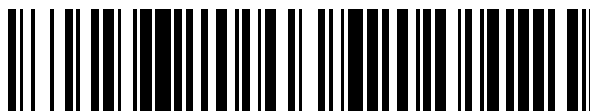


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 732**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2009 E 09781956 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2321417**

54 Título: **STXBP1 como biomarcador psiquiátrico en un sistema de modelo murino y sus usos**

30 Prioridad:

20.08.2008 US 90607 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.09.2015

73 Titular/es:

BRAINCO BIOPHARMA, S.L. (50.0%)
Parque Tecnológico de Zamudio Edificio 504
48160 Derio, Bizkaia, ES y
UNIVERSIDAD DEL PAIS VASCO EUSKAL
HERRIKO UNIBERTSITATEA (50.0%)

72 Inventor/es:

GUERRERO MARTÍNEZ, MARÍA JOSÉ;
SIMÓN BUELA, LAUREANO;
FERRER-ALCÓN, MARCEL;
MARTÍNEZ MARTÍNEZ, ANTONIO;
MEANA, JOSÉ JAVIER;
CALLADO, LUIS FELIPE y
URIGUEN, LEYRE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 546 732 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

STXBP1 como biomarcador psiquiátrico en un sistema de modelo murino y sus usos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un marcador de enfermedades psiquiátricas, particularmente esquizofrenia y trastorno bipolar, en modelos murinos que utilizan el marcador y a los métodos para explorar agentes que afectan al marcador y que pueden tener potencial terapéutico.

10

Antecedentes de la invención

Los trastornos psiquiátricos tales como esquizofrenia se están convirtiendo en uno de los problemas de salud pública más importantes a escala global. Las causas de la enfermedad aún se comprenden mal, aunque los factores genéticos tienen indudablemente un papel importante en su etiología. Además, esta enfermedad no se desarrolla debido a la alteración de un solo gen, sino más probablemente debido a cambios en un grupo de genes, lo que la convierte en una enfermedad multifactorial.

15

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente 24 millones de personas padecen actualmente esquizofrenia, lo que se aproxima al 1 % de la población mundial, y su prevalencia es similar en hombres y mujeres. La esquizofrenia aparece por lo general al final de la adolescencia o al principio de la edad adulta, y produce importantes cambios en los procesos cognitivos, en la percepción y en las emociones. Su evolución varía, y puede ir desde un único episodio con recuperación completa a un grave deterioro y al suicidio. Aunque los pacientes con esquizofrenia representan menos del 40 % de los que necesitan hospitalización psiquiátrica, la morbilidad y cronicidad experimentadas por los pacientes con esquizofrenia significa que esta se ha convertido en la enfermedad mental más grave e incapacitante de la vida adulta temprana e intermedia. De hecho, se ha estimado que el coste directo de la esquizofrenia en países industrializados está entre el 1,6 y el 2,6 % del gasto sanitario total [Rossler, 2005].

20

25

La hipótesis neurobiológica clásica para explicar la esquizofrenia invoca la hiperactividad del sistema dopaminérgico del cerebro. Los fármacos antipsicóticos producirían su efecto terapéutico, por tanto, antagonizando estos receptores de la dopamina. Esta hipótesis se refinó posteriormente sugiriendo que la hipoactividad del sistema glutamatérgico cortical sería responsable de la hiperactividad dopaminérgica observada en la esquizofrenia. De hecho, el control del sistema dopaminérgico cortical mediante el sistema glutamatérgico cortical podría ser consistente con los postulados clásicos. Estudios recientes han demostrado importantes deficiencias neuronales y/o gliales en la corteza, posiblemente vinculadas en el desarrollo temprano del sistema nervioso asociado con la esquizofrenia. Es por tanto más probable que la esquizofrenia está causada por conexiones neuronales anómalas en lugar de la pérdida neuronal [Horner, 2002].

30

35

Los estudios genéticos han identificado numerosos genes susceptibles vinculados a la esquizofrenia [Weinberger, 2005]. A pesar de esto, en la actualidad se carece de marcadores fiables para la esquizofrenia. Uno de los sustratos moleculares candidatos para un tipo de conectividad neuronal anómala es un grupo de proteínas neuronales conocidas como SNARE (*factores sensibles a N-etilmaleimida de unión a receptores de proteínas*), que sirven como elementos fundamentales en el control molecular de la neurotransmisión [Sollner, 1993a; Sollner, 1993b]. Este proceso de neurotransmisión se avanza en respuesta a una entrada de Ca^{2+} activada mediante un potencial de acción que provoca la fusión de las vesículas sinápticas que contienen los neurotransmisores con las membranas presinápticas y la liberación de su contenido en la hendidura sináptica, desde donde estas moléculas se difunden hacia la terminal post-sináptica. Se han identificado dos tipos de proteínas SNARE dependiendo de su ubicación subcelular: a) proteínas v-SNARE, que se describieron por primera vez en las vesículas de neurotransmisores y que incluyen la proteína VAMP/sinaptobrevina; y b) proteínas t-SNARE, que se describieron por primera vez en la región presináptica de la membrana plasmática diana e incluye sintaxina y la *proteína asociada al sinaptosoma de 25 kDa*, o SNAP25. Este grupo de proteínas se caracteriza por tener una región conservada de aproximadamente 60 aminoácidos, conocido como el motivo SNARE, y tiene por lo general una región implicada en el anclaje a la membrana. Se cree actualmente que las proteínas SNARE están muy implicadas en la fusión de membranas, aunque necesitan para su actividad de otras proteínas auxiliares. Estas proteínas auxiliares incluyen el *factor sensible a N-etilmaleimida* o NSF (una ATPasa asociada a varias actividades celulares) y la familia de proteínas SM, que contiene la proteína Sec1p y la proteína Munc-18 (también conocidas como proteína de unión a sintaxina 1 (STXBP1)). Estas proteínas son esenciales en la fusión de membranas, ya que este evento es mucho más lento *in vitro* en su ausencia. El papel de STXBP1 en la liberación de neurotransmisores ha quedado claramente demostrado por una serie de experimentos que muestran que no se produce transmisión sináptica vesicular durante el desarrollo de animales que no expresan el gen que codifica esta proteína [Verhage, 2000]. El modelo más aceptado para explicar el mecanismo molecular de la liberación vesicular de neurotransmisores sugiere que STXBP1 se une a la sintaxina inhibiendo de esta forma la unión de esta proteína al resto del complejo SNARE. Cuando STXBP1 se libera de su asociación con la sintaxina, esta última puede interactuar con SNAP25 y VAMP para formar el complejo SNARE. Cuando se acopla con un aumento en el calcio intracelular, este complejo es responsable de promover el anclaje de las vesículas a la membrana plasmática, induciendo de esta forma la liberación de neurotransmisores

40

45

50

55

60

65

desde las vesículas sinápticas [Voets, 2001].

Algunos estudios recientes han demostrado que algunas enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas muestran cambios en la expresión (tanto en el ARN mensajero como en la proteína) de algunos componentes del complejo SNARE. Por ejemplo, se han descubierto cambios en los niveles las proteínas VAMP y SNAP-25 post-mortem en la corteza cerebral prefrontal de pacientes humanos con esquizofrenia [Honer, 2002; Halim, 2003]. De manera similar, se han descubierto niveles anómalos de SNAP-25 post-mortem en el hipocampo y en el cerebelo de cerebros esquizofrénicos [Young, 1998; Fatemi, 2001; Mukaetova-Landiska, 2002], y otros grupos han descubierto niveles anómalos de SNAP-25 en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con diagnóstico de esquizofrenia [Thompson, 2003]. Sin embargo, no se han descubierto cambios significativos asociados con la esquizofrenia en las proteínas NSF, que también están asociadas al complejo SNARE [Imai, 2001; Gray, 2006]. Se ha notificado un aumento en la expresión de STXBP1 en microdominios de membrana en la corteza dorsolateral prefrontal procedente de pacientes esquizofrénicos [Behan, 2008 y 2009]. Sin embargo, se ha notificado la infrarregulación de STXBP1 en ratas postpubertales lesionadas en el hipocampo ventral durante el nacimiento (nVH), un modelo de neurodesarrollo muy utilizado de conductas de tipo esquizofrénico [Vercauteren, 2007].

La expresión de MUNC-18 murino 1 (un homólogo de STXBP1) insertado con el promotor unc-18 endógeno corrigió los defectos neuronales en mutantes de *Caenorhabditis elegans unc-18* (discapacidad locomotora grave, resistencia a inhibidores de la colinesterasa, e hipersensibilidad a los agonistas del receptor colinérgico) [GENGYO-ANDO 1996].

Los ratones que tienen mutaciones sin sentido en el gen DISC1 (perturbado en la esquizofrenia) muestran rasgos conductuales que se pueden asociar con la esquizofrenia y se pueden utilizar como un modelo murino de la esquizofrenia [LOW 2007].

Los modelos en ratón que imitan el espectro fenotípico de un trastorno psiquiátrico, tal como esquizofrenia, son virtualmente imposibles. Sin embargo, es factible cierta recreación de componentes fenotípicos, y los modelos animales de la esquizofrenia a menudo intentan imitar algunos de los síntomas positivos/negativos del trastorno. En este contexto, los modelos animales tienen un papel fundamental para descubrir las causas de los trastornos psiquiátricos y nuevos tratamientos mecanicistas [Arguello y Gogos, 2006]. Se desean animales transgénicos como método para estudiar las funciones de los genes en un organismo vivo, o como modelo animal para desarrollar agentes terapéuticos. Sin embargo, es difícil preparar un modelo que refleje una enfermedad humana que tiene un mecanismo de desarrollo desconocido, tal como la esquizofrenia. Además, los hallazgos en animales que se correlacionan con síntomas positivos de esquizofrenia (tales como delusiones paranoides, alucinaciones, y trastornos del habla y del pensamiento) resultan ser desafiantes. Sin embargo, la hiperactividad en respuesta al estrés o a la novedad se han sugerido como correlaciones útiles que se pueden modelar en roedores, y se han utilizado ampliamente en la validación y valoración de modelos farmacológicos [Geyer y Moghaddam, 2002]. Menos ampliamente modelados se encuentran los síntomas negativos (tales como una expresión emocional plana, baja motivación, y retraimiento social). Estos síntomas representan una parte significativa de la psicopatología en la depresión mayor y, considerando la comorbilidad sustancial entre esquizofrenia y depresión, muchos de estos déficits pueden ser síntomas secundarios en la esquizofrenia [Ellenbroek y Cools, 2000]. La afectación de las interacciones sociales, la ansiedad y la conducta depresiva en animales se utilizan frecuentemente para modelar los síntomas negativos de la esquizofrenia. Además, los pacientes con esquizofrenia presentan diferentes formas de déficits de memoria, incluyendo afectación de la memoria de trabajo y la memoria episódica. Hasta la fecha, existen numerosas tareas de la memoria de trabajo utilizadas en animales, tales como las tareas de reconocimiento de objetos nuevos. Casi todos los modelos animales conductuales incluyen un componente locomotor. Por este motivo, es importante evaluar la actividad locomotora de los animales a ensayar antes aplicar las pruebas para descartar las posibles limitaciones en la capacidad de movimiento de los ratones transgénicos.

Existe en la actualidad una necesidad no satisfecha de modelos animales para la esquizofrenia. Sigue existiendo una notable dificultad en la traducción de los estudios de asociación genética a modelos que sean eficaces para evaluar la eficacia de los compuestos terapéuticos candidatos. En particular, la complejidad del trastorno significa que no suele ser normalmente predecible si una alteración genética asociada con el trastorno tiene un papel causal y producirá cambios conductuales de relevancia para la esquizofrenia.

55 Descripción de la invención

Los presentes inventores han descubierto ahora que STXBP1 se expresa mucho más intensamente en la corteza prefrontal de las personas esquizofrénicas que fallecieron por suicidio y que no tomaban fármacos en comparación con muestras tomadas de la misma región del cerebro de individuos de control sin antecedentes de enfermedades mentales que fallecieron accidentalmente. Resulta interesante el hecho de que los niveles de STXBP1 en pacientes esquizofrénicos en tratamiento con fármacos antipsicóticos fallecidos por suicidio eran inferiores a los de los pacientes esquizofrénicos sin tratamiento, y eran similares a los de sujetos de control. Además, los hallazgos descritos en el presente documento indican que una expresión potenciada de STXBP1 no es meramente un cambio consecencial asociado con la esquizofrenia, sino que parece tener un papel causativo, tal como se muestra por los cambios conductuales relacionados con la esquizofrenia en ratones transgénicos que

expresan STXBP1 en exceso en la corteza prefrontal. La diferencia observada en los niveles de STXBP1 entre los pacientes esquizofrénicos tratados con fármacos y no tratados con fármacos convierte a STXBP1 en una diana farmacológica atractiva y una herramienta de exploración para tratamientos candidatos de patologías psiquiátricas, incluyendo la esquizofrenia.

5 De acuerdo con ello, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un ratón transgénico que tiene un polinucleótido que codifica un polinucleótido de STXBP1, donde dicho polinucleótido está unido operativamente a un promotor EAAT3, en el que dicho animal transgénico tiene una expresión de polipéptido de STXBP1 mayor que el tipo silvestre en al menos una región cerebral. Preferentemente, los ratones transgénicos muestran una o más conductas relacionadas con la esquizofrenia, por ejemplo: una actividad motora reducida en pruebas a campo abierto; reducido tiempo pasado en brazos abiertos de un laberinto elevado; interacción social reducida; y aumento en el índice de reconocimiento en una tarea de reconocimiento de objetos novedosos.

15 El ratón transgénico puede incluir un gen o promotor extraño (es decir, material genético de otra especie) o puede no incluir ningún gen o promotor extraño. El último caso se considera en el presente documento como transgénico en virtud de una alteración en la ubicación, número de copias o secuencia de un polinucleótido que codifica STXBP1 y/o una alteración en el control de la expresión del polinucleótido que codifica STXBP1. En determinados casos, el animal transgénico de la invención puede tener dicho polinucleótido que codifica un polipéptido de STXBP1 presente en un número de copias mayor que el tipo silvestre.

20 Por ejemplo, el animal transgénico puede llevar un gen *stxbp1* tipo silvestre o no tipo silvestre en más de un número de copias diploide. El animal transgénico de la invención tiene el polinucleótido que codifica el polipéptido de STXBP1 unido operativamente a un promotor EAAT3 (transportador de aminoácidos excitadores) que muestra una expresión específica del cerebro o muy específica del cerebro.

25 En algunos casos del ratón transgénico de acuerdo con la invención, dicho polinucleótido codifica un polipéptido de STXBP1 que es un polipéptido de STXBP1 de ratón, rata o ser humano, una variante (tal como una variante de corte y empalme), un derivado (tal como un polipéptido procesado después de la traducción), homólogo u ortólogo de otra especie (preferentemente, un homólogo u ortólogo humano), o fragmento. El polipéptido de STXBP1 o fragmento del mismo muestra preferentemente actividad biológica, especialmente la capacidad de unirse a un polipéptido de sintaxina. En casos preferidos del ratón transgénico de acuerdo con la invención, dicho polinucleótido codifica:

- 35 (i) un polipéptido de STXBP1 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, 90 %, 95 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEC ID N°: 2;
- (ii) un polipéptido de STXBP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2
- (iii) un polipéptido de STXBP1 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, 90 %, 95 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEC ID N°: 4;
- (iv) un polipéptido de STXBP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4; o
- 40 (v) un fragmento activo de uno o más (i)-(iv) que tiene al menos 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 o 550 aminoácidos, en el que dicho polipéptido de STXBP1 o cualquier of (i)-(iv) o dicho fragmento activo de (v) puede unirse a un polipéptido de sintaxina.

45 Preferentemente, el promotor del gen EAAT3 es un promotor EAAT3 de la misma especie que el animal transgénico. El promotor EAAT3 puede comprender o consistir de un polinucleótido que tiene al menos un 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 6 o puede comprender o consistir en un polinucleótido que tiene la secuencia de la SEC ID N°: 6. Los presentes inventores han descubierto que el promotor EAAT3 permite una expresión elevada de STXBP1 de una forma dirigida; expresión ampliamente confinada a las neuronas glutamatérgicas. De esta manera, el uso del promotor EAAT3 para impulsar la expresión de STXBP1 proporciona una forma ventajosa de inducir el fenotipo análogo a la esquizofrenia deseado en algunas realizaciones del ratón transgénico de la invención.

50 Preferentemente, el ratón transgénico de la invención tiene una expresión de polipéptido de STXBP1 mayor que el tipo silvestre, tal como se define en el presente documento, en al menos una región cerebral seleccionada entre: corteza, cuerpo estriado, hipocampo y cerebelo. Los resultados descritos en el presente documento indican que una expresión elevada de STXBP1 en una o más de estas regiones cerebrales contribuye o subyace al fenotipo análogo a la esquizofrenia. La expresión elevada puede ser, en algunos casos, relativa a un aumento modesto de la expresión comparada con el tipo silvestre (por ejemplo, comparado con la expresión en la misma región cerebral de un ratón tipo silvestre del mismo sexo y edad que no incluye ninguna alteración genética relativa a STXBP1 o a su promotor). En algunos casos, la expresión elevada puede ser hasta de un 10 %, 20 %, 30 %, 50 % o más expresión del polipéptido de STXBP1 en dicha una región cerebral. Están disponibles diferentes técnicas para medir la expresión de STXBP1, incluyendo técnicas para la medida directa de los niveles de proteína (por ejemplo, transferencia de Western, inmunofluorescencia) y técnicas de medición indirecta basada en la medición del ARNm que codifica el polipéptido de STXBP1 (por ejemplo, cPCR).

65 Tal como se usa en el presente documento en relación a estos y otros aspectos de la presente invención, una expresión mayor o más elevada de STXBP1 puede incluir una expresión elevada en una fracción citosólica, una

fracción no citosólica o tanto citosólica como no citosólica en una o más regiones del cerebro. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree en la actualidad que la redistribución de STXBP1 desde una fracción de membrana hasta una fracción citosólica puede contribuir o ser subyacente a la esquizofrenia.

5 También se describe un vector que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de STXBP1 unido operativamente a un promotor específico de cerebro que es diferente al promotor del gen *stxbp1* y, opcionalmente, con más secuencias reguladoras. Preferentemente, dicho polinucleótido codifica un polipéptido de STXBP1 que es un polipéptido de STXBP1 de ratón, rata o ser humano, una variante (tal como una variante de corte y empalme), un derivado (tal como un polipéptido procesado después de la traducción), homólogo u ortólogo de otra especie
10 (preferentemente, un homólogo u ortólogo humano), o fragmento. El polipéptido de STXBP1 o fragmento del mismo muestra preferentemente actividad biológica, especialmente la capacidad de unirse a un polipéptido de syntaxina. En casos preferidos del vector de este aspecto de la invención, dicho polinucleótido codifica:

- 15 (i) un polipéptido de STXBP1 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, 90 %, 95 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEC ID N°: 2;
- (ii) un polipéptido de STXBP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 (iii) un polipéptido de STXBP1 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, 90 %, 95 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEC ID N°: 4;
- 20 (iii) un polipéptido de STXBP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4; o
- (iv) un fragmento activo de uno o más (i)-(iv) que tiene al menos 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 o 550 aminoácidos, y en el que dicho polipéptido de STXBP1 o cualquier of (i)-(iv) o dicho fragmento activo de (v) puede unirse a un polipéptido de syntaxina.

25 Dicho promotor del vector puede ser específico o muy específico de las neuronas glutamatérgicas. Un promotor preferido del vector de este aspecto de la invención es un promotor EAAT3. El promotor EAAT3 puede comprender o consistir de un polinucleótido que tiene al menos un 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 6 o puede comprender o consistir en un polinucleótido que tiene la secuencia de la SEC ID N°: 6.

30 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un ratón transgénico de la invención, que comprende:

35 introducir un vector en una o más células del animal en estado embrionario; y opcionalmente, extraer posteriormente el ADN del animal para confirmar la incorporación del polinucleótido en el genoma del animal. El método puede comprender además reproducir un ratón transgénico heterocigótico producido con el método de este aspecto de la invención con el fin de producir una progenie, en particular, una progenie homocigótica o heterocigótica respecto al polinucleótido incorporado.

40 La divulgación proporciona además un método *in vitro* para identificar un agente (por ejemplo, una molécula pequeña, un ácido nucleico o una proteína) para su uso en el tratamiento de enfermedades neuropsiquiátricas, particularmente esquizofrenia y/o trastorno bipolar, que comprende:

- 45 (i) poner en contacto una célula que expresa un polipéptido de STXBP1 con un agente de ensayo y medir, directa o indirectamente, la expresión del polipéptido de STXBP1 con respecto a la expresión del polipéptido de STXBP1 en una célula de control que aún no se ha expuesto al agente de ensayo; y/o
- (ii) poner en contacto un polipéptido de STXBP1 con un agente de ensayo y medir, directa o indirectamente, la unión del polipéptido de STXBP1 a un polipéptido de syntaxina con respecto a la unión de un polipéptido de STXBP1 de control que no se ha expuesto al agente de ensayo a un polipéptido de syntaxina,

50 en el que una reducción de dicha expresión en (i) y/o una reducción en dicha unión en (ii) debido al agente de ensayo indica que el agente de ensayo es potencialmente útil en el tratamiento de enfermedades neuropsiquiátricas, particularmente esquizofrenia y trastornos bipolares. Preferentemente, dicha célula que expresa un polipéptido de STXBP1 es una célula neuronal o célula no neuronal obtenida a partir de:

- 55 un paciente que tiene una enfermedad neuropsiquiátrica, particularmente esquizofrenia o trastorno bipolar; o un ratón transgénico de la invención; o una célula que se ha transfectado o transformado con un polinucleótido que codifica un polipéptido de STXBP1 o con un vector de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.

60 La expresión del polipéptido de STXBP1 se puede medir en cualquier etapa de expresión del gen que codifica STXBP1 (por ejemplo, medición del nivel de ARNm o el nivel de proteína). En casos preferidos del método de este aspecto de la invención, se encuentra que el agente de ensayo reduce dicha expresión en (i) y/o dicha unión en (ii). Dichos agentes de ensayo se pueden considerar como antagonistas funcionales del polipéptido de STXBP1 (actúen tanto antes de la traducción como después de la traducción). Los agentes de ensayo descubiertos que pueden
65 reducir dicha expresión en (i) y/o dicha unión en (ii) se pueden someter a exploración adicional (incluyendo exploración *in vivo* como se describe adicionalmente en la presente memoria). En algunos casos, el método de este

aspecto de la invención comprende adicionalmente aislar el agente de ensayo y, opcionalmente, formular el agente de ensayo en una composición farmacéutica con al menos una sal, transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un método de exploración *in vitro* que comprende:

poner en contacto al menos una célula que expresa un polipéptido de STXBP1 con un agente de ensayo; y detectar si dicho agente de ensayo altera una actividad relacionada con STXBP1 comparada con dicha actividad en ausencia del agente de ensayo.

10 El método puede comprender detectar un cambio en la actividad relacionada con STXBP1 en la presencia de dicho agente de ensayo en comparación con dicha actividad relacionada con STXBP1 en ausencia del agente de ensayo. El método puede comprender comparar la actividad relacionada con STXBP1 de una célula expuesta a un agente de ensayo con dicha actividad relacionada con STXBP1 de una (segunda) "célula control" que no ha sido expuesta al agente de ensayo. De manera adicional o alternativa, el método puede comprender comparar la actividad relacionada con STXBP1 de una célula expuesta a un agente de ensayo con dicha actividad relacionada con STXBP1 en la misma célula en ausencia del agente de ensayo. Por ejemplo, se puede establecer un "valor inicial" de dicha actividad relacionada con STXBP1 antes de añadir el agente de ensayo y evaluarse la actividad relacionada con STXBP1 (por ejemplo, con respecto al dicho valor inicial) tras exponer la célula al agente de ensayo. Preferentemente, la célula es una célula que se ha transfectado o transfectado con un vector que comprende un polinucleótido que codifica dicho polipéptido de STXBP1, por ejemplo, un vector de acuerdo con el segundo aspecto de la invención. En particular, la célula puede ser una línea celular de neuronas (por ejemplo, una línea celular humana o de un animal, tal como un roedor) o una línea celular derivada de citoblastos. La actividad relacionada con STXBP1 alterada se puede seleccionar entre: unión alterada de STXBP1 a sintaxina; unión alterada de sintaxina a un complejo SNARE; fusión de la vesícula sináptica-membrana plasmática alterada; exocitosis de la vesícula sináptica alterada; y señalización neuronal alterada. Por ejemplo, el método puede comprender detectar un cambio en el proceso de liberación de la vesícula sináptica (por ejemplo, un aumento o una disminución en la liberación de la vesícula sináptica) en la presencia del agente de ensayo en comparación con la liberación de la vesícula sináptica en ausencia del agente de ensayo. Preferentemente, se ha descubierto que el agente de ensayo inhibe al menos una actividad relacionada con STXBP1. La célula utilizada en el método puede comprender un vector que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de STXBP1 unido operativamente a un promotor, tal como un promotor que permite una expresión variable de STXBP1. El promotor puede ser un promotor EAAT3. Como alternativa o adicionalmente, se puede usar una pluralidad de células, comprendiendo cada una de ellas un vector que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de STXBP1 unido operativamente a un promotor. En algunos casos, la pluralidad de células puede comprender subconjuntos de células, en la que la célula de cada subconjunto tiene un vector que tiene un promotor que difiere del promotor de los vectores de las células de otros de dichos subconjuntos, tal como el nivel de expresión de STXBP1 que difiere entre dichos subconjuntos de células. Preferentemente, un primer subconjunto de células se caracteriza por una expresión relativamente baja de STXBP1 y un segundo subconjunto de células se caracteriza por una expresión de STXBP1 mayor con respecto a dicho primer subconjunto de células.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método *in vivo* para identificar un agente para su uso en el tratamiento de una enfermedad psiquiátrica, particularmente esquizofrenia y/o trastorno bipolar, que comprende:

45 (i) administrar un agente de ensayo a un ratón transgénico de la invención y posteriormente medir, directa o indirectamente, la expresión de un polipéptido de STXBP1 en al menos una región del cerebro con respecto a la expresión del polipéptido de STXBP1 en al menos una región del cerebro de un ratón transgénico control de la invención que no se ha expuesto al compuesto de ensayo; y/o

50 (ii) administrar un agente de ensayo a un ratón transgénico de la invención y posteriormente evaluar la presencia y/o la gravedad de una o más conductas relacionadas con la esquizofrenia en el ratón transgénico con respecto a una o más conductas relacionadas con la esquizofrenia en un ratón transgénico control de la invención, que no se ha expuesto al agente de ensayo,

55 en el que una reducción de dicha expresión en (i) y/o dichas una o más conductas relacionadas con la esquizofrenia en (ii) debido al agente de ensayo indica que el agente de ensayo es potencialmente útil en el tratamiento de enfermedades neuropsiquiátricas, particularmente esquizofrenia y trastornos bipolares. Dichas una o más conductas relacionadas con la esquizofrenia se pueden seleccionar entre: reducción de la actividad motora en una prueba de campo abierto; reducido tiempo pasado en brazos abiertos de un laberinto elevado; interacción social reducida; aumento en el índice de reconocimiento en una tarea de reconocimiento de objetos novedosos; y disminución de la inhibición prepulso de una respuesta inicial. Preferentemente, en el método de este aspecto de la invención, se encuentra que el agente de ensayo reduce dicha expresión en (i) y/o dichas una o más conductas relacionadas con la esquizofrenia en (ii). Dichos agentes de ensayo se pueden considerar antagonistas funcionales *in vivo* de STXBP1 y/o conductas de tipo esquizofrénico asociadas con STXBP1. En algunos casos, el agente de ensayo es un agente que se ha sometido a ensayo anteriormente. De esta forma, se puede usar una exploración inicial *in vitro* para posteriormente explorar *in vivo* los compuestos candidatos más prometedores.

El método de este aspecto de la invención puede ir seguido adicionalmente del aislamiento del agente de ensayo y, opcionalmente, formular el agente de ensayo en una composición farmacéutica con al menos una sal, transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 La divulgación proporciona un agente identificado, o que se puede identificar, por un método del aspecto anterior de la invención. El agente puede ser para su uso en medicina. Preferentemente, el agente es para su uso en un método para tratar una enfermedad psiquiátrica, particularmente esquizofrenia y trastornos bipolares. Preferentemente, el agente comprende:

10 una molécula de unión o fragmento de unión al mismo que se puede unir a un polipéptido de STXBP1 (por ejemplo, un polipéptido de STXBP1 tal como se define en relación a cualquier aspecto de la presente invención); o

15 un ácido nucleico de sentido contrario, ribozima, molécula de triple hélice, ARNip u otro ácido nucleico que pueda inhibir la expresión génica de STXBP1 (por ejemplo, que pueda hibridarse con al menos una porción de un polinucleótido que codifica el polipéptido de STXBP1 tal como se define en relación a cualquier aspecto de la presente invención o que pueda hibridarse con al menos una porción de un polinucleótido que sea complementario del polipéptido que codifica el polipéptido de STXBP1).

20 La divulgación proporciona el uso de un agente identificado o que se pueda identificar por un método del cuarto o quinto aspecto de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad psiquiátrica, particularmente esquizofrenia y trastornos bipolares. Dicho agente se puede definir con respecto a la divulgación.

25 La divulgación proporciona además un método para tratar una enfermedad neuropsiquiátrica, particularmente esquizofrenia y/o trastorno bipolar, en un sujeto (por ejemplo, un paciente humano necesitado de dicho tratamiento), que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente identificado, o que se puede identificar, por un método del cuarto o quinto aspecto de la invención. Dicho agente se puede definir con respecto al aspecto anterior de la divulgación.

30 También se describe un método para evaluar la presencia de, o la susceptibilidad a, una enfermedad neuropsiquiátrica, particularmente esquizofrenia y/o trastorno bipolar, en un sujeto de ensayo, que comprende:

35 detectar y/o determinar la cantidad de un polipéptido de STXBP1 y/o la cantidad de un ARNm o ADNc que codifica un polipéptido de STXBP1 en una muestra que se ha obtenido de dicho sujeto de ensayo; y
comparar dicha cantidad del polipéptido de STXBP1 y/o dicha cantidad del ARNm i ADNc que codifica el polipéptido de STXBP1 con uno o más valores de referencia que corresponden a la cantidad del polipéptido de STXBP1 y/o la cantidad del ARNm o el ADNc que codifica el polipéptido de STXBP1 en una muestra control obtenida de un sujeto control que no tiene una enfermedad neuropsiquiátrica. La muestra puede comprender
40 sangre, plasma, suero o tejido. Preferentemente, la muestra comprende tejido del sistema nervioso central (por ejemplo, tejido de la corteza prefrontal).

En algunos casos de este método, el sujeto de ensayo no ha recibido previamente un diagnóstico de tener una enfermedad neuropsiquiátrica. En algunos otros casos, el método, el sujeto de ensayo no ha recibido previamente
45 un diagnóstico de tener una enfermedad neuropsiquiátrica. El método se puede usar para evaluar la etapa y/o la gravedad de la enfermedad neuropsiquiátrica o para seguir el efecto de un tratamiento administrado al sujeto de ensayo.

La divulgación proporciona también un vector que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido asociado a una neuropatología unido operativamente a un promotor EAAT3 y opcionalmente secuencias reguladoras
50 adicionales. Preferentemente, el promotor EAAT3 comprende o consiste de un polinucleótido que tiene al menos un 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia de ácido con la secuencia de SEC ID N°: 6 o el promotor EAAT3 comprende o consiste en un polinucleótido que tiene la secuencia de la SEC ID N°: 6. El polinucleótido que codifica un polinucleótido asociado a una neuropatología es preferentemente un gen, cuya expresión elevada se ha
55 encontrado asociada con una enfermedad neuropsiquiátrica (por ejemplo, esquizofrenia o trastorno bipolar).

En otro aspecto, la divulgación proporciona el uso de un vector de ese tipo en la producción de un ratón transgénico que tiene una expresión de dicho polipéptido asociado a la neuropatía mayor de el tipo silvestre en al menos una
60 región del cerebro. El ratón transgénico así producido y su progenie se puede utilizar en la exploración de agentes de ensayo para los tratamientos potenciales de la neuropatología.

Descripción de las figuras

65 La **Figura 1** muestra un ejemplo de una corteza cerebral prefrontal separada en un gel de poliacrilamida bidimensional de tamaño de poro conocido (12 %) y teñida con nitrato de plata para visualizar las proteínas. Se ha ampliado el área que contiene las manchas que corresponden a la proteína STXBP1.

- La **Figura 2** muestra representaciones de cajas y bigotes de las intensidades de las manchas. Los valores máximo y mínimo se proporcionan para cada variable, junto con los cuartiles superior e inferior (percentiles 75 y 25, respectivamente) y el promedio (percentil 50). La caja está definida por los cuartiles inferior y superior, y está cruzada de un lado al otro por la media. Las líneas que se extienden desde la caja hasta los valores máximo y mínimo, y los valores más allá del máximo y mínimo indicados por un círculo son valores atípicos. **A)** Los valores de intensidad de la mancha no normalizados, y **B)** los valores normalizados aplicando un logaritmo en base 2, que proporcionan una distribución más homogénea.
- La **Figura 3** muestra una representación gráfica de la intensidad óptica normalizada obtenida en geles bidimensionales de los niveles de STXBP1 post mortem de la corteza prefrontal (área de Brodmann 9) del cerebro de sujetos control humanos (n=8), sujetos no tratados diagnosticados de esquizofrenia que fallecieron debido a suicidio (n=7), o los tratados con fármacos antipsicóticos (n=6). Los datos se proporcionan como porcentaje de los valores medios \pm SEM (desviación estándar). Puede observarse que el grupo total de sujetos esquizofrénicos tiene una intensidad promedio mayor que los controles (35 %, n=14, $p < 0,004$). Cuando el grupo total de sujetos esquizofrénicos se separa en sujetos tratados y no tratados, se observa un aumento significativo para los sujetos no tratados con respecto a los controles (62 %, n=8, $p < 0,0001$), mientras que el grupo tratado permanece al mismo nivel que los controles.
- La **Figura 4** muestra la cuantificación de STXBP1 en la fracción citosólica. **A)** Inmunorreactividad de la proteína STXBP1 determinada en la fracción citosólica de la corteza prefrontal (área de Brodmann 9) de sujetos esquizofrénicos que fallecieron debido a suicidio (n=14) y separados entre sujetos no tratados (*exentos de fármaco*; DF, n=8) y los tratados con fármacos antipsicóticos (tratados; T, n=6). Los datos se expresan como porcentaje del valor medio \pm SEM (error estándar) con respecto a los controles fijados a 100 ± 1 %. El grupo total (*All*) de los sujetos esquizofrénicos (135 ± 10 %, n=14, $+ *p < 0,004$, *prueba de la t de una muestra*) y el grupo de sujetos esquizofrénicos no tratados proporcionaron valores más altos que los controles (162 ± 7 %, n=8, $+ *p < 0,0001$, *prueba de la t de una muestra*). Sin embargo, el grupo de sujetos tratados no cambia con respecto al grupo de control (100 ± 9 %, n=6, no significativo). Existe una diferencia significativa en los niveles de STXBP1 entre los sujetos tratados y no tratados, tal como se determina mediante el análisis de la varianza unidimensional (*ANOVA monolateral*) y aplicando después una prueba de comparación múltiple de Bonferroni ($*p < 0,01$). **B)** Autorradiogramas representativos ("*inmunotransferencias*") de la proteína STXBP1 en cerebro humano post-mortem (corteza prefrontal, área de Brodmann 9) de sujetos esquizofrénicos que fallecieron debido a suicidio (*exentos de fármaco*; DF), los tratados con fármacos antipsicóticos (*tratados*; T) y sus controles respectivos (C). Cada una de las muestras de cerebro que contenían 2 μ g de proteína se cargaron en geles de acrilamida al 10 %.
- [C1 = ♂, 27 años, 10 horas PMD; DF1 = ♀, 25 años, 19 horas PMD; T1 = ♂, 30 años, 19 horas PMD; C2 = ♂, 28 años, 15 horas PMD; DF2 = ♀, 30 años, 13 horas PMD; T2 = ♂, 32 años, 8 horas PMD, donde PMD es el tiempo entre el fallecimiento y la autopsia].
- La **Figura 5** muestra la cuantificación de STXBP1 en la fracción de la membrana. **A)** Inmunorreactividad de la proteína STXBP1 determinada en la fracción no citosólica de la corteza prefrontal (área de Brodmann 9) de sujetos esquizofrénicos que fallecieron debido a suicidio (n=14), y separados entre sujetos no tratados (*exentos de fármaco*; DF, n=8) y los tratados con fármacos antipsicóticos (tratados; T, n=6). Los datos se expresan como porcentaje del valor medio \pm SEM (error estándar) con respecto a los controles fijados a 100 ± 1 %. El grupo total (*All*) de los sujetos esquizofrénicos (92 ± 9 %, n=13, no significativo) y el grupo de sujetos esquizofrénicos no tratados (86 ± 8 %, n=8, no significativo) es significativamente inferior que los controles. Sin embargo, el grupo de sujetos tratados no cambia con respecto al grupo de control (101 ± 22 %, n=5, no significativo). **B)** Autorradiograma representativo ("*inmunotransferencias*") de la proteína STXBP1 en cerebro humano post-mortem (corteza prefrontal, área de Brodmann 9) de sujetos esquizofrénicos que fallecieron debido a suicidio (*exentos de fármaco*; DF), los tratados con fármacos antipsicóticos (tratados; T) y sus controles respectivos (C). Cada una de las muestras que contenían 2 μ g de proteína se cargaron en geles de acrilamida al 10 %.
- [C1 = ♂, 48 años, 16 horas PMD; DF1 = ♂, 46 años, 19 horas PMD; T1 = ♂, 43 años, 65 horas PMD, donde PMD es el tiempo entre el fallecimiento y la autopsia].
- La **Figura 6** muestra microfotografías en gel de agarosa después de la amplificación mediante PCR (WT: ratón tipo silvestre; Tg: ratón transgénico).
- La **Figura 7** muestra experimentos de inmunofluorescencia en la región del cuerpo estriado del cerebro, en ratones control y transgénicos (L3, L7 y L8) para STXBP1, EAAT3, Hoetstch y combinados.
- La **Figura 8** muestra la cuantificación de STXBP1. La inmunorreactividad de la proteína STXBP1 determinada en (**A, C y E**) la fracción citosólica y (**B, D y F**) la fracción no citosólica de la corteza cerebral, cuerpo estriado (que también incluye las regiones del tálamo e hipotálamo) y cerebelo (respectivamente) de los ratones de tipo silvestre de control y los ratones transgénicos (L3, L7 y L8). Los datos se expresan como porcentaje del valor medio \pm SEM (error estándar) y se expresan como porcentaje del grupo control. $*p < 0,05$, cuando se

compararon con el correspondiente grupo control (la prueba de la t bilateral para una muestra).

Figura 9 muestra resultados de pruebas conductuales. **A)** Evaluación de la actividad locomotora espontánea en ratones control y transgénicos a campo abierto. La actividad motora se midió en una sesión de 5 min, (n = 6-7). Las columnas representan la media y las líneas verticales \pm SEM etapas en ratones; * valores medios que se diferencian significativamente de los encontrados en los ratones transgénicos ($p < 0,05$, ANOVA monolateral) en cada línea de ratones control. **B)** Evaluación de la coordinación motora en ratones control y transgénicos en la prueba de la varilla giratoria (*rotarod*) (n = 6-7). Las columnas representan la media y las líneas verticales \pm SEM de tiempo transcurrido (segundos) en la varilla giratoria. Evaluación de conductas análogas a la ansiedad en ratones transgénicos y de tipo silvestre en el laberinto en cruz elevado: **C)** Porcentaje de tiempo que los ratones permanecen en los brazos abiertos; **D)** Número de entradas en los brazos abiertos. La conducta se evaluó durante un periodo de 5 min. Las columnas representan la media y las líneas verticales \pm SEM del porcentaje de tiempo pasado en los brazos abiertos para 5-7 ratones; Valores medios que se diferencian significativamente de los encontrados en los ratones transgénicos (columnas de color negro) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,006$ ANOVA monolateral) de los ratones control (columnas de color blanco). **E)** Valoración de la interacción social en ratones transgénicos y de tipo silvestre. La conducta de cada prueba se evaluó durante un periodo de 5 min. Las columnas representan la media y las líneas verticales \pm SEM de tiempo (segundos) en 6-7 ratones; * valores medios que se diferencian significativamente de los encontrados en los ratones transgénicos (columnas de color negro) ($p < 0,05$, ANOVA monolateral) de los ratones de tipo silvestre (columnas de color blanco). **F)** Valoración del comportamiento de la memoria de trabajo en ratones transgénicos y de tipo silvestre. La conducta de cada prueba se evaluó durante un periodo de 5 min. Las columnas representan la media y las líneas verticales \pm SEM del índice de reconocimiento en 5-7 ratones; * valores medios que se diferencian significativamente de los encontrados en los ratones transgénicos (columnas de color negro) ($p < 0,05$, ANOVA monolateral) de los ratones de tipo silvestre (columnas de color blanco).

La **Figura 10** muestra la secuencia del ADNc de STXBP1 de ratón (*Mus musculus*) disponible bajo el nº de acceso a NCBI BC031728 [gi: 21594763] (SEC ID Nº: 1).

La **Figura 11** muestra la secuencia de la proteína STXBP1 traducida prevista de ratón (*Mus musculus*) disponible bajo el nº de acceso a NCBI BC031728 [gi: 21594763] (SEC ID Nº: 2).

La **Figura 12** muestra la proteína de unión a sintaxina 1 (STXBP1) humana, secuencia del ADNc variante transcrito 1 disponible bajo el nº de acceso a NCBI NM_003165 [gi: 4507296] (SEC ID Nº: 3).

La **Figura 13** muestra la secuencia de aminoácidos de STXBP1 disponible bajo el nº de acceso a NCBI P61764 (SEC ID Nº: 4).

La **Figura 14** muestra la familia del transportador de soluto 1 de ratón (*Mus musculus*) (transportador de glutamato neuronal-epitelial de alta afinidad, sistema Xag), miembro 1 ("EAAT3"), secuencia del ADNc disponible bajo el nº de acceso a NCBI BC031728 [gi: 21594763] (SEC ID Nº: 5).

La **Figura 15** muestra la secuencia del promotor de la familia del transportador de soluto 1 de ratón (*Mus musculus*) (transportador de glutamato neuronal-epitelial de alta afinidad, sistema Xag), miembro 1 ("EAAT3") desde el nucleótido 94024 al 96872 de la secuencia GeneBank NCBI AC155724.8 [gi:66793527] (SEC ID Nº: 6).

Descripción detallada de la invención

Los términos "sujeto" o "individuo" se refieren a miembros de la especie animal de los mamíferos, e incluyen, pero sin limitación, animales domésticos, primates y seres humanos; el sujeto es, preferentemente, un varón o hembra humano que sea de cualquier edad o raza.

El término "enfermedad neuropsiquiátrica" incluye una amplia gama de dolencias psiquiátricas y neurológicas indeseables, tal como esquizofrenia, trastorno bipolar, depresión mayor, trastorno esquizoafectivo, dolencias psiquiátricas (definidas en el manual DMS IV) y enfermedades neurológicas causadas por alteraciones en el sistema nervioso central.

El término "gen" se refiere a una región de una cadena molecular de desoxirribonucleótidos que codifican una proteína y que podría representar la secuencia codificante completa, o una parte de la misma.

El término "ADN" se refiere a ácido desoxirribonucleico. Una secuencia de ADN es una secuencia de desoxirribonucleótidos.

El término "ARN" se refiere a ácido ribonucleico. Una secuencia de ARN es una secuencia de ribonucleótidos.

El término "ARNm" se refiere a ácido ribonucleico mensajero, que es la fracción del ARN total que se traduce a proteínas.

El término "ADNc" se refiere a una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una secuencia de ARNm.

La expresión "ARNm transcrito a partir de" se refiere a la transcripción del gen (ADN) a un ARNm, como primer paso para que el gen se exprese y se traduzca a una proteína.

5 El término "secuencia de nucleótidos" se refiere por igual a una secuencia de ribonucleótidos (ARN) o a una secuencia de desoxirribonucleótidos (ADN).

10 El término "proteína" se refiere a una cadena molecular de aminoácidos unidos por enlaces covalentes o no covalentes. Este término incluye todos los tipos de modificaciones posteriores a la traducción, tales como glucosilación, fosforilación o acetilación.

15 Los términos "péptido" y "polipéptido" se refieren a cadenas moleculares de aminoácidos que representan una parte de un fragmento de proteína. Los términos "proteína" y "péptido" se utilizan indistintamente.

20 El término "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que presenta una unión específica a una molécula diana, que se denomina "antígeno". El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales, bien intacto, o fragmentos del mismo; incluye anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos no humanos. Los "anticuerpos específicos" son poblaciones homogéneas de anticuerpos muy específicos que se dirigen a un único sitio antigénico, o "determinante". "Antisuero policlonal" incluye poblaciones heterogéneas de anticuerpos que se dirigen a diferentes determinantes antigénicos.

25 El término "epítipo", tal como se usa en la presente invención, se refiere a un determinante antigénico de una proteína, que es la secuencia de aminoácidos de la proteína que reconoce un anticuerpo específico.

30 El término "fase sólida", tal como se usa en la presente invención, se refiere a una matriz no acuosa a la que se puede unir un anticuerpo. Los ejemplos de materiales en fase sólida incluyen vidrio, polisacáridos tales como agarosa, poli(acrilamida), poliestireno, poli(alcohol vinílico) y siliconas. Los ejemplos de formas en fase sólida son los pocillos de una placa de ensayo o una columna de purificación.

35 Los términos "oligonucleótidos" y "cebador de oligonucleótido" se utilizan indistintamente y, tal como se utilizan en la presente invención, se refieren a secuencias de nucleótidos que son complementarias de una secuencia de nucleótidos del gen *stxbp1*. Cada cebador se hibrida con la secuencia de su nucleótido diana, y actúa como punto de partida de la polimerización de nucleótidos catalizada por la ADN polimerasa, ARN polimerasa o transcriptasa inversas.

40 El término "sonda", tal como se usa en la presente invención, se refiere a una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una secuencia de nucleótidos derivada del gen *stxbp1* y que se puede utilizar para detectar esta secuencia de nucleótidos derivada del gen *stxbp1*.

El término "diana terapéutica" se refiere a secuencias de nucleótidos o péptidos contra las que se puede diseñar y aplicar clínicamente un compuesto farmacológico terapéutico.

45 El término "antagonista" se refiere a cualquier molécula que inhibe la actividad biológica de la molécula antagonizada. Los ejemplos de antagonistas incluyen, entre otros, proteínas, péptidos, variaciones de secuencia de péptidos de tipo silvestre y moléculas orgánicas pequeñas (pesos moleculares inferiores a 500 Dalton).

50 La expresión "promotor exógeno" tal como se usa en el presente documento significa un promotor diferente al promotor del gen *STXBP1*.

La expresión "mostrar síntomas esquizofrénicos" significa, pero no se limita a, especialmente mostrar una reducción en el laberinto en cruz elevado descrito a continuación.

55 La expresión "modelo animal de la esquizofrenia" significa un animal que se puede usar en la detección del efecto de una sustancia de ensayo sobre el tratamiento de la esquizofrenia o exploración de un agente para el tratamiento de la esquizofrenia.

60 La expresión "síntomas negativos" significa, pero en forma alguna se limita a, especialmente mostrar un trastorno de la conducta social en el ensayo de conducta social.

La expresión "deterioro cognitivo" significa, pero en forma alguna se limita a, especialmente mostrar trastornos en la memoria y el aprendizaje en la tarea de reconocimiento de objetos novedosos descrita a continuación.

STXBP1

Tal como se usa en el presente documento, el polipéptido de STXBP1 puede ser un polipéptido de STXBP1 tipo silvestre procedente de una especie de mamífero, especialmente un ratón, ser humano o rata. STXBP1 también se conoce por los nombres: ANC18HA, Munc18-1, n-sec1, N-Sec1, NSEC1A, p67, rbSec1, rbSec1A, rbSec1B, Sec1, Proteína de unión a syntaxina 1, Unc-18-1, Unc18a, Unc-18A y Unc-18 homólogo. También abarcado por la expresión de polipéptido de STXBP1 tal como se usa en el presente documento se encuentran las variantes (tal como una variante de corte y empalme), derivados (tales como un polipéptido procesado después de la traducción) y fragmentos del mismo. El polipéptido de STXBP1 o fragmento del mismo muestra preferentemente actividad biológica, especialmente la capacidad de unirse a un polipéptido de syntaxina tal como syntaxina 1a (por ejemplo, un polipéptido de syntaxina de la misma especie). Preferentemente, el polipéptido de STXBP1 tiene la capacidad de unirse a un polipéptido de syntaxina y evitar o limitar la capacidad de la syntaxina para interactuar con los elementos componentes del complejo SNARE. El polipéptido de STXBP1 puede comprender:

- 15 (i) un polipéptido de STXBP1 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, 90 %, 95 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEC ID N°: 2;
- (ii) un polipéptido de STXBP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2;
- (iii) un polipéptido de STXBP1 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, 90 %, 95 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEC ID N°: 4;
- 20 (iv) un polipéptido de STXBP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4; o
- (v) un fragmento activo de uno o más (i)-(iv) que tiene al menos 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 o 550 aminoácidos, en el que dicho polipéptido de STXBP1 o cualquier of (i)-(iv) o dicho fragmento activo de (v) puede unirse a un polipéptido de syntaxina.

25 Tal como se usa en el presente documento, un polinucleótido que codifica STXBP1, o expresión similar, se refiere a cualquier ácido nucleico (ADN o ARN) que codifica un polinucleótido de STXBP1 tal como se usa en el presente documento. Los polinucleótidos que codifican STXBP1 preferidos incluyen los que tienen al menos un 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de la secuencia a la secuencia de polinucleótidos de la SEC ID N°: 1 o 3. Los polinucleótidos que codifican STXBP1 especialmente preferidos comprenden, o consisten de, un polinucleótido que

30 tiene la secuencia de polinucleótidos de la SEC ID N°: 1 o 3.

Promotor EAAT3

La secuencia de nucleótidos del gen EAAT3 de ratón tipo silvestre se muestra en la Figura 14 (SEC ID N°: 5). La secuencia de nucleótidos del promotor del gen EAAT3 de ratón tipo silvestre se muestra en la Figura 15 (SEC ID N°: 6). La secuencia se extiende en los nucleótidos 94024 a 96872 inclusive, de la secuencia con número de acceso a GeneBank NCBI AC155724.8. Esta secuencia cubre la región promotora y la región 5'-no traducida inmediatamente corriente arriba del primer codón AUG de inicio del gen EAAT3.

40 Tal como se usa en el presente documento, el promotor EAAT3 puede ser una variante u homólogo de una especie no de ratón, en la que dicha variante u homólogo comprende o consiste de un polinucleótido que tiene al menos un 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de la secuencia con la secuencia de polinucleótidos de la SEC ID N°: 6, o un fragmento de la misma que tiene actividad promotora. Preferentemente, el promotor EAAT3 comprende o consiste una secuencia de polinucleótidos que tiene una secuencia de polinucleótidos de la SEC ID N°: 6.

Ratones transgénicos

Se puede usar varias técnicas adecuadas para alterar el genoma del ratón para potenciar la expresión de STXBP1 en al menos una región cerebral. Preferentemente, se introduce en el embrión de ratón un vector de la invención. El polinucleótido incorporado que codifica un polipéptido de STXBP1 y bajo el control de un promotor EAAT3 es preferentemente transmisible entre generaciones. Esto facilita el establecimiento de una colonia de ratones transgénicos. Preferentemente, la incorporación genómica del polinucleótido se verifica mediante extracción y caracterización del ADN del ratón transgénico y su progenie.

Métodos de exploración y agentes de ensayo

Cuando un agente reduce los niveles de expresión del gen *stxbp1* o invierte los efectos debidos a un aumento en la expresión de dicho gen, este agente se convierte en candidato para el tratamiento de trastornos neuropsiquiátricos.

60 De esta manera, la divulgación se refiere al uso de secuencias de nucleótidos o de péptidos procedentes del gen *stxbp1* en métodos para buscar, identificar, desarrollar y evaluar la eficacia de los compuestos para tratar enfermedades neuropsiquiátricas, especialmente esquizofrenia. La importancia de los métodos de exploración en la búsqueda de fármacos basada en la unión, competitiva o de otro tipo, de una molécula de fármaco potencial a la diana terapéutica debe ponerse a prueba.

65

Otro objeto de la divulgación consiste en proporcionar agentes caracterizados por su inhibición de la expresión y/o la actividad de la proteína STXBP1. Dichos agentes que se pueden identificar y evaluar de acuerdo con la presente invención se pueden seleccionar entre el grupo formado por:

- 5 a) un anticuerpo específico, o combinación de anticuerpos, contra uno o más epítomos presentes en la proteína STXBP1, preferentemente un anticuerpo monoclonal humano o humanizado, que también puede incluir un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo monocatenario o un anticuerpo contra idiotipo;
- 10 b) agentes citotóxicos, tales como toxinas, moléculas que incluyen átomos radioactivos, o agentes quimioterapéuticos, incluyendo, pero sin limitación, moléculas pequeñas orgánicas e inorgánicas, péptidos, fosfopéptidos, moléculas de sentido contrario, ribozimas, ARNip, moléculas de triple hélice, etc., que inhiben la expresión y/o la actividad de la proteína STXBP1; y
- 15 c) antagonistas de la proteína STXBP1 que inhiben una o más funciones de dicha proteína.

Se ha resuelto la estructura cristalina de la squid neuronal Sec-1, un homólogo de STXBP1. De acuerdo con ello, un agente preferido es un compuesto que se une a STXBP1 y evita su interacción con uno o más t-SNARE de la familia de la syntaxina. Un compuesto de ensayo puede ser un compuesto que previsiblemente se une a STXBP1 en la región de la bolsa de unión a la molécula efectora formada por restos de los dominios 1 y 2 de STXBP1/Sec-1 [22].
 20 Como alternativa o adicionalmente, un compuesto de ensayo puede ser un compuesto que previsiblemente se une a STXBP1 en el sitio de la interacción con syntaxina 1a que está implicado en la unión entre la syntaxina 1a a través del contacto formado por restos de los dominios 1 y 3 de STXBP1/Sec-1 [22].

La divulgación proporciona también una composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes identificados en un método de exploración de la invención (*método in vitro* o *in vivo*)
 25 junto con uno o más excipientes y/o sustancias transportadoras. Además, dicha composición puede comprender otro principio activo que inhiba la función de la proteína STXBP1.

Los excipientes, sustancias de transporte y sustancias auxiliares deberán ser farmacéutica y farmacológicamente aceptables, de forma que se puedan combinar con el resto de componentes de la formulación o la preparación y no produzcan efectos adversos sobre el organismo tratado. Las composiciones o formulaciones farmacéuticas incluyen las que sean apropiadas para administración oral o parenteral (incluyendo la administración subcutánea, intradérmica, intramuscular e intravenosa), aunque la mejor vía de administración depende del estado del paciente. Las formulaciones puede tener la forma de dosis simples, y las formulaciones se preparan de acuerdo con métodos conocidos en el campo de la farmacología. Las cantidades de principios activos a administrar pueden variar dependiendo de las necesidades terapéuticas.

Métodos de diagnóstico

40 Los métodos para evaluar la presencia o a susceptibilidad a una enfermedad neuropsiquiátrica se basan en la observación de si los sujetos o individuos diagnosticados con enfermedades neuropsiquiátricas, especialmente esquizofrenia, presentan niveles mucho más elevados de la proteína codificada por el gen *stxbp1* (proteína STXBP1) que los correspondientes niveles en sujetos sin antecedentes clínicos de estas enfermedades.

45 El método presentado implica una etapa de muestreo de los sujetos y puede trabajar con diferentes fluidos biológicos tales como, por ejemplo: sangre, plasma, suero o líquido cefalorraquídeo. Preferentemente, la muestra comprende tejido del SNC.

Las muestras se pueden tomar de sujetos que anteriormente fueron diagnosticados con una enfermedad neuropsiquiátrica dada o de individuos no diagnosticados, así como de un sujeto que recibe tratamiento o que se ha tratado anteriormente de una enfermedad neuropsiquiátrica, particularmente esquizofrenia.

El presente método puede implicar también una etapa de extracción, tanto para obtener el extracto de proteína de la muestra o para obtener el extracto del ARN total.

55 Se puede usar cualquier ensayo convencional *in vitro* para medir los niveles del ARNm transcrito a partir del gen *stxbp1* o su ADNc complementario, o la concentración de proteína de la proteína STXBP1, en muestras recogidas de los individuos analizar y de los individuos de control.

60 De esta manera, en algunos casos, se proporciona un método *in vitro* para detectar la presencia de enfermedades neuropsiquiátricas en un individuo, especialmente esquizofrenia, para determinar el estado o la gravedad de dicha enfermedad en el individuo, o para realizar un seguimiento del efecto de un tratamiento administrado a un individuo que presenta dicha enfermedad, basándose bien en la medición de la concentración de la proteína STXBP1 o la expresión del gen *stxbp1*.

65

Si se va a determinar la concentración de la proteína STXBP1, el método puede comprender una etapa inicial en la que el extracto de proteína de la muestra se mezcla con uno o más anticuerpos específicos dirigidos contra uno o más epítomos de la proteína STXBP1, y una segunda etapa en la que se cuantifican los complejos formados entre estos anticuerpos y la proteína STXBP1.

5 Se puede utilizar una amplia variedad de ensayos para detectar la formación de complejos específicos de antígeno-anticuerpo y se han descrito anteriormente varios ensayos de unión competitivos y no competitivos a proteínas, un buen número de los cuales están comercialmente disponibles.

10 De esta manera, la proteína STXBP1 se puede cuantificar con anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales específicos, y anticuerpos policlonales específicos, bien intactos, o fragmentos recombinantes de los mismos, combicuerpos, y fragmentos Fab o scFv dirigidos contra la proteína STXBP1. Estos anticuerpos pueden ser humanos, humanizados o de origen no humano. Los anticuerpos usados en estos ensayos pueden estar marcados o no, y los anticuerpos no marcados se pueden usar en ensayos de agregación mientras que los anticuerpos marcados se pueden utilizar en una amplia gama de pruebas. Las moléculas de marcado que se pueden usar para marcar los anticuerpos incluyen radionucleidos, enzimas, fluoróforos, reactivos químio luminiscentes, cofactores o sustratos enzimáticos, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes y derivados.

20 Una amplia gama de ensayos bien conocidos que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primaria) y marcados (anticuerpo secundario) se puede usar en el método de la invención desarrollado aquí. Estas técnicas incluyen Western blot o transferencia Western, ELISA (*enzimoinmunoanálisis de adsorción*), RIA (*Radioinmunoensayo*), EIA competitivo (*enzimoinmunoanálisis competitivo*), DAS-ELISA (*ELISA con doble anticuerpo en sándwich*), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el uso de biochips o micromatrices de proteínas que incluyen anticuerpos o ensayos específicos basados en la precipitación coloidal en formatos tales como tiras reactivas. Otros métodos para detectar y cuantificar la proteína STXBP1 incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión del ligando o ensayos de unión de lectina.

30 Si se va a detectar el ARNm o el ADNc correspondientes al gen *stxbp1* además, o como alternativa, a la detección de la proteína, el método puede comprender la extracción del ARN (tal como el ARN total). El ARNm o ADNc correspondientes al gen *stxbp1* se detecta ampliando el ARN total extraído o el correspondiente ADNc sintetizado mediante transcripción inversa a partir del molde de ARNm en una primera etapa, seguido por una segunda etapa que implica la cuantificación del producto amplificado a partir del ARNm o el ADNc del gen *stxbp1*. Un ejemplo de la amplificación del ARNm consiste en una transcripción inversa del ARNm a ADNc (RT), y después realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los oligonucleótidos cebadores. La PCR es una técnica utilizada para amplificar una secuencia de nucleótidos concreta (diana) incluida en una mezcla de secuencias de nucleótidos. La PCR utiliza un exceso de un par de oligonucleótidos cebadores que se hibridan con las hebras complementarias de la secuencia de nucleótidos diana. A continuación, una enzima con actividad polimerasa (Taq ADN polimerasa) extiende cada cebador usando la secuencia de nucleótidos diana como molde. Los productos de extensión se convierten después en secuencias diana tras disociación de la hebra diana original. Nuevas moléculas cebadoras se hibridan después con estas, y la polimerasa las extiende. Este ciclo se repite para aumentar el número de secuencias diana exponencialmente, y se trata de una técnica descrita en las patentes US 4683195 y US 4683202. Se han descrito muchos métodos para detectar y cuantificar los productos de la amplificación mediante PCR, cualquiera de los cuáles se puede utilizar en la presente invención. En un método preferido, el producto amplificado se detecta mediante electroforesis en gel de agarosa de la siguiente forma: cinco microlitros del producto de amplificación se separa mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2 % en un tampón TBE 0,5x a 100 vdc durante una hora. Después de la electroforesis, el gel se tiñe con bromuro de etidio, y el producto de amplificación se visualiza iluminando el gen con luz ultravioleta (uv). Como alternativa a la tinción y también como técnica preferida, el producto de amplificación se puede transferir a una membrana de nilón mediante la técnica de *transferencia Southern* y detectada con una sonda específica adecuadamente marcada para el ADNc del gen *stxbp1*.

50 En otro ejemplo, el ARNm se detecta por transferencia del ARNm a una membrana de nilón mediante técnicas de transferencia tales como la transferencia Northern y la detección con sondas específicas del ARNm o el correspondiente ADNc del gen *stxbp1*. En otro ensayo específico, el ARNm correspondiente al gen *mucln18-1* se puede amplificar y cuantificar a la vez mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real (Q-PCR).

60 El método puede implicar la comparación de la cantidad de la proteína STXBP1, la cantidad de ARNm del gen *stxbp1* o la cantidad del correspondiente ADNc detectado en la muestra tomada del sujeto con la cantidad de proteína STXBP1, la cantidad de ARNm del gen *stxbp1* o la cantidad del correspondiente ADNc detectado en muestras de uno o más sujetos control o uno o más valores de referencia predeterminados. Un aumento de aproximadamente un 10 %, preferentemente un 20 %, 30 %, 50 % o mayor puede indicar la presencia o la susceptibilidad a una enfermedad neuropsiquiátrica en el sujeto.

65 Lo siguiente se muestra a modo de ejemplo y no debe tomarse como una limitación del alcance de las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Análisis de tejido cerebral usando electroforesis bidimensional

- 5 Se analizaron veinticuatro muestras de tejido de la corteza cerebral prefrontal humana (área de Brodmann 9) de individuos diagnosticados con esquizofrenia que fallecieron por suicidio o causas naturales o accidentales (n=14) y de sujetos control sin antecedentes psiquiátricos conocidos que fallecieron por causas naturales o accidentales (n=10). Estas muestras se obtuvieron del Basque Institute of Legal Medicine (Instituto Vasco de Medicina Legal) según la normativa y las consideraciones éticas. Las muestras se procesaron y almacenaron a -80 °C
- 10 inmediatamente después de la autopsia (Tabla 1).

Tabla 1: Muestras incluidas en el estudio.

Muestras	Diagnóstico	Causa del fallecimiento	Sexo (Varón/Mujer)	Edad (años)	Intervalo post-mortem Interval (horas)	Toxicología en plasma
PK 1	Esquizofrenia	Suicidio	Varón	27	17	Clozapina
PK 2	Esquizofrenia	Suicidio	Varón	41	16	(-)
PK 3	Esquizofrenia	Suicidio	Mujer	25	19	(-)
PK 4	Esquizofrenia	Suicidio	Varón	30	13	(-)
PK 5	Esquizofrenia	Accidental	Mujer	39	11	(-)
PK 6	Esquizofrenia	Natural	Varón	43	65	Clozapina
PK 7	Esquizofrenia	Natural	Varón	43	19	(-)
PK 15	Esquizofrenia	Suicidio	Varón	66	57	Olanzapina
PK 18	Esquizofrenia	Suicidio	Varón	57	19	Quetiapina Fenobarbital
PK 19	Esquizofrenia	Suicidio	Varón	48	19	(-)
PK 21	Esquizofrenia	Suicidio	Varón	30	19	Olanzapina
PK 22	Esquizofrenia	Suicidio	Varón	24	45	(-)
PK 24	Esquizofrenia	Suicidio	Varón	32	8	Quetiapina, Lorazepan Paracetamol
PK 25	Esquizofrenia	Suicidio	Varón	31	11	(-)
			12 Varones 2 mujeres	38±12 años	24±17 Horas	
PK 8	Control	Natural	Varón	30	10	(-)
PK 9	Control	Natural	Mujer	30	15	(-)
PK 11	Control	Natural	Varón	27	10	(-)
PK 12	Control	Accidental	Mujer	35	8	(-)
PK 13	Control	Accidental	Varón	38	59	(-)
PK 14	Control	Accidental	Varón	48	16	(-)
PK 17	Control	Accidental	Varón	70	41	Alcohol
PK 20	Control	Accidental	Varón	54	26	(-)
PK 23	Control	Accidental	Varón	28	15	Alcohol
PK 26	Control	Accidental	Varón	32	28	Alcohol, Anfetaminas
			8 Varones 2 mujeres	39±13 años	23±16 años	

- 15 En la Tabla 1, la información asociada con cada muestra está distribuida en columnas. La primera de estas corresponde al diagnóstico, y va seguida por la causa de la muerte, sexo, edad, intervalo post-mortem (PMI), y finalmente los datos toxicológicos ((-) corresponde a una toxicología negativa).

- 20 Se extrajeron las proteínas del tejido de la corteza cerebral prefrontal humana post mortem, y un volumen de 1 ml de tampón de lisis (urea 7 M; tiourea 2 M; CHAPS al 2 %, D-Streak al 0,2 %, 20 µl de inhibidores de la proteasa) se añadió a 0,1 g de tejido. La mezcla se sometió a ultrasonidos durante ciclos de 20 segundos durante dos minutos y después se centrifugó a una velocidad de 75000 rpm durante una hora a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante se recogió, y la concentración de proteína se determinó usando el ensayo de Bradford. El intervalo de concentración de las muestras estaba comprendido entre 2 y 12 µg/µl en un volumen aproximado de 1 ml.

- 25 A continuación, 250 µg de proteína de cada muestra se resuspendió en 450 µl de tampón de hidratación (urea 7 M; tiourea 2 M; CHAPS al 2 %, tampón IPG pH 3-10 al 2 %, D-streak al 2 % y azul de bromofenol al 0,002 %) y se solubilizó a temperatura ambiente durante una hora como mínimo.

Una vez que se solubilizaron todas las muestras, las proteínas se separaron en dos dimensiones mediante electroforesis bidimensional. Esta técnica implica dos fases, una primera fase en la que las proteínas se separan por su carga (IEF, o isoelectroenfoque) y una segunda fase en la que se separaron de acuerdo con su peso molecular (SDS-PAGE).

5 El IEF se realizó en minigeles que soportan un gradiente de pH inmovilizado (3-10). La primera etapa consistió en introducir las proteínas anteriormente solubilizadas en el gel aplicando una tensión de 30 V durante 15 horas (rehidratación activa) y después aumentar gradualmente la tensión a 8000 V. El IEF finalizó cuando la tensión total alcanzó 120.000. En ningún caso, la resistencia de cada gel puede exceder de 50 μ A (microamperios).

10 La separación de las proteínas en la segunda dimensión por su peso molecular se llevó a cabo en los geles de acrilamida al 12,5 % anteriormente polimerizados con dimensiones 26 x 20 cm (*Ettan OALT twelve Gel Caster Amersham*). Tras la separación de las proteínas, se visualizaron mediante tinción con plata (Amersham). El resultado es una cartografía de manchas, donde cada mancha representa una proteína (Figura 1). Los geles se escanearon y analizaron con un programa informático especializado (Progenesis PG 220 ver. 2006 de Nonlinear Dynamics). Para este análisis, las imágenes deben tener un formato de 300 dpi (puntos por pulgada) y 8 bits/canal. El programa informático delimita el contorno de cada mancha y calcula su intensidad en función del área y una escala de grises, transformando la imagen plana en un volumen. El resultado es una tabla que incluye el número de manchas con su intensidad como "valor bruto" obtenido de cada gel.

20 **Ejemplo 2 - Determinación de STXBP1 como marcador biológico de la esquizofrenia**

Se generó un mapa bidimensional de la corteza prefrontal humana usando las múltiples imágenes bidimensionales que incluyeron las manchas habituales y adicionales encontradas en todas las muestras de cerebro humano. Los datos obtenidos se normalizaron experimentalmente dividiendo la intensidad "bruta" de cada mancha por un determinado valor: el volumen total de la mancha y/o las manchas que aparecieron en todas las muestras. El objeto de esta normalización fue garantizar que las diferencias observadas no se debían a las diferentes cantidades de proteína cargada en los geles. Los datos normalizados se exportaron a una hoja de cálculo MS Excel® para análisis estadístico. Un número importante de pruebas estadísticas requirieron que los datos sigan una distribución normal. Las distribuciones de manchas/intensidad variable son claramente asimétricas y están alejadas de una distribución normal (Figura 2, Gráfico 1), aunque la aplicación de un logaritmo homogeniza y normaliza dichas distribuciones (Figura 2, Gráfico 2).

35 Se comenzó el análisis estadístico realizando una prueba de comparación paramétrica para los valores medios de los dos grupos establecidos (casos totales vs. controles o casos no tratados vs. controles) y se seleccionaron las manchas con $p \leq 0,05$. Se calculó el índice de cambio para las manchas consideradas significativas mediante un cociente entre las medias de los dos grupos establecidos.

40 Las manchas consideradas significativas se recortaron de los geles, se digirieron *in situ* con tripsina y los péptidos se eluyeron y se identificaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (*desorción/ionización con láser asistida por matriz/tiempo de vuelo*). La huella de la masa molecular obtenida de cada mancha se comparó con una base de datos *in silico*, que permitió la identificación de cada proteína correspondiente.

45 Se emparejaron e identificaron un total de 15 manchas de los 24 geles (casos y controles). Las proteínas se cuantificaron tal como se ha descrito anteriormente, y se encontró una mancha (número 2999) que correspondía a STXBP1 (Figura 1).

50 El análisis estadístico mostró que solamente las comparaciones entre casos no tratados o exentos de fármaco y los controles, y los casos no tratados o exentos de fármaco y los casos tratados, producen una diferencia estadísticamente significativa (Figura 3). El resto de comparaciones, en otras palabras, los casos totales comparados con los controles y los casos tratados comparados con los controles no muestran cambios significativos (Figura 3; solamente los controles emparejados para los casos tratados o no tratados se utilizaron en las comparaciones).

55 **Ejemplo 3 - Validación mediante transferencia Western de STXBP1 como marcador biológico de la esquizofrenia**

Los niveles de la proteína STXBP1 en 24 muestras de corteza cerebral prefrontal humana (área de Brodmann 9) de individuos diagnosticados de esquizofrenia que fallecieron por suicidio y que habían recibido (n=6) o no habían recibido (n=8) tratamiento antipsicótico y sujetos control sin antecedentes de enfermedad psiquiátrica que fallecieron accidentalmente (n=10) se validaron mediante transferencia Western con un anticuerpo que reconoce específicamente dicha proteína. Las muestras de individuos esquizofrénicos se emparejaron con las muestras de control sobre la base del sexo, edad y tiempo post mortem. A continuación, las proteínas se extrajeron usando el mismo procedimiento de extracción utilizado para preparar los geles bidimensionales. Se decidió medir los niveles de STXBP1 tanto en la fracción citosólica como en la fracción de membrana mediante validación por transferencia de Western. En resumen, 1 ml de tampón de lisis (urea 7 M; tiourea 2 M; CHAPS al 2 %, D-Streak al 0,2 %, 20 μ l de

inhibidores de la proteasa) se añadió a 0,1 g de tejido. La mezcla se sometió a ultrasonidos durante ciclos de 20 segundos durante dos minutos y después se centrifugó a una velocidad de 75000 rpm durante una hora a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante se recogió, y la concentración de proteína se determinó usando el ensayo de Bradford. El aglomerado se volvió a suspender en 100 µl de tampón de lisis y la cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford. Se añadió tampón de Laemmli 5x (Tris 0,5 M pH 6,8, SDS al 20 % y azul de bromofenol al 0,01 %) justo antes de cargar la muestra en el gel. Tras la preparación de la muestra, se añadió p-mercaptoetanol a una relación de 1/7. La concentración de proteína total se ajustó a 1,2 µg/µl para todas las muestras de la fracción citosólica, y 0,5 µg/µl para las de la fracción de membrana. Tras su preparación, la muestra se calentó a 100 °C durante cinco minutos y después se centrifugó durante 15 segundos a 4 °C. Dos microgramos de proteína total por muestra se cargaron en un gel de acrilamida al 10 % para las fracciones citosólica y de membrana. Se realizaron dos experimentos como mínimo para cada muestra, y se calculó la media aritmética de los valores individuales. Se observó un aumento significativo en los niveles de la proteína STXBP1 en la fracción citosólica de las muestras de la corteza prefrontal de los sujetos esquizofrénicos cuando se compararon con los niveles de la misma proteína en sujetos de control sin antecedentes de enfermedad psiquiátrica (135 ± 10 , $n=14$, $p < 0,004$). Además, se descubrió que la expresión de la proteína STXBP1 era mucho más alta en la corteza prefrontal de las personas esquizofrénicas que fallecieron por suicidio y que no habían recibido tratamiento farmacológico, en comparación con las muestras de la misma región del cerebro de individuos de control sin antecedentes de enfermedades psiquiátricas y que habían fallecido en un accidente (162 ± 7 , $n=8$, $p < 0,0001$). Resulta interesante el hecho de que se descubriera que los niveles de STXBP1 en sujetos esquizofrénicos que se habían tratado con fármacos antipsicóticos pero que también habían fallecido por suicidio eran inferiores a los que tenían los sujetos no tratados y eran similares a los niveles control (100 ± 9 , $n=6$, no significativo; Figura 4). Por otra parte, se descubrió que existía una reducción no significativa en la densidad de la inmunoseñal de STXBP1 en la fracción no citosólica de las muestras de la corteza prefrontal procedente de individuos esquizofrénicos cuando se compararon con los sujetos control sin antecedentes de enfermedades psiquiátricas (92 ± 9 , $n=13$, no significativo). Además, la expresión de STXBP1 fue inferior, aunque no tan significativamente, en la corteza prefrontal de las personas esquizofrénicas que no habían recibido tratamiento farmacológico cuando se compararon con las muestras de la misma región del cerebro de individuos de control (86 ± 8 , $n=8$, no significativo). Finalmente, no se observaron cambios en los niveles de STXBP1 en el grupo de los sujetos tratados con fármacos antipsicóticos con respecto al grupo control (101 ± 22 , $n=5$, no significativo; Figura 5).

Ejemplo 4 - Método para preparar ratones transgénicos

El polinucleótido a introducir contiene una secuencia promotora que puede controlar la expresión de la proteína relacionada con la esquizofrenia y, si se desea, puede contener además una secuencia potenciadora. La proteína relacionada con la esquizofrenia se puede expresar específicamente en el cerebro. El promotor para preparar el ratón modelo del presente ejemplo se seleccionó específicamente. Este promotor es el EAAT3 (Transportador de glutamato de tipo 3), también conocido como familia del transportador de soluto 1 (transportador de glutamato neuronal/epitelial de alta afinidad, sistema Xag), miembro 1 (S1c1a1). El gen EAAT3 es un gen neuronal expresado específicamente en neuronas glutamatérgicas. Por tanto, se puede expresar selectivamente un gen deseado (en este caso STXBP1) en el cerebro, particularmente en neuronas glutamatérgicas, mediante el uso de la región promotora de un gen EAAT3. Se descubrió que los ratones transgénicos mostraban síntomas esquizofrénicos como resultado de la expresión en exceso de STXBP1 e el cerebro.

Para preparar la región promotora, los cebadores utilizados fueron: 5':ttgtcgacttcgagccttcgctcggaaatctggag (SEC ID N°: 7); y 5':ttgtaccatagccaaccagagacagacacactc (SEC ID N°: 8).

2848 nucleótidos del promotor de EAAT3 (SEC ID N°: 6) (Transportador de glutamato de tipo 3), también conocido como familia del transportador de soluto 1 (transportador de glutamato neuronal/epitelial de alta afinidad, sistema Xag), miembro 1 (S1c1a1) (véase la Figura 15) se amplificaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El promotor de la expresión neuronal se clonó en *Kpn I-Sal I* en la posición derecha anterior del ADNc a expresar (NIH_MGC_94) en el vector pCMV-Sport6 comercial. La construcción se digirió con *Kpn I* y *Cla I* para producir el transgén, que se microinjetó en embriones de ratón. Estos fragmentos del transgén, además del EAAT3 y el ADNc contenían un sitio sv40 poliadenilado para estabilizar el ARNm. Se desarrollaron cuatro fundadores, y tres de ellos transmitieron el fragmento del transgén: línea 3 (L3), línea 7 (L7) y línea 8 (L8).

El éxito de la introducción del gen se puede determinar mediante la extracción del ADN de una parte del cuerpo (por ejemplo, la punta de la cola), y confirmar la presencia del polinucleótido introductor. Los ratones con un resultado positivo en el ensayo para el gen introducido se consideraron fundadores. El polinucleótido introducido se transmite al 50 % de la progenie, y se pueden preparar eficazmente tanto animales de tipo silvestre como mutados (Figura 6).

El ratón transgénico preparado como se ha descrito anteriormente y su progenie que muestran síntomas esquizofrénicos son útiles para detectar un efecto terapéutico sobre la esquizofrenia y para explorar agentes terapéuticos o agentes para la esquizofrenia.

Ejemplo 5 - Validación de los niveles de STXBP1 en el cerebro de ratones transgénicos: inmunofluorescencia y transferencia Western

Se realizó la inmunofluorescencia en secciones de 30 µm del cerebro coronal adulto con flotación libre de ratones. Se incubaron tres regiones cerebrales diferentes, corteza, cuerpo estriado e hipocampo [Paxinos, 2003] con anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra STXBP1 (Sigma) y anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra EAAT3 (Santa Cruz Biotechnology), seguido por tinción secundaria de las IgG de conejo y ratón con anticuerpos secundarios AlexaFluor 594 y AlexaFluor 488 de absorción cruzada (Invitrogen), respectivamente. Los núcleos celulares se tiñeron con el agente intercalador de ADN de Hoechst. Las preparaciones se examinaron con un microscopio confocal Olympus Fluoview.

Estos resultados mostraron un aumento en los niveles de STXBP1 para las tres líneas transgénicas (L3, L7 y L8) y principalmente en el cuerpo estriado, cuando se compararon con los animales control (Figura 7).

Los niveles de la proteína STXBP1 en las muestras de corteza cerebral, cuerpo estriado y cerebelo de ratón procedente de los ratones control (de tipo silvestre, n = 4), ratones transgénicos de L3 (n=4), ratones transgénicos de L7 (n=4) y ratones transgénicos de la línea 8 (n=4) se validaron mediante transferencia Western con un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína STXBP1. A continuación, las proteínas se extrajeron usando el mismo procedimiento de extracción utilizado para preparar los geles bidimensionales y en las muestras humanas. Se decidió medir los niveles de STXBP1 tanto en la fracción citosólica como en la fracción no citosólica mediante validación por transferencia de Western.

En resumen, 1 ml de tampón de lisis (urea 7 M; tiourea 2 M; CHAPS al 2 %, D-Streak al 0,2 %, 20 µl de inhibidores de la proteasa) se añadió a 150 mg de corteza cerebral. Análogamente, se añadieron 400 µl de tampón de lisis a 40 mg de la región del cuerpo estriado. Finalmente, se añadieron 300 µl de tampón de lisis a 30 mg de la región del cerebelo. La mezcla se sometió a ultrasonidos durante ciclos de 20 segundos durante dos minutos y después se centrifugó a una velocidad de 75000 rpm durante una hora a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante se recogió, y la concentración de proteína se determinó usando el ensayo de Bradford. El aglomerado se volvió a suspender en 30 (corteza cerebral), 20 (cuerpo estriado) o 10 (cerebelo) µl de tampón de lisis y la cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford. Se añadió tampón de Laemmli 5x (Tris 0,5 M pH 6,8, SDS al 20 % y azul de bromofenol al 0,01 %) justo antes de cargar la muestra en el gel. Tras la preparación de la muestra, se añadió p-mercaptoetanol a una relación de 1/7. La concentración de proteína total se ajustó a 1 µg/µl para todas las muestras de la fracción citosólica, y 1 µg/µl para las de la fracción no citosólica. Tras su preparación, la muestra se calentó a 100 °C durante cinco minutos y después se centrifugó durante 15 segundos a 4 °C. Cuatro microgramos de proteína total por muestra se cargaron en un gel de acrilamida al 10 % para las fracciones citosólica y no citosólica. Se realizaron dos experimentos como mínimo para cada muestra, y se calculó la media aritmética de los valores individuales.

Se observó un aumento significativo en los niveles de la proteína STXBP1 tanto en la fracción citosólica como en la fracción no citosólica de las muestras de cuerpo estriado de L7 cuando se compararon con los niveles de la misma proteína en animales control (123 ± 7 , n=4, p=0,06 y 134 ± 5 , n=4, p=0,03 respectivamente). Para las líneas L3 y L8 se produjo también un aumento en los niveles de STXBP1, pero no significativamente diferentes de los animales control (fracción citosólica L3 118 ± 7 , n=4, p=0,06 y fracción no citosólica 114 ± 3 , n=3, p=0,09; fracción citosólica L8 118 ± 6 , n=4, p=0,09 y fracción no citosólica 107 ± 13 , n=4, p = 0,6). Además, se descubrió que la expresión de la proteína STXBP1 era mucho más elevada en el cerebelo de las líneas de ratones transgénicos (L3, L7 y L8) comparado con muestras de la misma región del cerebro de los animales control (fracción citosólica L3 137 ± 7 , n=4, p=0,02 y fracción no citosólica 171 ± 3 , n=4, p=0,01; fracción citosólica L7 93 ± 5 , n=4, p=0,5 y fracción no citosólica 138 ± 20 , n=4, p=0,2; fracción citosólica L8 148 ± 11 , n=4, p=0,01 y fracción no citosólica 145 ± 17 , n=4, p=0,05). Resulta interesante el hecho de que se descubriera que los niveles de STXBP1 en líneas de ratones transgénicos (L3, L7 y L8) fueron similares a los niveles control (fracción citosólica L3 92 ± 4 , n=4, ns y fracción no citosólica 74 ± 11 , n=4, ns; fracción citosólica L7 90 ± 6 , n=4, ns y fracción no citosólica 76 ± 9 , n=3, ns; fracción citosólica L8 100 ± 7 , n=4, ns y fracción no citosólica 129 ± 13 , n=4, ns) (Figura 8). Estos resultados son similares a los resultados obtenidos mediante el uso del enfoque de la inmunofluorescencia.

Ejemplo 6 - Prueba conductual

Es posible detectar si un ratón transgénico muestra o no síntomas esquizofrénicos por métodos convencionales para medir trastornos relacionados con la esquizofrenia tal como los siguientes métodos descritos en los puntos 1) a 4):

1) Actividad motora en campo abierto

El campo abierto consiste en una jaula cuadrada de paredes opacas de color negro de 25 cm x 25 cm x 25 cm (PanLab, Barcelona, España). La base de la jaula consiste en sensores que pueden detectar los movimientos horizontales de los ratones. El ensayo se realizó en una habitación silenciosa con iluminación constante. Los ratones se colocaron individualmente en el centro del aparato para iniciar una sesión de ensayo de 10 min. Para determinar si la modificación en la expresión de STXBP1 altera la actividad motora espontánea, los inventores compraron

ratones transgénicos y de control en el campo abierto durante un periodo de 5 min. No se apreciaron diferencias entre la línea transgénica 3 y los animales de tipo silvestre. Sin embargo, se descubrieron cambios sutiles al comparar las líneas transgénica 7 y 8 con los controles. Los resultados revelaron que la distancia en el campo abierto disminuyó significativamente en la línea 7 y la línea 8 (ANOVA monolateral seguida de la prueba de Tukey: $F(21,24)=14,42$; $p < 0,05$) (Figura 9A).

2) Ensayo de coordinación motora en varilla giratoria (*rotarod*)

Se evaluó la coordinación motora mediante un equipo *Rotarod* automatizado (PanLab, Barcelona, España). Un ordenador registró la latencia hasta la caída en segundos. En primer lugar, los ratones se entrenaron en la varilla *rotarod* a una velocidad constante de 20 rpm hasta que todos los ratones pudieron pasar el menos 3 min en la varilla. Después, los ratones se sometieron a ensayo tres veces consecutivas.

No se observaron diferencias significativas entre las líneas transgénicas y los animales de tipo silvestre en el ensayo *Rotarod* (Figura 9B). Estos resultados indican que el deterioro mostrado en la prueba de campo abierto no se debe a una afectación en la coordinación de la motilidad de los ratones transgénicos.

3) Evaluación de conductas análogas a la ansiedad

3.1 - Laberinto en cruz elevado

El laberinto en cruz elevado es una prueba habitualmente utilizada para medir la conducta análoga a la ansiedad y el miedo innato en roedores [Crawley, 2000; Rogers y Cole, 1994]. El laberinto consiste en dos brazos abiertos (25 cm x 5 cm) y dos brazos cerrados (25 cm x 5 cm x 30 cm), dispuestos de forma que dos brazos de cada tipo estén opuestos entre sí y se extiendan desde una plataforma central (5 cm x 5 cm). El suelo y paredes laterales del laberinto consisten en un material de plexiglás opaco. El laberinto está elevado a una altura de 50 cm. En ensayo se realizó en una sala experimental con luz tenue. Los ratones se introdujeron individualmente en el centro, con la cabeza orientada hacia el brazo abierto. Un observador registró los parámetros conductuales durante 5 minutos. Se midió el porcentaje de cada uno de los siguientes parámetros: 1) tiempo en los brazos abiertos 2) entradas en los brazos abiertos. El laberinto se limpió entre sesiones usando etanol al 70 %.

En el laberinto en cruz elevado, el porcentaje de tiempo (%) pasado en los brazos abiertos disminuyó significativamente en las tres líneas de ratones transgénicos (ANOVA monolateral seguida de una prueba de la F de Tukey (19,22) = 5,476, $p < 0.006$) cuando se comparó con los animales control (Figura 8C). De manera similar, las tres líneas de ratones transgénicos mostraron una disminución significativa en el número de entradas en los brazos abiertos (ANOVA monolateral seguida de una prueba de la F de Tukey (19,22) = 4,469, $p < 0,02$) (Figura 9D).

3.2 - Interacción social

Cunando dos ratones de jaulas diferentes se juntan en una cámara pequeña en la que ninguno de ellos tiene un territorio establecido, establecen una interacción social que incluye varios modos conductuales: olfateo, seguido de aseo, dar patadas, arrastrarse por encima o por debajo del compañero, y tocar, o casi tocar, la cara.

En el día del experimento, parejas de ratones de diferentes jaulas hogar se juntaron en una jaula de plástico pequeña (20 cm x 40 cm x 10 cm) con una tapa de cartulina y cama de madera nueva en el suelo (sin cambio en el nivel de iluminación). Se midió durante 5 min el tiempo en que los ratones interactuaron socialmente.

En la prueba de interacción social, el tiempo durante el que ratones de jaulas diferentes (situación no familiar) establecen una interacción social fue significativamente inferior ($p < 0,001$) en ratones transgénicos (ANOVA monolateral seguida de una prueba de la F de Tukey (20,23)= 8,026 $p < 0,05$) cuando se comparó con los animales control (Figura 9E).

4) Tareas de reconocimiento de objetos nuevos (NORT)

La NORT se llevó a cabo en una palestra de plexiglás (35 cm x 45.5 cm x 36 cm) con objetos que los ratones no podían mover. Los ratones macho adultos se habituaron a la palestra en ausencia de objetos durante 30 min cada uno de 3 días consecutivos antes del día del experimento. El día del experimento, los ratones se habituaron a la palestra durante 1 min. y después se colocaron dos objetos diferentes en la jaula en dos esquinas adyacentes (7,5 cm de cada pared). Durante la fase de muestreo, cada ratón se colocó en el centro de la palestra, y se registró durante un periodo 5 con un cronómetro min el tiempo que pasaron explorando cada objeto. Al día siguiente, el ratón se devolvió a la palestra para la fase de elección, con un objeto de la fase de muestreo (objeto familiar) y un objeto novedoso. Individuos que no conocían las condiciones de tratamiento o el genotipo del ratón registraron el tiempo que el ratón pasó explorando cada objeto durante un periodo de 3 min usando cronómetros. La exploración se definió como dirigir la nariz hacia una distancia inferior a 1 cm e incluyó colocar una o más extremidades sobre el objeto. El tiempo total pasado investigando ambos objetos en la fase de muestra se registró y se comparó con los tres genotipos de ratón. En la fase de elección, se determinó la proporción del tiempo que el ratón pasó con el objeto

novedoso restando el tiempo pasado con el objeto familiar del tiempo pasado con el objeto novedoso, y dividiendo este tiempo por el tiempo total pasado explorando ambos objetos. El valor resultante fue un índice de discriminación, en el que un valor de 0 indicó que se pasó el mismo tiempo investigando ambos objetos, y un valor de 1 indicó que todo el tiempo pasó investigando el objeto novedoso.

5 En NORT, el índice de reconocimiento aumentó significativamente en las tres líneas de ratones transgénicos, 3, 7 y 8, (ANOVA monolateral seguida de una prueba de la F Tukey (20,23)= 5,927; p < 0,05 para línea 3 y 7 y p < 0,001 para la línea 8) cuando se compararon con sus controles (Figura 9F). Se cree que este aumento en el índice de reconocimiento se debe a un aumento en la respuesta al estrés del animal debido a la presencia de un objeto nuevo.

10 La línea de ratón transgénico de acuerdo con la invención se comparó con los ratones de tipo silvestre en una gama de ensayos conductuales. Los resultados se describen en la Tabla 2 siguiente.

Tabla 2: Resultados de la prueba conductual

Prueba	Resultados
Campo abierto	La prueba de campo abierto está diseñada para medir respuestas conductuales tales como actividad locomotora, hiperactividad y conducta exploratoria. La prueba de campo abierto también se utiliza como medida de la ansiedad. En los experimentos de los inventores, los ratones transgénicos pasaron menos tiempo en el centro del campo abierto en comparación con el grupo de ratones de tipo silvestre, esta conducta se asocia con respuestas de tipo ansiedad. Se considera que este fenotipo refleja una menor motivación por la parte de los animales transgénicos hacia la exploración, que podría estar relacionada con los síntomas negativos de la esquizofrenia (disminución de la motivación, y retraimiento social) y se ha observado en otros modelos con animales [Hattori et al., 2008].
Laberinto en cruz elevado	Los ratones transgénicos mostraron un aumento en el tiempo pasado en los brazos más cercanos del laberinto en cruz elevado (EPM) en comparados con el grupo de ratones de tipo silvestre. La conducta observada en el EPM siguió la misma tendencia que los resultados obtenidos en los experimentos de campo abierto. Se considera que esta conducta es una respuesta de tipo ansiedad con similitudes a los síntomas negativos observados en la esquizofrenia [Hattori et al., 2008].
Inhibición pre-pulso	Los ratones transgénicos mostraron una inhibición pre-pulso (PPI) reducida cuando se compararon con el grupo control. Se han indicado numerosos informes de una deficiencia en la respuesta PPI en pacientes con esquizofrenia, se ha sugerido que una respuesta PPI reducida cumple los criterios de un endofenotipo para los estudios genéticos de la esquizofrenia [Powell et al., 2009].
Condicionamiento de miedo	Los ratones transgénicos mostraron una reducción en el porcentaje de tiempo pasado en una respuesta congelada comparado con el grupo control. El resultado sugiere que los animales transgénicos mostraron un recuerdo alterado del miedo. Este rasgo se ha descrito en otros modelos animales de la esquizofrenia, y pertenece al grupo de síntomas cognitivos observados en la esquizofrenia [Bhardwaj et al., 2009].
Interacción social	En la prueba de interacción social, los ratones transgénicos mostraron una disminución significativa en el número de contactos sociales, comparado con los ratones de tipo silvestre. La reducción en la interacción social es un fenotipo conductual presente en la esquizofrenia que se correlaciona con el resto de síntomas negativos [Koike et al., 2009].
Reconocimiento de objetos nuevos	En esta prueba se descubrió que los ratones tenían una reducción en su memoria a corto plazo. El tiempo pasado en presencia de objetos nuevos presentados al grupo transgénico relacionado con el tiempo de exploración tal está reducido cuando se compara con el grupo de tipo silvestre. Las deficiencias en la memoria a corto plazo son consistentes con los síntomas cognitivos asociados con la esquizofrenia, y se han observado en otros modelos animales de la enfermedad [McLean et

15 **Ejemplo 7 - Método para explorar agentes como potenciales agentes terapéuticos contra la esquizofrenia**

20 Se puede someter a ensayo una agente terapéutico potencial para el tratamiento de la esquizofrenia mediante la administración de la sustancia de ensayo de a un animal transgénico de la invención. Tras la administración de la sustancia, se repitieron los ensayos conductuales (por ejemplo, los ensayos conductuales descritos en el Ejemplo 6 anterior), para evaluar si el compuesto modifica los resultados observados antes de la administración del compuesto. Preferentemente, la una o más pruebas conductuales se realizan adicionalmente en uno o más animales transgénicos de la invención no tratados que actúan como controles.

25 Un agente terapéutico potencial se puede clasificar como un candidato para investigación adicional sobre la base de un resultado de exploración positivo. Un resultado de exploración positivo puede ser aquel en que se descubre que el agente de ensayo puede restaurar o normalizar un resultado conductual de un animal de la invención o hacia el resultado conductual de un animal normal (por ejemplo, un animal que no tiene niveles alterados de STXP1 pero que por otra parte es idéntico al animal de la invención). En algunos casos, el resultado conductual se puede cuantificar, y medir se el grado de restauración o normalización del resultado conductual. De esta forma, se puede

establecer un nivel umbral predeterminado que permita la clasificación de un agente de exploración como positivo o negativo para la restauración o normalización de la conducta. De esta forma, los agentes clasificados como positivos se pueden someter a un ensayo adicional en animales y/o a ensayo clínico en seres humanos para determinar la seguridad y/o la eficacia en el tratamiento de enfermedades psiquiátrica, por ejemplo, esquizofrenia.

5 Las sustancias que se pueden utilizar en el método de exploración no están limitadas, sino que pueden incluir por ejemplo: comercialmente disponibles, varios compuestos conocidos registrados en bases de datos de compuestos, compuestos obtenidos de archivos de química combinatoria, compuestos obtenidos por técnicas de química combinatoria, o compuestos modificados química o biológicamente derivados de otros compuestos, sobrenadantes de cultivos de microorganismos, componentes naturales derivados de plantas o de organismos marinos, tejidos animales, ARN de interferencia, péptidos y anticuerpos. Preferentemente, el agente es un compuesto que puede atravesar la barrera hematoencefálica (BBB) de forma que está "activado centralmente".

15 Preferentemente, uno o más compuestos de control positivos, conocidos por tener actividad terapéutica en el tratamiento de enfermedades psiquiátricas, particularmente esquizofrenia, se usan en el método de exploración como referencia con la que comparar los efectos de cualquier agente de ensayo. Los compuestos de control positivo preferidos incluyen los antipsicóticos atípicos tales como: clozapina, risperidona, olanzapina, Quetiapina, ziprasidona, aripiprazol, paliperidona, asenapina, iloperidona, sertindol, zotepina, amisulprida, bifeprunox y mepeperona, y fármacos antipsicóticos típicos tales como: clorpromazina, flufenazina, haloperidol, molindona, tiotixeno, tioridazina, trifluoperazina, loxapina, perfenazina, proclorperazina, pimozida y zuclopentixol.

25 Todas las referencias citadas en el presente documento se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad y para todos los fines en la misma extensión que se cada publicación individual o patente o solicitud de patente se indicara específicamente de forma individual como incorporada por referencia en su totalidad.

Las realizaciones específicas descritas en el presente documento se ofrecen a modo de ejemplo, pero no como limitación. Cualquier subtítulo del presente documento es simplemente por comodidad, y no debe tomarse como limitante de la descripción de ninguna forma.

30 Referencias

1. Arguello & Gogos, 2006, *Neuron*, 52(1): 179-196.
2. Behan et al., 2008a, *Molecular Psychiatry*, Publicación electrónica, 12 feb. de 2008, doi:10.1038/mp.2008.7
3. Crawley et al., 2000, *What's Wrong with My Mouse? Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice* (Wiley, Nueva York).
4. Ellenbroek & Cools, 2000, *Behav Pharmacol.* 11(3-4): 223-233.
5. Fatemi et al., 2001, *Neuroreport*, 12:3257-3262.
6. Geyer & Moghaddam, 2002, *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*, (eds. K.L. Davis, D. Charney, J.T. Coyle, & C. Nemeroff), Lippincott Williams & Wilkins, Capítulo 50, pág. 689-701.
7. Gray et al., 2006, *Neurosci Lett*, 391:112-115.
8. Halim et al., 2003, *Mol Psychiatry*, 8:797-810.
9. Honer et al., 2002, *Cerebral cortex*, 12:349-356.
10. Imai et al., 2001, *Neurosci Lett*, 305:185-188.
11. Mukaetova-Landiska et al., 2002, *Neurosci Lett*, 317:161-165.
12. Rogers y Cole, 1994, *Eur J Pharmacol.* 22;261(3):321-5.
13. Rossler et al., 2005, *Eur Neuropsychopharmacol*, 15:399-409.
14. Sollner et al., 1993a, *Cell* 75:409-418.
15. Sollner et al., 1993b, *Nature* 362:318-324.
16. Thompson et al., 2003, *Biol Psychiatry*, 53:1132-1137.

17. Verhage et al., 2000, *Science*, 287:864-869.
18. Vercauteren et al., 2007, *Proteomics*, 7: 3569-3579.
- 5 19. Voets et al, 2001, *Neuron*, 31: 581-591.
20. Weinberger, 2005, *Clin Ther.*27: Supl. A: S8-S15.
- 10 21. Young et al., 1998, *Cereb Cortex*, 8:261-268.
22. Bracher and Weissenhorn, 2001, *J Mol Biol*, 306(1): 7-13.
- 15 23. Bhardwaj SK, Baharnoori M, Sharif-Askari B, Kamath A, Williams S and Srivastava L K (2009) Behavioral Characterization of Dysbindin-1 Deficient Sandy Mice. *Behav Brain Res* 197:435-441.
24. Hattori S, Murotani T, Matsuzaki S, Ishizuka T, Kumamoto N, Takeda M, Tohyama M, Yamatodani A, Kunugi H and Hashimoto R (2008) Behavioral Abnormalities and Dopamine Reductions in Sdy Mutant Mice With a Deletion in *Dtnbp1*, a Susceptibility Gene for Schizophrenia. *Biochem Biophys Res Commun* 373:298-302.
- 20 25. Koike H, Ibi D, Mizoguchi H, Nagai T, Nitta A, Takuma K, Nabeshima T, Yoneda Y and Yamada K (2009) Behavioral Abnormality and Pharmacologic Response in Social Isolation-Reared Mice. *Behav Brain Res* 202:114-121.
- 25 26. McLean SL, Idris N F, Woolley M L and Neill J C (2009) D(1)-Like Receptor Activation Improves PCP-Induced Cognitive Deficits in Animal Models: Implications for Mechanisms of Improved Cognitive Function in Schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* 19:440-450.
- 30 27. Powell SB, Zhou X and Geyer M A (2009) Prepulse Inhibition and Genetic Mouse Models of Schizophrenia. *Behav Brain Res*. May 3 [Epub ahead of print]; PMID: 19397931.
28. Behan AT et al."Proteomic analysis of membrane microdomain-associated proteins in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder reveals alterations in LAMP, STXBP1 and BASP1 protein expression.",*MOL PSYCHIATRY*. June 2009(6) p 601-613, ePub 12.2.2008
- 35 29. Gengyo-Ando,K., Kitayama,H., Mukaida,M., Ikawa,Y.,: "A murine neural-specific homolog corrects cholinergic defects in *Caenorhabditis elegans unc18* mutants.", *J. Neurosci.*, vol. 16, 1996, páginas 6695-6702,
30. Low N C et al: "What Is a Schizophrenic Mouse?", *Neuron*. vol. 54, nº 3, 3 Mayo 2007 páginas 348-349

40 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Brainco Biopharma, S.L. Guerrero Martínez, María J Simón Buela, Laureano Ferrer - Alcón, Marcel Martínez Martínez, Antonio Meana, José J Callado, Luis F Uriguen, Leyre
- 45 <120> Marcador psiquiátrico, sistema de modelo y métodos relacionados
- <130> CSC/FP6644298
- <150> US 61/090.607
- 50 <151> 20-08-2008
- <160> 8
- <170> PatentIn versión 3.3
- 55 <210> 1
- <211> 3617
- <212> ADN
- <213> *Mus musculus*
- 60 <400> 1

ES 2 546 732 T3

gcggggcgcg	cggcccgggg	gaggcgacgg	tgtcgcggga	ggagcatcgg	agcccgaaga	60
ctcgaagaac	gccatggccc	ccattggcct	caaggcggtg	gtcggagaga	agatcatgca	120
tgatgtgate	aagaaggaga	agaagaagg	cgagtgggaag	gtgctggtgg	tggaccagtt	180
aagcatgagg	atgctgtcct	cctgctgcaa	gatgacagac	atcatgaccg	agggcatcac	240
aattgtggag	gatatcaaca	agcgcggaga	gccactcccc	agcctggagg	cogtgtacct	300
catcacccca	tctgagaagt	ctgtccactc	tctgatcagt	gattttaagg	acccgccgac	360
tgctaaatat	cgggctgcgc	atgtgttctt	cacagactcg	tgtccagatg	ccctatttaa	420
cgagctggta	aaatcccag	cagccaaagt	catcaagacg	ctgacggaaa	tcaacattgc	480
gtttctcccc	tatgagtccc	aggtgtattc	cctggactcc	gctgactctt	tccaaagctt	540
ctacagccct	cacaaggcgc	agatgaagaa	tccgatactg	gaacgcctgg	cagagcagat	600
cgcaaccctg	tgtgccaccc	tgaaggagta	tccagctgtg	cggtatcggg	gggagtacaa	660
ggacaatgcc	ttgctggctc	agctgatcca	ggacaagctg	gatgcctata	aagccgacga	720
tccaacaatg	ggggagggtc	ccgacaaggc	acggtcccag	ctcctgatcc	tggatcgtgg	780
ctttgacccc	agctcccctg	tgctccatga	actgacattc	caggctatga	gttatgacct	840
gctgcctatc	gaaaatgatg	tttacaagta	tgagaccagc	ggcattggag	aggcgcgggt	900
gaaggagggtg	ctactggatg	aggacgatga	cctgtggatt	gcgctgcgac	acaagcacat	960
cgcagagggtg	tcccaggaag	tcaccggctc	tctgaaggac	ttttcctcta	gcaagaggat	1020

ES 2 546 732 T3

gaacactggc gagaagacca cdatgcgga cctgtcccag atgctgaaga aatgcccc 1080
 gtaccagaag gagctcagca agtattcgac tcacctgcac cttgctgaag actgcatgaa 1140
 gcattaccaa ggcactgtag acaaactctg ccgctggag caggacctgg caatgggac 1200
 agatgctgag ggggaaaaaa tcaaggacct catgagagcc attgtcccc tctgctgga 1260
 tgccaacgtc agcacttacg aaaaaatccg tatcatcctt ctctacatct tctgaagaa 1320
 cggtatcact gaggagaacc taaacaaact catccagcac gctcagatac ccccagagga 1380
 cagcgagatc atcaccaaca tggctcacct cggcgtgccc atcgtcacgg attccacact 1440
 acgccgccga agcaaaccgg agcgggaagg gcgatcagt gagcagacct accagctctc 1500
 acgatggacc ccgatcatta aagacattat ggaggacact atcgaagaca agctggatac 1560
 aaagcactac ccatacatct ctaccgctc gtccgctcc ttcagacca ctgctgtgag 1620
 tgcccgtat ggacattggc acaagaataa ggccccggg gagtaccgca gcggccccg 1680
 cctcattatt ttcaccttg ggggtgtgag cctgaatgag atgcgctgtg cttacgaagt 1740
 gaccaggcc aacggcaagt ggggaagtgt gataggttct actcacatc tcaactcccac 1800
 caaattctc atggacctga gacaccccga cttcaggag tctctaggg tatcttttga 1860
 ggatcaggct ccaacaatgg agtgagagcc aaagagaca agatccacgc acattctcac 1920
 cccacagaaa ctgctggaca cgctgaagaa gctgaataaa acagatgaag aaataagcag 1980
 ttaaaaaata agctgcccc caaaaccog gctccctcc caaatgctc tgcagctccc 2040
 ccgtgcgcca cctcggttac tctgtgctt ccccagcct gcacgcctg gccacccogt 2100
 tgccgtgctg agttcttctc ctgtgcatg acaccccatc ttgtcctctg aaaagcaaga 2160
 gagtaatgtg ttgttttta aaaatgagca tctctgtat gtatcccaca gtaagttcac 2220
 atgcaagctc cacactgcag aagcgtcaga actccggacc gagtgaatc tcccttattt 2280
 atgacccgt gacctgata tagccctgtc ccgctgtgc acattgctg aatatggaaa 2340
 ggtagatgtg tgggtgtctc tccaagctt gttggattca tttctgtcct tgttggtgtt 2400
 tgttccccgg ataggacatg ctgaggagat gatgttctcg ctagcccctg ctogctccct 2460
 gttctcagcg atgagcagac acctctggag gctggcgtgg aacgagcctc ctctttgcac 2520
 ctatggggga ggcttagggt gtccacagga agccagtctg agtgccggcc agtgtggtct 2580
 ccagagcctg gcactgctt ccctgatctg tgtccatact gttgtaaaa gttaaacct 2640
 tcaggctaaa tcagcctgcc tagtgccctc ggagcctcca gagttaggtc tgaccagccc 2700
 cctgcttgaa cacagtgtg atagaggcca agggtcaggg gtgggctgga agctgtgagt 2760
 ttggcactct ggtcaagggt gctttgctgt aggagctagg cctgaagaat gggggccctg 2820

ES 2 546 732 T3

ctgcttagtc agagtcccct cagtttaaga tacttcatca atcttaagtt tgtgtagtgt 2880
 acagtcatgt gtcattgtgg ttgtatgaaa aggatcattt tattctttgt attagtcate 2940
 actgtataaa acatagctag ctataaagca gaaattccag aagccgatgc tggaaggatg 3000
 gtctccaccc tcaggacgca gcagcccct gagcatgctg ctcaacctgc tgctgtagtc 3060
 gtgaaacaaa gacagtggaa gtcacaaaaa tgtccccagc ccagtccccg cccctccctc 3120
 ccgcagattt gtacgtatta ctgtgtctcg tgctgtcttc gcaaacgtgg tgtacgcctg 3180
 ccgcaggtgt cctgtgccct tctccctccc tgactetaga gtctctcttc tcttagttc 3240
 tcaggcctct cccctgctcc tctccagtga accttttccc ttaggactga accacactag 3300
 caccggttga tttcttctgt agcgcttctc ccatcccttc ctccggtcaa gcaatgctca 3360
 tgcttcagga tcttgtttgt cgaacatgtg gggtttctt tatgttattt atataaataa 3420
 tttctcaaat ggatatttaa aaaaaagcta gtctgtcttg aaacttgta acttgaaact 3480
 cttgaatctc agtgtttaa gtatggaagc acaaccgtgt accgctctgt accgtcctgt 3540
 actgcagcat ttgagtctaa taaagacgtc agctctcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3600
 aaaaaaaaaa aaaaaaa 3617

<210> 2
 <211> 599
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 2

Met Ala Pro Ile Gly Leu Lys Ala Val Val Gly Glu Lys Ile Met His
 1 5 10 15
 Asp Val Ile Lys Lys Val Lys Lys Lys Gly Glu Trp Lys Val Leu Val
 20 25 30
 Val Asp Gln Leu Ser Met Arg Met Leu Ser Ser Cys Cys Lys Met Thr
 35 40 45
 Asp Ile Met Thr Glu Gly Ile Thr Ile Val Glu Asp Ile Asn Lys Arg
 50 55 60
 Arg Glu Pro Leu Pro Ser Leu Glu Ala Val Tyr Leu Ile Thr Pro Ser
 65 70 75 80
 Glu Lys Ser Val His Ser Leu Ile Ser Asp Phe Lys Asp Pro Pro Thr
 85 90 95
 Ala Lys Tyr Arg Ala Ala His Val Phe Phe Thr Asp Ser Cys Pro Asp

10

Met Lys His Tyr Gln Gly Thr Val Asp Lys Leu Cys Arg Val Glu Gln
 355 360 365

Asp Leu Ala Met Gly Thr Asp Ala Glu Gly Glu Lys Ile Asp Pro Met
 370 375 380

Arg Ala Ile Val Pro Ile Leu Leu Asp Ala Asn Val Ser Thr Tyr Asp
 385 390 395 400

Lys Ile Arg Ile Ile Leu Leu Tyr Ile Phe Leu Lys Asn Gly Ile Thr
 405 410 415

Glu Glu Asn Leu Asn Lys Leu Ile Gln His Ala Gln Ile Pro Pro Glu
 420 425 430

Asp Ser Glu Ile Ile Thr Asn Met Ala His Leu Gly Val Pro Ile Val
 435 440 445

Thr Asp Ser Thr Leu Arg Arg Arg Ser Lys Pro Glu Arg Lys Glu Arg
 450 455 460

Ile Ser Glu Gln Thr Tyr Gln Leu Ser Arg Trp Thr Pro Ile Ile Lys
 465 470 475 480

Asp Ile Met Glu Asp Thr Ile Glu Asp Lys Leu Asp Thr Lys His Tyr
 485 490 495

Pro Tyr Ile Ser Thr Arg Ser Ser Ala Ser Phe Ser Thr Ala Val Ser
 500 505 510

Ala Arg Tyr Gly His Trp His Lys Asn Lys Ala Pro Gly Glu Tyr Arg
 515 520 525

Ser Gly Pro Arg Leu Ile Ile Phe Ile Leu Gly Gly Val Ser Leu Asn
 530 535 540

Glu Met Arg Cys Ala Tyr Glu Val Thr Gln Ala Asn Gly Lys Trp Glu
 545 550 555 560

Val Leu Ile Gly Ser Thr His Ile Leu Thr Pro Thr Lys Phe Leu Met
 565 570 575

Asp Leu Arg His Pro Asp Phe Arg Glu Ser Ser Arg Val Ser Phe Glu
 580 585 590

Asp Gln Ala Pro Thr Met Glu
 595

ES 2 546 732 T3

<210> 3
 <211> 3899
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

```

ctgacgcgcg gctgcggggc ggagagctgc ggctggccca gcgcgccac ctgaggaggc      60
ggcgggggtcc gcaggcgtcg cgggacgagg agatcggagc cgggagactc gcgcagcgcc      120
atggccccc a ttggcctcaa agctgttgtc ggagagaaga ttatgcatga tgtgataaag      180
aaggtcaaga agaaggggga atggaagggtg ctggtggtgg atcagttaag catgaggatg      240
ctgtcctcct gctgcaagat gacagacatc atgaccgagg gcataacgat tgtggaagat      300
atcaataagc gcagagagcc gctccccagc ctggaggctg tgtatctcat cactccatcc      360
gagaagtccg tccactctct catcagtgac ttaaggacc cgcgactgc taaataccgg      420
gctgcacacg tcttcttcac tgactcttgt ccagatgcc tgtttaatga actggtaaaa      480
tcccgagcag ccaaagtcat caaaactctg acggaatca atattgcatt tctccogtat      540
gaatcccagg tctattcctt ggactctgct gactctttcc aaagcttcta cagtccccac      600
aaggctcaga tgaagaatcc tatactggag cgctggcag agcagatcg gcaccttgt      660
gccaccctga aggagtacc ggctgtgagg tatcgggggg aatacaagga caatgcctg      720
ctggctcagc taatccagga caagctcgat gcctataaag ctgatgatcc aacaatgggg      780
gagggcccag acaaggcacg ctcccagctc ctgatcctgg atcgaggctt tgaccccagc      840
tcccctgtgc tccatgaatt gacttttcag gctatgagtt atgatctgct gcctatcgaa      900
aatgatgtat acaagtatga gaccagcggc atcggggagg cacgggtgaa ggaggtgctc      960
ctggacgagg acgacgacct gtggatagca ctgcgccaca agcacatcgc agaggtgtcc     1020
caggaagtca cccgtctct gaaagatfff tcttctagca agagaatgaa tactggagag     1080
aagaccacca tgogggacct gtcccagatg ctgaagaaga tgctcagta ccagaaagag     1140
ctcagcaagt actccacca cctgcacctt gctgaggact gtatgaagca ttaccaaggc     1200
accgtagaca aactctgcog agtgaggcag gacctggcca tgggcacaga tgctgagga     1260
gagaagatca aggaccctat gcgagccatc gtccccatc tgctggatgc caatgtcagc     1320
acttatgaca aatccgcat catccttctc tacatctttt tgaagaatgg catcacggag     1380
gaaaacctga acaaactgat ccagcacgcc cagatacccc cggaggatag tgagatcatc     1440
accaacatgg ctacactcgg cgtgcccatc gtcaccgatt ccacgctgcg tcgccggagc     1500
    
```

ES 2 546 732 T3

aagccggagc ggaaggaacg catcagcgag cagacctacc agctctcacg gtggactccg 1560
attatcaagg acatcatgga ggacactatt gaggacaaac ttgacaccaa acactaccct 1620
tatatctcta cccgttctct tgctctcttc agcaccaccg ccgtcagcgc ccgctatggg 1680
cactggcata agaacaaggc cccagggcag taccgcagtg gccccgcct catcattttc 1740
atccttgggg gtgtgagcct gaatgagatg cgctgcgcct acgaggtgac ccaggccaac 1800
ggaaagtggg aggtgctgat aggttctact cacattctta ctcccaccaa atttctcatg 1860
gacctgagac accccgactt cagggagtcc tctagggat cttttgagga tcaggctcca 1920
acaatggagt gagagccaaa gaaacaaaga tccacacaca tctcaccct acagaaactg 1980
ctggacacac tgaagaaact gaataaaaca gatgaagaaa taagcagtta aaaaaataag 2040
tcgcccctcc aaaacacgcc cccatcccac agcgcctcgc agcttcccac caccgcccgc 2100
ctcagttcct ttgcgtctgt tgctcccca gccctgcacg ccctggctgg cactgttgcc 2160
gctgcattct cgtgttcagt gatgccctct tcttgtttga aacaaaagaa aataatgcat 2220
tgtgtttttt aaaaagagta tcttatacat gtatcctaaa aagagaagct catgtgcaat 2280
tggtgacag caggagaaat ttctggactg ttaggatgaa tggacgcct ctccccgta 2340
tttaagattt gtgacctgt acataacct gggtgacgtg cacattgctt gggatggaa 2400
cggtagaaat ttgggtgttt ttaaacctt gtttggggtt gttcctgtcc ttgttgagaa 2460
tcatagagat gtctgtgttc ttggagtatt tcaactgag gactaatctg ctatcttcat 2520
tccagtcctt accctcagt gccctctctc atccaaataa cctgggaggt gacaatcagg 2580
atatctcagg aggtccaagg tggaacagac ctctttgcct tcccagcgt ctcatacccc 2640
cggtagtgca gctgtgggtg gaggctgggg tgtctgcacg aagtcaggcc agcgtcctcc 2700
tccacagcct gtcactgccc cctccccagc ctgtgtccac agtgctgtga tcccgagga 2760
agtcctccag tctaaagtcac agtgccctga caggtgagaa gcaaacctcc gctggaagcc 2820
tccatctctt tggaaaaaca gttagtctgg agcctgtggc ccaggccctt ctgtccccag 2880
gcatcatccc aacagctcat tttccctagt ccgccttcgt tcaagggtca ggaatggacc 2940
agaacagatg ggttctggag gccctgaac agagggctat ggctgtggag aaggttcttg 3000
gcccgttgga ctacacaga ccctgtacc cctcggcaag catcttcagt cagattatcc 3060
tcagtttcag atacttcata ataccttggt ttgtgtgggg tcatacatca tcgtgtttgt 3120
aagagaagat ggtcatttta ttctctgtat aaaacttagc tctaaagcag aaactaaagc 3180
agcaaagca ggaaggctgt ctgcatcc tcaagactca gcagctctca ttctccagt 3240
gtgagcacac cttttgtgct gctgctgttg tcgtgaaata taataacagt ggaagtcaca 3300
aaaatgtccc ctgcccagcc cctcgcgc ccttgacctc ctgcaggcca tgtgtgtatt 3360

ES 2 546 732 T3

acttgctag tgatgtcctc tcaaagtgt gtacgcgagc tcggcgccac ctccgcctcc 3420
 ctttcagagc ctgtcctccg cctctctgc tcgctgcatt gtggtgttct cttctcaagg 3480
 ctttgaaatc tccccttgca ctgagattag tcgtcagatc tctcccogtc tccctcccaa 3540
 cttatacgac ctgatttctt taggacggaa ccgcaggcac ctgcgcoggg cgtcttactc 3600
 ccgctgcttg ttctgtcccc tcctcoggac caaacagtgc tcatgcttca ggaccttgtt 3660
 tgtcgaagat gttgggttcc ctttctctgt tatttatata aaaataattt atcaaaagga 3720
 tattttaaaâ aagctagtct gtcttgaaac ttgtttaoct taaaattatc agaattctag 3780
 tgtttgaaag tactgaagca caaacatata tcatctctgt accattctgt actaaagcac 3840
 ttgagtctaa taataaaga aatcagcacc ccttcccggt gtccaggggg aaaaaaaaa 3899

<210> 4
 <211> 594
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

Met Ala Pro Ile Gly Leu Lys Ala Val Val Gly Glu Lys Ile Met His
 1 5 10 15

Asp Val Ile Lys Lys Val Lys Lys Lys Gly Glu Trp Lys Val Leu Val
 20 25 30

Val Asp Gln Leu Ser Met Arg Met Leu Ser Ser Cys Cys Lys Met Thr
 35 40 45

Asp Ile Met Thr Glu Gly Ile Thr Ile Val Glu Asp Ile Asn Lys Arg
 50 55 60

Arg Glu Pro Leu Pro Ser Leu Glu Ala Val Tyr Leu Ile Thr Pro Ser
 65 70 75 80

Glu Lys Ser Val His Ser Leu Ile Ser Asp Phe Lys Asp Pro Pro Thr
 85 90 95

Ala Lys Tyr Arg Ala Ala His Val Phe Phe Thr Asp Ser Cys Pro Asp
 100 105 110

Ala Leu Phe Asn Glu Leu Val Lys Ser Arg Ala Ala Lys Val Ile Lys
 115 120 125

Thr Leu Thr Glu Ile Asn Ile Ala Phe Leu Pro Tyr Glu Ser Gln Val
 130 135 140

10

ES 2 546 732 T3

Tyr Ser Leu Asp Ser Ala Asp Ser Phe Gln Ser Phe Tyr Ser Pro His
 145 150 155 160
 Lys Ala Gln Met Lys Asn Pro Ile Leu Glu Arg Leu Ala Glu Gln Ile
 165 170 175
 Ala Thr Leu Cys Ala Thr Leu Lys Glu Tyr Pro Ala Val Arg Tyr Arg
 180 185 190
 Gly Glu Tyr Lys Asp Asn Ala Leu Leu Ala Gln Leu Ile Gln Asp Lys
 195 200 205
 Leu Asp Ala Tyr Lys Ala Asp Asp Pro Thr Met Gly Glu Gly Pro Asp
 210 215 220
 Lys Ala Arg Ser Gln Leu Leu Ile Leu Asp Arg Gly Phe Asp Pro Ser
 225 230 235 240
 Ser Pro Val Leu His Glu Leu Thr Phe Gln Ala Met Ser Tyr Asp Leu
 245 250 255
 Leu Pro Ile Glu Asn Asp Val Tyr Lys Tyr Glu Thr Ser Gly Ile Gly
 260 265 270
 Glu Ala Arg Val Lys Glu Val Leu Leu Asp Glu Asp Asp Asp Leu Trp
 275 280 285
 Ile Ala Leu Arg His Lys His Ile Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Thr
 290 295 300
 Arg Ser Leu Lys Asp Phe Ser Ser Ser Lys Arg Met Asn Thr Gly Glu
 305 310 315 320
 Lys Thr Thr Met Arg Asp Leu Ser Gln Met Leu Lys Lys Met Pro Gln
 325 330 335
 Tyr Gln Lys Glu Leu Ser Lys Tyr Ser Thr His Leu His Leu Ala Glu
 340 345 350
 Asp Cys Met Lys His Tyr Gln Gly Thr Val Asp Lys Leu Cys Arg Val
 355 360 365
 Glu Gln Asp Leu Ala Met Gly Thr Asp Ala Glu Gly Glu Lys Ile Lys
 370 375 380

Asp Pro Met Arg Ala Ile Val Pro Ile Leu Leu Asp Ala Asn Val Ser
385 390 395 400

Thr Tyr Asp Lys Ile Arg Ile Ile Leu Leu Tyr Ile Phe Leu Lys Asn
405 410 415

Gly Ile Thr Glu Glu Asn Leu Asn Lys Leu Ile Gln His Ala Gln Ile
420 425 430

Pro Pro Glu Asp Ser Glu Ile Ile Thr Asn Met Ala His Leu Gly Val
435 440 445

Pro Ile Val Thr Asp Ser Thr Leu Arg Arg Arg Ser Lys Pro Glu Arg
450 455 460

Lys Glu Arg Ile Ser Glu Gln Thr Tyr Gln Leu Ser Arg Trp Thr Pro
465 470 475 480

Ile Ile Lys Asp Ile Met Glu Asp Thr Ile Glu Asp Lys Leu Asp Thr
485 490 495

Lys His Tyr Pro Tyr Ile Ser Thr Arg Ser Ser Ala Ser Phe Ser Thr
500 505 510

Thr Ala Val Ser Ala Arg Tyr Gly His Trp His Lys Asn Lys Ala Pro
515 520 525

Gly Glu Tyr Arg Ser Gly Pro Arg Leu Ile Ile Phe Ile Leu Gly Gly
530 535 540

Val Ser Leu Asn Glu Met Arg Cys Ala Tyr Glu Val Thr Gln Ala Asn
545 550 555 560

Gly Lys Trp Glu Val Leu Ile Gly Ser Thr His Ile Leu Thr Pro Gln
565 570 575

Lys Leu Leu Asp Thr Leu Lys Lys Leu Asn Lys Thr Asp Glu Glu Ile
580 585 590

Ser Ser

<210> 5
<211> 3754
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

5

<400> 5

ES 2 546 732 T3

gcgctgacag cggccggtgc gcgttgtctc cactgtgcc c tgcacccgc atctcgcatc 60
 ggccaggcta cccgactcat cgcaaacgtc agtgctcacc atggggaagc ccacgagctc 120
 gggatgtgac tggcgccgct tcctacggaa tcaactggctg ctgctctcca ccgtggccgc 180
 cgtggtacta ggaattgtct taggagtcgt ggttcgagga cacagtgagc tctcaaactc 240
 ggataaattc tactttgctt ttctgggga aattctgatg aggatgctga agctggctcat 300
 tttgcogctg atcgatcca gcatgatcac aggtgtcgt gcaactggatt ccaatgtgtc 360
 tgggaagatt ggtctgcgcg ctgtagtata ttattctcc accacgctca ttgctgtaat 420
 cctaggtatt gtgtagtg tgagtatcaa gcctgggtgc actcagaaag tgaatgacat 480
 caacaggacg ggtaaaacc ctgaagtcag caccatggat gccatggttg acctgatcag 540
 gaacatgttc cctgagaatc tggccaagc ctgtttcag cagtacaaaa ccaagcggga 600
 agaggatgaag cctgtggcg atcctggggg gaacgcaacg gaggtgtctg tcaccacagc 660
 catgacaaca atgtctgaga acaagacaaa ggaatacaag atcgtgggcc tgtactcaga 720
 cggcatcaat gtctgggct tgattatctt ctgcctcgtc tttggccttg tcattgggaa 780
 aatgggagaa aaggggcaga ttctggtgga cttctcaat gccttgagtg acgccaccat 840
 gaaaatcgtc cagatcatca tgtgctacat gccgattgac attttgttc taattgctgg 900
 gaagatcata gaagttgaag actgggaaat attcgcgaag ctgggccttt acatggccac 960
 tgtcctgagc gggcttgcaa tccactcct catagttctg cccctgctct attcatagt 1020
 tgtgcggaag aacccttcc gctttgctt gggatggcg caggetctcc tgacagctct 1080
 catgatctcg tccagttcgg caaccctgcc agttacattc cgctgtgagg aagaaaagaa 1140
 ccaggtagac aagaggatca cgagatttgt gctgcctgtt ggtgccacca tcaacatgga 1200
 cggcactgag ctctacgaag ctgtggcagc cgtgtttatt gcgcaactga atggcttggga 1260
 cctaagcatt gggcagatcg tcaccatcag cttacagcc accgctgcca gcattggagc 1320
 tgctggggtg cccaggtctg gcctgggtgac catggtgatc gtgctgagtg ctgtgggct 1380
 gcctgccgag gacgtcacc tgatcattgc tgttgactgg ctctggacc ggctcaggac 1440
 catggtgaac gtctgggtg atgcgtttgg gacgggcatc gtagagaagc tctcgaagaa 1500
 ggagctggag cagatggatg tttcgtctga agtcaacatc gtgaaccctt ttgccttggga 1560
 accacaacc ctgataacg aagactcaga taccaagaag tcttatgtca atggggctt 1620
 cgcggtagac aactctgaca ccatctcgtt cactcagacc tcacagttct agatgcctga 1680
 cctcagattg aggcctggga ttgtgaaggg cgtctccaca ggagccatct cctagcaaac 1740
 tccgacatta agaacgaga aggacactaa gactcaactg tacatttagt ttgataaaca 1800

ES 2 546 732 T3

gacctccaga ttatcttcta tatttgactt tatagccttg gttctctggg tttagggatt 1860
 tggggtgaga tgaactgaaa ggaaattaag aaagttgtgt tatctggatt ttctaattct 1920
 atacaacaga gtttggaagt atatgaagta gtaactgtta ggattaggtc atagatatgg 1980
 aagagaaatt ggtttctcat gcatagacca gtgtttgggg tttttaaca atattattgg 2040
 ctacaaattt ttactcaggc tttctattgg caggacttcc tttgcctttt tacttttata 2100
 gattataatg catctcaaaa gccctacca gttaatgtgc caaattttcc attttgacct 2160
 catctccagc cactctcaaa ctaccctggg ggggggggag caaaaaagat cagcatagtt 2220
 ctgcaataac agtttaaga tagttgtggg gtttagggga agggaaaggg tttttttatt 2280
 caatgtactg tattgagaca ctggtagctg acagccagtg ttcggtatag aactatatgt 2340
 atatgtgtgt atatttatta ttttcatgta atttgcaaga cagagatcag taatgaacta 2400
 tcaatgtgaa atacgcagct tccctgtac ttgaatcaaa acgatagctc cagcctaggt 2460
 gtgagctcac cagaacactg tcaggcactc tgggatgaga aatcaagttg ctggcttact 2520
 gtgattcaag ccctaaagca gaaacatatt atggtgaaac tctaagatga cacagccatt 2580
 cacgtacaac atctagggc aggcctcccg gagggggagg ctccctgcga gcatggaata 2640
 agtacattta caaaggcact gtagaggcag gaagtgtcc catagcaaca aaaggcttcg 2700
 atcttcaagt agacttcaag acccacttca caaggctgtc acttttctgt tcttggtttt 2760
 ctctgctgc gccccacc cccaggcca aaccagcagt gacaagccac tgctgtttca 2820
 aaacggggtg gcctaaattg aataagctc attgcaaggt gaccaagcta tccttatact 2880
 gtcgtctttt tattttatct tctggtttt ttattttta gtttttgaga cagcgcctct 2940
 ctacatagcc ctggatatcc tggaaactac tatgtagact agactggcct caaactcaca 3000
 gagatcctcc tgccctctgc tctttagtgc tggcctgaaa ggtaggtacc accatgcccc 3060
 gctctacact gtatctttac agaagaaaag ccaggccata agcgactggg accagcgggt 3120
 cagggacaat acttcagtc ttccctggag aggattgttc tgggaatctc agccttgtgg 3180
 cttagaatcc tetgctgtc tttctctgc taattccga agatggctta taaaagtcta 3240
 cacttctgtc ctcatctgt aaataaaact caacaaaaac ttgttcttaa cttggagaca 3300
 ggtcataac agccgtgtt ctgtagtgc cttaagtcac cttaaccgg tgcttttata 3360
 tttagaagc cagaaatcgt gccaaagata gcaggaaggt aaccgaatgc tcagagttgg 3420
 ccacgcccac ctgaaagcta ccgactgacc gtcacggga cccttgactc cgaactttga 3480
 agtacaata tctgtattct ttataggaag taaatctaaa tctaaatgag gttgaatgga 3540
 tattttattt aggagtggat gtttctgtcc ccttatcagg tggttctcct tagtggcagt 3600

ES 2 546 732 T3

gaattggcag agccgttcac aagatcattg gggtcacctt gtaaccagcc acttcacaca 3660
 ctgtgctggt aactcaagat gatatgttcc acttccttct caataaacat ctcccccaact 3720
 ctttctcccc ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 3754

<210> 6
 <211> 2849
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 6

tagtccaacc agagacagag cacactcacc attttcagag agaggaagg ggctcaacct 60
 atgaagagaa aacaaaacaa aacaatgaca aacacagtcc tctttggatt cttctccctt 120
 tttatttgta gtaatgaggg atgaacctac agctcgggtgc atactagaaa aaaacctacc 180
 ctggagctat atccataccc attttctttt tgttttgaag cagagtctca ctaagttatc 240
 caaacagttc tgaatttgca atcctcctgc ctctatctgc caaggagctg ggggatagaa 300
 acttgcttgc accgctgtgt tgcgctgtct ttggagggtt aatcaaataa ataaaaatat 360
 atagccagct aatgtgtggt gagtatggat tgcctgtgat ggaggaataa gcaagctact 420
 atttcattct gacagccttt attcctgcag ttctgagaag ttggaaggag aaagttcact 480
 gaagttgtca atgctcacag atttctctaa caggcgtctg gctctgtggt ctctccccac 540
 caaggcttat ttaccacac tgatgcctta agcttcggga attcctccac gccctctgat 600
 ttctgtgaac tgaatagagg cctggcaagg ctctatttag cactcacctc aaggctctcag 660
 agttgagtat ttctgcact gtaggccctt agaagacaga gcaaggcaag catttcccct 720
 ttgtgactcc cactgtgcc ttaccagcat taggaaggcc ttagaatacc tgctagcagg 780
 gtactaagea gtctcaacat ttttctcca ttttatctat tcagaggcaa ccacaatgat 840
 caatgacaac aggacctgag atcaacagca gcagggtgtt attttaaag tatagaaaac 900
 aggttaaac actgtaaaca tcaaccagaa aaattaagga ctctgctagc tatttggttt 960
 gtttgtttgt ttgtttggtt gtttgttttt gtaataatgg ggtctgcaca caggaccaat 1020
 gctgetccat gctaggcaag tttgatcact gaactctatt tctagcactc ttctcgcttt 1080
 ttatggtgag ccacaatctt accaacttgc tccggtggc cttgaactca ctttgtaatc 1140
 cctacaagcc ctgaacttaa aattctctg tcttggtctc cggaataggt ctgcctcacc 1200
 atgccagttt gtattattac tgataacagt aaaatctgta aatgctgcat atactaaaca 1260
 cttcccaaac atccctcatt tagcctctgt ggcagatttt ctactaacc cggtttacct 1320
 aagaatcaag gaaggctggg ggaagttaag acattcctcc actggcctgg agagatgact 1380
 cagaggttaa gagcatttgc tgtcctttca gaggaccag attcaagtcc cagttccacc 1440

10

ES 2 546 732 T3

gtggcagctt agaatcatct gtaactccag ttccaagagc tctggcacc tcttctgacc 1500
tcagcaggca caaagcatgc gggtagagca catacacaat gcaggcaaga cattcattca 1560
caataaatta gttttgtttt gatttttttag gaactacttt tctccaaagt aaattgetgg 1620
agtccattgc caggctatcc taaacaccag tggcagaaga cattttcata aagccccca 1680
tgatttcctc aactgccttt ctaatcagct aaacaactaa gtctgacttc gcctcaagta 1740
tattttacta ctctttgttt tagggtaagt tgggtgtctt agtagagcac tttgagtttg 1800
gttaaaaatt aacagttgca aatttagaaa cactgttacc ttaggcactg ccatcttaga 1860
agcctaggag tcaggggat cctggacacc acaagaaaac aaccacagc atcaactaag 1920
cagggctcat aggcgctcac agaaactgaa gcggctagca cagggcctac gtgtgtctgt 1980
gctaggttct ctgtgatgt gttatggtt tgtagcttg tggcttcta gaagtgttt 2040
tcttaggtaa atgttatttg tttaatatt gaataaaact aagaaacct tctggcctgg 2100
gaagccatgt ttctgcccag gaacacagag cacctccagc agctgtctgc tttgaagctg 2160
ctaagagctc gctcaggaag aagtgaagtc atccgcttct atctatcttc tatctataac 2220
gatggcacia cggttcagta atttgccac aggacagcag aatgaaggg ogaagaaaa 2280
ggcgagctgg caatcacttt atttcagttc acttcagtca aacccttgct ccatttttt 2340
ttttttctag tgtgatttca cacaaagtga ctcatgaaaa ttgcacgcat atgtggggag 2400
attagcaata ccggacttca gtgacactga ggccggcttc cattccattc cacttatatt 2460
gacagctgaa cagctgcttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt tttttctcc 2520
cttcagggca aagaacacac acaagcgatg tgtttaaaa gagatggtt gtatttaaac 2580
tgccagagag aactgacacc accttagtt taggtagggg atttccgcta gttacttttt 2640
gtcctaacat tggataaagc ccaactgctc gagtcaactaa ccacttcag ccaatcacag 2700
acagaccaac acaccgccc gcagccaatt ttctgagccc tgccgtgctt taaccgcaga 2760
accaatccga aggaccgct gtcacttttc atccagctgg ttgtcgtgc gcgccctcc 2820
agattccgaa ggcgaaagctc gcgaagcag 2849

<210> 7

<211> 37

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: cebador

10

<400> 7

ttgtcgactt cgcgagcttc gccttcggaa tctggag 37

15

<210> 8

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 546 732 T3

<220>

<223> Secuencia sintética: cebador

<400> 8

5 ttgtacat agtccaacca gagacagagc acactc 36

REIVINDICACIONES

1. Un ratón transgénico que tiene un polinucleótido que codifica un polipéptido de STXBP1 (proteína de unión a sintaxina 1), polinucleótido que está unido operativamente a un promotor EAAT3 (transportador de aminoácidos excitadores 3), en donde dicho ratón transgénico tiene una expresión del polipéptido de STXBP1 mayor que la de tipo silvestre en al menos una región cerebral seleccionada entre: corteza, cuerpo estriado, hipocampo y cerebelo.
2. Un ratón transgénico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho polinucleótido está presente con un número de copias mayor que el tipo silvestre.
3. Un ratón transgénico de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho polinucleótido codifica:
- (i) un polipéptido de STXBP1 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2;
 - (ii) un polipéptido de STXBP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2
 - (iii) un polipéptido de STXBP1 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4;
 - (iv) un polipéptido de STXBP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4; o
 - (v) un fragmento activo de uno o más de (i)-(iv) que tiene al menos 200 aminoácidos, y en el que dicho polipéptido de STXBP1 o uno cualquiera de (i)-(iv) o dicho fragmento activo de (v) pueden unirse a un polipéptido de sintaxina.
4. Un ratón transgénico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el promotor de EAAT3 comprende un polinucleótido que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEC ID N°: 6 o un polinucleótido que tiene la secuencia de la SEC ID N°: 6.
5. Un ratón transgénico de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que tiene al menos un 10 % más de expresión del polipéptido de STXBP1 en dicha al menos una región cerebral, tal como se ha medido mediante transferencia de Western, inmunofluorescencia y/o cPCR de un ARNm de STXBP1.
6. Un método para producir un ratón transgénico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende introducir un vector en una o más células del ratón en estado embrionario; y opcionalmente, extraer posteriormente el ADN del animal para confirmar la incorporación del polinucleótido en el genoma del animal, donde dicho vector comprende: un polinucleótido que codifica un polipéptido de STXBP1 unido operativamente a un promotor EAAT3 y opcionalmente secuencias reguladoras adicionales.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho polinucleótido de dicho vector codifica:
- (i) un polipéptido de STXBP1 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEC ID N°: 2;
 - (ii) un polipéptido de STXBP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2
 - (iii) un polipéptido de STXBP1 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEC ID N°: 4;
 - (iv) un polipéptido de STXBP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4; o
 - (v) un fragmento activo de uno o más de (i)-(iv) que tiene al menos 200 aminoácidos, y en el que dicho polipéptido de STXBP1 o uno cualquiera de (i)-(iv) o dicho fragmento activo de (v) pueden unirse a un polipéptido de sintaxina.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que el promotor de EAAT3 de dicho vector comprende un polinucleótido que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEC ID N°: 6 o un polinucleótido que tiene la secuencia de la SEC ID N°: 6.
9. Un método *in vivo* para identificar un agente para su uso en el tratamiento de una enfermedad neuropsiquiátrica, particularmente esquizofrenia y/o trastorno bipolar, que comprende:
- (i) administrar un agente de ensayo a un ratón transgénico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y posteriormente medir, directa o indirectamente, la expresión de un polipéptido de STXBP1 en al menos una región del cerebro con respecto a la expresión del polipéptido de STXBP1 en al menos una región del cerebro de un ratón transgénico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que no se ha expuesto al compuesto de ensayo; y/o
 - (ii) administrar un agente de ensayo a un ratón transgénico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y posteriormente evaluar la presencia y/o la gravedad de una o más conductas relacionadas con la esquizofrenia en el animal transgénico con respecto a una o más conductas relacionadas con la esquizofrenia en un ratón

transgénico control de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que no se ha expuesto al agente de ensayo, en donde una reducción de dicha expresión en (i) y/o dichas una o más conductas relacionadas con la esquizofrenia en (ii) debido al agente de ensayo indica que el agente de ensayo es potencialmente útil en el tratamiento de enfermedades neuropsiquiátricas, particularmente esquizofrenia y trastornos bipolares.

5
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dichas una o más conductas relacionadas con la esquizofrenia se pueden seleccionar entre: reducción de la actividad motora en una prueba de campo abierto; reducido tiempo pasado en los brazos abiertos de un laberinto elevado; interacción social reducida; aumento en el índice de reconocimiento en una tarea de reconocimiento de objetos novedosos; y disminución de la inhibición prepulso de una respuesta inicial.

10
11. Un método de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que se encuentra que el agente de ensayo reduce dicha expresión en (i) y/o en dichas una o más conductas relacionadas con la esquizofrenia en (ii).

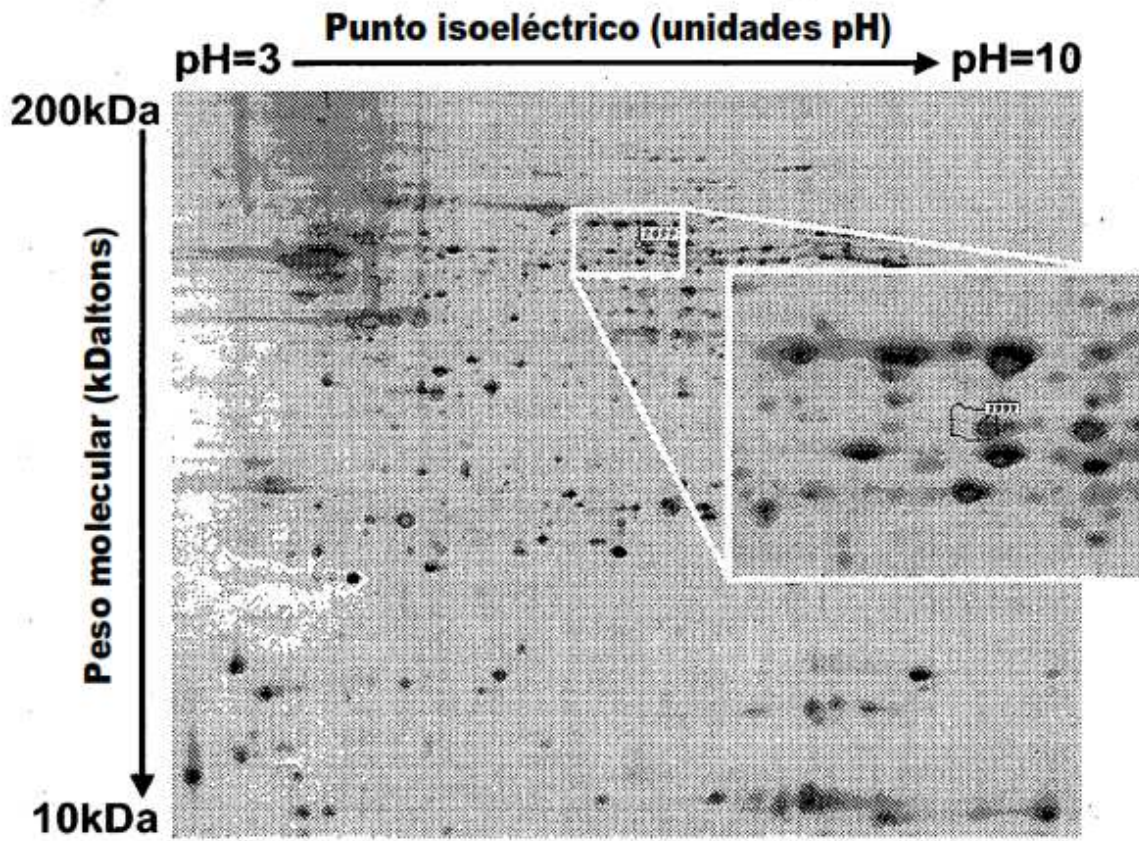


Figura 1

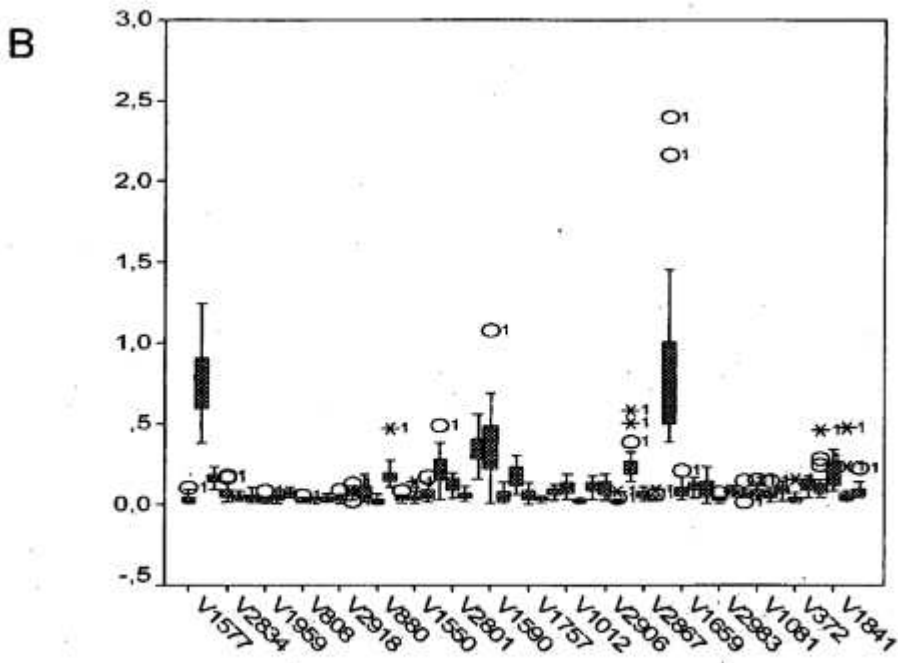
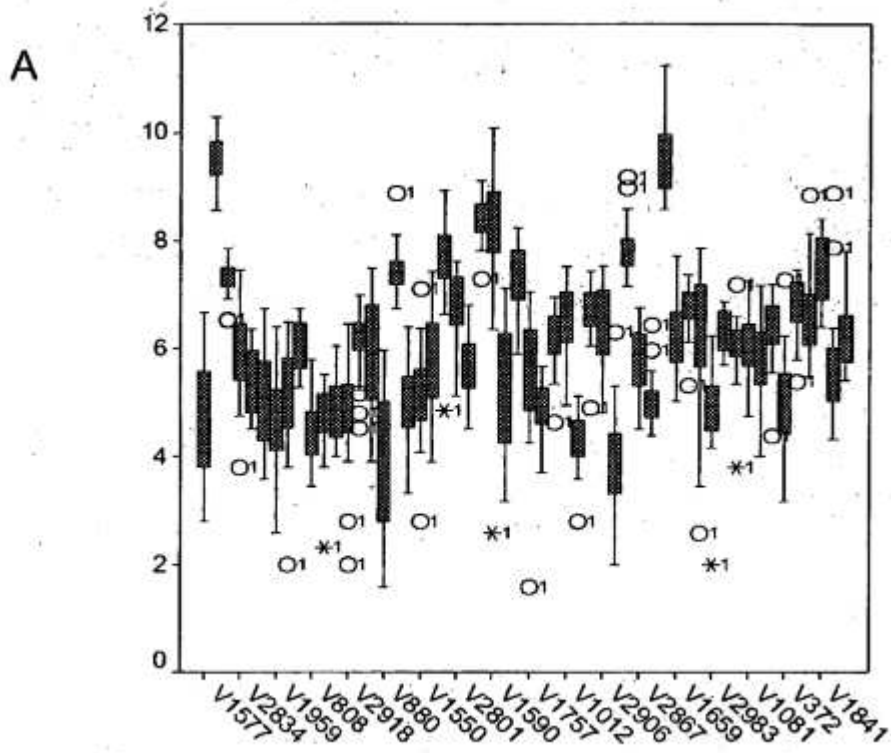


Figura 2

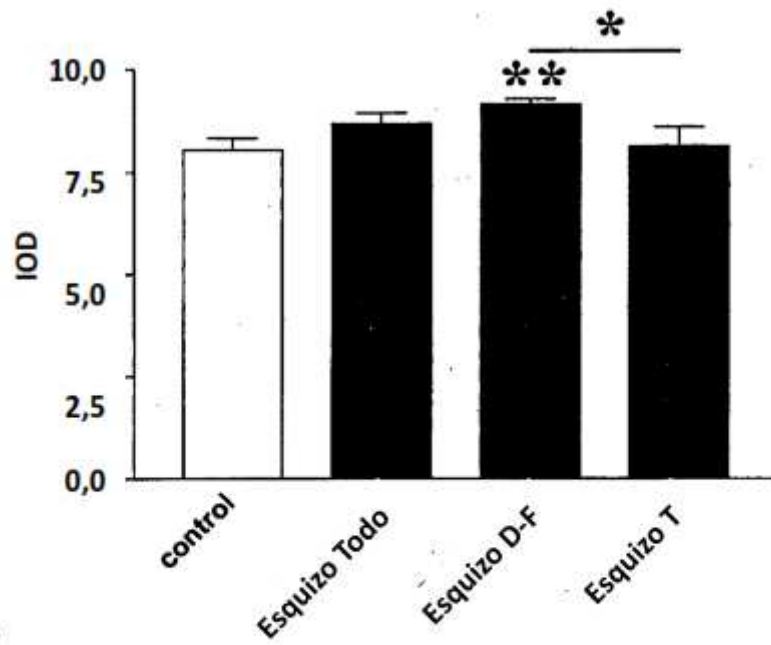


Figura 3

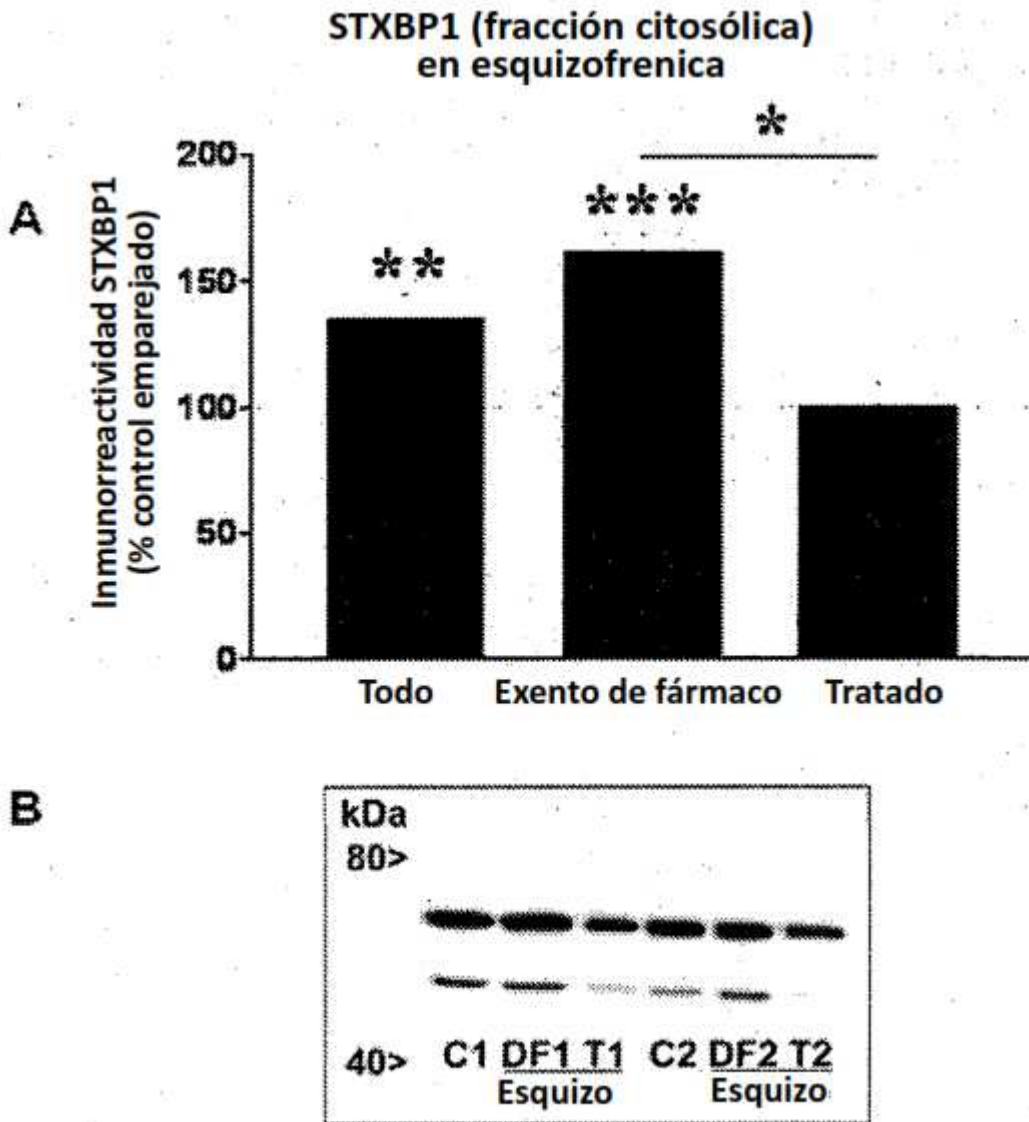
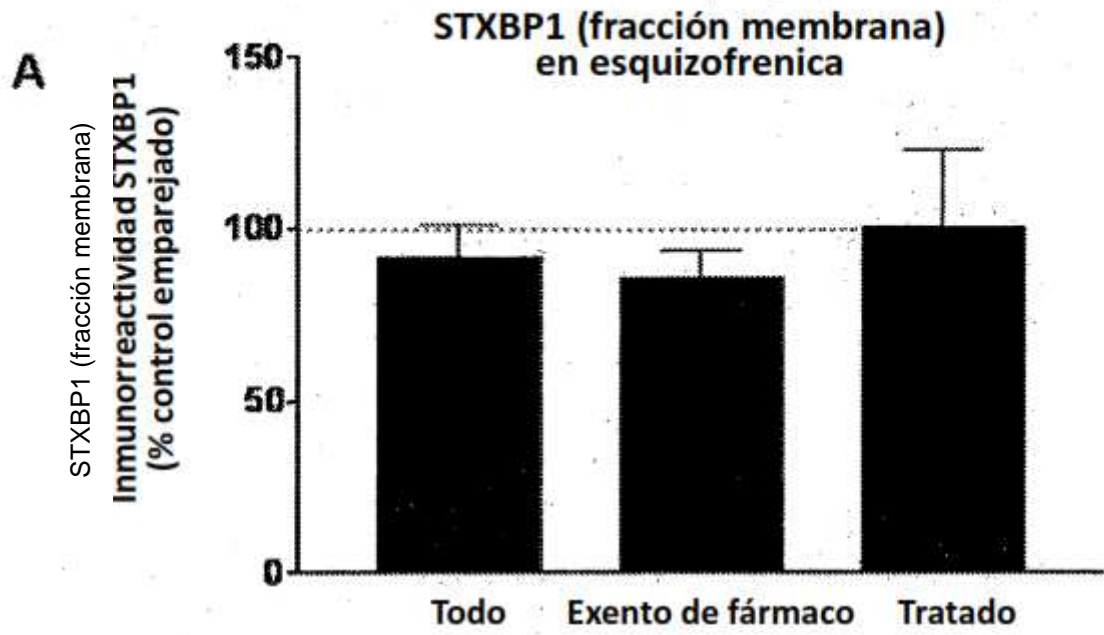


Figura 4



B

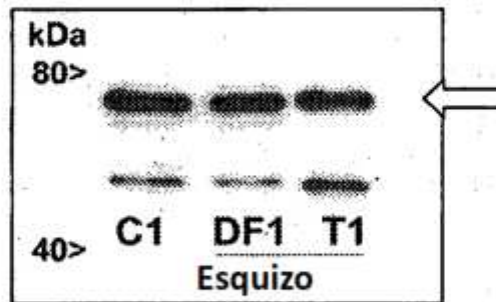


Figura 5

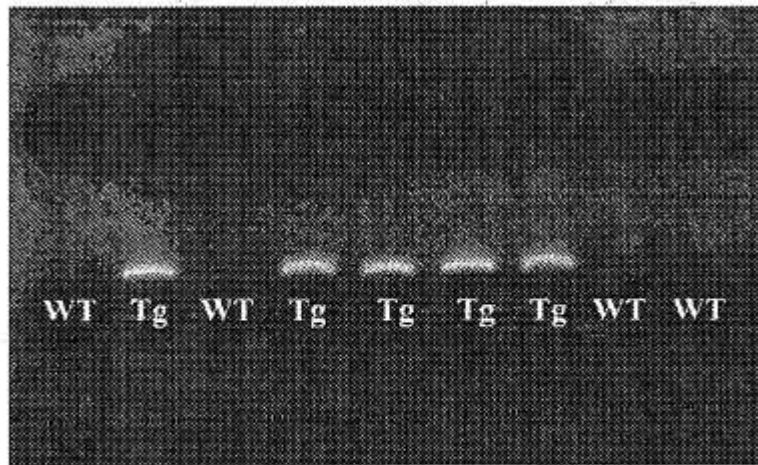


Figura 6

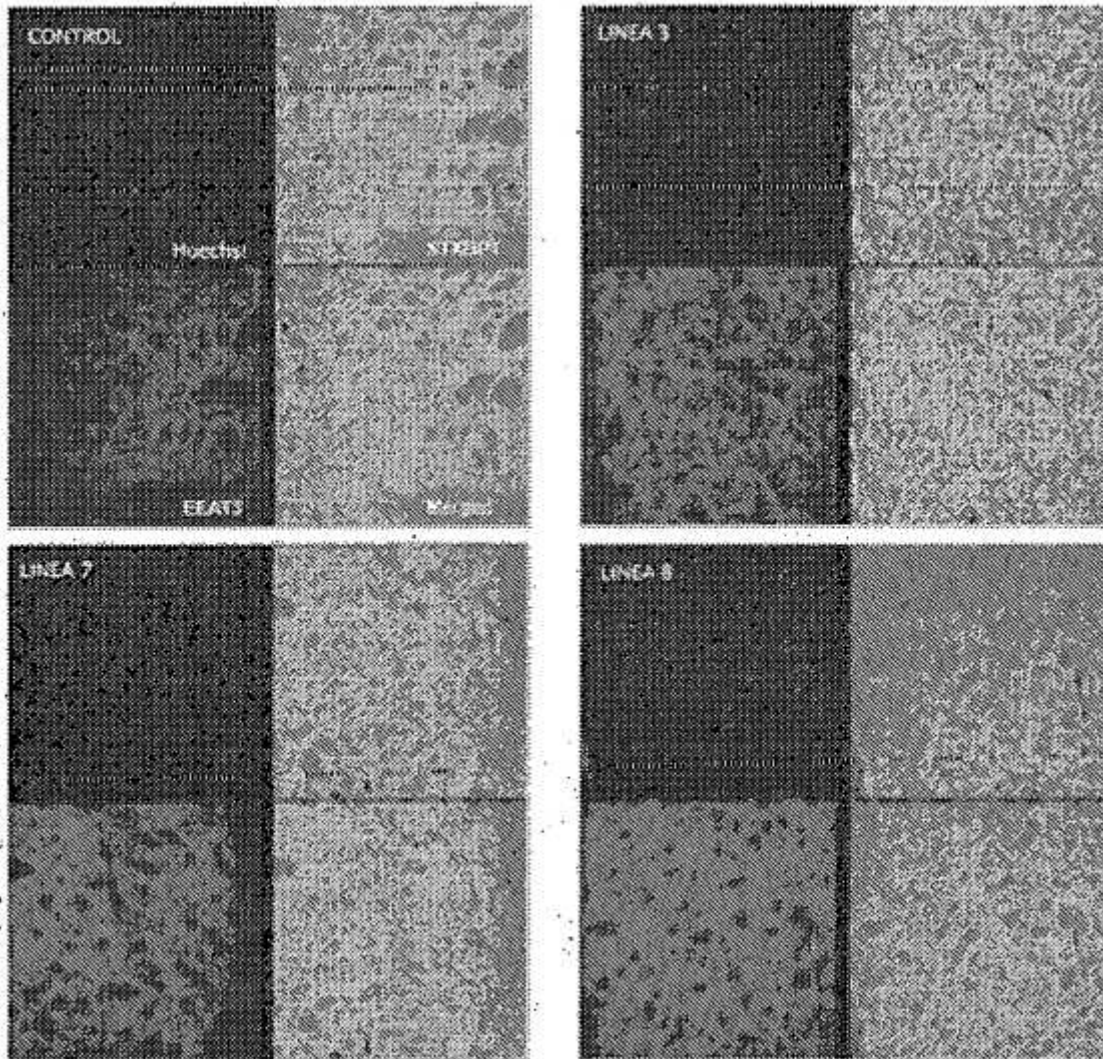


Figura 7

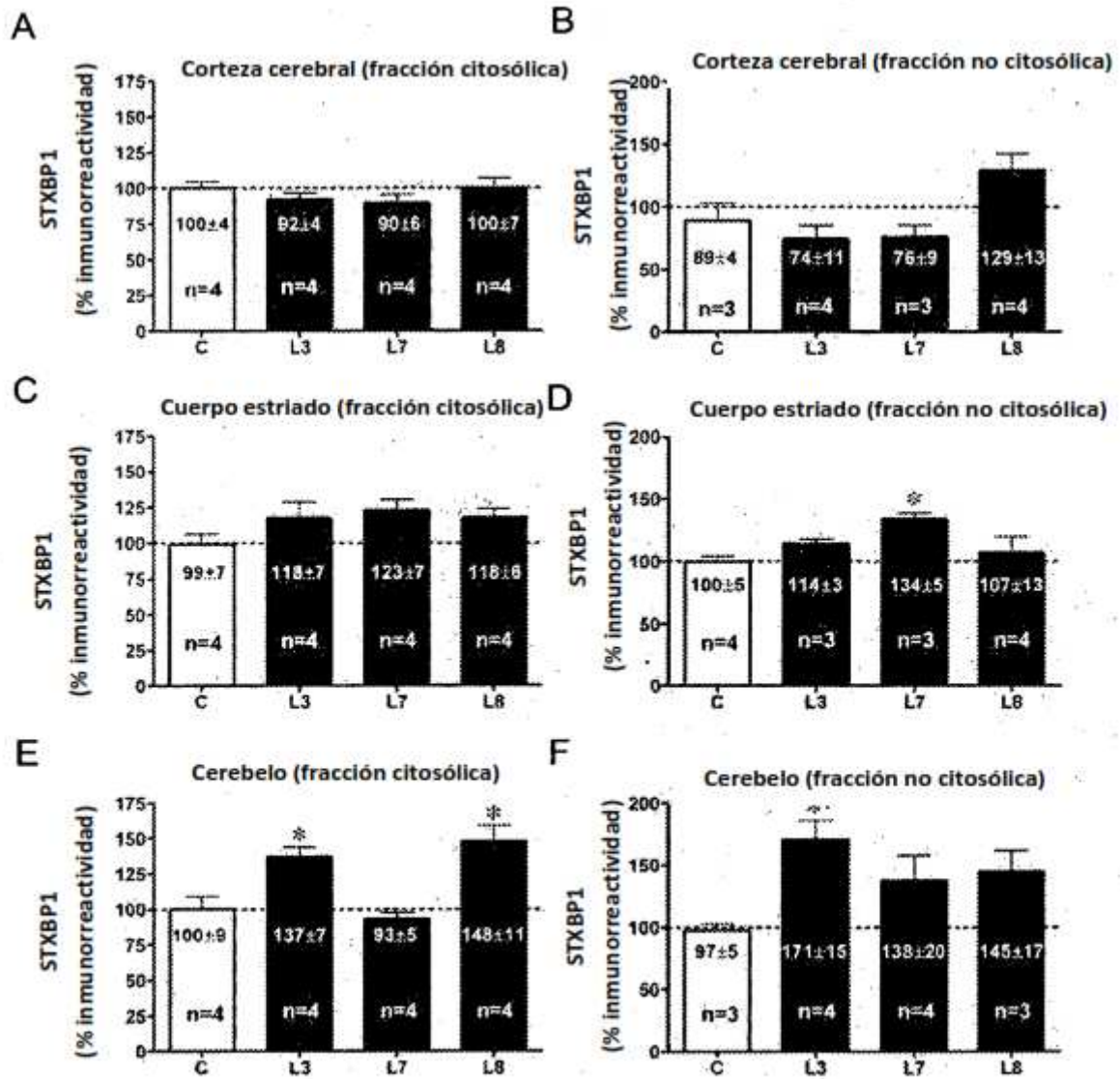


Figura 8

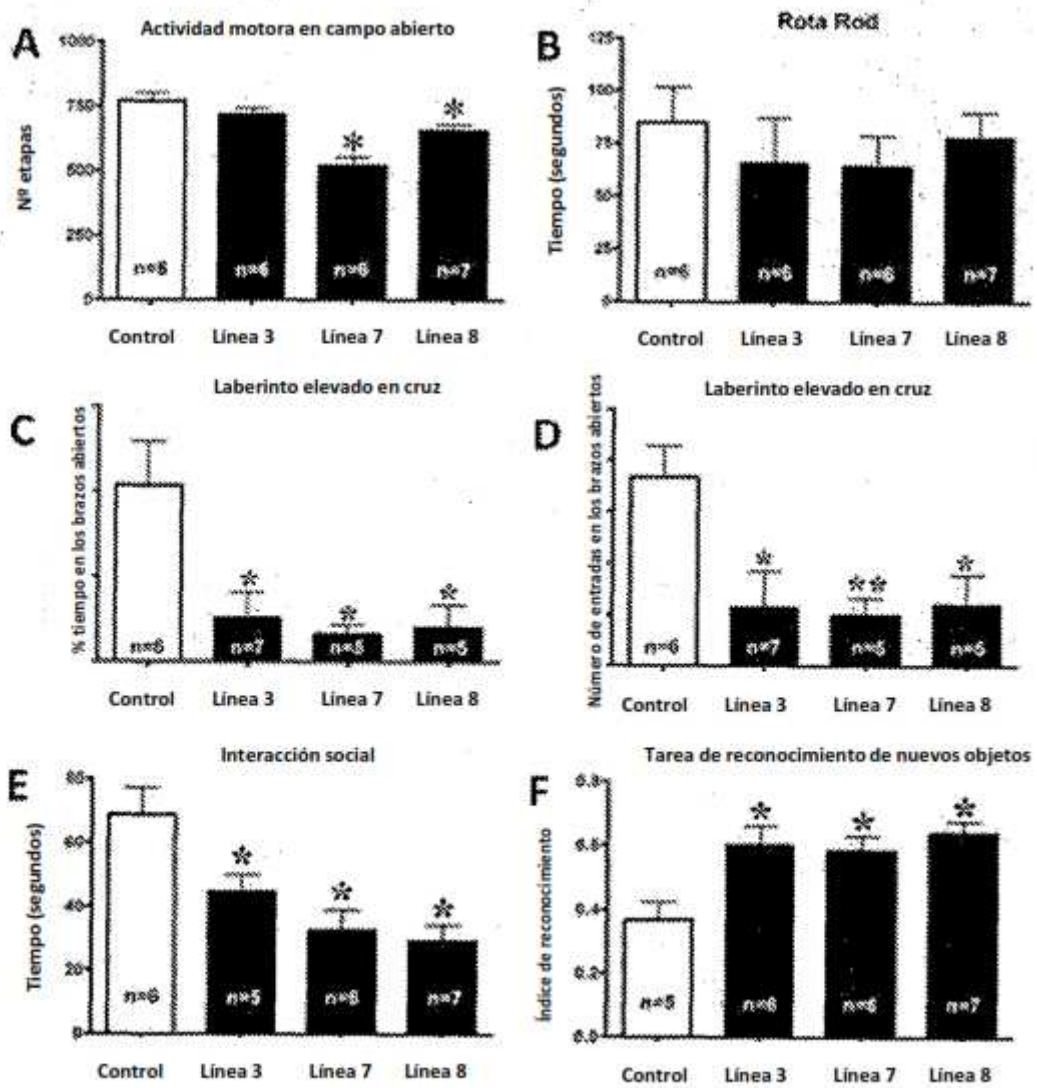


Figura 9

Figura 10A

```

1 gcggggcgcg cggcccgggg gaggcgacgg tgtcgcgggg ggagcatcgg agcccgaaga
61 ctcgaagaac gccatggccc ccattggcct caaggcgggtg gtcggagaga agatcatgca
121 tgatgtgac aagaagggtga agaagaaggg cgagtggag gtgctgggtg tggaccagtt
181 aagcatgagg atgctgtcct cctgctgcaa gatgacagac atcatgaccg agggcatcac
241 aattgtggag gatatcaaca agcgcggaga gccactcccc agcctggagg cogtgtacct
301 catcaccoca tctgagaagt ctgtccactc tctgatcagt gattttaagg acccgcggac
361 tgctaaatat cgggctgogc atgtgttctt cacagactcg tgtccagatg ccctatttaa
421 cgagctggta aaatcccag cagccaaagt catcaagacg ctgacggaaa tcaacattgc
481 gtttctcccc tatgagtccc aggtgtattc cctggactcc gctgactctt tccaaagctt
541 ctacagccct cacaaggogc agatgaagaa tccgatactg gaacgcctgg cagagcagat
601 cgcaaccctg tgtgccacc tgaaggagta tccagctgtg cggtatcggg gggagtacaa
661 ggacaatgcc ttgctggctc agctgatcca agacaagctg gatgcctata aagccgacga
721 tccaacaatg ggggagggtc ccgacaaggc acggtcccag ctccctgatcc tggatcgtgg
781 ctttgacccc agctcccctg tgctccatga actgacattc caggctatga gttatgacct
841 gctgcctatc gaaaatgatg tttacaagta tgagaccagc ggcattggag aggcgoggt
901 gaaggaggtg ctactggatg aggacgatga cctgtggatt gcgctgcgac acaagcacet
961 cgcagaggtg tcccaggaag tcaccoggtc tctgaaggac ttttctctta gcaagaggat
1021 gaacactggc gagaagacca ccctgcggga cctgtcccag atgctgaaga aatgccccca
1081 gtaccagaag gagctcagca agtattcgac tcacctgcac cttgctgaag actgcatgaa
1141 gcattaccaa ggcactgtag acaaaactctg ccgcgtggag caggacctgg caatgggcac
1201 agatgctgag ggggaaaaaa tcaaggacc cctgatgagcc atgtgccccca tctgctgga
1261 tgcgaacgtc agcacttacg acaaaatccg tatcatcctt ctctacatct tctgaagaa
1321 cggatcactc gaggagaacc taacaaaact catccagcac gctcagatac ccccagagga
1381 cagcgagatc atcaccaaca tggctcacct cggcgtgccc atcgtcacgg attccacact
1441 acgcccggca agcaaacggg agcggagga cgtatcagt gagggacact agcgaagaca agctggatac
1501 acgatggacc ccgatcatta aagacattat ggaggacact atcgaagaca ctgctgtgag
1561 aaagcactac ccatacatct ctaccogctc gtccgcgtcc ttcagcacca ctgctgtgag
1621 tgcccgtat ggacattggc acaagaataa ggccccggg gagtaccgca gcggtccccg
1681 cctcattatt ttcacocctg ggggtgtgag cctgaatgag atgcgctgtg ctacgaagt
1741 gaccagggcc aacggcaagt gggagtgtct gataggttct actcacattc tcaactcccac
1801 caaattcctc atggacctga gacccccga cttcagggag tctctaggg tatcttttga
1861 ggatcaggct ccaacaatgg agtgagacc aaagagacaa agatccacgc acattctcac
1921 cccacagaaa ctgctggaca cgctgaagaa gctgaataaa acagatgaag aaataagcag
1981 ttaaaaaata agctgcccc caaaaccccg gctcccttc caaaatgctc tgcagctccc
2041 cgtgcgcca cctcggttac tetgctgctt ccccagocct gcacgocctg gccaccccgt
2101 tgccgtgctg agttctctc ctgtgcgatg acaccccac ttgtcctctg aaaagcaaga
2161 gagtaatgtg ttgtttttta aaaatgagca tcttctgtat gtatcccaca gtaagttcac
2221 atgcaagctc cacactgcag aagcgtcaga actccggacc gagtgaattc tcccttattt
2281 atgacccogt gacctgtata tagcctgtc ccgcgtgtgc acattgcttg aataggaaa
2341 ggtagatgtg tgggtgtctc tccaagcttg gttggattca tttctgfctt tgttgggtt
2401 tgttccccgg ataggacatg ctgagggagt gatgttctcg ctagcccctg ctgctccct
2461 gttctcagcg atgagcagac acctctggag gctggcgtgg aacgagcctc ctctttgcac
2521 ctatggggga ggcttagggt gtccacagga agccagctct agtgccggcc agtgtggctt
2581 ccagagcctg gcactgcttt ccctgatctg tgtccatact gttgtaacaa gtttaagcctt
2641 tcaggctaaa tcagcctgct tagtgccctc ggagcctcca gagttaggtc tgaccagccc
2701 cctgctttaa cacagtttg atagaggcca agggtcagg gttggctgga agctgtgagt
2761 ttggcactct ggtcaagggt gctttgctgt aggagctagg cctgaagaat gggggccctg
2821 ctgcttagtc agagtccctc cagtttaaga tacttcatca atcttaagtt tgtgtagtt
2881 acagtcatgt gtcattgtgg ttgatgaaa aggatcattt tattctttgt attagtcatc
2941 actgtataaa acatagctag ctataaagca gaaattccag aagccgatgc tggaggatg
3001 gtctccacc ctaggacgca gcagcccct gagcatgctg ctaccctgtc tgtgtagtc
3061 gtgaacaaa gacagtggaa gtcacaaaaa tgtcccagc ccagtcctcg cccctcccctc
3121 ccgagattt gtacgtatta ctgtgtctcg tgctgtcttc gcaaacgtgg tgtacgctg
3181 ccgaggtgt cctgtgccc tctcccctcc tgactotaga gtctctcttc tcttagttc
3241 tcaggctct cccctgctcc tetccagtga accttttccc ttaggactga accacactag
3301 caccggttga tttcttctgt agcgtctct ccatcccttc ctccggtcaa gcaatgctca
3361 tgcttcagga tcttgtttgt cgaacatgt gggtttccct tatgttattt atataaataa
3421 tttctcaaat ggatatttaa aaaaaagcta gtctgtcttg aaacttgta acttgaact
3481 cttgaatctc agtgttttaa gtatggaagc acaaccgtgt accgctctgt accgctctgt

```


Figura 10B

3541 actgcagcat ttgagtctaa taaagacgtc agctctcaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
3601 aaaaaaaaaa aaaaaaa

Figura 11

MAPIGLKAVVGEKIMHDVIKKVKKKGWVKVLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGITIVEDINKRREPLPSLE
AVYLIITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSCPDALFNELVKSRAAKVIKTLTEINIAFLPYESQV
YSLDSADSFQSFYSPHKAQMKNPILERLAEQIATLCATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADD
PTMGEGPDKARSQLLILDGRGDPSSPVLHELTFQAMSYDLLPIENDVYKYETSGIGEARVKEVLLDEDDDLW
IALRHKHIAEVSQEVTRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQMLKKMPQYQKELSKYSTHLHLAEDCMKHYQG
TVDKLCRVEQDLAMGTDAEGEKIKDPMRAIVPILLDANVSTYDKIRIILLYIFLKNGITENLNKLIQHAQI
PPEDSEIITNMAHLGVPIVTDSTLRRRSKPERKERISEQTYQLSRWTPIIKDIMEDTIEDKLDTKHYPYIST
RSSASFSTTAVSARYGHWKKNKAPGEYRSGPRLIIFILGGVSLNEMRCAYEVTQANGKWEVLIGSTHILTPT
KFLMDLRHPDFRESSRVSFEDQAPTME

Figura 12A

1 ctgacgcgcg gctgcggggc ggagagctgc ggctggccca ggcgcgccac ctgaggaggc
 61 ggcgggggtcc gcaggcgtcg cgggacgagg agatcggagc cgggagactc ggcgagcgcc
 121 atggccccca ttggcctcaa agctgtttgc ggagagaaga ttatgcatga tgtgataaag
 181 aaggtcaaga agaaggggga atggaaggtg ctggtggtgg atcagttaag catgaggatg
 241 ctgtcctcct gctgcaagat gacagacatc atgaccgagg gcataacgat tgtggaagat
 301 atcaataagc gcagagagcc gctccccagc ctggaggctg tgtatctcat cactccatcc
 361 gagaagtccg tccactctct catcagtgc ttaaggacc cgcgcactgc taaataccgg
 421 gctgcacacg tcttcttcac tgactcttgt ccagatgccc tgtttaatga actggtaaaa
 481 tcccagcagc ccaaagtcat caaaactctg acggaaatca atattgcatt tctcccgtat
 541 gaatcccagg tctattcctt ggactctgct gactcttcc aaagcttcta cagtccccac
 601 aaggctcaga tgaagaatcc tatactggag cgctggcag agcagatcgc gaccctttgt
 661 gccaccctga aggagtaccc ggctgtgctg tatcgggggg aatacaagga caatgccttg
 721 ctggctcagc taatccagga caagctcgat gcctataaag ctgatgatcc aacaatgggg
 781 gagggcccag acaaggcacg ctcccagctc ctgatcctgg atcgaggctt tgaccccagc
 841 tcccctgtgc tccatgaatt gacttttcag gctatgagtt atgatctgct gcctatcgaa
 901 aatgatgtat acaagtatga gaccagcggc atcggggagg cacgggtgaa ggaggtgctc
 961 ctggacgagg acgacgacct gtggatagca ctgcgccaca agcacatcgc agaggtgtcc
 1021 caggaagtca cccggtctct gaaagatfff tcttctagca agagaatgaa tactggagag
 1081 aagaccacca tgcgggacct gtcccagatg ctgaagaaga tgcctcagta ccagaaagag
 1141 ctgagcaagt actccacca cctgcacctt gctgaggact gtatgaagca ttaccaaggc
 1201 accgtagaca aactctgccc agtggagcag gacctggcca tgggcacaga tgctgagggg
 1261 gagaagatca aggaccctat ggcagccatc gtccccattc tgctggatgc caatgtcagc
 1321 acttatgaca aaatccgcat catccttctc tacatctttt tgaagaatgg catcacggag
 1381 gaaaacctga acaaaactgat ccagcacgcc cagatacccc cggaggatag tgagatcatc
 1441 accaacatgg ctcaactcgg cgtgcccac gtcaccgatt ccaogctgcg tgcgggagc
 1501 aagccggagc ggaaggaacg catcagcag cagacctacc agctctcacg gtggactccg
 1561 attatcaagg acatcatgga ggacactatt gaggacaaac ttgacaccaa aactaccct
 1621 tatatctcta cccgttctct tgctccttc agcaccaccg ccgtcagcgc ccgctatggg
 1681 cactggcata agaacaaggc cccagggcag taccgcagtg gccccgcct catcattttc
 1741 atccttgggg gtgtgagcct gaatgagatg cgctgcgcct acgaggtgac ccaggccaac
 1801 ggaaagtggg aggtgctgat aggttctact cacattctta ctcccaccaa atttctcatg
 1861 gacctgagac accccgactt cagggagtcc tctagggtat cttttgagga tcaggctcca
 1921 acaatggagt gagagccaaa gaaacaaaga tccacacaca tctcaccctc acagaaactg
 1981 ctggacacac tgaagaaact gaataaaaca gatgaagaaa taagcagtta aaaaaataag
 2041 tgcgccctcc aaaacacgcc cccatcccac agcgcctccg agcttcccac caccgcccgc
 2101 ctgagttcct ttgcgtctgt tgctccccca gcctgcaag ccttggtgg cactggtgcc
 2161 gctgcattct cgtgttcagt gatgccctct tctgtttga aacaaaagaa aataatgat
 2221 tgtgtttttt aaaaagagta tcttatacat gtatcctaaa aagagaagct catgtgcaat
 2281 tgggtgcacag caggagaaat ttctggactg ttaggatgaa tggacgcctt ctcccgtta
 2341 ttaagatfff gtgaccttgt acataaccct gggtagcgtg cacattgctt gggtatggaa

Figura 12B

2401 cggtagaaat ttgggtgttt ttaaaacctt gtttgggggtt gttcctgtcc ttgttgagaa
 2461 tcatagagat gtctgtgttc ttggagtatt tcacactgag gactaatctg ctatcttcat
 2521 tccagtcctt acccctcagt gcctgtcttc atccaaataa cctgggaggt gacaatcagg
 2581 atatctcagg aggtccaagg tggaacagac ctctttgcct ttcccagcgt ctcatacccc
 2641 cggtagtgca gctgtgggtg gaggctgggg tgtctgcacg aagtcaggcc agcgtcctcc
 2701 tccacagcct gtcactgccc cctccccagc ctgtgtccac agtgctgtga tcccagagga
 2761 agtctctcag tctaagtcac agtgcctga cagggtgagaa gcaaaactccc gctggaagcc
 2821 tccatctctt tggaaaaaca gttagtctgg agcctgtggc ccaggcctt ctgtccccag
 2881 gcatcatccc aacagctcat tttccctagt ccgccttctg tcaagggtca ggaatggacc
 2941 agaacagatg ggttctggag gccctgaac agagggctat ggctgtggag aaggttcttg
 3001 gcccgttgga ctcacacaga cctgtaccc tctcggaag catcttcagt cagattatcc
 3061 tcagtttcag atacttcata ataccttggt ttgtgtgggg tcatacatca tcgtgtttgt
 3121 aagagaagat ggtcatttta ttctctgtat aaaacttagc tctaaagcag aaactaaagc
 3181 agcaaatgca ggaaggctgt ctgcctatcc tcaagactca gcagctctca ttctccagtg
 3241 gtgagcacac catttgtgct gctgtgttg tcgtgaaata taataacagt ggaagtcaca
 3301 aaaatgtccc ctgcccagcc ccctcgccgc ccttgacctc ctgcaggcca tgtgtgtatt
 3361 acttgtctag tgatgtctc tcaaagtgt gtacgcgagc tcggcgccac ctccgcctcc
 3421 ctttcagagc ctgtccccg ccctctctgc tcgctgcatt gtgggtttct cttctcaagg
 3481 ctttgaaatc tccccttga ctgagattag tcgtcagatc tctccccgtc tccctcccaa
 3541 cttatacgac ctgatttct taggacggaa ccgcaggcac ctgcgcggg cgtcttactc
 3601 ccgctgcttg ttctgtcccc tcctcggac caaacagtgc tcatgcttca ggaccttgtt
 3661 tgtcgaagat gttggttcc ctttctctgt tatttatata aaaataattt atcaaaagga
 3721 tattttaaaa aagctagtct gtcttgaac ttgtttacct taaaattatc agaatctcag
 3781 tgtttgaaag tactgaagca caaacatata tcatctctgt accattctgt actaaagcac
 3841 ttgagtctaa taaataaaga aatcagcacc cttccccggt gtccaggggg aaaaaaaaa

Figura 13

Uniprot P61764 (STXBP1_HUMAN)

10	20	30	40	50	60
MAPIGLKAVV	GEKIMHDVIK	KVKKKGWVKV	LVVDQLSMRM	LSSCCKMTDI	MTEGITIVED
70	80	90	100	110	120
INKRREPLPS	LEAVYLITPS	EKSVHSLISD	FKDPPTAKYR	AAHVFFTDSC	PDALFNELVK
130	140	150	160	170	180
SRAAKVIKTL	TEINIAFLPY	ESQVYSLDSA	DSFQSFYSPH	KAQMKNPILE	RLAEQIATLC
190	200	210	220	230	240
ATLKEYPAVR	YRGEYKDNAL	LAQLIQDKLD	AYKADDPTMG	EGPDKARSQI	LILDRGFDPS
250	260	270	280	290	300
SPVLHELTFQ	AMSYDLLPIE	NDVYKYETSG	IGEARVKEVL	LDEDDDLWIA	LRHKHIAEVS
310	320	330	340	350	360
QEVTRSLKDF	SSSKRMNTGE	KTTMRDLSQM	LKKMPQYQKE	LSKYSTHLHL	AEDCMKHYQG
370	380	390	400	410	420
TVDKLCRVEQ	DLAMGTDAEG	EKIKDPMRAI	VPILLDANVS	TYDKIRIILL	YIFLKNIGTE
430	440	450	460	470	480
ENLNKLIQHA	QIPPEDSEII	TNMAHLGVPI	VTDSTLRRRS	KPERKERISE	QTYQLSRWTP
490	500	510	520	530	540
IIKDIMEDI	EDKLOTKHYP	YISTRSSASF	STTAVSARYG	HWHKNKAPGE	YRSGPRLIIF
550	560	570	580	590	
ILGGVSLNEM	RCAYEVTQAN	GKWEVLIGST	HILTPQKLLD	TLKKLNKTDE	EISS

Figura 14A

```

1 gcgctgacag cggccggtgc gcgttgtctc cactgtgccc tgcaccccgc atctcgcatc
61 ggccaggcta cccgactcat cgcaaacgtc agtgctcacc atggggaagc ccacgagctc
121 gggatgtgac tggcgccgct tcctacggaa tcactggctg ctgctctcca ccgtggccgc
181 cgtggtacta ggaattgtct taggagtcgt ggttcgagga cacagtgagc tctcaaatct
241 ggataaattc tactttgctt ttctctggga aattctgatg aggatgctga agctggctat
301 ttgcccgtg atcgtatcca gcattgatcac aggtgtcgtc gcactggatt ccaatgtgtc
361 tgggaagatt ggtctgcgcg ctgtagtata ttatttctcc accaccgtca ttgctgtaat
421 cctaggtatt gtgttagttg tgaatataca gcctgggtgc actcagaaag tgaatgacat
481 caacaggacg ggtaaaacc ctagaacatc caccatggat gccatggtgg acctgatcag
541 gaacatgttc cctgagaatc tggccaagc ctgttttcag cagtacaaaa ccaagcggga
601 agaggtgaag cctgtgggag atcctggggg gaacgcaacg gagggtgtctg tcaccacagc
661 catgacaaca atgtctgaga acaagacaaa ggaatacaag atcgtgggcc tgtaactaga
721 cggcatcaat gtccctggct tctctgggga ctgcctctgc ttggccttg tcaattggaa
781 aatgggagaa aaggggcaga ttctgggtga ctcttcaat gccttgagtg acgccaccat
841 gaaaatcgtc cagatcatca tgtgtacat gccgattggc attttgttcc taattgctgg
901 gaagatcata gaagttgaag actgggaaat attccgcaag ctgggccttt acatggccac
961 tgtcctgagc gggcttgcaa tccactccct catagttctg cccctgctct atttcatagt
1021 tgtgcggaag aacccttcc gctttgcctt gggatggcg caggctctcc tgacagctct
1081 catgatctcg tccagttcgg caaccctgcc agttacattc cgctgtgctg aagaaaagaa
1141 ccaggtagac aagaggatca cgagatttgt cgtgcctgtt ggtgccacca tcaacatgga
1201 cggcactcgc ctctacgaag ctgtggcagc cgtgtttatt gcgcaactga atggcttggg
1261 cctaagcatt gggcagatcg tcaccatcag cattacagcc accgctgcca gcattggagc
1321 tgctggggtg ccccaggctg gcctgggtgac catggtgatc gtgctgagtg ctgtgggct
1381 gcctgccgag gacgtcacc tgatcattgc tgttgactgg ctctggacc ggttcaggac
1441 catggtgaac gtccctgggtg atgcgtttgg gacgggcac gttagagaagc tctcgaagaa
1501 ggagctggag cagatggatg tttcgtctga agtcaacatc gtgaaccctt ttgccctgga
1561 accacaacc ctcgataacg aagactcaga taccaagaag tcttatgtca atgggggctt
1621 cgcgttagac aaatctgaca ccatctcgtt cactcagacc tcacagttct agatgctga
1681 cctcagattg aggcctggga ttgtgaaggg cgtctccaca ggagccatct cctagcaaac
1741 tccgacatta aggaacgaga aggacactaa gagtcaactg tacatttagt ttgataaaca
1801 gacctccaga ttattttcta tatttgactt tatagccttg gttctctggg tttagggatt
1861 tggggtgaga tgaactgaaa ggaattaag aaagtgtgt tatctggatt ttctaattct
1921 atacaacaga gtttggaggt atatgaagta gtaactgta ggattaggtc atagatatgg
1981 aagagaaatt ggtttctcat gcatagacca gtgtttgggg ttttaaaaca atattattgg
2041 ctacaaattt ttactcaggc tttctatttg caggacttcc ttgaccttt tacttttata
2101 gattataatg catctcaaaa gccctaccca gttaatgtgc caaattttcc attttgacct
2161 catctccagc cactctcaaa ctaccctggg gcggggggag caaaaagat cagcatagtt
2221 ctgcaataac agtttaaaaga tagttgtggg gtttagggga agggaaaggg ttttttatt
2281 caatgtactg tattgagaca ctggtagctg acagccagtg ttcggtatag aactatatgt
2341 atatgtgtgt atatttatta ttttcatgta atttgcaaga cagagatcag taatgaacta
2401 tcaatgtgaa atacgcagct tccctgttac ttgaatcaaa acgatagctc cagcctaggt
2461 gtgagctcac cagaacactg tcaggcactc tgggatgaga aatcaagttg ctggcttact
2521 gtgattcaag ccctaaagca gaaacatatt atggtgaaac tctaagatga cacagccatt
2581 cacgtacaac atctagggtc aggcctcccg gagggggagg ctccctgoga gcattggaata
2641 agtacattta caaaggcact gtagagcag gaagtgtctc catagcaaca aaaggcttcg
2701 atcttcaagt agacttcaag acccacttca caaggctgtc acttttctgt tcttggtttt
2761 ctctgcctgc gccccacc cccagggcca aaccagcagt gacaagccac tgctgtttca
2821 aaacggggtg gcctaaattg aataagcctc attgcaaggt gaccaagcta tocttatact
2881 gtcgtctttt tattttatct tctggttttt ttattttta gtttttgaga cagcgcctct
2941 ctacatagcc ctggatatcc tggaaactcac tatgtagact agactggcct caaactcaca
3001 gagatcctcc tgccctctgcc tcttttagtgc tggcctgaaa ggtagglacc acctgcca
3061 gctctacact gtatttttac agaagaaaag ccaggccata agcgaactgtt accagcgtt
3121 caggacaact acttcagtc tccctggag aggattgttc tgggaatctc agccttgtgg
3181 cttagaatcc tctgcctgtc tttctctgtc taattcccga agatggctta taaaagtcta
3241 cacttctgtc ctcatcctgt aaataaaact caacaaaaac ttgttcttaa cttggagaca
3301 ggttcataac agccgtgttt ctgtagtgcc cttaagtcac cttaaaccog tgcttttata
3361 tttagaagc cagaaalct gccaagata gcaggaaggt aaccgaatgc tcagagttgg
3421 ccacgcccac ctgaaagcta ccgactgacc gtcacgggtg cocttgactc cgaacttga
3481 agtacaataa tctgtattct ttataggaag taaatctaaa tctaatgag gttgaaatgga

```

Figura 14B

```
3541 ttttttattt aggagtggat ggttctgtcc cttatcagg tggttctcct tagtggcagt
3601 gaattggcag agccgttcac aagatcattg gggtcatctt gtaaccagcc acttcacaca
3661 ctgtgctggt aactcaagat gatatgttcc acttccttct caataaacat ctccccact
3721 ctttctccc ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa
```


Figura 15A

1 tagtccaacc agagacagag cacactcacc attttcagag agaggggaagg ggctcaacct
 61 atgaagagaa aacaaaacaa aacaatgaca aacacagtcc tctttggatt cttctocctt
 121 tttatattgta gtaatgagg atgaacctac agctcgggtc atactagaaa aaaacctacc
 181 ctggagctat atccataccc attttctttt tgttttgaaa cagagctca ctaagttatc
 241 caaacagttc tgaatttgca atcctcctgc ctctatctgc caaggagctg ggggatagaa
 301 acttgcttgc accgctgtgt tgcgctgtct ttggaggttt aatcaaataa ataaaaatat
 361 atagccagct aatgtgtgtt gagtatggat tgctgtgat ggaggaataa gcacgctact
 421 atttcattct gacagccttt attcctgcag ttctgagaag ttggaaggag aaagttcact
 481 gaagttgtca atgctcacag atttctctaa caggegtctg gctctgtgtt ctctccccac
 541 caaggcttat ttaccacac tgatgcctta agcttcggga attcctccac gcctctgat
 601 ttctgtaac tgaatagagg cctggcaagg ctctatttag cactcacctc aaggtctcag
 661 agttgagtat ttctgcact gtaggcctt agaagacaga gcaaggcaag catttccct
 721 ttgtgactcc cactgtgcc ttaccagcat taggaaggcc ttagaatacc tgctagcagg
 781 gtactaagca gtctcaacat ttttctccca ttttatctat tcagaggcaa ccacaatgat
 841 caatgacaac aggacctgag atcaacagca gcagggtttt attttaaaag tatagaaaac
 901 aggttaaaac actgtaaac tcaaccagaa aaattaagga ctctgctagc tatttggtt
 961 gtttgtttgt ttgtttgttt gtttgttttt gtaataatgg ggtctgcaca caggaccaat
 1021 gctgctccat gctaggcaag ttgatcact gaactctatt tctagcactc ttctcgcttt
 1081 ttatgttgag ccacaatctt accaacttgc tccggctggc ctltgaactca ctttgtaac
 1141 cctacaagcc ctgaacttaa aattctctctg tcttggtctc cggaataggt ctgctcacc
 1201 atgccagttt gtattattac tgataacagt aaaatctgta aatgctgcat atactaaaca
 1261 ctccccaaac atccctcatt tagcctctgt ggcagatttt ctactaacc cggtttacct
 1321 aagaatcaag gaaggctggg ggaagttaag acattcctcc actggcctgg agagatgact
 1381 cagaggttaa gagcatttgc tgtcctttca gaggaccag attcaagtcc cagttccac
 1441 gtggcagctt agaatcatct gtaactccag ttccaagagc tctggcacc tctctgacc
 1501 tcagcaggca caaagcatgc ggttacagca catacaaat gcaggcaaga cattcattca
 1561 caataaatta gttttgtttt gattttttag gaactacttt tctccaaagt aaattgctgg
 1621 agtccattgc caggctatcc taaacaccag tggcagaaga cattttcata aagccccaa
 1681 tgatttctc aactgccttt ctaatcagct aaacaactaa gtctgacttc gcctcaagta
 1741 tattttacta ctctttgttt tagggtaagt tgggtgtctt agtagagcac tttgagttg
 1801 gttaaaaatt aacagttgca aatttagaaa cactgttacc ttaggcactg ccatcttaga
 1861 agcctaggag tcaggggat cctggacacc acaagaaaac aaccacagc atcaactaag
 1921 cagggtcat aggcctcac agaaactgaa gggctagca caggcctac gtgtgtctgt
 1981 gctaggttct ctgtgtatgt gttatggtt tgtagcttg tggcttgta gaagttgttt
 2041 tcttaggtaa atgttatttg tttaatattg gaataaaact aagaacctt tctggcctgg
 2101 gaagccatgt ttctgcccag gaacacagag cacctccagc agctgtctgc tttgaagctg
 2161 ctaagagctc gctcaggaag aagtgaagtc atccgttct atctatctc tatctataac
 2221 gatggcaciaa cggttcagta attttgccac aggacagcag aatgaaggg cgaagaaaa
 2281 ggcgagctgg caatcacttt atttcagttc acttcagtca aaccttgct cccattttt
 2341 tttttctag tgtgatttca cacaaagtga ctcatgaaaa ttgcacgat atgtggggag

Figura 15B

2401 attagcaata cggacttca gtgacactga ggccggcttc cattccatte cacttatatt
 2461 gacagctgaa cagctgcttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttctcc
 2521 cttcagggca aagaacacac acaagcgatg tgtttaaaaa gagatggttt gtatttaaac
 2581 tgccagagag aactgacacc accttagtt taggtagggg attccgcta gttactttt
 2641 gtcctaacat tggataaagc ccactgctct gagtcactaa ccacttcag ccaatcacag
 2701 acagaccaac acacccgcc gcagccaatt ttctgagccc tgccgtgctt taaccgcaga
 2761 accaatccga aggaccgct gtcactttc atccagctgg ttgtcgtgc cgcgcctcc
 2821 agattccgaa ggcgaagctc gcgaagcag