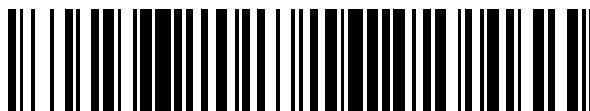


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 145**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2009** **E 09775225 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015** **EP 2376649**

54 Título: **Evaluación del riesgo potencial de alteración del estado de ánimo y suicidio inducidos farmacológicamente: utilización de una plataforma dedicada**

30 Prioridad:

17.12.2008 EP 08305963

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

16.07.2015

73 Titular/es:

**ALCEDIAG (100.0%)
Route des Michels, La Cornereille
13790 Peynier, FR**

72 Inventor/es:

**WEISSMANN, DINAH;
PUJOL, JEAN-FRANÇOIS;
VINCENT, LAURENT y
CAVAREC, LAURENT**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 541 145 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

Evaluación del riesgo potencial de alteración del estado de ánimo y suicidio inducidos farmacológicamente: utilización de una plataforma dedicada.

La presente invención se refiere a métodos *in vitro* para la determinación de la toxicidad potencial de compuestos de ensayo. La invención comprende además métodos *in vitro* para la selección de compuestos terapéuticos útiles para el tratamiento de patologías relacionadas con la alteración del mecanismo de edición del ARNm dependiente de ADAR A a I del receptor de serotonina 2C (5HTR2C). Finalmente, la presente invención se refiere a los kits y herramientas para la implementación de dichos métodos. La invención resulta de especial utilidad en la industria farmacéutica para el análisis del perfil de toxicidad o para el cribado de compuestos en el desarrollo de fármacos y/o de composiciones farmacéuticas.

La toxicidad es el motivo principal para abandonar moléculas terapéuticas candidatas durante el desarrollo preclínico y clínico. Según los conocimientos de los presentes inventores, actualmente existe una necesidad de proporcionar ensayos con los que determinar rápidamente el perfil de toxicidad de un compuesto en el ser humano. En general, estos ensayos son largos y costosos y sólo resultan parcialmente satisfactorios. Por ejemplo, la toxicidad animal está lejos de ser un reflejo de la toxicidad en el ser humano. Además, el reducido número de pacientes incluidos en los ensayos clínicos no permite identificar sistemáticamente las toxicidades asociadas a una población específica de pequeño tamaño. El desarrollo, perfeccionamiento y utilización de dichos ensayos debería permitir la identificación y eliminación de los compuestos tóxicos del procedimiento de desarrollo tan pronto como resulte posible en el procedimiento. De esta manera, los nuevos fármacos podrían comercializarse antes y a un menor coste para las compañías farmacéuticas y, a su vez, para las organizaciones de cuidado de la salud y para el consumidor. Además, dichos ensayos también podrían permitir la detección de algunas toxicidades que actualmente salen a la luz sólo durante el periodo posterior a la comercialización.

Los estudios de asociación genética, ratones con inactivaciones génicas y análisis post-mortem han sugerido la participación del receptor de serotonina 2C (HTR2C) en trastornos neuropsiquiátricos. En primer lugar un polimorfismo alélico funcional (Cys23Ser) de HTR2C se asocia a depresión y trastorno bipolar (Lerer *et al.*, Mol. Psychiatry 6:579-585, 2001). En segundo lugar, los ratones que no presentan receptor de serotonina 5-HT2C manifiestan convulsiones espontáneas, alteraciones cognitivas y un control anormal de la conducta alimentaria (Tecott *et al.*, Nature 374:542-546, 1995). Estos animales también son hipersensibles al estrés repetido (Chougreen *et al.*, Physiol. Behav. 79:217-226, 2003). En tercer lugar, en cerebros post-mortem de pacientes afectados por trastorno bipolar o esquizofrenia, la expresión de ARN del receptor de serotonina 5-HT2C se encuentra regulado negativamente (Iwamoto *et al.*, Mol. Psychiatry 9:406-416, 2004; Castensson *et al.*, Biol. Psychiatry 54:1212-1221, 2003). También se cree que la edición del ARN de HTR2C participa en la fisiopatología de los trastornos mentales y la acción de los antidepresivos (Seeburg, Neuron 35:17-20, 2002). Se editan cinco residuos de adenosina (denominados A, B, C, D y E o C') en una región codificante del segundo bucle intracelular del receptor de serotonina 5-HT2C y pueden conducir a sustituciones de aminoácidos en tres posiciones diferentes de la secuencia del receptor. La sustitución combinatorial de estos residuos amino genera hasta 24 isoformas de la proteína HTR2C con diferentes eficiencias de acoplamiento a G (Price *et al.*, J. Biol. Chem. 276:44663-44668, 2001). En ratones, en comparación con las cepas endogámicas C57BL/6 y 129sv, la cepa BALB/c muestra un patrón de edición del pre-ARNm de 5-HT2C neocortical del cerebro frontal basal diferente que podría subyacer a su diferencia de reactividad frente al estrés. Además, los ratones BALB/c muestran cambios inducidos por estrés en la edición del pre-ARNm de 5-HT2C que son similares a los detectados en cerebros de víctimas de suicidio deprimidas (Englander *et al.*, J. Neurosci. 25:648-651, 2005). De hecho, en cerebros post-mortem, se ha informado de la edición alterada del ARN de HTR2C en pacientes con esquizofrenia, depresión y aquellos que habían cometido suicidio (Niswender *et al.*, Neuropsychopharmacology 24:478-491, 2001; Sodhi *et al.*, Mol. Psychiatry 6:373-379, 2001; Gurevich *et al.*, Neuron 34:349-356, 2002; Dracheva S. *et al.*, Molecular Psychiatry 13:1011-10, 2008). Además, el interferón- α se utiliza en el tratamiento de la hepatitis C pero los síntomas de depresión con frecuencia aparecen como un efecto secundario de esta molécula en los pacientes y Yang *et al.* han demostrado que esta molécula altera fuertemente la edición del receptor 5HT2C (ver ref. en Tohda *et al.*, J. Pharmacol. Sci. 100:427-432, 2006).

Algunos estudios anteriores han demostrado que el receptor de serotonina 5-HT2C se expresa principalmente en el cerebro, particularmente en el plexo coroide, córtex prefrontal, áreas límbicas, ganglios basales e hipotálamo (Tohda *et al.*, Neurosci. Res. 24:189-193, 1996; Julius *et al.*, 241:558-564, 1988; Pasqualetti *et al.*, Neuroscience 92:601-611, 1999). Este patrón específicamente cerebral de expresión restringe las investigaciones de las asociaciones potenciales existentes entre la edición del ARN de HTR2C y el estado psiquiátrico a estudios post-mortem.

Recientemente se ha desarrollado un nuevo método que permite cuantificar a partir del ARN total de tejidos el perfil de edición completo de 5-HT2CR en un único ensayo (Poyau *et al.*, Electrophoresis 28:2843-52, 2007). El ensayo determina el porcentaje de cada isoforma editada y no editada en la fracción de ARNm específico contenido en la muestra de tejido. Se adapta muy bien a la evaluación de variaciones de la edición en regiones cerebrales específicas en el ratón, la rata y el ser humano. Este tipo de tecnología ha tenido éxito en el análisis del perfil de edición en células neurales en cultivo primario (Chanrion B. *et al.*, Molecular Pharmacol. 73:748-57, 2008).

El interés principal de los inventores de dicha evaluación es que permite extraer del perfil un índice de actividad de los isoenzimas de edición ADAR 1a, 1b, ADAR2, ya que los isoenzimas ADAR1 editan los sitios A, B y también C y E y ADAR2 puede editar los sitios D, C y E. De esta manera, de hecho, se admite que una isoforma en la que los sitios A y/o B han sido editados, que ha sido transformada por los isoenzimas ADAR1, los cuales actúan solos en el caso de que el sitio D no sea editado (isoformas editadas: A, AB, ABC, ABCE, ABE, AC, ACE, AE, B, BC, BCE, BE) o que actúan conjuntamente con ADAR2 en el caso de que las isoformas presenten también el sitio D editado (isoformas editadas: ABCD, ABCDE, ABD, ABDE, ACD, ACDE, AD, ADE, BCD, BCDE, BD, BDE, C, CE, E).

Las isoformas en las que los sitios A y/o B no se han editado y el sitio D se ha editado se consideran el resultado de la acción de sólo ADAR2.

Conjuntamente con dicho análisis del perfil de edición completo de 5-HT₂CR, los inventores han demostrado que una evaluación de la expresión de los isoenzimas ADAR como enfoque complementario resulta particularmente adecuada para la evaluación del contexto general de edición de la maquinaria de edición. Incluye el análisis cuantitativo y cualitativo de la expresión de los isoenzimas ADAR (ARNm, es decir, RT-PCR cuantitativa y/o a partir de la proteína codificada correspondiente, es decir, mediante transferencia western).

Considerando la advertencia especial de la Food and Drug Administration (FDA) sobre el riesgo de suicidio respecto a fármacos antiepilépticos, antidepresivos y antipsicóticos, por ejemplo, recientemente se ha encontrado que el fármaco para la pérdida de peso AcompliaTM (rimonabant) induce un comportamiento suicida y otros efectos secundarios psicológicos en algunos pacientes, dificultando estos conocidos efectos secundarios neuropsiquiátricos que la FDA y la Agencia Europea del Medicamento aprecien una relación riesgo-beneficio positiva para este nuevo fármaco y motivando que finalmente recomienden su retirada del mercado debido a sus efectos secundarios.

Tal como se ha indicado anteriormente, existe una necesidad de proporcionar ensayos que puedan determinar rápidamente la toxicidad o el perfil de potenciales efectos secundarios de un fármaco en el ser humano, particularmente antes del periodo que sigue a la comercialización.

Por dicho motivo los inventores han decidido desarrollar una plataforma dedicada que podría proponerse para la evaluación, por ejemplo en un estadio preclínico, del potencial efecto de nuevas moléculas terapéuticas sobre la regulación de la edición, ya que se ha encontrado que la edición se encuentra alterada en pacientes que sufren de depresión, psicosis o que han cometido suicidio.

Los inventores han demostrado que:

- mediante la utilización de estirpes celulares de mamífero particulares, en particular estirpes celulares humanas, que expresaban los enzimas de edición ADAR1a, ADAR1b y ADAR2 y el receptor de 5-HT₂C, y

- mediante la comparación entre las células de control y las células tratadas con el compuesto que debe someterse a ensayo,

- a) la actividad de dichos enzimas de edición (obtenidos mediante análisis del perfil de edición que proporciona la proporción media de cada isoforma identificada del ARNm de 5-HT₂CR medido en el extracto celular de ARN) y/o

- b) la expresión cuantitativa de dichos enzimas de edición ADAR1a, ADAR1b y ADAR2 (es decir, mediante Q-PCR o mediante transferencia western),

resulta posible predecir el riesgo final de que estos compuestos produzcan alteraciones del humor mediante una alteración crónica de la transmisión de 5-HT.

A continuación, la presente exposición describe métodos eficaces y rápidos mediante los que se determina la potencial toxicidad o eficacia de los compuestos de ensayo, así como herramientas y kits para la implementación de dichos métodos.

De esta manera, la presente exposición se refiere a un método *in vitro* para la determinación o la predicción de la potencial toxicidad o efectos secundarios de un compuesto de ensayo que pueden resultar tras su administración en un paciente, que comprende las etapas siguientes:

- a) obtención de una muestra biológica que contiene células de mamífero, en la que dichas células de mamífero expresan los enzimas de edición ADAR1a, ADAR1b y ADAR2 y el receptor de serotonina 2C (5HT₂C),

- b) puesta en contacto de dichas células de mamífero con el compuesto que debe someterse a ensayo,

- c) determinación en el mismo extracto celular de:

- el perfil de edición que proporciona la proporción media de cada isoforma identificada del ARNm de 5-HT2CR medido en el extracto celular de ARN, y/o

- la expresión cuantitativa de dichos enzimas de edición ADAR1a, ADAR1b y ADAR2,

d) comparación entre los resultados obtenidos en la etapa c) entre dichas células tratadas con el compuesto que debe someterse a ensayo y células de control no tratadas o células puestas en contacto con un compuesto de control, en el que las células de mamífero proceden de la estirpe celular SH-S5Y.

En el contexto de la exposición, el término "toxicidad" se refiere a cualquier efecto adverso y/o efecto secundario de un compuesto sobre el metabolismo de una célula o un tejido, y más generalmente a cualquier alteración del metabolismo que puede resultar en un efecto perjudicial del compuesto sobre el paciente, en particular en el contexto de la presente invención el riesgo potencial de alteraciones del humor y suicidio inducidos farmacológicamente.

La expresión "compuesto de ensayo" se refiere en general a un compuesto al que se expone un sujeto de ensayo. Los compuestos de ensayo típicos son moléculas orgánicas pequeñas, típicamente fármacos y/o compuestos farmacéuticos prospectivos de cabeza de serie, aunque pueden incluir proteínas, péptidos, polinucleótidos, genes heterólogos (en sistemas de expresión), plásmidos, análogos de polinucleótido, análogos de péptido, lípidos, carbohidratos, virus, fagos, parásitos y similares.

La expresión "compuesto de control" se refiere a un compuesto que no es conocido que comparta ninguna actividad biológica con un compuesto de ensayo, que se utiliza en la práctica de la invención para comparar compuestos "activos" (de ensayo) e "inactivos" (de control) durante la derivación de Firmas de grupo y Firmas de fármaco. Entre los compuestos de control típicos se incluyen, aunque sin limitación, fármacos utilizados para tratar trastornos diferentes de las indicaciones del compuesto de ensayo, vehículos, versiones inactivadas del agente de ensayo, compuestos inertes conocidos y similares.

En un segundo aspecto, la presente exposición se refiere además a un método *in vitro* para la selección de compuestos terapéuticos útiles en el tratamiento de patologías relacionadas con una alteración del mecanismo de la edición del ARNm dependiente de ADAR A a I de 5-HT2C, que comprende las etapas siguientes:

a) obtención de una muestra biológica que contiene células de mamífero, en la que dichas células de mamífero que expresan los enzimas de edición ADAR1a, ADAR1b y ADAR2 y el receptor de 5-HT2C,

b) puesta en contacto de dichas células de mamífero con el compuesto que debe someterse a ensayo,

c) determinación en el mismo extracto celular de:

- el perfil de edición que proporciona la proporción media de cada isoforma identificada del ARNm de 5-HT2CR medido en el extracto celular de ARN, y/o

- la expresión cuantitativa de dichos enzimas de edición ADAR1a, ADAR1b y ADAR2,

d) comparación entre los resultados obtenidos en la etapa c) entre dichas células tratadas con el compuesto que debe someterse a ensayo y células de control no tratadas o células puestas en contacto con un compuesto de control, y

e) selección del compuesto sometido a ensayo, muestre dicho compuesto sometido a ensayo la alteración o la no alteración del perfil de edición de HT2CR y/o de los enzimas de edición ADAR1a, ADAR1b y ADAR2 que se desea obtener.

En una forma de realización preferida, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para la determinación o para la predicción de la toxicidad potencial o efectos secundarios de un compuesto de ensayo o para la selección de un compuesto terapéutico, en el que la etapa c) comprende determinar en el mismo extracto celular:

- el perfil de edición que proporciona la proporción media de cada isoforma identificada del ARNm de 5-HT2CR medido en el extracto celular de ARN y, opcionalmente,

- la expresión cuantitativa de dichos enzimas de edición ADAR1a, ADAR1b y ADAR2.

En una forma de realización todavía más preferida, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para la determinación o para la predicción de la toxicidad potencial o efectos secundarios de un compuesto de ensayo o para la selección de un compuesto terapéutico, en el que la etapa c) comprende determinar en el mismo extracto celular:

- el perfil de edición que proporciona la proporción media de cada isoforma identificada del ARNm de 5-HT2CR medido en el extracto celular de ARN, y
- la expresión cuantitativa de dichos enzimas de edición ADAR1a, ADAR1b y ADAR2.

En una forma de realización preferida, en la etapa a) de los métodos de la presente exposición, dichas células de mamífero son capaces de expresar un número significativo de isoformas editadas de ARNm de 5HT2CR, demostrando que dichos enzimas ADAR1a, ADAR1b y ADAR2 son activos en el control de la producción de varias isoformas editadas del receptor en dichas células.

Más preferentemente, dichas células de mamífero son capaces de presentar por lo menos los sitios A, B y también C y E editados, también más preferentemente son células de mamífero que pueden presentar por lo menos 1, preferentemente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 isoformas ADAR 1 editadas seleccionadas de entre el grupo que consiste en las isoformas editadas A, AB, ABC, ABCE, ABE, AC, ACE, AE, B, BC, BCE, BE, conjuntamente con por lo menos 1, preferentemente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 isoformas que presentan también el sitio D editado seleccionadas de entre el grupo de las isoformas editadas ABCD, ABCDE, ABD, ABDE, ACD, ACDE, AD, ADE, BCD, BCDE, BD, BDE, C, CE y E.

En una forma de realización preferida de los métodos de la presente exposición en la etapa a), dichas células de mamífero son estirpes celulares, particularmente de ser humano, ratón o rata.

En una forma de realización más preferida de los métodos de la presente exposición en la etapa a), dichas células de mamífero son estirpes celulares de mamífero, particularmente de ser humano, ratón o rata, que muestran una expresión constante y constitutiva de los enzimas ADAR1 y ADAR2 de 5HT2CR, preferentemente de los enzimas ADAR1a, ADAR1b y ADAR2.

La característica "muestra una expresión constante y constitutiva de los enzimas ADAR1 y ADAR2 de 5HT2CR, preferentemente de los enzimas ADAR1a, ADAR1b y ADAR2", resulta muy importante en el sentido de que la expresión del contenido de los enzimas ADAR1 y ADAR2 de 5HT2CR debe ser constante (regular) en el caso de que las células se encuentren en cultivo y no sean tratadas (células de control) con el fin de disponer de datos fiables para comparar con las células tratadas (robustez y fiabilidad del ensayo).

Por ejemplo, los inventores han demostrado inesperadamente (ver la Tabla 5 del Ejemplo 5, que las células HTB-14 (línea celular de glioma) no expresan suficiente 5HT2CR de manera constante y constitutiva y no pueden utilizarse como estirpe celular de mamífero en el método de la presente invención.

La expresión de los enzimas de edición ADAR por sí sola no resulta suficiente para predecir la potencial toxicidad o los efectos secundarios de un compuesto de ensayo o para seleccionar un compuesto terapéutico según la presente invención o para encontrar un nuevo compuesto de referencia (tal como interferón alfa) para comparar el efecto de un compuesto sometido a ensayo sobre la alteración de la edición de 5HT2CR y para predecir la potencial toxicidad o efectos secundarios en vista de la alteración y toxicidad/efectos secundarios conocidos de dichos compuestos de referencia (panel de compuestos de referencia en el que sus efectos sobre la alteración de la edición de 5HT2CR han sido estudiados sobre estirpes celulares de mamífero utilizadas en el método de la presente invención (tal como la estirpe celular de neuroblastoma (es decir SH-SY5Y) y en el que se conocen la toxicidad o efectos secundarios potenciales) en vista de la alteración y toxicidad/efectos secundarios conocidos de dichos compuestos de referencia.

De hecho, la expresión cuantitativa de los ADAR no resulta suficiente para predecir su efecto combinado sobre la edición de 5HT2C. El ensayo de cuantificación de ADAR no es un ensayo de actividad y los inventores han demostrado que sólo la determinación de la distribución de todas las isoformas de 5HT2C resulta significativa en el caso de una alteración real de la edición de 5HT2C. Por este motivo resulta preferente determinar la distribución de todas las isoformas de 5HT2C en relación con la acción de los enzimas de edición.

En una forma de realización todavía más preferida de los métodos de la presente exposición en la etapa a), dichas células de mamífero son estirpes celulares de mamífero, particularmente de ser humano, ratón o rata, que presentan las características siguientes:

- 1) presentan una expresión constante y constitutiva de los enzimas ADAR1 y ADAR2 de 5HT2CR, preferentemente de los enzimas ADAR1a, ADAR1b y ADAR2,
- 2) en el caso de que dicha célula de mamífero se trate con un fármaco capaz de alterar la edición de 5HT2CR,
 - capaz de expresar un número significativo de isoformas editadas de 5HT2CR,
 - preferentemente capaz de expresar por lo menos una isoforma de 5HT2CR que muestra por lo menos el sitio de edición A editado, una isoforma de 5HT2CR que muestra por lo menos el sitio de edición B editado, una isoforma de 5HT2CR que muestra por lo menos el sitio de edición C editado, una isoforma de 5HT2CR que muestra por lo

menos el sitio de edición D editado y una isoforma de 5HT2CR que muestra por lo menos el sitio de edición E editado, preferentemente con la adición de la isoforma de 5HT2CR no editada, en el caso de que dicha célula de mamífero se trate con un fármaco capaz de alterar la edición de 5HT2CR,

- 5 - más preferentemente resulta posible expresar la totalidad de las isoformas editadas y no editadas de 5HT2CR.

En una forma de realización particular, dicho fármaco capaz de alterar la edición de 5HT2CR es interferón-alfa, en el caso de que dichas estirpes celulares deban someterse a ensayo y seleccionarse para su capacidad de mostrar una alteración de la edición de 5HT2CR y de expresar o no determinadas isoformas de 5HT2CR en presencia de dicho fármaco de 5HT2CR.

En una forma de realización más preferida de los métodos de la presente exposición en la etapa a), dichas células de mamífero son estirpes celulares de mamífero, particularmente de ser humano, ratón o rata, que muestran una expresión constante o constitutiva de los enzimas 5HT2CR, ADAR1 y ADAR2, preferentemente de los enzimas ADAR1a, ADAR1b y ADAR2.

En una forma de realización todavía más preferida de los métodos de la presente exposición en la etapa a), dichas células de mamífero son estirpes celulares de mamífero, particularmente de ser humano, ratón o rata, que presentan las características siguientes:

a) presentan una expresión constante y constitutiva de los enzimas ADAR1 y ADAR2 de 5HT2CR, preferentemente de los enzimas ADAR1a, ADAR1b y ADAR2,

b) - son capaces de expresar un número significativo de isoformas editadas de 5HT2CR, preferentemente la totalidad de las isoformas editadas de 5HT2CR y, en el caso de que dichas células de mamífero se traten con un fármaco capaz de alterar la edición de 5HT2CR, y

- en los que el fármaco capaz de alterar la edición de 5HT2CR es un fármaco que es conocido que presenta una advertencia de la comunidad científica y/o de la Food and Drug Administration (FDA) sobre el riesgo de efectos secundarios en algunos pacientes que han recibido dicho fármaco, tal como efectos secundarios psicológicos o neuropsiquiátricos, en el que esta alteración puede relacionarse, de esta manera, con dicha advertencia.

En una forma de realización todavía más preferida de los métodos de la presente exposición en la etapa a), dichas células de mamífero proceden de una estirpe celular de neuroblastoma, particularmente de una estirpe celular de neuroblastoma humano.

En una forma de realización preferida de los métodos de la presente exposición en la etapa a), dichas células de mamífero son de ser humano, ratón o rata, más preferentemente dichas células de mamífero son células de una estirpe celular de neuroblastoma, particularmente de una estirpe celular de neuroblastoma humano.

En una forma de realización más preferida de los métodos de la presente exposición en la etapa a), dichas células de mamífero son de la estirpe celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, particularmente de la estirpe celular SH-SY5Y nº EC94030304 de la European Collection of Cell Cultures (ECACC).

En una forma de realización preferida, en la etapa c) de los métodos de la presente invención, el perfil de edición de cada isoforma identificada del ARNm de 5-HT2CR y la expresión cuantitativa de dichos enzimas de edición ADAR1a, ADAR1b y ADAR2, se determinan en el mismo extracto celular.

En una forma de realización preferida de los métodos de la presente exposición en la etapa c), en el caso de que el perfil de edición de cada isoforma identificada del ARNm de 5-HT2CR y la expresión cuantitativa del ARNm de dichos enzimas de edición ADAR1a, ADAR1b y ADAR2 se determinen en el mismo extracto celular, se determinan en el mismo extracto celular de ARN total.

En una forma de realización preferida de los métodos de la presente exposición en la etapa c), el análisis de los resultados de la determinación del perfil de edición permite obtener los índices de actividad de dichos enzimas de edición, ADAR1a, ADAR1b y ADAR2.

En una forma de realización más preferida, dichos índices de actividad de dichos enzimas de edición se calculan mediante un método que comprende las etapas de:

a) determinación de la proporción media (%), preferentemente $\pm$ SEM ($n \geq 3$, 4, 5 y 6) de cada isoforma identificada del ARNm de 5-HT2CR medido en el ARN celular, o de la proporción media de por lo menos el grupo de isoformas correspondiente a los sitios de edición seleccionados entre los asociados a la firma de la etapa c) (sitios de edición A, B, C, D y/o E), o la proporción media de por lo menos las isoformas principales observadas en una muestra de control y/o en una muestra tratada de referencia y correspondientes a los sitios de edición seleccionados entre los asociados a la firma de la etapa c) (sitios de edición A, B, C, D y/o E),

b) opcionalmente, clasificación de dichas isoformas en función del incremento algebraico de la comparación con el control y, opcionalmente, con un grupo de referencia, preferentemente con un grupo tratado con un fármaco de referencia,

c) determinación de una firma asociada y significativa de la actividad de los enzimas de edición, preferentemente mediante clasificación de los productos de las actividades enzimáticas, más preferentemente mediante un método que calcula y relaciona el porcentaje de edición de por lo menos dos, preferentemente 3 o 4, sitios de edición seleccionados de entre los sitios de edición A, B, C, D y E, más preferentemente mediante un método que calcula y relaciona el porcentaje de edición de cada uno de los sitios de edición encontrados en cada parte de la firma, y

d) opcionalmente, clasificación de la actividad expresada mediante la medición del % representado por todas las isoformas, o por las isoformas seleccionadas, en las que se ha implicado la acción de ADAR1 (ADAR I) o ADAR2 (ADAR II).

Respecto a la etapa a), puede seleccionarse para evaluar sólo cierta acción de edición específica, por ejemplo para identificar la proporción de productos de las actividades enzimáticas en las que sólo se ha encontrado la edición de los sitios C y E, o de A y C, A y B, A y B y C, etc. La isoforma no editada (NE) también puede ser significativa y en consecuencia, seleccionarse.

Por ejemplo, en el caso de que deba realizarse una comparación con una muestra de referencia que ha sido tratada con un fármaco, puede seleccionarse para evaluar únicamente la adición de edición específica que se ha demostrado que resulta alterada por dicho tratamiento, en comparación con la muestra de control, e identificar de esta manera únicamente la proporción de los productos correspondientes de dichos enzimas específicos (actividades enzimáticas en las que únicamente se observado la alteración de los sitios C y E, o A y C, A y B, A y B y C, etc.).

En una forma de realización todavía más preferida, dichos índices de actividad de dichos enzimas de edición se calculan a partir de las isoformas de edición debido a la acción de por lo menos ADAR1 solo (ADAR I) y de la acción de ADAR2 (ADAR2).

En una forma de realización todavía más preferida, dichos índices de actividad de dichos enzimas de edición se calculan a partir de las isoformas de edición debido a la acción de ADAR1 solo y la acción combinada de ADAR1 y ADAR2 (ADAR1+2) y de la acción exclusiva de ADAR2 (ADAR2).

En una forma de realización todavía más preferida, la etapa a) del método de cálculo de dichos índices de actividad de dichos enzimas de edición comprende la determinación de la proporción media (%), preferentemente $\pm$ SEM ($n \geq 3$, 4, 5 y 6) de la totalidad de las 32 isoformas del ARNm de 5-HT₂CR capaces de encontrarse presentes en el extracto celular de ARN tras la puesta en contacto de las células con el compuesto que debe someterse a ensayo.

En una forma de realización preferida de los métodos de la presente exposición en la etapa c), la expresión cuantitativa de dichos enzimas de edición, ADAR1a, ADAR1b y ADAR2, se determina mediante la medición de la expresión de ARNm de dichos enzimas de edición o mediante la medición de dichas proteínas enzimáticas de edición expresadas en el extracto celular.

En una forma de realización preferida de los métodos de la presente exposición, la potencial toxicidad o los efectos secundarios de dicho compuesto de ensayo que deben determinarse son el riesgo potencial de alteraciones del humor y suicidio inducidos por el fármaco, particularmente trastornos mentales, esquizofrenia, depresión, suicidio depresivo o conducta alimentaria anormal.

En una forma de realización preferida de los métodos de cribado y/o selección de compuestos farmacológicos potenciales de la presente invención, para el tratamiento de patologías relacionadas con la alteración de la edición del ARNm de 5-HT₂CR tras su administración, se encuentran patologías seleccionadas de entre el grupo que consiste en trastornos mentales, esquizofrenia, depresión, suicidio depresivo o conducta alimentaria anormal.

En una forma de realización preferida de los métodos de la presente exposición en la etapa b) dichas células de mamífero se cultivan en presencia del compuesto que debe someterse a ensayo en un medio adecuado o conveniente para el cultivo de dichas células de mamífero y preferentemente conveniente para la expresión de 5-HT₂CR y los enzimas de edición ADAR1 (1a y 1b) y ADAR2.

Preferentemente, en la etapa b) dichas células de mamífero se cultivan en presencia del compuesto que debe someterse a ensayo durante por lo menos el tiempo necesario para modificar la expresión de las isoformas editadas del ARNm de 5HT₂CR y/o los enzimas ADAR1a, ADAR1b y ADAR2 expresados, si pueden resultar modificados por dicho compuesto.

Preferentemente en la etapa b) dichas células de mamífero se cultivan en presencia de los compuestos que deben someterse a ensayo durante por lo menos 1 hora, más preferentemente durante por lo menos 5, 10, 16, 24 y 48 horas antes de la etapa c) de determinación en el mismo extracto celular del perfil de edición de cada isoforma identificada del ARNm de 5-HT2CR y/o la expresión cuantitativa de dichos enzimas de edición ADAR1a, ADAR1b y ADAR2.

Los métodos para determinar el estado de equilibrio de la edición incluyen determinar el perfil de cada isoforma identificada del ARNm de 5-HT2CR medido en un extracto celular de ARN mediante una PCR de tipo anidado, que permite la determinación de la distribución exacta de las isoformas de ADAR expresadas en el extracto celular y la estimación, en el mismo extracto, del estado de equilibrio de la expresión de los enzimas de edición. También pueden encontrarse en la solicitud de patente PCR titulada "Peripheral tissue sample containing cells expressing the 5HTR2C y/o ADARs as markers of the alteration of the mechanism of the 5HTR2C mRNA editing and its applications" [Muestra de tejido periférico que contiene células que expresan 5HTR2C y/o ADAR como marcadores de la alteración del mecanismo de edición del ARNm de 5HTR2C y aplicaciones de los mismos], presentada el 13 de junio de 2008 con el número PCT/EP2008057519 y publicada el 18 de diciembre de 2008 (documento nº WO 2008/152146).

En una forma de realización preferida de los métodos de la presente exposición en la etapa c), el perfil de edición que proporciona la proporción media de cada isoforma identificada del ARNm de 5-HT2CR medido en el extracto celular de ARN se determina mediante una PCR de tipo anidado que comprende dos rondas de PCR, y en el que la primera ronda de PCR se lleva a cabo con los grupos de cebadores siguientes:

para las estirpes celulares de mamífero de ratón o rata:

directo: 5'-TGTCCTAGCCATTGCTGATATGC-3' (SEC ID nº 1),
inverso: 5'-GCAATCTTCATGATGGCCTTAGTC-3' (SEC ID nº 2),

para las estirpes celulares humanas:

directo: 5'-TGTCCTAGCCATTGCTGATATGC-3' (SEC ID nº 1),
inverso: 5'-GCAATCTTCATGATGGCCTTAGTC-3' (SEC ID nº 2), y

en el que la segunda ronda de PCR se lleva a cabo con el grupo de cebadores siguiente:

para estirpes celulares de ratón o rata:

directo: 5'-TTTGTGCCCCGTCTGGT-3' (SEC ID nº 5),
inverso: 5'-GCCTTAGTCCGCGAATTG-3' (SEC ID nº 6), y

para estirpes celulares humanas:

directo: 5'-ATGTGCTATTTTCAACAGCGTCCATC-3' (SEC ID nº 3),
inverso: 5'-GCAATCTTCATGATGGCCTTA-3' (SEC ID nº 4).

En una forma de realización preferida del método según la presente exposición, la tasa de edición de cada forma editada y no editada de dicho ARNm de 5HTR2C se determina mediante un método que comprende las etapas siguientes:

A) extracción de los ARN totales de dichas células de mamífero, seguido, en su caso, de la purificación de los ARNm,

B) transcripción inversa de los ARN extraídos en la etapa A), y

C) amplificación por PCR de los ADNc obtenidos en la etapa B) utilizando por lo menos una pareja de cebadores específica para el fragmento de ARNm de 5HTR2C que contiene los sitios de edición que pueden editarse, seleccionando dicha pareja de cebadores de manera que se amplifiquen todas las formas de edición y la forma no editada potencialmente presente en el extracto de ARN.

En una forma de realización preferida del método según la presente invención, la tasa de edición de cada forma editada y no editada de dicho ARNm de 5HTR2C se determina mediante un método que comprende las etapas siguientes:

A) extracción de los ARN totales de dichas células de mamífero, seguido, en su caso, de la purificación de los ARNm,

B) transcripción inversa de los ARN extraídos en la etapa A), y

C) amplificación por PCR de los ADNc obtenidos en la etapa B), utilizando por lo menos una pareja de cebadores específicos del fragmento de ARNm de 5HTR2C que contiene los sitios de edición que pueden editarse, seleccionando esta pareja de cebadores de manera que pueda amplificar la totalidad de las formas de edición y la forma no editada potencialmente presentes en el extracto de ARN,

y en el que la etapa B) de transcripción inversa se lleva a cabo mediante la utilización de un cebador oligonucleótido específico del gen 5HTR2C.

En una forma de realización preferida del método según la presente invención, en la etapa C), los cebadores utilizados en la etapa de amplificación por PCR (en la segunda ronda en el caso de una PCR de tipo anidado) se encuentran marcados, preferentemente marcados con fluoróforos.

En una forma de realización preferida de los métodos de la presente exposición en la etapa c), el perfil de edición que proporciona la proporción media de cada isoforma identificada del ARNm de 5-HT2CR se determina mediante un método CE-SSCP capaz de proporcionar el perfil de edición de cada una de las formas separadas editadas y no editadas de dicho ARNm, estando caracterizado dicho método SSCP porque comprende, tras la etapas A), B) y C), las etapas siguientes:

D) en su caso, la purificación de los productos de PCR obtenidos en la etapa C),

E) en su caso, la cuantificación de los productos de PCR obtenidos en la etapa D),

F) la disociación de los ADNc de doble cadena en ADNc de cadena sencilla, en particular mediante calentamiento seguido de un enfriamiento abrupto,

G) la separación de los ADNc de cadena sencilla mediante electroforesis capilar, y

H) la obtención del perfil de edición mediante lectura de la fluorescencia y, en su caso, la adquisición de los datos de perfil mediante el sistema de captación asociado al lector de fluorescencia.

En una forma de realización preferida de los métodos de la presente exposición en la etapa C), la pareja de cebadores específicos de la amplificación por PCR del ARNm de ADAR se seleccionan de entre el grupo que consiste en:

- para la amplificación del ARNm de la isoforma ADAR1-150 humana:

directo: 5'-GCCTCGCGGGCGCAATGAATCC-3' (SEC ID nº 7),
inverso: 5'-CTTGCCCTTCTTGCCAGGGAG-3' (SEC ID nº 8),

- para la amplificación del ARNm de la isoforma ADAR1-110 humana:

directo: 5'-CGAGCCATCATGGAGATGCCCTCC-3' (SEC ID nº 9),
inverso: 5'-CATAGCTGCATCCTGCTTGCCAC-3' (SEC ID nº 10),

- para la amplificación del ARNm de ADAR2 humano:

directo: 5'-GCTGCGCAGTCTGCCCTGGCCGC-3' (SEC ID nº 11),
inverso: 5'-GTCATGACGACTCCAGCCAGCAC-3' (SEC ID nº 12),

- para la amplificación del ARNm de la isoforma ADAR1-150 de ratón:

directo: 5'-GTCTCAAGGGTTCAGGGGACCC-3' (SEC ID nº 13),
inverso: 5'-CTCCTCTAGGGAATTCCTGGATAC-3' (SEC ID nº 14),

- para la amplificación del ARNm de la isoforma ADAR1-110 de ratón:

directo: 5'-TCACGAGTGGGCAGCGTCCGAGG-3' (SEC ID nº 15),
inverso: 5'-CTCCTCTAGGGAATTCCTGGATAC-3' (SEC ID nº 14), y

- para la amplificación del ARNm de ADAR2 de ratón:

directo: 5'-GCTGCACAGTCTGCCTTGGCTAC-3' (SEC ID nº 16),
inverso: 5'-GCATAAAGAAACCTGAGCAGGGAC-3' (SEC ID nº 17).

- En una forma de realización preferida de los métodos de la presente exposición, el compuesto que debe someterse a ensayo se administra además *in vivo* en un modelo animal, preferentemente en un ratón o una rata, adecuado para someter a ensayo el mismo compuesto y en el que la potencial toxicidad o efectos secundarios de dicho compuesto de ensayo tras su administración en dicho modelo animal pueden ser evaluados, particularmente mediante la evaluación de la alteración de la edición del ARNm de 5HT2CR y/o las isoformas de ADAR expresadas en muestras de sangre total y piel, o en el cerebro (tal como se da a conocer en la solicitud de patente internacional PCT presentada el 13 de junio de 2008 bajo el número PCT/EP2008057519 y publicada el 18 de diciembre de 2008 bajo el número WO 2008/152146).
- En otro aspecto, la presente exposición se refiere a un kit para la determinación de la potencial toxicidad o efectos secundarios de un compuesto de ensayo tras su administración en un paciente o para la selección de compuestos terapéuticos que resulten útiles para el tratamiento de patologías relacionadas con la alteración del mecanismo de edición del ARNm dependiente de ADAR A a I de 5HTR2C, comprendiendo dicho kit:
- a) células de mamífero de una estirpe celular en la que dichas células expresan los enzimas de edición ADAR1a, ADAR1b y ADAR2 y el receptor de serotonina 2C (5HTR2C), y
 - b) dos grupos de cebadores para la medición de cada isoforma del ARNm de 5-HT2CR que pueden encontrarse presentes en un extracto de ARN de dichas células de mamífero, mediante un método CE-SSCP que incluye una PCR de tipo anidado que comprende dos rondas de PCR, y/o
 - c) un grupo de cebadores para la medición mediante una Q-PCR cuantitativa de la expresión cuantitativa de los enzimas de edición ADAR1a, ADAR1b y ADAR2.
- En una forma de realización preferida del kit de la presente exposición, dichas células de mamífero son capaces de expresar un número significativo de isoformas editadas de ARNm de 5HT2CR, demostrando que dichos enzimas ADAR1a, ADAR1b y ADAR2 son activos en el control de la producción de varias isoformas editadas del receptor en estas células.
- Más preferentemente, dichas células de mamífero son capaces de presentar por lo menos los sitios A, B y también C y E editados; también resultan más preferida las células de mamífero que pueden encontrarse presentes en por lo menos 1, preferentemente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 isoformas de ADAR1 editadas seleccionadas de entre el grupo que consiste en las isoformas editadas A, AB, ABC, ABCE, ABE, AC, ACE, AE, B, BC, BCE, BE, conjuntamente con por lo menos 1, preferentemente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 isoformas que presentan además el sitio D editado seleccionadas de entre el grupo de las isoformas editadas ABCD, ABCDE, ABD, ABDE, ACD, ACDE, AD, ADE, BCD, BCDE, BD, BDE, C, CE y E.
- En una forma de realización preferida del kit de la presente exposición, dichas células de mamífero son de humanas, de ratón o de rata, más preferentemente dichas células de mamífero son células de una estirpe celular de neuroblastoma, particularmente de una estirpe celular humana de neuroblastoma.
- En una forma de realización más preferida del kit de la presente exposición, dichas células de mamífero son de la estirpe celular SH-SY5Y humana de neuroblastoma.
- En un aspecto particular, la presente exposición se refiere a un método *in vitro* para la determinación o para la predicción de la potencial toxicidad o efectos secundarios de un tratamiento de interferón-alfa (IFN α) tras su administración en un paciente, particularmente para un paciente infectado por el VCH (virus de la hepatitis C), comprendiendo dicho método las etapas siguientes:
- a) obtención de un muestra biológica que contiene glóbulos blancos de mamífero, preferentemente células leucocitos o monocitos, a partir de dicho paciente tratado,
 - b) determinación en el extracto celular de dicha muestra biológica que contiene glóbulos blancos de mamífero, de la expresión cuantitativa de cada uno de los enzimas de edición ADAR1a, ADAR1b y ADAR2, y opcionalmente proporcionando el perfil de edición la proporción media de cada isoforma identificada del ARNm de 5-HT2CR medido en el extracto celular de ARN,
 - d) comparación de los resultados obtenidos en la etapa b) entre dichas células de dicho paciente tratado con IFN α y las células de control no tratadas o con células tratadas con IFN α obtenidas previamente del mismo paciente al inicio o durante el tratamiento de IFN α .
- La presente exposición se refiere además a un método *in vitro* de predicción de la potencial toxicidad de compuestos de ensayo o para la selección de compuestos terapéuticos que resultan útiles para el tratamiento de patologías relacionadas con una alteración del mecanismo de edición del ARNm dependiente de ADAR A a I del receptor de la serotonina 2C (5HTR2C), que comprende:

(a) el cribado de compuestos en una estirpe celular de mamífero (preferentemente aquellas estirpes celulares que presentan las características ilustradas para el método de la presente invención), preferentemente la estirpe celular de neuroblastoma, más preferentemente la estirpe celular SH-SY5Y, para su capacidad de alterar la edición de 5HT2CR, siendo conocido que estos compuestos presentan o no presentan toxicidad o efectos secundarios, tales como efectos psicológicos o neuropsicológicos,

(b) basándose en dicho cribado, la selección de un panel de elementos de referencia, comprendiendo dicho panel elementos que difieren con respecto a su capacidad de alterar la edición de 5HT2CR y, opcionalmente, que difieren con respecto a su toxicidad o efectos secundarios,

(c) el cribado de un compuesto de ensayo de actividad desconocida respecto a dicha edición de 5HT2CR con el fin de determinar su efecto sobre la alteración de la edición de 5HT2CR, obteniendo de esta manera el perfil de edición de 5HT2CR y, opcionalmente la expresión de ADAR de dicho compuesto de ensayo,

(d) la comparación del perfil de edición de 5HT2CR y, opcionalmente, la expresión de ADAR de dicho compuesto de ensayo y para dicho panel de referencias,

(e) la predicción de la potencial toxicidad de compuestos de ensayo o la selección del compuesto de ensayo como compuesto terapéutico potencial que resulta útil para el tratamiento de patologías relacionadas con una alteración del mecanismo de edición del ARNm de 5HTR2C, basada en la premisa de que la alteración de la edición de 5HTR2C resultante del compuesto de ensayo será similar a la del compuesto de referencia, en el que las etapas del cribado de dicha estirpe celular de mamífero para su capacidad de alterar el perfil de edición de 5HT2CR y, opcionalmente, la expresión de ADAR, es la misma en el ensayo celular *in vitro* ilustrado para el método de la presente invención anteriormente, tal como en las reivindicaciones 1 a 15.

La presente invención finalmente comprende un kit según la presente exposición, comprendiendo además dicho kit un panel de referencia tal como se han seleccionado en la etapa b) del método anteriormente indicado y/o el perfil de edición de 5HT2CR y, opcionalmente, la expresión de ADAR de dicho panel de referencias.

Los ejemplos, a continuación, y también las figuras y leyendas a continuación se han seleccionado a fin de proporcionar al experto en la materia una descripción completa con el fin de sea capaz de poner en práctica y utilizar la presente invención. Estos ejemplos no pretenden limitar el alcance de lo que el inventor considera su invención, ni pretenden mostrar que únicamente se han llevado a cabo los experimentos proporcionados a continuación en la presente memoria.

Leyendas de las figuras

Figuras 1A y 1B: efecto de la aplicación durante 24 horas de interferón humano sobre la concentración de ARNm de ADAR1a en células SH-SY5Y: determinación de la EC50 (%).

Expresión de ARN de ADAR1a en células SH-SY5Y (Q-PCR, ref. de sondas TaqMan de Applied: Hs 01020780_m1). Gen de referencia: GAPDH.

Figuras 2A-2C: las modificaciones del perfil de edición reflejan la alteración de la expresión de ADAR1 en células SH-SY5Y en cultivo tratadas con IFN-alfa.

Figura 2A. Se proporciona en un gráfico la $\Delta\Delta\text{CT}$ del ARNm de ADAR1a de placas tratadas (n=8) frente a controles (n=8) versus LOG10 de las concentraciones aplicadas de IFN α . El ajuste óptimo de la relación hiperbólica ajustada mediante el método de cuadrados mínimos permitió calcular el efecto máximo y estimar la IC50 (%) como la media $\pm$ SD (n=40).

Figura 2B. Se llevó a cabo el mismo experimento mediante amplificación del ARNm de 5-HT2CR y tras el incremento de la alteración de la edición se produjo una reducción significativa de la isoforma NE tras la identificación de cada perfil de edición individual. Se calculan los resultados tal como para A a partir de valores individuales (n=40).

Figura 2C. Los resultados se refieren a la relación entre la variación positiva del porcentaje representado en la distribución del perfil por la suma de las 3 isoformas editadas AB, ABC y AC versus la concentración de IFN α . El ajuste óptimo estimó el efecto máximo y la IC50 (%) a partir de los valores individuales de las mediciones (n=40) tal como en A y B.

La IC50 (%) se expresa en IU/ml de medio de cultivo. Los efectos máximos determinados para el ARNm de ADAR1a como $\Delta\Delta\text{CT}$ normalizado respecto a los controles proporciona un valor calculado promedio de QR de 10,56 al normalizar los controles medios a 1. En las figuras 2B y 2C, el gráfico y corresponde a los valores medios de la variación absoluta frente a los controles $\pm$ SEM. El error permisible para el ajuste óptimo era de 0,01%.

Figura 3: modelo celular como base para evaluar un posible riesgo psiquiátrico.

Se evaluaron las "firmas" de edición del ARNm del receptor (5-HT₂CR) en 3 estructuras cerebrales límbicas (prefrontal dorsal (DPFCx), cingular anterior (ACCx) y córtex entorrinal (Cx entorrinal) de pacientes deprimidos/suicidas. Esta firma corresponde a las variaciones de la distribución de las proporciones respectivas de cada isoforma editada identificada (ver la Tabla 7) al comparar sus valores medios con los observados en el grupo de control de pacientes. En primer lugar se clasificó según su media algebraica de delta individual y después se sometieron a análisis estadístico de componentes. Cada componente se define como la proporción de isoformas editadas en la que por ejemplo se había observado que los sitios A y B, o A y C o A, B y C, etc. se encontraban editados. Los rectángulos negros y grises representan la variación de la media positiva y negativa, respectivamente, del componente definido en caso de ser identificado como significativo ($p < 0,05$).

Figura 4: ejemplo típico de perfilado *in vitro* de fármacos mediante el seguimiento de la alteración de la actividad de edición detectada mediante análisis estadístico de componentes de los perfiles de edición del ARNm de 5-HT₂CR en células SH-SY5Y en cultivo. Para cada molécula sometida a ensayo los componentes de la firma que se había encontrado que eran significativos se representan en negro (variaciones positivas) y en gris (variaciones negativas). Para cada componente, la alteración puede afectar a partes positivas y/o negativas de la firma y también puede encontrarse que altera su suma total. La elección de los componentes se deriva directamente de la comparación del análisis realizada en pacientes suicidas y en células SH-SY5Y en cultivo tratadas con IFN α , presentada en la figura 3. El '*' indica que la molécula correspondiente ha sido objeto de una advertencia psiquiátrica de la FDA por riesgo de alteraciones del humor y suicidio durante el tratamiento.

Figura 5: expresión de ARNm y proteínas de ADAR1 en células SH-SY5Y tratadas con IFN α . Extractos de proteínas transferidos en membrana de nitrocelulosa con SDS. Las bandas correspondientes a isoformas de ADAR1 tanto constitutivas (p110) como inducibles (p150) se muestran con flechas. También se ilustran los estándares de proteínas (PM 250, 150 y 100 kD).

Ejemplos

Ejemplo 1: cultivo celular y tratamiento farmacológico

Entre diez estirpes celulares diferentes de cribado se seleccionó la estirpe celular humana de neuroblastoma SH-SY5Y como la más interesante al utilizarla bajo las condiciones siguientes.

La estirpe celular humana de neuroblastoma SH-SY5Y se obtuvo de ECACC (EC94030304 de la European Collection of Cell Cultures (ECACC)). La estirpe celular SH-SY5Y es un neuroblastoma clonado tres veces, originalmente de SK-N-SH e informado por primera vez en 1978. Un subclón de tipo neuroblasto de SK-N-SH denominado SH-SY se subclonó como SH-SY5, que se subclonó nuevamente como SH-SY5Y (Biedler J.L. *et al.*, Cancer Res. 38:3751-7, 1978). Las células se cultivaron en medio D-MEM rico en glucosa (Sigma, ref. D6546) complementado con FCS dializado al 10% (PAA, ref. A15-507, lote nº A50708-0050), glutamina 2 mM (Sigma, G7513) y una mezcla 1X de agente antibiótico-antimicótico estabilizado (Sigma, ref. A5955) a 37°C bajo una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. El día anterior al tratamiento con fármaco o IFN α _h, se sembraron células SH-SY5Y en placas de 6 pocillos a una densidad de 10⁵ células/pocillo. Se utilizaron placas de 6 pocillos según las condiciones experimentales (concentración o duración del tratamiento). El día después de la siembra, se eliminó el medio de cultivo y las células se incubaron durante 24 horas con una solución 10 μ M de moléculas del compuesto que debía someterse a ensayo o una solución 1.000 IU/ml de IFN α _h (PBL Biomedical Laboratories). Para el experimento de dosis-respuesta de IFN α _h, se incubaron células con 1, 10, 100 y 1.000 IU/ml de soluciones de IFN α _h. Para el experimento de curso temporal de IFN α _h, las células se trataron durante 24, 48 o 72 horas con una solución 1.000 IU/ml de IFN α _h. Tras los diferentes tratamientos, las células se lisaron directamente en tampón de lisis RLT y ARN total purificado según el protocolo del fabricante (Qiagen, mini-kit RNeasy Plus, ref. 74134). A continuación, se realizó la transcripción inversa del ARN total con el sistema Thermoscript de RT-PCR Plus Taq (Invitrogen, 11146-032) y el ADNc resultante se utilizó para CE-SSCP y PCR en tiempo real cuantitativa.

Ejemplo 2: protocolo *in vivo* para IFN α _m y el tratamiento farmacológico

Para el experimento con IFN α _m, se realizaron inyecciones por vía i.p. de 10.000 IU de IFN α _m (PBL Biomedical Laboratories) en 8 machos (ratones Balb/cJ, Charles Rivers). Los ratones de control recibieron inyecciones por la misma vía de solución salina estéril tamponada con fosfato. Ocho horas después de las inyecciones, se sacrificaron los animales mediante decapitación y se extrajo la sangre total, la piel ventral y el cerebro. Se purificó el ARN total utilizando el kit de aislamiento de ARN de sangre de ratones RiboPure (Ambion, ref. 1951) para la sangre, el reactivo TRIzol (Invitrogen, ref. 15596-026) (tras la rotura del tejido) para la piel, y con el mini-kit para lípidos RNeasy (Qiagen, ref. 74804), para el cerebro. A continuación, el ARN total se transcribió inversamente con el sistema Thermoscript RT-PCR Plus Taq (Invitrogen, 11146-032) y el ADNc resultante se utilizó para CE-SSCP y PCR en tiempo real cuantitativa. El método utilizado para las determinaciones mediante SSCP ya ha sido descrito para muestras de ratón y humanas (ver la patente nº PCT/EP 2008/057519, presentada el 13 de junio de 2008).

Para los fármacos antipsicóticos, antidepresivos y con advertencia de riesgo de suicidio, los diferentes compuestos en primer lugar se disolvieron en vehículo (DMSO/etanol/agua: 50%/15%/35%) y se administraron en ratones Balb/cJ macho utilizando bombas Alzet (Alzet, ref. 2002, obtenidos de Charles River, Francia) para conseguir una administración continua y homogénea del fármaco. El grupo de control estaba compuesto de 8 ratones tratados con vehículo sólo. Los grupos de ensayo estaban compuestos de 8 ratones tratados con compuestos a una dosis de 3,5 o 7,0 mg/kg/día disueltos extemporáneamente en el vehículo. Tras 15 días de administración de los fármacos utilizando bombas Alzet, se sacrificaron los animales mediante decapitación. Tal como se ha indicado anteriormente, se recogieron muestras de sangre total y piel y cerebro. Se purificó el ARN total y se transcribió inversamente, tal como se ha indicado anteriormente.

Ejemplo 3: perfil total de distribución de todas las isoformas expresadas editadas y no editadas del ARNm de 5-HT₂CR; cuantificación de la expresión de ARNm de 5-HT₂CR (total) y de ADAR mediante análisis de PCR en tiempo real

3A) Perfil total de distribución de todas las isoformas editadas y no editadas expresadas de ARNm de 5-HT₂CR mediante electroforesis capilar no desnaturizante mediante polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (CE-SSCP) (ver también la solicitud de patente internacional PCT nº WO 2008/152146, Ejemplo 2 y figura 1).

a) Obtención del perfil de edición completo de una muestra de tejido cerebral

Se extrajo y se purificó el ARN total a partir de extractos de tejido o celulares, siguiendo las especificaciones del fabricante (Qiagen RNeasy, mini-kit). Se evaluó la cantidad y la pureza del ARN extraído mediante la medición de tanto la absorbancia a 260 nm como la proporción 260/280 nm utilizando un espectrofotómetro GeneQuant (Pharmacia-Biotech). Con el fin de eliminar la posible contaminación por ADN genómico, 8 µl de cada ARN (entre 88 ng y 1,3 µg) se trataron con 1 unidad de ADNasa I (Invitrogen) durante 15 min. a temperatura ambiente en un volumen final de 10 µl. La reacción se detuvo mediante la adición de 1 µl de EDTA 25 mM y después se calentó durante 10 min. a 65°C. Se llevó a cabo la transcripción inversa de los ARN tratados con ADNasa I (10 µl) utilizando 15 unidades de transcriptasa inversa ThermoScript (sistema de RT-PCR ThermoScript, Invitrogen) y cebadores oligo(dT) a una concentración final de 2,5 µM.

A continuación, se llevó a cabo una primera reacción de PCR (volumen final: 25 µl), reusitando en un fragmento de 250 pb, en 1 µl de los productos de transcripción inversa con 0,2 unidades de ADN polimerasa Taq Platinum (sistema de RT-PCR ThermoScript, Invitrogen) y cebadores específicos (cebador directo: 5'-TGTCCTAGCCATTGCTGATATGC-3' (SEC ID nº 1) y cebador inverso: 5'-GCAATCTTCATGATGGCCTTAGTC-3' (SEC ID nº 2); concentración final de cada uno: 0,2 µM) situado en el exón IV y el exón V del ADNc de 5-HT₂CR humano, respectivamente. Tras una etapa de desnaturalización a 95°C durante 3 min. se llevó la PCR a su punto final tras 35 ciclos (15 s a 95°C; 30 s a 60°C y 20 s a 72°C) y una etapa final de alargamiento de 2 min. a 72°C. Se utilizaron alícuotas de los productos de amplificación para comprobar el producto en un gel analítico de agarosa al 2%.

b) Segunda PCR y separación de fragmentos de ADNc de cadena sencilla mediante electroforesis capilar (EC)

Se utilizó 1 µl de una dilución 1/50 de los productos de primera RT-PCR o el ADNc de 250 pb amplificado a partir de los plásmidos que incluían las treinta y dos isoformas estándares de 5-HT₂cR (o 5HT₂CR) humana, a modo de moldes para una PCR anidada aditiva. Estos 32 estándares correspondían a las isoformas no editadas (NE) y editadas de la 5-HT₂cR humana. Se llevaron a cabo las amplificación en un volumen final de 20 µl con cebadores fluorescentes purificados mediante HPLC (cebador directo: FAM-ATGTGCTATTTTCAACAGCGTCCATC-3' (SEC ID nº 3); cebador inverso: VIC-GCAATCTTCATGATGGCCTTA-3' (SEC ID nº 4); concentración final de cada uno: 0,2 µM) y 0,2 unidades de ADN polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen).

El cebador inverso marcado con VIC se hibrida con una secuencia complementaria del receptor de 5-HT₂c idéntica en el ser humano, el ratón y la rata. Por otra parte, aunque utilizada con muestras humanas, la secuencia del cebador directo marcado con FAM se diseñó para ser similar al máximo a la del ratón. Más exactamente, los residuos de T en las posiciones 5 y 6 de la secuencia oligonucleótida humana (posiciones 1133 y 1134 de la referencia humana U49516) se modificaron por G y C, respectivamente.

Las simulaciones de las rutas de plegamiento estocásticas de ambas cadenas del producto de PCR obtenidas con los dos cebadores indicados anteriormente se llevaron a cabo con el servidor Kinefold (kinefold.curie.fr). Demostraron que las estructuras de energía libre más baja obtenidas para las cadenas directa e inversa (la región editada incluida en el bucle de una estructura de tallo-bucle y capaz de hibridarse con la secuencia complementaria situada en otros sitios de la estructura completa tras el plegamiento del tallo) eran muy similares a las calculadas para el producto de PCR anidada de ratón utilizada con éxito para las muestras de ratón. Se demostró que este conjunto de cebadores era óptimo para el análisis conformacional de la edición del ARNm de 5HT₂C humano mediante electroforesis capilar no desnaturizante, mediante el análisis de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (CE-SSCP).

El fragmento amplificado presentaba una longitud de 127 pb. Tal como para la RT-PCR, tras una etapa inicial de desnaturalización de 5 min. a 94°C, se llevó hasta el final de la reacción de amplificación con 35 ciclos (15 s a 94°C; 30 s a 55°C; 20 s a 68°C) y una etapa final de alargamiento de 2 min. a 68°C. Nuevamente, se evaluó la calidad de los fragmentos amplificados de 127 pb de longitud en un gel de agarosa al 2% antes del análisis posterior en un analizador genético 3100 Avant (Applied Biosystems).

Los productos de PCR fluorescentes correspondientes a las isoformas estándares (1 µl de una dilución 1/100 en agua tratada con DEPC) y las muestras (1 µl de una dilución 1/30) diluidas en 11 µl de formamida desionizada se añadieron a una mezcla de estándares de migración marcados con ROX (MWG-BIOTECH, AG) (0,5 µl cada uno) que cubría el rango completo de tiempos de retención del electroferograma. Estos estándares ROX se utilizaron para la calibración de CE y posteriormente para obtener la superposición correcta de picos de estándares y de muestras. Tras desnaturalizar durante 2 min. a 95°C, las muestras fueron inmediatamente enfriadas sobre hielo. Se llevó a cabo la CE no desnaturalizante en un analizador genético ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems) a través de capilares de 80 cm de longitud con "polímero de análisis conformacional POP" al 7% (Applied Biosystems), 1X TBE y sin glicerol. Tras una migración previa realizada a 15 kV durante 3 min., se inyectaron las muestras durante 15 s a 2 kV y se realizó la electroforesis durante 105 min. a 15 kV a una temperatura controlada de 20°C. Bajo estas condiciones se resolvió claramente cada una de las treinta y dos posibles isoformas como resultado de la conformación única de ADN de cadena sencilla obtenida con la cadenas marcadas con FAM o con VIC. Los diferentes tiempos de retención se utilizaron para la identificación inequívoca de las isoformas.

c) Identificación y cuantificación relativa de cada isoforma en cada muestra de cerebro

A continuación se procesó la señal electroforética utilizando un software del propio laboratorio. En primer lugar, la base temporal de los perfiles electroforéticos de cada muestra se ajustó utilizando las cadenas marcadas con ROX de los estándares de migración. Ello permitió que las cadenas marcadas con FAM y con VIC desconvolucionaran con exactitud las señales de los estándares y de las muestras en una única base temporal. Seguidamente se ajustó el fondo y se restó de la señal y a continuación se normalizó el área total bajo cada señal.

Se procesó la proporción relativa de cada isoforma mediante un ajuste óptimo de cada señal analítica desconvolucionada y normalizada de las muestras de cerebro. Se llevó a cabo mediante el ajuste iterativo de la señal integrada representada por las 32 señales analíticas desconvolucionadas y normalizadas de manera similar. El

$$S(t) = \sum_{i=1}^N g_i R_i(t)$$

cálculo se basó en la hipótesis de que la señal de SSCP, en la que $R_i(t)$, con $i \in \{1, \dots, N\}$ son las señales estándares y g_i es el % de cada una de ellas en la señal. El ajuste óptimo minimizó la suma de los

$$SSE = \int \left[S(t) - \sum_{i=1}^N g_i R_i(t) \right]^2$$

cuadrados de error (SSE) y se controló mediante el análisis estadístico de cuadrados mínimos.

El resultado de dicho ajuste óptimo se evaluó estadísticamente tras el cálculo del valor de r^2 , tal como

$r^2 = 1 - \frac{SSE}{SSM}$, en el que SSM es la suma de cuadrados de las desviaciones de la media, tal como

$$SSM = \sum_{i=1}^I (S(t) - \bar{S})^2.$$

. El ajuste óptimo teórico máximo proporcionará una $r^2=1$.

Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo condiciones de ciego y todas las muestras se sometieron a ensayo en el mismo lote para las reacciones de RT-PCR y de segunda PCR. Los resultados de ajuste óptimo rindieron un perfil de edición específico para cada muestra individual, que se determinó a partir del porcentaje de cada forma editada y no editada de la señal analítica total. Estos valores iniciales se utilizaron para los análisis estadísticos.

El presente método proporciona la proporción de cada isoforma de ARNm expresado como el porcentaje del total de receptor de 5-HT2c presente en el extracto.

3B) Cuantificación de la expresión de ARNm de 5-HT2CR y de ADAR mediante análisis de PCR en tiempo real

Con el fin de cuantificar los niveles de expresión del ARNm de 5-HT2CR, ADAR1 y ADAR2 en células SH-SY5Y o en el córtex prefrontal, sangre total y piel de ratones Balb/cJ, se sintetizó ADNc de primera cadena mediante transcripción inversa y se sometió a análisis de PCR cuantitativa en tiempo real TaqMan (Applied Biosystems). Todas las sondas y cebadores utilizados para las PCR cuantitativas se obtuvieron de Applied Biosystems (Gene Expression Assays, Assay-On-Demand) (ver la Tabla 1, cebadores y sondas de referencia de Applied Biosystems).

Dichas sondas y cebadores pueden ser fácilmente diseñados, en caso necesario, por el experto en la materia a partir de las bien conocidas secuencias de ácidos nucleicos dadas a conocer del gen humano y de ratón codificante de 5-HT2cR, ADAR1, isoformas constitutivas e inducibles, y la proteína ADAR.

5 Tabla 1

	5-HT2cR	Isoforma constitutiva de ADAR1 o total	Isoforma constitutiva de ADAR1	ADAR2
Ratones Balb/cJ	Mm 00434127_m1	Mm 00508001_m1 Mm 00507998_m1	Mm 00507997_m1	Mm 00504621_m1
Tejidos humanos y células SH-SY5Y	Hs 00968672_m1 Hs 00968671_m1	Hs 01017596_m1	Hs 01020780_m1	Hs 00210562_m1

10 La GAPDH humana (producto nº 4326317E, Applied Biosystems) o la GAPDH de ratón (producto nº 4352339E, Applied Biosystems) se incluyeron en cada PCR múltiplex a modo de controles internos. La PCR en tiempo real y el análisis posterior se llevaron a cabo con un sistema de RT-PCR en bloque de 48 pocillos StepOne (Applied Biosystems). La cuantificación de la expresión del gen diana en todas las muestras se normalizó respecto a la expresión de GAPDH mediante la ecuación $Ct \text{ (diana)} - Ct \text{ (GAPDH)} = \Delta Ct$, en la que Ct es el número del ciclo umbral. Los valores medios de ΔCt de las muestras procedentes de ratones o células no tratados se determinaron y se utilizaron como punto de referencia para las muestras correspondientes a los animales o células tratados. Las

15 diferencias entre los animales o las células no tratados y los tratados, incluyendo la variación individual, se calcularon mediante la ecuación $(\Delta Ct \text{ (muestras tratadas individuales)} - \Delta Ct \text{ (media de muestras no tratadas)}) = \Delta \Delta Ct$. Los cambios en la expresión del gen diana (factor n) en cada muestra se calcularon como $2^{-\Delta \Delta Ct}$, a partir del cual se derivaron las medias y desviaciones estándares (SD).

20 Con el fin de mejorar la sensibilidad de la estirpe celular seleccionada en la detección de una alteración significativa del proceso de editado, se aplicó el procedimiento a la evaluación del interferón humano y de 17 moléculas en las que la FDA había concentrado sus advertencias.

25 **Ejemplo 4: relación de concentración-efecto sobre la expresión de ADAR1a del interferón humano aplicado a células SH-SY5Y durante 24 horas**
(ver las figuras 1A y 1B)

Se seleccionó la concentración de 1.000 IU/ml para la evaluación adicional de la distribución de isoformas editadas en controles y células tratadas con interferón; se presenta el resultado en la Tabla 2.

30 Tabla 2: análisis del perfil de edición obtenido tras 24 horas de tratamiento con 1.000 IU de interferón-alfa humano

El perfil de edición proporciona la proporción media (%) $\pm$ SEM (n=6) de cada isoforma identificada del ARNm de 5-HT2cR ($\approx 100\%$) medido en el ARN celular. Estas isoformas se clasificaron en función del incremento algebraico en la comparación entre los grupos de control y tratado con IFN. La firma obtenida se sometió a ensayo para su significancia y seguidamente se propuso una evaluación múltiple de la actividad de los enzimas de edición mediante clasificaciones de los productos de las actividades enzimáticas. La primera clasificación (sitios editados) calcula el porcentaje de edición de cada uno de los sitios de edición: A, B, C, D y E, observados en cada parte de la firma. En el caso de que se utilice la distribución total, el resultado proporcionado en "total" corresponde de hecho a un resultado que podría obtenerse mediante el método de extensión de cebador. Los índices enzimáticos se calcularon a partir de las isoformas de edición debido a la acción de ADAR1 solo (ADAR1), a la acción combinada de ADAR1 y ADAR2 (ADAR1+2) y debido a la acción exclusiva de ADAR2 (ADAR2). Una clasificación final expresa la actividad mediante la medición del % representado por todas las isoformas para las que se ha encontrado actividad de ADAR1 (ADAR I) o de ADAR2 (ADAR II). También resultan posibles otras clasificaciones (no mostradas en la presente memoria) para la evaluación de alguna acción específica de edición (por ejemplo para identificar la proporción de productos de las actividades enzimáticas en las que se ha encontrado que están editados los sitios C y E, o A y C, A y B, A y B y C, etc.). Resulta interesante observar que la isoforma no editada (NE) también se encontraba significativamente reducida.

Tabla 2

Perfil de edición					
Isoformas	Cts	SEM	IFN1000U	SEM	
NE (INI)	54.6	1.9	37.5	3.5	
A (VNI)	28.5	1.3	32.3	2.5	
B (MNI)	3.4	0.3	3.5	0.8	
C (ISI)	2.5	0.5	2.2	0.4	
AB (VNI)	1.8	0.8	2.8	0.9	
ACE (VGI)	1.4	0.3	0.8	0.2	
D (INV)	1.3	0.2	0.5	0.1	
BD (MNV)	1.1	0.1	0.3	0.1	
AC (VSI)	0.9	0.6	13.5	3.4	
AE (VDI)	0.6	0.4	1.1	0.3	
ABD (VNV)	0.4	0.1	0.2	0.2	
ADE (VDV)	0.4	0.0	0.04	0.0	
DE (IDV)	0.4	0.0	0.27	0.0	
B (MNI)	0.3	0.2	1.40	0.5	
AD (VNI)	0.3	0.2	1.40	0.5	
ABE (VDI)	0.2	0.2	0.28	0.1	
BE (MDI)	0.2	0.1	0.78	0.7	
CE (IGI)	0.2	0.2	0.13	0.1	
ABC (VSI)	0.2	0.1	1.82	0.3	
ABCD (NSV)	0.1	0.1	0.03	0.0	
CD (ISV)	0.1	0.0	0.19	0.1	
BCE (MGI)	0.1	0.0	0.02	0.0	
ABDE (VDV)	0.1	0.1	0.04	0.0	100
100					

Firma					
Isoformas	Δ %	Cts	SEM	IFN1000U	SEM
ACE (VDV)	-89.2	54.6	1.9	37.5	3.5
ABCD (NSV)	-82.4	37.3	1.9	57.5	3.5
BD (MNV)	-75.9	3.5	0.4	4.5	0.5
BCE (MGI)	-69.2	8.1	0.4	4.5	0.5
ABD (VNV)	-60.5	0.13164			
D (INV)	-59.8	0.00221			
CE (IGI)	-43.9	0.34397			
ABDE (VDV)	-41.7	0.36296			
ACE (VGI)	-40.2	0.07315			
NE (INI)	-31.3	0.00082			
DE (IDV)	-28.3	0.06225			
C (ISI)	-14.2	0.28715			
B (MNI)	2.6	0.46177			
A (VNI)	9.5	0.17352			
ABE (VDI)	25.8	0.40553			
AB (VNI)	63.7	0.18693			
AE (VDI)	69.2	0.17984			
CD (ISV)	123.2	0.24804			
BE (MDI)	228.5	0.24235			
AD (VNI)	342.7	0.03539			
ABC (VSI)	788.7	0.00104			
AC (VSI)	1324.2	0.00235			

Firma					
Isoformas	Δ %	Cts	SEM	IFN1000U	SEM
NE (INI)	-82.4	54.6	1.9	37.5	3.5
Suma de Delta > 0	-75.9	37.3	1.9	57.5	3.5
Suma de Delta < 0	-69.2	8.1	0.4	4.5	0.5
ABD (VNV)	-60.5	0.13164			
D (INV)	-59.8	0.00221			
CE (IGI)	-43.9	0.34397			
ABDE (VDV)	-41.7	0.36296			
ACE (VGI)	-40.2	0.07315			
NE (INI)	-31.3	0.00082			
DE (IDV)	-28.3	0.06225			
C (ISI)	-14.2	0.28715			
B (MNI)	2.6	0.46177			
A (VNI)	9.5	0.17352			
ABE (VDI)	25.8	0.40553			
AB (VNI)	63.7	0.18693			
AE (VDI)	69.2	0.17984			
CD (ISV)	123.2	0.24804			
BE (MDI)	228.5	0.24235			
AD (VNI)	342.7	0.03539			
ABC (VSI)	788.7	0.00104			
AC (VSI)	1324.2	0.00235			

Firma					
Isoformas	Δ %	Cts	SEM	IFN1000U	SEM
NE (INI)	-82.4	54.6	1.9	37.5	3.5
Suma de Delta > 0	-75.9	37.3	1.9	57.5	3.5
Suma de Delta < 0	-69.2	8.1	0.4	4.5	0.5
ABD (VNV)	-60.5	0.13164			
D (INV)	-59.8	0.00221			
CE (IGI)	-43.9	0.34397			
ABDE (VDV)	-41.7	0.36296			
ACE (VGI)	-40.2	0.07315			
NE (INI)	-31.3	0.00082			
DE (IDV)	-28.3	0.06225			
C (ISI)	-14.2	0.28715			
B (MNI)	2.6	0.46177			
A (VNI)	9.5	0.17352			
ABE (VDI)	25.8	0.40553			
AB (VNI)	63.7	0.18693			
AE (VDI)	69.2	0.17984			
CD (ISV)	123.2	0.24804			
BE (MDI)	228.5	0.24235			
AD (VNI)	342.7	0.03539			
ABC (VSI)	788.7	0.00104			
AC (VSI)	1324.2	0.00235			

Firma					
Isoformas	Δ %	Cts	SEM	IFN1000U	SEM
NE (INI)	-82.4	54.6	1.9	37.5	3.5
Suma de Delta > 0	-75.9	37.3	1.9	57.5	3.5
Suma de Delta < 0	-69.2	8.1	0.4	4.5	0.5
ABD (VNV)	-60.5	0.13164			
D (INV)	-59.8	0.00221			
CE (IGI)	-43.9	0.34397			
ABDE (VDV)	-41.7	0.36296			
ACE (VGI)	-40.2	0.07315			
NE (INI)	-31.3	0.00082			
DE (IDV)	-28.3	0.06225			
C (ISI)	-14.2	0.28715			
B (MNI)	2.6	0.46177			
A (VNI)	9.5	0.17352			
ABE (VDI)	25.8	0.40553			
AB (VNI)	63.7	0.18693			
AE (VDI)	69.2	0.17984			
CD (ISV)	123.2	0.24804			
BE (MDI)	228.5	0.24235			
AD (VNI)	342.7	0.03539			
ABC (VSI)	788.7	0.00104			
AC (VSI)	1324.2	0.00235			

Firma					
Isoformas	Δ %	Cts	SEM	IFN1000U	SEM
NE (INI)	-82.4	54.6	1.9	37.5	3.5
Suma de Delta > 0	-75.9	37.3	1.9	57.5	3.5
Suma de Delta < 0	-69.2	8.1	0.4	4.5	0.5
ABD (VNV)	-60.5	0.13164			
D (INV)	-59.8	0.00221			
CE (IGI)	-43.9	0.34397			
ABDE (VDV)	-41.7	0.36296			
ACE (VGI)	-40.2	0.07315			
NE (INI)	-31.3	0.00082			
DE (IDV)	-28.3	0.06225			
C (ISI)	-14.2	0.28715			
B (MNI)	2.6	0.46177			
A (VNI)	9.5	0.17352			
ABE (VDI)	25.8	0.40553			
AB (VNI)	63.7	0.18693			
AE (VDI)	69.2	0.17984			
CD (ISV)	123.2	0.24804			
BE (MDI)	228.5	0.24235			
AD (VNI)	342.7	0.03539			
ABC (VSI)	788.7	0.00104			
AC (VSI)	1324.2	0.00235			

Firma					
Isoformas	Δ %	Cts	SEM	IFN1000U	SEM
NE (INI)	-82.4	54.6	1.9	37.5	3.5
Suma de Delta > 0	-75.9	37.3	1.9	57.5	3.5
Suma de Delta < 0	-69.2	8.1	0.4	4.5	0.5
ABD (VNV)	-60.5	0.13164			
D (INV)	-59.8	0.00221			
CE (IGI)	-43.9	0.34397			
ABDE (VDV)	-41.7	0.36296			
ACE (VGI)	-40.2	0.07315			
NE (INI)	-31.3	0.00082			
DE (IDV)	-28.3	0.06225			
C (ISI)	-14.2	0.28715			
B (MNI)	2.6	0.46177			
A (VNI)	9.5	0.17352			
ABE (VDI)	25.8	0.40553			
AB (VNI)	63.7	0.18693			
AE (VDI)	69.2	0.17984			
CD (ISV)	123.2	0.24804			
BE (MDI)	228.5	0.24235			
AD (VNI)	342.7	0.03539			
ABC (VSI)	788.7	0.00104			
AC (VSI)	1324.2	0.00235			

Firma					
Isoformas	Δ %	Cts	SEM	IFN1000U	SEM
NE (INI)	-82.4	54.6	1.9	37.5	3.5
Suma de Delta > 0	-75.9	37.3	1.9	57.5	3.5
Suma de Delta < 0	-69.2	8.1	0.4	4.5	0.5
ABD (VNV)	-60.5	0.13164			
D (INV)	-59.8	0.00221			
CE (IGI)	-43.9	0.34397			
ABDE (VDV)	-41.7	0.36296			
ACE (VGI)	-40.2	0.07315			
NE (INI)	-31.3	0.00082			
DE (IDV)	-28.3	0.06225			
C (ISI)	-14.2	0.28715			
B (MNI)	2.6	0.46177			
A (VNI)	9.5	0.17352			
ABE (VDI)	25.8	0.40553			
AB (VNI)	63.7	0.18693			
AE (VDI)	69.2	0.17984			
CD (ISV)	123.2	0.24804			
BE (MDI)	228.5	0.24235			
AD (VNI)	342.7	0.03539			
ABC (VSI)	788.7	0.00104			
AC (VSI)	1324.2	0.00235			

Firma					
Isoformas	Δ %	Cts	SEM	IFN1000U	SEM
NE (INI)	-82.4	54.6	1.9	37.5	3.5
Suma de Delta > 0	-75.9	37.3	1.9	57.5	3.5
Suma de Delta < 0	-69.2	8.1	0.4	4.5	0.5
ABD (VNV)	-60.5	0.13164			
D (INV)	-59.8	0.00221			
CE (IGI)	-43.9	0.34397			
ABDE (VDV)	-41.7	0.36296			
ACE (VGI)	-40.2	0.07315			
NE (INI)	-31.3	0.00082			
DE (IDV)	-28.3	0.06225			
C (ISI)	-14.2	0.28715			
B (MNI)	2.6	0.46177			
A (VNI)	9.5	0.17352			
ABE (VDI)	25.8	0.40553			
AB (VNI)	63.7	0.18693			
AE (VDI)	69.2	0.17984			
CD (ISV)	123.2	0.24804			
BE (MDI)	228.5	0.24235			
AD (VNI)	342.7	0.03539			
ABC (VSI)	788.7	0.00104			
AC (VSI)	1324.2	0.00235			

Firma					
Isoformas	Δ %	Cts	SEM	IFN1000U	SEM
NE (INI)	-82.4	54.6	1.9	37.5	3.5
Suma de Delta > 0	-75.9	37.3	1.9	57.5	3.5
Suma de Delta < 0	-69.2	8.1	0.4	4.5	0.5
ABD (VNV)	-60.5	0.13164			
D (INV)	-59.8	0.00221			
CE (IGI)	-43.9	0.34397			
ABDE (VDV)	-41.7	0.36296			
ACE (VGI)	-40.2	0.07315			
NE (INI)	-31.3	0.00082			
DE (IDV)	-28.3	0.06225			
C (ISI)	-14.2	0.28715			
B (MNI)	2.6	0.46177			
A (VNI)	9.5	0.17352			
ABE (VDI)	25.8	0.40553			
AB (VNI)	63.7	0.18693			
AE (VDI)	69.2	0.17984			
CD (ISV)	123.2	0.24804			
BE (MDI)	228.5	0.24235			
AD (VNI)	342.7	0.03539			
ABC (VSI)	788.7	0.00104			
AC (VSI)	1324.2	0.00235			

Firma					
Isoformas	Δ %	Cts	SEM	IFN1000U	SEM
NE (INI)	-82.4	54.6	1.9	37.5	3.5
Suma de Delta > 0	-75.9	37.3	1.9	57.5	3.5
Suma de Delta < 0	-69.2	8.1	0.4	4.5	0.5
ABD (VNV)	-60.5	0.13164			
D (INV)	-59.8	0.00221			
CE (IGI)	-43.9	0.34397			
ABDE (VDV)	-41.7	0.36296			
ACE (VGI)	-40.2	0.07315			
NE (INI)	-31.3	0.00082			
DE (IDV)	-28.3	0.06225			
C (ISI)	-14.2	0.28715			
B (MNI)	2.6	0.46177			
A (VNI)	9.5	0.17352			
ABE (VDI)	25.8	0.40553			

Resulta evidente que el tratamiento de IFN induce una alteración fuerte y significativa del perfil de edición, lo que demuestra, tal como se esperaba, un incremento importante de la actividad de ADAR1 y una reducción de la actividad de ADAR2.

- 5 En las muestras, se midieron los niveles de expresión de los ADAR mediante QPCR y se resumen los resultados en la Tabla 3, a continuación, y se comparan con los obtenidos tras la evaluación del perfil de edición.

10 Tabla 3: comparación entre la expresión y los índices de actividad de los enzimas ADAR1 y ADAR2 tras el tratamiento de IFN de la estirpe celular seleccionada. Los resultados se expresan en % de variación frente a los controles (n=6). El área marcada con asterisco (*) y los números en negrita indican una variación significativa (p<0,05).

Tabla 3

	ÍNDICE DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (Δ EN %)					Q-PCR (Δ EN %)			
	ADAR1	ADAR1+2	ADAR2	ADAR I	ADAR II	NE	ADAR 1a	ADAR 1b	ADAR 2
IFN 24H	48,05*	-10,25	-44,75*	41,07*	-19,08	-31,30*	970*	0	68

15 La tabla siguiente resume el resultado tras experimentos similares llevados a cabo con el mismo protocolo a fin de determinar la alteración final de la edición tras la aplicación durante 24 horas de concentraciones de 10 micromolar de 17 moléculas que han recibido advertencias de la FDA por presentar un riesgo de inducción al suicidio bajo un uso crónico. Estas moléculas pertenecen a varias familias químicas diferentes. Sin embargo, presentan una alteración significativa de la edición de 5-HT2cR. Once de dichas moléculas presentan una alteración significativa de la expresión de los enzimas de edición. Las otras inducen cambios significativos de la actividad de dichos enzimas que pueden detectarse fácilmente mediante la utilización de las mismas muestras celulares (ver la Tabla 4).

25 Tabla 4: las moléculas con advertencia de la FDA de presentar un riesgo de suicidio alteran significativamente la expresión de los enzimas de edición y/o su acción editora en ARNm de 5-HT2cR. Lo anterior puede detectarse fácilmente mediante su aplicación en una estirpe celular dedicada (SH-SY5Y).

	ÍNDICE DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (% de variación)							QPCR: expresión del ARN (% de variación)		
	ADAR1	ADAR1+2	ADAR2	NE	ADAR I	ADAR II	EC	ADAR 1A	ADAR 1b	ADAR 2
Fenfluramina	4,2	-43,3*	0,7	4,5	-4,8	-34,8*		7	23	27
Rimonabant	13,3	2,4	-3,7	10,4	11,3	1,2		-43*	-32*	-7
Carbamazepina	-3	38,8*	26	-3,8	3	36,4*		52*	-62*	-42*
Felbamato	6,3	-13,9	-24,6	-1,2	2,4	-16		-13	-1	1
Gabapentina	19,2	-28,5	-26,7	-8,3	10,1	-28,1*		-42*	-34*	-21*
Lamotrigina	5,9	-24,6	-23	0,9	0,1	-24,3		-26	-26*	-32
Levetiracetam	12	-36,6*	10,9	-3,1	2,8	-27,4		-9	-11	-17
Oxcarbazepina	1,1	-25,6	-25,9	4,8	-3,9	-25,6	-65,2*	-28	-18	-15
Pregabalina	2,5	-8,7	-6,2	-0,1	0,4	-8,2		-33	-43*	-36
Topiramato	14,4	-19,5	11,4	-8	8	-13,5		-44*	-46*	-60*
Zonisamida	11,9	9,7	-7,8	-10,5	11,5	6,3		-24*	-19*	-23
Bupropion	-16,3*	42,6	68,9	5,3	-8,9*	34,7		-66*	-51*	-40*
Citalopram	-5,7	70,2*	70,1*	-7,4*	5,3	70,2*		-18	-2	64*
Desipramina	-8,6	5,7	15,5	5,9	-6,6	7,5		29	-38	-12
Imipramina	-11,6*	146,4*	62,5	-13*	11,3	130,4*		34	0	111*
Trazodona	0	89,3*	28,4	-13,4	12,9	77,7		-60	-40	5
Olanzapina	-23,2	84,9*	9,2	7	-7,6	70,5*		-54*	20	92*

30 Resulta evidente que la estirpe celular dedicada, observada con el conjunto de técnicas que permiten una medición rápida y completa de dichos parámetros, representan un nuevo modelo para la evaluación preclínica del riesgo final de que estas moléculas produzcan alteraciones del humor mediante una alteración crónica de la transmisión de 5-HT.

35 Ejemplo 5: elección de una estirpe celular para el efecto predictivo *in vitro* de moléculas

a. Criterios de selección. Para ser elegibles para el cribado *in vitro* de moléculas, la estirpe celular debe validar los puntos principales siguientes:

- debe ser de origen humano,

- debe expresar el receptor 5-HT2cR en un rango que permita una evaluación reproducible del perfil de edición bajo condiciones de control,
- debe expresar los enzimas de edición en estados relativamente de equilibrio similares a los observados en las estructuras corticales normales del cerebro humano.

b. Una propuesta de mejor elección.

Entre las diez estirpes celulares diferentes, se seleccionó la estirpe celular humana de neuroblastoma SH-SY5Y como más interesante al utilizarla bajo las condiciones siguientes.

Se obtuvo de ECACC de la estirpe celular humana de neuroblastoma SH-SY5Y. Las células se cultivaron en medio D-MEM rico en glucosa (Sigma, ref. D6546) complementado con FCS dializado al 10% (PAA, ref. A15-507, lote nº A50708-0050), glutamina 2 mM (Sigma, ref. G7513) y una mezcla 1X de agente antibiótico-antimicótico estabilizado (Sigma, ref. A5955) a 37°C bajo una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. El día anterior al tratamiento de IFN α _h o de fármaco, se sembraron células SH-SY5Y en placas de 6 pocillos (Corning, placa multipocillo, 6 pocillos, Corning CellBIND Surface, ref. 3335) a una densidad de 5, 7 o 9x10⁶ células/pocillo durante un periodo de tratamiento de 72, 48 o 24 horas, respectivamente. Se utilizaron seis u ocho pocillos de placas de 6 pocillos para cada condición experimental (control, concentración o duración de tratamiento). El día después de la siembra, se eliminó el medio de cultivo y las células se incubaron durante 24 o 48 horas con una solución 10 μ M de las moléculas que debían someterse a ensayo o una solución 1.000 IU/ml de IFN α _h (PBL Biomedical Laboratories). Para el experimento de dosis-respuesta de IFN α _h, las células se incubaron con 1, 10, 100, 1.000 o 10.000 IU/ml de soluciones de IFN α _h [para el experimento de curso temporal de IFN α _h, las células se trataron durante 24, 48 o 72 horas con una solución 1.000 IU/ml de IFN α _h. En el caso de los puntos de tratamiento de 72 horas, se cambió el medio para las células tanto de control como tratadas con IFN α _h tras 48 horas de cultivo]. A continuación, las células se lisaron directamente en tampón de lisis RLT y se purificó el ARN total siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen, mini-kit RNeasy Plus, ref. 74134). A continuación, el ARN total se transcribió inversamente con el sistema de RT-PCR Thermoscript Plus Taq (Invitrogen, ref. 11146-032) y el ADNc resultante se utilizó para el CE-SSSP y la PCR en tiempo real cuantitativa.

En caso posible, también se prepararon extractos de proteínas totales para la transferencia western. Brevemente, se lisaron células de ocho pocillos correspondientes a procedimientos de control o de tratamiento, en 600 μ l de tampón RIPA (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 5 mM, Triton X100 al 1%, desoxicolato sódico al 0,1%) complementado con PMSF 1 mM y cóctel inhibidor de mini-proteasa completo (Roche, ref. 11836153001). Los lisados celulares se sonicaron 3x15 segundos sobre hielo, se agitaron mediante balanceo durante como mínimo 2 horas a 4°C y después se centrifugaron a 100g durante 10 min. a 4°C. Los pellets insolubles se resuspendieron en 40 μ l de 2X tampón de carga de Laemmli y se cuantificaron las concentraciones de proteínas con un kit de ensayo de proteínas Quant-IT (Invitrogen, ref. Q33211). Tras la sonicación y la desnaturalización durante 5 min. a 70°C, se cargaron 75 μ g de extractos insolubles de proteínas en tampón de Laemmli en un gel de poliacrilamida desnaturante al 12%. Se llevó a cabo además la migración y electrotransferencia de extractos de proteínas siguiendo procedimientos estándares. Para la detección de las proteínas ADAR1 (formas tanto constitutiva como inducible), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa con un anticuerpo policlonal de cabra purificado por afinidad L-15 (Santa Cruz, ref. sc-19077).

c. Estado de equilibrio de los enzimas de edición de la expresión y 4-HT2cR en SH-SY5Y bajo condiciones de control. Se ilustra en la Tabla 5.

Tabla 5: expresión relativa de ARNm de ADAR1a, ADAR1b, ADAR2 y 5-HT2cR en el neuroblastoma SH-SY5Y y estirpes celulares de astrocitoma HTB-14 y en un pool de ARN total de córtex cerebral de cerebro humano. Las estirpes celulares se obtuvieron de ECACC (SH-SY5Y, ref. 94030304) y la ATCC (HTB-14, ref. HTB-14). El ARN total de córtex cerebral se obtuvo de Clontech (ref. 636561). La cuantificación de los niveles de ARNm de la expresión se llevó a cabo mediante análisis de PCR en tiempo real cuantitativa TaqMan (Q-PCR) en un aparato StepOnePlusTM de 96 pocillos de Applied Biosystems (Applied Biosystems, ref. 4376592). Todas las sondas y cebadores utilizados para la Q-PCR eran de Applied Biosystems (Gene Expression Assays, Assay-On-Demand): 5-HT2cR (Hs 00968672_m1), isoforma constitutiva p110 de ADAR1 (Hs 01017596_m1), isoforma inducible p150 de ADAR1 (Hs 01020780_m1) y ADAR2 (Hs 00210562_m1). Se incluyó la GAPDH humana (Applied Biosystems, ref. 4326317E) en cada Q-PCR multiplex a modo de control interno. Se calculó la RQ (cuantificación relativa) siguiendo las instrucciones del proveedor. En cada tejido o estirpe celular, se consideró que la expresión del gen ADAR1a era la referencia y que su RQ era igual a 1.

Origen del ARN	RQ ADAR1a	RQ ADAR1b	p	RQ ADAR2	p	RQ 5-HT2cR	P
Células SH-SY5Y	1	48,10	<0,0001	1,78	0,02	0,02	<0,0001
Grupo de ARN de córtex	1	40,19	<0,0001	0,24	0,000889	1,31	0,044
Células HTB-14	1	20,27	<0,0001	4,23	0,000018		

Resulta importante indicar que, en comparación con la isoforma ADAR1a (considerada la referencia en la presente memoria), que es la isoforma inducible de ADAR1, el ARNm de la isoforma constitutiva de ADAR1 (ADAR1b) se expresa 48 veces más y se ha encontrado la misma proporción en el córtex humano. En células SH-SY5Y, tal como en el ARN total del córtex cerebral humano, puede identificarse una cantidad reproducible de ARNm específico codificante de 5-HT2cR. Éste no era el caso de las células HTB-14, en las que el ARNm codificante del receptor no se expresaba en un intervalo que permitiese la expresión constante.

Otro punto fue verificar las capacidades de dichos enzimas de responder a modelos clásicos de inducción selectiva y de revelar la compleja actividad cooperativa de generación de los productos de los perfiles de edición. La validación de estos criterios se ilustra en las dos tablas siguientes.

Tabla 6: ARNm de ADAR1 y expresión de proteínas en células SH-SY5Y tratadas con IFN α

Se cultivaron células SH-SY5Y durante 48 horas en presencia de IFN α a una concentración de 1.000 IU/ml. Tras el tratamiento, se prepararon extractos de ARN total y de proteínas tal como se indica en la sección de Materiales y Métodos. La cuantificación de los niveles de ARNm de expresión se llevó a cabo mediante análisis de PCR en tiempo real cuantitativa TaqMan (Q-PCR) en un aparato StepOnePlus™ de 96 pocillos de Applied Biosystems (Applied Biosystems, ref. 4376592). Las sondas utilizadas para la Q-PCR eran de Applied Biosystems (Gene Expression Assays, Assay-On-Demand): isoforma constitutiva p110 de ADAR1 (Hs 01017596_m1), isoforma inducible p150 de ADAR1 (Hs 01020780_m1). La GAPDH humana (Applied Biosystems, ref. 4326317E) se incluyó en cada Q-PCR multiplex a modo de control interno. Se calculó la RQ siguiendo las instrucciones del proveedor. Se consideró que la expresión del gen ADAR1a era la referencia y que su RQ era igual a 1.

Los extractos de proteínas se resolvieron mediante SDS-PAGE en un gel desnaturalizante de acrilamida al 12% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa PROTRAN BA 85 (Whatman, ref. 10 401 197). Para la detección de proteínas ADAR1, se realizó una transferencia a las membranas de nitrocelulosa con un anticuerpo policlonal de cabra purificado por afinidad L-15 (Santa Cruz, ref. sc-19077). Las bandas correspondientes a las isoformas tanto constitutiva (p110) como inducible (p150) de ADAR1 se muestran con flechas. También se ilustran los estándares de proteínas (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad, ref. 161-0363). Las bandas correspondientes a las proteínas de interés se escanearon con el aparato Li-Cor Odyssey y se cuantificaron adicionalmente con el software MCID (ver la figura 5). La densidad óptica (DO) obtenida para cada escaneo y cada condición experimental se muestra entre paréntesis (ver la Tabla 6). Por convención, la DO de la isoforma ADAR1a en células no tratadas se consideró la referencia y se consideró igual a 1.

Tabla 6

	RQ de ARNm de células no tratadas	RQ de ARNm de células tratadas con IFN (1.000 IU/ml-48 h)	DO proteína (transferencia western) Células no tratadas	DO proteína (transferencia western) células tratadas con IFN (1.000 IU/ml-48 h)
ADAR1a	1	10,3	1 (22,12 DO)	12,1 (268 DO)
ADAR1b	21,7		116,2 (2.570 DO)	117,1 (2.590 DO)

El presente experimento demuestra claramente que bajo las condiciones de cultivo expresadas anteriormente, la respuesta de la estirpe celular seleccionada a la inducción producida por IFN α puede observarse al nivel de proteína enzimática con la misma especificidad y proporción de amplitudes que la predicha por la cuantificación del ARNm.

El análisis de la distribución de los productos de dichos enzimas de edición (índice de sus actividades) se llevó a cabo mediante la utilización de la tecnología SSCP-CE anteriormente indicada, en el Ejemplo 3A, y que permite cuantificar en un único ensayo de una muestra de ARN total, el perfil total de distribución de todas las isoformas

editadas y no editadas expresadas del ARNm de 5-HT2cR. La Tabla 8 proporciona un ejemplo de perfiles de edición obtenidos de 3 estructuras corticales límbicas y de la estirpe celular SHSY5Y bajo condiciones de control.

5 Tabla 8: comparación entre los perfiles de edición de 5-HT2cR determinados en 3 áreas del cerebro humano de sujetos de control y en células SH-SY5Y en cultivo bajo condiciones de control. Los presentes inventores observaron un perfil de edición reproducible en placas individuales de cultivo (n=8). Observaron que el número de isoformas editadas era menor en la estirpe celular pero que la proporción media de isoformas en un intervalo $\geq 1\%$ seguía siendo similar, indicando una eficiencia similar del procedimiento analítico utilizado para la cuantificación. Las células sombreadas indican las proporciones de isoforma NE y el grupo de isoformas bajo un límite de 1%. Los resultados se expresan como la media en % del ARNm específico total $\pm$ SEM (n=6 sujetos humanos de control y 8 placas de cultivo bajo condiciones de control).

10

DPFCx	Controles		ACCX	Controles		Cx entorrinal	Controles		Células SH-SY5Y	Controles	
	Media (%)	SEM		Media (%)	SEM		Media (%)	SEM		Media (%)	SEM
Isoformas			Isoformas			Isoformas			Isoformas		
ABCD (VSV)	11,67	1,01	ABCD (VSV)	15,14	1,82	ABCD (VSV)	11,75	1,84	NE (INI)	54,0	2,9
A (VNI)	10,14	1,83	AD (VNV)	9,07	1,67	A (VNI)	10,41	1,11	A (VNI)	29,5	3,4
ABD (VNV)	8,51	0,66	NE (INI)	7,95	1,13	NE (INI)	9,54	1,54	AC (VSI)	3,9	0,6
NE (INI)	8,01	1,28	ABD (VNV)	7,73	0,56	ABD (VNV)	8,33	0,73	B (MNI)	2,0	0,5
AD (VNV)	7,01	1,31	A (VNI)	7,42	0,87	AD (VNV)	6,71	1,07	AB (VNI)	1,9	0,7
ACE (VGI)	5,02	0,93	C (ISI)	5,03	0,47	ACE (VGI)	5,67	0,68	D (INV)	1,8	1,0
DE (IDV)	4,57	0,45	ACE (VGI)	4,77	1,12	AC (VSI)	5,33	0,73	ABC (VSI)	1,7	0,5
C (ISI)	4,56	0,89	ABC (VSI)	4,10	0,18	ACD (VSV)	3,50	0,34	C (ISI)	1,2	0,4
ABC (VSI)	4,30	0,85	DE (IDV)	3,82	0,23	C (ISI)	3,41	0,68	CE (IGI)	0,9	0,3
ACDE (VGV)	3,91	0,59	AC (VSI)	3,81	0,72	DE (IDV)	3,40	0,39	BC (MSI)	0,5	0,4
AC (VSI)	3,84	1,25	AB (VNI)	3,45	0,29	D (INV)	3,07	0,18	BCD (MSV)	0,4	0,1
ACD (VSV)	3,31	0,18	ACD (VSV)	3,26	0,52	BD (MNV)	3,03	0,10	CD (ISV)	0,3	0,2
AB (VNI)	3,12	0,67	D (INV)	3,08	0,41	CD (ISV)	2,71	0,31	ABD (VNV)	0,3	0,1
D (INV)	2,70	0,31	ACDE (VGV)	2,66	0,53	AB (VNI)	2,36	0,95	ACE (VGI)	0,3	0,0
BD (MNV)	2,68	0,35	CD (ISV)	2,47	0,42	ADE (VDV)	1,96	0,75	ACD (VSV)	0,2	0,0
ABCE (VGI)	2,43	0,57	BD (MNV)	2,18	0,09	E (IDI)	1,79	0,16	AE (VDI)	0,2	0,1
CD (ISV)	2,15	0,15	ABCDE (VGV)	1,97	0,74	BC (MSI)	1,56	0,39	BCE (MGI)	0,2	0,1
ABE (VDI)	1,82	0,22	ABE (VDI)	1,86	0,17	ABCDE (VGV)	1,54	0,41	E (IDI)	0,1	0,1
B (MNI)	1,44	0,36	ABCDE (VGI)	1,49	0,26	ABE (VDI)	1,50	0,10	CDE (IGV)	0,1	0,1

DPFCx	Controles		ACCX	Controles		Cx entorrinal	Controles		Células SH-SY5Y	Controles	
ADE (VDV)	1,19	0,10	B (MNI)	1,24	0,37	AE (VDI)	1,45	0,35	DE (IDV)	0,1	0,1
BCE (MGI)	0,96	0,06	CE (IGI)	1,11	0,25	B (MNI)	1,43	0,45	ABCE (VGI)	0,1	0,1
BCDE (MGV)	0,86	0,09	ADE (VDV)	1,03	0,11	ABC (VSI)	1,39	0,28	ABCDE (VGV)	0,1	0,0
CE (IGI)	0,81	0,09	BCE (MGI)	0,99	0,09	ABDE (VDV)	1,26	0,37	ACDE (VGV)	0,1	0,0
CDE (IGV)	0,64	0,09	BC (MSI)	0,97	0,15	CE (IGI)	1,26	0,18	BE (MDI)	0,1	0,0
ABDE (VDV)	0,59	0,22	BCDE (MGV)	0,95	0,12	ABCE (VGI)	1,08	0,32	ABDE (VDV)	0,0	0,0
BCD (MSV)	0,42	0,10	ABDE (VDV)	0,93	0,27	CDE (IGV)	1,05	0,15	ADE (VDV)	0,0	0,0
BE (MDI)	0,31	0,26	CDE (IGV)	0,70	0,17	BCDE (MGV)	0,92	0,11	ABE (VDI)	0,0	0,0
BC (MSI)	0,29	0,14	BCD (MSV)	0,44	0,13	BCD (MSV)	0,74	0,14	BDE (MDV)	0,0	0,0
AE (VDI)	0,16	0,08	AE (VDI)	0,37	0,24	ACDE (VGV)	0,69	0,24	BCDE (MGV)	0,0	0,0
BDE (MDV)	0,0	0,0	BDE (MDV)	0,00	0,00	BCE (MGI)	0,67	0,05	ABCD (VSV)	0,0	0,0
BE (MDI)	0,00	0,00	BE (MDI)	0,00	0,00	BDE (MDV)	0,37	0,29	AD (VNV)	0,0	0,0
E (IDI)	0,00	0,00	E (IDI)	0,00	0,00	BE (MDI)	0,11	0,07	BD (MNV)	0,0	0,0
	Media	Número		Media	Número		Media	Número		Media	Número
Suma total	100,0	32,00	Suma total	100,0	32,00	Suma total	100,0	32,00	Suma total	100,0	32,00
Suma <1%	4,1	11	Suma <1%	2,4	7	Suma <1%	3,5	6	Suma <1%	4,1	16
Suma >=1%	93,3	21	Suma >=1%	97,6	25	Suma >=1%	96,5	26	Suma >=1%	95,9	8

La capacidad de medir rápidamente estas distribuciones es un requisito previo para poder investigar correctamente las modificaciones de las actividades de los enzimas de edición que podrían producirse en estados patológicos o con la aplicación de moléculas.

5 Ejemplo 6: el modelo del interferón: su interés en la orientación de una estrategia específica para comparar moléculas sometidas a ensayo

10 Tal como se ha indicado anteriormente, el tratamiento de interferón α , principalmente para tratar la hepatitis C, puede inducir graves alteraciones del humor en un gran proporción de pacientes (30% a 50%). De esta manera, resulta interesante analizar el efecto de IFN α sobre la estirpe celular seleccionada por los presentes inventores ya que (ver la Tabla 7) esta molécula es conocido que es un fuerte inductor de la isoforma inducible ADAR1a de ADAR1.

15 En una primera etapa, se evaluó el efecto de un intervalo de concentraciones mediante la medición del grado de expresión de dicho enzima mediante QPCR de su ARNm específico. Se llevó a cabo un conjunto adicional de experimentos para analizar el efecto del producto sobre el perfil de edición que se consideró un índice potente de las actividades de los enzimas de edición. Se resumen los resultados en la figura 1 y en la Tabla 4 (ver también la Tabla 7).

20 Dichos resultados indican claramente que la inducción de ADAR1a era selectiva y conducía a una alteración significativa del perfil de edición concentrado principalmente en las isoformas AB, ABC y C. Bajo condiciones de control, dichas isoformas representaban 7,5% de 5-HT2cR específico total (ver la Tabla 7). Al aplicar 1.000 IU/ml al medio durante 48 horas, se encontró que esta proporción era de 26%. De esta manera, resultó evidente que la inducción de ADAR1a afectaba principalmente a la producción de dichas isoformas.

25 Con el fin de analizar estadísticamente dicha alteración de los perfiles y con el fin de referirse al hecho de que la comparación de hecho estaba limitada a una alteración de una distribución normalizada, en primer lugar los presentes inventores clasificaron las variaciones observadas de la proporción media de las isoformas expresadas en función de su incremento medio algebraico. Esta clasificación se definió como "firma" de la modificación global observada. Las variaciones de las dos partes de esta firma seguidamente se sometieron a ensayo mediante análisis de la varianza. A continuación se completó el análisis mediante un análisis de componentes considerando grupos de isoformas para los que podía detectarse una alteración significativa de las proporciones.

30 A título de ejemplo de dicho procedimiento, los presentes inventores decidieron utilizar a modo de referencia un grupo de componentes significativos deducidos del análisis de la comparación de las firmas obtenidas de los perfiles de edición de los sujetos de control y los pacientes de suicidio depresivo.

El resultado de dicho análisis se presenta en la figura 3.

40 Se observa que, a partir de dicho análisis, 4 componentes variaban significativa y positivamente en las 3 estructuras cerebrales humanas y 9 componentes compartían una variación significativa positiva en los 2 córtex prefrontales. La última columna de la tabla ilustra el resultado del mismo análisis realizado en células en cultivo SH-SY5Y (origen humano) tras la aplicación durante 48 horas de IFN-alfa humano a una concentración de 1.000 IU/ml. Resulta interesante subrayar la similitud de la firma de los componentes identificados como alterados en las 3 estructuras corticales de pacientes de suicidio depresivo. De esta manera resultó posible proponer razonablemente la utilización de los mismos criterios tras el perfilado de edición de las moléculas de referencia para ver si algunas de ellas presentaba la capacidad de inducir alteraciones del ARNm de edición de 5-HT2c similares a las observadas tras la aplicación de IFN α .

50 Ejemplo 7: utilización de la plataforma *in vitro* para la detección de moléculas de referencia que inducen una alteración similar del perfil de edición al observado tras el tratamiento de IFN α

Los presentes inventores decidieron utilizar este tipo de análisis de componentes con diferentes clases de moléculas típicas sujetas o no a advertencias de la FDA referentes a alteraciones del humor y riesgo de suicidio. Se llevó a cabo un cribado *in vitro* del perfil de edición tras la aplicación de cada una de ellas en células en cultivo SH-SY5Y durante 48 horas a una concentración de 10 μ M. Se llevó a cabo el análisis de los perfiles de edición del ARNm de 5-HT2c y se analizó con el mismo grupo de componentes definido anteriormente (ver la figura 3).

60 Un ejemplo de dicha clasificación se proporciona en la figura 4, permitiendo identificar varias moléculas, pertenecientes a diferentes clases terapéuticas, con una actividad de edición de ARNm de 5-HT2cR alterada de manera similar, y que presentaban potencialmente, de hecho, un riesgo potencial de inducción de efectos secundarios psiquiátricos similares. Se observó que Rimonabant y Taranabant pertenecían a esta familia conjuntamente con algunas moléculas antidepresivas, antipsicóticas y anticonvulsivas.

65 Dicho tipo de análisis de los perfiles de edición proporciona los criterios más sensibles que permiten clasificar mediante cribado *in vitro*, las moléculas que comparten alteraciones comunes de la edición del ARNm de una diana

dada. La elección de los componentes no se encuentra limitada y puede orientarse según varios criterios. En el caso de que esta diana, en la presente memoria 5-HT_{2c}R, se relacione directamente en el control del humor, los ritmos circadianos, el dolor, la conducta alimentaria, etc., dicha evaluación puede considerarse una herramienta válida de análisis de los riesgos predichos de efectos secundarios adversos de las nuevas moléculas bajo investigación preclínica.

Listado de secuencias

- <110> BIOCORTECH
- <120> Evaluación del riesgo potencial de alteración del estado de ánimo y suicidio inducidos farmacológicamente: utilización de una plataforma dedicada
- <130> D27196
- <150> EP 08305963.4
- <151> 2008-12-17
- <160> 17
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 24
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia derivada del ADNc que codifica el receptor 5-HT_{2C}
- <400> 1
- tgtccctagc cattgctgat atgc 24
- <210> 2
- <211> 24
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia derivada del ADNc que codifica el receptor 5-HT_{2C}
- <400> 2
- gcaatcttca tgatggcctt agtc 24
- <210> 3
- <211> 26
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia derivada del ADNc que codifica el receptor 5-HT_{2C}
- <400> 3
- atgtgctatt ttaacagcg tccatc 26
- <210> 4
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Artificial

ES 2 541 145 T3

	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia derivada del ADNc que codifica el receptor 5-HT2C	
	<400> 4 gcaatcttca tgatgcctt a	21
5	<210> 5 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia derivada del ADNc que codifica el receptor 5-HT2C	
	<400> 5 ttgtgcccc gtctggat	18
15	<210> 6 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia derivada del ADNc que codifica el receptor 5-HT2C	
20	<400> 6 gccttagtcc gcgaattg	18
	<210> 7 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia derivada del ADNc que codifica la isoforma ADAR1 150 humana	
	<400> 7 gcctcgctgg cgcaatgaat cc	22
30	<210> 8 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia derivada del ADNc que codifica la isoforma ADAR1 150 humana	
	<400> 8 cttgcccttc ttgccaggg ag	22
40	<210> 9 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia derivada del ADNc que codifica la isoforma ADAR1 110 humana	

ES 2 541 145 T3

	<400> 9 cgagccatca tggagatgcc ctcc	24
5	<210> 10 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia derivada del ADNc que codifica la isoforma ADAR1 110 humana	
10	<400> 10 catagctgca tcctgcttgg ccac	24
15	<210> 11 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia derivada del ADNc que codifica el ADAR2 humano	
20	<400> 11 gctgcgcagt ctgccctggc cgc	23
	<210> 12 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia derivada del ADNc que codifica el ADAR2 humano	
30	<400> 12 gtcatgacga ctccagccag cac	23
	<210> 13 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia derivada del ADNc que codifica la isoforma ADAR1 150 murina	
35	<400> 13 gtctcaaggg ttcaggggac cc	22
40	<210> 14 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia derivada del ADNc que codifica la isoforma ADAR1 150 murina	
45	<400> 14 ctcctctagg gaattcctgg atac	24

ES 2 541 145 T3

<210> 15
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia derivada del ADNc que codifica la isoforma ADAR1 110 murina

<400> 15
 tcacgagtgg gcagcgtccg agg 23

10 <210> 16
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia derivada del ADNc que codifica el ADAR2 murino

<400> 16
 gctgcacagt ctgccttggc tac 23

20 <210> 17
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia derivada del ADNc que codifica el ADAR2 murino

25 <400> 17
 gcataaagaa acctgagcag ggac 24

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para la determinación de la toxicidad o los efectos secundarios potenciales de un compuesto de ensayo después de su administración en un paciente, que comprende las etapas siguientes:

a) obtener una muestra biológica que contiene células de mamífero, en el que dichas células de mamífero son estirpes celulares de origen humano que presentan una expresión regular y constitutiva de los enzimas de edición ADAR1a, ADAR1b y ADAR2 y del receptor de serotonina 2C (5HTR2C);

b) poner en contacto dichas células de mamífero con el compuesto que debe someterse a ensayo;

c) determinar en el mismo extracto celular:

- el perfil de edición que proporciona la proporción media de cada isoforma identificada del ARNm de 5-HT2CR medido en el extracto celular de ARN, y

- la expresión cuantitativa de dichos enzimas de edición ADAR1a, ADAR1b y ADAR2;

d) comparar los resultados obtenidos en la etapa c) entre dichas células tratadas con el compuesto que debe someterse a ensayo y las células de control no tratadas,

en el que en la etapa a) dichas células de mamífero proceden de la estirpe celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

2. Método según la reivindicación 1, en el que en la etapa c), se determina la expresión cuantitativa de dichos enzimas de edición ADAR1a, ADAR1b y ADAR2, mediante la medición de la expresión de ARNm de dichos enzimas de edición o mediante la medición de las proteínas enzimáticas de edición expresadas en el extracto celular.

3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que en la etapa c), el perfil de edición de cada isoforma identificada del ARNm de 5-HT2CR y la expresión de ARNm cuantitativa de dichos enzimas de edición, ADAR1a, ADAR1b y ADAR2, determinados en el mismo extracto celular, se determinan en el mismo extracto celular de ARN total.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que en la etapa c), el análisis de los resultados de la determinación del perfil de edición permiten obtener los índices de actividad de estos enzimas de edición, ADAR1a, ADAR1b y ADAR2.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la toxicidad o los efectos secundarios potenciales de dicho compuesto de ensayo después de su administración en un paciente se seleccionan de entre el grupo que consiste en trastornos mentales, esquizofrenia, depresión, suicidio por depresión o conducta alimentaria anormal.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que en la etapa c), el perfil de edición que proporciona la proporción media de cada isoforma identificada del ARNm de 5-HT2CR medido en el extracto de ARN celular se mide mediante un método CE-SSCP que implica una PCR de tipo anidado que comprende dos rondas de PCR, y en el que la primera ronda de PCR se lleva a cabo con los conjuntos de cebadores siguientes:

para las estirpes celulares humanas:

directo: 5'-TGTCCCTAGCCATTGCTGATATGC-3',

inverso: 5'-GCAATCTTCATGATGGCCTTAGTC-3'; y

en el que la segunda ronda de PCR se lleva a cabo con los conjuntos de cebadores siguientes:

para las estirpes celulares humanas:

directo: 5'-ATGTGCTATTTTCAACAGCGTCCATC-3',

inverso: 5'-GCAATCTTCATGATGGCCTTA-3'.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que en la etapa c), el par de cebadores específicos para la amplificación por PCR del ARNm de ADAR se seleccionan de entre el grupo que consiste en:

- para la amplificación del ARNm de la isoforma ADAR1-150 humana:

directo: 5'-GCCTCGCGGGCGCAATGAATCC-3'

inverso: 5'-CTTGCCCTTCTTTGCCAGGGAG-3'

- para la amplificación del ARNm de la isoforma ADAR1-110 humana:

5 directo: 5'-CGAGCCATCATGGAGATGCCCTCC-3'
 inverso: 5'-CATAGCTGCATCCTGCTTGCCAC-3'

- para la amplificación del ARNm de ADAR2 humano:

10 directo: 5'-GCTGCGCAGTCTGCCCTGGCCGC-3'
 inverso: 5'-GTCATGACGACTCCAGCCAGCAC-3'

8. Kit para la determinación de la toxicidad o los efectos secundarios potenciales de un compuesto de ensayo después de su administración en un paciente, comprendiendo dicho kit:

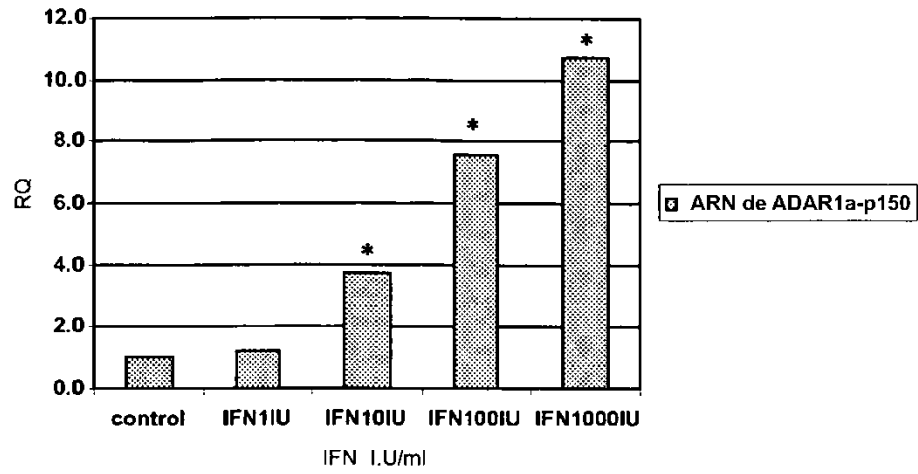
15 a) unas células de mamífero de una estirpe celular de origen humano en el que dichas células presentan una expresión regular y constitutiva de los enzimas de edición ADAR1a, ADAR1b y ADAR2 y del receptor de serotonina 2C (5HTR2C); y

20 b) dos conjuntos de cebadores para medir mediante una PCR cuantitativa (Q) que implica una PCR de tipo anidado que comprende dos rondas de PCR cada isoforma del ARNm de 5-HT2CR que puede encontrarse presente en un extracto de ARN de dichas células de mamífero; y

 c) un conjunto de cebadores para medir mediante una Q-PCR cuantitativa la expresión cuantitativa de los enzimas de edición ADAR1a, ADAR1b y ADAR2,

25 en el que en la etapa a), dichas células de mamífero proceden de la estirpe celular de neuroblastoma SH-SY5Y.

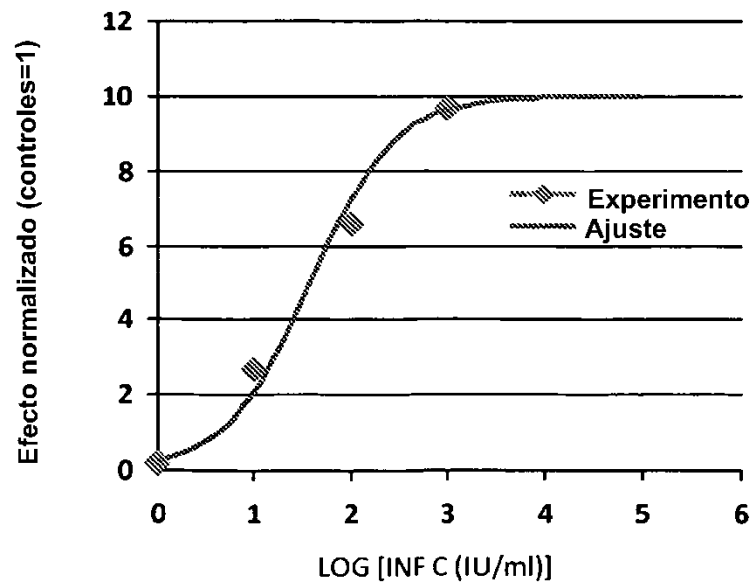
Expresión de ARN de ADAR1a. Dosis-respuesta de IFN



CTMEDIA = 34

(* : $p < 0.05$)

FIGURA 1A



EC₅₀ = 38 I.U/ml

FIGURA 1B

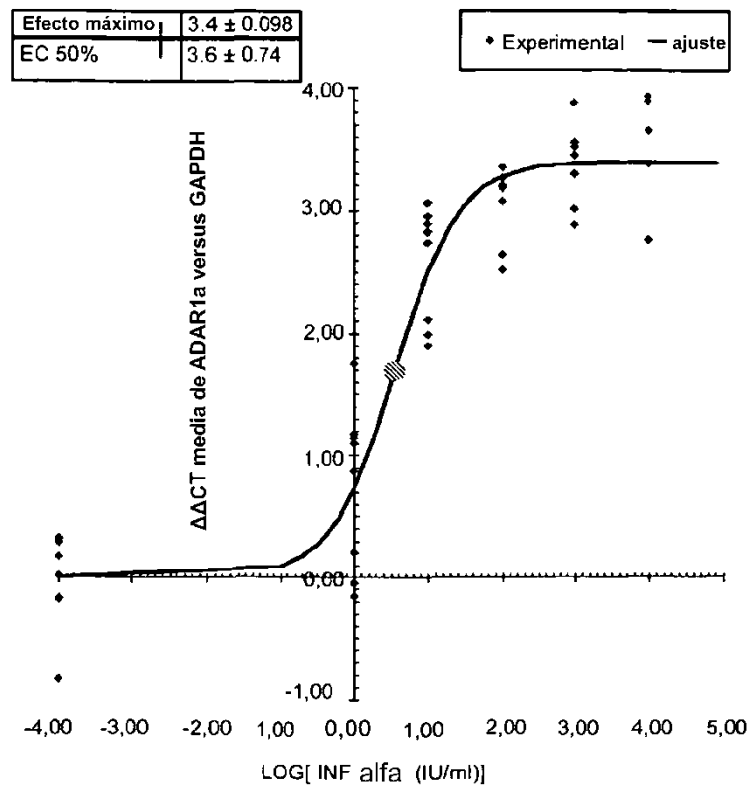


FIGURA 2A

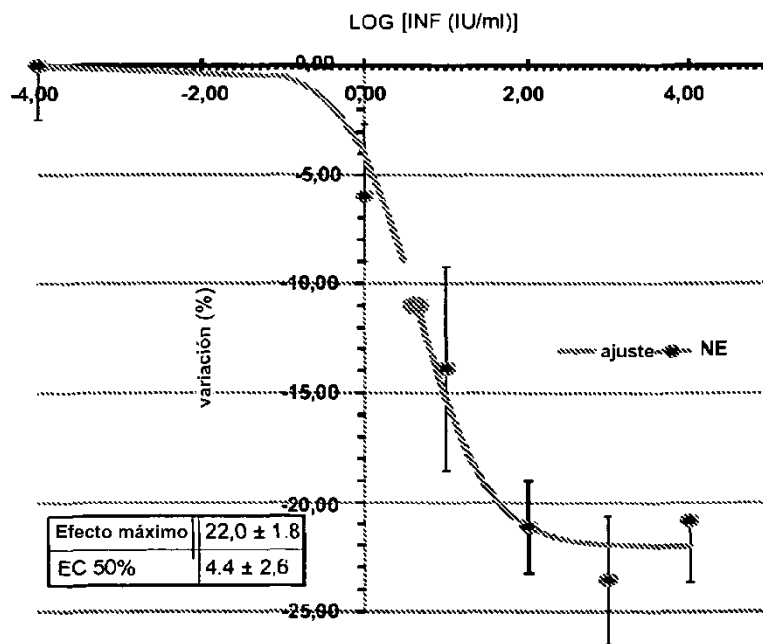


FIGURA 2B

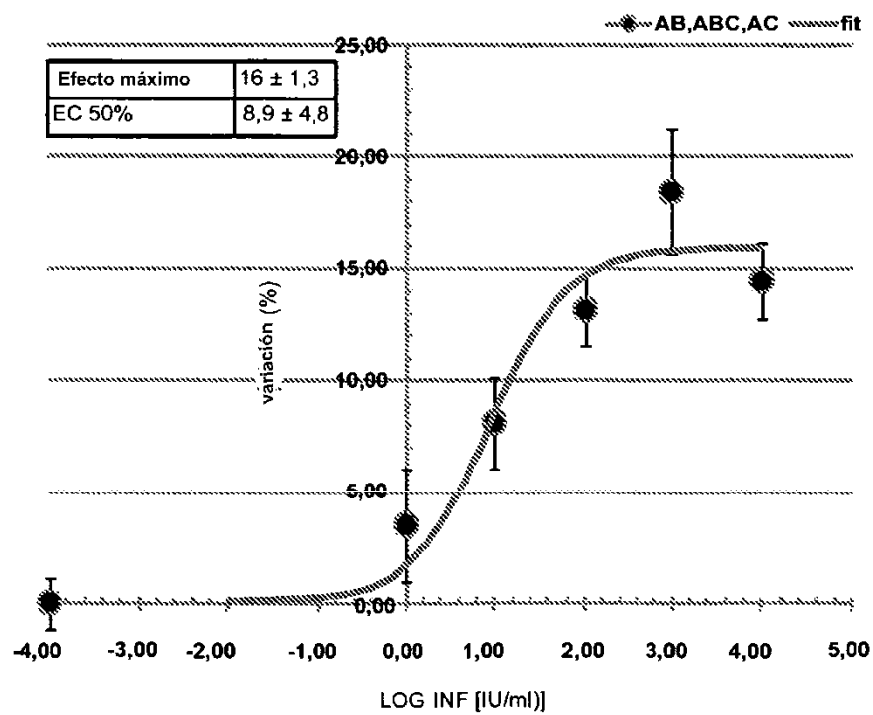


FIGURA 2C

		DPFCx humano	ACCx humano	Cx entorrinal humano	Células SH-SH5Y IFN 48 h	
AB	Global					
	POSITIVO					
	NEGATIVO					
AC	Global					
	POSITIVO		<0,06			
	NEGATIVO					
ABC	Global					
	POSITIVO					
	NEGATIVO					
BC	Global					
	POSITIVO					
	NEGATIVO					
CD	Global					
	POSITIVO					
	NEGATIVO					
ABD	Global					
	POSITIVO					
	NEGATIVO					
AD	Global					$\Delta (+)$
	POSITIVO					$\Delta (-)$
	NEGATIVO					
BD	Global					
	POSITIVO					
	NEGATIVO					
BCD	Global					
	POSITIVO					
	NEGATIVO					
CE	Global					
	POSITIVO					
	NEGATIVO					

FIGURA 3

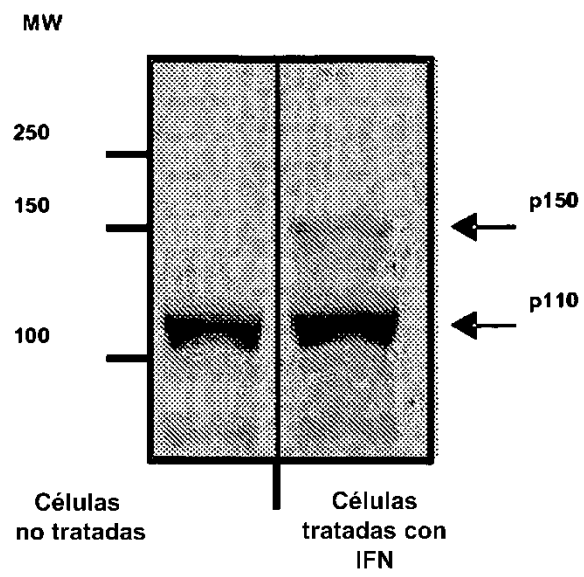


FIGURA 5