidores de TMEFF2

[0163] Dominios similares a folistatina de TMEFF2 pueden unirse a activina mediante una interacción proteína-proteína. Pueden usarse ensayos de cribado que miden interacciones proteína-proteína para seleccionar compuestos que alteran la unión de TMEFF2 a activina, tales como análisis de Scatchard, ensayos de proximidad de centelleo (SPA), transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), polarización por fluorescencia, ensayos de dos híbridos, ensayos de captura y otros (para una revisión de procedimientos de cribado véase, por favor, Warner y col., 2004, Curr Med Chem 11:721-730; Yin, Hamilton, 2005, Angew Chem Int Ed 44:4130-4163; Chène, 2006, ChemMedChem 1:400-411).

50

[0164] Por ejemplo, la activina puede marcarse radiactivamente con 125 I o 3 H y puede ponerse en contacto con TMEFF2, fragmentos de TMEFF2 o células que expresan TMEFF2. La fracción de activina marcada libre puede separarse de la fracción unida a TMEFF2 mediante precipitación, filtración o cromatografía en columna. La cantidad de activina radiactivamente marcada que se une a TMEFF2 puede estimarse midiendo la radiactividad unida a

55

TMEFF2 con un contador de partículas beta. Los datos pueden analizarse usando un análisis de Scatchard. Alternativamente, la activina puede marcarse con colorantes fluorescentes o con proteínas fluorescentes y la cantidad de activina unida a TMEFF2 puede medirse por detección de fluorescencia.

5 **[0165]** Alternativamente, la unión de activina a TMEFF2 puede medirse por “ensayo de proximidad de centelleo” (SPA). En este caso, TMEFF2 o fracciones de TMEFF2 pueden unirse a perlas de centelleo de SPA y la activina puede marcarse, por ejemplo, con I^{125} o H^3 . Si las dos moléculas están unidas, las partículas en desintegración de la activina marcada estimulan la emisión de luz de perlas de SPA. La fracción de activina libre no produce emisión de luz debido a que no está suficientemente próxima a las perlas. Este ensayo también puede
10 realizarse marcando TMEFF2 y uniendo activina a perlas de SPA. Detalles de tales procedimientos son muy conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Wu y Lui, 2005, BioDrugs 19:383-392.

[0166] Todavía otro procedimiento para detectar inhibidores de TMEFF2 es medir la unión de TMEFF2 a activina por FRET (Jares-Erijman y Jovin, 2003, Nat Biotechnol 21:1387-1395). Este procedimiento consiste en la
15 transferencia de energía entre dos colorantes fluorescentes que están unidos a dos proteínas, en este caso activina y TMEFF2. Si la activina y TMEFF2 están unidas juntas, los colorantes unidos transfieren energía de tal forma que uno de los colorantes absorba la energía del otro y esto produce un aumento en la cantidad de fluorescencia emitida por el colorante aceptor. Por ejemplo, una aplicación de este principio es la plataforma AlphaScreen. Las perlas donantes de AlphaScreen podrían unirse a activina y las perlasceptoras de AlphaScreen podrían unirse a TMEFF2
20 o viceversa. Las perlas donantes se estimulan por luz UV con una longitud de onda particular. La emisión del donante activado estimula las perlasceptoras, que emiten luz en una longitud de onda diferente y esta emisión puede registrarse. Las perlasceptoras no se activan si no se unen TMEFF2 y activina.

[0167] Todavía otra posibilidad para cribar compuestos que se unen a TMEFF2 sería usar un ensayo
25 funcional. La activina libre se une a los receptores de activina y esto produce activación de receptor, fosforilación y activación de Smad. Por tanto, la disociación entre TMEFF2 y activina puede medirse por un aumento de receptor o fosforilación de Smad, además de un aumento de la actividad transcripcional de Smad. La actividad de transcripción de Smad puede medirse, por ejemplo, con una construcción indicadora que tiene una secuencia 12XCAGA clonada en la región potenciadora de un indicador de luciferasa (como se describe en detalle en el Ejemplo 14).

30

LISTADO DE SECUENCIAS

[0168]

35 <110> Affectis Pharmaceuticals AG Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.

<120> Procedimientos para el diagnóstico y tratamiento de trastornos afectivos y síndromes de Cushing

<130> L2596 PCT S3

40

<150> EP 06 00 2474.2

<151> 02-07-2006

<160> 19

45

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 1627

50

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

55

<222> (1)..(1627)

<223> TMEFF2 humana

<400> 1

ES 2 435 793 T3

cagtagcccg ctgcccggcc cccgcgatcc tgtgttccctc ggaagccggtt tgctgctgca 60
 gagttgcacg aactagtcac ggtgctgtgg gaggccccgc ggcagtgacg cagctggaca 120
 ctttgcgagg gcttttgcctg gctgctgctg ctgcccgtca tgctactcat cgtagcccgc 180
 ccggtgaagc tcctgtcttt ccctacctcc ttaagtgact gccaaacgcc caccggctgg 240
 aattgctctg gttatgatga cagagaaaat gatctcttcc tctgtgacac caacacctgt 300
 aaatttgatg gggaatgttt aagaattgga gacactgtga cttgcgtctg tcagttcaag 360
 tgcaacaatg actatgtgcc tgtgtgtggc tccaatgggg agagctacca gaatgagtgt 420
 tacctgcgac aggctgcatg caaacagcag agtgagatac ttgtggtgtc agaaggatca 480
 tgtgccacag atgcaggatc aggatctgga gatggagtcc atgaaggctc tggagaaact 540
 agtcaaaagg agacatccac ctgtgatatt tgccagtttg gtgcagaatg tgacgaagat 600
 gccgaggatg tctggtgtgt gtgtaatatt gactgttctc aaaccaactt caatcccctc 660
 tgcgcttctg atgggaaatc ttatgataat gcatgccaaa tcaaagaagc atcgtgtcag 720
 aaacaggaga aaattgaagt catgtctttg ggtcgatgtc aagataacac aactacaact 780
 actaagtctg aagatgggca ttatgcaaga acagattatg cagagaatgc taacaaatta 840
 gaagaaagtg ccagagaaca ccacatacct tgtccggaac attacaatgg cttctgcatg 900
 catgggaagt gtgagcattc tatcaatatg caggagccat cttgcaggtg tgatgctggt 960
 tatactggac aacactgtga aaaaaaggac tacagtgttc tatacgttgt tcccggctct 1020

 gtacgatttc agtatgtctt aatcgcagct gtgattgga caattcagat tgctgtcacc 1080
 tgtgtggtgg tcctctgcat cacaaggaaa tgccccagaa gcaacagaat tcacagacag 1140
 aagcaaaata cagggcactg tgggtataat actaagttga gatgatatca tttacggggg 1200
 aaggcgcttt gtgaagtagg ccttatttct cttgtccttt cgtacagggg ggaatttgaa 1260
 gtagatagaa accgacctgg attactccgg tctgaactca gatcacgtag gactttaatc 1320
 gttgaacaaa cgaaccttta atagcggctg caccatcggg atgtcctgat ccaacatcga 1380
 ggtcgtaaac cctattgttg atatggactc tagaatagga ttgcgctggt atccctaggg 1440
 taacttgctc cgttggtcaa gttattggat caattgagta tagtagttcg ctttgactgg 1500
 tgaagtctta gcatgtactg ctccgagggt gggttctgct ccgaggctgc cccaaccgaa 1560
 atttttaatg caggtttggg agtttaggac ctgtgggttt gttaggtact gtttgatta 1620
 ataaatt 1627

<210> 2

<211> 368

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(368)

10 <223> TMEFF2 humana

<400> 2

```

Met Val Leu Trp Glu Ser Pro Arg Gln Cys Ser Ser Trp Thr Leu Cys
1.          5          10          15

Glu Gly Phe Cys Trp Leu Leu Leu Leu Pro Val Met Leu Leu Ile Val
          20          25          30

Ala Arg Pro Val Lys Leu Ala Ala Phe Pro Thr Ser Leu Ser Asp Cys
          35          40          45

Gln Thr Pro Thr Gly Trp Asn Cys Ser Gly Tyr Asp Asp Arg Glu Asn
          50          55          60

Asp Leu Phe Leu Cys Asp Thr Asn Thr Cys Lys Phe Asp Gly Glu Cys
65          70          75          80

Leu Arg Ile Gly Asp Thr Val Thr Cys Val Cys Gln Phe Lys Cys Asn
          85          90          95

Asn Asp Tyr Val Pro Val Cys Gly Ser Asn Gly Glu Ser Tyr Gln Asn
          100          105          110
    
```

15

ES 2 435 793 T3

Glu Cys Tyr Leu Arg Gln Ala Ala Cys Lys Gln Gln Ser Glu Ile Leu
 115 120 125
 Val Val Ser Glu Gly Ser Cys Ala Thr Asp Ala Gly Ser Gly Ser Gly
 130 135 140
 Asp Gly Val His Glu Gly Ser Gly Glu Thr Ser Gln Lys Glu Thr Ser
 145 150 155 160
 Thr Cys Asp Ile Cys Gln Phe Gly Ala Glu Cys Asp Glu Asp Ala Glu
 165 170 175
 Asp Val Trp Cys Val Cys Asn Ile Asp Cys Ser Gln Thr Asn Phe Asn
 180 185 190
 Pro Leu Cys Ala Ser Asp Gly Lys Ser Tyr Asp Asn Ala Cys Gln Ile
 195 200 205
 Lys Glu Ala Ser Cys Gln Lys Gln Glu Lys Ile Glu Val Met Ser Leu
 210 215 220
 Gly Arg Cys Gln Asp Asn Thr Thr Thr Thr Thr Lys Ser Glu Asp Gly
 225 230 235 240
 His Tyr Ala Arg Thr Asp Tyr Ala Glu Asn Ala Asn Lys Leu Glu Glu
 245 250 255
 Ser Ala Arg Glu His His Ile Pro Cys Pro Glu His Tyr Asn Gly Phe
 260 265 270
 Cys Met His Gly Lys Cys Glu His Ser Ile Asn Met Gln Glu Pro Ser
 275 280 285
 Cys Arg Cys Asp Ala Gly Tyr Thr Gly Gln His Cys Glu Lys Lys Asp
 290 295 300
 Tyr Ser Val Leu Tyr Val Val Pro Gly Pro Val Arg Phe Gln Tyr Val
 305 310 315 320
 Leu Ile Ala Ala Val Ile Gly Thr Ile Gln Ile Ala Val Ile Cys Val
 325 330 335
 Val Val Leu Cys Ile Thr Arg Lys Cys Pro Arg Ser Asn Arg Ile His
 340 345 350
 Arg Gln Lys Gln Asn Thr Gly His Cys Gly Tyr Asn Thr Lys Leu Arg

355

360

365

<210> 3
 <211> 24
 5 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 10 <223> /nota=DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA ARTIFICIAL "gen TMEFF2 humana"

 <400> 3

 ctgatgggaa atcttatgat aatg 24
 15
 <210> 4
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 20
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA ARTIFICIAL "gen TMEFF2 humana"

 25 <400> 4

 caggaacaac gtagagaaca ctgt 24

 <210> 5
 30 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 35 <221> fuente
 <223> /nota=DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA ARTIFICIAL "gen β -actina humana"

 <400> 5

 40 acgggggtcac ccacactgtg c 21

 <210> 6
 <211> 25
 <212> ADN
 45 <213> secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /note=DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA ARTIFICIAL "gen β -actina humana"
 50
 <400> 6

 ctagaagcat ttgcggtgga cgatg 25

 55 <210> 7
 <211> 22
 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>
<221> fuente

5 <223> /nota=DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA ARTIFICIAL “gen GAPDH de ratón”

<400> 7

atggtgaagg tcggttgaa cg 22

10 <210> 8
<211> 21
<212> ADN
<213> secuencia artificial

15 <220>
<221> fuente
<223> /nota=DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA ARTIFICIAL “gen GAPDH de ratón”

20 <400> 8

gttgcatgg atgacctgg c 21

<210> 9

25 <211> 19
<212> ARN
<213> secuencia artificial

<220>

30 <221> fuente
<223> /nota=DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA ARTIFICIAL “gen TMEFF2 de ratón”

<400> 9

35 ucagaaggau ccugucua 19

<210> 10
<211> 19
<212> ARN

40 <213> secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota=DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA ARTIFICIAL “gen TMEFF2 de ratón”

45 <400> 10

cgguuacgau gacagagaa 19

50 <210> 11
<211> 24
<212> ADN
<213> secuencia artificial

55 <220>
<221> fuente
<223> /nota=DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA ARTIFICIAL “gen TMEFF2 humana”

<400> 11

ctgatgggaa atcttatgat aatg 24

<210> 12
 5 <211> 24
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 10 <221> fuente
 <223> /nota=DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA ARTIFICIAL "gen TMEFF2 humana"

<400> 12

15 caggaacaac gtagagaaca ctgt 24

<210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA ARTIFICIAL "gen β -actina humana"

25 <400> 13

acggggtcac ccacactgtg c 21

30 <210> 14
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA ARTIFICIAL "gen β -actina humana"

<400> 14

40 ctagaagcat ttgcggtgga cgatg 25

<210> 15
 <211> 21
 45 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 50 <223> /nota=DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA ARTIFICIAL "aleatoria"

<400> 15

cgcguaagaag augaaguugt t 21

55 <210> 16
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA ARTIFICIAL "gen TMEFF2 de ratón"

5

<400> 16

ucagaaggau ccugucua 19

10 <210> 17

<211> 19

<212> ARN

<213> secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /nota=DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA ARTIFICIAL "gen TMEFF2 de ratón"

<400> 17

20

cgguuacgau gacagagaa 19

<210> 18

<211> 2175

25 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 18

ES 2 435 793 T3

agtacagtat aaaacttcac agtgccaata ccatgaagag gagctcagac agctcttacc 60
 acatgataca agagccggct ggtggaagag tggggaccag aaagagaatt tgctgaagag 120
 gagaaggaaa aaaaaaacac caaaaaaaaa aataaaaaaa tccacacaca caaaaaaacc 180
 tgcgcgtgag gggggaggaa aagcagggcc ttttaaaaag gcaatcaca caacttttgc 240
 tgccaggatg cccttgcttt ggctgagagg atttctgttg gcaagttgct ggattatagt 300
 gaggagtcc cccaccccag gatccgaggg gcacagcgcg gcccccgact gtccgtcctg 360
 tgcgctggcc gccctcccaa aggatgtacc caactctcag ccagagatgg tggaggccgt 420
 caagaagcac attttaaca tgctgcactt gaagaagaga cccgatgtca cccagccggt 480
 acccaaggcg gcgcttctga acgcgatcag aaagcttcat gtgggcaaag tcggggagaa 540
 cgggtatgtg gagatagagg atgacattgg aaggagggca gaaatgaatg aacttatgga 600
 gcagacctcg gagatcatca cgtttgccga gtcaggaaca gccaggaaga cgctgcactt 660
 cgagatttcc aaggaaggca gtgacctgtc agtgggtggag cgtgcagaag tctggctctt 720
 cctaaaagtc cccaaggcca acaggaccag gaccaaaagtc accatccgcé tcttccagca 780
 gcagaagcac ccgcagggca gcttgacac aggggaagag gccgaggaag tgggcttaaa 840
 gggggagagg agtgaactgt tgctctctga aaaagtagta gacgctcgga agagcacctg 900
 gcatgtcttc cctgtctcca gcagcatcca gcggttgctg gaccagggca agagctccct 960
 ggacgttcgg attgcctgtg agcagtgccca ggagagtggc gccagcttgg ttctcctggg 1020
 caagaagaag aagaaagaag aggaggggga agggaaaaag aaggcggag gtgaaggtgg 1080
 ggcaaggagca gatgaggaaa aggagcagtc gcacagacct ttcctcatgc tgcaggcccc 1140
 gcagtctgaa gaccaccctc atcgccggcg tcggcggggc ttggagtgtg atggcaaggt 1200
 caacatctgc tgtaagaaac agttctttgt cagtttcaag gacatcggct ggaatgactg 1260
 gatcattgct ccctctggct atcatgcaa ctactgcgag ggtgagtgcc cgagccatat 1320
 agcaggcaag tccgggtcct cactgtcctt ccaactcaaca gtcacaaacc actaccgcat 1380
 ggggggcat agccccttg ccaacctcaa atcgtgctgt gtgcccacca agctgagacc 1440

ES 2 435 793 T3

```

catgtccatg ttgtactatg atgatgggtca aaacatcatc aaaaaggaca ttcagaacat 1500
gatcgtggag gagtgtgggt gctcatagag ttgccagacc cagggggaaa gggagcaaga 1560
gttgtccaga gaagacagtg gcaaaatgaa gaaattttta aggtttctga gttaaccaga 1620
aaaatagaaa ttaaaaacaa aacaaaaaaaa aaaacaaaaa aaaacaaaag taaattaaaa 1680
acaaaacctg atgaaacaga tgaaggaaga tgtggaaaaa atccttagcc agggctcaga 1740
gatgaagcag tgaagagac aggaattggg agggaaaggg agaatggtgt accctttatt 1800
tcttctgaaa tcacactgat gacatcagtt gtttaaacgg ggtattgtcc ttccccct 1860
tgaggttccc ttgtgagcct tgaatcaacc aatctagtct gcagtagtgt ggactagaac 1920
aacccaaata gcacttagaa agccatgagt ttgaaagggc ccatcacagg cactttccta 1980
cccaattacc caggtcataa ggtatgtctg tgtgacactt atctctgtgt atatcagcat 2040
acacacacac acacacacac acacacacac acacaggcat ttccacacat tacatatata 2100
cacatactgg taaaagaaca atcgtgtgca ggtggtcaca cttccttttt ctgtaccact 2160
tttgcaacaa aacaa 2175

```

<210> 19
 <211> 426
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 19

ES 2 435 793 T3

Met Pro Leu Leu Trp Leu Arg Gly Phe Leu Leu Ala Ser Cys Trp Ile
 1 5 10 15

Ile Val Arg Ser Ser Pro Thr Pro Gly Ser Glu Gly His Ser Ala Ala
 20 25 30

Pro Asp Cys Pro Ser Cys Ala Leu Ala Ala Leu Pro Lys Asp Val Pro
 35 40 45

Asn Ser Gln Pro Glu Met Val Glu Ala Val Lys Lys His Ile Leu Asn
 50 55 60

Met Leu His Leu Lys Lys Arg Pro Asp Val Thr Gln Pro Val Pro Lys
 65 70 75 80

Ala Ala Leu Leu Asn Ala Ile Arg Lys Leu His Val Gly Lys Val Gly
 85 90 95

Glu Asn Gly Tyr Val Glu Ile Glu Asp Asp Ile Gly Arg Arg Ala Glu
 100 105 110

Met Asn Glu Leu Met Glu Gln Thr Ser Glu Ile Ile Thr Phe Ala Glu

ES 2 435 793 T3

	115						120						125		
Ser	Gly	Thr	Ala	Arg	Lys	Thr	Leu	His	Phe	Glu	Ile	Ser	Lys	Glu	Gly
	130						135				140				
Ser	Asp	Leu	Ser	Val	Val	Glu	Arg	Ala	Glu	Val	Trp	Leu	Phe	Leu	Lys
145						150				155					160
Val	Pro	Lys	Ala	Asn	Arg	Thr	Arg	Thr	Lys	Val	Thr	Ile	Arg	Leu	Phe
				165					170					175	
Gln	Gln	Gln	Lys	His	Pro	Gln	Gly	Ser	Leu	Asp	Thr	Gly	Glu	Glu	Ala
			180					185					190		
Glu	Glu	Val	Gly	Leu	Lys	Gly	Glu	Arg	Ser	Glu	Leu	Leu	Leu	Ser	Glu
		195					200					205			
Lys	Val	Val	Asp	Ala	Arg	Lys	Ser	Thr	Trp	His	Val	Phe	Pro	Val	Ser
210						215					220				
Ser	Ser	Ile	Gln	Arg	Leu	Leu	Asp	Gln	Gly	Lys	Ser	Ser	Leu	Asp	Val
225					230					235					240
Arg	Ile	Ala	Cys	Glu	Gln	Cys	Gln	Glu	Ser	Gly	Ala	Ser	Leu	Val	Leu
				245					250					255	
Leu	Gly	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Glu	Glu	Glu	Gly	Glu	Gly	Lys	Lys	Lys
			260					265					270		
Gly	Gly	Gly	Glu	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Asp	Glu	Glu	Lys	Glu	Gln	Ser
		275					280					285			
His	Arg	Pro	Phe	Leu	Met	Leu	Gln	Ala	Arg	Gln	Ser	Glu	Asp	His	Pro
	290					295					300				
His	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Gly	Leu	Glu	Cys	Asp	Gly	Lys	Val	Asn	Ile
305					310					315					320
Cys	Cys	Lys	Lys	Gln	Phe	Phe	Val	Ser	Phe	Lys	Asp	Ile	Gly	Trp	Asn
				325					330					335	
Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Ser	Gly	Tyr	His	Ala	Asn	Tyr	Cys	Glu	Gly
			340					345					350		
Glu	Cys	Pro	Ser	His	Ile	Ala	Gly	Thr	Ser	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Phe
		355					360					365			

ES 2 435 793 T3

His Ser Thr Val Ile Asn His Tyr Arg Met Arg Gly His Ser Pro Phe
370 375 380

Ala Asn Leu Lys Ser Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Arg Pro Met Ser
385 390 395 400

Met Leu Tyr Tyr Asp Asp Gly Gln Asn Ile Ile Lys Lys Asp Ile Gln
405 410 415

Asn Met Ile Val Glu Glu Cys Gly Cys Ser
420 425

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un modulador de TMEFF2, en la que dicho modulador de TMEFF2 es un antagonista de TMEFF2 para el uso en el tratamiento de un trastorno afectivo.
5
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el modulador de TMEFF2 puede reducir o inhibir la unión de TMEFF2 a activina.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 ó 2, en la que el modulador de TMEFF2 puede
10 interactuar con la proteína TMEFF2, con el gen TMEFF2 o con el transcrito de TMEFF2.
4. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el modulador de TMEFF2 es un anticuerpo dirigido contra TMEFF2 o un ARNip contra TMEFF2.
- 15 5. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho trastorno afectivo está seleccionado del grupo que consiste en depresión mayor, trastorno de ansiedad generalizada y trastorno bipolar.
6. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha
20 depresión mayor está seleccionada del grupo que consiste en depresión mayor, distimia, depresión atípica, trastorno disfórico premenstrual y trastorno afectivo estacional.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en la que dicho trastorno de ansiedad
25 generalizada está seleccionado del grupo que consiste en trastorno de pánico, fobias, agorafobia, fobia social, fobia específica, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno por estrés postraumático, trastorno de ansiedad por separación, manía, hipomanía y trastorno ciclotímico.
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en la que dicho trastorno bipolar es trastorno
30 bipolar tipo 1 o trastorno bipolar tipo II.

Figura 1

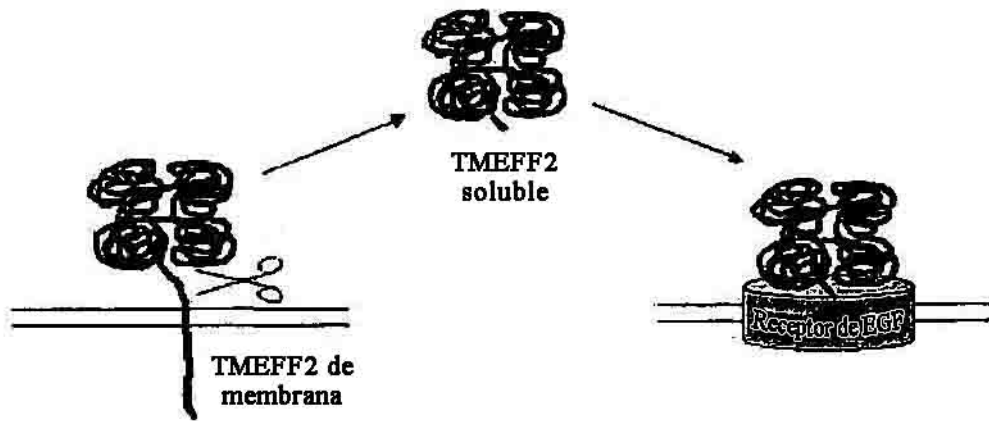


Figura 2

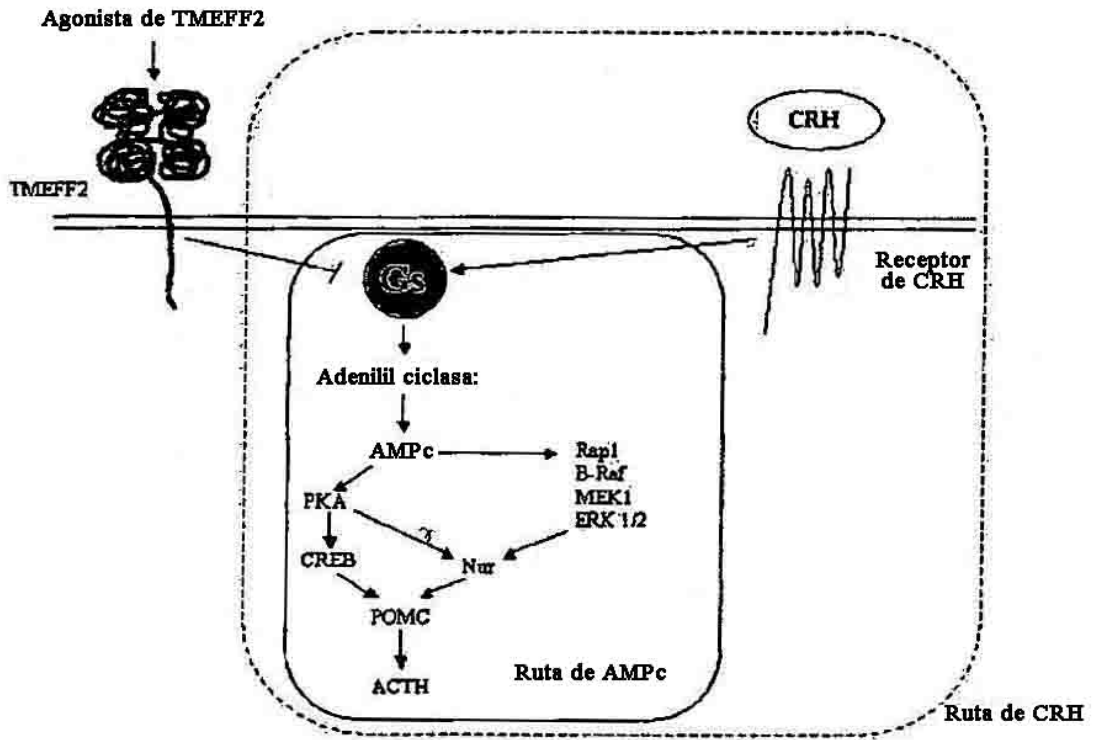


Figura 3



Figura 4

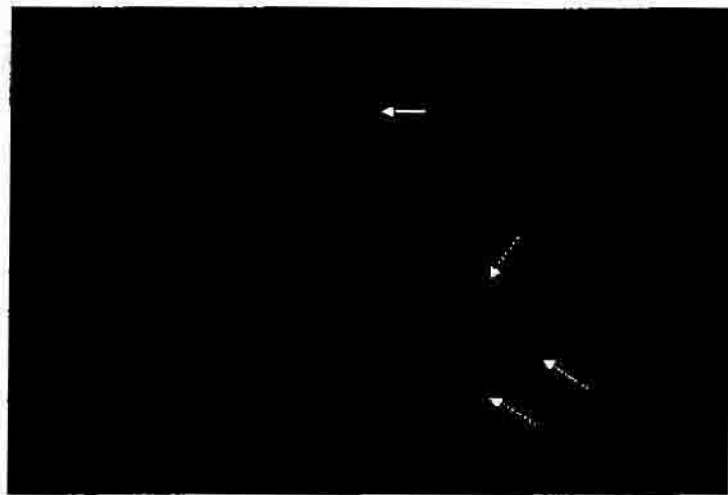


Figura 5

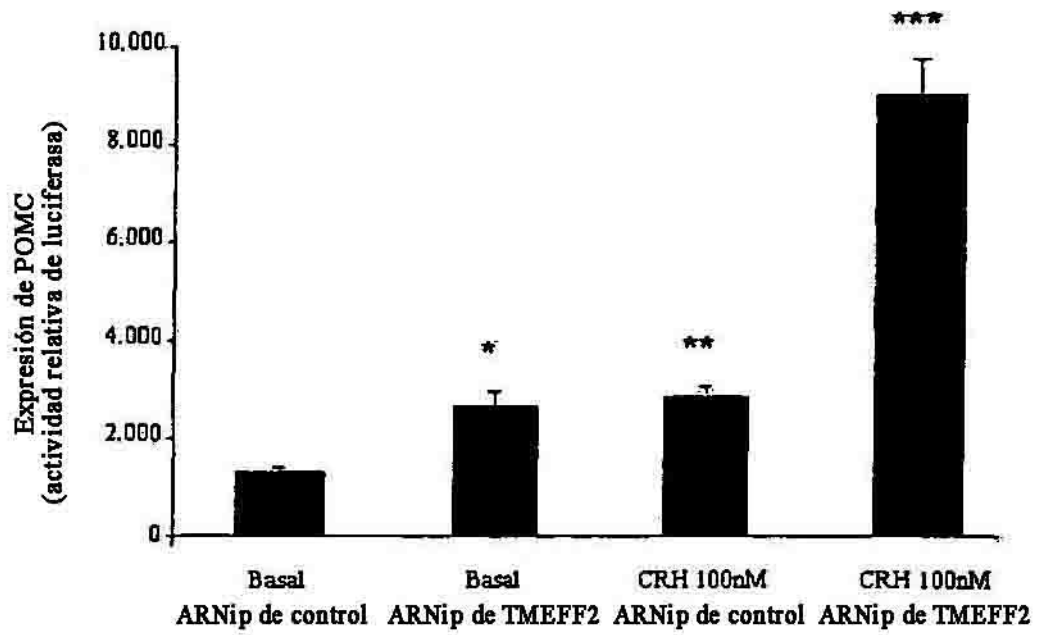


Figura 6

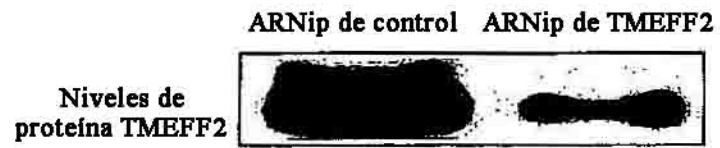


Figura 7

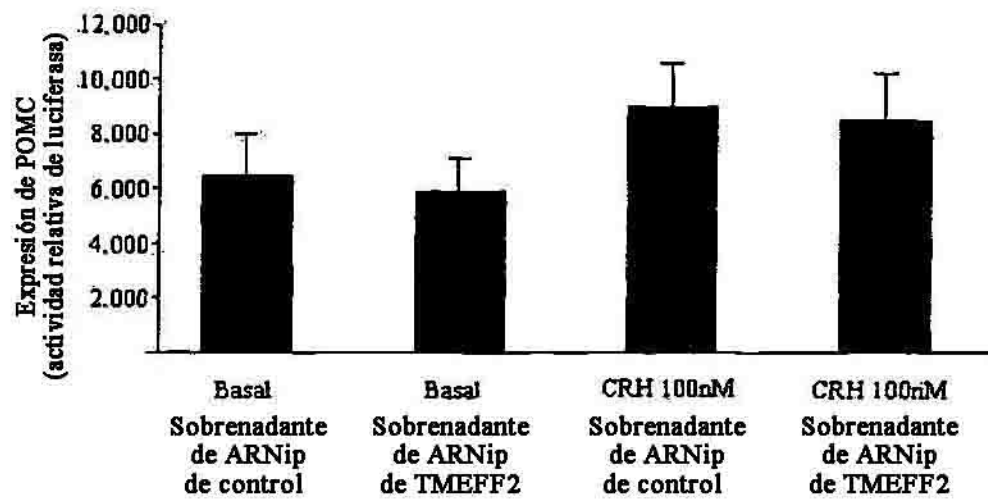


Figura 8

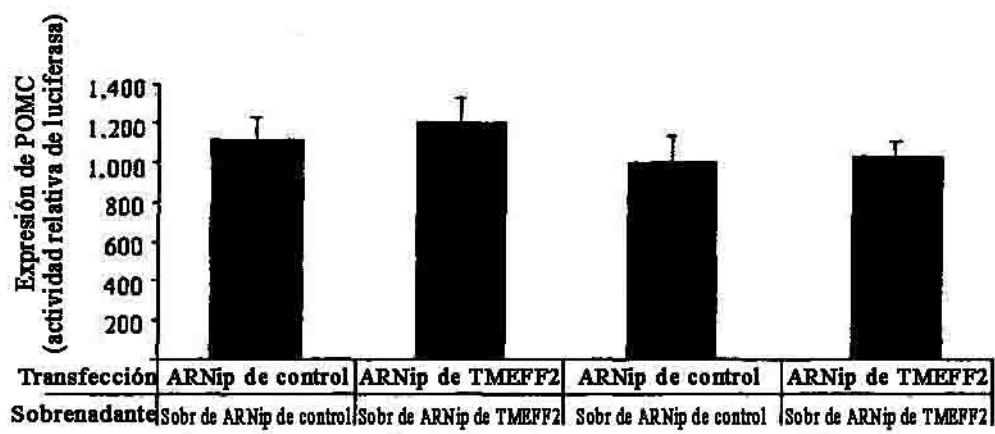


Figura 9

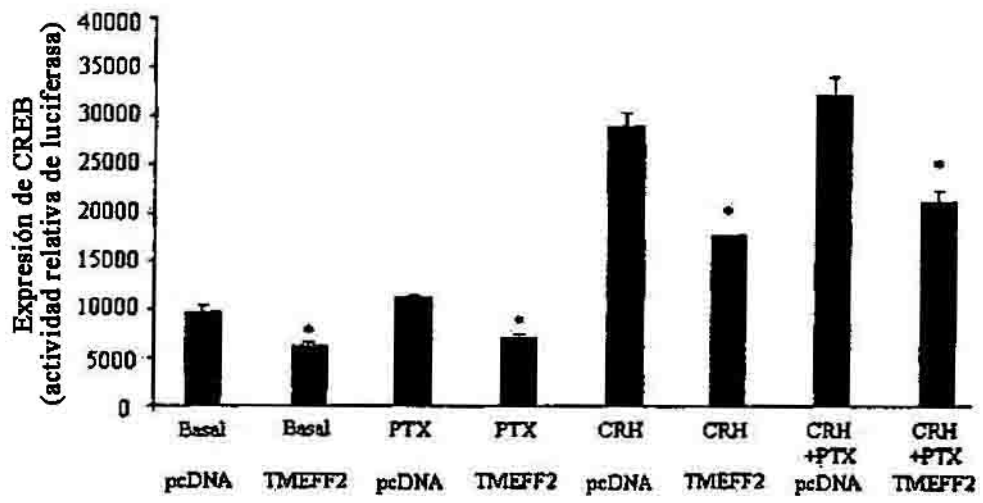


Figura 10

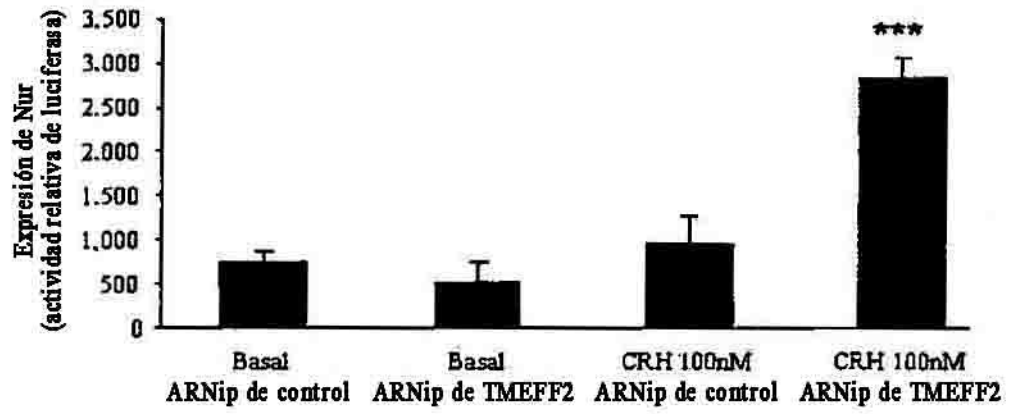


Figura 11

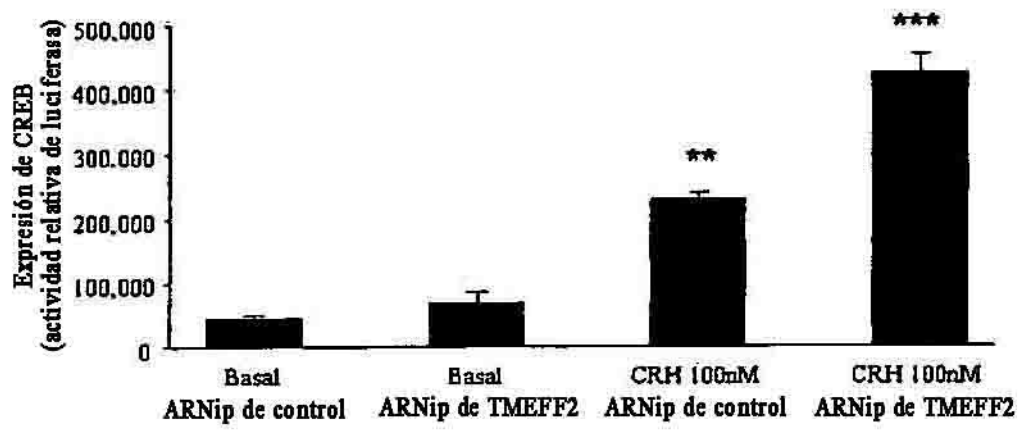


Figura 12

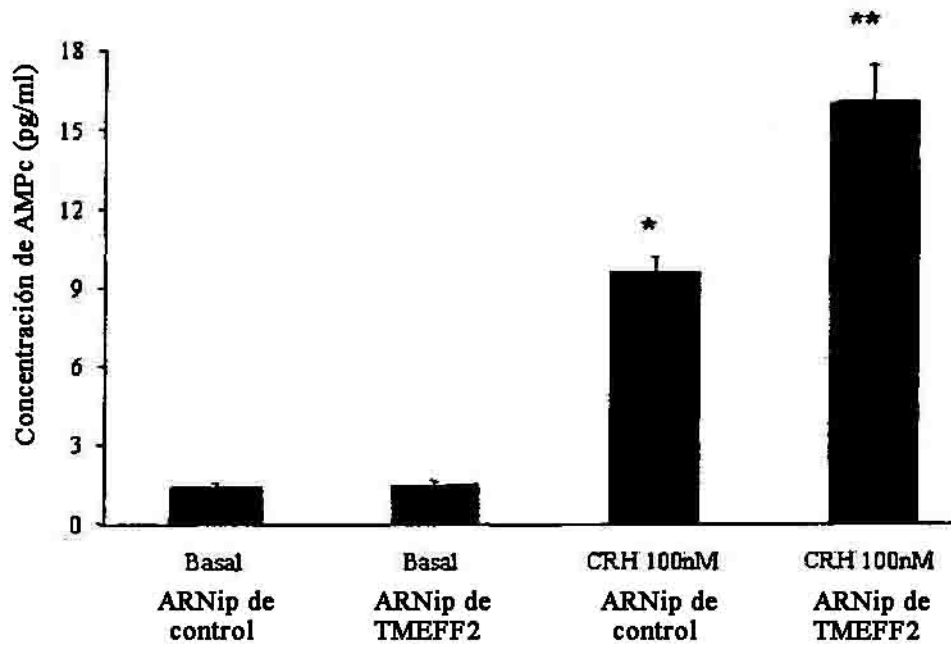


Figura 13

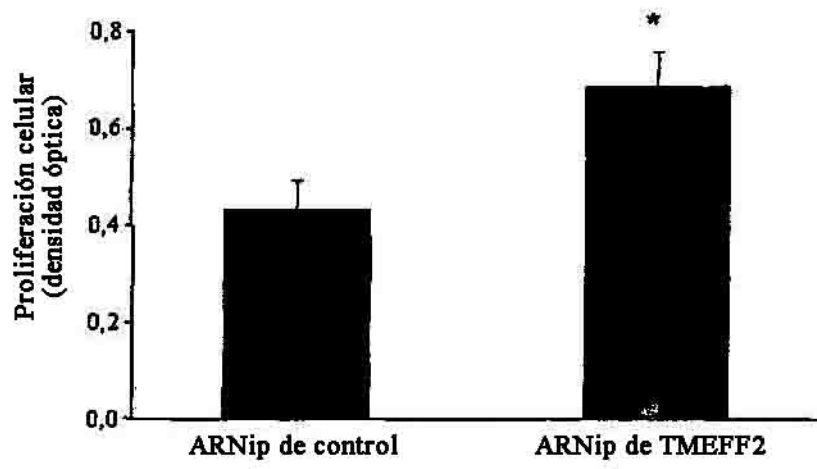
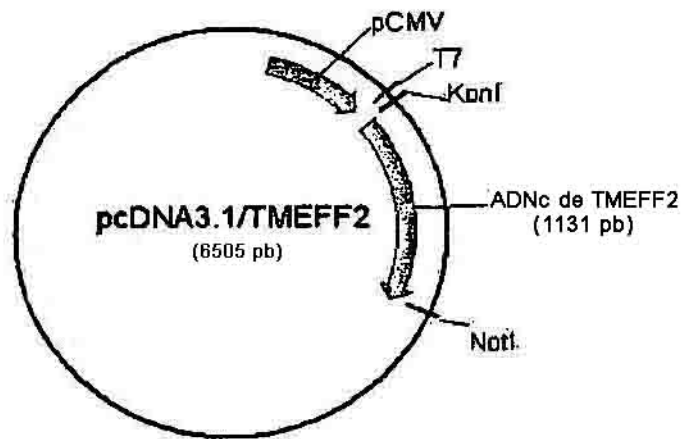


Figura 14



pCMV: promotor del citomegalovirus
T7: promotor de T7 polimerasa

Figura 15

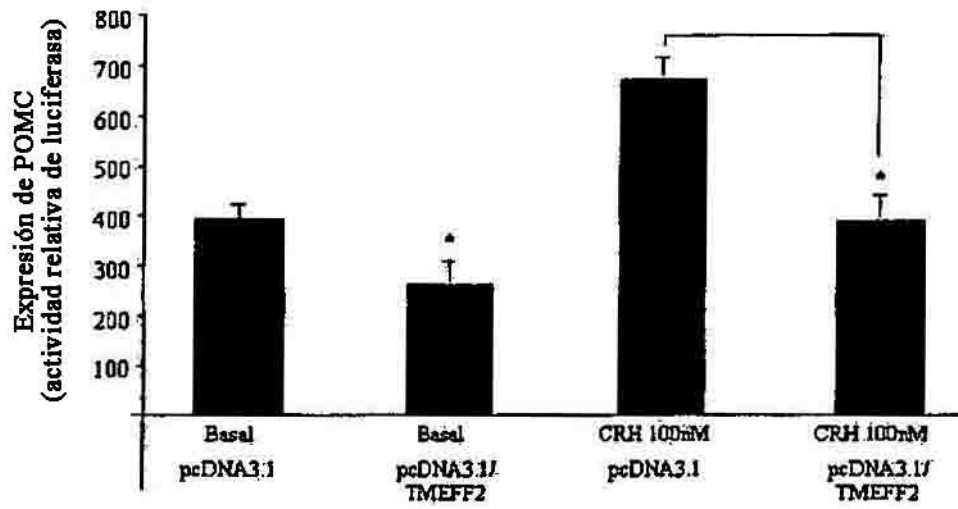


Figura 16

Secuencia de nucleótidos de TMEFF2 humana (ADNc) [SEQ ID NO: 1]

```

1  cagtagcccg ctgcccgcc cccgcgatcc tgtgttcctc ggaagccgtt tgctgctgca
61  gagttgcacg aactagtcac ggtgctgtgg gagtcccgcg ggcagtgcaag cagctggaca
121 ctttgogagg gcttttgcctg gctgctgtctg ctgcccgcca tgotactcat cgtagcccg
181 ccggtgaagc tcgctgcttt ccctacotcc ttaagtgact gccaaacgcc caccgctgg
241 aattgctctg gttatgatga cagagaaaat gatctcttcc tctgtgacac caacacctgt
301 aaatttgatg gggaaatggtt aagaattgga gacactgtga ctggcgtctg tcagttcaag
361 tgcaacaatg actatgtgcc tgtgtgtggc tccaatgggg agagctacca gaatgagtg
421 taactgogac aggctgcatg caaacagcag agtgagatc ttgtggtgtc agaaggatca
481 tgtgccacag atgcaggatc aggatctgga gatggagtcc atgaaggctc tggagaaact
541 agtcaaaagg agacatccac ctgtgatatt tgccagtttg gtgcagaatg tgacgaagat
601 gccgaggatg tctggtgtgt gtgtaatatt gactgttctc aaaccaactt caatcccctc
661 tgcgottctg atgggaaatc ttatgataat gcatgccaaa tcaagaangc atcgtgtcag
721 aaacaggaga saattgaagt catgtctttg ggtcgatgtc aagataacac aactacaact
781 actaagtctg aagatgggca ttatgcaaga acagattatg cagagaatgc taacaaatta
841 gaagaaagtg ccagagaaca ccacatacct tctccggaac attacaatgg cttotgcatg
901 catgggaagt gtgagcatto tatcaatag caggagccat ctggcaggtg tgatgctggt
961 tatactggac aacactgtga aaaaaaggac tacagtgttc tatacgttgt tcccggctct
1021 gtacgatttc agtatgtctt aatcgcagct gtgattggaa caattcagat tgatgtcctc
1081 tgtgtggtgg tctctgcat cacaaggaaa tgcccagaa gcaacagaat tcacagacag
1141 aagcaaaata cagggcactg tgggtataat actaagttga gatgatatca tttacggggg
1201 aaggcgcttt gtgaagtagg ccttattct ctgtccttt cgtacaggga ggaattgaa
1261 gtagatagaa accgacctgg attactccgg tctgaactca gatcacgtag gactttaatc
1321 gtgaacaaa cgaaccttta atagcggctg caccatcggg atgtcctgat ccaacatcga
1381 ggtcgtaaac cctattgttg atatggactc tagaatagga ttgcgctgtt atccctaggg
1441 taactgttcc cgttggtcaa gttattggat caattgagta tagtagttcg ctttgactgg
1501 tgaagtctta gcctgtactg ctggagggtt ggttctgtct ccgaggtcgc cccaaccgaa
1561 attttaatg caggtttggt agtttaggac ctgtgggttt gttaggtact gtttgatta
1621 ataaatt

```

(la secuencia codificante se muestra en negrita)

Secuencia de aminoácidos de TMEFF2 humana [SEQ ID NO: 2]

```

MVLWESPRQC SSWTLCEGFC WLLLLPVMLL IVAREVKLAA FPTSLSDCQT
PTGWNCSGYD DRENDLFLCD TNTCKFDGEC LRIGDVTVCV CQFKCNNDYV
PVCGSNGESY QNECYLRQAA CKQQSEILVV SEGSCATDAG SGSGDGVHEG
SGETSQKETS TCDICQFGAE CDEDAEDVWC VCNIDCSQTN FNPLCASDGK
SYDNACQIKE ASCQKQEKIE VMSLGRCQDN TTTTKSEDG HYARTDYAEN
ANKLEESARE HHIPCPEHYN GFCHMGKCEH SINMQEFSR CDAGYTGQHC
EKKDYSVLYV VPGPVRFYV LIAAVIGTIQ IAVICVVVLC ITRKCPRSNR
IHRQKQNTGH CGYNTKLR

```

Figura 17

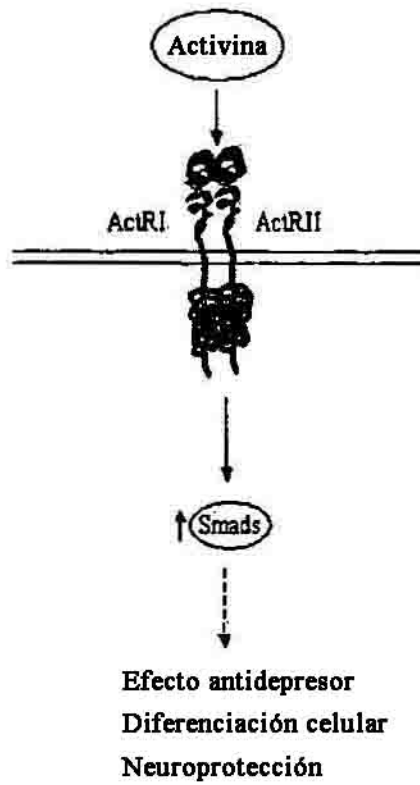


Figura 18

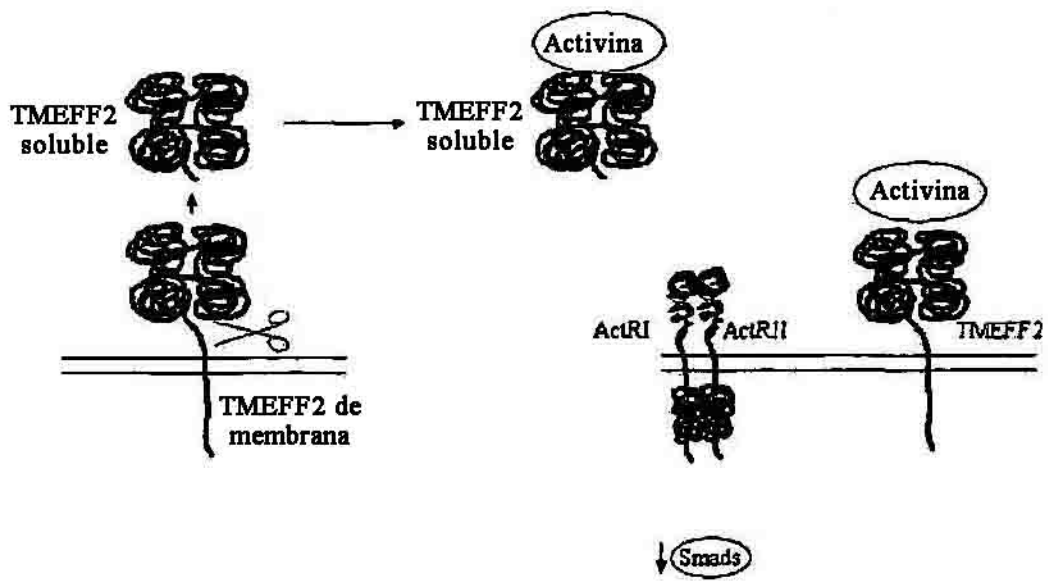


Figura 19

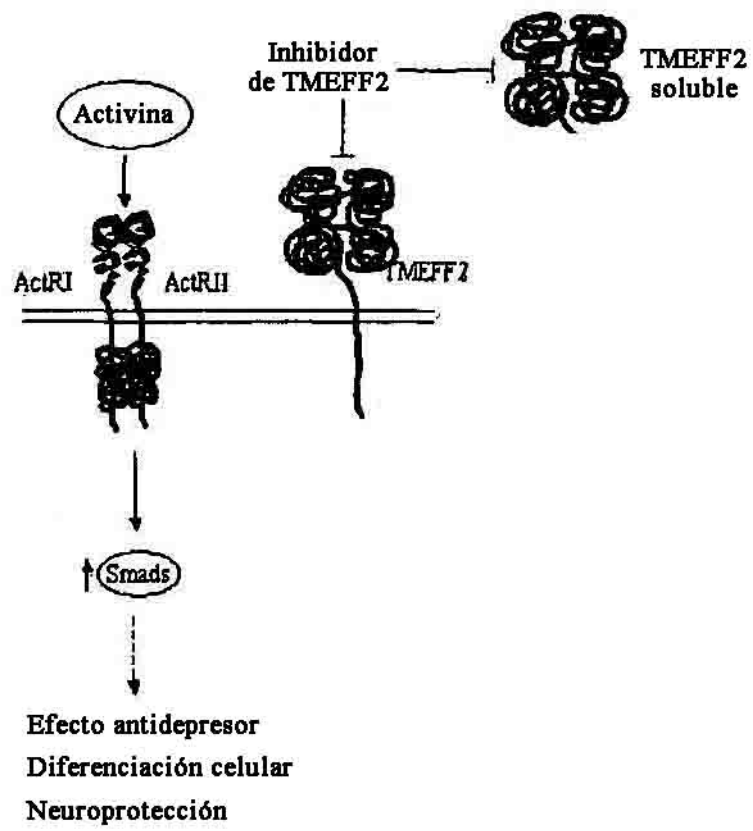


Figura 20

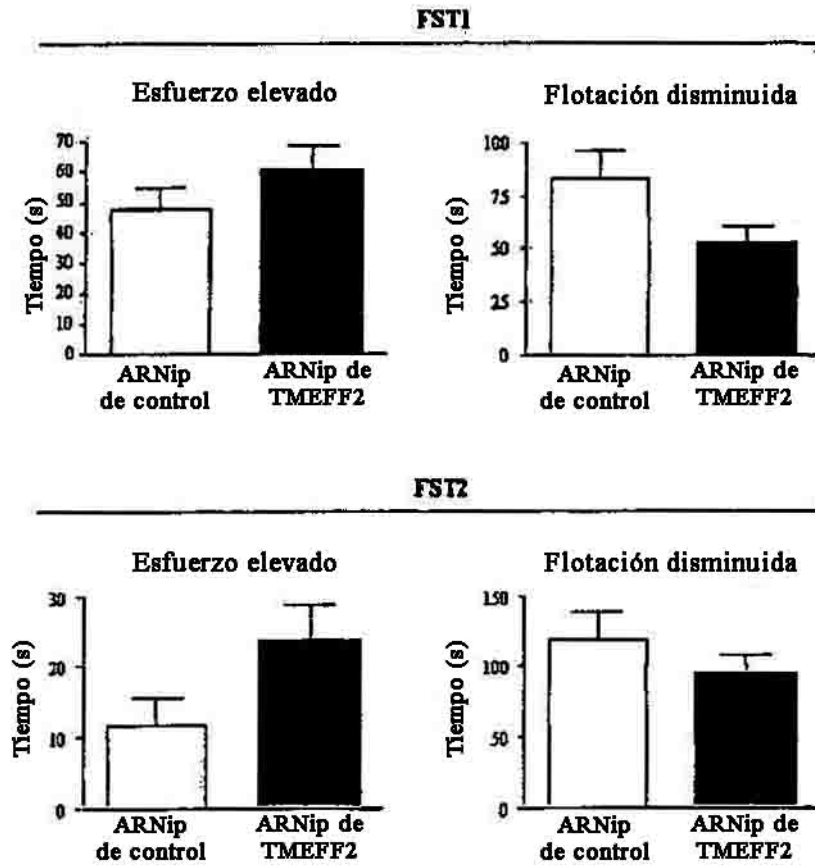


Figura 21

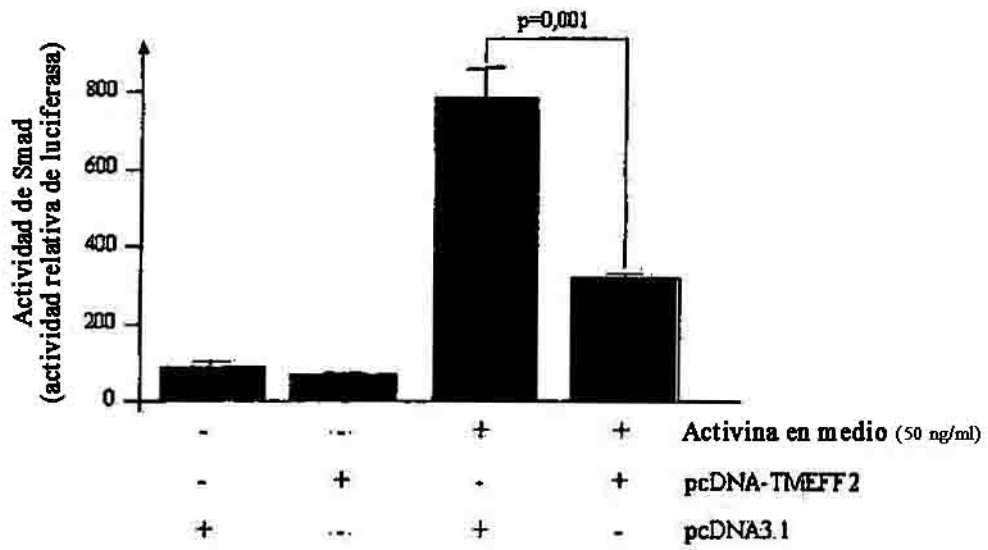


Figura 22

Secuencia de nucleótidos de activina humana (inhibina beta A) (ADNc) [SEQ ID NO: 18]

```

1 agtacagtat aaaacttcac agtgccaata ccatgaagag gagctcagac agcttttacc
61 acatgafaca agagccggct ggtggaagag tggggaccag aaagagaatt tgctgaagag
121 gagaaggaaa aaaaaaacac caaaaaaaa aataaaaaaa tccacacaca caaaaaaacc
181 tgcgctgtag gggggaggaa aagcagggcc ttttaaaaag gcaatcaca caacttttgc
241 tgccaggatg cccttgcttt ggctgagagg attctgtgtg gcaagttgct ggattatagt
301 gaggagttec cccaccccag gatccgaggg gcacagcggc gccccgact gtcctgctg
361 tgcgctggcc gccctcccaa aggatgtacc caactctcag ccagagatgg tggaggccgt
421 caagaagcac atTTtaaaCa tgetgcactt gaagaagagc cccgatgtca ccagccggc
481 acccaaggcg gcycttctga acgcgatcag aaagcttcat gtgggcaaag tccggggaga
541 cgggtatgtg gagatagagg atgacattgg aaggagggca gaaatgaatg aacttatgga
601 gcagaccctc gagatcatca cgtttgccga gtcaggaaaca gccaggaaga cgtgcactt
661 cgagtttcc aaggaaggca gtgacctgtc agtgggtggag cgtgcagaag tctggctctt
721 cctaaaagtc cccaaggcca acagaccag gaccaaagtc accatccgcc tctccagca
781 gcagaagcac ccgacgggca gcttggacac aggggaagag gcgaggaag tggcttaaa
841 gggggagagg agtgaactgt tgctctctga aaaagtagta gacgctcggg agagcacctg
901 gcagtgtctc cctgtctcca gcagcateca gcggttctgt gaccagggca agagtccct
961 ggacgttcgg attgctctgt agcagtgccg ggagagtggc gccagcttgg tctcctggg
1021 caagaagaag aagaagaag aggaggggga agggnaaaag aagggcggag gtgaaggtgg
1081 ggcagggca gatgaggaag aggagcagtc gcacagacct ttcctcatgc tgcaggcccg
1141 gcagtctgaa gaccaccctc atcgccggcg tccggggggo ttggagtgtg atggcaaggt
1201 caacatctgc tgaagaagac agttctttgt cagtctcaag gacatcggct ggaatgactg
1261 gatcattgct ccctctggct atcatgccaa ctactcggag ggtgagtgcc ctagccatct
1321 agcaggcaag tccgggtcct cactgtcctt ccactcaaca gtcctcaaco actaccgat
1381 gcggggccat agccctttg ccaacctcaa atcgtgtgtg gtgcccaca agctgagacc
1441 catgtccatg ttgtactatg atgatggtca aaacatcatc aaaaaggaca ttcagaacat
1501 gatcgtggag gagtgtgggt gctaatagag ttgccagcc cagggggaaa gggagcaaga
1561 gttgtccaga gaagacagtg gcaaatgaa gaaatttta agtttctga gtaaccaga
1621 aaaatagaaa ttaaaaacaa aacaaaaaaa aaaaacaaa aaaaacaaag taatataa
1681 acaaaacctg atgaaacaga tgaaggaaga tgtggaaaa atccttagcc agggctcaga
1741 gatgaagcag tgaagagag aggaattggg agggaaaggg agaattgtgt accctttatt
1801 tctctgaaa tcacactgat gacatcagtt gtttaaacgg ggtattgtcc tttccccct
1861 tgaggttccc ttgtgagcct tgaatcaacc aatctagtct gcagtagtgt ggactagaac
1921 aacccaaata gcatctagaa agccatgagt ttgaaagggc ccatcacagg cactttctta
1981 cccaattacc caggtcataa ggtatgtctg tgtgacactt atctctgtgt atatcagcat
2041 acacacacac acacacacac acacacacac acacagggcat tccacacat tacatata
2101 cacatactgg taaaagaaca atcgtgtgca ggtggtcaca cttccttttt ctgtaccact
2161 tttgaacaaa aacaa
    
```

(la secuencia codificante se muestra en negrita)

Secuencia de aminoácidos de activina humana [SEQ ID NO: 19]

```

MPLLWLRGFL IASCIIVRS SPTPGSEHGS AAPDCPSCAL AALPKDVPNS QPEMVEAVKK
HILNMLHLKK RPDVTQPVFK AALLNAIRKL HVGKVGGENY VEIEDDIGRR AEMNELMEQT
SEIITFAESG TARKTLHFEI SKEGSDLSVV ERAEVWFLK VPKANRTRTK VTIRLFQQQK
HPQGS�DTGE EAEVGLKGE RSELLSEKV VDARKSTWHV FPVSSSIQRL LDQKSSLDV
RIACEQCQES GASLVLLGK KKEEEGEGK KGGGGEGGAG ADEEKEQSHR PFLMLQARQS
EDHPRRRRRR GLECDGKVINI CCKKQFFVSF KDIGWNDWII APSGYHANYC EGECPSHIAG
TSGSSLSFHS TVINHYMRG HSPFANLKSC CVPTKLRPNS MLYYDDGQNI IKKDIQNMIV
EECGCS
    
```