

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 340**

51 Int. Cl.:

C07K 14/005 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2008 E 08833887 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 2199391**

54 Título: **Factor implicado en la infección latente por herpesvirus, y su uso**

30 Prioridad:

27.09.2007 JP 2007250461

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

18.12.2015

73 Titular/es:

**JAPAN TOBACCO, INC. (50.0%)
2-1, TORANOMON 2-CHOME
MINATO-KU, TOKYO 105-8422, JP y
VIRUS IKAGAKU KENKYUSHO INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KONDO, KAZUHIRO y
KOBAYASHI, NOBUYUKI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 554 340 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

Factor implicado en la infección latente por herpesvirus, y su uso

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a: un factor implicado en la infección latente con un herpesvirus; y al uso del mismo. En particular, la presente invención se refiere a una nueva proteína que se expresa específicamente durante la infección latente con un herpesvirus; a un gen que codifica dicha proteína; y al uso de los mismos.

Técnica anterior

- 10 Los virus de la familia Herpesviridae, que tienen cada uno un tamaño total de aproximadamente 150 nm a 200 nm, son tales que una proteína núcleo está rodeado por ADN multi-hebra con masas moleculares de 80 a 150 x 10⁶ dalton. Este ADN multi-hebra está encerrado en una cápside icosaédrica que tiene un diámetro de aproximadamente 100 nm y está formada por 162 capsómeros, con el fin de formar una nucleocápside que está rodeada por una envoltura. Los virus del herpes se han encontrado en casi todos los mamíferos y anfibios. En particular, los virus de la familia Herpesviridae que tienen especificidad de anfitrión para los seres humanos se denominan herpesvirus humanos (HHV). Los HHV se clasifican en las subfamilias Alphaherpesvirinae (por ejemplo, virus del herpes simple y virus del herpes varicela-zoster), Betaherpesvirinae (p. ej., citomegalovirus), y Gammaherpesvirinae (p. ej., virus EB).

- 15 Estos virus del herpes se caracterizan por tener una fase de infección latente. La "infección latente" se refiere al estado de infección en el que un virus que ha infectado una célula anfitriona no produce viriones infecciosos dentro de la célula anfitriona, sino que continúa sobreviviendo. Incluso en esta fase de infección latente, los genes de virus y los productos génicos que ayudan a los genes del virus a existir son conservados dentro de la célula anfitriona. Los virus del herpes que presentan infección latente son conocidos por reanudar la producción de viriones y la replicación viral en una gran cantidad debido a ciertas causas definidas por el anfitrión (p. ej. envejecimiento y problemas somáticos (incluyendo fatiga)). Este estado se denomina "reactivación".

- 20 En resumen, los virus del herpes tienen el siguiente carácter único: Los virus del herpes siguen infectando al anfitrión de manera latente, siempre y cuando el anfitrión no tenga ninguna anomalía; sin embargo, una vez que se produce una alteración somática en el anfitrión y los virus detectan que el anfitrión está en peligro, los virus se reactivan para buscar otro anfitrión sano.

- 25 Para el estudio de la biología de estos virus de la familia Herpesviridae, es esencial la comprensión de su infección latente y de su reactivación. Sin embargo, entre los muchos virus de herpes, es solo el virus EB perteneciente a la subfamilia Gammaherpesvirinae el que ha sido estudiado hasta proporcionar muchas conclusiones acerca de la infección latente, y queda mucho por aclarar acerca de otros virus.

- 30 En particular, con respecto a los factores que pueden estar implicados en la infección latente de Betaherpesvirinae, no se ha obtenido ninguna otra información que no sean los hallazgos realizados previamente por los autores de la presente invención. Por ejemplo, el Documento No de Patente 1 describe la infección latente de HHV-6 en macrófagos de sangre periférica cuyos macrófagos se han diferenciado hasta un grado relativamente alto, e identifica los sitios de un anfitrión en cuyos sitios el anfitrión está infectado de forma latente con el HHV-6. El Documento No de Patente 2 describe la invasión muy frecuente de HHV-6 en un cerebro después de la infección primaria para causar la infección persistente y la infección latente. El Documento No de Patente 3 describe genes (genes de infección latente) que se expresan durante la infección latente de HHV-6, y sugiere que esos genes juegan un papel regulador de la infección latente y la reactivación del virus.

- 35 El Documento No de Patente 4 muestra que el estado de infección latente con HHV-6 implica una fase intermedia que es comparativamente estable y permite la expresión del gen activo, con el resultado de que un gen de infección latente y una proteína (proteína del gen de infección latente) codificada por este gen se expresan abundantemente. Es más, el Documento No de Patente 5 muestra que los pacientes con síndrome de fatiga crónica tenían en sus sueros anticuerpos contra las proteínas de los genes de infección latente que se expresan con un aumento de nivel en la fase intermedia.

Documento no de patente 1

Kondo. K et al. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages (J Gen Virol 72: 1401-1408, 1991)

Documento no de patente 2

- 40 Kondo. K et al. Association of human herpesvirus 6 infection of the central nervous system with recurrence of febril convulsions. (J Infect Dis 167: 1197-1200, 1993)

Documento no de patente 3

Kondo. K et al. Identification of human herpesvirus 6 latency-associated transcripts. (J Virol. 76: 4145-4151, 2002)

Documento no de patente 4

Kondo K et al. Recognition of a Novel Stage of Beta-Herpesvirus Latency in Human Herpesvirus 6. (J Virol.77: 2258-2264, 2003)

Documento no de patente 5

5 Kazuhiro Kondo, "Herpesvirus Kansen to Hiro (Herpesvirus latency and fatigue)", Virus, 2005, vol. 55, Núm. 1, páginas 9 a 18.

Reeves et al., ("Human Herpesviruses 6 and 7 in Chronic Fatigue Syndrome: A Case-Control Study", CLINICAL INFECTIOUS DISEASES, vol. 31, Núm. 1, Julio de 2000, páginas 48-52) estudian para determinar si la infección con herpesvirus humano (HHV) 6A, HHV-6B, o HHV-7 diferían entre pacientes con síndrome de fatiga crónica y sujetos de control. No se encontró evidencia de que la infección activa o latente con HHV-6A, HHV-6B, HHV-7, o cualquier combinación de estos tres HHV estuviera asociada con el síndrome de fatiga crónica.

Wallace et al., ("Human Herpesviruses in Chronic Fatigue Syndrome", CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY, vol. 6, Núm. 2, Marzo de 1999, páginas 216-223) llevaron a cabo un estudio doble ciego para evaluar la posible implicación de los herpesvirus humanos (HHV) HHV-6, HHV-7, virus Epstein-Barr (EBV) y citomegalovirus en pacientes con síndrome de fatiga crónica (SFC) en comparación con controles de edad, raza y género coincidentes. No se encontraron diferencias significativas entre los pacientes con SFC y de control.

Patnaik et al., ("Prevalence of IgM Antibodies to Human Herpesvirus 6 Early Antigen (p41/38) in Patients with Chronica Fatigue Syndrome", THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, vol. 172, Núm. 5, Noviembre de 1095, páginas 1364-1367) evaluaron la asociación entre herpesvirus humanos 6 (HHV-6) y el síndrome de fatiga crónica (SFC) en dos grupos separados geográficamente de pacientes con SFC y controles sanos. Los datos indicaron que más pacientes con SFC que controles tenían niveles elevados de IgM específica del antígeno temprano p41/38 de HHV-6, indicando quizás la replicación activa de HHV-6 en SFC.

Compendio de la invención

25 Sin embargo, no se ha identificado ningún gen de infección latente o proteína del gen de infección latente involucrados específicamente en enfermedades. Además, siguen sin conocerse sus funciones y su relación con un mecanismo patógeno del síndrome de fatiga crónica. Adicionalmente, hay una posibilidad de que HHV-6 esté implicado en otras enfermedades, además del síndrome de fatiga crónica.

30 Por lo tanto, existe una fuerte demanda para aclarar la relación entre la infección por HHV-6 y las enfermedades, y también para desarrollar una técnica que contribuya a establecer (i) un método de diagnóstico objetivo de las enfermedades y (ii) un modelo animal.

La presente invención se realizó en vista de los problemas anteriores, y un objeto de la presente invención es identificar un factor implicado en la infección latente con HHV-6 y proporcionar un uso del mismo.

35 Con el fin de resolver los problemas anteriores, los autores de la presente invención realizaron un estudio diligente. Como resultado, los autores de la presente invención llegaron a la siguiente idea única: A la luz de la naturaleza distintiva de HHV-6, es decir, la infección latente y la reactivación, la identificación de un factor implicado en la infección latente y la reactivación produciría un hallazgo acerca de la relación entre la infección por HHV-6 y los trastornos mentales. Basándose en esta idea, los autores de la presente invención llevaron a cabo complicadas, experiencias sofisticadas muchas veces. Como resultado, los autores de la presente invención identificaron: un nuevo gen expresado en la fase intermedia, en la que un gen específico para la infección latente con HHV-6 se expresa activamente; y una nueva proteína (Pequeña proteína codificada por el Transcrito Intermedio de HHV-6-1; SITH-1) codificada por el gen nuevo. Además, los autores de la presente invención llevaron a cabo un análisis funcional del nuevo gen y la proteína SITH-1, que está codificada por el nuevo gen, con el fin de realizar los siguientes nuevos hallazgos: (i) la proteína SITH-1 tiene capacidad para aumentar la concentración de calcio intracelular; y (ii) un anticuerpo contra la proteína SITH-1 se detecta de manera significativa en pacientes con trastornos del estado de ánimo, pero es difícilmente detectable en personas sanas. De ese modo, se completó la presente invención. La presente invención se completó basándose en los nuevos hallazgos anteriores, e incluye las siguientes invenciones:

50 1. Un método para diagnosticar un trastorno del estado de ánimo en donde el método comprende determinar la cantidad de un anticuerpo que se une específicamente a SITH-1 en una muestra biológica aislada de un sujeto humano, y en donde:

i. SITH-1 es

a. una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ de SEQ ID NO: 1;

b. una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos con una sustitución, delección, inserción, y/o adición de 10 o menos aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, teniendo la proteína

la actividad de incrementar la concentración de calcio intracelular o la actividad de unión al ligando de ciclofilina modulador de calcio;

c. una proteína codificada por un gen que comprende un marco de lectura abierto que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2; o

5 d. una proteína codificada por un gen que hibrida en condiciones rigurosas con ADN complementarioal ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2, teniendo la proteína la actividad de incrementar la concentración de calcio intracelular o la actividad de unión al ligando de ciclofilina modulador de calcio;

ii. la cantidad de anticuerpo determinada es mayor que la cantidad medida en una muestra biológica de un sujeto sano.

10 2. Un método para determinar si un sujeto mamífero no humano es útil o no como modelo de un trastorno del estado de ánimo, que comprende las etapas de:

(i) determinar la presencia de un anticuerpo que reconoce una SITH-1 como se define en la realización 1, en una muestra biológica aislada de un sujeto mamífero no humano, en donde el sujeto se obtiene mediante transferencia de un gen que codifica una SITH-1 como se define en la reivindicación 1; y

15 (ii) en donde el sujeto mamífero no humano es útil como modelo de un trastorno del estado de ánimo si se detecta un anticuerpo que reconoce una SITH-1 como se define en la realización 1.

3. Un método de escrutinio de sustancias candidato contra los trastornos del estado de ánimo que se corresponde con la presencia de anticuerpos específicos para SITH-1, que comprende las etapas de:

20 (a) administrar a un sujeto mamífero no humano, en donde el sujeto se obtiene mediante transferencia de un gen que codifica una SITH-1 como se define en la realización 1, una sustancia candidato; y

(b) determinar si la sustancia candidato es eficaz o no por medio de:

i. la detección de un anticuerpo contra SITH-1 como se define en la realización 1, y

ii. el ensayo con un método de diagnóstico que utiliza un trastorno del comportamiento o una respuesta de sobresalto en dicho mamífero no humano.

25 4. El uso de un kit para llevar a cabo un método de diagnóstico de acuerdo con la realización 1 o un método para determinar si un sujeto mamífero no humano es útil o no como modelo de un trastorno del estado de ánimo de acuerdo con la realización 2, en donde el kit comprende al menos uno seleccionado de:

a. una proteína SITH-1 como se define en la realización 1;

30 b. un péptido portador de epítipo que tiene al menos 6 aminoácidos que se une específicamente al anticuerpo contra la proteína SITH-1 como se define en la realización 1;

c. un aparato de detección al cual se inmoviliza la proteína del apartado (a) o el péptido portador de epítipo del apartado (b).

5. El método de la reialización 1, en donde el trastorno del estado de ánimo es la depresión causada por la enfermedad de Crohn.

35 Un gen o una proteína utilizados en la presente invención se expresan específicamente durante la infección latente con un herpesvirus, y tienen capacidad de regular la infección latente y la reactivación de un herpesvirus. Además, como se describe más adelante, se ha demostrado que un anticuerpo contra una proteína de la presente invención se encuentra de manera significativa en los pacientes con trastornos mentales. Por lo tanto, la determinación de la presencia o ausencia del anticuerpo permite el diagnóstico objetivo para los trastornos mentales.

40 Además, un gen o una proteína utilizados en la presente invención se pueden aplicar al diagnóstico de diversas enfermedades, así como al diagnóstico de las enfermedades descritas en la presente memoria. Por otra parte, un gen o una proteína de la presente invención también se encuentran disponibles para su uso en métodos de escrutinio de fármacos, en los métodos de producción de modelos animales, y en diversos tipos de kits, por ejemplo.

45 Para una comprensión más completa de la naturaleza y las ventajas de la invención, debe hacerse referencia a la siguiente descripción detallada tomada junto con los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

Fig.1

La Fig. 1 es un diagrama que muestra esquemáticamente una estructura de un gen específico de la infección

latente y las posiciones de los cebadores analíticos.

Fig.2

La Fig. 2 es un diagrama que muestra los resultados de la amplificación realizada por la técnica de PCR con respecto a los productos génicos de HHV-6.

5

Fig.3

La Fig. 3 es un diagrama que muestra los resultados del análisis realizado mediante la técnica de RACE con respecto a nuevos ARNm de genes específicos de la infección latente.

Fig.4

10

La Fig. 4 es un diagrama que muestra los resultados de un experimento en el que se identificó una proteína del anfitrión que se une a la proteína SITH-1 por medio del análisis de dos híbridos de levadura.

Fig.5

La Fig. 5 es un diagrama que muestra que una proteína SITH-1 aumentaba la cantidad de CAML en una línea de células gliales de tipo astrocito.

Fig.6

15

La Fig. 6 es un diagrama que muestra cómo SITH-1 aumentaba la concentración de calcio en las células gliales.

Fig.7

La Fig. 7 es un gráfico que muestra los títulos de anticuerpos para SITH-1 en pacientes con trastornos mentales.

20

Fig.8

La Fig. 8 es un gráfico que muestra el resultado de una investigación del efecto de SITH-1 en un ensayo de suspensión por la cola.

Fig.9

25

La Fig. 9 es un gráfico que muestra el resultado de una investigación del efecto de SITH-1 en un ensayo de natación forzada.

Fig.10

La Fig. 10 es un gráfico que muestra el resultado de una investigación del efecto de SITH-1 en términos de respuesta de sobresalto (inhibición de prepulso).

Fig.11

30

La Fig. 11 es un gráfico que muestra el resultado de un experimento en el que se expresó SITH-1 en células gliales de ratón utilizando un vector de adenovirus y, tres semanas más tarde, se midió la actividad motora de los animales en la actividad en la rueda giratoria.

Fig.12

35

La Fig. 12 es un gráfico que muestra el resultado de un experimento en el que se expresó SITH-1 en las células gliales de ratón utilizando un vector de lentivirus y, ocho semanas más tarde, se midió la actividad motora de los animales en la actividad en la rueda giratoria.

Fig.13

La Fig. 13 es un gráfico que muestra los resultados del diagnóstico, utilizando SITH-1 como marcador, de diversas enfermedades que están complicadas con depresión.

40 Descripción de las realizaciones

A continuación se describen varios aspectos relacionados con la presente invención. Solamente aquellas realizaciones que están abarcadas por las reivindicaciones son parte de la invención. Todos los demás aspectos se incluyen con el fin de facilitar la comprensión de la invención solamente.

En primer lugar, para ayudar a la comprensión de la presente invención, se describirá brevemente cómo

completaron la presente invención los autores de la presente invención. Los autores de la presente invención dedujeron que la infección con HHV-6 entre los diversos tipos de virus de herpes humanos era más probablemente una causa de trastornos mentales, concretamente los acompañados de trastornos del estado de ánimo. Las razones incluyen: (i) entre los síntomas del síndrome de fatiga crónica (SFC) para los cuales se ha mantenido hasta ahora HHV-6 como una de las causas, se reconocen los síntomas depresivos y otros que se encuentran a menudo en los trastornos mentales; (ii) HHV-6 causa una infección latente en el cerebro; y (iii) se detectaron un anticuerpo reactivo con la proteína del gen específico de la infección latente por HHV-6 identificado hasta ahora, así como un anticuerpo reactivo con una proteína desconocida que se expresaba en las células infectadas de forma latente con HHV-6, pero que aún tenía que ser identificada por un gen o por sí misma con alta frecuencia en los sueros de los pacientes con SFC.

Además, a la luz del hecho de que los sitios primarios en el cerebro que estaban infectados de manera latente con HHV-6 incluían un lóbulo frontal y una región del hipocampo, cada uno de los cuales rige pensamientos y emociones humanas, así como el hecho de que los virus que causan la infección latente en un cerebro son solo unos pocos que incluyen HHV-6, los autores de la presente invención dedujeron la relación entre HHV-6 y los trastornos mentales. Además, se sabe que HHV-6 causa la infección latente en las células gliales (p. ej., astrocitos) que desempeñan papeles importantes en el metabolismo de sustancias dentro del cerebro (p. ej., serotonina) que están asociadas con la depresión. También en estos términos, los autores de la presente invención llegaron a la idea única de que HHV-6 podría estar asociado con trastornos mentales, tales como trastornos del estado de ánimo.

Por lo tanto, los autores de la presente invención dedujeron que los pacientes con SFC pueden incluir casos considerables que se presentan con síntomas psiquiátricos a causa de la infección latente del cerebro con HHV-6. En particular, los autores de la presente invención dedujeron la relación entre HHV-6 y trastornos del estado de ánimo tales como la depresión y la enfermedad maniaco-depresiva.

Los trastornos del estado de ánimo son síntomas que se encuentran en trastornos mentales tales como la depresión y la enfermedad maniaco-depresiva, y dos ejemplos muy típicos son la depresión que se presenta solamente con síntomas de depresión y la enfermedad maniaco-depresiva en la que los episodios de manía se alternan con episodios de depresión. Aunque se han propuesto varias causas posibles, incluyendo el estrés, las aberraciones genéticas, y la infección, no se ha establecido un único factor. La incidencia de los trastornos del estado de ánimo está aumentando en estos días, y esto se está convirtiendo en un gran problema social. Por lo tanto, es deseable que la etiología y patología de cada trastorno del estado de ánimo sean desentrañadas y que se desarrollen métodos para el diagnóstico y el tratamiento tan pronto como sea posible. Un problema que merece una mención especial aquí es que el diagnóstico de los trastornos del estado de ánimo es susceptible de ser únicamente cualitativo, e implica dificultades para lograr la objetividad. Además, no se han desarrollado adecuadamente modelos animales que contribuyan a los estudios de los trastornos del estado de ánimo y el desarrollo de métodos para el tratamiento de los mismos. Esto dificulta la clarificación de la etiología y el desarrollo de los métodos de tratamiento.

Por esta razón, los autores de la presente invención pensaron que había que dejar clara la relación entre (i) la infección por HHV-6 y (ii) los trastornos del estado de ánimo y los trastornos mentales, y desarrollar una técnica que contribuya a establecer modelos de diagnóstico y animales objetivos para los trastornos del estado de ánimo y los trastornos mentales.

Huelga decir que estas deducciones son las únicas a las que llegaron los autores de la presente invención como resultado de un estudio diligente realizado en este campo de investigación durante mucho tiempo, y no pueden ser fácilmente alcanzadas en general, por un experto en la técnica.

A continuación se describen detalles de una proteína, un gen, y otros utilizados en la presente invención en orden.

(1) Proteína y gen utilizados en la presente invención

(1-1) Estructura

La presente invención proporciona un factor que está implicado en la infección latente con un virus del herpes. En mayor detalle, la presente invención proporciona (i) una proteína que se expresa específicamente durante la infección latente con un virus del herpes y (ii) un gen que codifica la proteína. La frase "se expresa específicamente durante la infección latente con un virus del herpes" significa que un gen derivado de un virus del herpes o un producto génico del mismo se expresa específicamente en un anfitrión infectado por virus, mientras que el anfitrión está infectado de forma latente (pero no infectado productivamente) con el virus del herpes.

La proteína y el gen pueden ser, por ejemplo, (a) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 1 y un gen que codifica la proteína.

Como se describirá más adelante en el Ejemplo, la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 1 se aísla e identifica como una proteína que se expresa específicamente durante la infección latente con virus del herpes 6 humano (HHV-6). Esta proteína se denomina en lo sucesivo "Pequeña proteína codificada por el Transcrito Intermedio de HHV-6 -1 (proteína SITH-1)". La proteína SITH-1 es una proteína que tiene una masa molecular de aproximadamente 17,5 kDa, la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 1, y 159

aminoácidos.

La proteína SITH-1 está codificada por un gen SITH-1. Como se muestra en el SEQ ID NO: 3, el ADNc del gen SITH-1 tiene un tamaño de 1795 pares de bases (aproximadamente 1,79 kpb). Además, la secuencia de nucleótidos desde el 954^o al 956^o representa un codón de inicio (ATG Kozak), mientras la secuencia de nucleótidos desde el 1431^o al 1433^o representa un codón de parada (TAA). Por lo tanto, el gen SITH-1 tiene un marco de lectura abierto (ORF) que tiene la secuencia de nucleótidos desde el 954^o al 1430^o de la secuencia de nucleótidos mostrada en el SEQ ID NO: 3, con un ORF que tiene un tamaño de 477 pares de bases (aproximadamente 0,48 kpb). La secuencia de nucleótidos que representa la región ORF del ADNc de SITH-1 se muestra en el SEQ ID NO: 2. Obsérvese que la secuencia de nucleótidos mostrada en el SEQ ID NO: 2 incluye tres bases del codón de parada.

10 La proteína utilizada en la presente invención puede ser, por ejemplo, (b) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con una sustitución, delección, inserción y/o adición de 10 o menos aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 1, expresándose la proteína específicamente durante la infección latente con un virus del herpes. El gen utilizado en la presente invención puede ser, por ejemplo, un gen que codifica esta proteína.

15 La frase "con una sustitución, delección, inserción y/o adición de uno o varios aminoácidos" significa la sustitución, delección, inserción y/o adición de numerosos aminoácidos, es decir 10 o menos aminoácidos que puede ser ocasionada por un método de producción de péptidos mutantes conocido, tal como la mutagénesis dirigida al sitio. Por lo tanto, la proteína (b) se puede describir como una proteína mutante de la proteína (a). Obsérvese que el "mutante" en la presente memoria se refiere principalmente a un mutante elaborado mediante la introducción artificial por medio de un método de producción de proteínas mutantes conocido, o puede ser uno obtenido por aislamiento y purificación de una proteína mutante similar, existente en la naturaleza.

25 Alternativamente, el gen utilizado en la presente invención puede ser, por ejemplo, un gen que codifica (c) una proteína que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con el ADN que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria al ADN que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en el SEQ ID NO: 2, expresándose la proteína específicamente durante la infección latente con un virus del herpes.

La frase "hibrida en condiciones de hibridación rigurosas" significa que la hibridación se produce solo en un caso en el que las secuencias de nucleótidos de interés tienen una identidad de al menos 90%, preferiblemente una identidad de al menos 95%, más preferiblemente una identidad de al menos 97%. Como ejemplo específico de las "condiciones de hibridación rigurosas", son posibles las siguientes condiciones: Se incubaba un filtro de hibridación durante la noche a 42°C en una solución de hibridación (incluyendo formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10%, y 20 µg/ml de ADN de esperma de salmón sometido a cizalla, desnaturalizado), seguido de lavado en 0,1 x SSC a aproximadamente 65°C. Además, la hibridación se puede realizar mediante un método conocido convencionalmente, por ejemplo, de acuerdo con los procedimientos descritos en "J. Sambrook et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1989)", y no está limitado a ninguno específico. Generalmente, a medida que aumenta la temperatura y la concentración de sal se hace más baja, el nivel de rigurosidad aumenta (es decir, es más difícil la hibridación).

Obsérvese que el término "gen" se utiliza en la presente memoria indistintamente con "polinucleótido", "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico". "Polinucleótido" se refiere a un polímero de nucleótidos. Por lo tanto, el término "gen" en la presente memoria incluye no solo ADN de doble hebra, sino también ADN de hebra sencilla (p. ej., una hebra efectora y una hebra antisentido que constituyen el ADN de doble hebra) y ARN (p. ej., ARNm). La hebra antisentido puede ser utilizada como una sonda o un fármaco antisentido. El término "ADN" incluye, p. ej., (i) ADNc obtenido por clonación, una técnica de síntesis química, o una combinación de las mismas y (ii) un ADN genómico. Es decir, el "ADN" puede ser un ADN "genómico" que incluye una secuencia no codificante (p. ej., intrón), cuyo ADN genómico es una forma contenida en los genomas animales. Alternativamente, el "ADN" puede ser ADNc obtenido a partir de ARNm mediante el uso de la transcriptasa inversa o la polimerasa, es decir, ADN "transcripcional" incluyendo una secuencia no codificante (p. ej., intrón). Adicionalmente, el gen utilizado en la presente invención puede ser uno que tenga no solo una secuencia que codifica el aminoácido descrito en relación con los apartados (a) o (b) anteriores, sino también una secuencia de una región no traducida (UTR) y/o una secuencia de vector (incluyendo una secuencia de un vector de expresión). Adicionalmente, el ARNm o el ADNc pueden incluir, en un extremo y/o en el interior de su región traducida, un polinucleótido deseado, tal como una secuencia reguladora o una secuencia de ácido poliadenílico. Además, en un caso en el que la proteína utilizada en la presente invención puede ser codificada por una pluralidad de alelos, el término "ácido nucleico" abarca todos los alelos, sus transcritos, y el ADNc. Obsérvese que el término "ácido nucleico" en la presente memoria incluye un polinucleótido que incluye los nucleótidos deseados simples y/o nucleótidos modificados, cuyos ejemplos abarcan ADNc, ARNm, ARN total, y ARNhn. El término "nucleótidos modificados" abarca: ésteres de fosfato tales como inosina, acetilcitosina, metilcitosina, metiladenosina y metilguanosa; y los nucleótidos que se pueden conseguir por un efecto de los rayos ultravioleta o de sustancias químicas.

60 El término "secuencia de nucleótidos" se usa de manera indistinta con "secuencia de ácido nucleico", y se presenta como una secuencia de desoxirribonucleótidos (abreviados cada uno como A, G, C, o T). Adicionalmente, se

pretende que un polinucleótido o una "secuencia de nucleótidos" de un polinucleótido signifiquen (i) una secuencia de desoxirribonucleótidos para una molécula de ADN o un polinucleótido y (ii) una secuencia de ribonucleótidos (A, G, C y U) (cada timidina (T), que es un desoxinucleótido, en la secuencia de desoxinucleótidos especificada en la presente memoria se sustituye por uridina (U), que es un ribonucleótido) para una molécula de ARN o un polinucleótido.

Por ejemplo, se pretende que una molécula de ARN que tiene la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 2 o 4, que está representada por las abreviaturas de desoxirribonucleótidos, signifique una molécula de ARN que tiene una secuencia en la que los desoxinucleótidos A, G, y C mostrados en el SEQ ID NO: 2 o 4 están sustituidos por sus correspondientes ribonucleótidos A, G, y C, y el desoxinucleótido T mostrado en el SEQ ID NO: 2 o 4 está sustituido por el ribonucleótido U. Adicionalmente, se pretende que un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en el SEQ ID NO: 2 o 4 o un fragmento del polinucleótido signifique un polinucleótido que tiene una secuencia representada por los desoxinucleótidos A, G, C y/o T que se muestran en el SEQ ID NO: 2 o 4 o un fragmento del polinucleótido.

Un fragmento (secuencia parcial) del gen utilizado en la presente invención se puede utilizar como cebador para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o como sonda de hibridación. El fragmento (polinucleótido) está disponible en la amplificación por PCR específica de un homólogo o un ortólogo del gen utilizado en la presente invención, y también está disponible como una sonda de hibridación que hibrida específicamente con un homólogo o un ortólogo del gen utilizado en la presente invención. Es decir, en una realización preferible, el fragmento del gen utilizado en la presente invención es útil para el diagnóstico (i) como cebador para la amplificación de una secuencia diana realizada por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o (ii) como sonda de acuerdo con una técnica de hibridación de ADN convencional.

Adicionalmente, otros ejemplos de uso del fragmento del gen utilizado en la presente invención abarcan: la hibridación *in situ* (por ejemplo, FISH) con respecto a una propagación del cromosoma mitótico, por medio de la cual se muestra la hibridación *in situ* de un sitio del cromosoma correcto (descrito en Verma et al., Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, Nueva York (1988)); y el análisis de transferencia Northern para la detección de ARNm de la presente invención expresado en un determinado tejido.

Los ejemplos del gen utilizado en la presente invención abarcan, pero no se limitan a: un polinucleótido que codifica por sí mismo una secuencia de aminoácidos de una proteína de maduración; una secuencia codificante de una proteína de maduración y su ulterior secuencia (p. ej., una secuencia que codifica una secuencia líder) (p. ej., una secuencia de preproteína, una secuencia de proproteína o una secuencia de preproproteína); un intrón, una secuencia no codificante 5' y una secuencia no codificante 3' (p. ej., una región no traducida de transcripción que funciona en la transcripción y el procesamiento del ARNm (incluyendo corte y empalme y una señal de poliadenilación)); y una secuencia codificante adicional que codifica otro aminoácido proporcionando una funcionalidad adicional.

Por lo tanto, por ejemplo, una secuencia que codifica una proteína se puede fusionar con una secuencia marcadora (p. ej., una secuencia que codifica un péptido que facilita la purificación de una proteína fusionada). En una realización preferible utilizada en la presente invención, una secuencia de aminoácidos marcadora puede ser un péptido de hexa-histidina, tal como una etiqueta proporcionada en el vector pQE (Qiagen, Inc.). Como se describe en "Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-824 (1989)", el péptido de hexa-histidina es útil en la purificación de una proteína de fusión de una manera simple. Alternativamente, se puede utilizar una secuencia de aminoácidos marcadora disponible públicamente y/o comercialmente de muchos tipos. Por ejemplo, como se describe en "Wilson et al., Cell 37: 767 (1984)", una etiqueta de "HA" es otro péptido útil en la purificación, cuya etiqueta de HA corresponde a un epítipo derivado de una proteína de hemaglutinina de influenza (HA). También resultaría útil alternativamente para la purificación, una proteína de fusión elaborada haciendo que un Fc se fusione con el extremo N-terminal o C-terminal de la proteína utilizada en la presente invención.

Adicionalmente, se describe un mutante del gen utilizado en presente invención. El mutante puede existir naturalmente, como un alelo mutante natural. Se pretende que "alelo mutante" signifique una de algunas formas intercambiables de un gen que ocupa un locus del gen predeterminado en un cromosoma de un organismo. Adicionalmente, se puede producir un mutante de origen no natural utilizando, p. ej., un mecanismo de mutagénesis conocido en la técnica. Los ejemplos de semejante mutante abarcan un mutante producido por una sustitución, delección, o adición de uno o varios nucleótidos, tal como se ha descrito anteriormente conduciendo a una proteína como se ha definido anteriormente y con las limitaciones de las reivindicaciones. La sustitución, delección, o adición pueden producirse en uno o más nucleótidos. El mutante puede incluir una mutación producida en una región codificante, una región no codificante o ambas. La mutación en una región codificante puede causar una sustitución, delección, o adición conservativa o no conservativa de un aminoácido.

Además de la proteína de maduración, los ejemplos de una proteína preferible utilizada en la presente invención abarcan: un dominio extracelular, un dominio transmembrana, un dominio intracelular, y una proteína que carece de la totalidad o parte de un dominio transmembrana, pero incluye dominios extracelulares e intracelulares. El término "proteína" se utiliza indistintamente en la presente memoria con "polipéptido" o "péptido". Adicionalmente, se describe un polipéptido con una sustitución, adición y/o delección de uno o varios aminoácidos de una proteína

codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en el SEQ ID NO: 2. Se prefiere una sustitución, delección, y/o adición conservativa o no conservativa de uno o varios aminoácidos, y es particularmente preferida una sustitución, adición y/o delección silenciosa de los mismos. Éstas no cambian las características y la actividad de la proteína utilizada en la presente invención o de parte de la proteína. En cuanto a este punto, es particularmente preferible una sustitución conservativa.

Adicionalmente, la proteína utilizada en la presente invención puede ser no solamente aquella aislada de fuentes naturales, sino también aquella sintetizada químicamente u obtenida por recombinación. Es decir, la proteína utilizada en la presente invención se puede aislar y purificar a partir p. ej., de células o tejidos. Alternativamente, la proteína utilizada en la presente invención se puede expresar intracelularmente por estar codificada por un gen que ha sido transferido a la célula anfitriona. Adicionalmente, la proteína utilizada en la presente invención puede incluir un polipéptido adicional.

La presente invención se refiere a un polipéptido no reivindicado per se que tiene una secuencia de aminoácidos de una parte portadora de un epítipo de la proteína descrita en la presente memoria. El polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la parte portadora del epítipo de la proteína utilizada en la presente invención solo tiene que incluir parte de un polipéptido, cuya parte incluye al menos 6, 7, 8, 9 ó 10 aminoácidos. Adicionalmente, semejante polipéptido también puede ser un polipéptido de la parte portadora del epítipo que tiene una longitud (opcionalmente fijada) igual o más corta que la longitud de una secuencia completa de aminoácidos de (i) una proteína codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en el SEQ ID NO: 2 ó 4 o (ii) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 1.

En otras palabras, la presente descripción ilustra un péptido portador del epítipo de la proteína utilizada en la presente invención. Como se describe en el Ejemplo descrito más adelante, la proteína utilizada en la presente invención es inmunogénica. Por lo tanto, es posible identificar, en la proteína utilizada en la presente invención, una parte del epítipo que induce una respuesta de anticuerpos, de acuerdo con un método conocido en la técnica. Por ejemplo, Geysen, H. M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3998-4002 (1984) describen un procedimiento de una síntesis rápida concurrente sobre soportes sólidos de cientos de péptidos que tienen una pureza suficiente para reaccionar en un ensayo de inmunoabsorción con enzima ligada. La interacción de los péptidos sintetizados con anticuerpos es fácilmente detectada a continuación sin separarlos de los soportes. De esta manera, un péptido que porta un epítipo inmunogénico de una proteína deseada puede ser identificado de forma rutinaria por un experto en la técnica. Por ejemplo, un epítipo inmunológicamente importante en una proteína de la cubierta del virus de la fiebre aftosa fue localizado por Geysen et al. con la resolución de siete aminoácidos mediante la síntesis de un conjunto solapante de todos los 208 posibles hexapéptidos que abarcan una secuencia de 213 aminoácidos completa de una proteína. A continuación, se sintetizó un conjunto de péptidos de reemplazo completo en el que se sustituyeron a su vez los 20 aminoácidos de cada posición dentro del epítipo, y se determinaron los aminoácidos concretos que conferirían especificidad para una reacción con un anticuerpo. Por lo tanto, se puede elaborar de forma rutinaria un análogo peptídico del péptido portador de epítipo utilizado en la presente invención por medio de este método. La Patente de los Estados Unidos Núm. 4.708.781, de Geysen (1987) describe más detalles de este método por medio del cual se identifica un péptido que porta un epítipo inmunogénico de una proteína deseada.

El "epítipo inmunogénico" se define como parte de una proteína cuya parte induce una respuesta de anticuerpos, en un caso en el que la totalidad de la proteína es un inmunógeno. Se considera que los epítipos inmunogénicos están limitados a dos o más regiones en una molécula. Por otro lado, un sitio de una molécula de proteína a cuyo sitio puede unirse un anticuerpo se define como "epítipo antigénico". Generalmente, en una proteína, el número de epítipos inmunogénicos es menor que el de los epítipos antigénicos. Por ejemplo, véase Geysen, H. M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3998-4002 (1984).

Un péptido portador de un epítipo antigénico utilizado en la presente invención es útil para la inducción de anticuerpos incluyendo un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la proteína utilizada en la presente invención. Por lo tanto, la mayoría de los híbridos obtenidos mediante fusión de células de bazo obtenidas de un donante inmunizado con el péptido portador de epítipo antigénico segregan anticuerpos generalmente reactivos con las proteínas naturales. Los anticuerpos inducidos por el péptido portador de epítipo antigénico son útiles para detectar proteínas simuladas, y los anticuerpos contra diferentes péptidos se pueden utilizar para el seguimiento del destino de diversas regiones de un precursor de proteína que se someten a procesamiento post-traduccional. Se pueden utilizar un péptido y un anticuerpo anti-péptido en una variedad de análisis cualitativos o cuantitativos para las proteínas simuladas (p. ej., en análisis de competición), ya que se ha demostrado que, en análisis de inmunoprecipitación, incluso los péptidos cortos (p. ej., aproximadamente 9 aminoácidos) pueden unirse y sustituir péptidos más largos. Por ejemplo, véase Wilson, I. A. et al., Cell 37: 767-778 (1984) 777. Un anticuerpo anti-proteína de la presente invención también es útil para la purificación de las proteínas simuladas (p. ej., mediante cromatografía de adsorción utilizando un método conocido en la técnica).

El péptido portador del epítipo antigénico utilizado en la presente invención diseñado de acuerdo con la directriz anterior incluye preferiblemente una secuencia de al menos siete, más preferiblemente al menos nueve, muy preferiblemente entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 aminoácidos incluidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína utilizada en la presente invención. Sin embargo, un péptido o un polipéptido que incluye una porción más grande de la secuencia de aminoácidos de la proteína utilizada en la presente invención, que

contiene de aproximadamente 30 a aproximadamente 50 aminoácidos, o cualquier longitud hasta e incluyendo la secuencia entera de aminoácidos de la proteína utilizada en la presente invención, también se consideran el péptido portador de epítipo utilizado en la presente invención, y también son útiles para inducir anticuerpos que reaccionan con una proteína simulada. Preferiblemente, se selecciona una secuencia de aminoácidos del péptido portador de epítipo de manera que pueda proporcionar una solubilidad sustancial en un disolvente acuoso (es decir, la secuencia seleccionada contiene un residuo relativamente hidrófilo, y preferiblemente se evita una secuencia altamente hidrófoba); y es particularmente preferible una secuencia que contiene un residuo de prolina.

El péptido portador del epítipo utilizado en la presente invención puede ser producido mediante la producción de proteínas recombinantes convencionales deseadas que emplea el gen utilizado en la presente invención. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos corta portadora de epítipo se puede fusionar con un polipéptido más grande que actúa como un portador, durante la producción y la purificación de un recombinante y la inmunización para la producción de un anticuerpo anti-proteína. El péptido portador del epítipo también se puede sintetizar mediante el uso de un método conocido para una síntesis química.

Adicionalmente, la presente descripción ilustra una proteína que va a ser expresada (pero no reivindicada per se) en cuya proteína se ha incorporado una señal secretora apropiada, para la secreción de una proteína traducida en el interior de un lumen de un retículo endoplásmico, en el interior de un espacio periplásmico, o en un entorno extracelular. La señal de secreción puede ser endógena con respecto a un polipéptido, o puede ser una señal heterogénea.

Por lo tanto, la proteína utilizada en la presente invención se puede expresar en una forma modificada tal como una proteína de fusión, y puede incluir no solo la señal de secreción, sino también una región funcional heterogénea adicional. Por ejemplo, se puede añadir un aminoácido adicional, concretamente, una región de un aminoácido con carga eléctrica al extremo N-terminal de una proteína para la mejora de la estabilidad y la durabilidad en las células anfitrionas durante la purificación o la manipulación y el almacenamiento posteriores. Adicionalmente, se puede añadir una parte del péptido a una proteína para facilitar la purificación. Tal región se puede separar antes de una preparación final de la proteína. En particular, la adición de una parte del péptido a una proteína con el propósito de causar la secreción o la excreción, mejorar la estabilidad y facilitar la purificación es bien conocida en la técnica, y es un mecanismo realizado de forma rutinaria.

Una proteína de fusión preferible incluye una región heterogénea derivada de inmunoglobulina, cuya región heterogénea es útil para elaborar una proteína soluble. Por ejemplo, el documento EP A 0 464 533 (Solicitud de la Contraparte Canadiense 2045869) describe proteínas de fusión que incluyen varias porciones de las regiones constantes de moléculas de inmunoglobulina junto con otra proteína humana o una parte de la misma. En muchos casos, el empleo de la región Fc de una proteína de fusión es suficientemente ventajoso para su uso en la terapia y el diagnóstico, dando así como resultado, por ejemplo, propiedades farmacocinéticas mejoradas (documento EP A 0232 262). Por otro lado, para algunos usos, es deseable que la parte Fc sea eliminada después de que la proteína de fusión haya sido expresada, detectada y purificada de una manera ventajosa descrita. Este es un caso en el que la porción Fc demuestra ser un obstáculo para su uso en la terapia y el diagnóstico (p. ej., en un caso en el que la proteína de fusión se va a utilizar como un antígeno para inmunizaciones). En el escrutinio de fármacos, por ejemplo, se han fusionado proteínas humanas tales como hIL-5 con porciones Fc para su uso en un análisis de escrutinio de alto rendimiento para identificar un antagonista de hIL-5. Véase D. Bennett et al., *Journal of Molecular Recognition* Vol. 8: 52-58 (1995), y K. Johanson et al., *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 270, Núm. 16, páginas 9459-9471 (1995).

(1-2) Funciones

A continuación se describen las funciones detalladas de la proteína utilizada en la presente invención, tomando la proteína SITH-1 descrita anteriormente como ejemplo.

Como se muestra en el Ejemplo descrito más adelante, se expresó un gen SITH-1 en todos los momentos en el citoplasma de células infectadas de forma latente con HHV-6, pero no en las células infectadas productivamente. El gen que codifica la proteína SITH-1 está codificado por un ADN que forma una hebra complementaria al gen específico de la infección latente del HHV-6 referido anteriormente (H6LT), y la expresión del gen se intensifica en la fase intermedia de la infección latente con HHV-6.

A partir de estos hechos, se considera que la proteína SITH-1 es una proteína que se expresa específicamente durante la infección latente con HHV-6. Adicionalmente, se ha encontrado que la proteína SITH-1 es claramente diferente de las proteínas identificadas hasta este momento que están implicadas en la infección latente con HHV-6.

Adicionalmente, los autores de la presente invención procedieron al análisis funcional de la proteína SITH-1, y encontraron el siguiente hecho: la proteína SITH-1 se une a CAML (ligando de ciclofilina modulador de calcio, Acceso Núm.; U 18242), que es una proteína anfitriona, con el fin de incrementar la concentración de calcio en las células gliales tales como los astrocitos. CAML es una proteína que se produce abundantemente dentro del cerebro y los linfocitos en un organismo vivo anfitrión, y se sabe que aumenta la concentración de calcio en las células. Además, se considera que el aumento en la concentración de calcio intracelular debido a la expresión de la proteína

SITH-1 induce la activación de la transducción de señales en general dentro de la célula con infección latente, contribuyendo de ese modo a la reactivación eficiente de HHV-6.

5 Con el término "células gliales" según se utiliza en la presente memoria se quiere significar todo tipo de células gliales incluyendo las formas maduras y precursoras de las células gliales en el sistema nervioso central, como ilustran los astrocitos, oligodendrocitos, microglías y las células ependimarias. Otros tipos que pueden estar incluidos son las células satélite, las células de Schwann, y los gliocitos terminales en un sistema nervioso periférico.

10 Se sabe que HHV-6 causa la infección latente de las células gliales (p. ej., astrocitos) en el cerebro. Se cree que la concentración de calcio en las células gliales (p. ej., astrocitos) se eleva, si el HHV-6 se encuentra en un estadio de infección latente o en un estadio intermedio, que es un estado de infección latente que se caracteriza por una alta actividad, que hace que SITH-1 sea expresada. Como resultado de los hallazgos recientemente realizados en los campos de las ciencias mentales, se considera que un aumento de la concentración intracelular de calcio dentro de las células cerebrales está estrechamente relacionado con los trastornos del estado de ánimo y otros trastornos mentales.

15 De hecho, como se muestra en el Ejemplo, la expresión de la proteína SITH-1 en células gliales de ratón (p. ej., astrocitos) indujo síntomas similares a los de los trastornos del estado de ánimo, que son trastornos mentales, e incrementó la sensibilidad. Esto sugiere con fuerza la posibilidad de que las células gliales infectadas de forma latente con HHV-6 (p. ej., astrocitos) puedan desencadenar un trastorno mental a través de la proteína SITH-1.

20 Además, HHV-6 puede infectar no solo los astrocitos, sino también otros tipos de células gliales tales como la microglía. Por lo tanto, los trastornos mentales tales como la depresión y las enfermedades maniaco-depresivas pueden estar causados por otros tipos de células gliales, además de los astrocitos.

25 Los descubrimientos anteriores muestran que la proteína utilizada en la presente invención tiene capacidad para retener la actividad de unión a CAML, que es una proteína del anfitrión, y para aumentar la concentración de calcio intracelular. También se ha encontrado que se puede inducir un trastorno mental al hacer que la proteína utilizada en la presente invención se exprese en las células gliales (p. ej., astrocitos) donde es probable que se produzca la expresión más fuerte de esta proteína. Por lo tanto, se considera que la proteína utilizada en la presente invención tiene la capacidad de causar un trastorno mental en el anfitrión al ser expresada durante la infección latente por el virus del herpes o en una fase temprana de su reactivación.

(1-3) Métodos para la obtención de genes y proteínas

30 Los métodos para obtener (o producir) el gen y la proteína utilizados en la presente invención no están limitados específicamente. A continuación se describen ejemplos típicos de los métodos.

<Método para la obtención de proteínas>

35 Como se ha descrito anteriormente, el método para obtener la proteína utilizada en la presente invención (o el método para producir la proteína) no está particularmente limitado. Los ejemplos del método incluyen un procedimiento para la purificación simple a partir de muestras biológicas (p. ej., células, tejidos o un organismo individual) que contienen la proteína de la presente invención. Asimismo, el método para la purificación no está particularmente limitado, y puede llevarse a cabo de una manera tal que una solución de extracto se extrae de las células o los tejidos mediante un método conocido, y la solución de extracto se purifica a continuación mediante un método conocido (p. ej., un método en el que se utiliza una columna). Por ejemplo, la proteína de la presente invención puede ser purificada y aislada mediante la realización de una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con respecto a una fracción de proteína bruta extraída de células o tejidos.

40 Adicionalmente, otros ejemplos del método para obtener la proteína utilizada en la presente invención incluyen un procedimiento en el que se utiliza, p. ej., una técnica de recombinación génica. En este caso, por ejemplo, se puede adoptar el siguiente método: El gen utilizado en la presente invención se incorpora, p. ej., a un vector, el vector se transfiere a continuación a una célula anfitriona mediante un método conocido de manera que sea susceptible de ser expresado en ella, y la proteína obtenida por medio de la traducción dentro de la célula se purifica. Los métodos específicos para la transferencia del gen (transformación), la expresión del gen, y similares se describirán más adelante.

45 Obsérvese que, para la transferencia de un gen foráneo a un anfitrión como antes, se pueden seleccionar un vector y un anfitrión dependiendo de su propósito, ya que hay diversos tipos de anfitriones y vectores de expresión que incluyen un promotor que funciona en el anfitrión para la expresión del gen foráneo. El método para purificar una proteína producida varía en función del anfitrión utilizado y/o de las características de la proteína. Sin embargo, el uso de una etiqueta permite purificar una proteína diana de una manera relativamente fácil, por ejemplo.

50 El método para producir la proteína mutante tampoco está limitado a ninguno específico. Se puede utilizar un método de producción de proteína mutante conocido, por ejemplo, la mutagénesis dirigida al sitio (Hashimoto-Gotoh, Gene 152, 271-275 (1995), y otros), un método para producir una proteína mutante mediante la introducción de una mutación puntual en una secuencia de nucleótidos a través de la técnica de PCR, o un método para producir una

línea mutante por inserción de un transposón. Utilizando cualquiera de estos métodos, es posible producir la proteína mutante causando, en una secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la proteína (a), una mutación por sustitución, delección, inserción y/o adición de uno o varios nucleótidos. Adicionalmente, la proteína mutante se puede producir mediante el uso de un kit disponible en el mercado.

- 5 El método para obtener la proteína utilizada en la presente invención no se limita a los anteriores. Alternativamente, por ejemplo, se puede utilizar una síntesis química empleando p. ej., un sintetizador de péptidos comercialmente disponible. También alternativamente, se puede utilizar por ejemplo, una solución de síntesis de proteínas libre de células para sintetizar el péptido de la presente invención a partir del gen de la presente invención.

<Método para la obtención del gen>

- 10 Como se ha descrito anteriormente, el método para obtener el gen que codifica la proteína utilizada en la presente invención (o el método para producir el gen) tampoco está particularmente limitado, y puede ser, por ejemplo, un método en el que se utiliza un escrutinio diferencial (clonación por sustracción). Este método se puede realizar de tal manera que, de acuerdo con una técnica conocida, la hibridación directa se lleva a cabo repetidamente en un tubo de ensayo con el fin de condensar el ADNc diana (el gen de la presente invención).

- 15 Cada etapa en el escrutinio diferencial se puede realizar en las condiciones aplicadas convencionalmente. En cuanto a un clon obtenido como resultado de esto, se puede crear un mapa de enzimas de restricción, y se puede determinar una secuencia de nucleótidos (secuenciación), para un análisis más detallado del clon. Este análisis hace posible confirmar fácilmente si se obtiene o no un fragmento de ADN que incluye la secuencia del gen de la presente invención.

- 20 Alternativamente, el método para obtener el gen utilizado en la presente invención puede ser un método para el aislamiento y la clonación, de acuerdo con un método conocido, de un fragmento de ADN que incluye el gen utilizado en la presente invención. Por ejemplo, se puede preparar una sonda que hibrida específicamente con una parte de la secuencia del ADNc, y se puede realizar el escrutinio de una biblioteca de ADN genómico o una biblioteca de ADNc. La sonda puede tener cualquier secuencia y/o longitud, siempre que hibride específicamente con al menos parte de la secuencia del ADNc o su secuencia complementaria.

- 25 También alternativamente, el método para obtener el gen utilizado en la presente invención puede ser un método en el que se utilicen medios de amplificación tales como la PCR. Por ejemplo, los cebadores se preparan respectivamente basándose en los extremos 5' y 3' de una secuencia de ADNc (o su secuencia complementaria) del gen utilizado en la presente invención, y los cebadores se utilizan para realizar, por ejemplo, la PCR con un ADN genómico (o ADNc) como molde, de manera que se amplifica una región de ADN entre los cebadores. De esta manera, los fragmentos de ADN que incluyen el gen de la presente invención se pueden obtener en cantidades masivas.

- 30 También alternativamente, se puede sintetizar un polinucleótido que tiene la secuencia por medio de una síntesis química conocida, basándose en la información de la secuencia del gen

- 35 (2) Anticuerpo utilizado por la presente invención

- El anticuerpo utilizado por la presente invención se obtiene como un anticuerpo policlonal o monoclonal mediante un método conocido utilizando, como antígeno, la proteína utilizada en la presente invención (p. ej., la proteína (a) o (b)) o un péptido parcial de la misma. Los ejemplos del método conocido incluyen aquellos que se describen en documentos tales como: Harlow et al., "Antibodies: A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1988); e Iwasaki et al., "Tankurohn koutai haiburidoma to ELISA (Monoclonal Antibody Hybridomas and ELISA)", Kodansha (1991)). El anticuerpo así obtenido se puede utilizar en la detección y el análisis de la proteína de la presente invención.

- 40 Por ejemplo, el péptido portador del epítipo utilizado en la presente invención descrito en el apartado (1-1) anterior se utiliza para inducir un anticuerpo por medio de un método conocido en la técnica. Por ejemplo, véase: Chow, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 910-914; y Bittle, F. J. et al., J. Gen. Virol. 66: 2347-2354 (1985). En general, los animales pueden ser inmunizados con un péptido libre; sin embargo, el título de anticuerpos anti-proteína se puede aumentar mediante una inmunización de refuerzo mediante el acoplamiento de un péptido a un portador de elevado peso molecular (p. ej., hemocianina de lapa californiana (KLH) o toxoide del tétanos). Por ejemplo, se puede acoplar un péptido que contiene cisteína a un portador utilizando un conector tal como éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), mientras que otros péptidos se pueden acoplar a los portadores utilizando conectores más generales tales como glutaraldehído. Los animales tales como conejos, ratas y ratones se inmunizan con un péptido libre o de acoplamiento a un portador, por ejemplo, por medio de inyección intraperitoneal y/o intradérmica de aproximadamente 100 µg de una emulsión que incluye un péptido o una proteína portadora y coadyuvante de Freund. Se pueden requerir algunas inyecciones de inmunización de refuerzo p. ej., a intervalos de 2 semanas, por ejemplo, para proporcionar un anticuerpo anti-proteína que tenga un título útil que sea detectable en un análisis ELISA utilizando un péptido libre adsorbido a una superficie de un sólido. El título de anticuerpo anti-proteína en el suero de un animal inmunizado se puede aumentar mediante la selección de un anticuerpo anti-proteína, p. ej., por medio de adsorción a un péptido sobre un soporte sólido mediante un método conocido en la técnica y por medio de

disolución del anticuerpo seleccionado.

En la presente memoria el término "anticuerpo" representa las inmunoglobulinas (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM y sus fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂ y fragmentos Fc); cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos anti-idiotípicos, y anticuerpos humanizados.

En la presente memoria, se pretende que el término "anticuerpo que reconoce una proteína utilizada por la presente invención" incluya moléculas completas y fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos Fab y F(ab')₂) que son capaces de unirse específicamente a la proteína utilizada en la presente invención descrita anteriormente. Los fragmentos Fab y F(ab')₂, cada uno de los cuales carece de un fragmento Fc incluido en un anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación, y apenas pueden presentar unión a un tejido específico del anticuerpo intacto (Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)). Por esta razón, son preferibles estos fragmentos.

Adicionalmente, se puede producir otro anticuerpo capaz de reconocer la proteína utilizada en la presente invención por medio de un procedimiento de dos etapas a través del uso de un anticuerpo anti-idiotípico. Este método aprovecha el hecho de que un anticuerpo en sí mismo es un antígeno; por lo tanto, este método es capaz de proporcionar un anticuerpo que se une a un segundo anticuerpo. De acuerdo con este método, se utiliza un anticuerpo específico para la proteína utilizada en la presente invención para inmunizar animales (preferiblemente ratones). Con posterioridad, las células de bazo de los animales se utilizan para producir células de hibridoma, que luego son sometidas a escrutinio para la identificación de un clon que produce un anticuerpo cuya capacidad para unirse al anticuerpo específico para la proteína utilizada en la presente invención puede ser bloqueada por un antígeno proteico utilizado en la presente invención. Semejante anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-idiotípico contra el anticuerpo específico para la proteína utilizada en la presente invención, y se puede utilizar para inmunizar animales para inducir la formación de anticuerpos adicionales específicos para la proteína utilizada en la presente invención.

Está claro que el fragmento Fab, el fragmento F(ab')₂, y otros fragmentos del anticuerpo utilizado por la presente invención se pueden usar de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. Estos fragmentos se producen por escisión causada por proteólisis utilizando una enzima, cuyos ejemplos típicos abarcan la papaína (que proporciona un fragmento Fab) o la pepsina (que proporciona un fragmento F(ab')₂). Alternativamente, se puede producir un fragmento de unión a las proteínas de la presente invención mediante la aplicación de una técnica de ADN recombinante o mediante química sintética.

En la detección de un aumento del nivel de la proteína utilizada en la presente invención utilizando la formación de imágenes *in vivo* para fines de diagnóstico en seres humanos, puede ser preferible utilizar un anticuerpo monoclonal quimérico "humanizado". Semejante anticuerpo puede ser generado utilizando un constructo genético derivado de células de hibridoma que generan el anticuerpo monoclonal antes mencionado. Los métodos para generar anticuerpos quiméricos son conocidos en las técnicas de interés. Para obtener descripciones generales de los mismos, consúltense: Morrison, Science 229: 1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4: 214 (1986); Cabilly et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.816.567; Taniguchi et al., documento EP 171496; Morrison et al., documento EP 173494; Neuberger et al., documento WO 8601533; Robinson et al., documento WO 8702671; Boulianne et al., Nature 312: 643 (1984); y Neuberger et al., Nature 314: 268 (1985).

(3) Vector de expresión recombinante utilizado en la presente invención

El vector de expresión recombinante utilizado en la presente invención incluye el gen utilizado en la presente invención que codifica la proteína (a) o (b). El vector de expresión recombinante puede ser, por ejemplo, un vector de expresión recombinante en el que se ha insertado ADNc. El vector de expresión recombinante se puede producir utilizando, p. ej., un plásmido, un fago, o un cósmido (sin estar limitado a éstos). Adicionalmente, un método de producción del vector de expresión recombinante puede emplear un método conocido.

El vector no está limitado a ningún tipo específico, y puede ser cualquiera con tal de que sea susceptible de ser expresado en una célula anfitriona (anfitrión). Es decir, el vector de expresión puede ser uno preparado como sigue: Con el fin de que un gen sea expresado sin duda, se selecciona una secuencia promotora según sea necesario de acuerdo con el tipo de célula anfitriona; y se incorporan la secuencia promotora seleccionada de este modo y el gen de la presente invención, por ejemplo, a un plásmido de diversos tipos. Los ejemplos del vector de expresión incluyen: vectores de fago; vectores de plásmido; vectores de virus; vectores de retrovirus; vectores de cromosomas; vectores de episomas; y vectores derivados de virus (p. ej., vectores derivados de plásmidos bacterianos, bacteriófagos, episomas de levadura, elementos cromosómicos de levadura, virus (p. ej., baculovirus, papovavirus, virus vaccinia, adenovirus, avipoxvirus, virus de pseudorrabia, herpesvirus, lentivirus, y retrovirus), y combinaciones de los mismos, por ejemplo, cósmidos y fagémidos).

Generalmente, la introducción del vector plasmídico se lleva a cabo en sedimentos tales como sedimentos de fosfato de calcio o en un complejo con lípidos cargados. En el caso en el que el vector es un virus, el vector puede ser empaquetado *in vitro* utilizando una línea celular de empaquetamiento apropiada, y posteriormente puede ser transducido a una célula anfitriona. El vector de retrovirus puede ser replicable o puede ser de replicación

defectuosa. En este último caso, la propagación del virus por lo general solo se produce en una célula anfitriona complementaria.

Adicionalmente, son preferibles los vectores que incluyen cada uno una región de regulación que actúa en cis para un gen diana. Un factor que actúa en trans apropiado puede ser suministrado por un anfitrión, por un vector complementario o por el propio vector durante la introducción del vector en el anfitrión. En una realización preferible en este sentido, son preferibles los vectores que proporcionan cada uno una expresión específica que puede ser inducible y/o específica del tipo de célula. Son particularmente preferidos entre semejantes vectores aquellos inducibles por factores ambientales que son fáciles de manipular, tales como la temperatura y los aditivos nutricionales.

Los ejemplos de un vector bacteriano preferible que se va a utilizar abarcan: pQE70, pQE60, pQE-9 y (disponible de Qiagen); vector pBS, vector Phagescript, vector Bluescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (disponibles de Stratagene); y ptrc99a, pKK223-3, pDR540, pRIT5 (disponibles de Pharmacia). Adicionalmente, los ejemplos de un vector eucariota preferible incluyen pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, y pSG (disponibles de Stratagene); y pSVK3, pBPV, pMSG, y pSVL (disponibles de Pharmacia).

Se pueden utilizar varios tipos de marcadores para confirmar si el gen utilizado en la presente invención ha sido transferido o no a la célula anfitriona, y para confirmar si el gen es expresado sin duda o no en la célula anfitriona. Es decir, el vector de expresión incluye preferiblemente al menos un marcador de selección. Los ejemplos de tales marcadores de selección incluyen: la ácido dihidrofólico reductasa o la resistencia a neomicina para el cultivo de células eucarióticas; y genes de resistencia a fármacos, tales como un gen de resistencia a tetraciclina y un gen de resistencia a ampicilina para el cultivo de *E. coli* y otras bacterias. Otro ejemplo utiliza, como marcador, un gen eliminado en una célula anfitriona, e introduce, como vector de expresión, un plásmido o similar que incluyen el marcador y el gen utilizado en la presente invención en la célula anfitriona. A partir de la expresión del gen marcador, es posible confirmar que el gen utilizado en la presente invención ha sido transferido. Alternativamente, la proteína utilizada en la presente invención se puede expresar como una proteína de fusión. Por ejemplo, utilizando la proteína fluorescente verde (GFP) derivada de *Aequorea victoria* como marcador, se puede expresar la proteína utilizada en la presente invención como una proteína de fusión con GFP. Adicionalmente, el gen utilizado en la presente invención se puede unir a un vector que incluye un marcador de selección para la propagación en la célula anfitriona.

Adicionalmente, es preferible que un inserto de ADN esté unido operablemente a un promotor apropiado (p. ej., promotor de fago lambda λ pL, promotor lac de *E. coli*, promotor trp, promotor tac, promotor temprano y promotor tardío de SV40, y promotor de retrovirus LTR). En cuanto a otro promotor apropiado, se puede utilizar uno cualquiera de los conocidos por los expertos en la técnica.

Con el fin de poner en práctica la presente invención, los promotores de bacterias conocidos que se usan preferiblemente incluyen los promotores lacI y lacZ de *E. coli*, el promotor de T3 y el promotor de T7, el promotor gpt, el promotor λ PR y el promotor λ pL, y el promotor trp. Los promotores eucarióticos adecuados incluyen el promotor temprano inmediato de CMV, el promotor de la timidina quinasa de HSV, el promotor temprano de SV40 y el promotor tardío de SV40, un promotor de retrovirus LTR (p. ej., un promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV)), y el promotor de metalotioneína (p. ej., el promotor de la metalotioneína I de ratón).

Es preferible que el vector de expresión recombinante incluya además: sitios para el inicio de la transcripción y la terminación de la transcripción; y una región de transcripción que contiene un sitio de unión al ribosoma para la traducción. Un transcrito madurado expresado por un constructo vector incluye una región codificante que contiene (i) el inicio de la transcripción AUG en el inicio de un polipéptido que se va a traducir y (ii) un codón de parada que está posicionado correctamente en el extremo del polipéptido.

La transcripción de ADN por un eucariota superior se puede mejorar mediante la inserción de una secuencia intensificadora en un vector. El intensificador es un elemento que actúa en cis de ADN (por lo general, de aproximadamente 10 pb a 300 pb), que funciona mejorando la actividad transcripcional de un promotor de un tipo predeterminado de célula anfitriona. Los ejemplos del intensificador incluyen: un intensificador de SV40 (situado a 100 pb - 270 pb sobre el lado tardío del origen de replicación); un intensificador del promotor temprano de un citomegalovirus; un intensificador de polioma sobre el lado tardío del origen de replicación; y un intensificador de adenovirus.

La célula anfitriona anterior no está limitada a ninguna específica, y se puede utilizar adecuadamente una célula convencionalmente conocida de diversos tipos. Los ejemplos típicos de un anfitrión apropiado incluyen: células bacterianas (p. ej., células de *E. coli*, células de *Streptomyces*, y células de *Salmonella typhimurium*); células de hongos (p. ej., células de levadura); células de insecto (p. ej., células S2 de *Drosophila* y células Sf9 de *Spodoptera*); células animales (p. ej., células CHO, células COS y células de melanoma de Bowes); y células vegetales. Los ejemplos más específicos de los mismos incluyen no solo células de mamíferos tales como células humanas y células de ratón, sino también las células derivadas de *Bombys mori*, de insectos tales como *Drosophila melanogaster*, de bacterias tales como *E. coli* (*Escherichia coli*), de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*), y *Caenorhabditis elegans*, y células ovocíticas de *Xenopus laevis*. Sin embargo, la presente invención no se limita a estas. Un medio de cultivo y las condiciones adecuadas para cada una de las

células anfitrionas anteriores pueden ser aquellos conocidos en la técnica.

El método para introducir el vector de expresión en la célula anfitriona, es decir, el método para la transformación tampoco está limitado a ninguno específico, y se puede emplear adecuadamente un método convencionalmente conocido, por ejemplo, electroporación, un método con fosfato de calcio, un método con liposomas, un método con DEAE dextrano, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, o infección. Estos métodos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales, por ejemplo, Davis et al., Basic Methods In Molecular Biology (1986).

También se describen en la presente memoria pero no se reivindican per se (i) un vector de expresión recombinante que incluye un polinucleótido que codifica un fragmento parcial de la proteína utilizada en la presente invención y (ii) un transformante (célula anfitriona) genéticamente modificado por un vector de expresión recombinante, cada uno de los cuales tiene el objetivo de producir de forma recombinante un fragmento parcial (fragmento) de la proteína utilizada en la presente invención.

Adicionalmente, también se describe, pero no se reivindica, la producción de la proteína utilizada en la presente invención o un fragmento de la misma por medio de las técnicas recombinantes anteriores. Es decir, se describe pero no se reivindica un método para producir la proteína utilizada en la presente invención y su fragmento a través del uso de una técnica recombinante. Una proteína recombinante producida por medio de la técnica puede ser recogida y purificada a partir de un producto de cultivo de células recombinantes por medio de un método conocido, p. ej., una precipitación con sulfato amónico o una precipitación con etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxapatita, o cromatografía de lectina. La más preferible utilizada para la purificación es la cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC").

(4) Transformante utilizado en la presente invención

El transformante utilizado para poner en práctica la presente invención es un transformante al que ha sido transferido el gen utilizado en la presente invención, es decir, un transformante al que se ha transferido el vector de expresión recombinante descrito en el apartado (3) anterior. La expresión el "gen ha sido transferido" en la presente memoria significa que el gen ha sido transferido a una célula diana (célula anfitriona) de una manera expresable por medio de un método conocido de ingeniería genética (técnica de manipulación genética). Adicionalmente, "transformante" significa no solamente una célula, un tejido, y un órgano, sino también un organismo individual.

Un método para preparar (producir) el transformante utilizado en la presente invención puede ser, por ejemplo, un método para transformar el vector de expresión recombinante anterior. El organismo que va a ser transformado tampoco está limitado a ninguno específico, cuyos ejemplos abarcan varios tipos de microorganismos y animales (p. ej., un ratón transgénico) ilustrados en las descripciones anteriores relativas a la célula anfitriona. Adicionalmente, con un promotor y/o un vector seleccionados, una planta puede ser también un sujeto a ser transformado.

(5) Aparato de detección del gen de la presente invención

Un aparato de detección de los genes utilizado en la presente invención, pero no reivindicado per se, utiliza, a modo de sonda, al menos parte de una secuencia de nucleótidos, o su secuencia complementaria, del gen utilizado en la presente invención. El aparato de detección del gen se puede utilizar, p. ej., para detectar y/o medir un patrón de expresión del gen utilizado en la presente invención en diversas condiciones.

El aparato de detección del gen utilizado en la presente invención puede ser, por ejemplo, un chip de ADN que incluye un sustrato (soporte) en el que se inmoviliza la sonda que hibrida específicamente con el gen de la presente invención. El "chip de ADN" se refiere en la presente memoria principalmente a un chip de ADN sintético que utiliza, como sonda, un oligonucleótido sintetizado. No solo eso, el término "chip de ADN" en la presente memoria también abarca una micromatriz de ADN de tipo anclaje que utiliza, como sonda, ADNc tal como un producto de PCR.

La secuencia utilizada como sonda se puede determinar por medio de un método convencionalmente conocido para determinar una secuencia característica a partir de una secuencia de ADNc. Específicamente, por ejemplo, el método puede ser un método de Análisis en Serie de la Expresión Génica (SAGE) (Science 276: 1268, 1997; Cell 88: 243, 1997; Science 270: 484, 1995; Nature 389: 300, 1997; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.695.937).

Obsérvese que el chip de ADN puede ser fabricado mediante un método conocido. Por ejemplo, con el fin de utilizar un oligonucleótido sintetizado como oligonucleótido, se puede utilizar una técnica de fotolitografía y una técnica de síntesis de ADN en fase sólida combinadas de manera que se proporciona el oligonucleótido a través de una síntesis sobre un sustrato. Por otra parte, con el fin de utilizar ADNc como oligonucleótido, se puede anclar el ADNc sobre un sustrato con un dispositivo portador de matrices.

Adicionalmente, como en los chips de ADN convencionales, la exactitud de la detección de un gen se puede mejorar adicionalmente proporcionando una sonda con coincidencia perfecta (oligonucleótido), junto con una sonda con falta de coincidencia, que difiere de la sonda con coincidencia perfecta por la sustitución de una sola base. Adicionalmente, con el fin de detectar diferentes genes en paralelo, el chip de ADN puede estar configurado de tal

manera que se inmoviliza una pluralidad de tipos de oligonucleótidos sobre un único sustrato.

A continuación se describe el aparato de detección del gen utilizado en la presente invención con mayor detalle.

<Sustrato>

5 El material del sustrato para su uso en el aparato de detección del gen utilizado en la presente invención solo tiene que ser uno en el que se pueda inmovilizar un oligonucleótido de forma estable. Los ejemplos del material incluyen, pero no se limitan a, resinas sintéticas (p. ej., policarbonato y plástico) y vidrio. La forma del sustrato tampoco se limita a ninguna específica. Por ejemplo, se puede utilizar preferiblemente un sustrato en forma de placa o un sustrato en forma de película.

<Oligonucleótido que va a ser inmovilizado sobre la superficie del sustrato>

10 Solamente es necesario que el oligonucleótido que se va a inmovilizar sobre la superficie del sustrato del aparato de detección de genes utilizado en la presente invención sea un oligonucleótido que esté basado en al menos parte de la secuencia de nucleótidos del gen utilizado en la presente invención. Mediante el establecimiento de la hibridación entre el oligonucleótido y un ácido nucleico derivado de una muestra, es posible detectar un gen contenido en la muestra. Obsérvese que el oligonucleótido que está basado en al menos parte de la secuencia de nucleótidos del gen de la presente invención se denominará en lo sucesivo "oligo de captura" en algunos casos.

15 El oligo de captura se puede diseñar basándose en la secuencia de nucleótidos del gen utilizado en la presente invención. Por lo tanto, el oligo de captura puede ser la secuencia de nucleótidos en sí misma, o puede incluir una mutación siempre que permita el establecimiento de la hibridación específica entre el oligo de captura y un ácido nucleico preparado a partir de una muestra que se va a detectar. La posición de la mutación no está particularmente limitada.

20 La longitud (el número de bases) del oligo de captura no está particularmente limitada. Sin embargo, si la longitud es demasiado corta, la detección de la hibridación se hace difícil; si la longitud es demasiado larga, se permite una hibridación no específica. Los autores de la presente invención mantuvieron el estudio de optimización de la longitud del oligo de captura, y determinaron como longitud patrón una longitud de 12 a 50 bases. La longitud patrón es preferiblemente una longitud de 12 a 40 bases, más preferiblemente una longitud de 12 a 30 bases, aún más preferiblemente una longitud de 13 a 22 bases. La longitud no se limita a esta. La longitud en bases depende principalmente de las características de la secuencia (el contenido de una cierta base, la repetición de una determinada base). Adicionalmente, los autores de la presente invención han confirmado que incluso un oligo de captura de cadena corta es susceptible de hibridación específica siempre que el oligo de captura de cadena corta tenga una unión fina.

25 En el caso en el que el oligo de captura tenga cualquiera de una estructura en horquilla, una estructura en bucle, y otras estructuras terciarias, cada una de las cuales dificulta la hibridación con un ácido nucleico derivado de una muestra, la sustitución de uno o más de los nucleótidos que constituyen el oligo de captura por inosina o uno o varios ácidos nucleicos no emparejados con cualquiera de los nucleótidos, puede anular la estructura terciaria.

30 El método de síntesis del oligo la captura no está limitado a ninguno específico. Por ejemplo, se puede utilizar un método conocido (p. ej., el método descrito por Maniatis, T. et al., en *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). Generalmente, el oligo de captura puede ser sintetizado químicamente utilizando un sintetizador de ADN disponible en el mercado.

35 En el aparato de detección del gen utilizado en la presente invención, es preferible que el denominado oligo de captura de control, así como el oligonucleótido que se basa en al menos parte de la secuencia de nucleótidos del gen utilizado en la presente invención se inmovilicen sobre la superficie del sustrato. El oligo de captura de control incluye un oligo de captura de control positivo y un oligo de captura de control negativo. El oligo de captura de control positivo se utiliza para comprobar si la reacción de amplificación se está llevando a cabo satisfactoriamente o no en la etapa de preparación de la sonda descrita más adelante. El oligo de captura de control negativo se utiliza para comprobar la hibridación no específica, es decir, una señal de hibridación falsa positiva. Se describe también un aparato de detección de genes en el que estos oligos de captura de control positivo y oligos de captura de control negativo se inmovilizan sobre la superficie del sustrato.

40 El oligo de captura de control positivo puede ser cualquier oligonucleótido, siempre que esté diseñado basándose en una secuencia de nucleótidos incluida en una sonda preparada a partir de una muestra que va a ser detectada. Adicionalmente, con el fin de que una pluralidad de muestras a detectar sean detectadas a la vez utilizando un único aparato de detección de genes, se pueden diseñar oligos de captura de control positivo respectivamente, para las muestras que se van a detectar, o se puede diseñar un oligo de captura de control positivo basándose en una secuencia de nucleótidos compartida por las sondas preparadas a partir de la pluralidad de muestras que se van a detectar. En caso de que no haya ninguna secuencia de nucleótidos compartida por las sondas preparadas a partir de todas las muestras que se van a detectar, se puede diseñar un oligo de captura de control positivo para cada uno de algunos grupos. Alternativamente, se puede diseñar una secuencia artificial de manera que tenga una secuencia diferente de una secuencia de una bacteria sujeto, pero tenga una secuencia de cebador común, y se puede utilizar

una parte de la secuencia artificial como oligo de captura de control positivo. Utilizando semejante secuencia artificial como molde, se puede preparar una sonda (semejante sonda se denomina en la presente memoria "sonda de control"), y la sonda resultante se añade a una sonda preparada a partir de una muestra. De esta manera, se puede someter a ensayo la especificidad de la hibridación. A continuación se discutirán más detalles sobre la sonda.

- 5 Es preferible que el oligo de captura de control negativo esté diseñado de tal manera que tenga una secuencia de nucleótidos de un oligo de captura de control positivo con una sustitución artificial de una o más bases pero menos de 20% de las bases totales de la secuencia. El número de bases sustituidas se determina teniendo en cuenta las condiciones de hibridación de modo que el oligo de captura de control negativo no hibride con la sonda derivada de la muestra que se va a detectar.
- 10 La muestra que se va a detectar no está limitada a ninguna específica. Adicionalmente, solamente es necesario que los numerosos tipos de oligos de captura que se van a inmovilizar sobre el sustrato sean uno o más, y no hay límite superior para ello. Asimismo, es más preferible diseñar el aparato de detección del gen utilizado en la presente invención para que sea del tipo denominado de micromatriz en el que se inmoviliza una pluralidad de fragmentos parciales (que tienen diferentes secuencias de nucleótidos) del gen utilizado en la presente invención sobre un sustrato como oligos de captura.

<Inmovilización de oligonucleótidos (Oligo de captura)>

El método para inmovilizar el oligonucleótido sobre la superficie del sustrato no está limitado a ninguno específico, pero se puede seleccionar entre los métodos conocidos, según sea necesario. Por ejemplo, se encuentran disponibles los medios utilizados para los métodos generales de hibridación, p. ej., adsorción física, conexión equipotencial, o enlace covalente molecular. Para el aparato de detección del gen descrito en la presente memoria, es preferible utilizar un sustrato que tenga un grupo carbodiimida o un grupo isocianato en su superficie (Patente de los Estados Unidos Núm. US 5.908.746, Tokukaihei, Núm. 8-23975) para la inmovilización.

Si una cantidad del oligonucleótido aplicado sobre el sustrato es demasiado pequeña, la detección puede ser difícil debido a que puede haber una reacción insuficiente entre el oligonucleótido y la sonda. Adicionalmente, la aplicación de alta integración provoca problemas técnicos y un elevado coste, y también requiere un aparato de detección de mayor precisión costoso (p. ej., un escáner) para detectar una señal de hibridación utilizando, p. ej., una marca fluorescente de la sonda o quimioluminiscencia. Por lo tanto, es preferible inmovilizar, sobre la superficie del sustrato, el oligonucleótido dentro de un tamaño de 10 µm a 1000 µm de diámetro. El método para aplicar el oligonucleótido sobre el sustrato no está limitado a ninguno específico. Por ejemplo, la aplicación se puede realizar mediante la aplicación de una solución del oligonucleótido sobre el sustrato utilizando una máquina de aplicación. De esta manera, la solución de oligonucleótido se puede aplicar generalmente sustancialmente en un círculo.

(6) Aparato de detección utilizando la proteína utilizada en la presente invención o su fragmento parcial

Un aparato de detección utilizado en la presente invención utiliza, como sonda, al menos parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína utilizada en la presente invención. En otras palabras, el aparato de detección utilizado en la presente invención es un aparato de detección que tiene la proteína utilizada en la presente invención o su fragmento parcial (fragmento) inmovilizados en el mismo. El aparato de detección se puede utilizar para detectar y/o medir, en diversas condiciones, una sustancia (p. ej., un polipéptido, un ácido nucleico, o un anticuerpo) que interacciona con la proteína utilizada en la presente invención.

El aparato de detección utilizado en la presente invención puede ser, por ejemplo, uno que incluye un sustrato (soporte) que tiene la sonda inmovilizada, cuya sonda se une específicamente a un anticuerpo que reconoce la proteína utilizada en la presente invención. Para una secuencia de aminoácidos utilizada como sonda, es preferible utilizar un sitio de la proteína utilizada en la presente invención cuyo sitio interacciona específicamente con el anticuerpo utilizado en la presente invención, es decir, un péptido portador del epítipo de la proteína utilizada en la presente invención.

El material del sustrato que se utiliza en el aparato de detección utilizado en la presente invención solamente tiene que ser uno en el que un oligopéptido se puede inmovilizar de manera estable. Los ejemplos del material incluyen, pero no se limitan a, resinas sintéticas (p. ej., policarbonato y plástico) y vidrio. La forma del sustrato tampoco se limita a ninguna específica. Por ejemplo, se pueden usar preferiblemente un sustrato en forma de placa o un sustrato en forma de película.

Adicionalmente, el método para inmovilizar un oligopéptido sobre el sustrato puede ser un método conocido convencionalmente, y no está limitado a ninguno específico. Por ejemplo, la inmovilización se puede llevar a cabo por medio de: un método en el que un oligopéptido se une a un portador insoluble mediante un método de unión covalente o un método de adsorción; un método de inmovilización por atrapamiento en el que un oligopéptido está rodeado por sustancias de elevado peso molecular; o un método en el que un oligopéptido se inmoviliza sobre un soporte mediante el uso de un agente de entrecruzamiento o similar. Obsérvese que el método de inmovilización adecuado se puede seleccionar teniendo en cuenta (i) la compatibilidad entre un sustrato para la inmovilización y un oligopéptido y (ii) el propósito de uso de la sustancia inmovilizada.

(7) Utilidad de los genes, proteínas y otros utilizados en la presente invención

Como se ha descrito anteriormente, el gen y la proteína utilizados en la presente invención se expresan específicamente durante la infección latente con un herpesvirus. Se considera que esta proteína tiene capacidad para inducir un trastorno mental en un anfitrión al ser expresada en las células gliales (p. ej., astrocitos) en el cerebro.

Adicionalmente, se ha encontrado de manera interesante, que el gen y la proteína utilizados en la presente invención están relacionados con los pacientes con trastornos mentales. Dicho con mayor detalle, como se muestra en el Ejemplo descrito más adelante, se detectó un anticuerpo anti-SITH-1 en aproximadamente 50% de los pacientes que padecían trastornos del estado de ánimo u otros trastornos mentales, mientras que el anticuerpo anti-SITH-1 apenas fue detectable en personas sanas (la frecuencia de detección del anticuerpo anti-SITH-1 en personas sanas fue de menos de aproximadamente 2%).

Por lo tanto, los autores de la presente invención han descubierto por sí mismos que un anticuerpo específico para la proteína utilizada en la presente invención se encuentra significativamente solo en pacientes con trastornos del estado de ánimo y otros trastornos mentales, pero es difícilmente detectable en personas sanas. Obsérvese que se pretende que "trastorno mental", según se utiliza en la presente memoria, signifique un estado tal que la vida cotidiana o la vida social experimentan limitaciones considerables a causa de los trastornos en las funciones mentales como la conciencia, la inteligencia, la memoria, las emociones, el pensamiento y la conducta. Se pretende que "trastorno de estado de ánimo", represente un estado tal que debido a los cambios persistentes del estado de ánimo o emocionales, se experimenten anormalmente sentimientos depresivos o eufóricos que representan perturbaciones en el funcionamiento cotidiano o el funcionamiento de la vida social.

Las razones específicas para el estado anterior en el que "un anticuerpo específico para la proteína utilizada en la presente invención se encuentra de manera significativa solamente en pacientes con trastornos del estado de ánimo y otros trastornos mentales, pero es difícilmente detectable en personas sanas" están actualmente siendo estudiadas de manera diligente para ser desentrañadas. La proteína utilizada en la presente invención tiene una naturaleza tal que se produce de forma activa en la fase intermedia en la que la infección latente es inducida hacia la reactivación. Se cree que en respuesta al estrés, se induce la reactivación de virus del herpes (p. ej., HHV-6), por medio de la cual se produce la proteína de la presente invención. Se considera que las personas que tienen el anticuerpo contra la proteína utilizada en la presente invención, que representan aproximadamente 50% de los pacientes con trastornos mentales, tienen esa proteína expresada abundantemente debido al estrés o a cualquier factor genético durante un período prolongado en las células gliales (p. ej., astrocitos) en el cerebro, cuyas células gliales se infectan de manera latente con el HHV-6. Como resultado, el aumento de la concentración de calcio en las células gliales (p. ej., astrocitos) continúa durante un período prolongado, y el metabolismo de la serotonina y otras funciones importantes de las células gliales (p. ej., astrocitos) se deterioran, por lo que se manifestaría un trastorno mental. Los pacientes con síndrome de fatiga crónica (SFC) que presentan trastornos mentales llevan el anticuerpo contra la proteína utilizada en la presente invención con una alta frecuencia. La razón de esto sería que los pacientes con SFC a menudo son infectados de forma latente con un mayor número de HHV-6 que las personas sanas, por lo tanto tienen una mayor probabilidad de producir la proteína de la presente invención (proteína SITH-1). El hecho de que los pacientes con SFC sean infectados de manera latente con un mayor número de HHV-6 que las personas sanas también es apoyado por el resultado de la reacción entre el producto del gen específico de la infección latente referido previamente y el anticuerpo en los pacientes con SFC (véase el Documento No de Patente 5).

Por lo tanto, aunque el mecanismo detallado del fenómeno de que el anticuerpo contra la proteína utilizada en la presente invención se encuentre en pacientes con trastornos mentales, todavía no se ha desentrañado, la utilización de este fenómeno proporciona un método de determinación y un método de diagnóstico que contribuyen al diagnóstico objetivo de los trastornos mentales. Adicionalmente, la presente invención también se refiere a un kit de determinación, un kit de diagnóstico, un método de producción de un modelo animal, y un método de escrutinio de fármacos. A continuación se describe cada uno de estos métodos con detalle.

(7-1) Método de determinación de la presente invención

Solamente es necesario que el método de determinación de la presente invención sea un método para determinar si un anticuerpo que reconoce la proteína utilizada en la presente invención (es decir, la proteína (a) o (b)) existe o no en un sujeto. Obsérvese que el término "sujeto" se refiere a un ser humano o un mamífero distinto de un ser humano.

Un análisis para un anticuerpo es activado por la detección a través de, por ejemplo, una reacción para la unión a una proteína reconocida por el anticuerpo o un fragmento parcial de la proteína. De ese modo, en este método de determinación, se utiliza preferiblemente una proteína reconocida por el anticuerpo o un fragmento parcial de la proteína para determinar la presencia del anticuerpo de una manera inmunológica (es decir, utilizando una reacción antígeno-anticuerpo). Obsérvese que el "fragmento parcial" contiene preferiblemente al menos un péptido portador de epítopo.

Para proporcionar un ejemplo de este método de determinación, se pone en contacto un portador insoluble sobre el que está inmovilizada la proteína utilizada en la presente invención o un fragmento parcial de la misma con una muestra biológica tomada de un sujeto y se lava, y a continuación se detectan los anticuerpos específicamente unidos a la proteína o al fragmento parcial de la misma sobre el portador insoluble. Los anticuerpos unidos específicamente a la proteína o al fragmento parcial de los mismos sobre el portador insoluble son, por ejemplo, anticuerpos derivados del sujeto. Por lo tanto, tales anticuerpos pueden ser detectados fácilmente utilizando un anticuerpo secundario, es decir, un anticuerpo específico para los anticuerpos en el sujeto. En este caso, se puede incorporar un colorante, una enzima o una marca radiactiva o fluorescente al anticuerpo secundario con el fin de mejorar y facilitar así aún más la detección prevista.

Por lo tanto, los análisis de anticuerpos que se van a utilizar en el método de determinación en consideración incluyen mecanismos de análisis que hacen uso de enfoques inmunohistoquímicos tradicionales, tales como un mecanismo de anticuerpos fluorescentes, un análisis de transferencia puntual, una mecánica de transferencia Western, mecanismos de análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (incluyendo el mecanismo ELISA y ELISA sándwich), un mecanismo de radioinmunoanálisis (RIA), y un mecanismo de análisis de inmunodifusión. Estos análisis utilizan moléculas tales como avidina y biotina para los fines de inmovilización y detección moleculares, y los mecanismos para preparar estos reactivos y métodos de uso de los mismos puede ser tecnologías conocidas para una persona experta en la técnica. Obsérvese que el resultado del método de determinación bajo consideración es una tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido para el ensayo patológico.

Obsérvese también que el método de determinación en cuestión se realiza utilizando preferiblemente una muestra biológica aislada del sujeto. El término "muestra biológica aislada" puede cubrir cualquier muestra que contiene células, tejidos o pedazos desorganizados de los mismos tomados del sujeto. Por ejemplo, la "muestra biológica aislada" puede ser cualquiera de sangre periférica, saliva, orina, heces, y muestras de células, y no está limitada a ninguna específica. Entre estas, la muestra particularmente preferible es sangre periférica tomada del sujeto, en vista del hecho de que los virus del herpes infectan de forma latente los macrófagos de la sangre periférica. En este caso, el sujeto se beneficia de un bajo grado de invasión.

La cantidad de anticuerpos presente en una muestra biológica (muestra) se puede calcular fácilmente realizando una comparación con la cantidad de anticuerpos presentes en una preparación patrón (p. ej., una muestra patrón tomada de una persona sana o una tomada de un paciente típico con un trastorno mental), utilizando, por ejemplo, un algoritmo informático de regresión lineal. Si bien se encuentran disponibles diversas técnicas de análisis para la detección de anticuerpos, Iacobelli et al., *Breast Cancer Research and Treatment* 11: 19-30 (1988), describen un ejemplo de ELISA.

Las marcas enzimáticas adecuadas pueden ser ilustradas por aquellas derivadas de una clase de oxidasas que catalizan la generación de peróxido de hidrógeno a través de la reacción con el sustrato. La glucosa oxidasa es particularmente preferible, ya que tiene una estabilidad satisfactoria y su sustrato (glucosa) se encuentra fácilmente disponible. La actividad de la marca de oxidasas se puede analizar midiendo la concentración de peróxido de hidrógeno formado por una reacción de anticuerpo marcado con enzima/sustrato. Además de las enzimas, otras marcas adecuadas incluyen radioisótopos (p. ej., yodo (^{125}I e ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{112}In), y tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), así como marcas fluorescentes (p. ej., fluoresceína y rodamina) y biotina.

A nivel de los anticuerpos (contra la proteína de la presente invención) que están presentes en las muestras biológicas obtenidas del sujeto, también puede ser detectada *in vivo* por métodos distintos de la técnica de inmunoanálisis anteriormente descrita, por ejemplo, por análisis de imagen. En resumen, en vista del hecho de que el anticuerpo contra la proteína de acuerdo con la presente invención también es una proteína, se puede utilizar un anticuerpo que reconoce específicamente este anticuerpo para la detección *in vivo* por medio del análisis de imágenes del nivel de los anticuerpos (contra la proteína de la presente invención) que están presentes en las muestras biológicas obtenidas a partir del sujeto.

Las marcas o marcadores de anticuerpos para el análisis *in vivo* de imágenes de anticuerpos incluyen aquellos que pueden ser detectados por imágenes de rayos X, RMN, o ESR. Para las imágenes de rayos X, las marcas adecuadas comprenden radioisótopos tales como bario o cesio que emiten radiación detectable pero que son claramente inofensivos para la muestra que se va a someter a ensayo. Los marcadores adecuados para RMN y ESR abarcan aquellos que se pueden utilizar para marcar un nutriente para el cultivo de un híbrido asociado para producir un anticuerpo correspondiente, por lo que la marca se incorpora en el anticuerpo producido; un ejemplo de tal marca es el deuterio que tiene un espín característico detectable.

Un anticuerpo o un fragmento del mismo que son específicos para el anticuerpo contra la proteína utilizada en la presente invención y que están marcados con una porción de análisis por imágenes detectable adecuada, tal como un radioisótopo (p. ej., ^{131}I , ^{111}In , o $^{99\text{m}}\text{Tc}$), o un sustrato radio-opaco o una sustancia detectable por resonancia magnética nuclear (p. ej., por vía parenteral, subcutánea o intravenosa) se introduce en un mamífero que se va a someter a ensayo para determinar un trastorno. Se entenderá en la técnica de interés que la cantidad de la porción de análisis por imágenes requerida para generar una imagen de diagnóstico se determina por el tamaño de la muestra que se vaya a someter a ensayo y por el sistema de análisis de imagen que se vaya a utilizar. En el caso en el que esa porción es parte de un radioisótopo, la cantidad de radiactividad que se va a inyectar en una muestra

humana está típicamente en un intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mCi de ^{99m}Tc . Posteriormente, el anticuerpo con la marca o el fragmento del mismo se acumulan preferentemente en un sitio de la célula cuyo sitio incluye el anticuerpo contra la proteína utilizada en la presente invención. Obsérvese que S. W. Burchiel et al., en "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments" (Tumer Imaging, Capítulo 13: The Radiochemical Detection of Cancer, Burchiel, S. W. y Rhodes, B. A. eds., Masson Publishing Inc. (1982)) describen un análisis por imágenes *in vivo* de tumores.

A continuación se enumeran ejemplos específicos de una marca disponible para la presente invención. Los ejemplos de marcas enzimáticas adecuadas incluyen malato deshidrogenasa, nucleasa de *Staphylococcus*, alcohol deshidrogenasa de levadura, α -glicerolfosfato deshidrogenasa, triosafosfato isomerasa, peroxidasa, fosfatasa alcalina, asparraginasa, glucosa oxidasa, β -galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa, y acetilcolina esterasa.

Los ejemplos de las marcas de radioisótopos adecuadas incluyen ^3H , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^{51}Cr , ^{57}To , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{152}Eu , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{217}Ci , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{47}Sc , y ^{109}Pd . El Indio 111 (^{111}In) es un isótopo preferido en el caso en el que se emplea la formación de imágenes *in vivo*, ya que evita el problema de deshalogenación de un anticuerpo monoclonal marcado con ^{125}I o ^{131}I , cuya deshalogenación está causada por el hígado. Adicionalmente, este radionúclido tiene una energía de liberación gamma favorable para la formación de la imagen (Perkins et al., Eur. J. Nucl. Med. 10: 296-301 (1985); Carasquillo et al., J. Nucl. Med. 28: 281-287 (1987)). Por ejemplo, el indio 111 (^{111}In) acoplado a un anticuerpo monoclonal utilizando 1-(P-bencil isotiocianato)-DPTA ha mostrado poca absorción en tejidos no tumorales, particularmente hígado, y por lo tanto aumenta la especificidad de la localización del tumor (Esteban et al., J. Nucl. Med. 28: 861-870 (1987)).

Los ejemplos de marcas isotópicas no radiactivas adecuadas incluyen ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{162}Dy , ^{52}Tr , y ^{56}Fe .

Los ejemplos de marcas fluorescentes adecuadas incluyen marca de ^{152}Eu , marca de fluoresceína, marca de isotiocianato, marca de rodamina, marca de ficoeritrina, marca de ficocianina, marca de aloficocianina, marca de o-ftalaldehído, y marca de fluorescamina.

Los ejemplos de toxinas marcadoras adecuadas incluyen toxina diftérica, ricina, y toxina del cólera.

Los ejemplos de marcas quimioluminiscentes incluyen marca de luminal, marca de isoluminal, marca de éster de acridinio aromático, marca de imidazol, marca de sal de acridinio, marca de éster de oxalato, marca de luciferina, marca de luciferasa y marca de aequorina.

Los ejemplos de agentes de contraste para la resonancia magnética nuclear incluyen núcleos atómicos de metales pesados tales como Gd, Mn, y Fe.

Las técnicas de unión representativas para las marcas mencionadas anteriormente a los anticuerpos son proporcionadas por Kennedy et al. (Clin. Chim. Acta 70: 1-31 (1976)) y Schurs et al. (Clin. Chim. Acta 81: 1-40 (1977)). Las técnicas de acoplamiento descritas en esta última incluyen el método del glutaraldehído, el método del peryodato, el método de la dimaleimida, y el método del éster de m-maleimidobencil-N-hidroxi-succinimida.

(7-2) Método de diagnóstico

El método de diagnóstico de la presente invención solo tiene que utilizar el método de determinación anterior. La configuración específica, las condiciones y otros del método de diagnóstico no están particularmente limitados. Por ejemplo, mediante el uso como un marcador del anticuerpo utilizado en la presente invención que existe en un sujeto humano o un sujeto animal, es posible determinar que el sujeto humano o el sujeto animal contraerán un trastorno mental. Adicionalmente, el diagnóstico se puede realizar mediante el uso, como indicación de un valor cuantitativo del anticuerpo utilizado en la presente invención, como sigue: Se ajusta apropiadamente un valor umbral de acuerdo con un valor cuantitativo (valor normal) medido en una persona sana o un valor cuantitativo (valor del trastorno) medido en un paciente típico con trastornos mentales; si el valor medido en un sujeto está por encima o por debajo del valor umbral, se determina que el sujeto contraerá un trastorno mental con una alta probabilidad. Una vez que se desarrolla un trastorno mental, se incrementa la cantidad del anticuerpo. En vista de esto, en la presente invención, por ejemplo, un valor cuantitativo (valor normal) medido en una persona sana se establece como un valor umbral; si el valor medido en un sujeto humano está por debajo del valor umbral, se puede determinar que el sujeto humano contraerá un trastorno mental con una alta posibilidad.

Obsérvese que el término "sujeto humano" en la presente memoria significa un ser humano, y el término "sujeto animal" significa un animal que no sea un ser humano. Los ejemplos del sujeto animal abarcan ratones, ratas y monos. No solo eso, cualquier animal que no sea un ser humano puede ser un "sujeto animal".

Por lo tanto, este método de diagnóstico hace que sea posible determinar con facilidad y precisión (i) si un sujeto tiene o no un trastorno mental o (ii) si un sujeto tiene o no una posibilidad de contraer un trastorno mental. Adicionalmente, el método de diagnóstico para un sujeto animal será muy útil, p. ej., para el escrutinio de fármacos para el desarrollo de agentes terapéuticos para los trastornos mentales y de sujetos animales para someter a ensayo la eficacia del fármaco.

(7-3) Kit de determinación, Kit de diagnóstico

Solamente es necesario que el kit de determinación y el kit de diagnóstico de la presente invención sean diseñados cada uno para permitir llevar a cabo el método de determinación descrito en el apartado (7-1) anterior o el método de diagnóstico descrito en el apartado (7-2) anterior. Las configuraciones específicas, los materiales, los aparatos y otros de estos no están específicamente limitados. Para ser más específicos, con el fin de detectar inmunológicamente el anticuerpo de la presente invención, cada uno de los kits de determinación y kits de diagnóstico incluye preferiblemente cualquiera de: (i) una proteína de la presente invención; (ii) un fragmento parcial (que incluye preferiblemente un péptido portador de epítopo) de la proteína (i); y (iii) un aparato de detección en el que se inmovilizan la proteína (i) o el fragmento parcial (ii).

- 5
- 10 Un kit que tiene la configuración anterior es muy útil, ya que semejante kit hace que sea posible llevar a cabo fácilmente y de forma fiable el método de determinación o el método de diagnóstico de la presente invención.

Adicionalmente, además de la configuración anterior, cada uno de los kits de determinación y los kits de diagnóstico puede incluir un elemento para realizar cada etapa del método de determinación o el método de diagnóstico. Los ejemplos del semejante elemento incluyen: aparatos para tomar una muestra de un sujeto (p. ej., una jeringa (inyector) para la recogida de sangre periférica); y elementos necesarios para llevar a cabo el método de determinación y/o el método de diagnóstico tales como aparatos de laboratorio y diversos reactivos (p. ej., reactivos utilizados para una reacción inmunológica tal como ELISA). Adicionalmente, cada uno de los kits de determinación y kits de diagnóstico puede incluir una unidad aritmética (p. ej., un ordenador) o un soporte lógico, cada uno de los cuales se requiere para llevar a cabo la determinación más fácilmente y con precisión.

- 15
- 20 (7-4) Métodos para la producción, determinación, escrutinio y evaluación de un modelo animal

El método diagnóstico de la presente invención es aplicable a: un método para producir un modelo animal (que no sea un ser humano) de un trastorno mental; un método para determinar la utilidad del modelo animal; y un método para determinar la utilidad de un fármaco por medio del escrutinio de fármacos utilizando el modelo animal. Específicamente, como se describe en el Ejemplo, el modelo animal del trastorno mental puede ser producido mediante la introducción de la proteína SITH-1 en el cerebro de un animal utilizando, p. ej., un vector. Adicionalmente, la utilidad del modelo animal del trastorno mental se puede determinar como sigue: Al igual que en el método de determinación y el método de diagnóstico, se determina si un sujeto animal desarrolla o no un trastorno mental, dependiendo de la presencia o ausencia del anticuerpo de la presente invención; si el sujeto animal ha desarrollado el trastorno mental, se puede determinar que el sujeto animal es útil como modelo animal de la enfermedad mental.

- 25
- 30

Es más preferible que cada uno de los diversos métodos anteriores utilice adicionalmente, como medio de evaluación, un método de diagnóstico que utilice p. ej., un trastorno del comportamiento y/o una respuesta de sobresalto del animal conocidos hasta ahora. En concreto, para el diagnóstico de los ensayos con animales, se puede emplear cualquiera de los siguientes: (i) un ensayo de un trastorno del comportamiento, p. ej., un ensayo de suspensión por la cola o un ensayo de natación forzada; y (ii) un ensayo de una función del cerebro conocida, p. ej., respuesta de sobresalto.

- 35

El "sujeto animal" en la presente memoria puede ser cualquier animal que no sea un ser humano, cuyos ejemplos particularmente preferibles incluyen ratones, ratas, cobayas, perros, conejos, monos, y jockos. La determinación (diagnóstico) de los trastornos mentales de los animales que no sean un ser humano fue más difícil. Por lo que respecta a esto, el método de la presente invención es bastante útil. Adicionalmente, se puede administrar una sustancia candidato para un agente psicotrópico o un agente antipsicótico (un agente para tratar o mejorar un trastorno mental) a un modelo de tal animal, y, posteriormente, se puede llevar a cabo un ensayo para el trastorno de la conducta y la detección del anticuerpo de la presente invención de la manera descrita anteriormente. A continuación, si el trastorno mental se cura o mejora, se puede determinar que la sustancia candidato tiene un efecto anti-trastorno mental. Por lo tanto, el uso del método de diagnóstico de la presente invención hace que sea posible llevar a cabo de manera fácil y fiable el escrutinio de una sustancia candidato para un agente psicotrópico. La "sustancia candidato para un agente psicotrópico" en la presente memoria puede ser cualquier sustancia deseada por la persona que lleva a cabo el ensayo.

- 40
- 45

Obsérvese que la cuestión del método de determinación, el método de diagnóstico o similares de la presente invención es proporcionar un método de determinación objetivo para determinar si un sujeto contrae o no un trastorno mental mediante la detección de un anticuerpo contra una proteína que se expresa específicamente durante la infección latente con un herpesvirus, y no reside en cada manipulación descrita específicamente en la presente memoria. Por lo tanto, hay que señalar que los métodos de determinación y los métodos de diagnóstico que utilizan manipulaciones distintas de las descritas anteriormente están también comprendidos en el alcance de la presente invención siempre que sean abarcados por las reivindicaciones.

- 50
- 55

Adicionalmente, se considera que la infección con herpesvirus está relacionada con: enfermedades acompañadas de inmunodeficiencia tales como SFC, que se describe también en el Ejemplo, (p. ej., enfermedades autoinmunitarias tales como la enfermedad de Crohn); enfermedades cutáneas que se consideran asociadas con

HHV-6 (p. ej., síndrome de hipersensibilidad inducida por fármacos); y encefalitis y encefalopatía inducidas por HHV-6. Por lo tanto, cabría considerar que el método de determinación y el método de diagnóstico de la presente invención también permiten el diagnóstico y la evaluación objetivos de estas enfermedades. La presente invención, sin embargo, está limitada solamente a los trastornos del estado de ánimo. Todas las demás enfermedades se mencionan solamente con fines informativos.

Es decir, la proteína, el gen y otros utilizados en la presente invención se pueden utilizar como un marcador de la enfermedad para diversas enfermedades en las que podría estar involucrado HHV-6.

Adicionalmente, la presente invención también abarca un modelo animal producido por transferencia del gen utilizado en la presente invención descrita anteriormente, un producto génico del mismo (p. ej., una proteína codificada por el gen), o un vector de expresión recombinante que tiene el gen. Dado que el gen utilizado en la presente invención está implicado en un trastorno mental como se ha descrito anteriormente, el modelo animal producido por la transferencia del gen, el producto génico del mismo (p. ej., la proteína codificada por el gen), o el vector de expresión recombinante que tiene el gen manifiesta un síntoma del trastorno mental. Los ejemplos de los síntomas del trastorno mental abarcan síntomas de tipo maniaco-depresivo, síntomas de tipo manía, síntomas de tipo depresión, y, en función del método de ensayo, síntomas de tipo esquizofrenia. La presente invención, sin embargo, está limitada solamente a los trastornos del estado de ánimo. Todas las demás enfermedades se mencionan solamente con fines informativos.

El sujeto animal no se limita a ninguno específico, siempre que esté disponible como un animal de ensayo. Uno particularmente preferible es un mamífero, por ejemplo, un ratón, una rata, o un mono.

Además, el método para la transferencia del gen, el producto del gen y el vector de expresión recombinante puede ser un método conocido convencionalmente, y no está limitado a ninguno específico. Por ejemplo, un método para hacer que la proteína utilizada en la presente invención se exprese en el cerebro puede ser un método que utiliza un vector de adenovirus o un método que utiliza un vector de retrovirus (véase el Ejemplo descrito más adelante), y, por supuesto, puede ser cualquiera de los métodos que utilizan vectores que no son un vector de adenovirus o un vector de retrovirus. Alternativamente, se puede utilizar la transferencia de genes utilizando un transgén general (p. ej., la producción de un ratón transgénico). También alternativamente se puede utilizar, un método para inocular directamente la proteína utilizada en la presente invención en el cerebro.

El modelo animal del trastorno mental se puede utilizar adecuadamente, por ejemplo, para el estudio sobre los métodos de tratamiento para los trastornos mentales, el estudio sobre los efectos de los fármacos, la determinación de los efectos de los fármacos, y la evaluación de los métodos de tratamiento (p. ej., termoterapia) que no son métodos de tratamiento que utilizan fármacos, y por lo tanto es muy útil.

Adicionalmente, el modelo animal puede ser utilizado para el estudio de un factor relacionado con un factor de desarrollo de un trastorno mental. El modelo animal también se puede utilizar para la investigación de la prevención del desarrollo de los trastornos mentales p. ej., mediante el estudio de la cantidad de fatiga y estrés que están involucrados en la inducción de un trastorno mental.

A continuación se muestran Ejemplos para describir las realizaciones de la presente invención con mayor detalle. Huelga decir que la presente invención no se limita a los Ejemplos de más abajo, y que se pueden adoptar diversas formas para los detalles. Adicionalmente, la presente invención no se limita a la descripción de las realizaciones anteriores, sino que puede ser alterada por un experto dentro del alcance de las reivindicaciones. Se incluye una realización basada en una combinación adecuada de medios técnicos descritos en las diferentes realizaciones dentro del alcance técnico de la presente invención.

Ejemplos

<1. Identificación de productos génicos (ARNm) que codifican la proteína específica de la infección latente SITH-1>

Se separó el ARN mensajero (ARNm) de los macrófagos descritos en el Documento No de Patente 1 que fueron infectados de forma latente con HHV-6, y se realizó una reacción de transcripción inversa utilizando cebadores aleatorios, IE4RB como cebador para la transcripción inversa de los transcritos efectores, e IE2FB como cebador para la transcripción inversa de los transcritos antisentido. Después de eso, los transcritos inversos resultantes (ADNc) se amplificaron mediante la técnica de PCR utilizando los cebadores IE4RB e IE2FB, y los productos fueron amplificados adicionalmente por medio de la técnica de doble PCR anidada utilizando los cebadores internos IE4RA e IE2FA. La Fig. 1 muestra (i) la correspondencia entre el transcrito efector (H6LT) del ARNm conocido durante la infección productiva y el nuevo gen específico de la infección latente y (ii) un marco de lectura abierto de la proteína específica de la infección latente SITH-1. Para los detalles de la información de secuencia sobre SITH-1 y el nuevo gen específico de la infección latente, véase la lista de secuencias.

Como resultado, la amplificación proporcionó un producto de 925 pb, que difería tanto de (i) un producto de 351 pb amplificado a partir del ARNm que está siendo expresado en células MT-4 que habían sido infectadas productivamente con HHV-6 y (ii) un producto de 351 pb amplificado a partir de un producto génico específico de la infección latente (transcrito asociado a la latencia de HHV-6: H6LT), que se describe en el Documento No de Patente

3, que era detectable durante la infección latente de macrófagos (MΦ) con HHV-6.

Este producto también era diferente de un producto de 1241 pb amplificado a partir de ADN de HHV-6 ya que se había amplificado únicamente a partir del producto de la transcripción inversa de los transcritos antisentido en las células infectadas de forma latente con HHV-6. A partir de esto, se demostró que este producto era un producto génico específico de la infección latente novedoso desconocido hasta ahora (véase la Fig. 2). En la Fig. 2, "R" significa un cebador aleatorio, "S" significa un transcrito efector, y "anti-S" significa un transcrito anti-sentido.

Para determinar la estructura de este ARNm del gen específico de la infección latente novedoso, se realizaron un método de amplificación rápida 5' de los extremos de ADNc (RACE) y un método 3'-RACE, por medio de los cuales se determinaron no solamente los extremos 5' y 3', sino también la secuencia de nucleótidos total (véase la Fig. 3).

10 IE4RB: 5'-GATGCTCCTTCTTCCACATTACTGG-3'
 IE2FB: 5'-CATCCCATCAATTATTGGATTGCTGG-3'
 IE2FA: 5'-GAAACCAC- CACCTGGAATCAATCTCC-3'
 IE4RA: 5'-GACACATTCTTGGGAAGCGATGTCG-3'
 N 1: 5'-GCTGGGTAGTCCCCACCTTTCTAGA-3'
 15 αF1: 5'-CTGAAGCATGTAAGCACATCTCTTGC-3'
 αR1: 5'-GCTTCGAGATCAGTAGTGGTACG-3'

<2. Análisis funcional de la proteína del gen específico de la infección latente novedosa SITH-1>

Para estudiar la función de la proteína SITH-1, se identificó una proteína anfitriona a la que se uniría la proteína SITH-1 dentro de las células. Esto se realizó mediante el escrutinio de una biblioteca de ADNc de cerebro fetal humano por medio del análisis de dos híbridos de levadura con la proteína SITH-1 utilizada como cebo. El resultado se muestra en la Fig. 4. En la Fig. 4, (A) muestra clones de levadura en los que se expresaba fuertemente la β-galactosidasa debido a la unión entre SITH-1 y CAML; (B) muestra un diagrama que verifica mediante transferencia Western y tinción de anticuerpos anti-CAML que, en el análisis de interacción ("pull-down") *in vitro*, CAML expresada en *E. coli* podría ser precipitada conjuntamente con una proteína de fusión GST-SITH-1 que también se expresaba en *E. coli*; y (C) muestra un diagrama que verifica mediante transferencia Western y tinción de anticuerpos anti-FLAG que, después de que SITH-1 con una etiqueta FLAG y CAML fueran transferidas a células 293T utilizando un vector de expresión, SITH-1 podría ser precipitada conjuntamente con anticuerpos anti-CAML. Como muestra la Fig. 4, se encontró que la proteína SITH-1 se unía fuertemente al ligando de ciclofilina modulador de la señal de calcio (CAML).

30 CAML es una proteína que se ha informado que muestra una fuerte expresión en los linfocitos y en el cerebro, y se sabe que CAML tiene capacidad de aumentar la concentración de calcio intracelular. Por lo tanto, con el fin de observar si la proteína SITH-1 podría estar mediada por CAML para aumentar la concentración de calcio intracelular, se tiñeron tanto la línea de células gliales de tipo astrocito (U373) en las que se había expresado SITH-1 como células U373 no tratadas por medio de la técnica de anticuerpos fluorescentes usando anticuerpos anti-SITH-1 y anticuerpos anti-CAML. Resultó que, cuando se expresaba la proteína SITH-1 en la línea de células gliales de tipo astrocito (U373), se encontraba más CAML que en las células U373 no tratadas (Fig. 5). El nivel de expresión de CAML en las células U373 no fue muy alto cuando las células U373 se dejaron sin tratar, pero se encontró que se producía más CAML mediante la expresión de SITH-1 en las células U373.

40 En otro experimento, se prepararon dos muestras; se preparó una muestra mediante transferencia de SITH-1 a una línea de células gliales de tipo astrocito (U373) a través de un vector de retrovirus, y se preparó otra muestra mediante la introducción del vector solo en U373. Cada muestra fue estimulada con tapsigargina (TG), y se midió la concentración de calcio intracelular utilizando Fura2. Como resultado, la medición real de la concentración de calcio intracelular demostró que a causa de la estimulación con tapsigargina (TG), la concentración de calcio intracelular en la línea de células gliales de tipo astrocito que expresaban SITH-1 era considerablemente mayor que en las células en las que solamente se había transferido el vector (Fig. 6).

A partir de estos resultados, se encontró que la proteína SITH-1 tiene capacidad para aumentar la concentración de calcio intracelular en una línea de células gliales de tipo astrocito al ser expresada durante la infección latente con HHV-6 para incrementar la cantidad de CAML intracelular.

<3. Relación entre SITH-1 y los trastornos del estado de ánimo >

50 En la siguiente etapa, los autores de la presente invención estudiaron la relación entre SITH-1 y los trastornos mentales. Los resultados se muestran en la Fig. 7. A diferencia de la proteína del gen específico de la infección latente referida, p. ej., en el Documento no de Patente 5, la relación entre un anticuerpo contra SITH-1 y los pacientes con síndrome de fatiga crónica fue baja, pero la frecuencia de portadores de anticuerpos fue alta entre los

pacientes con síndrome de fatiga crónica acompañado de trastornos mentales. En muchos casos, los pacientes con síndrome de fatiga crónica (SFC) acompañado de síntomas psiquiátricos principalmente manifestaron síntomas depresivos, mientras que los pacientes con SFC infantil presentaron principalmente síntomas de agitación anormal. En la Fig. 7, "bipolar I" se refiere a los pacientes con enfermedad maniaco-depresiva de síntomas graves. Los adultos sanos apenas llevaban el anticuerpo contra SITH-1. Para la medición del título de anticuerpos, las células 293T que expresaban SITH-1 se utilizaron como antígenos, y se aplicó la técnica de anticuerpos fluorescentes.

<4. Construcción de ratones modelo de trastorno mental por medio de la expresión de SITH-1>

Se inyectó SITH-1 que tenía un promotor de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) ligado aguas arriba de su marco de lectura abierto en el cerebro de ratones recién nacidos utilizando un vector de adenovirus o un vector de retrovirus. GFAP es una proteína expresada específicamente en las células gliales tales como los astrocitos. Aproximadamente cuatro o cinco semanas después de la inyección, se observó el comportamiento de cada ratón para confirmar que los ratones modelo con trastornos mentales se habían establecido mediante la transferencia de SITH-1.

Se llevaron a cabo la prueba de suspensión por cola y la prueba de natación forzada para evaluar los trastornos mentales; estas pruebas se usan comúnmente para observar a los pacientes con depresión o enfermedad maniaco-depresiva. Específicamente, los ratones a los que se había transferido SITH-1 utilizando un vector de adenovirus fueron sometidos a una prueba de suspensión por la cola. Resultó que, los ratones a los que se había transferido SITH-1 tuvieron un tiempo de inmovilidad notablemente más corto, lo que indica que estos ratones estaban en un estado maniaco (Fig. 8). Con posterioridad, los ratones a los que se había transferido SITH-1 utilizando un vector de retrovirus fueron sometidos a una prueba de natación forzada. Resultó que, los ratones a los que se había transferido SITH-1 utilizando el vector de retrovirus a un título ELEVADO presentaban más tiempo de inmovilidad que los ratones de control a los que se había transferido el gen de la proteína fluorescente verde intensificado (EGFP), lo que indica que los ratones a los que se había transferido SITH-1 a un título ELEVADO se encontraban en un estado de depresión. En contraste, los ratones a los que se había transferido SITH-1 utilizando el vector de retrovirus a un título BAJO presentaron un tiempo de inmovilidad más corto, lo que indica que los ratones a los que se había transferido SITH-1 a título BAJO se encontraban en un estado maniaco (Fig. 9). Por lo tanto, se observó el estado maniaco en la prueba de suspensión por la cola, mientras que se observaron tanto el estado maniaco como el estado deprimido en la prueba de natación forzada. Adicionalmente, el hecho de que se observara, el estado maniaco o el estado depresivo en función del título del vector de retrovirus utilizado para introducir SITH-1 no solo demuestra que el modelo de interés puede servir como modelo de depresión y de enfermedad maniaco-depresiva por igual, sino que también sugiere que la cantidad de expresión de SITH-1 afecta a los síntomas de los trastornos mentales.

Los autores de la presente invención también midieron una inhibición prepulso con el fin de comprobar si hay alguna anomalía en una respuesta de sobresalto, cuya anomalía se pueden encontrar en pacientes con enfermedad maniaco-depresiva y esquizofrenia. Específicamente, se evaluaron los ratones a los que se había transferido SITH-1 utilizando el vector de adenovirus para determinar una respuesta de sobresalto midiendo la inhibición de prepulso. El resultado se muestra en la Fig. 10; resulta que, los ratones a los que se había transferido SITH-1 tenían una inhibición de prepulso notablemente inferior, lo que indica que estos ratones se habían vuelto demasiado sensibles a los estímulos. Por lo tanto, también se observó una considerable anomalía en la respuesta de sobresalto, lo que indica que SITH-1 afecta en gran medida a la función del cerebro asociada con los trastornos mentales.

<5. Construcción 2 de ratones modelo de trastorno mental por medio de la expresión de SITH-1>

A continuación, se ligó un marco de lectura abierto de SITH-1 aguas abajo de un promotor de GFAP, y se expresó en células gliales de ratones usando un vector de adenovirus; tres semanas más tarde, se midió la actividad motora de los ratones en términos de actividad en la rueda giratoria. El resultado se muestra en la Fig. 11.

Como muestra la Fig. 11, en comparación con los ratones de control en los que se había expresado EGFP (proteína fluorescente verde intensificada), los ratones que expresaban SITH-1 presentaban una intensificación de su actividad motora, y los ratones que expresaban SITH-1 mostraban una tendencia a permanecer en un estado maniaco.

<6. Construcción 3 de ratones modelo de trastorno mental por medio de la expresión de SITH-1>

Con posterioridad, se ligó un marco de lectura abierto de SITH-1 aguas abajo de un promotor de GFAP, y se expresó en células gliales de ratones utilizando un vector de lentivirus; ocho semanas después, se midió la actividad motora de los ratones en términos actividad en la rueda giratoria. El resultado se muestra en la Fig. 12.

Como se muestra la Fig. 12, en comparación con los ratones de control en los que se expresó EGFP (proteína fluorescente verde intensificada), los ratones que expresaban SITH-1 presentaban una supresión de su actividad motora, y los ratones que expresaban SITH-1 mostraron una tendencia a permanecer en un estado de depresión.

Como se puede observar en las Figs. 11 y 12, se encontró que la misma SITH-1 provocaba dos fenómenos opuestos, un estado maniaco y un estado deprimido. Las razones serían las siguientes: 1) la SITH-1 portada por el vector de adenovirus se expresaba en una cantidad mayor que cuando la SITH-1 era portada por el vector de

lentivirus; 2) por otro lado, el vector de lentivirus permitió que SITH-1 fuera expresada durante un período más largo, de manera que se observó el efecto de la expresión prolongada de SITH-1.

5 Este hecho, es decir, los ratones modelo de un estado maníaco y de un estado deprimido pueden ser construidos ambos mediante la expresión de SITH-1, se puede describir que proporcionan un resultado en buen acuerdo con el hallazgo clínico de que los anticuerpos contra SITH-1 se detectan tanto en pacientes con enfermedad maníaco-depresiva como en pacientes con depresión.

<7. Diagnóstico utilizando SITH-1 como marcador>

Se realizó un estudio para ver si el diagnóstico basado en SITH-1 también podría ser útil en el diagnóstico de otras enfermedades complicadas por la depresión. Los resultados se muestran en la Fig. 13.

10 El diagnóstico basado en el anticuerpo anti-SITH-1 es bastante específico para los trastornos del estado de ánimo tales como la depresión, la enfermedad maníaco-depresiva, y el síndrome de fatiga crónica. Sin embargo, como muestra la Fig. 13, el mismo diagnóstico mostró excepcionalmente una alta tasa positiva entre los pacientes con enfermedad de Crohn. Los pacientes con colitis ulcerosa, que es similar a la enfermedad de Crohn, no mostraron ningún resultado positivo.

15 Sin embargo, se sabe que la enfermedad de Crohn está más frecuentemente complicada por "síntomas depresivos", y las personas positivas para anticuerpos anti-SITH-1 mostradas en la Fig. 13 son casos de enfermedad de Crohn que eran suficientemente graves como para estar complicados por síntomas depresivos. El ejemplo en cuestión muestra que incluso en estos casos graves, en los que los pacientes con enfermedad de Crohn, que es una enfermedad crónica clasificada como una enfermedad autoinmunitaria, que también presentan síntomas depresivos,
20 la depresión puede ser diagnosticada utilizando SITH-1 como marcador. En otras palabras, se puede considerar que los ensayos con el anticuerpo anti-SITH-1 "también son útiles en el diagnóstico de la depresión causada por otras enfermedades, no psiquiátricas".

Aplicabilidad Industrial

25 Como se ha descrito anteriormente, el gen y la proteína utilizados en la presente invención son cada uno un factor implicado en la infección latente con un herpesvirus. Mediante el uso del gen y/o la proteína como un marcador, es posible determinar objetivamente si un sujeto contrae o no un trastorno mental. Por lo tanto, la presente invención no solo proporciona beneficios en los ámbitos académicos y los ámbitos de la investigación básica, sino que también tiene importancia en los ámbitos de la medicina clínica. Por lo tanto, la presente invención es aplicable en diversos aspectos de la industria.

30

Lista de secuencias

- <110> Virus Ikagaku Kenkyusho Inc.
- 5 <120> Nuevo factor implicado en la latencia del herpesvirus y uso del mismo
- <130> SK0843
- <150> JP2007-250461
- 10 <151> 2007-09-27
- <160> 10
- <170> PatentIn version 3.1
- 15 <210> 1
- <211> 159
- <212> PRT
- <213> Herpesvirus humano 6
- 20 <400> 1
- Met Gly Tyr Glu Glu Lys Val Ser Ala Thr Gly Lys Thr Arg Leu Lys
1 5 10 15
- Ile Leu Ala Cys Leu Ile Val Leu Ile Leu Ala Ala Ala Ile Thr Met
20 25 30
- Leu Thr Leu Glu Ile Ile Ser Asn Gln Lys Arg Thr Thr Thr Asp Leu
35 40 45
- Glu Ala Val Thr Val Ala Leu Lys His Val Ser Thr Ser Leu Ala Ser
50 55 60
- Cys Thr Glu Ser Thr Thr Ser Val His Thr Asp Ser Val Thr Ser Gln
65 70 75 80
- Pro Thr Lys Asn Lys Glu Ser Arg Lys Lys Ile Glu Gly Lys Ser Pro
85 90 95
- Ser Trp Val Gln Ala Leu Thr Thr Ala Ser Gly Ile Ile Leu Leu Phe
100 105 110
- Cys Ile Met Met Ile Phe Ile Thr Cys Ser Trp Thr Thr Glu Lys Asp
115 120 125
- Thr Glu Lys Ser Glu Val Gln Ser Tyr Ala Ser Ser Val Glu Thr Leu
130 135 140
- Asp Ser Leu Asn Glu Ala Ile Ile Pro Lys Thr Glu Met Asn Val
145 150 155
- 25 <210> 2
- <211> 480
- <212> DNA
- <213> Herpesvirus humano 6
- 30 <400> 2

ES 2 554 340 T3

```

atgggatatg aagaaaaagt gtcagctact ggaaagactc gtttaaagat actggcatgt    60
ctgatcgttt taatactagc tgcggcaata actatgttaa cgctggaat tatatcgaac    120
caaaaacgta ccontactga tctcgaagct gtgactgtgg cgctgaagca tgtaagcaca    180
tctcttgcca gctgcactga atccactact tctgtacata ccgattctgt gacgagccaa    240
cccacgaaaa acaaagaatc gaggaaaaaa attgaaggga aatctccaag ttgggttcag    300
gctttaacta cagcatctgg aattatccta ctgttttgta taatgatgat attcattaca    360
tgttcctgga ccacagaaaa agatacagag aagagtgaag tgcaatctta tgcttcttca    420
gtagagactt tagactcttt aaatgaggct attataccga aaactgaaat gaatgtgtaa    480

```

<210> 3

<211> 1795

5 <212> DNA

<213> Herpesvirus humano 6

<400> 3

```

aggctctgct ggaggctctg ctggaggcct tgctgaaggc tctgctggag gccctgctgg    60
aggctctgct ggaggctctg ctggaggctc tgctggaggc tctgctggag gctctgctgg    120
aggctctgct ggaggctctg ctggaggctc tgcagagac ctcggtgaaa gttttactca    180
gaggtttatac agagttttcg ccattagttt ggttagaagt ttcagattta ttttcggtgg    240
aactgcagtt aggtttcatg tcagtacatt catcaccgtt agaagtgcta ttcattggtgc    300
tgttgccact gttggatttg ttaaaagcag taaatgagct aggattggaa tgactccgaa    360
tagctaataa atttgagcat tttcttcgaa tggatcataa tcagagggat agccatctaa    420
tttaaagact tccattttat cactgttgca atcacttcta atggagtatc tggatacatt    480
ttttctacat ctttttcatc ccctccaaca tggatctgtg cagcgттаат aagccagcgg    540
agttaattaa atcgtcttcc atggttagaca gttcctggtt catggcagcc ttcactgatg    600
caccaatact ttggatgcaa gtgccaacgg actgagctag gatgtaaaag aagatattct    660
aattttgaat tcttcagatg ctcttcttcc cacattactg gaataggaca cattcttgga    720
agcgatgtcg ttggaagact ctgggatgaa aagatcacag gcttccagtt ctggaaaaag    780
caggctttca aaggacacat cacacttgag actctcttcc aatatttctt tgatggattc    840
ttccaccact ggatcgggat ggtagctata tatactatat aaggagatta ccaccaccac    900
ctctttcttt gcagagatta ttctctgctt gaaaatctgt aacctgatc atgatgggat    960

```

10

ES 2 554 340 T3

```

atgaagaaaa agtgtcagct actggaaaga ctcgtttaaa gatactggca tgtctgatcg 1020
ttttaatact agctgcggca ataactatgt taacgctgga aattatatcg aacccaaaaac 1080
gtaccactac tgatctcgaa gctgtgactg tggcgcgtgaa gcatgtaagc acatctcttg 1140
ccagctgcac tgaatccact acttctgtac ataccgattc tgtgacgagc caaccacga 1200
aaaacaaaga atcgaggaaa aaaattgaag ggaaatctcc aagttgggtt caggctttaa 1260
ctacagcatc tggaaattatc ctactgtttt gtataatgat gatattcatt acatgtccct 1320
ggaccacaga aaaagataca gagaagagtg aagtgcaatc ttatgctcct tcagtagaga 1380
cttttagacc tttaaatgag gctattatac cgaaaactga aatgaatgtg taatgtctgt 1440
atTTTTcttt acagagatgt acggagagtt tatatTTTggg gaaaatacct gactgttctg 1500
cctatatgcy aatgttaaag tatgtataat ataaattctt acctTTtaag agtgattcaa 1560
ggtggaggtt tctttggaga ttgattccag gtggtgggtt cgggtgcaat caatctttct 1620
tctgggcggg aagaaaatcc agcaatccaa taattgatgg gatgtaatca atgtcacaaa 1680
tctgtaagat taaatgtgaa cagtataaat tctttcgtgc ttatcaaatt acaattatgc 1740
gcatgaaaat atcattaat tgttttaaac attcttaaaa aaaaaaaaa aaaaa 1795

```

<210> 4
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> cebador

5

<400> 4

10 gatgctcctt ctccacatt actgg 25

<210> 5
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> cebador

15

<400> 5

20 catcccatca attattggat tgctgg 26

<210> 6
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> cebador

25

<400> 6

gaaaccacca cctggaatca atctcc 26

30

<210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> cebador

35

<400> 7

gacacattct tggagcgat gtcg 24

40

<210> 8
 <211> 25
 <212> DNA

ES 2 554 340 T3

<213> cebador

<400> 8

5 gctggtagt cccaccttt ctaga 25

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

10 <213> cebador

<400> 9

15 ctgaagcatg taagcacatc tcttgc 26

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

20 <213> cebador

<400> 10

gcttcgagat cagtagtgg acg 23

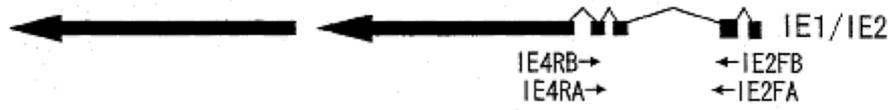
25

REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar un trastorno del estado de ánimo en donde el método comprende determinar la cantidad de un anticuerpo que se une específicamente a SITH-1 en una muestra biológica aislada de un sujeto humano, y en donde:
- 5 i. SITH-1 es
- a. una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;
- b. una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos con una sustitución, delección, inserción, y/o adición de 10 o menos aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, teniendo la proteína la actividad de incrementar la concentración de calcio intracelular o la actividad de unión a ligando de ciclofilina modulador de calcio;
- 10 c. una proteína codificada por un gen que comprende un marco de lectura abierto que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2; o
- d. una proteína codificada por un gen que hibrida en condiciones rigurosas con ADN complementario al ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2, teniendo la proteína la actividad de incrementar la concentración de calcio intracelular o la actividad de unión al ligando de ciclofilina modulador de calcio;
- 15 ii. la cantidad de anticuerpo determinada es mayor que la cantidad medida en una muestra biológica de un sujeto sano.
2. Un método para determinar si un sujeto mamífero no humano es útil o no como modelo de un trastorno del estado de ánimo, que comprende las etapas de:
- 20 (i) determinar la presencia de un anticuerpo que reconoce una SITH-1 como se define en la reivindicación 1, en una muestra biológica aislada de un sujeto mamífero no humano, en donde el sujeto se obtiene mediante transferencia de un gen que codifica una SITH-1 como se define en la reivindicación 1; y
- (ii) en donde el sujeto mamífero no humano es útil como modelo de un trastorno del estado de ánimo si se detecta un anticuerpo que reconoce una SITH-1 como se define en la reivindicación 1.
- 25 3. Un método de escrutinio de sustancias candidato contra los trastornos del estado de ánimo que se corresponde con la presencia de anticuerpos específicos para SITH-1, que comprende las etapas de:
- (a) administrar a un sujeto mamífero no humano, en donde el sujeto se obtiene mediante transferencia de un gen que codifica una SITH-1 como se define en la reivindicación 1, una sustancia candidato; y
- 30 (b) determinar si la sustancia candidato es eficaz o no por medio de:
- i. la detección de un anticuerpo contra SITH-1 como se define en la reivindicación 1, y
- ii. el ensayo con un método de diagnóstico que utiliza un trastorno del comportamiento o una respuesta de sobresalto en dicho mamífero no humano.
4. El uso de un kit para llevar a cabo un método de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1 o un método para determinar si un sujeto mamífero no humano es útil o no como modelo de un trastorno del estado de ánimo de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el kit comprende al menos uno seleccionado entre:
- 35 a. una proteína SITH-1 como se define en la reivindicación 1;
- b. un péptido portador de epítipo que tiene al menos 6 aminoácidos que se une específicamente a un anticuerpo contra la proteína SITH-1 como se define en la reivindicación 1;
- 40 c. un aparato de detección al cual se inmoviliza la proteína del apartado (a) o el péptido portador de epítipo del apartado (b).
5. El método de la reivindicación 1, en donde el trastorno del estado de ánimo es la depresión causada por la enfermedad de Crohn.

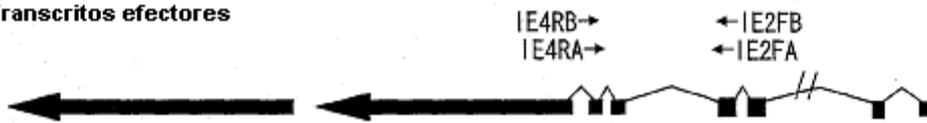
FIG. 1

ARNm durante la infección productiva



ARNm durante la infección latente

Transcritos efectores



Transcritos antisentido

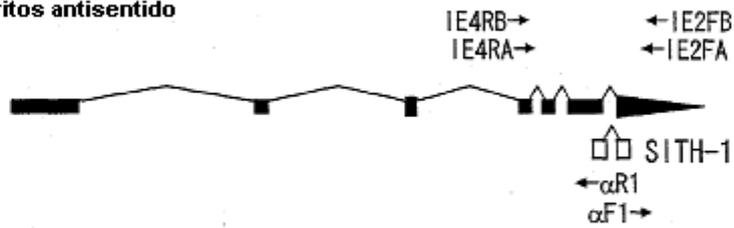


FIG. 2

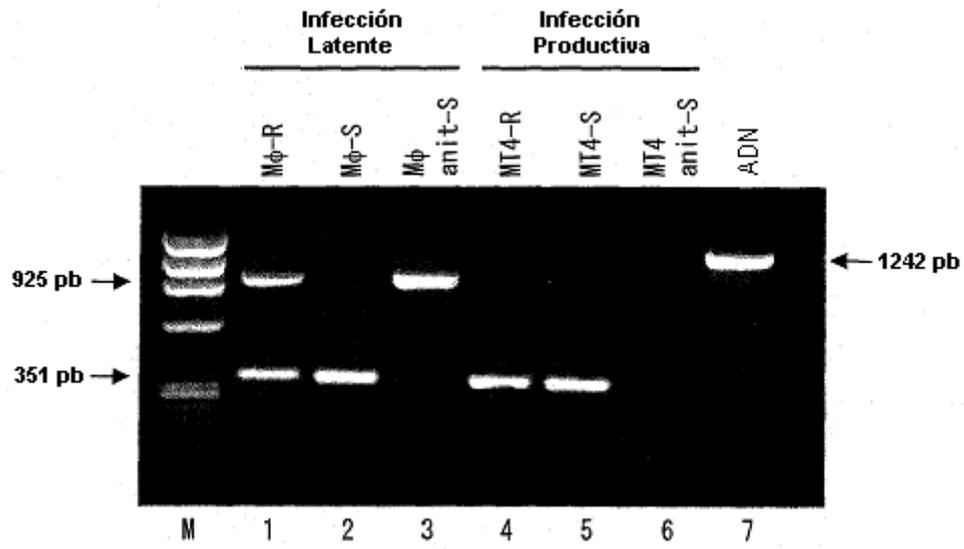


FIG. 3

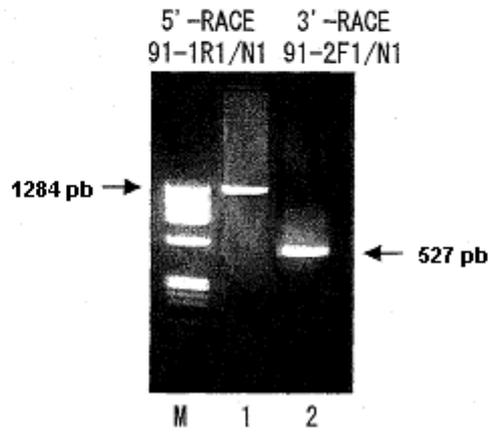


FIG. 4

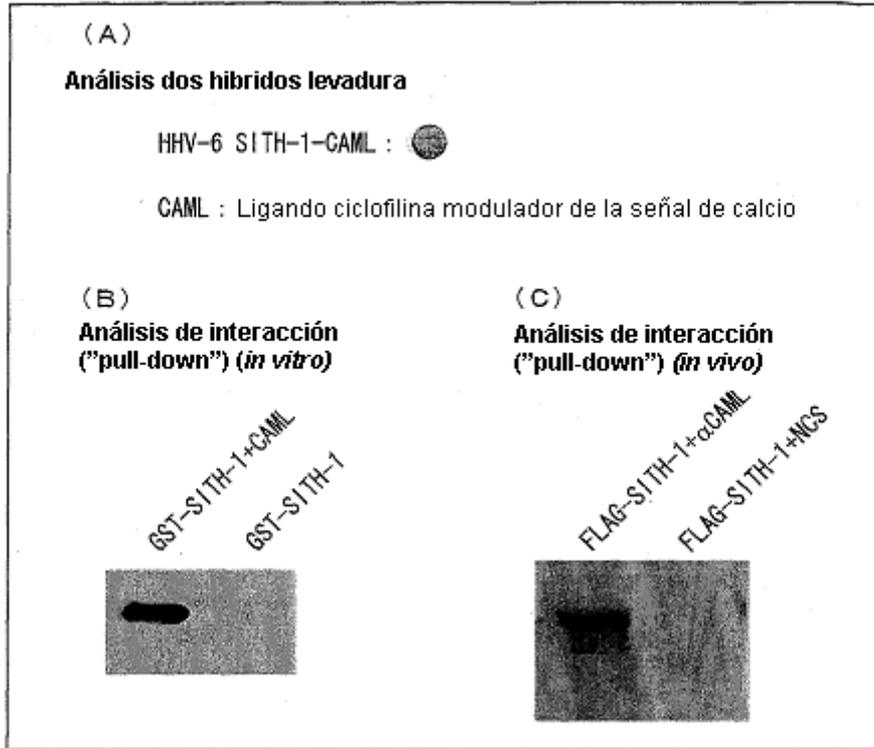


FIG. 5

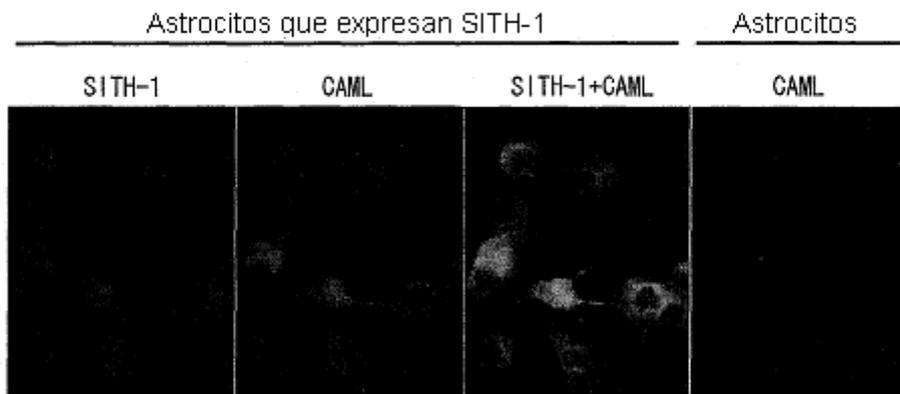
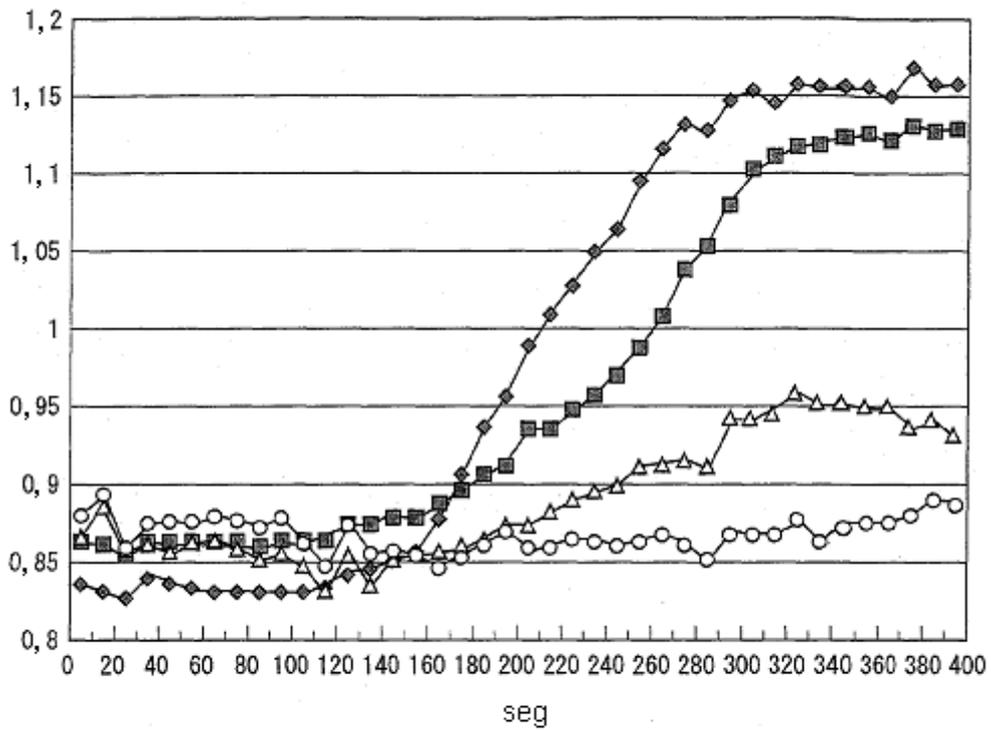


FIG. 6

Cambios en el nivel de calcio intracelular



- ◆ Experimento 1 con U373-SITH-1
- Experimento 2 con U373-SITH-1
- △ Experimento 1 con vector U373 solo
- Experimento 2 con vector U373 solo

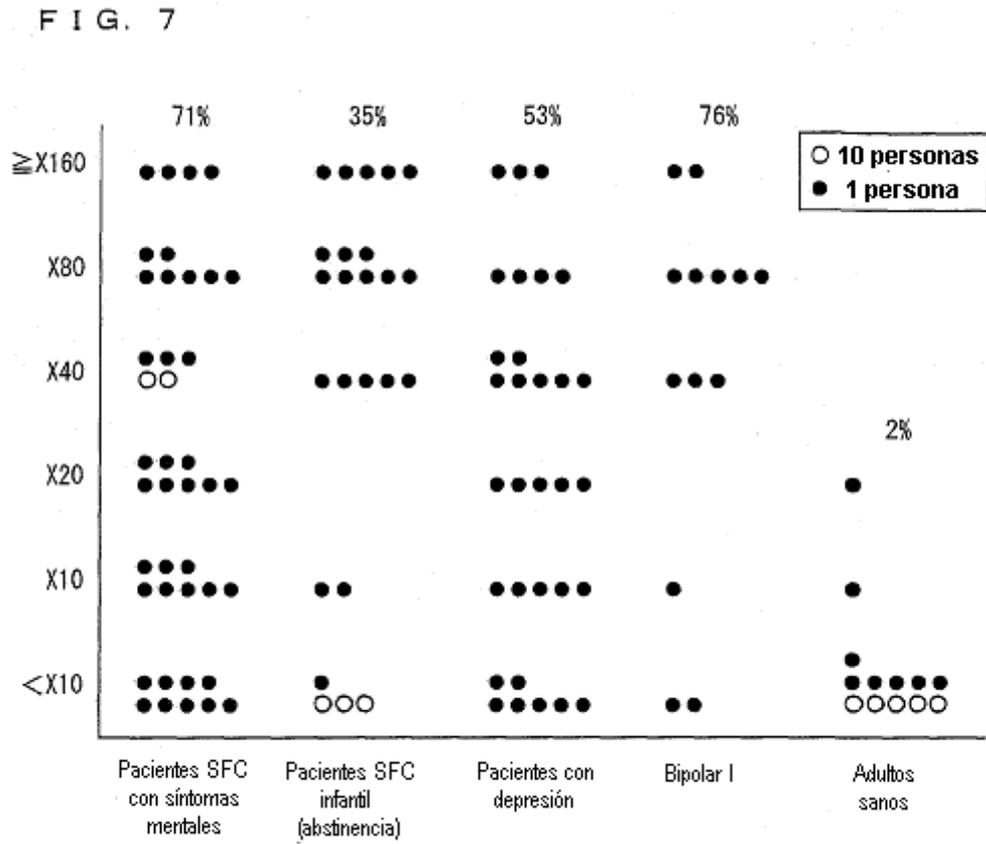


FIG. 8

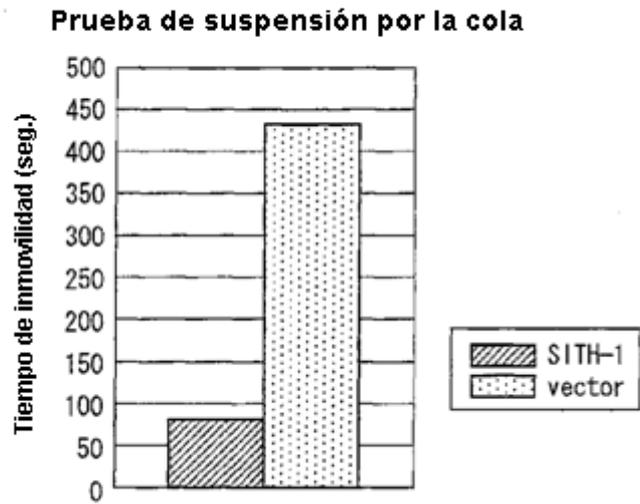


FIG. 9

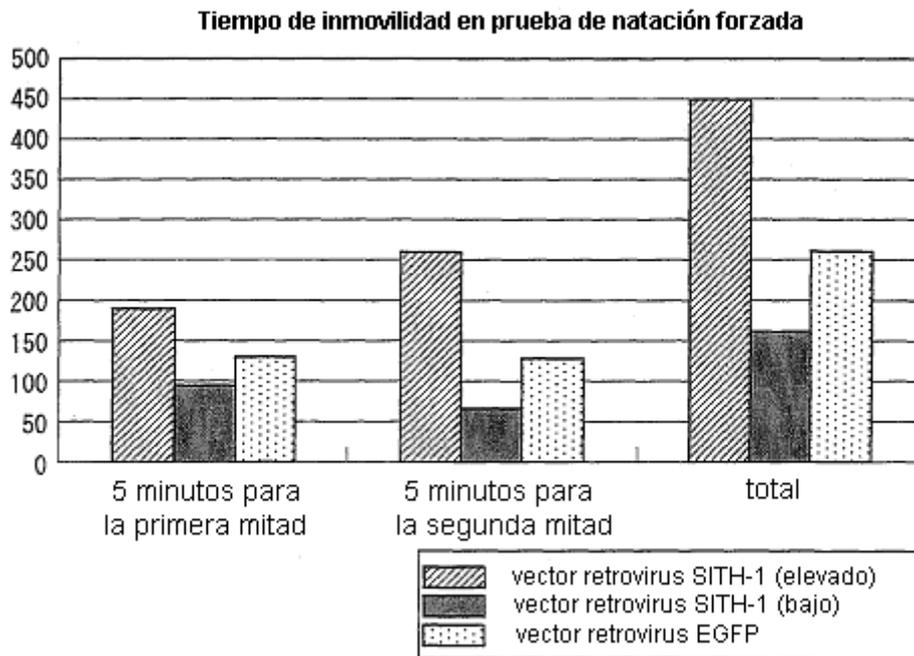


FIG. 10

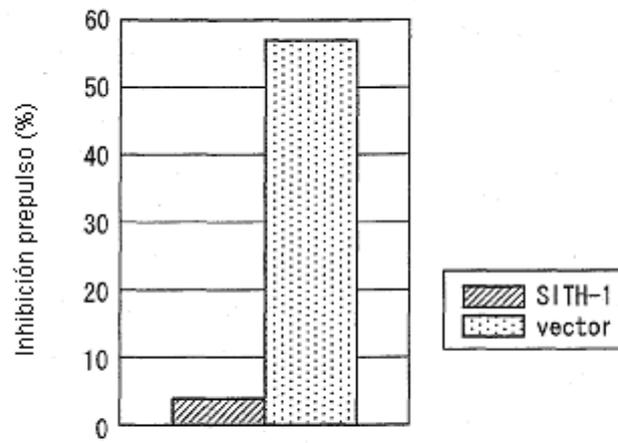


FIG. 11

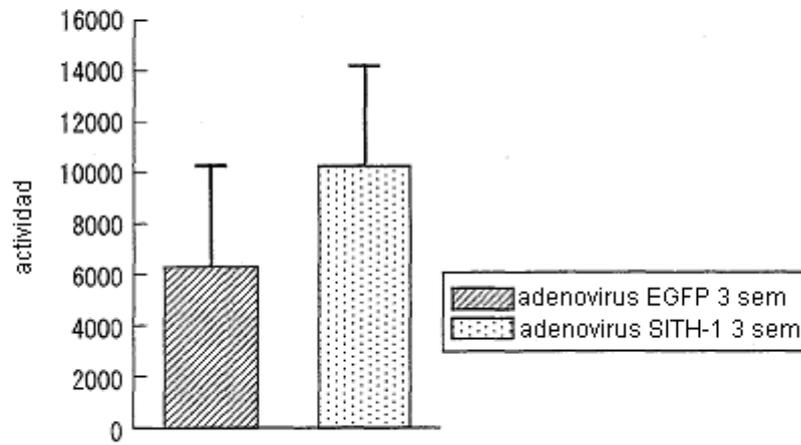


FIG. 12

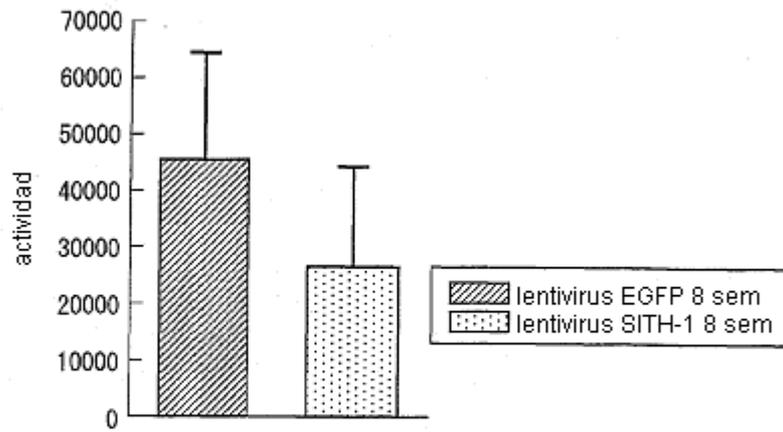


FIG. 13

