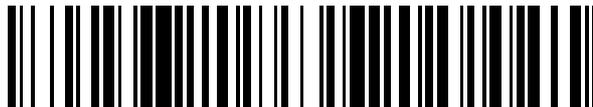


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 672**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00	(2006.01)
C12Q 1/68	(2006.01)
C12M 1/34	(2006.01)
C07H 21/02	(2006.01)
C07H 21/04	(2006.01)
A61K 38/18	(2006.01)
G01N 33/50	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2006 E 12193871 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 2564864**

54 Título: **Métodos relacionados con FGF2 para diagnosticar y tratar la depresión**

30 Prioridad:

12.11.2005 US 736526 P
13.10.2006 US 829516 P

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

27.04.2015

73 Titular/es:

THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND (100.0%)
Stanford Junior University, 1705 El Camino Real Palo Alto, CA 94306-1106, US

72 Inventor/es:

AKIL, HUDA; WATSON, STANLEY J.; EVANS, SIMON J.; TURNER, CORTNEY; BERNARD, RENÉ; KERMAN, ILAN; THOMPSON, ROBERT C.; BURMEISTER, MARGIT; SCOTT, LAURA J.; MENG, FAN; BOEHNKE, MICHAEL; BUNNEY, WILLIAM E. JR.; VAWTER, MARQUIS P.; JONES, EDWARD G.; CHOUDARY, PRABHAKARA V.; MYERS, RICHARD M.; SCHATZBERG, ALAN F.; LI, JUN; ABSHER, DEVIN; TOMITA, HIROAKI y LYONS, DAVID MICHAEL

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 534 672 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

Métodos relacionados con FGF2 para diagnosticar y tratar la depresión

5 Antecedentes de la invención

La depresión clínica, incluyendo tanto trastornos bipolares como trastornos de depresión mayor, es un problema de salud pública importante, que afecta a una estimación del 9,5 % de la población adulta de los Estados Unidos cada año. Aunque se ha planteado la hipótesis de que la enfermedad mental, incluyendo trastornos anímicos tales como depresión mayor ("MDD") y trastorno bipolar ("BP") así como trastornos psicóticos tales como esquizofrenia, pueden tener raíces genéticas, se ha conseguido poco progreso en la identificación de secuencias génicas y productos génicos que desempeñan un papel en la causa de estos trastornos, como sucede para muchas enfermedades con un origen genético complejo (véase, por ejemplo, Burmeister, Biol. Psychiatry 45: 522-532 (1999)).

La falta actual de biomarcadores y la ineficacia y fiabilidad del diagnóstico y las tasas son importantes problemas para el tratamiento de trastornos mentales. Por ejemplo, aproximadamente el 15 % de la población padece MDD mientras que aproximadamente el 1 % padece trastornos BP. El diagnóstico del trastorno bipolar es difícil cuando, como sucede en ocasiones, el paciente presenta solamente síntomas de depresión para el especialista clínico. Se ha indicado que al menos al 10-15 % de los pacientes con BP se les diagnostica erróneamente MDD. Las consecuencias de dicho diagnóstico erróneo incluyen un retardo en la introducción de tratamiento eficaz con estabilizadores anímicos y un retardo en la búsqueda u obtención de consejo específico para el trastorno bipolar. Además el tratamiento con antidepresivos solo induce ciclos rápidos, cambiando a estado maniaco o mixto, y en consecuencia aumenta el riesgo de suicidio. Además, aparte de una falta de eficacia, retardo en el inicio de la acción y efectos secundarios (sexuales, de sueño, aumento de peso, etc.), hay preocupaciones recientes con respecto a los efectos indeseables de los antidepresivos en los síndromes metabólicos, tales como diabetes e hipercolesterolemia.

Claramente, existe la necesidad de métodos para obtener información precisa y objetiva acerca del estado fisiológico y/o genético de pacientes deprimidos o potencialmente suicidas, particularmente ya que el estado fisiológico y/o genético del paciente está relacionado con la probable respuesta del paciente a un régimen de tratamiento particular.

El documento WO 2004/056865 desvela compuestos capaces de modular la interacción del ligando de FGFR. Además, el documento WO 2004/056865 desvela un péptido de motivos de unión a NCAM.

El documento WO 2005/014623 también desvela un péptido de motivo de unión a FGFR NCAM.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona un ligando que activa el receptor de FGF para su uso como un antidepresivo en el tratamiento terapéutico de un individuo con trastorno depresivo mayor (MDD), en el que el ligando es un peptidomimético de NCAM. Tanto FGF2 como el peptidomimético de NCAM tienen efectos de tipo antidepresivo en el ensayo de natación forzada cuando se inyectan por vía intracerebroventricular. La descripción y los ejemplos presentados en el presente documento muestran que la presencia de un inhibidor peptídico invierte el efecto.

45 Breve descripción de los dibujos

La FIGURA 1 muestra diferencias de variantes de FGFR2 en Trastornos Anímicos. Las variantes de corte y empalme del receptor soluble FGFR2 pueden representar un porcentaje menor de los receptores totales en MDD que en los controles.

La FIGURA 2 muestra el efecto de la inyección aguda de FGF2 en la depresión y ansiedad de ratones, como se mide por ensayos de movilidad (parte superior) y el ensayo de laberinto elevado más (EPM) (parte inferior), respectivamente. "Abierto", "centro" y "cerrado" se refieren al tiempo pasado en las partes abierta, central y cerrada del EPM, respectivamente.

La FIGURA 3 muestra los efectos de inyecciones del péptido NCAM en la depresión y ansiedad de ratones, como se mide por el ensayo de escalada y natación forzada (parte superior) y el ensayo de laberinto elevado más (EPM) (parte inferior), respectivamente. "Abierto", "centro" y "cerrado" se refieren al tiempo pasado en las partes abierta, central y cerrada del EPM, respectivamente.

La FIGURA 4 muestra los efectos de inyecciones de un inhibidor peptídico en depresión y ansiedad de ratones, como se mide por el ensayo de escalada y natación forzada (parte superior) y el ensayo de laberinto elevado más (EPM) (parte inferior), respectivamente. "Abierto", "centro" y "cerrado" se refieren al tiempo pasado en las partes abierta, central y cerrada del EPM, respectivamente.

La FIGURA 5 muestra una tabla que enumera los genes en la ruta de señalización de AMPc cuya expresión está significativamente desregulada en la corteza cingulada anterior (AnCg) de pacientes con trastorno bipolar (BPD).

La FIGURA 6 muestra una tabla que enumera genes en las rutas de señalización de AMPc cuya expresión está significativamente desregulada en la corteza cingulada anterior (AnCg) de pacientes con trastorno de depresión mayor (MDD).

La FIGURA 7 muestra una tabla que enumera genes en la ruta de señalización de fosfatidilinositol cuya expresión está significativamente desregulada en la corteza cingulada anterior (AnCg) de pacientes con trastorno bipolar (BPD).

La FIGURA 8 muestra una tabla que enumera genes en la ruta de señalización de fosfatidilinositol cuya expresión está significativamente desregulada en la corteza cingulada anterior (AnCg) de pacientes con trastorno de depresión mayor (MDD).

La FIGURA 9 muestra dos diagramas que ilustran el efecto de la administración de FGF-2 crónica (5 ng/g, 3 semanas) en la ansiedad en roedores con diferencias, como se mide por el tiempo que los roedores pasan en el compartimento luminoso del sistema de ensayo. LR, animales con alta ansiedad intrínseca; HR, animales con baja ansiedad intrínseca; HRFGF-2, animales con baja ansiedad a los que se administró FGF-2; LRFGF-2, animales con alta ansiedad a los que se administró FGF-2.

La FIGURA 10 muestra la relación inversa entre la expresión del gen de FGF-2 y el comportamiento de ansiedad usando el ensayo de "brazos abiertos". CA-2, región del hipocampo CA-2.

La FIGURA 11, parte superior, muestra un esquema de la estructura básica de FGFR2 y FGFR3 alineados con los exones amplificados y descritos en el Ejemplo. Se pone énfasis en las variantes de corte y empalme IIIb/IIIc en el extremo C terminal del tercer dominio de tipo Ig de ambos receptores (R2 y R3). Las secuencias exónicas para FGFR2 y FGFR3 no son de ninguna manera idénticas (véase FIGURA 11, parte inferior), pero la nomenclatura exónica se sincronizó para emparejar cada número de exón con regiones correspondientes en las estructuras proteicas tanto de R2 como de R3. Las isoformas truncada y escindida de los receptores de FGF se excluyen del esquema. La FIGURA 11, parte inferior, muestra secuencias de cebadores de FGFR2 y FGFR3 directo e inverso diseñados para análisis cuantitativo por RT-PCR en tiempo real. Los cebadores se optimizaron y se diseñaron para máxima eficacia con detección diferencial para variantes de corte y empalme de IIIb/IIIc tanto para FGFR2 como para FGFR3.

La FIGURA 12 muestra dos diagramas que ilustran la reducción inducida por tensión crónica en la relación de expresión de variante de corte y empalme IIIc:IIIb exónica tanto en FGFR2 (panel superior) como en FGFR3 (panel inferior). V (vehículo); NS (sin tensión); tensión crónica (S); FGF-2 (F).

Definiciones

Un "trastorno mental", una "dolencia mental", "enfermedad mental" o "enfermedad, dolencia o trastorno psiquiátrico o neuropsiquiátrico" se refiere a trastornos anímicos (por ejemplo, depresión mayor, manía y trastornos bipolares), trastornos psicóticos (por ejemplo, esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo, trastorno esquizofreniforme, trastorno delirante, trastorno psicótico breve y trastorno psicótico compartido), trastornos de personalidad, trastornos de ansiedad (por ejemplo, trastorno obsesivo compulsivo) así como otros trastornos mentales tales como trastornos relacionados con sustancias, trastornos de la infancia, demencia, trastorno autista, trastorno de ajuste, delirio, demencia multiinfarto y trastorno de Tourette como se describe en el Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Cuarta Edición, (DSM IV). Típicamente, dichos trastornos tienen un componente genético y/o uno bioquímico complejo.

Un "trastorno anímico" se refiere a la alteración de la tonalidad emocional o estado emocional experimentado por un individuo durante un periodo de tiempo prolongado. Los trastornos anímicos incluyen trastorno de depresión mayor (es decir, trastorno unipolar), manía, disforia, trastorno bipolar, distimia, ciclotimia y muchos otros. Véase, por ejemplo, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Cuarta Edición, (DSM IV).

"Trastorno de depresión mayor", "trastorno depresivo mayor" o "trastorno unipolar" se refieren a un trastorno anímico que implica cualquiera de los siguientes síntomas: estados de ánimo triste, ansioso o "vacio" persistente; sensaciones de desesperanza o pesimismo; sensaciones de culpa, inutilidad o impotencia; pérdida de interés o placer en aficiones y actividades que antes se disfrutaban, incluyendo el sexo; energía reducida, fatiga, estar "ralentizado"; dificultad en la concentración, recuerdo o toma de decisiones; insomnio, despertarse de madrugada o dormir en exceso; apetito y/o pérdida de peso o sobrealimentación y aumento de peso; pensamientos de muerte o suicidio o intento de suicidio; inquietud o irritabilidad; o síntomas físicos persistentes que no responden a tratamiento, tales como cefaleas, trastornos digestivos y dolor crónico. Se han descrito diversos subtipos de depresión en, por ejemplo, DSM IV.

“Trastorno bipolar” es un trastorno anímico caracterizado por periodos alternantes de estados de ánimo extremos. Una persona con trastorno bipolar experimenta ciclos de estados de ánimo que habitualmente se desplazan de estar extremadamente eufórico o irritable (manía) a triste y desesperado (depresión) y de nuevo de vuelta al primero, con periodos de estado de ánimo normal entre medias. El diagnóstico del trastorno bipolar se describe, por ejemplo, en DSM IV. Los trastornos bipolares incluyen trastorno bipolar I (manía con o sin depresión mayor) y trastorno bipolar II (hipomanía con depresión mayor), véase, por ejemplo, DSM IV.

Un “trastorno psicótico” se refiere a una afección que afecta a la mente, que da como resultado al menos alguna pérdida de contacto con la realidad. Los síntomas de un trastorno psicótico incluyen, por ejemplo, alucinaciones, comportamiento cambiado que no se basa en la realidad, delirios y similares. Véase, por ejemplo, DSM IV. La esquizofrenia, el trastorno esquizoafectivo, el trastorno esquizofreniforme, el trastorno delirante, el trastorno psicótico breve, el trastorno psicótico inducido por sustancias y trastorno psicótico compartido son ejemplos de trastornos psicóticos.

La “esquizofrenia” se refiere a un trastorno psicótico que implica un alejamiento de la realidad por un individuo. Los síntomas comprenden durante al menos parte de un mes dos o más de los siguientes síntomas: delirios (solamente se requiere un síntoma si un delirio es extraño, tal como ser secuestrado en una nave espacial del sol); alucinaciones (solamente se requiere un síntoma si las alucinaciones son de al menos dos voces que hablan entre sí o de una voz que mantiene un comentario continuo en los pensamientos o acciones del paciente); habla desorganizada (por ejemplo, desvíos o incoherencia frecuente); comportamiento genéricamente desorganizado o catatónico; o síntomas negativos, es decir, aplanamiento afectivo, afasia o abulia. La esquizofrenia abarca trastornos tales como, por ejemplo, trastornos esquizoafectivos. El diagnóstico de la esquizofrenia se describe, por ejemplo, en DSM IV. Los tipos de esquizofrenia incluyen, por ejemplo, paranoide, desorganizada, catatónica, indiferenciada y residual.

Un “antidepresivo” se refiere a un agente usado típicamente para tratar la depresión clínica. Los antidepresivos incluyen compuestos de diferentes clases incluyendo, por ejemplo, inhibidores de la recaptación de serotonina específicos (por ejemplo, fluoxetina), antidepresivos tricíclicos (por ejemplo, desipramina) e inhibidores de la recaptación de dopamina (por ejemplo, bupropión). Típicamente, los antidepresivos de diferentes clases ejercen sus efectos terapéuticos mediante diferentes rutas bioquímicas. Con frecuencia estas rutas bioquímicas se solapan o se cruzan. Las enfermedades o trastornos adicionales tratados con frecuencia con antidepresivos incluyen dolor crónico, trastornos de ansiedad y sofocaciones.

Un “agonista” se refiere a un agente que se une con un polipéptido o polinucleótido, estimula, aumenta, activa, facilita, potencia la activación, sensibiliza o regula positivamente la actividad o expresión de un polipéptido o polinucleótido.

Un “antagonista” se refiere a un agente que inhibe la expresión de un polipéptido o polinucleótido o se une con, bloquea parcial o totalmente la estimulación, reduce, previene, retarda la activación, inactiva, desensibiliza o regula negativamente la actividad de un polipéptido o polinucleótido.

Los “inhibidores”, “activadores” y “moduladores” de la expresión o de la actividad se usan para hacer referencia a moléculas inhibitoras, activadoras o moduladoras, respectivamente, identificadas usando ensayos *in vitro* e *in vivo* para expresión o actividad, por ejemplo, ligandos, agonistas, antagonistas y sus homólogos y miméticos. El término “modulador” incluye inhibidores y activadores. Los inhibidores son agentes que, por ejemplo, inhiben la expresión de un polipéptido o polinucleótido o se unen con, bloquean parcial o totalmente la estimulación o actividad enzimática, reducen, previenen, retardan la activación, inactivan, desensibilizan o regulan negativamente la actividad de un polipéptido o polinucleótido, por ejemplo, antagonistas. Los activadores son agentes que, por ejemplo, inducen o activan la expresión de un polipéptido o polinucleótido o se unen con, estimulan, aumentan, abren, activan, facilitan, potencian la activación o actividad enzimática, sensibilizan o regulan positivamente la actividad de un polipéptido o polinucleótido, por ejemplo, agonistas. Los moduladores incluyen ligandos de origen natural y sintéticos, antagonistas, agonistas, moléculas químicas pequeñas y similares. Los ensayos para identificar inhibidores y activadores incluyen, por ejemplo, aplicación de compuestos moduladores potenciales a células, en presencia o ausencia de un polipéptido o polinucleótido y determinar después los efectos funcionales en una actividad polipeptídica o polinucleotídica. Las muestras o ensayos que comprenden un polipéptido o polinucleótido que se trata con un activador, inhibidor o modulador potencial se comparan con muestras de control sin el inhibidor, activador o modulador para examinar el alcance del efecto. Se asigna a muestras de control (no tratadas con moduladores) un valor de actividad relativo del 100 %. Se consigue inhibición cuando el valor de actividad de un polipéptido o polinucleótido en relación con el control es aproximadamente 80 %, opcionalmente 50 % o 25-1 %. Se consigue activación cuando el valor de actividad de un polipéptido o polinucleótido en relación con el control es 110 %, opcionalmente 150 %, opcionalmente 200-500 % o 1000-3000 % mayor.

La expresión “compuesto de ensayo” o “candidato farmacológico” o “modulador” o equivalentes gramaticales como se usa en el presente documento describe cualquier molécula, bien de origen natural o sintética, por ejemplo, proteína, oligopéptido (por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 aminoácidos de longitud, preferentemente de aproximadamente 10 a 20 o 12 a 18 aminoácidos de longitud, preferentemente 12, 15 o 18

aminoácidos de longitud), molécula orgánica pequeña, polisacárido, lípido, ácido graso, polinucleótido, ARNi, oligonucleótido, etc. El compuesto de ensayo puede estar en forma de una biblioteca de compuestos de ensayo, tal como una biblioteca combinatoria o aleatoria que proporciona un suficiente intervalo de diversidad. Los compuestos de ensayo se unen opcionalmente con un compañero de fusión, por ejemplo, compuestos de dirección, compuestos de rescate, compuestos de dimerización, compuestos de estabilización, compuestos dirigibles y otros restos funcionales. Convencionalmente, se generan nuevas entidades químicas con propiedades útiles identificando un compuesto de ensayo (denominado un "compuesto candidato") con alguna propiedad o actividad deseable, por ejemplo, actividad inhibitoria, creando variantes del compuesto candidato y evaluando la propiedad y actividad de esos compuestos variantes. Con frecuencia, se emplean métodos de exploración de alto rendimiento (HTS) para dicho análisis.

La expresión "Tabla N^o" cuando se usa en el presente documento incluye todas las subtablas de la Tabla a la que se hace referencia (por ejemplo, "Tabla 1" se refiere a Tabla 1A, 1B y Tabla 1C) a no ser que se indique de otro modo.

"Determinar el efecto funcional" se refiere a ensayar con respecto a un compuesto que aumente o reduzca un parámetro que esté directa o indirectamente bajo la influencia de un polinucleótido o polipéptido (tal como un polinucleótido de la FIGURA 1, FIGURAS 5-8, o Tablas 1-4, o un polipéptido codificado por un gen de la FIGURA 1, FIGURAS 5-8, o Tablas 1-4), por ejemplo, medir los efectos físicos y químicos o fenotípicos. Dichos efectos funcionales pueden medirse por cualquier medio conocido por los expertos en la materia, por ejemplo, cambios en las propiedades espectroscópicas (por ejemplo, fluorescencia, absorbancia, índice refractario), hidrodinámicas (por ejemplo, forma), cromatográficas o de solubilidad para la proteína; medir marcadores inducibles o activación de la transcripción de la proteína; medir la actividad de unión o ensayos de unión, por ejemplo unión con anticuerpos; medir los cambios en la afinidad de unión al ligando; medición del flujo de entrada de calcio; medición de la acumulación de un producto enzimático de un polipéptido o agotamiento de un sustrato; medición de cambios en los niveles de proteína de un polipéptido; medición de la estabilidad del ARN; unión con proteína G; fosforilación o desfosforilación de GPCR; transducción de señal, por ejemplo interacciones de receptor-ligando, concentraciones de segundo mensajero (por ejemplo, AMPc, IP3 o Ca²⁺ intracelular); identificación de expresión génica indicadora o corriente abajo (CAT, luciferasa, β-gal, GFP y similares), por ejemplo, mediante quimioluminiscencia, fluorescencia, reacciones colorimétricas, unión de anticuerpos, marcadores inducibles y ensayos de unión a ligando.

Las muestras o ensayos que comprenden un ácido nucleico o proteína desvelado en el presente documento que se tratan con un activador, inhibidor o modulador potencial se comparan con muestras de control sin el inhibidor, activador o modulador para examinar el alcance de la inhibición. Se asigna a las muestras de control (no tratadas con inhibidores) un valor de actividad proteica relativa del 100 %. Se consigue inhibición cuando el valor de actividad relativo con respecto al control es de aproximadamente el 80 %, preferentemente 50 %, más preferentemente 25-0 %. Se consigue activación cuando el valor de actividad en relación con el control (no tratado con activadores) es del 110 %, más preferentemente 150 %, más preferentemente 200-500 % (es decir, de dos a cinco veces mayor en relación con el control), más preferentemente 1000-3000 % mayor.

La "muestra biológica" incluye secciones de tejidos tales como muestras de biopsia y autopsia, y secciones congeladas tomadas para fines histológicos. Dichas muestras incluyen sangre, esputo, tejido, células lisadas, biopsia cerebral, células cultivadas, por ejemplo, cultivos primarios, explantes y células transformadas, heces, orina, etc. Se obtiene típicamente una muestra biológica de un organismo eucariota, más preferentemente un mamífero, tal como un primate, por ejemplo, chimpancé o ser humano; vaca; perro; gato; un roedor, por ejemplo, cobaya, rata, ratón; conejo; o un ave; reptil o pez.

Los términos "peptidomimético" y "mimético" se refieren a un compuesto químico sintético que tiene sustancialmente las mismas características estructurales y funcionales de los polinucleótidos, polipéptidos, antagonistas o agonistas desvelados en el presente documento. Se usan habitualmente análogos peptídicos en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido molde. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "miméticos peptídicos" o "peptidomiméticos" (Fauchere, Adv. Drug Res. 15: 29 (1986); Veber y Freidinger TINS p. 392 (1985); y Evans *et al.*, J. Med. Chem. 30: 1229 (1987). Los miméticos peptídicos que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles pueden usarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente o potenciado. En general, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigmático (es decir, un polipéptido que tiene una actividad biológica o farmacológica), tal como un CCX CKR, pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace seleccionado del grupo que consiste en, por ejemplo, -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH- (cis y trans), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂-, y -CH₂SO-. El mimético puede estar compuesto completamente de análogos de aminoácidos sintéticos, no naturales, o es una molécula quimérica de aminoácidos peptídicos parcialmente naturales y análogos parcialmente no naturales de aminoácidos. El mimético también puede incorporar cualquier cantidad de sustituciones conservativas de aminoácidos naturales siempre que dichas sustituciones no alteren sustancialmente también la estructura y/o actividad del mimético. Por ejemplo, una composición mimética es capaz de llevar a cabo las actividades de unión o enzimáticas de un polipéptido o polinucleótido o inhibir o aumentar la actividad enzimática o expresión de un polipéptido o polinucleótido.

El término “gen” significa el segmento de ADN implicado en la producción de una cadena polipeptídica; incluye regiones que preceden y siguen a la región codificante (líder y cola) así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones).

5 El término “aislado”, cuando se aplica a un ácido nucleico o proteína, indica que el ácido nucleico o proteína está esencialmente sin otros componentes celulares con los que se asocia en el estado natural. Preferentemente está en un estado homogéneo aunque puede estar en una solución seca o acuosa. La pureza y homogeneidad se determinan típicamente usando técnicas químicas analíticas tales como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. Una proteína que es la especie predominante presente en una
10 preparación está sustancialmente purificada. En particular, un gen aislado se separa de fases abiertas de lectura que flanquean al gen y codifican una proteína distinta del gen de interés. El término “purificado” indica que un ácido nucleico o proteína da lugar a esencialmente una banda en un gel electroforético. Particularmente, significa que el ácido nucleico o proteína es al menos 85 % puro, más preferentemente al menos 95 % puro, y más preferentemente al menos 99 % puro.

15 La expresión “ácido nucleico” o “polinucleótido” se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma mono o bicatenaria. A no ser que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y se metabolizan de una manera similar a nucleótidos de origen natural. A no ser que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca de forma implícita variantes modificadas de forma conservativa de los mismos (por ejemplo, sustituciones de codones degradados), alelos, ortólogos, SNP y secuencias complementarias así como la secuencia indicada de forma explícita. Específicamente, pueden conseguirse sustituciones de codones degradados generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituyen con restos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer *et al.*,
20 Nucleic Acid Res. 19: 5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, J. Biol. Chem. 260: 2605-2608 (1985); y Cassol *et al.* (1992); Rossolini *et al.*, Mol. Cell. Probes 8: 91-98 (1994)). La expresión ácido nucleico se usa de forma intercambiable con gen, ADNc y ARNm codificado por un gen.

30 Los términos “polipéptido” “péptido” y “proteína” se usan de forma intercambiable en el presente documento para hacer referencia a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural. Como se usa en el presente documento, los términos abarcan cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas de longitud completa (es decir, antígenos), en las que los restos de aminoácidos están
35 unidos por enlaces peptídicos covalentes.

El término “aminoácido” se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que actúan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Son aminoácidos de origen natural los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono α que está unido con un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil sulfonio de metionina. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o cadenas principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. “Miméticos de aminoácidos” se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que actúa de una manera similar a un aminoácido de origen natural.

50 Los aminoácidos pueden indicarse en el presente documento por los símbolos de tres letras habitualmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de IUPAC-IUB. Los nucleótidos, de forma similar, pueden indicarse por sus códigos de una letra habitualmente aceptados.

“Variantes modificadas de forma conservativa” se aplica a secuencias tanto de aminoácidos como de ácido nucleico. Con respecto a secuencias de ácido nucleico particulares, “variantes modificadas de forma conservativa” se refiere a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degradación del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que se especifica una alanina por un codón, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácido nucleico son “variaciones silenciosas”, que son una especie de variaciones modificadas de forma conservativa. Cada secuencia de ácido nucleico en el presente documento que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto en la materia reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es habitualmente el único codón para metionina, y TGG, que es habitualmente el único codón para triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. En consecuencia, cada
65 reacción silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

Con respecto a las secuencias de aminoácidos, un experto en la materia reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que altere, añada o suprima un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de forma conservativa" en la que la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Se conocen bien en la técnica tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Dichas variantes modificadas de forma conservativa son además de y no excluyen las variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos.

Los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí:

- 1) Alanina (A), Glicina (G);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (I), Triptófano (W);
- 7) Serina (S), Treonina (T); y
- 8) Cisteína (C), Metionina (M)

(véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins* (1984)).

El "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias alineadas de forma óptima sobre una ventana de comparación, en la que la parte de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico o el resto de aminoácido idénticos aparecen en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad" en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, 60 % de identidad, opcionalmente 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad sobre una región específica), cuando se comparan y alinean para máxima correspondencia sobre una ventana de comparación, o región designada como se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por alineamiento manual e inspección visual. Se dice entonces que dichas secuencias son "sustancialmente idénticas". Esta definición también se refiere al complemento de una secuencia de ensayo. Opcionalmente, la identidad existe sobre una región que es de al menos aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, o más preferentemente sobre una región que es de 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos de longitud.

Para comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, se introducen secuencias de ensayo y referencia en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan parámetros de programas de algoritmos de secuencia. Pueden usarse parámetros de programa por defecto, o pueden designarse parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula después el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de ensayo en relación con la secuencia de referencia, basándose en los parámetros de programa.

Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, incluye referencia a un segmento de uno cualquiera del número de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste en de 20 a 600, habitualmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más habitualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de alinearse óptimamente las dos secuencias. Se conocen bien en la técnica métodos para alinear secuencias para comparación. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede realizarse, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2: 482c, por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443, por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444, por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o por alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (suplemento de 1995)).

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.* (1977) *Nuc. Acids Res.* 25: 3389-3402, y Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, respectivamente. El software para realizar análisis de BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica. Este algoritmo

implica identificar en primer lugar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden con o satisfacen alguna puntuación de umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de bases de datos. Se denomina T al umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul *et al.*, mencionado anteriormente). Estos aciertos de palabra vecinos iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contengan. Los aciertos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como pueda aumentarse la puntuación de alineamiento acumulada. Las puntuaciones acumuladas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre >0) y N (puntuación de penalización para restos desapareados; siempre <0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulada cae por la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada baja hasta cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se alcanza el final de una de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W , T y X determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, $M=5$, $N=-4$ y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra de 3 y expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915) alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, $M=5$, $N=-4$, y una comparación de ambas hebras.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de menor suma ($P(N)$), que proporciona un indicio de la probabilidad por la que una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría al azar. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de menor suma en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,2, más preferentemente menor de aproximadamente 0,01 y más preferentemente menor de aproximadamente 0,001.

Un indicio de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticos es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo de forma cruzada con los anticuerpos inducidos contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe posteriormente. Por lo tanto, un polipéptido es típicamente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren solamente en sustituciones conservativas. Otro indicio de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se describe posteriormente. Otro indicio más de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que pueden usarse los mismos cebadores para amplificar la secuencia.

La frase "una secuencia de ácido nucleico codificante" se refiere a un ácido nucleico que contiene información de secuencia para un ARN estructural tal como ARNr, un ARNt, o la secuencia de aminoácidos primaria de una proteína o péptido específico, o un sitio de unión para un agente regulador de acción en trans. Esta expresión abarca específicamente codones degradados (es decir, diferentes codones que codifican un único aminoácido) de la secuencia o las secuencias nativas que pueden introducirse para adaptarse a la preferencia codónica en una célula hospedadora específica.

El término "recombinante" cuando se usa en referencia, por ejemplo, a una célula, o ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, el ácido nucleico, la proteína o el vector, se ha modificado por la introducción de un ácido nucleico heterólogo o proteína o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativo, o que la célula deriva de una célula modificada de esta manera. Por lo tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que se expresan de otra manera de forma anómala, se expresan poco o no se expresan en absoluto.

El término "heterólogo" cuando se usa con referencia a partes de un ácido nucleico indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico se produce típicamente de forma recombinante, teniendo dos o más secuencias de genes no relacionados dispuestos para realizar un nuevo ácido nucleico funcional, por ejemplo, un promotor de una fuente y una región codificante de otra fuente. De forma similar, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (por ejemplo, una proteína de fusión).

Un "vector de expresión" es una construcción de ácido nucleico, generada de forma recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido nucleico específicos que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula hospedadora. El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus o fragmento de ácido nucleico. Típicamente, el vector de expresión incluye un ácido nucleico para transcribir unido operativamente a un promotor.

Una persona que está “predispuesta a un trastorno mental” como se usa en el presente documento significa una persona que tiene una inclinación o una mayor probabilidad de desarrollar un trastorno mental en comparación con una persona promedio en la población general.

5 Descripción detallada de la invención

Las pruebas basadas en el análisis de solamente un número restringido de moléculas sugieren una desregulación génica alterada y única que puede estar implicada en la patofisiología del trastorno bipolar (BPD) y trastorno depresivo mayor (MDD) así como en el mecanismo del tratamiento farmacológico para estos trastornos. El reciente desarrollo de tecnología de micromatrices permite una visión exhaustiva de los perfiles de expresión de ARNm de genes específicos, sistemas y rutas de señalización.

I. Introducción

15 Para entender la base genética de los trastornos mentales, se han realizado estudios para investigar los patrones de expresión de genes que se expresan diferencialmente específicamente en el sistema nervioso central de sujetos con trastornos anímicos. En varios estudios, la expresión diferencial y única de genes conocidos y nuevos se determinó consultando muestras de ARN totales purificadas de cerebros post mórtem de pacientes con BP y MDD con Affymetrix Gene Chips® (que contienen matrices de conjuntos de sondas oligonucleotídicas de alta densidad). El principio fundamental es que identificando genes y rutas que se expresan diferencialmente en BP y/o MDD (en relación con sujetos de control sanos), mediante la realización de perfiles de expresión globales de los transcriptomas como anteriormente, se pueden identificar genes que provocan, efectúan o se asocian con la enfermedad, o que interaccionan con fármacos usados para tratar la enfermedad, para su uso en aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.

25 Los Ejemplos proporcionados en el presente documento describen la realización de perfiles de expresión génica de micromatrices de las cortezas prefrontal dorsolateral, cingulada anterior, del hipocampo, del Núcleo Accumbens, de las Amígdalas y cerebelares de pacientes con BPD y MDD. En particular, se desvelan los niveles de expresión de ARNm de genes relacionados con las rutas de FGF y GPCR. También se desvela la detección de variantes de corte y empalme de FGFR2, que también están desreguladas. También se proporcionan genes que están desregulados por litio para el tratamiento específico de trastornos de BP.

35 Se proporcionan métodos para aprovechar la expresión alterada (expresión bien mayor o bien menor como se indica en el presente documento) o expresión diferencial única de los genes de la FIGURA 1, FIGURAS 5-8 o Tablas 1-4 que se observa en regiones cerebrales seleccionadas de pacientes a los que se han diagnosticado trastornos anímicos (por ejemplo, trastorno bipolar y trastorno de depresión mayor) en comparación con individuos normales.

40 Se desvelan métodos para identificar un compuesto útil para el tratamiento de dichos trastornos seleccionando compuestos, por ejemplo, FGF2, NCAM e inhibidores peptídicos del sistema FGF, que modulan el efecto funcional de los productos de traducción o la expresión de los transcritos descritos en el presente documento. La invención también proporciona compuestos para su uso en métodos para tratar pacientes con dichos trastornos mentales.

45 Los antidepresivos pertenecen a diferentes clases, por ejemplo, desipramina, bupropión y fluoxetina, y son en general igualmente eficaces para el tratamiento de depresión clínica, pero actúan por mecanismos diferentes. La eficacia similar de los fármacos para el tratamiento de trastornos anímicos sugiere que actúan mediante una ruta común no identificada en la actualidad. Pueden usarse modelos animales de depresión, incluyendo tratamiento de animales con productos terapéuticos conocidos tales como SSRI, para examinar el modo de acción de los genes proporcionados en el presente documento. El litio es el fármaco elegido para el tratamiento de BP.

50 II. Métodos generales de ácidos nucleicos recombinantes

Pueden aislarse polinucleótidos y clonarse usando métodos recombinantes. Dichos polinucleótidos incluyen, por ejemplo, los enumerados en la FIGURA 1, FIGURAS 5-8 o Tablas 1-4, que pueden usarse, por ejemplo, para expresión proteica o durante la generación de variantes, derivados, casetes de expresión, para controlar la expresión génica, para el aislamiento o detección de secuencias en diferentes especies, para fines de diagnóstico en un paciente, por ejemplo, para detectar mutaciones o para detectar niveles de expresión de ácidos nucleicos o polipéptidos. Las secuencias pueden unirse operativamente con un promotor heterólogo. Los ácidos nucleicos pueden ser de cualquier mamífero, incluyendo, en particular, por ejemplo, un ser humano, un ratón, una rata, un primate, etc.

A. Métodos generales de ácidos nucleicos recombinantes

65 Se cuenta con técnicas rutinarias en el campo de la genética recombinante. Los textos básicos que desvelan los métodos generales incluyen Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3ª ed. 2001); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); y Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, eds., 1994)).

Para ácidos nucleicos, se proporcionan tamaños en kilobases (kb) o pares de bases (pb). Estos son estimaciones derivadas de electroforesis en gel de agarosa o acrilamida, de ácidos nucleicos secuenciados, o de secuencias de ADN publicadas. Para proteínas, los tamaños se proporcionan en kilodalton (kDa) o números de restos de aminoácidos. Los tamaños de proteínas se estiman a partir de la electroforesis en gel, de proteínas secuenciadas, de secuencias de aminoácidos derivadas, o de secuencias proteicas publicadas.

Los oligonucleótidos que no están disponibles en el mercado pueden sintetizarse químicamente de acuerdo con el método de triéster de fosoramidita de fase sólida descrito en primer lugar por Beaucage y Caruthers, *Tetrahedron Letts.* 22: 1859-1862 (1981), usando un sintetizador automático, como se describe en Van Devanter *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 12: 6159-6168 (1984). La purificación de oligonucleótidos es por electroforesis en gel de acrilamida nativo o por HPLC de intercambio aniónico como se describe en Pearson y Reanier, *J. Chrom.* 255: 137-149 (1983).

La secuencia de los genes clonados y oligonucleótidos sintéticos puede verificarse después de clonar usando, por ejemplo, el método de terminación de cadena para secuenciación de moldes bicatenarios de Wallace *et al.*, *Gene* 16: 21-26 (1981).

B. Métodos de clonación para el aislamiento de secuencias de nucleótidos que codifican proteínas deseadas

En general, los ácidos nucleicos que codifican las proteínas objeto se clonan a partir de bibliotecas de secuencia de ADN que se realizan para codificar ADNc o ADN genómico. Las secuencias particulares pueden localizarse hibridando con una sonda oligonucleotídica, cuya secuencia puede derivar de las secuencias de los genes enumerados en la FIGURA 1, FIGURAS 5-8 o Tablas 1-4, que proporcionan una referencia para cebadores de PCR y define regiones adecuadas para aislar sondas específicas. Como alternativa, cuando la secuencia se clona en una biblioteca de expresión, la proteína recombinante expresada puede detectarse de forma inmunológica con antisueros o anticuerpos purificados preparados contra un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por un gen enumerado en la FIGURA 1, FIGURAS 5-8, o Tablas 1-4.

Se conocen bien por los expertos en la materia métodos para realizar y explorar bibliotecas de ADNc y genómicas (véase, por ejemplo, Gubler y Hoffman *Gene* 25: 263-269 (1983); Benton y Davis *Science*, 196: 180-182 (1977); y Sambrook, mencionado anteriormente). Las células cerebrales son un ejemplo de células adecuadas para aislar secuencias de ARN y ADNc.

Brevemente, para realizar la biblioteca de ADNc, debería elegirse una fuente que sea rica en ARNm. El ARNm puede después convertirse en ADNc, ligarse en un vector dominante, y transfectarse en un hospedador recombinante para propagación, exploración y clonación. Para una biblioteca genómica, el ADN se extrae de un tejido adecuado y se corta mecánicamente o se digiere enzimáticamente para producir fragmentos de preferentemente aproximadamente 5-100 kb. Los fragmentos se separan después por centrifugación de gradiente de tamaños no deseados y se construyen en vectores lambda bacteriófagos. Estos vectores y fagos se empaquetan *in vitro*, y los fagos recombinantes se analizan por hibridación en placa. La hibridación de colonias se lleva a cabo como se describe en general en Grunstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 72: 3961-3965 (1975).

Un método alternativo combina el uso de cebadores oligonucleotídicos sintéticos con extensión de polimerasa en un molde de ARNm o ADN. Los cebadores adecuados pueden diseñarse a partir de secuencias específicas. Este método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplifica los ácidos nucleicos que codifican la proteína de interés directamente a partir de ARNm, ADNc, bibliotecas genómicas o bibliotecas de ADN. Pueden incorporarse sitios de endonucleasas de restricción en los cebadores. También pueden ser útiles métodos de reacción en cadena de la polimerasa u otros métodos de amplificación *in vitro*, por ejemplo, para clonar ácidos nucleicos que codifican proteínas específicas y expresan dichas proteínas, para sintetizar ácidos nucleicos que se usarán como sondas para detectar la presencia de ARNm que codifica un polipéptido en muestras fisiológicas, para secuenciación de ácido nucleico, o para otros fines (véase, Patente de Estados Unidos N° 4.683.195 y 4.683.202). Los genes amplificados por una reacción de PCR pueden purificarse a partir de geles de agarosa y clonarse en un vector apropiado.

Los cebadores y sondas apropiados para identificar polinucleótidos de tejidos de mamífero pueden derivarse de las secuencias proporcionadas en el presente documento. Para una visión general de conjunto de PCR, véase, Innis *et al.* *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego (1990).

Pueden usarse oligonucleótidos sintéticos para construir genes. Esto se realiza usando una serie de oligonucleótidos solapantes, habitualmente de 40-120 pb de longitud, que representan las cadenas tanto sentido como antisentido del gen. Estos fragmentos de ADN después se hibridan, se ligan y se clonan.

Un gen que codifica un polipéptido puede clonarse usando vectores intermedios antes de la transformación en células de mamífero para expresión. Estos vectores intermedios son típicamente vectores procariotas o vectores lanzadera. Las proteínas pueden expresarse en procariotas, usando métodos convencionales bien conocidos por los expertos en la materia, o eucariotas como se describen posteriormente.

III. Purificación de proteínas

Pueden purificarse polipéptidos de origen natural o recombinantes para su uso en ensayos funcionales. Pueden purificarse polipéptidos de origen natural, por ejemplo, polipéptidos codificados por genes enumerados en la FIGURA 1, FIGURAS 5-8 o Tablas 1-.4, por ejemplo, de tejido de ratón o humano tal como cerebro o cualquier otra fuente de un ortólogo. Pueden purificarse polipéptidos recombinantes de cualquier sistema de expresión adecuado.

Los polipéptidos pueden purificarse hasta pureza sustancial por técnicas convencionales, incluyendo precipitación selectiva con sustancias tales como sulfato de amonio; cromatografía en columna, métodos de inmunopurificación y otros (véase, por ejemplo, Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice* (1982); Patente de Estados Unidos N° 4.673.641; Ausubel *et al.*, mencionado anteriormente; y Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente).

Pueden emplearse varios procedimientos cuando se purifican polipéptidos recombinantes. Por ejemplo, las proteínas que tienen propiedades de adhesión molecular establecidas pueden fusionarse de forma reversible con polipéptidos. Con el ligando apropiado, los polipéptidos pueden adsorberse de forma selectiva en una columna de purificación y después liberarse de la columna en una forma relativamente pura. La proteína fusionada se retira después por actividad enzimática. Finalmente el polipéptido puede purificarse usando columnas de inmutafinidad.

A. Purificación de proteínas de bacterias recombinantes

Cuando se expresan proteínas recombinantes por las bacterias transformadas en grandes cantidades, típicamente después de inducción del promotor, aunque la expresión puede ser constitutiva, las proteínas pueden formar agregados insolubles. Hay varios protocolos que son adecuados para purificación de cuerpos de inclusión de proteínas. Por ejemplo, la purificación de proteínas agregadas (en lo sucesivo en el presente documento denominados cuerpos de inclusión) típicamente implica la extracción, separación y/o purificación de cuerpos de inclusión mediante la alteración de células bacterianas típicamente, pero sin limitación, por incubación en un tampón de lisozima aproximadamente 100-150 µg/ml y Nonidet P40 0,1 %, un detergente no iónico. La suspensión celular puede molerse usando un triturador Polytron (Brinkman Instruments, Westbury, NY). Como alternativa, las células pueden sonicarse en hielo. Se describen métodos alternativos para lisar bacterias en Ausubel *et al.* y Sambrook *et al.*, ambas mencionadas anteriormente, y resultarán evidentes para los expertos en la materia.

La suspensión celular en general se centrifuga y el sedimento que contienen los cuerpos de inclusión se resuspende en tampón que no disuelve, sino que lava los cuerpos de inclusión, por ejemplo, Tris-HCl 20 mM (pH 7,2), EDTA 1 mM, NaCl 150 mM y Triton-X 100 2%, un detergente no iónico. Puede ser necesario repetir la etapa de lavado para retirar tantos residuos celulares como sea posible. El sedimento restante de cuerpos de inclusión puede resuspenderse en un tampón apropiado (por ejemplo, fosfato sódico 20 mM, pH 6,8, NaCl 150 mM). Otros tampones apropiados resultaron evidentes para los expertos en la materia.

Después de la etapa de lavado, los cuerpos de inclusión se solubilizan por la adición de un disolvente que es tanto un aceptor de hidrógeno fuerte como un donante de hidrógeno fuerte (o una combinación de disolventes que tienen cada uno una de estas propiedades). Las proteínas que han formado los cuerpos de inclusión pueden después renaturalizarse por dilución o diálisis con un tampón compatible. Los disolventes adecuados incluyen, pero sin limitación, urea (de aproximadamente 4 M a aproximadamente 8 M), formamida (al menos aproximadamente 80 %, basándose en volumen/volumen), y clorhidrato de guanidina (de aproximadamente 4 M a aproximadamente 8 M). Algunos disolventes que son capaces de solubilizar las proteínas formadoras de agregados, tales como SDS (dodecil sulfato sódico) y ácido fórmico al 70 %, son inapropiados para su uso en este procedimiento debido a la posibilidad de desnaturalización irreversible de las proteínas, acompañado de una falta de inmunogenicidad y/o actividad. Aunque el clorhidrato de guanidina y agentes similares son desnaturalizantes, esta desnaturalización no es irreversible y puede producirse renaturalización tras la retirada (por diálisis, por ejemplo) o dilución del desnaturalizante, lo que permite la reformación de la proteína de interés inmunológicamente y/o biológicamente activa. Después de la solubilización, la proteína puede separarse de otras proteínas bacterianas por técnicas de separación convencionales.

Como alternativa, es posible purificar proteínas del periplasma bacteriano. Cuando la proteína se exporta al periplasma de la bacteria, la fracción periplásmica de la bacteria puede aislarse por choque osmótico frío además de otros métodos conocidos por los expertos en la materia (véase, Ausubel *et al.*, mencionado anteriormente). Para aislar proteínas recombinantes del periplasma, las células bacterianas se centrifugan para formar un sedimento. El sedimento se resuspende en un tampón que contiene sacarosa al 20 %. Para lisar las células, las bacterias se centrifugan y el sedimento se resuspende en MgSO₄ 5 mM helado y se mantienen en un baño de hielo durante aproximadamente 10 minutos. La suspensión celular se centrifuga y el sobrenadante se decanta y se guarda. Las proteínas recombinantes presentes en el sobrenadante pueden separarse de las proteínas hospedadoras por técnicas de separación convencionales bien conocidas por los expertos en la materia.

B. Técnicas de separación de proteínas convencionales para purificar proteínas

1. Fraccionamiento de solubilidad

5 Con frecuencia como una etapa inicial, y si la mezcla de proteínas es compleja, un fraccionamiento de sal inicial puede separar muchas de las proteínas de células hospedadoras no deseadas (o proteínas derivadas de los medios de cultivo celular) de la proteína de interés recombinante. La sal preferida es sulfato de amonio. El sulfato de amonio precipita proteínas reduciendo eficazmente la cantidad de agua en la mezcla de proteínas. Las proteínas se precipitan después basándose en su solubilidad. Cuanto más hidrófoba sea una proteína, más probablemente precipite a concentraciones de sulfato de amonio menores. Un protocolo típico es añadir sulfato de amonio saturado a una solución de proteínas de modo que la concentración de sulfato de amonio resultante esté entre el 20 y el 30 %. Esto precipitará más proteínas hidrófobas. El precipitado se descarta (a no ser que la proteína de interés sea hidrófoba) y se añade sulfato de amonio al sobrenadante hasta una concentración que se sabe que precipita la proteína de interés. El precipitado se solubiliza después en tampón y la sal en exceso se retira, si es necesario, mediante diálisis o diafiltración. Otros métodos que se basan en la solubilidad de proteínas, tales como precipitación con etanol frío, se conocen bien por los expertos en la materia y pueden usarse para fraccionar mezclas de proteínas complejas.

2. Filtración diferencial por tamaño

20 Basándose en un peso molecular calculado, puede aislarse una proteína de mayor o menor tamaño usando ultrafiltración a través de membranas de diferentes tamaños de poro (por ejemplo, membranas Amicon o Millipore). Como una primera etapa, la mezcla de proteínas se ultrafiltra a través de una membrana con un tamaño de poro que tiene un punto de corte de peso molecular menor que el peso molecular de la proteína de interés. El retenido de la ultrafiltración se ultrafiltra después frente a una membrana con un punto de corte molecular mayor que el peso molecular de la proteína de interés. La proteína recombinante pasará a través de la membrana al filtrado. El filtrado puede después someterse a cromatografía como se describe posteriormente.

3. Cromatografía en columna

30 Las proteínas de interés también pueden separarse de otras proteínas basándose en su tamaño, carga de superficie neta, hidrofobicidad y afinidad por ligandos. Además, pueden conjugarse anticuerpos inducidos contra proteínas con matrices en columna e inmunopurificarse las proteínas. Todos estos métodos se conocen bien en la técnica.

35 Resultará evidente para un experto que pueden realizarse técnicas cromatográficas a cualquier escala y usando equipamiento de muchos fabricantes diferentes (por ejemplo, Pharmacia Biotech).

IV. Exploración respecto a moduladores de polipéptidos y polinucleótidos

40 Los moduladores de polipéptidos o polinucleótidos, es decir agonistas o antagonistas de su actividad o moduladores de la expresión de polipéptidos o polinucleótidos, son útiles para tratar varias enfermedades humanas, incluyendo trastornos anímicos o trastornos psicóticos. La administración de agonistas, antagonistas u otros agentes que modulan la expresión de los polinucleótidos o polipéptidos puede usarse para tratar pacientes con trastornos anímicos o trastornos psicóticos.

A. Métodos de exploración

50 Pueden utilizarse varios protocolos de exploración diferentes para identificar agentes que modulan el nivel de expresión o actividad de polipéptidos y polinucleótidos en células, particularmente células de mamífero, y especialmente células humanas. En términos generales, los métodos de exploración implican explorar una pluralidad de agentes para identificar un agente que module la actividad polipeptídica uniéndose con un polipéptido, modulando la unión del inhibidor con el polipéptido o activando la expresión del polipéptido o polinucleótido, por ejemplo.

1. Ensayos de unión

55 Pueden realizarse exploraciones preliminares explorando con respecto a agentes capaces de unirse con un polipéptido, ya que al menos algunos de los agentes identificados de esta manera son moduladores probables de la actividad polipeptídica. Los ensayos de unión habitualmente implican poner en contacto un polipéptido con uno o más agentes de ensayo y permitir el tiempo suficiente para que la proteína y los agentes de ensayo formen un complejo de unión. Puede detectarse cualquier complejo de unión formado usando cualquiera de varias técnicas analíticas establecidas. Los ensayos de unión de proteínas incluyen, pero sin limitación, métodos que miden la coprecipitación, comigración en geles de poliacrilamida-SDS no desnaturalizantes, y comigración en transferencias de Western (véase, por ejemplo, Bennet y Yamamura, (1985) "Neurotransmitter, Hormone or Drug Receptor Binding Methods", en Neurotransmitter Receptor Binding (Yamamura, H. I., *et al.*, eds.), pp. 61-89. La proteína utilizada en dichos ensayos puede expresarse de forma natural, clonarse o sintetizarse.

2. Actividad catalítica

La actividad catalítica de los polipéptidos puede determinarse midiendo la producción de productos enzimáticos o midiendo el consumo de sustratos. La actividad se refiere a la velocidad de catálisis o a la capacidad del polipéptido para unirse (K_m) con el sustrato o liberar el producto catalítico (K_d).

Se realiza análisis de la actividad de polipéptidos de acuerdo con análisis bioquímicos generales. Dichos ensayos incluyen ensayos basados en células así como ensayos *in vitro* que implican polipéptidos purificados o parcialmente purificados o lisados de células en bruto. Los ensayos implican en general proporcionar una cantidad conocida de sustrato y cuantificar el producto en función del tiempo.

3. Validación

Los agentes que se identifican inicialmente por cualquiera de los métodos de exploración anteriores pueden ensayarse adicionalmente para validar la actividad aparente. Preferentemente dichos estudios se realizan con modelos animales adecuados. El formato básico de dichos métodos implica administrar un compuesto candidato identificado durante una exploración inicial a un animal que actúa como un modelo para seres humanos y después determinar si la expresión o actividad de un polinucleótido o polipéptido está de hecho regulada positivamente. Los modelos animales utilizados en estudios de validación generalmente son mamíferos de cualquier tipo. Los ejemplos específicos de animales adecuados incluyen, pero sin limitación, primates, ratones y ratas. Como se describe en el presente documento, pueden ser útiles modelos que usan administración de productos terapéuticos conocidos.

4. Modelos animales

Los modelos animales de trastornos mentales también encuentran uso en la exploración con respecto a moduladores. Pueden usarse modelos invertebrados tales como modelos de *Drosophila*, explorando moduladores de ortólogos de *Drosophila* de los genes humanos desvelados en el presente documento. La tecnología de animales transgénicos incluyendo tecnología de anulación de genes, por ejemplo como resultado de recombinación homóloga con un vector de dirección génica apropiado, o sobreexpresión génica, dará como resultado la ausencia, reducción o aumento de la expresión de un polinucleótido o polipéptido. La misma tecnología puede aplicarse para realizar células con anulación. Cuando se desee, puede ser necesaria la expresión o anulación específica de tejido de un polinucleótido o polipéptido. Los animales transgénicos generados por dichos métodos encuentran su uso como modelos animales de enfermedad mental y son útiles en la exploración con respecto a moduladores de enfermedad mental.

Pueden prepararse células con anulación y ratones transgénicos mediante la inserción de un gen marcador u otro gen heterólogo en un sitio de gen endógeno en el genoma de ratón mediante recombinación homóloga. Dichos ratones también pueden prepararse sustituyendo un polinucleótido endógeno con una versión mutada del polinucleótido, o mutando un polinucleótido endógeno, por ejemplo, por exposición a carcinógenos.

Para el desarrollo de células madre apropiadas, se introduce una construcción de ADN en los núcleos de células madre embrionarias. Se inyectan células que contienen la lesión genética recién introducida por ingeniería genética en un embrión de ratón hospedadora, que se reimplanta en una hembra receptora. Algunos de estos embriones se desarrollan en ratones quiméricos que poseen células germinales parcialmente derivadas de la línea celular mutante. Por lo tanto, criando los ratones quiméricos es posible obtener una nueva línea de ratones que contienen la lesión genética introducida (véase, por ejemplo, Capecchi *et al.*, Science 244: 1288 (1989)). Pueden derivarse ratones diana quiméricos de acuerdo con Hogan *et al.*, Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) y Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, Robertson, ed., IRL Press, Washington, D. C., (1987).

B. Moduladores de polipéptidos o polinucleótidos

Los moduladores de la presente invención son miméticos peptídicos de NCAM. Los moduladores pueden ser versiones alteradas genéticamente de un polipéptido.

Los métodos de exploración de alto rendimiento implican proporcionar una biblioteca de péptidos o química combinatoria que contiene un gran número de compuestos terapéuticos potenciales (compuestos moduladores o ligandos potenciales). Dichas "bibliotecas química combinatoria" o "bibliotecas de ligando" se exploran después en uno o más ensayos, como se describe en el presente documento, para identificar los miembros de la biblioteca que presentan una actividad característica deseada. Los compuestos identificados de este modo pueden actuar como "compuestos candidatos" convencionales o pueden usarse en sí mismos como productos terapéuticos potenciales o reales.

Una biblioteca química combinatoria es una colección de diversos compuestos químicos generados por síntesis química o síntesis biológica, combinando varios "componentes básicos" químicos tales como reactivos. Por ejemplo, se forma una biblioteca química combinatoria lineal tal como una biblioteca de polipéptidos combinando un conjunto

de componentes básicos químicos (aminoácidos) de todas las maneras posibles con respecto a una longitud de compuesto dada (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto polipeptídico). Pueden sintetizarse millones de compuestos químicos mediante dicha mezcla combinatoria de componentes básicos químicos.

5 Se conoce bien por los expertos en la materia la preparación y exploración de bibliotecas químicas combinatorias. Dichas bibliotecas químicas combinatorias incluyen, pero sin limitación, bibliotecas peptídicas (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos 5.010.175, Furka, *Int. J. Pept. Prot. Res.* 37: 487-493 (1991) y Houghton *et al.*, *Nature* 354: 84-88 (1991)). También pueden usarse otras químicas para generar bibliotecas de diversidad química. Dichas químicas incluyen, pero sin limitación: peptoides (por ejemplo, Publicación de PCT N° WO 91/19735), péptidos codificados (por ejemplo, Publicación de PCT WO 93/20242), bio-oligómeros aleatorios (por ejemplo, Publicación de PCT N° WO 92/00091), benzodiazepinas (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.288.514), diversómeros tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90: 6909-6913 (1993)), polipéptidos vinílicos (Hagihara *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 6568 (1992)), peptidomiméticos no peptídicos con armazón de glucosa (Hirschmann *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 9217-9218 (1992)), síntesis orgánicas análogas de bibliotecas de compuestos pequeños (Chen *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 116: 2661 (1994)), oligocarbamatos (Cho *et al.*, *Science* 261: 1303 (1993)), y/o peptidil fosfonatos (Campbell *et al.*, *J. Org. Chem.* 59: 658 (1994)), bibliotecas de ácido nucleico (véase Ausubel, Berger y Sambrook, todos mencionados anteriormente), bibliotecas de ácidos nucleicos peptídicos (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos 5.539.083), bibliotecas de anticuerpos (véase, por ejemplo, Vaughn *et al.*, *Nature Biotechnology*, 14(3): 309-314 (1996) y documento PCT/US96/10287), bibliotecas de carbohidratos (véase, por ejemplo, Liang *et al.*, *Science*, 274: 1520-1522 (1996) y Patente de Estados Unidos 5.593.853), bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (véase, por ejemplo, benzodiazepinas, Baum C&EN, 18 ene, página 33 (1993); isoprenoides, Patente de Estados Unidos 5.569.588; tiazolidinonas y metatiazanonas, Patente de Estados Unidos 5.549.974; pirrolidinas, Patentes de Estados Unidos 5.525.735 y 5.519.134; compuestos de morfolino, Patente de Estados Unidos 5.506.337; benzodiazepinas, 5.288.514 y similares).

Están disponibles en el mercado dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias (véase, por ejemplo, 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY; Symphony, Rainin, Woburn, MA; 433A Applied Biosystems, Foster City, CA; 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA). Además, numerosas bibliotecas combinatorias están en sí mismas disponibles en el mercado (véase, por ejemplo, ComGenex, Princeton, NJ; Tripos, Inc., St. Louis, MO; 3D Pharmaceuticals, Exton, PA; Martek Biosciences, Columbia, MD, *etc.*).

C. Ensayos de alto rendimiento solubles y de estado sólido

35 En los ensayos de alto rendimiento, es posible explorar hasta varios miles de moduladores o ligandos diferentes en un único día. En particular, cada pocillo de una placa de microtitulación puede usarse para procesar un ensayo separado frente a un modulador potencial seleccionado o, si se van a observar los efectos temporales de concentración o incubación, cada 5-10 pocillos pueden ensayar un único modulador. Por lo tanto, una única placa de microtitulación convencional puede ensayar aproximadamente 100 (por ejemplo, 96) moduladores. Si se usan placas de 40 de 1536 pocillos, entonces puede ensayarse fácilmente una única placa de aproximadamente 100 a aproximadamente 1500 compuestos diferentes. Es posible ensayar varias placas diferentes cada día; son posibles exploraciones de ensayo de hasta aproximadamente 6.000-20.000 compuestos diferentes usando los sistemas integrados. Más recientemente, se han desarrollado enfoques microfluídicos para manipulación de reactivos.

45 La molécula de interés puede unirse con el componente de estado sólido, directa o indirectamente, mediante enlace covalente o no covalente, por ejemplo, mediante un marcador. El marcador puede ser cualquiera de una diversidad de componentes. En general, una molécula que se une con el marcador (un agente de unión al marcador) se fija como soporte sólido, y la molécula marcada de interés se une con el soporte sólido por interacción del marcador y el agente de unión al marcador.

50 Pueden usarse varios marcadores y agentes de unión a marcadores, basándose en interacciones moleculares conocidas bien descritas en la bibliografía. Por ejemplo, cuando un marcador tiene un agente de unión natural, por ejemplo, biotina, proteína A o proteína G, puede usarse junto con agentes de unión a marcadores apropiados (avidina, estreptavidina, neutravidina, la región Fc de una inmunoglobulina, *etc.*). Los anticuerpos para moléculas con agentes de unión naturales tales como biotina también están disponibles ampliamente y son agentes de unión a marcadores apropiados (véase, SIGMA Immunochemicals 1998 catalogue SIGMA, St. Louis MO).

De forma similar, puede usarse cualquier compuesto hapténico o antigénico en combinación con un anticuerpo apropiado para formar un par de marcador/agente de unión a marcador. Están disponibles en el mercado miles de anticuerpos específicos y se describen en la bibliografía muchos anticuerpos adicionales. Por ejemplo, en una configuración habitual, el marcador es un primer anticuerpo y el agente de unión a marcador es un segundo anticuerpo que reconoce el primer anticuerpo. Además de interacciones anticuerpo-antígeno, también son apropiadas las interacciones receptor-ligando como pares de marcador y agente de unión a marcador, tales como agonistas y antagonistas de receptores de membrana celular (por ejemplo, interacciones de receptor celular-ligando tales como transferrina, c-kit, ligandos de receptor viral, receptores de citocinas, receptores de quimiocinas, receptores de interleucinas, receptores de inmunoglobulina y anticuerpos, la familia de cadherina, la familia de

integrina, la familia de selectina y similares; véase, por ejemplo, Pigott y Power, *The Adhesion Molecule Facts Book I* (1993)). De forma similar, toxinas y venenos, epítomos virales, hormonas (por ejemplo, opiáceos, esteroides, etc.), receptores intracelulares (por ejemplo, que median en los efectos de diversos ligandos pequeños, incluyendo esteroides, hormona tiroidea, retinoides y vitamina D; péptidos), fármacos, lectinas, azúcares, ácidos nucleicos (configuraciones poliméricas tanto lineales como cíclicas), oligosacáridos, proteínas, fosfolípidos y anticuerpos pueden interaccionar todos con diversos receptores celulares.

Polímeros sintéticos, tales como poliuretanos, poliésteres, policarbonatos, poliureas, poliamidas, polietiléniminas, poliariensulfuros, polisiloxanos, poliimididas y poliacetatos también pueden formar un marcador o agente de unión a marcador apropiado. Muchos otros pares de marcador/agente de unión a marcador también son útiles en los sistemas de ensayos descritos en el presente documento, como resultará evidente para un experto en la materia tras la revisión de la presente divulgación.

Enlazadores habituales tales como péptidos, poliéteres y similares también pueden actuar como marcadores, e incluyen secuencias polipeptídicas, tales como secuencias poli-Gly de entre aproximadamente 5 y 200 aminoácidos. Dichos enlazadores flexibles se conocen por los expertos en la materia. Por ejemplo, están disponibles enlazadores de poli(etilenglicol) de Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, Alabama. Estos enlazadores tienen opcionalmente enlaces amida, enlaces sulfhidrilo o enlaces heterofuncionales.

Se unen agentes de unión a marcadores con sustratos sólidos usando cualquiera de una diversidad de métodos actualmente disponibles. Los sustratos sólidos habitualmente se derivatizan o funcionalizan exponiendo todo o una parte del sustrato a un reactivo químico que fija un grupo químico a la superficie que es reactiva con una parte del agente de unión a marcador. Por ejemplo, los grupos que son adecuados para unión con una parte de cadena más larga incluirían aminas, grupos hidroxilo, tiol y carboxilo. Pueden usarse aminoalquilsilanos e hidroxialquilsilanos para funcionalizar una diversidad de superficies, tales como superficies de vidrio. La construcción de dichas matrices de biopolímeros de fase sólida se describe bien en la bibliografía (véase, por ejemplo, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2154 (1963) (que describe la síntesis de fase sólida de, por ejemplo, péptidos); Geysen *et al.*, *J. Immun. Meth.* 102: 259-274 (1987) (que describe la síntesis de componentes de fase sólida en puntas); Frank y Doring, *Tetrahedron* 44: 60316040 (1988) (que describe la síntesis de diversas secuencias peptídicas en discos de celulosa); Fodor *et al.*, *Science*, 251: 767-777 (1991); Sheldon *et al.*, *Clinical Chemistry* 39(4): 718-719 (1993); y Kozal *et al.*, *Nature Medicine* 2(7): 753759 (1996) (que describen todos matrices de biopolímeros fijadas en sustratos sólidos)). Los enfoques no químicos para fijar agentes de unión a marcadores con sustratos incluyen otros métodos habituales, tales como calor, reticulación por radiación UV, y similares.

Se proporcionan ensayos *in vitro* para identificar, en un formato de alto rendimiento, compuestos que pueden modular la expresión o actividad de los polinucleótidos o polipéptidos desvelados en el presente documento. Los métodos pueden incluir una reacción de control. Para cada uno de los formatos de ensayo descritos, las reacciones de control "sin modulador" que no incluyen un modulador proporcionan un nivel de fondo de la actividad de unión.

En algunos ensayos será deseable tener controles positivos que aseguren que los componentes de los ensayos actúen de forma apropiada. Al menos dos tipos de controles positivos son apropiados. En primer lugar, puede incubarse un activador conocido de un polinucleótido o polipéptido con una muestra del ensayo, y el aumento resultante en la señal resultante de un aumento del nivel de expresión o la actividad del polinucleótido o polipéptido puede determinarse de acuerdo con los métodos en el presente documento. En segundo lugar, puede añadirse un inhibidor conocido de un polinucleótido o polipéptido, y la reducción resultante en la señal para la expresión o actividad puede detectarse de forma similar.

D. Ensayos basados en ordenador

Otro ensayo más para compuestos que modulan la actividad de un polipéptido o polinucleótido implica diseño de fármaco asistido por ordenador, en el que se usa un sistema informático para generar una estructura tridimensional del polipéptido o polinucleótido basado en la información estructural codificada por su secuencia de aminoácidos o nucleótidos. La secuencia introducida interacciona directa y activamente con un algoritmo preestablecido en un programa informático para producir modelos estructurales secundarios, terciarios y cuaternarios de la molécula. Pueden realizarse análisis similares sobre receptores potenciales o compañeros de unión de los polipéptidos o polinucleótidos. Los modelos de la estructura proteica o de nucleótidos se examinan después para identificar regiones de la estructura que tienen la capacidad de unirse, por ejemplo, con un polipéptido o polinucleótido. Estas regiones se usan después para identificar polipéptidos que se unen con un polipéptido o polinucleótido.

El modelo estructural tridimensional de una proteína se genera introduciendo secuencias de aminoácidos de proteínas de al menos 10 restos de aminoácidos o secuencias de ácido nucleico correspondientes que codifican un receptor potencial en el sistema informático. Las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento representan las secuencias primarias o subsecuencias de las proteínas, que codifican la información estructural de las proteínas. Se introducen al menos 10 restos de una secuencia de aminoácidos (con una secuencia de nucleótidos que codifica 10 aminoácidos) en el sistema informático mediante teclados informáticos, sustratos leíbles por ordenador que incluyen, pero sin limitación, medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, disquetes magnéticos, cintas, cartuchos y chips), medios ópticos (por

ejemplo, CD ROM), información distribuida por sitios de Internet y por RAM. El modelo estructural tridimensional de la proteína se genera después por la interacción de la secuencia de aminoácidos y el sistema informático, usando software conocido por los expertos en la materia.

5 La secuencia de aminoácidos representa una estructura primaria que codifica la información necesaria para formar la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de la proteína de interés. El software se fija en ciertos parámetros codificados por la secuencia primaria para generar el modelo estructural. Estos parámetros se denominan "términos de energía" y principalmente incluyen potenciales electrostáticos, potenciales hidrófobos, superficies accesibles a disolvente y enlaces de hidrógeno. Los términos de energía secundarios incluyen potenciales de van der Waals. Las moléculas biológicas forman estructuras que minimizan los términos de energía de una manera acumulativa. El programa informático usa por lo tanto estos términos codificados por la estructura primaria o secuencia de aminoácidos para crear el modelo estructural secundario.

15 La estructura terciaria de la proteína codificada por la estructura secundaria se forma después basándose en los términos de energía de la estructura secundaria. El usuario en este momento puede introducir variables adicionales tales como si la proteína está unida a membrana o es soluble, su localización en el cuerpo, y su localización celular, por ejemplo, citoplasmática, superficial o nuclear. Estas variables junto con los términos de energía de la estructura secundaria se usan para formar el modelo de la estructura terciaria. En la modelización de la estructura terciaria, el programa informático empareja caras hidrófobas de estructura secundaria con similares, y caras hidrófilas de la estructura secundaria con similares.

25 Una vez que se ha generado la estructura, se identifican regiones de unión a ligando potenciales por el sistema informático. Se generan estructuras tridimensionales para ligandos potenciales introduciendo secuencias de aminoácidos o nucleótidos o fórmulas químicas de compuestos, como se han descrito anteriormente. La estructura tridimensional del ligando potencial se compara después con la de un polipéptido o polinucleótido de la invención para identificar sitios de unión del polipéptido o polinucleótido. La afinidad de unión entre la proteína y los ligandos se determina usando términos de energía para determinar qué ligandos tienen una probabilidad potenciada de unirse con la proteína.

30 También se usan sistemas informáticos para explorar con respecto a mutaciones, variantes polimórficas, alelos y homólogos entre especies de genes que codifican un polipéptido o polinucleótido. Dichas mutaciones pueden asociarse con patologías o rasgos genéticos y pueden usarse para diagnóstico. Como se ha descrito anteriormente, GeneChip™ y tecnología relacionada también puede usarse para explorar con respecto a mutaciones, variantes polimórficas, alelos y homólogos entre especies. Una vez que se han identificado las variantes, pueden usarse ensayos de diagnóstico para identificar pacientes que tienen dichos genes mutados. La identificación del polipéptido o polinucleótido mutado implica recibir la aportación de una primera secuencia de aminoácidos de un polipéptido (o de una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido), por ejemplo, cualquier secuencia de aminoácido que tenga al menos 60 %, opcionalmente al menos 70 % u 85 %, de identidad con la secuencia de aminoácidos de interés, o versiones modificadas de forma conservativa de la misma. La secuencia se introduce en el sistema informático como se ha descrito anteriormente. La primera secuencia de ácido nucleico o aminoácidos se compara después con una segunda secuencia de ácido nucleico o aminoácidos que tiene identidad sustancial con la primera secuencia. La segunda secuencia se introduce en el sistema informático de la manera descrita anteriormente. Una vez que se han comparado la primera y segunda secuencias, se identifican diferencias de nucleótidos o aminoácidos entre las secuencias. Dichas secuencias puede representar diferencias alélicas en diversos polinucleótidos, y mutaciones asociadas con patologías y rasgos genéticos.

V. Administración y composiciones farmacéuticas

50 Puede administrarse moduladores de los polinucleótidos o polipéptidos desvelados en el presente documento (por ejemplo, antagonistas o agonistas, tales como FGF2, NCAM, inhibidores peptídicos del sistema FGF, o ARNip y/o inhibidores antisentido de genes que se sobreexpresan en sujetos con trastornos mentales) directamente a un sujeto mamífero para modulación de la actividad de esas moléculas *in vivo*. La administración es por cualquiera de las vías normalmente usadas para introducir un compuesto modulador en contacto último con el tejido para tratar y se conoce bien por los expertos en la materia. Aunque puede usarse más de una vía para administrar una composición particular, una vía particular puede proporcionar con frecuencia una reacción más inmediata y más eficaz que otra vía.

60 Las enfermedades que pueden tratarse incluyen las siguientes, que incluyen el número de referencia correspondiente de Morrison, DSM-IV Made Easy, 1995: Esquizofrenia, Catatónica, Subcrónica, (295.21); Esquizofrenia, Catatónica, Crónica (295.22); Esquizofrenia, Catatónica, Subcrónica con Agravamiento Agudo (295.23); Esquizofrenia, Catatónica, Crónica con Agravamiento Agudo (295.24); Esquizofrenia, Catatónica, en Remisión (295.55); Esquizofrenia, Catatónica, No especificada (295.20); Esquizofrenia, Desorganizada, Subcrónica (295.11); Esquizofrenia, Desorganizada, Crónica (295.12); Esquizofrenia, Desorganizada, Subcrónica con Agravamiento Agudo (295.13); Esquizofrenia, Desorganizada, Crónica con Agravamiento Agudo (295.14); Esquizofrenia, Desorganizada, en Remisión (295.15); Esquizofrenia, Desorganizada, No especificada (295.10); Esquizofrenia, Paranoide, Subcrónica (295.31); Esquizofrenia, Paranoide, Crónica (295.32); Esquizofrenia,

Paranoide, Subcrónica con Agravamiento Agudo (295.33); Esquizofrenia, Paranoide, Crónica con Agravamiento Agudo (295.34); Esquizofrenia, Paranoide, en Remisión (295.35); Esquizofrenia, Paranoide, No especificada (295.30); Esquizofrenia, Indiferenciada, Subcrónica (295.91); Esquizofrenia, Indiferenciada, Crónica (295.92); Esquizofrenia, Indiferenciada, Subcrónica con Agravamiento Agudo (295.93); Esquizofrenia, Indiferenciada, Crónica con Agravamiento Agudo (295.94); Esquizofrenia, Indiferenciada, en Remisión (295.95); Esquizofrenia, Indiferenciada, No especificada (295.90); Esquizofrenia, Residual, Subcrónica (295.61); Esquizofrenia, Residual, Crónica (295.62); Esquizofrenia, Residual, Subcrónica con Agravamiento Agudo (295.63); Esquizofrenia, Residual, Crónica con Agravamiento Agudo (295.94); Esquizofrenia, Residual, en Remisión (295.65); Esquizofrenia, Residual, No especificada (295.60); Trastorno Delirante (Paranoide) (297.10); Psicosis Reactiva Breve (298.80); Trastorno Esquizofreniforme (295.40); Trastorno Esquizoafectivo (295.70); Trastorno Psicótico Inducido (297.30); Trastornos Psicótico NOS (Psicosis Atípica) (298.90); Trastornos de Personalidad, Paranoide (301.00); Trastornos de Personalidad, Esquizoide (301.20); Trastornos de Personalidad, Esquizotípico (301.22); Trastornos de Personalidad, Antisocial (301.70); Trastornos de Personalidad, Límite (301.83) y trastornos bipolares, trastornos maníacos, hipomaniacos, distímicos o ciclotímicos, trastornos anímicos inducidos por sustancias, depresión mayor, psicosis, incluyendo psicosis paranoide, psicosis catatónica, psicosis delirante, que tiene trastorno esquizoafectivo, y trastorno psicótico inducido por sustancias.

Los moduladores de polinucleótidos o polipéptidos pueden combinarse con otros fármacos útiles para tratar trastornos mentales incluyendo útiles para tratar trastornos anímicos, por ejemplo, esquizofrenia, trastornos bipolares o depresión mayor. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender un modulador de un polipéptido o polinucleótido combinado con al menos uno de los compuestos útiles para tratar esquizofrenia, trastorno bipolar o depresión mayor, por ejemplo, tales como los descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 6.297.262; 6.284.760; 6.284.771; 6.232.326; 6.187.752; 6.117.890; 6.239.162 o 6.166.008.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que se administra, así como por el método particular usado para administrar la composición. En consecuencia, hay una amplia diversidad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas de la presente invención (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a ed. 1985)).

Los moduladores (por ejemplo, agonistas o antagonistas) de la expresión o actividad del polipéptido o polinucleótido, solos o en combinación con otros componentes adecuados, puede componerse en formulaciones de aerosol (es decir, puede "nebulizarse") para administrar mediante inhalación o en composiciones útiles para inyección. Las formulaciones de aerosol pueden colocarse en propulsores aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

Las formulaciones adecuadas para administración incluyen soluciones acuosas y no acuosas, soluciones estériles isotónicas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. En la práctica de la presente invención, pueden administrarse composiciones, por ejemplo, por vía oral, por vía nasal, por vía tópica, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal o por vía intratecal. Las formulaciones de compuestos pueden presentarse en recipientes sellados de dosis unitaria o multidosis, tales como ampollas y frascos. Las soluciones y suspensiones pueden prepararse a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo anteriormente descrito. Los moduladores también pueden administrarse como parte de un alimento o fármaco preparado.

La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, debería ser suficiente para efectuar una respuesta beneficiosa en el sujeto a lo largo del tiempo. El nivel de dosis óptimo para cualquier paciente dependerá de una diversidad de factores incluyendo la eficacia del modulador específico empleado, la edad, el peso corporal, la actividad física y la dieta del paciente, en una posible combinación con otros fármacos, y de la gravedad del trastorno mental. El tamaño de la dosis también se determinará por la existencia, naturaleza y alcance de cualquier efecto secundario adverso que acompañe a la administración de un compuesto particular o vector en un sujeto particular.

Al determinar la cantidad eficaz del modulador para administrar un médico puede evaluar los niveles en plasma en circulación del modulador, la toxicidad del modulador y la producción de anticuerpos antimoduladores. En general, la dosis equivalente de un modulador es de aproximadamente 1 ng/kg a 10 mg/kg para un sujeto típico.

Para la administración, pueden administrarse moduladores de la presente invención a una tasa determinada por la DL-50 del modulador, y los efectos secundarios del modulador a diversas concentraciones, como se aplica a la masa y salud general del sujeto. La administración puede realizarse mediante dosis individuales o divididas.

Ejemplo 1: Expresión diferencial de genes asociados con el suicidio en sujetos tanto BP como MDD

Estudios previos han investigado genes asociados con trastornos anímicos y tendencias suicidas, usando micromatrices y PCR para analizar la expresión génica (Sibille *et al.*, 2004; Yanagi M, *et al.*, J Hum Genet., 50(4):

210-6(2005)). Ninguna investigación, sin embargo, usó un análisis riguroso del suicidio en comparación con el trastorno anímico y el suicidio comparado con controles para detectar genes que podrían ser más representativos de suicidio. Este Ejemplo describe perfiles de expresión génica de micromatrices en la amígdala, corteza cingulada anterior y cerebelo en cerebros post mórtem de pacientes con BPD y MDD que cometieron suicidio, centrándose en los niveles de expresión de ARNm de las moléculas que regulan la materia blanca, oligodendrocitos, mielina y otras rutas. Los genes identificados en el presente documento pueden usarse como biomarcadores para detectar y tratar la conducta suicida.

Los genes se descubrieron seleccionando sujetos procesados en microplacas U133P con calidad de ARNm > 1,4, pH > 6,6 y AFS=0. Las víctimas de suicidio con un trastorno anímico (n = 14) se compararon con personas no víctimas de suicidio que padecían un trastorno anímico (n=9) y controles (n =27). La edad y el pH fueron diferentes entre los grupos, y se introdujeron como una covariante en ANCOVA. Se descubrió que la expresión génica de mielina y oligodendrocitos estaba desregulada en sujetos con trastorno anímico suicida en comparación con sujetos con trastorno anímico no suicida o controles en las amígdalas. La lista completa de genes identificados que estaban desregulados en pacientes suicidas frente a pacientes con trastorno anímico no suicida se presenta en la Tabla 1A. La Tabla 1B enumera genes que estaban desregulados en pacientes con MDD suicidas frente a pacientes con MDD no suicidas, y los genes que estaban desregulados en pacientes con MDD suicidas frente a pacientes de control.

Se realizó un estudio similar usando cerebros de sujetos con MDD que se sabía que eran drogadictos y comparando la expresión génica en esos sujetos con la expresión génica en sujetos con MDD que no eran drogadictos, así como con sujetos de control. La Tabla 1C es una lista de genes que se ha mostrado que están desregulados en pacientes con MDD drogadictos frente a pacientes con MDD que no eran drogadictos. La Tabla 1C también muestra genes que estaban desregulados en pacientes con MDD drogadictos frente a sujetos de control.

En un estudio relacionado, se usaron dos cohortes para estudiar y comparar la expresión génica en pacientes con BP y MDD frente a pacientes normales. La cohorte A consistió en 7 controles, 6 pacientes con BPD, y 9 pacientes con MDD. La cohorte B incluyó 7 controles y 5 pacientes con MDD. Los sujetos se seleccionaron para evitar posibles efectos de confusión de acontecimientos agónicos, pH tisular, integridad del ARN, sexo y edad. Los resultados, resumidos en las Figuras 5-8, muestran que se observaron cambios en los niveles de expresión de GPCR y moléculas que regulaban las rutas de señalización de AMPc y fosfatidilinositol en las cortezas cerebrales, especialmente en la corteza cingulada anterior, de pacientes con trastornos anímicos. Los niveles de expresión de moléculas que actuaban como reguladores negativos en la señalización de AMPc aumentaron en BPD, mientras que las moléculas que activaban la señalización de AMPc no se alteraban. En contraste con los cambios en BPD, las moléculas que suprimían la señalización de AMPc se redujeron en MDD. Los niveles de expresión de inositol polifosfato-1-fosfatasa y fosfatidilinositol 3-quinasa se alteraron en BPD, mientras que la proteína quinasa C beta-1, receptor de inositol trifosfato-1, inositol polifosfato-5-fosfatasa aumentaron en MDD. Dos genes de GPCR huérfanos, GPRC5B y GPR37, mostraron uniformemente reducciones significativas en las tres cortezas en MDD, y aumentos significativos en la corteza cingulada anterior de BPD. La medición de las diferencias en la expresión de los genes identificados de las Figuras 5-8 es una herramienta útil para determinar si un sujeto padece una enfermedad mental particular, particularmente BP o MDD.

Ejemplo 2: Identificación de genes sensibles a litio que están desregulados en BPD

Este Ejemplo demuestra que ciertos genes en primates no humanos (mono macaco rhesus sano) se expresan diferencialmente en respuesta a tratamiento con el fármaco estabilizador anímico, litio (Li), el fármaco elegido para el tratamiento de BP. Se llevó a cabo perfil de expresión génica en la corteza cingulada anterior (AnCg), corteza prefrontal dorsolateral (DLPFC), hipocampo (HC) y amígdala (AMY) de monos macacos rhesus, usando los métodos de detección de expresión génica descritos en el presente documento, y en comparación con los resultados post mórtem humanos descritos anteriormente. La Tabla 2A muestra los genes sensibles a litio que se habían identificado previamente en la bibliografía y que se confirmaron por la presente investigación. La Tabla 2B muestra genes que se acaban de identificar como sensibles a litio en primates y que también están desregulados en sujetos humanos con trastorno bipolar.

Ejemplo 3: Diferencias de variantes de FGFR2 en trastornos anímicos.

Se ha descubierto uniformemente que el transcrito del receptor de FGF 2 (FGFR2) está reducido en varias áreas del cerebro de sujetos deprimidos (véase, por ejemplo, Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 10/701.263, presentado el 3 de noviembre de 2003, publicada como Publicación de Patente de Estados Unidos Nº 20040152111-A1 el 5 de agosto de 2004). El gen de FGFR2 humano contiene 19 exones y produce hasta 13 variantes de corte y empalme. Estas variantes quedan en tres clases funcionales principales: en primer lugar, las variantes que carecen del dominio transmembrana y tirosina quinasa que se cree que son receptores solubles; en segundo lugar, variantes que contienen el dominio de tipo Ig IIIc codificado por el exón 9; y en tercer lugar, variantes que contienen el dominio de tipo Ig IIIb codificado por el exón 8. El dominio de tipo Ig III confiere especificidad de ligando y por lo tanto estas dos últimas variantes tienen perfiles farmacológicos diferentes basándose en su uso del dominio IIIc o IIIb. Este Ejemplo describe mediciones basadas en PCR de exones presentes en ARN total derivado de la corteza humana (dorsolateral prefrontal y cingulada anterior) y el hipocampo.

Métodos Se obtuvieron cerebros humanos post mórtem y se diseccionaron como se ha descrito previamente (Evans *et al.*, PNAS 101(43): 15506-11 (2004)). Se extrajo ARN para análisis de micromatrices y RT-PCR semicuantitativa de regiones cerebrales discretas usando Trizol.

5 Se generaron datos de micromatrices con una combinación de microplacas Affymetrix 133A anti 133plus 2.0 y se analizó usando un archivo de mapeo de sondas adaptadas basándose en una generación reciente de la base de datos RefSeq (<http://brainarray.mbni.med.umich.edu/Brainarray/Database/CustomCDF>). Cada muestra biológica se procesó independientemente en dos sitios (Universidad de California-Irvine, Universidad de California-Davis o la Universidad de Michigan). Las señales de conjuntos de sondas se calcularon usando RMA (Bolstad *et al.*, Bioinformatics 19(2): 185-93 (2003)) y se realizaron comparaciones estadísticas después de centrar la mediana de los datos de RMA por separado para cada bloque técnico (entre cohortes y sitios independientes). Se construyeron p valores a partir de ensayo de t entre casos y controles. La composición de sujeto final incluía 13 sujetos depresivos mayores y 16 controles. Todos estaban libres de factores agónicos, tenían mediciones de pH de cerebro mayores de 6,8 y cumplían otras medidas de calidad.

15 Se generaron datos de RT-PCR semicuantitativa con cebadores específicos de exón y el método de SVBR Green usando el BioRad iCycler. Todos los pares de cebadores usados en reacciones cuantitativas se ensayaron con respecto a eficacia y se determinó que estaban a aproximadamente 100 %. Se seleccionaron los valores de umbral de ciclo (Ct) dentro del intervalo lineal de amplificación y se normalizaron hasta concentración de ADNc total como se determinó por el ensayo PicoGreen (Molecular Probes). Se eliminó ADN genómico contaminante con DNasa antes de la síntesis de ADNc con una mezcla de hexámeros aleatorios y cebadores poli T y se confirmó la eliminación amplificando fragmentos entre intrones más pequeños (del exón 3 al exón 4 y del exón 7 al exón 10). No se detectaron amplicones que contuvieran intrones.

25 **Resultados** Los resultados del estudio anteriormente mencionado se resumen parcialmente en la FIGURA 1, que muestra la expresión diferencial de los exones 5 y 11 en sujetos deprimidos frente a control. Más específicamente, los resultados muestran que la relación de expresión del exón 5 frente al exón 11 está significativamente reducida en pacientes con MDD, particularmente en la región DLPFC. Un análisis similar de la expresión del exón 9 (que codifica la variante IIIc) mostró que la expresión del exón 9 en las regiones AnCg y HC se reducía en sujetos con MDD.

30 **Ejemplo 4: Efecto de la inyección de FGF2, péptido de FGL (NCAM), e inhibidor peptídico de receptores de FGF en el comportamiento de roedores**

35 **A. Microinyección de FGF2**

Este conjunto de experimentos muestra efectos significativos después de la microinyección de FGF2, usando tanto el ensayo de natación forzada (FST) como el laberinto elevado más (EPM) para evaluar la depresión en los sujetos animales. En el FST, los animales a los que se inyectó FGF2 ($n = 12$) mostraron más natación ($t[23] = 2,20, p < 0,05$) y menos inmovilidad ($t[23] = 2,88, p < 0,01$) que los controles ($n = 13$). Esto es indicativo de menor comportamiento de tipo depresivo en animales con FGF2. Sin embargo, en el EPM, los animales a los que se inyectó FGF2 pasaron significativamente más tiempo en los brazos cerrados ($t[13] = 3,18, p < 0,01$) y menos tiempo en los brazos abiertos ($t[13] = 2,46, p < 0,05$). Estos resultados (FIGURA 2) muestran que el comportamiento de tipo ansiedad aumenta después de una inyección aguda de FGF2.

45 **B. Microinyección de NCAM (péptido FGL)**

Este conjunto de experimentos muestra un efecto significativo en el estado anímico animal en el ensayo de natación forzada después de la administración de NCAM (secuencia de aminoácidos = EVYVVAENQQGKSKA; véase FIGURA 3). Aquí, los animales a los que se inyectó NCAM ($n = 13$) mostraron menos inmovilidad ($t[24] = 2,13, p < 0,05$) que los controles ($n = 13$). De nuevo, este es un índice de menor comportamiento de tipo depresivo. Esto también está en la misma dirección que los datos de FGF2, coherentes con el hecho de que tanto FGF2 como NCAM interactúan con el receptor de FGF. De forma similar, los animales a los que se inyectó NCAM pasaron más tiempo (aunque no significativamente más tiempo) en los brazos cerrados y menos tiempo en los brazos abiertos, lo que es coherente con comportamiento de tipo ansiedad aumentado. Los animales a los que se inyectó NCAM también pasaron significativamente menos tiempo en el cuadrante central ($t[18] = 2,40, p < 0,05$).

60 **C. Microinyección de un inhibidor peptídico de FGFR**

Este conjunto de experimentos muestra un efecto significativo en el estado anímico animal, usando tanto el ensayo de natación forzada como el ensayo de laberinto elevado más, después de inyección con un inhibidor peptídico del sistema FGF (secuencia de aminoácidos = HFKDPKRLY). Los resultados se muestran en la FIGURA 4. En el FST, los animales a los que se inyectó el inhibidor ($n=7$) mostraron significativamente menos escalada ($t[12] = 2,06, p < 0,05$), menos natación ($t[12] = 1,92, p < 0,05$) y más inmovilidad ($t[12] = 3,58, p < 0,005$) que los controles ($n = 7$). Estos resultados muestran que la inhibición del sistema FGF puede dar como resultado un aumento del comportamiento de tipo depresivo. Estos resultados confirman y avanzan los resultados de los conjuntos de datos previos y son coherentes con estudios del tejido post mórtem de individuos con depresión mayor. Los animales a los

que se inyectó inhibidor también han pasado significativamente más tiempo en el cuadrante central del EPM ($T[7,7] = 35,0, p = 0,03$). Aunque los mismos animales pasaron menos tiempo en los brazos cerrados e igual tiempo en los brazos abiertos, lo que es indicativo de comportamiento del tipo ansiedad aumentado, los periodos de tiempo pasados no eran significativamente diferentes. Estas observaciones son no obstante coherentes con las conclusiones extraídas de los estudios de microinyección anteriores.

D. La administración de FGF2 induce cambios a largo plazo en la expresión génica del hipocampo

Métodos. Se inyectó a ratas Sprague-Dawley vehículo o FGF2 (20 ng/g, s.c.) el día después del nacimiento y se sacrificaron después de ensayarse con laberinto de agua de Morris como adultos. Los inventores evaluaron los cambios en la expresión génica usando tanto un enfoque de candidato como un enfoque de descubrimiento génico con microdissección de captura por láser del giro dentado seguido de análisis de micromatrices.

Resultados. Las ratas a las que se inyectó FGF2 rindieron significativamente mejor en los ensayos de aprendizaje y memoria (por ejemplo, 20 segundos de promedio para encontrar una plataforma oculta en el ensayo de laberinto de Agua de Morris frente a 25 segundos de promedio para ratas a las que se inyectó vehículo). También se descubrieron varios genes asociados con la plasticidad neural alterados en las ratas adultas, como se muestra por ensayos de expresión de ARN e histoquímicos. Por ejemplo, la expresión de GAP-43, Rgs4, trkB, CCK, SST y Vgfwas aumentó, mientras que la expresión de NCAM se redujo.

Ejemplo 5: Efecto ansiolítico de FGF2 administrado de forma crónica

Los trastornos de ansiedad tienen una alta comorbilidad con otros trastornos neuropsiquiátricos incluyendo Depresión Mayor (MD). Este Ejemplo muestra que la administración de FGF2 crónica tiene un efecto ansiolítico en ratas. Las ratas se colocaron en grupos de "alta ansiedad" (LR) o "baja ansiedad" (HR) basándose en su comportamiento en una diversidad de ensayos motores y conductuales. Se administró a ambos grupos de animales FGF2 (5 ng/g) o vehículo por inyección intraperitoneal cada 48 horas durante 3 semanas. Un día después de la última inyección de FGF2, se ensayó a todos los animales en el ensayo de ansiedad de laberinto elevado más (EPM) y luz-oscuridad (LD).

El aparato para el ensayo de EPM se construye de Plexiglás negro con cuatro brazos abiertos elevados (70 cm desde el suelo, 45 cm de longitud y 12 cm de anchura). Se proporciona iluminación por un lámpara de mesa de 40 vatios frente a una pared y colocada detrás de uno de los brazos cerrados. Los científicos ponen al animal dentro del sistema. Los animales que están menos ansiosos pasan más tiempo en los brazos abiertos mientras que los animales que están más ansiosos pasan menos tiempo en los brazos abiertos.

El ensayo de LD se realiza en una caja lanzadera de Plexiglás de 30 x 60 x 30 cm con una cubierta translúcida. Cada caja se divide en dos compartimentos del mismo tamaño por una pared y una puerta abierta de 12 cm de anchura. Un compartimento está pintado de blanco e iluminado de forma brillante, y el otro está pintado de negro e iluminado de forma muy tenue. El tiempo que cada rata pasa en cada compartimento se controla por filas de cinco células fotoeléctricas localizadas 2,5 cm por encima del suelo de rejilla de cada compartimento. Los animales que están menos ansiosos pasan más tiempo en el compartimento luminoso.

Los resultados muestran que los animales que recibieron FGF2 administrado de forma crónica están menos ansiosos que los animales que reciben vehículo (FIGURA 9, parte superior). Los efectos reductores de la ansiedad de FGF2 están claramente más pronunciados en ratas que son de forma innata más ansiosas (LR) antes del régimen de FGF2 (FIGURA 9, parte superior).

Para entender más la relación entre la expresión de FGF2 y la ansiedad, se midió la expresión de FGF2 en la región de CA-2 del hipocampo de cerebros de rata tomados de ratas que mostraron diversos niveles de ansiedad (como se mide por el ensayo de EPM). Los resultados (FIGURA 10) muestran que los niveles de FGF2 están relacionados de forma inversa con la ansiedad, es decir, mayores niveles de expresión de FGF2 innata en ratas se correlaciona con menores niveles de ansiedad.

Tomado en su conjunto, el Ejemplo muestra que la administración de FGF2 crónica es útil para aliviar síntomas de ansiedad en animales ansiosos y en sujetos que padecen trastornos tales como MDD que se asocian con ansiedad. Los datos también muestran que la detección de los niveles de FGF2 es útil para diagnosticar la ansiedad o caracterizar trastornos asociados con la ansiedad, tales como Trastorno de Depresión Mayor.

Ejemplo 6: Regulación diferencial de las variantes de corte y empalme de FGFR asociadas con tensión crónica

En el SNC del adulto, el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2) y el receptor de factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR3) se distribuyen de forma diferencial. El ARNm de estos receptores se somete a corte y empalme alternativo en los exones que codifican el extremo carboxilo terminal del dominio de tipo Ig III. Este corte y empalme de ARNm mutuamente excluyente produce dos isoformas de FGFR2 y FGFR3 con perfiles de

unión a ligando significativamente diferentes: una isoforma que expresa el exón IIIb (FGFR2b/FGFR3b) y una isoforma que expresa el exón IIIc (FGFR2c/FGFR3c). La selección de exones es estrictamente dependiente de tejido durante el desarrollo con exón IIIb expresado en linajes epiteliales y el exón IIIc expresado en linajes mesenquimales. Sin embargo, se han inducido cambios de IIIb a IIIc dependientes de ciclo celular, *in vitro* por la adición exógena de FGF1 y FGF2. Este Ejemplo muestra que la tensión crónica induce una reducción en la relación de expresión de variante de corte y empalme IIIc:IIIb del exón de FGFR2.

Animales. Se pidieron veinticuatro ratas macho Sprague-Dawley que pesaban 220-250 g de Charles River (Wilmington, MA) y permanecieron sin perturbaciones durante una semana para aclimatarse a las condiciones de alojamiento. Los animales se alojaron en pares en un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad (encendido de luces a las 6:00 A.M.) con agua y alimentos disponibles a voluntad. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de NIH y el Comité Universitario sobre el Uso y Cuidado de Animales.

Tratamientos con inyección de FGF2 y condiciones de tensión impredecible crónica (CUS). Se administró a la mitad de las ratas (n = 12) vehículo (PBS 0,1 M con albúmina de suero bovino 100 µg/ml), y a la otra mitad (n = 12) se les administró FGF2 humano recombinante disuelto en vehículo en dosificaciones de 5 ng/g (Sigma, St. Louis, MO) cada 48 horas durante tres semanas. Todos los tratamientos se inyectaron por vía intraperitoneal. Durante el mismo periodo de tres semanas que los tratamientos de FGF2, el grupo de vehículo se manipuló (n = 6) o se expuso a CUS (n = 6). De forma similar, el grupo al que se inyectó FGF2 se manipuló (n = 6) o se expuso a CUS (n = 6). Los animales se expusieron a los siguientes agentes de tensión impredecible crónica (descritos en Isgor *et al.* (2004)): éter (30 s), frío (2 h), ruido (15 m), aislamiento (24 h) o inmovilización (2 h). Los agentes de tensión se aplicaron aleatoriamente para evitar la habituación; las sesiones se realizaban una vez cada día por la mañana o por la tarde. El diseño de 2x2 (condición por tratamiento) dividió a los sujetos en grupos sin tensión/vehículo (NS/V), sin tensión/inyección de FGF2 (NS/F), con tensión/vehículo (S/V) y con tensión/inyección de FGF2 (S/F).

Ensayo de natación forzada. Para ensayar con respecto a posibles efectos de la inyección de FGF2 en el comportamiento antidepresivo para otros estudios, todos los animales se sometieron a ensayo de natación forzada de acuerdo con Lucki (1997) 24 h después de la terminación de los tratamientos de FGF2 y condiciones de CUS.

Cerebros. Las ratas se sacrificaron por la facultad por decapitación tres días después de terminar los ensayos de natación forzada. Los cerebros se retiraron después y se congelaron instantáneamente en isopentano a -80 °C.

Extracción de ARN total. Se realizaron disecciones generales en la corteza frontal de todos los cerebros. Se ejecutó extracción de ARN total siguiendo las instrucciones de los fabricantes de los reactivos. Los tejidos se homogeneizaron en TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA; fenol monofásico y guanidina isotiocianato). La separación de fases y precipitación de ARN se llevaron a cabo con cloroformo y 2-propanol seguido de centrifugación. Se purificaron muestras de ARN usando el Mini Kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA), lavando repetidas veces las muestras a través de columnas de centrifugación. Se reconstituyeron muestras de ARN puras con agua sin RNasa, seguido de un análisis de integridad con respecto a picos de ARN ribosómico 28s/18s con el sistema de 2100 Bioanalyzer y LabChip (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Usando las lecturas de concentración del Bioanalyzer, las muestras se normalizaron a 25 ng/µl de ARN total por sujeto y se almacenaron a -80 °C.

Síntesis de ADNc. Se sintetizó ADNc usando el Kit de Síntesis de ADNc iScript (Bio-Rad, Hercules, CA). Las 24 muestras de ARN se transcribieron de forma inversa con Transcriptasa Inversa iScript (Bio-Rad) y se cebaron con cebadores de oligo(dT) y hexámero aleatorio. Se incubaron mezclas de reacción en una unidad de PCR iCycler (Bio-Rad) de acuerdo con el protocolo convencional del fabricante de 40 minutos. Las soluciones de ADNc bicatenario se analizaron después con respecto a calidad y concentración usando el kit de ADNc Quant-iT PicoGreen de Invitrogen. Se prepararon diluciones en serie 10 veces con ADN de reserva 2 µg/ml (intervalo alto) y 50 ng/ml (intervalo bajo) para generar curvas patrón. Las muestras marcadas con fluorescencia se analizaron con un Contador Multimarcador Victor² 1420 (EG&G Wallac, Wellesley, MA) usando el protocolo de Fluoresceína básica. Se normalizaron adicionalmente las muestras de ADNc totales para ajustarse a la regresión lineal de la curva patrón de intervalo alto.

Diseño de cebadores de RT-PCR en tiempo real. Se obtuvieron secuencias para exones de FGFR2 y FGFR3 de rata de la base de datos Entrez Gene del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) y la base de datos de genes Ensembl-Rat (www.ensembl.org). Se analizaron secuencias de exones usando BLAST de nucleótidos y proteínas del NCBI y se emparejaron con sus productos proteicos correspondientes dentro de las estructuras receptoras (FIGURA 11). Se analizaron las secuencias de exones de FGFR2 y FGFR3 con respecto a estructura secundaria usando el servidor web de plegamiento de ácidos nucleicos Mfold. Las regiones en horquilla probables se anotaron para exclusión en el diseño de cebadores. Se generaron secuencias de cebadores optimizadas (FIGURA 11) usando el software basado en web Primer3. Todos los cebadores fueron de 18-22 pares de bases, los amplicones diana de 75-150 pb, y se obtuvieron del servicio de Síntesis de Cebadores a Petición del Cliente de Invitrogen. Las secuencias de cebadores (50 nmol/ml) se validaron y ensayaron con respecto a eficacia con diluciones en serie 5 veces de ADNc agrupado usando detección de iQ SYBR Green en una unidad de RT-PCR en Tiempo Real iCycler iQ (Bio-Rad).

Cuantificación de RT-PCR en tiempo real. Se realizaron reacciones de amplificación por PCR-transcriptasa inversa (RT-PCR) en tiempo real para cuantificar las abundancias relativas de ARNm (transcrito de forma inversa a ADNc) de exones de FGFR2 y R3 seleccionados en cada uno de los cuatro grupos de tratamiento por afección (n=6). Se usó detección de iQ SYBR Green Supermix en un sistema de RT-PCR en Tiempo Real iCycler iQ (Bio-Rad) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, con la excepción de que se prepararon reacciones de 19 μ l en lugar de las de 50 μ l indicadas. Se omitieron los genes de referencia debido a que los grupos de ADNc totales se normalizaron. Las reacciones se procesaron por duplicado, aumentando cada tamaño de grupo a n=12. Se amplificaron dos exones en yuxtaposición por placa para una comparación relativa (se puso énfasis en el exón IIIb y exón IIIc). Los pocillos de reacción se dispusieron para igualar la representación posicional entre todos los grupos. El protocolo de PCR fue el siguiente: inicio en caliente a 95 °C durante 30 s, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 s, hibridación a 60 °C durante 15 s y elongación a 72 °C durante 15 s. La fluorescencia se cuantificó después de cada ciclo, y se realizó análisis de curva de fusión después de amplificación para asegurar reacciones de productos individuales. Se describe la metodología exhaustiva en Kerman *et al.* (2006).

Análisis de datos. Los datos de RT-PCR en tiempo real se produjeron como valores de ciclo umbral (Ct), usando el algoritmo del software iCycler iQ Bio-Rad para calcular los umbrales de fluorescencia óptimos para detección fiable (el valor de fluorescencia medio de los 10 primeros ciclos de PCR más 10 desviaciones típicas). Esencialmente, los valores de Ct menores indican mayores cantidades de ADNc diana inicial debido a que se requieren menos ciclos de PCR para alcanzar los umbrales de fluorescencia. Los valores de Ct para todas las reacciones se agruparon después y se presentaron como medias con errores típicos. Los tamaños de las muestras fueron de 9-12 por grupo debido a la exclusión de valores extremos (>2 DT de la media). Se calcularon los factores de cambio medios usando un método de $2^{\Delta Ct}$ (modificación de la técnica descrita por Livak y Schmittgen (2001)), comparando los valores de Ct medios dentro de una variable (efectos de fragmento dentro de una afección o efectos de la afección dentro de un tratamiento). Este método de $2^{\Delta Ct}$ supone eficacias de cebadores iguales; sin embargo, para los fines de cuantificar la expresión relativa, es aceptable si se validan los cebadores. Se determinaron las relaciones de exón IIIc y exón IIIb calculando los valores de $2^{\Delta Ct}$ individuales entre regiones correspondientes de los dos exones. Las relaciones se clasificaron de forma similar a los grupos del valor Ct y se presentaron como relaciones medias con errores típicos. Se realizaron ensayos de significación estadística para diferencias en los valores de Ct medios de exones múltiples y relaciones IIIc:IIIb individuales usando ANOVA de dos factores y ensayo de t de Student para cada variable de comparación. El nivel de significación se estableció como $p < 0,05$. Todo el análisis estadístico se realizó en Microsoft Excel 2003.

Resultados. La tensión crónica indujo reducciones significativas en la relación de variante de corte y empalme de exón IIIc y exón IIIb (expresión mutuamente excluyente) en el grupo de vehículo ($P < 0,00004$) y en el grupo de inyección de FGF2 ($P < 0,005$) (FIGURA 12). Aunque la expresión del exón IIIc permaneció relativamente mayor que IIIb en todos los grupos, la expresión de IIIb aumentó significativamente con la tensión mientras que la expresión de IIIc cambió solo ligeramente. Por lo tanto, la tensión aumenta la expresión de la variante de IIIb en relación con la variante de IIIc tanto para FGFR2 como para FGFR3. La inyección de FGF2 no alteró la relación IIIc:IIIb significativamente ni en el grupo NS ni en el grupo S ($P > 0,1$), ni afectó significativamente a la magnitud de los cambios de relación IIIc:IIIb provocados por la tensión.

Los resultados muestran que la afinidad de FGFR2 o FGFR3 por ligandos endógenos tales como FGF2 y FGF9 (que se expresan diferencialmente en sujetos con MDD) o por ligandos exógenos (por ejemplo, péptidos farmacológicos y otros compuestos) puede alterarse por tensión. La invención descrita en el presente documento proporciona métodos para detectar variaciones en el corte y empalme de FGFR2 y FGFR3 y modificar el cuidado al sujeto en consecuencia. En otra realización, la invención proporciona métodos para identificar y optimizar productos terapéuticos para tratar la depresión y enfermedades relacionadas.

Ejemplo 7: Regulación diferencial de genes en el Locus Cerúleo y el Núcleo Dorsal del Rafe en sujetos con trastorno bipolar y depresión mayor

El Locus Cerúleo (LC) y el Núcleo Dorsal del Rafe (DR) son las fuentes principales de inervación noradrenérgica y serotoninérgica del cerebro respectivamente. La desregulación de estos neurotransmisores se ha implicado en trastornos psiquiátricos. Este Ejemplo usa cerebros post mórtem de pacientes con MDD (N=12), BPD (N=6), y sujetos sanos (N=9) para contrastar los perfiles de expresión génica en las regiones LC y DR de sus cerebros. Todos los sujetos cumplieron los criterios de inclusión de pH > 6,6 y cero factores agónicos. Se extrajeron muestras de ARN total de muestras de LC y DR microdisecionadas por captura láser, se amplificaron y se exploraron con micromatrices de oligonucleótidos de alta densidad Affymetrix. Los datos de expresión génica se analizaron por ANOVA del algoritmo promedio multimicroplaca robusto ($p \leq 0,1$) y por el algoritmo de llamada "presente" MAS5.0 (mínimo de 50 % de presencias en uno de los 3 estados de salud). Los genes que cumplen estos criterios se analizaron usando el Análisis de Ruta de Inventiva (IPA). En comparación con los individuos sanos, 774 y 636 genes muestran expresión alterada en el LC y 627 y 656 genes muestran expresión alterada en el DR de pacientes con MDD y BPD, respectivamente.

Patrones de expresión de genes de LC: los datos se resumen en la Tabla 3. El Análisis de Ruta de Inventiva reveló que 10 genes de la ruta de señalización del receptor de glutamato están alterados significativamente en MDD

($p < 0,01$) pero no en BPD. Las alteraciones de expresión de genes de señalización de glutamato están presentes en los siguientes compartimentos sinápticos del locus cerúleo: células gliales, neuronas presinápticas y neuronas postsinápticas. Esto muestra que la señalización de glutamato está alterada en el LC de pacientes con MDD. Los transportadores gliales, la glutamina sintasa, AMPA, kainato, GRM1 y GRM7 son por lo tanto dianas para tratamiento del desequilibrio glutamatérgico.

La expresión de genes relacionados con el crecimiento, es decir, factores de crecimiento de fibroblastos, también está alterada significativamente en el LC de pacientes con MDD. Los fármacos que se dirigen a FGFR3, receptor de TrkB, receptor de hormona del crecimiento o que imita las acciones de FGF-2 aumentarían el crecimiento de neuritas en el LC y reducirían la pérdida neuronal.

Los genes que se expresan casi exclusivamente en la glía están regulados negativamente de forma significativa. Estos genes son marcadores útiles para alteraciones gliales globales en pacientes con MDD.

Patrones de expresión de genes DR. Los datos se resumen en la Tabla 4. Los análisis de IPA del DR revelaron alteraciones en la expresión de varios genes en rutas relacionadas con el factor de crecimiento en MDD. La expresión de la mayoría de los genes alterados estaba regulada negativamente. De forma similar, la expresión de varios genes en rutas relacionadas con el factor de crecimiento estaba regulada negativamente en muestras de la cohorte de BP. Sin embargo, estos genes eran distintos de los detectados en la cohorte de MDD. Se identificaron varios genes que eran comunes para ambos trastornos; su expresión se alteró en la misma dirección de sujetos con MDD y BPD.

TABLA 1A

Genes asociados con el suicidio

Símbolo	Desregulación de suicidio	Nombre	Mejor Referencia	Citobanda	Factor de Cambio de Cingulada Anterior			Factor de Cambio de Amígdala			Factor de Cambio de Cerebelo		
					Suicidio Frente a Estado Anímico	Suicidio Frente a Control	Suicidio Frente a Estado Anímico	Suicidio Frente a Estado Anímico	Suicidio Frente a Control	Suicidio Frente a Estado Anímico	Suicidio Frente a Estado Anímico	Suicidio Frente a Control	
FOS	región 3	Homólogo del oncogén viral de osteosarcoma murino FBJ V-fos	BM894421	14q24.3	0,671	0,679	0,716	0,638	0,770	0,659			
CAPN3	región 2	"Calpaina 3, (p94)"	BC003169	15q15.1-q21.1	0,783	0,799	0,567	0,651	0,846	0,926			
FOS	región 2	Homólogo del oncogén viral de osteosarcoma murino FBJ V-fos	BM894421	14q24.3	0,671	0,679	0,716	0,638	0,770	0,659			
CAPN3	cingulada anterior	"Calpaina 3, (p94)"	BC003169	15q15.1-q21.1	0,783	0,799	0,567	0,651	0,846	0,926			
FGF12	cingulada anterior	Factor de crecimiento de fibroblastos 12	BC022524	3q28	1,393	1,303	1,060	1,167	0,896	1,074			
FOS	cingulada anterior	Homólogo del oncogén viral de osteosarcoma murino FBJ V-fos	BM894421	14q24.3	0,671	0,679	0,716	0,638	0,770	0,659			
MAP2	cingulada anterior	Proteína asociada con microtúbulos 2	AL535786	2q34-q35	1,389	1,303	0,914	1,084	0,921	0,999			
LRIG1	cingulada anterior	Repeticiones ricas en leucina y dominios de inmunoglobulina 1	A1459030	3p14	0,799	0,689	1,008	0,897	0,965	0,810			
TENS1	cingulada anterior	Que contiene dominio SH2 de tipo tensina 1	CN480168	7p13-p12.3	0,704	0,737	0,992	0,854	0,953	0,721			
ADAMTS1	cingulada anterior	"Tipo desintegrina A y metaloproteasa (tipo repressina) con motivo de tipo	CA446773	21q21.2	0,796	0,721	0,941	0,649	1,014	0,822			

Genes asociados con el suicidio											
Símbolo	Desregulación de suicidio	Nombre	Mejor Referencia	Citobanda	Factor de Cambio de Cingulada Anterior		Factor de Cambio de Amígdala		Factor de Cambio de Cerebelo		
					Suicidio Frente a Estado Anímico	Suicidio Frente a Control	Suicidio Frente a Estado Anímico	Suicidio Frente a Control	Suicidio Frente a Estado Anímico	Suicidio Frente a Control	
		trombospondina 1,1"									
CNTN1	cingulada anterior	Contactina 1	U07819	12q11-q12	1,320	1,283	1,038	1,098	0,883	0,994	
GABRG2	cingulada anterior	"Receptor de ácido gamma aminobutírico (GABA) A, gamma 2"	BI754570	5q31.1-q33.1	1,376	1,282	0,902	1,236	0,858	1,028	
EFEMP1	cingulada anterior	Proteína de matriz extracelular de tipo fibulina que contiene EGF 1	CR611721	2p16	0,791	0,749	0,784	0,826	0,979	0,787	
TPBG	cingulada anterior	Glucoproteína de trofoblasto	CA413562	6q14-q15	1,495	1,334	1,057	1,323	1,029	1,025	
C3orf14	amígdala	Fase de lectura 4 de cromosoma 3	CD102473	3p11-q11	0,897	0,909	0,705	0,763	0,903	0,921	
EVI2A	amígdala	Sitio de integración viral ecotrópico 2A	CA415486	17q11.2	0,883	0,862	0,669	0,714	0,899	0,884	
CD9	amígdala	Antígeno CD9 (p24)	AW864408	12p13.3	0,940	0,850	0,760	0,798	0,821	0,702	
MOG	amígdala	Glucoproteína oligodendrocito de mielina	NM_002433	6p22.1	0,847	0,792	0,644	0,711	0,905	0,883	
CAPN3	amígdala	"Calpaína 3, (p94)"	BC003169	15q15.1-q21.1	0,783	0,799	0,567	0,651	0,846	0,926	
UGT8	amígdala	UDP glucosiltransferasa 8 (UDP-galactosa ceramida galactosiltransferasa)	CN275924	4q26	0,945	0,781	0,710	0,776	0,926	0,947	

Genes asociados con el suicidio											
Símbolo	Desregulación de suicidio	Nombre	Mejor Referencia	Citobanda	Factor de Cambio de Cingulada Anterior		Factor de Cambio de Amígdala		Factor de Cambio de Cerebelo		
					Suicidio Frente a Estado Anímico	Suicidio Frente a Control	Suicidio Frente a Estado Anímico	Suicidio Frente a Control	Suicidio Frente a Estado Anímico	Suicidio Frente a Control	
ASPA	amígdala	"Asparatoacilasa (aminoacilasa 2, enfermedad de Canavan)"	BF115120	17pter-p13	0,903	0,816	0,761	0,763	0,910	0,923	
PLP1	amígdala	"Proteína proteolipídica 1 (enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, paraplejía espástica 2, sin complicaciones)"	BP194315	Xq22	0,935	0,888	0,765	0,751	0,876	0,848	
ENPP2	amígdala	Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 2 (autotaxina)	CR606785	8q24.1	0,816	0,817	0,602	0,717	0,813	0,851	
ENPP2	amígdala	Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 2 (autotaxina)	CR606785	8q24.1	0,816	0,817	0,602	0,717	0,813	0,851	
RPH3A	amígdala	Homólogo de rabfilina 3A (ratón)	CR613722	12q24.13	1,241	1,176	1,259	1,283	0,994	1,095	
SLC31A2	amígdala	"Familia de transportadores de solutos 31 (transportadores de cobre), miembro 2"	NM_001860	9q31-q32	0,875	0,864	0,707	0,798	0,957	0,966	
FOS	amígdala	Homólogo del oncogén viral de osteosarcoma murino FBj V-fos	BM894421	14q24.3	0,671	0,679	0,716	0,638	0,770	0,659	
CNP	amígdala	"nucleótido 3' fosfodiesterasa 2, 3'-cíclica"	CD369491	17q21	0,836	0,838	0,754	0,761	0,910	0,872	

Genes asociados con el suicidio												
Símbolo	Desregulación de suicidio	Nombre	Mejor Referencia	Citobanda	Factor de Cambio de Cingulada Anterior			Factor de Cambio de Amígdala			Factor de Cambio de Cerebelo	
					Suicidio Frente a Estado Anímico	Suicidio Frente a Control	Suicidio Frente a Estado Anímico	Suicidio Frente a Control	Suicidio Frente a Estado Anímico	Suicidio Frente a Control		
SEPP1	amígdala	"Selenoproteína P, plasma, 1"	BF941781	5q31	0,867	0,771	0,733	0,785	0,842	0,667		
PMP22	amígdala	Proteína de mielina periférica 22	BG939651	7p12-p11.2	0,845	0,772	0,793	0,793	0,927	0,779		
GREM1	amígdala	"Homólogo de gremlina 1, superfamilia del nudo de cisteína (<i>Xenopus laevis</i>)"	NM_013372	15q13-q15	0,827	0,912	0,800	0,798	0,970	0,991		
GPR37	amígdala	Receptor acoplado a proteína G 37 (similar al receptor de endotelina tipo B)	BF966147	7q31	0,991	0,878	0,735	0,784	0,954	0,917		
HSPA2	amígdala	Proteína de choque térmico de 70 kDa 2	BM979297	14q24.1	1,008	0,851	0,702	0,724	0,908	0,883		
CD74	amígdala	"antígeno CD74 (polipéptido invariante del complejo mayor de histocompatibilidad, asociado al antígeno de clase II)"	BI262425	5q32	0,806	0,766	0,787	0,746	0,895	0,738		
FA2H	amígdala	Ácido graso 2-hidroxi-lasa	AA454978	16q23	0,898	0,875	0,685	0,734	0,906	0,922		
C20orf35	amígdala	Fase abierta de lectura 35 del cromosoma 20	B1711408	20q13.12	0,865	0,902	0,759	0,750	0,930	0,868		

Genes asociados con el suicidio													
Símbolo	Desregulación de suicidio	Nombre	Mejor Referencia	Citobanda	Factor de Cambio de Cingulada Anterior			Factor de Cambio de Amígdala			Factor de Cambio de Cerebelo		
					Suicidio Frente a Estado Anímico	Suicidio Frente a Control	Suicidio Frente a Estado Anímico	Suicidio Frente a Control	Suicidio Frente a Estado Anímico	Suicidio Frente a Control	Suicidio Frente a Estado Anímico	Suicidio Frente a Control	
ZFYVE16	amígdala	"Dedo de cinc, que contiene dominio FYVE 16"	AK127003	5p15.2-q14.3	0,862	0,797	0,772	0,776	0,868	0,992			
MAG	amígdala	Glucoproteína asociada a mielina	X98405	19q13.1	0,870	0,829	0,685	0,726	1,011	0,904			
SATB2	amígdala	Miembro de la familia SATB 2	AW970253	2q33	1,231	1,188	1,549	1,302	0,975	1,019			
TF	amígdala	Transferrina	CB156966	3q22.1	0,890	0,829	0,669	0,711	0,878	0,881			
OPN3	amígdala	"Opsina 3 (encefalopsina, panopsina)"	BU631266	1q43	1,257	1,151	1,293	1,343	1,081	1,044			
CGI-38	amígdala	Proteína específica del cerebro	BM981844	16q22.1	1,000	1,000	1,667	1,563	1,000	1,000			
ST18	amígdala	Supresión de tumorigenicidad 18 (carcinoma de mama) (proteína de dedo de cinc)	A1741795	8q11.23	0,875	0,804	0,652	0,711	0,983	0,945			
RNASE1	amígdala	"Ribonucleasa, familia de RNasa A, 1 (pancreática)"	AL046791	14q11.2	0,937	0,932	0,760	0,771	0,962	0,967			

Genes asociados con el suicidio

Símbolo	Desregulación de suicidio	Nombre	Mejor Referencia	Citobanda	Factor de Cambio de Cingulada Anterior		Factor de Cambio de Amígdala		Factor de Cambio de Cerebelo	
					Suicidio Frente a Estado Anímico	Suicidio Frente a Control	Suicidio Frente a Estado Anímico	Suicidio Frente a Control	Suicidio Frente a Estado Anímico	Suicidio Frente a Control
KLK6	amígdala	"Callicreina 6 (neuroquina zima)"	CA945202	19q13.3	0,882	0,878	0,739	0,781	0,930	0,973
ZNF536	amígdala	Proteína de dedo de cinc 536	AK091043	19q12			1,584	1,603		
CX3CR1	amígdala	Receptor de quimiocina (motivo C-X3-C) 1 (CX3CR1)	CB047889	3p21	0,861	0,808	0,705	0,779	0,885	0,837
CHL1	cerebelo	Molécula de adhesión celular con homología con L1CAM (homólogo cercano de L1)	BF966608	3p26.1	1,119	1,088	0,978	1,297	0,786	0,786
ZBTB16	cerebelo	Que contiene dominio BTB y dedo de cinc 16	Z19002	11q23.1	1,231	1,235	1,199	1,161	1,446	1,625
FOS	cerebelo	Homólogo del oncogén viral de osteosarcoma murino FBJ V-fos	BM894421	14q24.3	0,671	0,679	0,716	0,638	0,770	0,659
HLA-DPA1	cerebelo	"Complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, DP alfa 1"	A1554919	6p21.3	0,874	0,860	0,831	0,839	0,771	0,799

TABLA 1B

Símbolo	Desregulación de suicidio	Nombre	Mejor Referencia	Citobanda	Factor de Cambio de Cingulada anterior	
					MDD suicida Frente a MDD No suicida	MDD suicida Frente a Control
PRPS2	cingulada anterior	Fosforribosil pirofosfato sintetasa 2	NM_002765	Xp22.3-p22.2	1,287	1,251
FGF9	cingulada anterior	Factor de crecimiento de fibroblastos 9 (factor activador de glía)	D14838	13q11-q12	1,270	1,288
RIMS2	cingulada anterior	Exocitosis de membrana sináptica reguladora 2	BC043144	8q22.3	1,243	1,288
TM4SF9	cingulada anterior	Tetraspanina 5	BX649011	4q23	1,488	1,358
PCLO	cingulada anterior	Piccolo (proteína de citomatrix presináptica)	AB011131	7q11.23-q21.3	1,555	1,383
GNB5	cingulada anterior	Proteína de unión a nucleótido guanina (proteína G), beta 5	AK092059	15q21.2	1,206	1,263
GABRA1	cingulada anterior	Receptor de ácido gamma-aminobutírico (GABA) A, alfa 1	NM_000806	5q34-q35	1,353	1,356
NLK	cingulada anterior	Quinasa de tipo nemo	BC064663	17q11.2	1,413	1,351
CDH18	cingulada anterior	Cadherina 18, tipo 2	BC031051	5p15.2-p15.1	1,217	1,260
NR1D2	cingulada anterior	Subfamilia del receptor nuclear 1, grupo D, miembro 2	AB209091	3p24.2	1,476	1,319
R3HDM	cingulada anterior	Que contiene dominio R3H 1	BX538168	2q21.3	1,208	1,222
COL5A2	cingulada anterior	Colágeno, tipo V, alfa 2	NM_000393	2q 14-q32	1,209	1,226
	cingulada anterior	ARNm cerebelar	AK126654		1,229	1,303
NRXN1	cingulada anterior	Neurexina 1	AB011150	2p16.3	1,247	1,230
NCALD	cingulada anterior	Neurocalcina delta	AB209015	8q22-q23	1,284	1,306
CADPS2	cingulada anterior	Proteína activadora dependiente de Ca ²⁺ para secreción 2	NM_017954		1,393	1,426
TRIM23	cingulada anterior	Que contiene motivo tripartito 23	NM_001656	5q12.3	1,231	1,227
STAT4	cingulada anterior	Transductor de señal y activador de la transcripción 4	NM_003151	2q32.2-q32.3	1,228	1,314

Símbolo	Desregulación de suicidio	Nombre	Mejor Referencia	Citobanda	Factor de Cambio de Cingulada anterior	
					MDD suicida Frente a MDD No suicida	MDD suicida Frente a Control
HLA-A	cingulada anterior	Complejo mayor de histocompatibilidad, clase I, A	AB209117	6p21.3	0,771	0,788
LYPDC1	cingulada anterior	Que contiene dominio LY6/PLAUR 1	AK122643	2q21.2	0,819	0,787
RYR1	cingulada anterior	Receptor de rianodina 1 (esquelético)	NM_000540	19q13.1	0,749	0,791

TABLA 1C Genes asociados con comorbilidad por abuso de sustancias

Símbolo	Desregulación de suicidio	Nombre	Mejor Referencia	Citobanda	Factor de Cambio de Cingulada anterior	
					MDD con Abuso de Sustancias Frente a MDD Sin Abuso de Sustancias	MDD con Abuso de Sustancias Frente a Control
NS3TP1	cingulada anterior	Proteína transactivada por NS3 de VHC 1	AK000759	2p24.3-q21.3	1,280	1,230
DZIP1	cingulada anterior	Proteína de interacción con DAZ 1	NM_198968	13q32.1	1,259	1,247
STMN4	cingulada anterior	Tipo estatmina 4	NM_030795	8p21.2	1,255	1,217
CDH 18	cingulada anterior	Cadherina 18, tipo 2	BC031051	5p15.2-p15.1	1,269	1,238
KCMF1	cingulada anterior	Factor modulador del canal de potasio 1	NM_020122	2p11.2	1,230	1,214
CRYZL1	cingulada anterior	Cristalina, tipo zeta (quinona reductasa) 1	AK057604	21q21.3	1,461	1,341
OSBPL8	cingulada anterior	Tipo proteína de unión a oxisterol 8	NM_020841	12q14	1,551	1,403
FGF14	cingulada anterior	Factor de crecimiento de fibroblastos 14	AY188178	13q34	1,291	1,231
HSPCB	cingulada anterior	Proteína de choque térmico de 90 kDa 1, beta	AY359878	6p12	1,264	1,210
DDX50	cingulada anterior	Polipéptido de caja DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) 50	BC000272	10q22.1	1,338	1,219
GNAZ	cingulada anterior	Proteína G, polipeptido alfa Z	BC037333	22q11.22	1,279	1,210
CACNB2	cingulada anterior	Canal de calcio dependiente de tensión, B2	AB208917	10p12	1,270	1,263
RASL11B	cingulada anterior	Tipo RAS, familia 11, miembro B	BC025694	4q12	1,272	1,216
DNM2	cingulada anterior	Dinamina 2	AK127033	19p13.2	0,805	0,813

Símbolo	Desregulación de suicidio	Nombre	Mejor Referencia	Citobanda	Factor de Cambio de Cingulada anterior	
					MDD con Abuso de Sustancias Frente a MDD Sin Abuso de Sustancias	MDD con Abuso de Sustancias Frente a Control
THG-1	cingulada anterior	Familia del dominio miembro 4	NM_030935	7p21-p15	0,829	0,785

TABLA 2A

Genes sensible a litio conocidos en la bibliografía: confirmados en primates no humanos			
Símbolo	Grupo de UG	Citobanda	Nombre
AP1S1	NM_057089	7q22.1	complejo de proteína relacionada con adaptador 1, subunidad sigma 1
CLOCK	NM_004898	4q12	homólogo de clock (ratón)
FGF8	NM_033163-5	10q24	factor de crecimiento de fibroblastos 8 (inducido por andrógenos)
GSK3B	NM_002093	3q13.3	glucógeno sintasa quinasa 3 beta
NFKB1	NM_003998	4q24	factor nuclear del potenciador génico de polipéptido ligero kappa en linfocitos B 1 (p105)

TABLA 2B

Genes nuevos que son sensibles a litio y están desregulados en BPD			
Símbolo	Grupo de UG	Citobanda	Nombre
A2M	Hs.212838	12p13.3-p12.3	Macroglobulina alfa 2
AP1S1	Hs.489365	7q22.1	complejo de proteína relacionada con el adaptador 1, subunidad sigma 1
BRD7	En múltiples grupos	16q12	que contiene bromodominio 7
CA10	Hs.463466	17q21	Anhidrasa carbónica X
CD74	Hs.436568	5q32	Antígeno CD74 (polipéptido invariante del complejo mayor de histocompatibilidad, asociado con antígeno de clase II)
CDK5R2	Hs.158460	2q35	Quinasa dependiente de ciclina 5, subunidad reguladora 2 (p39)
CNN2	Hs.169718	21q11.1	Calponina 2
DSTN	Hs.304192	20p12.1	Destrina (factor de despolimerización de actina)
ELAVL4	Hs.213050	1p34	Tipo ELAV (embrionario letal, visión anómala, Drosophila) 4 (antígeno de Hu D)
FLJ10094	Hs.128258	13q14.11	Proteína hipotética FLJ10094
HNRPH2	Hs.278857	Xq22	Ribonucleoproteína nuclear heteróloga H2 (H')
IGFBP6	Hs.274313	12q13	Proteína de unión a factor de crecimiento de tipo insulina 6
MOGAT2	Hs.288568	11q13.5	Monoacilglicerol O-aciltransferasa 2
MYLK	Hs.477375	3q21	Miosina, polipéptido quinasa ligera
NRIP1	Hs.155017	21q11.2	Proteína de interacción con el receptor nuclear 1
PSG5	Hs.558372	19q13.2	Glucoproteína 5 específica de embarazo beta 1
PTP4A2	En múltiples grupos	1p35	Proteína tirosina fosfatasa, tipo 4A, 2P4A2
RPLP2	Hs.437594	11p15.5-p15.4	Proteína ribosómica, grande, P2
RPS14	Hs.381126	5q31-q33	Proteína ribosómica S14
RPS9	En múltiples grupos	19q13.4	Proteína ribosómica S9
SST	Hs.12409	3q28	Somatostatina
UBQLN2	Hs.522668	Xp11.23-p11.1	Ubiquilina 2
UXT	Hs.172791	Xp11.23-p11.22	Transcrito expresado de forma ubicua

TABLA 3

Resumen de genes desregulados LC en sujetos con trastorno de depresión mayor			
RefSeq N°	Nombre	p (C frente a MD)	FC (factor de cambio) de MD frente a C
A. Señalización de glutamato			
NM_004171	SLC1A2 (transportador de glutamato de alta afinidad glial)	0,04	-1,26
NM_004172	SLC1A3 (transportador de glutamato de alta afinidad glial)	0,03	-1,59
NM_002065	GS (glutamina sintetasa)	0,02	-1,28
NM_020346	VGlutT2	0,01	1,31
NM_005271	Glutamato deshidrogenasa	0,05	-1,27
NM_181875	mGlutR7 (variante del transcrito 3)	0,07	-1,06
NM_000827	AMPA1	0,09	1,14
NM_000828	AMPA3	0,01	1,16
NM_175611	GRIK1	0,02	1,22
NM_000838	mGlutR1	0,05	1,08
NM_000842	mGlutR5	0,01	1,16
B. Factores de crecimiento y genes relacionados con el crecimiento			
NM 002006	FGF2	0,10	-1,07
NM_002010	FGF9	0,02	1,16
NM_000142	FGFR3	0,04	-1,17
NM_001007097	Receptor de TrkB	0,03	-1,45
NM 000163	Receptor de hormonas del crecimiento	0,10	-1,20
C. Marcadores gliales			
NM_002055	Proteína de ácido fibrilar glial	0,05	-1,32
NM_000165	Proteína de unión de huecos, alfa 1, 43 kDa (conexina 43)	0,04	-1,86
NM_006783	Proteína de unión de huecos, beta 6 (conexina 30)	0,02	-1,93
NM_080388	Proteína de unión a calcio S100 A16	0,02	-1,15

TABLA 4

Resumen de genes desregulados en DR de sujetos con MDD y BPD					
Genes de MDD					
RefSeq8_ID	Descripción	FC MD frente a C	p valor MD frente a C	FC BP frente a C	p valor BP frente a C
NM_001709	factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), variante de transcrito 4, ARNm	-1,207	0,052	-1,164	0,140
NM_003670	que contiene dominio de hélice-bucle-hélice básico, clase B, 2 (BHLHB2), ARNm	-1,185	0,017	-1,175	0,160
NM_001200	proteína morfogenética del hueso 2 (BMP2), ARNm	-1,059	0,085	-1,035	0,151

ES 2 534 672 T3

Resumen de genes desregulados en DR de sujetos con MDD y BPD					
Genes de MDD					
RefSeq8_ID	Descripción	FC MD frente a C	p valor MD frente a C	FC BP frente a C	p valor BP frente a C
NM_001008540	receptor de quimiocina (motivo C-X-C) 4 (CXCR4), variante de transcrito 1, ARNm	-1,154	0,001	-1,067	0,260
NM_145793	receptor alfa 1 de la familia de GDNF (GFRA1), variante de transcrito 2, ARNm	-1,062	0,067	-1,020	0,429
NM_013372	gremlina 1, superfamilia del nudo de cisteína, (<i>Xenopus laevis</i>) (GREM1), ARNm	-1,153	0,020	-1,099	0,194
NM_002253	receptor de dominio de inserción de quinasa (receptor tirosina quinasa tipo III a) (KDR), ARNm	-1,081	0,092	-1,065	0,362
NM_005924	caja homeótica de mesénquima 2 (MEOX2), ARNm	-1,105	0,028	-1,045	0,417
NM_002530	tirosina quinasa neurotrófica, receptor, tipo 3 (NTRK3), variante de transcrito 2, ARNm	1,080	0,072	1,090	0,165
NM_002660	fosfolipasa C, gamma 1 (PLCG1), variante de transcrito 1, ARNm	1,165	0,098	1,159	0,122
NM_005904	SMAD, homólogo de madres contra DPP 7 (<i>Drosophila</i>) (SMAD7), ARNm	-1,195	0,056	-1,037	0,439
NM_000346	caja SRY (región determinante del sexo Y) 9 (displasia campomélica, inversión de sexo autosómica) (SOX9), ARNm	-1,204	0,093	-1,128	0,251
NM_005749	transductor de ERBB2, 1 (TOB1), ARNm	-1,946	0,034	-1,866	0,113
NM_005429	factor de crecimiento endotelial vascular C, ARNm	-1,150	0,034	-1,099	0,168
NM_000756	hormona liberadora corticotropina (CRH), ARNm	1,205	0,021	-1,032	0,146
Genes de BPD					
RefSeq8_ID	Descripción	FC MD frente a C	p valor MD frente a C	FC BP frente a C	p valor BP frente a C
NM_004281	atanógeno asociado a BCL2 3 (BAG3), ARNm	-1,207	0,170	-1,345	0,073
NM_203330	molécula CD59, proteína reguladora de complemento (CD59), variante de transcrito 1, ARNm	-1,040	0,326	-1,107	0,042
NM_000089	colágeno, tipo I, alfa 2 (COL1A2), ARNm	-1,034	0,325	-1,134	0,049
NM_001331	catenina (proteína asociada a cadherina), delta 1 (CTNND1), ARNm	1,049	0,075	1,083	0,011
NM_001963	factor de crecimiento epidérmico (beta-urogastrona) (EGF), ARNm	-1,048	0,149	-1,083	0,030
NM_004508	isopentenil-difosfato delta isomerasa 1 (IDI1), ARNm	-1,168	0,192	-1,246	0,069
NM_058004	fosfatidilinositol 4-quinasa, catalítica, polipéptido alfa (PIK4CA), variante de transcrito 2, ARNm	-1,071	0,283	-1,235	0,025
NM_016224	nexina de clasificación 9 (SNX9), ARNm	-1,105	0,134	-1,162	0,085

RefSeq8_ID	Descripción	FC MD frente a C	p valor MD frente a C	FC BP frente a C	p valor BP frente a C
NM_003239	factor de crecimiento transformante, beta 3 (TGFB3), ARNm	1,022	0,364	1,204	0,026
NM_133646	quinasa AZK que contiene cremallera de leucina y motivo alfa estéril (ZAK), variante de transcrito 2, ARNm	-1,111	0,159	-1,208	0,094
NM_000898	monoamino oxidasa B (MAOB), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm	-1,083	0,156	-1,102	0,042
Genes comunes					
RefSeq8_ID	Descripción	FC MD frente a C	p valor MD frente a C	FC BP frente a C	p valor BP frente a C
NM_004723	factor de intercambio de nucleótido guanina rho/rac (GEF) 2 (ARHGEF2), ARNm	1,089	0,099	1,073	0,074
NM_078467	inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1A (p21, Cip1) (CDKN1A), variante de transcrito 2, ARNm	-1,162	0,056	-1,319	0,016
NM_001946	fosfatasa 6 de especificidad doble (DUSP6), variante de transcrito 1, ARNm	-1,321	0,076	-1,295	0,078
NM_001402	factor de elongación de traducción eucariota 1 alfa 1 (EEF1A1), ARNm	-1,416	0,016	-1,419	0,066
NM_032638	proteína de unión a GATA 2 (GATA2), ARNm	1,134	0,040	1,172	0,005
NM_006186	subfamilia del receptor nuclear 4, grupo A, miembro 2 (NR4A2), variante de transcrito 1, ARNm	-1,869	0,007	-1,877	0,070
NM_002525	nardilisina (convertasa dibásica de N-arginina) (NRD1), ARNm	1,113	0,043	1,141	0,050
NM_002576	quinasa activada por p21/Cdc42/Rac1 1 (homólogo de STE20, levadura) (PAK1), ARNm	1,070	0,030	1,085	0,067

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> The Board of Trustees of The Leland Stanford Junior University
- <120> Métodos relacionados con FGF2 para el diagnóstico y tratamiento de la depresión
- <130> N.104850
- 10 <140> EP 06844345.6
<141> 13-11-2006
- <150> WO PCT/US06/44057
15 <151> 13-11-2006
- <150> US 60/736.526
<151> 12-11-2005
- 20 <150> US 60/829.516
<151> 13-10-2006
- <160> 35
- 25 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
<210> 1

ES 2 534 672 T3

<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> cebador directo de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del exón 2 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2) R2 F

10 <400> 1
gccgtgatca gttggactaa g 21

<210> 2
<211> 21
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador directo de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del exón 2 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR3) R3 F

20 <400> 2
agaggcttca agtgctaaac g 21

<210> 3
25 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> cebador inverso de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del exón 2 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2) R2 R

<400> 3
35 tgtggcacct tttatctgga g 21

<210> 4
<211> 20
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real de amplicón del exón 2 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR3) R3 R

45 <400> 4
gcacactaaa gtggcacagc 20

<210> 5
50 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
55 <223> cebador directo de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del exón 5 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2) R2 F

<400> 5
tatggaaagt gtggtcccat c 21

60 <210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> cebador directo de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del

ES 2 534 672 T3

exón 5 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR3) R3 F

5 <400> 6
tggagcttgg tcatggaaag 20

<210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador inverso de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del exón 5 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2) R2 R

15 <400> 7
acatcaaggt ggtaggtgtg g 21

20 <210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> cebador inverso de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del exón 5 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR3) R3 R

30 <400> 8
ggatgctgcc aaactgttc 20

35 <210> 9
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> cebador directo de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del exón 6 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2) R2 F

45 <400> 9
ggaggggacg tagaattgt c 21

50 <210> 10
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> cebador directo de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del exón 6 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR3) R3 F

60 <400> 10
ccaaccagac agccgttc 18

65 <210> 11
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del exón 6 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2) R2 R

<400> 11
cttcaggacc ttgaggtagg g 21

<210> 12

ES 2 534 672 T3

<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> cebador inverso de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del exón 6 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR3) R3 R

10 <400> 12
cattcacctc cacgtgctt 19

<210> 13
<211> 21
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador directo de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del exón IIIb del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2) R2 F

20 <400> 13
ggggataaat agctccaatg c 21

<210> 14
25 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> cebador directo de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del exón IIIb del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR3) R3 F

<400> 14
35 cctggatcag tgagaatgtg g 21

<210> 15
<211> 24
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del exón IIIb del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2) R2 R

45 <400> 15
catatatatt cccagcatc catc 24

<210> 16
50 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
55 <223> cebador inverso de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del exón IIIb del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR2) R3 R

<400> 16
60 aaattggtgg ctcgacagag 20

<210> 17
<211> 21
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 534 672 T3

<220>
<223> cebador directo de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del exón IIIc del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2) R2 F

5 <400> 17
acaccacgga caaagaaatt g 21

<210> 18
<211> 20
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador directo de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del exón IIIc del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR3) R3 F

15 <400> 18
tgtccttgca caatgtcacc 20

20 <210> 19
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> cebador inverso de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del exón IIIc del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2) R2 R

30 <400> 19
atagaattac cgcgaagca c 21

<210> 20
<211> 20
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del exón IIIc del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR3) R3 R

40 <400> 20
acgcagagtg atgggaaaac 20

45 <210> 21
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador directo de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del exón 8 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2) R2 F

50 <400> 21
gatcacagct tcccagatt ac 22

55 <210> 22
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> cebador directo de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del exón 8 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR3) R3 F

65 <400> 22
ggaggagctg atggaagttg 20

ES 2 534 672 T3

5
<210> 23
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del exón 8 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2) R2 R

10
<400> 23
tcttggtcgt ggtcttcatt c 21

15
<210> 24
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> cebador inverso de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del exón 8 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR3) R3 R

25
<400> 24
ccaccaggat gaagaggaag 20

30
<210> 25
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35
<220>
<223> cebador directo de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del exón 11 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2) R2 F

40
<400> 25
agagaaggac ctgtctgacc tg 22

45
<210> 26
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> cebador directo de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del exón 11 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR3) R3 F

55
<400> 26
atgccactga caaggacctg 20

60
<210> 27
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65
<220>
<223> cebador inverso de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del exón 11 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2) R2 R

<400> 27
cccaggaggt tgatgatgtt c 21

<210> 28
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 534 672 T3

<220>
<223> cebador inverso de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real del amplicón del exón 11 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR3) R3 R

5 <400> 28
cccccaacag gttaatgatg 20

<210> 29
<211> 21
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador directo de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real de amplicón del exón 15 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2) R2 F

15 <400> 29
gtccttcggg ggttaatgt g 21

20 <210> 30
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> cebador directo de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real de amplicón del exón 15 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR3) R3 F

30 <400> 30
tcctttgggtg tcctcctctg 20

<210> 31
<211> 21
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real de amplicón del exón 15 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2) R2 R

40 <400> 31
agttcattgg tgcagttggt g 21

45 <210> 32
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso de amplificación por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real de amplicón del exón 15 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR3) R3 R

50 <400> 32
cagttggctg gcttgtcc 18

55 <210> 33
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> NCAM (péptido FGL)

65 <400> 33

ES 2 534 672 T3

Glu Val Tyr Val Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10 15

5 <210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Inhibidor del péptido del sistema FGF
<400> 34

His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr
1 5

15 <210> 35
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> caja DEAD DDX50
<400> 35

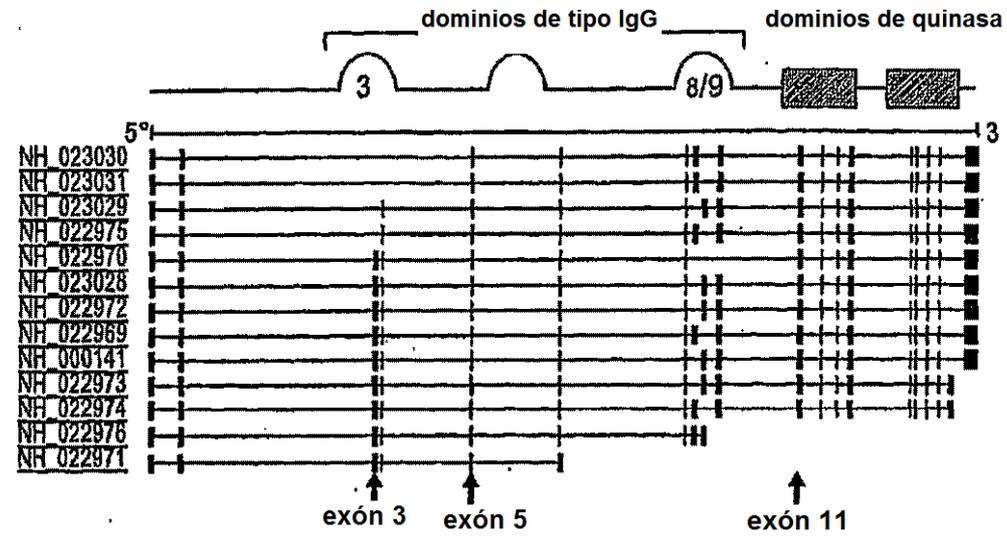
Asp Glu Ala Asp
1

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un ligando que activa el receptor de FGF para uso como un antidepresivo en el tratamiento terapéutico de un individuo con trastorno depresivo mayor (MDD), en el que el ligando es un péptido mimético de NCAM.
2. El ligando para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido mimético de NCAM comprende un péptido FGL con la secuencia de aminoácidos EYVVVAENQQGKSKA.
- 10 3. El ligando para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el MDD está asociado con ansiedad.
4. El ligando para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el MDD implica un estado anímico triste, ansioso o vacío persistente.
- 15 5. El ligando para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el individuo es un ser humano.
6. El ligando para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el ligando se administra con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 7. El ligando para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el ligando se administra por vía oral, por vía nasal, por vía tópica, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal o por vía intratecal.
8. El ligando para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que se ha diagnosticado al individuo MDD.
- 25 9. El ligando para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el ligando está unido a un compuesto de dimerización.
- 30 10. El ligando para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el ligando se administra a una dosis de aproximadamente 1 ng/kg a 10 mg/kg.

Diferencias de Variantes de FGFR2 en MDD



región del cerebro	relación exón 5:exón 11 (control)	relación exón5:exón 11 (MDD)	p-vaíor
AnCg	1,7	1,5	0,46
DLPFC	1,9	1,3	0,06
HC	2,1	1,4	0,20

FIG. 1

FIG. 2

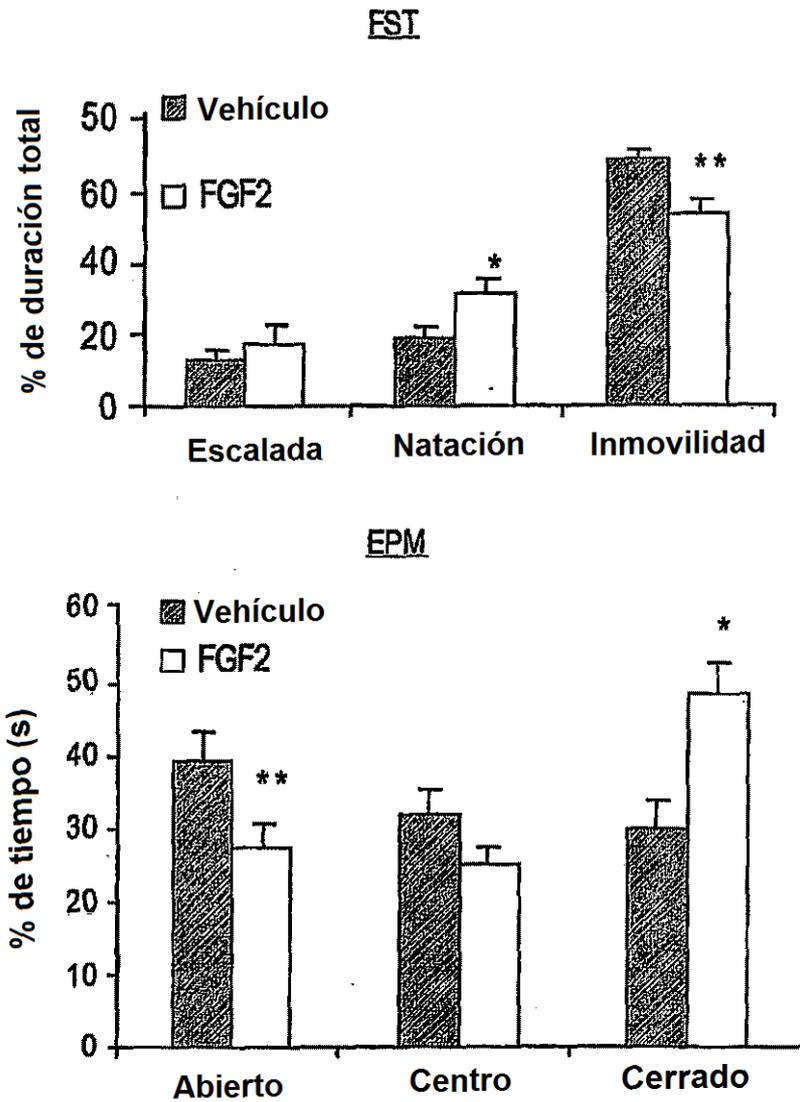


FIG. 3

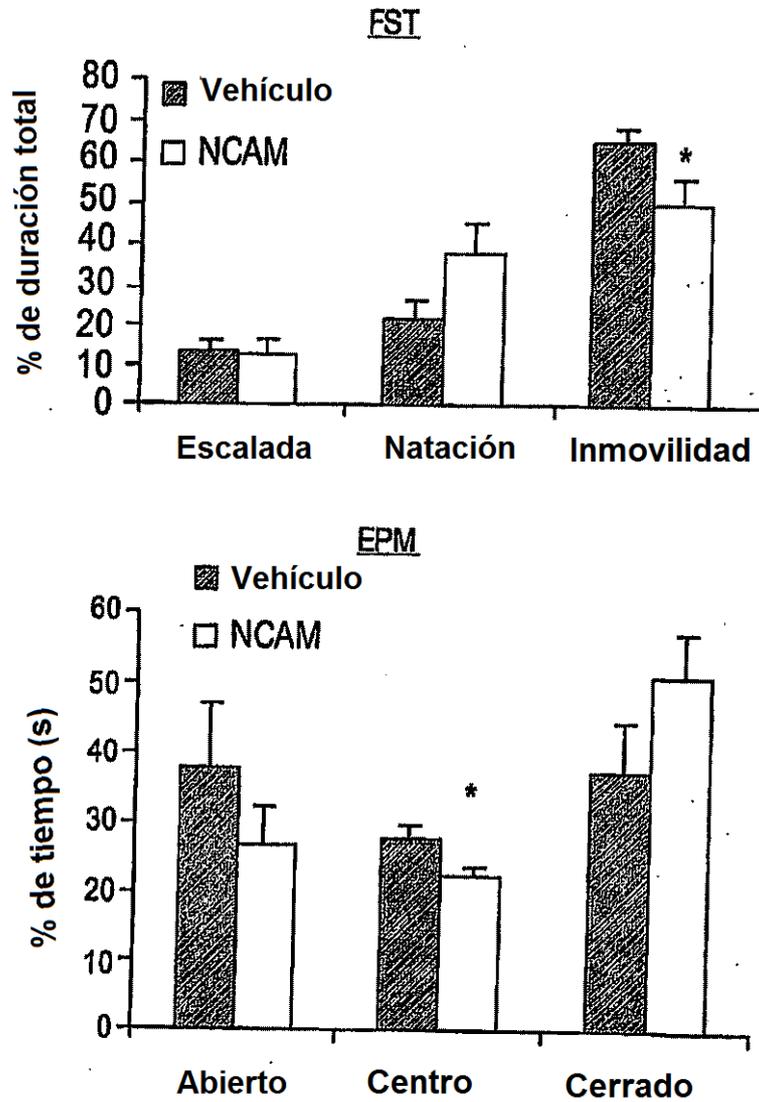
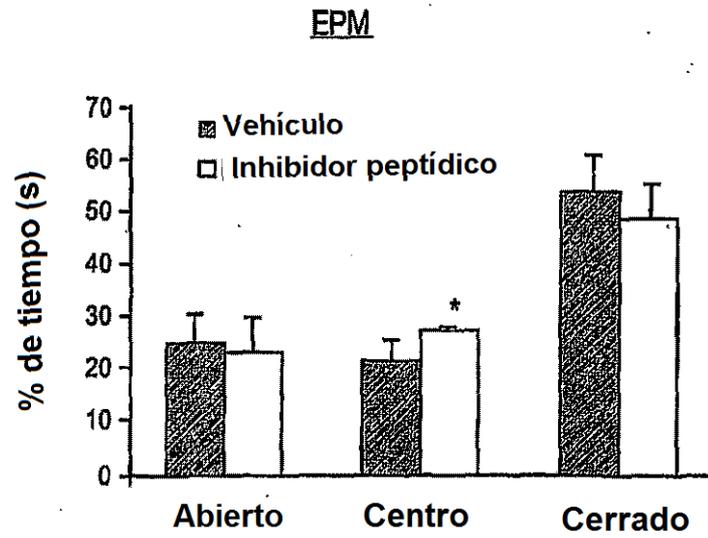
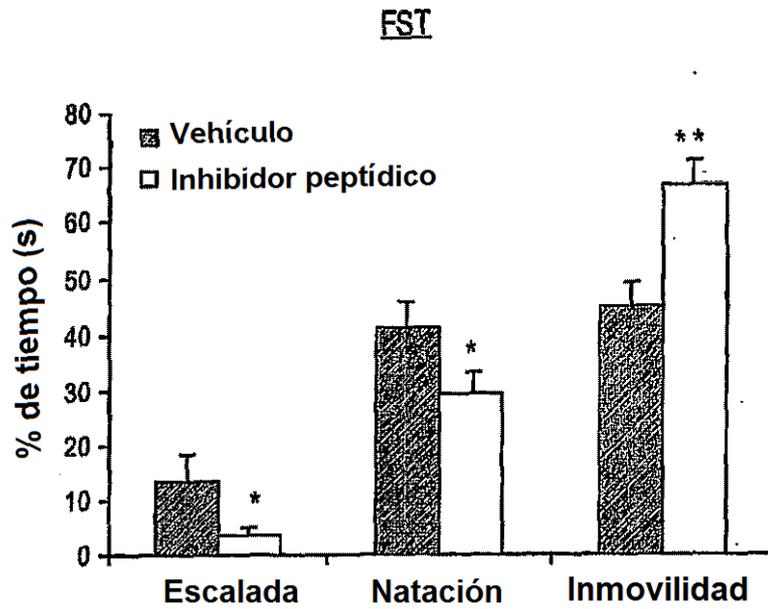


FIG. 4



Desregulación de genes implicados en las rutas de señalización de AMPc en corteza cingulada anterior de pacientes con BPD

Símbolo	Nombre	UniGene ID	Citobanda	U95Av2	U133A
NPY1R	Receptor de neuropéptido Y Y1	Hs.519057	4q31-q32		24,4**
NPY	Neuropéptido Y	Hs.1832	7p15	22,1**	33,0**
SST	Somatostatina	Hs.12409	3q28	29,0**	22,1**
GRM3	Receptor de glutamato metabotrópico 3	Hs.112621	7q21	33,4**	34,4**
EDG2	GPCR de diferenciación endotelial 2	Hs.126667	9q31.3	24,1*	18,2*
GNAI1	Actividad inhibidora de proteína G alfa 1	Hs.134587	7q21	40,4**	
PDE1A	Fosfodiesterasa 1A	Hs.416061	2q32	20,1**	24,1**
PDE8A	Fosfodiesterasa 8A	Hs.9333	15q25	16,3*	12,5*
PKIA	Inhibidor de proteína quinasa A alfa	Hs.433700	8q21	14,2*	16,6*
CDK5	Quinasa dependiente de ciclina 5	Hs.166071	7q36	10,5*	12,0*
PPP1CA	Proteína fosfatasa 1, catalítica alfa	Hs.183994	11q13	13,1*	16,8*

**Los p-valores que muestran una tasa de falso descubrimiento (FDR) de menos del 5 %

*p-valor de menos de 0,05 independientemente de la FDR

La probabilidad de que el grupo de moléculas que actúan de forma negativa en la actividad de señalización de AMPc se detecten como genes aumentados en BPD al azar, basándose en una distribución hipergeométrica, fue $p = 0,037$ ($q = 0,36$).

FIG. 5

FIG. 6
Desregulación de genes implicados en las rutas de señalización de AMPc en corteza cingulada anterior de pacientes con BPD

Símbolo	Nombre	UniGene ID	Citobanda	Cohorte de MDD A		Cohorte de MDD B
				U95AV2	U133A	U133A
PDE8A	Fosfodiesterasa 8A	Hs.9333	15q25	-24,3**	-23,1**	-17,8*
RGS20	Regulador de la señalización de proteína G 20	Hs.368733	8q12	-28,2**	-29,2**	-13,9*
EDG1	GPCR de diferenciación endotelial 1	Hs.154210	1p21	-19,7*	-21,2**	-10,4*
PPP1R3C	Proteína fosfatasa 1, reguladora 3C	Hs.303090	10q23-q24	-35,4**	-63,2**	-21,4**

** Los p-valores que muestran una tasa de falso de descubrimiento (FDR) de menos del 5 %

* p-valor de menos de 0,05 independientemente de la FDR

FIG. 7
Desregulación de genes implicados en las rutas de señalización de fosfatidilinositol en corteza cingulada anterior de pacientes con BPD

Símbolo	Nombre	UniGene ID	Citobanda	U95AV2	U133A
EDG2	GPCR de diferenciación endotelial 2	Hs.126667	9q31.3	24,1*	18,2*
ITPKB	Inositol 1,4,5-trisfosfato 3-quinasa B	Hs.528087	1q41-q43	14,8*	11,5*
INPP1	Inositol polifosfato-1-fosfatasa	Hs.32309	2q32	21,5**	24,9**
CDS1	CDP-diacilglicerol sintasa 1	Hs.444924	4q21.23	-29,5**	-24,2*
PIK3C2A	Fosfoinositida-3-quinasa catalítica 2A	Hs.175343	11p15-p14		22,3**
PIK3C2B	Fosfoinositida-3-quinasa catalítica 2B	Hs.497487	1q32	16,6*	14,8*
PIK3R1	Fosfoinositida-3-quinasa reguladora 1	Hs.132225	5q13	-32,0**	
PRKCI	Proteína quinasa C (iota)	Hs.478199	3p25-q27	-29,5**	

**Los p-valores que muestran una tasa de falso descubrimiento (FDR) de menos del 5 %

*p-valor de menos de 0,05 independientemente de la FDR

La probabilidad de que el grupo de las fosfatidilinositol 3 quinasa se detecten al azar como genes expresados diferencialmente en la comparación entre BPD y el control, basándose en una distribución hipergeométrica, fue $p = 0,042$ ($q = 0,36$).

FIG. 8
Desregulación de genes implicados en las rutas de señalización de fosfatidilinositol en corteza cingulada anterior de pacientes con MDD

Símbolo	Nombre	UniGene ID	Citobanda	Cohorte de MOD A		Cohorte de MOD B
				U95Av2	U133A	
NTSR2	Receptor de neurotensina 2	Hs.131138	2p25.1	-13,9*	-18,6*	-24,7**
EDNRB	Receptor de endotelina tipo B	Hs.82002	13q22.		-31,2**	-15,9*
ITPKB	Inositol 1,4,5-trisfosfato 3-quinasa B	Hs.528087	1q41-q43	-12,7*	-12,3*	-34,0**
INPP5F	Inositol polifosfato-5-fosfatasa F	Hs.369755	10q26		21,8**	
1TPR1	Receptor de inositol 1,4,5-trisfosfato 1	Hs.374613	3p26-p25	13,0*	17,4*	
PRKCB1	Proteína quinasa C beta 1	Hs.460355	16p11	14,8*	11,5*	
PIK3C2A	Fosfoinositina-3-quinasa catalítica 2A	Hs.175343	11p15-p14	-14,1*	-35,9**	-20,2*

**Los p-valores que muestran una tasa de falso descubrimiento (FDR) de menos del 5 %

*p-valor de menos de 0,05 independientemente de la FDR

FIG. 9

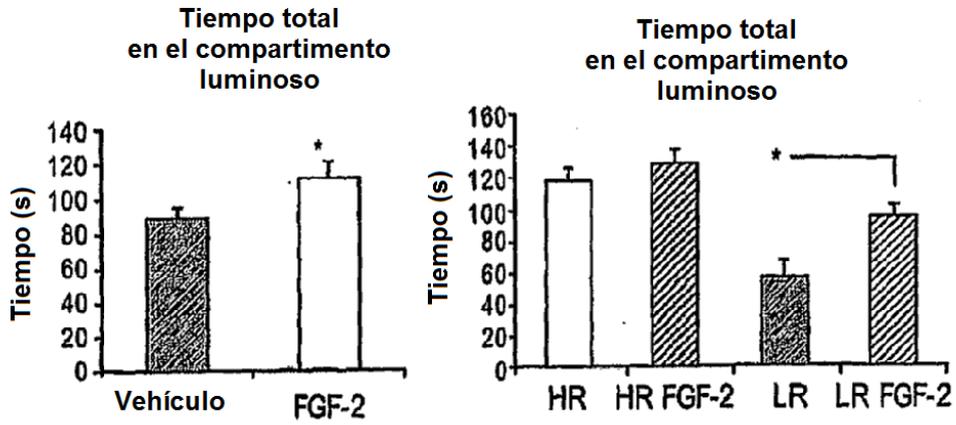
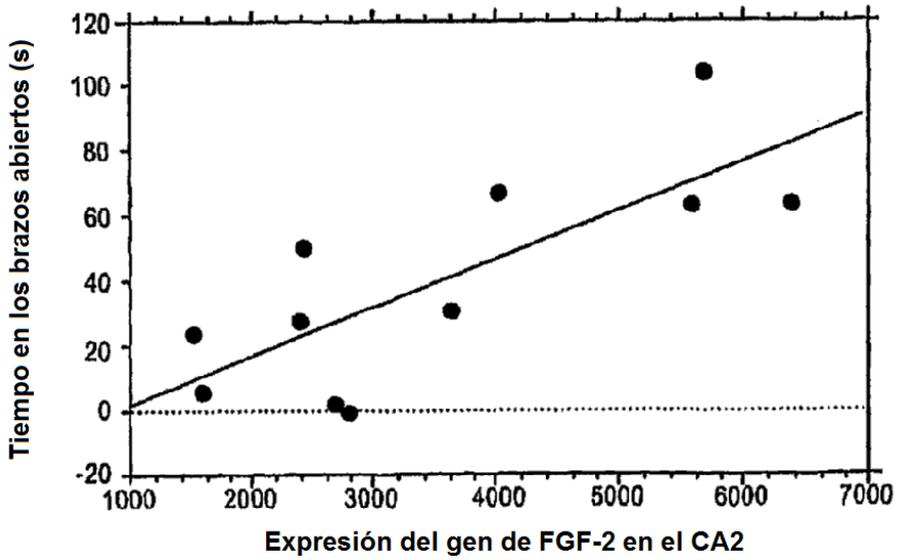
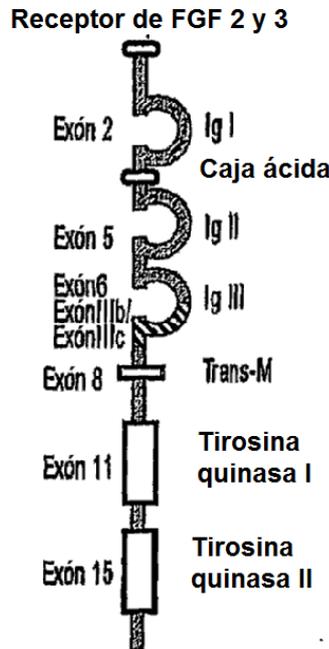


FIG. 10



Coefficiente de correlación = 0,77; P<003.

FIG. 11



Secuencias de cebadores de FGFR2 y FGFR3

Amplicón	Cebador	Secuencia	Cebador	Secuencia
Exón 2	R2 F	5'-GCCGTGATCAGTTGGACTAAG-3'	R3 F	5'-AGAGGCTTCAAGTGCTAAACG-3'
	R2 R	5'-TGTGGCACCTTTTATCTGGAG-3'	R3 R	5'-GCACACTAAAGTGGCACAGC-3'
Exón 5	R2 F	5'-TATGGAAAGTGTGGTCCCATC-3'	R3 F	5'-TGGAGCTTGGTCATGGAAAG-3'
	R2 R	5'-ACATCAAGGTGGTAGGTGTGG-3'	R3 R	5'-GGATGCTGCCAAACTTGTTC-3'
Exón 6	R2 F	5'-GGAGGGGACGTAGAATTTGTC-3'	R3 F	5'-CCAACCAGACAGCCGTTTC-3'
	R2 R	5'-CTTCAGGACCTTGAGGTAGGG-3'	R3 R	5'-CATTCACCTCCACGTGCTT-3'
Exón IIIb	R2 F	5'-GGGGATAAATAGCTCCAATGC-3'	R3 F	5'-CCTGGATCAGTGAGAATGTGG-3'
	R2 R	5'-CATATATATTCGCCAGCATCCATC-3'	R3 R	5'-AAATTGGTGGCTCGACAGAG-3'
Exón IIIc	R2 F	5'-ACACCACGACAAAGAAATTG-3'	R3 F	5'-TGTCCCTTGACAATGTCACC-3'
	R2 R	5'-ATAGAATTACCCGCCAAGCAC-3'	R3 R	5'-ACGCAGAGTGATGGGAAAAC-3'
Exón 8	R2 F	5'-GATCACAGCTTCCCAGATTAC-3'	R3 F	5'-GGAGGAGCTGATGGAAGTTG-3'
	R2 R	5'-TCTTGGTCGTGGTCTTCATTC-3'	R3 R	5'-CCACCAGGATGAAGAGGAAG-3'
Exón 11	R2 F	5'-AGAGAAGGACCTGTCTGACCTG-3'	R3 F	5'-ATGCCACTGACAAGGACCTG-3'
	R2 R	5'-CCCAGGAGGTTGATGATGTTTC-3'	R3 R	5'-CCCCAACAGGTTAATGATG-3'
Exón 15	R2 F	5'-GTCCTTCGGGGTGTAAATGTG-3'	R3 F	5'-TCCTTTGGTGTCTCCTCTG-3'
	R2 R	5'-AGTTCATTGGTGCAGTTGGTG-3'	R3 R	5'-CAGTTGGCTGGCTTGTCC-3'

FIG. 12

