

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 866**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2009 PCT/CA2009/000829**
87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2009 WO2009149560**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2009 E 09761218 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2294081**

54 Título: **Composiciones y métodos para modular la interacción y la función del receptor de dopamina D1-D2**

30 Prioridad:

12.06.2008 US 60948 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.05.2017

73 Titular/es:

**CENTRE FOR ADDICTION AND MENTAL HEALTH
(100.0%)
33 Russell Street, T108
Toronto, Ontario M5S 2S1, CA**

72 Inventor/es:

**LIU, FANG y
PEI, LIN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 613 866 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

Composiciones y métodos para modular la interacción y la función del receptor de dopamina D1-D2

5 Campo de la invención

La presente invención se relaciona con enfermedades o trastornos psiquiátricos, y más particularmente, con composiciones y métodos para modular la interacción y función de los receptores de dopamina D1-D2. Dichas composiciones y métodos son útiles para la prevención y/o tratamiento de trastornos o enfermedades psiquiátricas, particularmente depresión, que incluye trastorno depresivo mayor y depresión en trastorno bipolar, y afecciones psiquiátricas que requieren tratamiento con medicación, incluyendo esquizofrenia, psicosis en trastorno bipolar, e intoxicación por fármacos estimulantes.

15 Antecedente de la invención

Depresión:

La depresión es un trastorno del estado de ánimo caracterizado por estado de ánimo deprimido; sensación de inutilidad, indefensión o desesperanza; una pérdida de interés o placer; cambios en el apetito; cambios en los patrones del sueño; fatiga, pensamientos de muerte, incapacidad para concentrarse o tomar decisiones. De acuerdo con una estadística de Bienestar y Salud Mental del 2002 de Statistics Canada⁴, el 12.2% de todos los canadienses experimentará depresión en algún momento de la vida, aunque el 4.8% de los canadienses ha reportado síntomas de depresión mayor. Adicionalmente, el impacto económico de la depresión es tremendo debido a los costes tanto en productividad como en el cuidado salud. En Canadá, entre 62% y el 76% de los episodios de discapacidad de corto plazo debido a trastornos mentales se atribuyó a la depresión⁵. Las pérdidas de productividad relacionadas con el trabajo debido a la depresión se han estimado que son de US\$ 4.5 mil millones⁶. De esta manera, la prevalencia de la depresión hace de este trastorno un problema de salud muy importante en Canadá y en el extranjero.

Una vez diagnosticada, la depresión se puede tratar mediante diferentes terapias que incluyen medicación, psicoterapia y en casos más severos, con terapia electroconvulsiva. La primer línea de tratamiento es frecuentemente a través de medicación con antidepresivos, en algunos casos en conjunto con psicoterapia. Los antidepresivos consisten de los antidepresivos tricíclicos clásicos (TCA), inhibidores de la recaptación de serotonina (SSRI), inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina (NSRI), así como también inhibidores de oxidasamonoamina (MAOI). Todos los antidepresivos tienen efectos agudos sobre los niveles sinápticos de los neurotransmisores en el cerebro⁷⁻⁹. Los TCA clásicos son predominantemente inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina, similar a NSRI. Los fármacos SSRI son inhibidores del transportador de serotonina más selectivos, mientras que el MAOI bloquea las enzimas que están implicadas en la descomposición de estos neurotransmisores.

La dopamina (DA), que actúa a través de receptores DA, ejerce una función principal en la regulación del control motor neuronal, cognición, predicción de evento, emoción y placer/recompensa¹⁰⁻¹⁵, todos los cuales se afectan por la depresión. La contribución de la DA en la depresión se hace evidente cuando se tiene cuenta las principales rutas dopaminérgicas en el cerebro de los mamíferos: (a) el sistema mesostriatal que consiste de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra (SNc) que inerva el cuerpo estriado; (b) el sistema mesolímbico, en el que las neuronas dopaminérgicas área tegmental ventral (VTA) se proyectan en el hipocampo, Núcleo accumbens (NAc) y la amígdala; (c) el sistema mesocortical en donde las neuronas DA principalmente del VTA se proyectan en las regiones corticales del cerebro incluyendo la corteza prefrontal (PFx). La mayoría de estas regiones han estado implicadas en la depresión. Adicionalmente, numerosos estudios apoyan la hipótesis de reducción de señalización dopaminérgica en depresión que incluye informes en que: (1) la severidad de la depresión mayor se correlaciona altamente con respuestas de pacientes a anfetaminas, un fármaco que facilita el aumento de los niveles de DA sinápticos a través de múltiples mecanismos¹⁶, mientras que otro estudio ha mostrado niveles reducidos de ácido homovanílico, un metabolito DA principal, en el CSF de pacientes de depresión¹⁷; (2) animales que experimenta indefensión aprendida, un paradigma del comportamiento que recapitula algunos de los síntomas de la depresión, se ha mostrado que exhiben agotamiento de la DA en el cuerpo estriado, que puede ser mitigado mediante pretratamientos con agonistas DA¹⁸⁻¹⁹; (3) efectos motrices inducidos por agonistas del receptor DA se aumentan después de tratamiento crónico con antidepresivos o terapia electroconvulsiva²⁰ lo que sugiere neurotransmisión dopaminérgica reducida en depresión; (4) en pruebas de natación forzada, se ha mostrado que los antagonistas DA inhiben la inmovilidad, una indicación de actividad antidepresiva, mientras se ha mostrado que los antagonistas del receptor DA inhiben los efectos de los antidepresivos²¹⁻³²; (5) los inhibidores DAT de nomifensina y bupropión han mostrado que son antidepresivos efectivos^{21,33-34} y (6) estudios clínicos también han documentado casos en donde el agonista del receptor DA ha sido efectivo en el tratamiento de la depresión³⁵⁻³⁹. Adicionalmente, existe alguna evidencia de estudios de formación de imágenes neurológicas de que el receptor D2 de dopamina (D2R) se eleva en el cuerpo estriado de pacientes deprimidos⁴⁰⁻⁴⁴.

Otra ruta cerebral implicada en la depresión es el eje hipotalámico hipofisario suprarrenal (HPA). El eje HPA está implicado en la reacción de estrés y finalmente conduce a aumento de secreción de glucocorticoides de la corteza suprarrenal. Aunque los glucocorticoides tienen efectos sobre el hipocampo también se ha mostrado que facilitan la transmisión de DA en el NAc⁴⁵. Adicionalmente, frecuentes ataques de estrés con exposición intermitente a

glucocorticoides sensibilizan el sistema DA mesolímbico⁴⁶. Aunque el hipocampo y la corteza frontal, indudablemente, están implicados en determinados aspectos de la depresión, los síntomas de anhedonia, falta de motivación y déficit motrices implican otras regiones del cerebro que incluyen el cuerpo estriado dorsal y ventral, que son ricos en neuronas dopaminérgicas. Más aun, la actividad serotoninérgica tiene un impacto sobre la neurotransmisión de DA. Estudios han mostrado que la estimulación de los receptores 5HT_{1A} pueden estimular la liberación de DA en PFX y NAc pero inhiben la liberación de DA en el cuerpo estriado dorsal⁴⁷. Otros estudios han mostrado que la activación de neuronas rafe serotoninérgicas reducen la actividad de las neuronas dopaminérgicas en VTA (no SNc) e inhiben el comportamiento exploratorio, locomoción⁴⁸⁻⁴⁹.

10 Esquizofrenia:

La esquizofrenia es un trastorno mental debilitante y crónico grave que golpea en la juventud y afecta no sólo a pacientes sino a sus familias y cuidadores⁵⁰⁻⁵¹. Aproximadamente 2.2 millones de adultos norteamericanos tienen esquizofrenia en un año dado. Los síntomas clínicos de la esquizofrenia incluyen delirios, alucinaciones, pensamiento desorganizado, disfunción cognitiva que se divide en dos grupos principales: síntomas positivos y negativos⁵².

La evidencia acumulada sugiere que los síntomas positivos resultan de hiperdopaminérgica que implica los receptores D2 de dopamina en el cuerpo estriado límbico, mientras que los síntomas negativos/cognitivos surgen de una función hipodopaminérgica mediada por los receptores D1 de dopamina en la corteza prefrontal⁵². A pesar de décadas de intensa investigación, los medicamentos antipsicóticos actuales aún son limitados al bloqueo de la función del receptor D2 que alivian en general los síntomas positivos con sólo impacto limitado sobre los síntomas negativos y cognitivos y pueden inducir efectos secundarios graves, que incluyen efectos secundarios extrapiramidales (EPS). Los pacientes continúan experimentando discapacidad significativa y deterioro funcional que limita su integración en la sociedad. La falta de disponibilidad de medicamentos efectivos tanto con agonismo D1 y como antagonismo D2 se debe principalmente al objetivo terapéutico desconocido, una ruta a través de la cual tanto la inhibición del receptor D2 y como la activación de la función del receptor D1 se pueden alcanzar.

La hipótesis dopamina de esquizofrenia, en su formulación original trata principalmente los síntomas positivos⁵³⁻⁵⁴. La farmacoterapia temprana para esquizofrenia implica el uso de reserpina, que bloquea la liberación de dopamina de las terminales presinápticas, y/o el uso de antipsicóticos⁵⁵. Más aún, la evidencia más convincente para el involucramiento de los receptores de dopamina en esquizofrenia viene del hecho de que la mayoría de antipsicóticos, que incluyen antipsicóticos atípicos, muestran un umbral dependiente de dosis de ocupación del receptor D2 para sus efectos terapéuticos⁵⁵. La eficacia de tanto la reserpina como los antipsicóticos en el tratamiento de esquizofrenia implica fuertemente el involucramiento de la dopamina en este trastorno neuropsiquiátrico. Versiones más recientes de esta teoría sugieren que mientras los síntomas positivos resultan de hiperdopaminérgica en el cuerpo estriado límbico, los síntomas negativos/cognitivos surgen de una función hipodopaminérgica en la corteza prefrontal (PFC)⁵⁶⁻⁵⁷. Un importante volumen de estudios tiende a respaldar esta teoría. Estudios PET & SPECT han mostrado evidencia de aumento de síntesis de dopamina, liberación y niveles en las regiones subcorticales/límbicas⁵⁸ mientras que estudios de formación de imágenes funcionales han demostrado hipofunción en la corteza prefrontal en valores iniciales y mientras se realizan tareas cognitivas⁵⁹. Estudios más recientes se han enfocado en el sistema D1 dopamina en el PFC, ya que este es el subtipo de receptor de dopamina predominante en el PFC⁶⁰⁻⁶¹ y muestran una reducción en el número de receptores que se correlaciona con la disfunción⁶² ejecutiva y una regulación por aumento que se correlaciona con la disfunción de memoria de trabajo⁶³. Estas observaciones clínicas están bien respaldadas por evidencia preclínica y una modulación del receptor D1 PFC cambia los "campos de memoria" de neuronas prefrontales que contribuyen al funcionamiento de la memoria de trabajo⁶⁴⁻⁶⁵ y la administración del agonista D1 mejora el desempeño de la memoria de trabajo en monos con deficiencia de dopamina y con envejecimiento⁶⁶ (como sucede en sujetos humanos que envejecen)⁶⁷⁻⁶⁸.

50 Información general de los receptores DA:

En mamíferos, cinco genes distintos, denominados D1/D5 para receptores similares a D1 y D2/D3/D4 para receptores similares a D2, codifican los receptores DA. Estos receptores pertenecen a una superfamilia de receptores de dominio de transmembrana (TM) de siete polipéptidos individuales que ejercen sus efectos biológicos a través de la proteína G intracelular acoplada a las cascadas de señalización¹. Los receptores D1 y D5 se acoplan preferencialmente a las proteínas Gs que estimulan la actividad de la ciclase adenilato y las rutas dependientes de PKA. Los receptores D2 exhiben un patrón más complejo de la transducción de señal principalmente debido a su acoplamiento a subtipos de membranas específicos de la familia de proteínas Gi/Go.

Se sabe que los receptores D2 estimulan una serie de rutas de transducción de señal que incluyen la inhibición de la actividad adenilato ciclase, recambio PI, potenciación de liberación de ácido araquidónico, rectificación interna de canales K⁺ y Ca²⁺ y quinasas de proteína activadas por mitógenos². Más aún, algunos estudios han mostrado que las interacciones de proteína tienen una función importante en la función del receptor DA. Por ejemplo, se ha mostrado que el D2R interactúa físicamente con Par-4. Curiosamente, ratones mutantes Par-4, que son incapaces de reaccionar con D2R, presentan comportamiento similar a depresión³.

65 Enlace de Receptor D1-D2 de dopamina:

Aunque numerosos han indicado una sinergia entre los receptores D1 y D2, un estudio interesante de Seeman et al (1989)⁶⁹ proporcionó la primera evidencia de una conexión farmacológica entre los receptores D1 y D2. En resumen, se muestra que la dopamina puede reducir la densidad de los receptores D2 etiquetados mediante racloprida [³H] y que la adición del receptor D1 específico antagonista, SCH-23390, previno esta reducción, lo que sugiere una conexión funcional entre los receptores D1 y D2. Curiosamente, esta conexión D1-D2 farmacológica estuvo ausente o se redujo en tejidos cerebrales post mórtem de aproximadamente la mitad de la población esquizofrénica ensayada. Sin embargo, aún no está claro si la ausencia de la conexión D1-D2 se debe a una disociación inherente entre el receptor D1 y D2 que ocurre en esquizofrenia, o es un resultado del tratamiento con fármacos antipsicóticos. Adicionalmente, diversos estudios que utilizan una combinación de agonistas específicos y/o antagonistas D1 y D2 han mostrado que se requiere coactivación de los receptores D1-D2 para depresión a largo plazo, consolidación de memoria mediada por anandamida y potenciación de la respuesta génica temprana inmediata, lo que sugiere una interacción funcional potencial entre el D1R y D2R⁷⁰⁻⁷⁶.

Evidencia reciente indica que los receptores D1 y D2 forman un complejo de proteínas, y la coactivación de los receptores D1 y D2 resulta en un aumento de los niveles de calcio intracelular a través de una ruta de señalización no activada por el receptor solo, lo que confirma la conexión funcional observada entre los receptores D1 y D2⁷⁷⁻⁷⁸. Adicionalmente, se ha mostrado que los receptores D1 y D2 son coexpresados en neuronas del cuerpo estriado de ratas, que proporciona una base para una interacción funcional⁷⁹⁻⁸⁰.

A pesar de los años de investigación en el campo de la salud mental, sigue habiendo la necesidad de medicinas nuevas y mejoradas para tratar enfermedades y trastornos psiquiátricos, que incluyen depresión, esquizofrenia y síntomas psicóticos de los mismos. De acuerdo con lo anterior los presentes inventores han buscado identificar nuevos métodos de diagnóstico y quimioterapéuticos en esta área al investigar la asociación funcional entre las clases D1 y D2 de receptores DA. El documento WO03106491 menciona un polipéptido que tiene alguna homología con la SEQ ID NO: 2. Sin embargo, este documento tiene que ver con penetración celular.

Resumen de la invención

De acuerdo con lo anterior la presente invención se relaciona con composiciones y métodos para la prevención y/o tratamiento de enfermedades y trastornos que implican la asociación y funcionalidad del receptor DA anormal. Más particularmente, la presente invención se relaciona con métodos para modular la interacción y funcionalidad de los receptores D1-D2, así como compuestos útiles en dichos métodos. La invención como se describe, pero reivindica, también se relaciona con métodos para el diagnóstico de enfermedades y trastornos provocados por la asociación y funcionalidad del receptor D1-D2 anormal. La invención proporciona un polipéptido de 15 a 100 aminoácidos de longitud para uso en modular la función del receptor de dopamina (DA) para evitar y/o tratar una enfermedad seleccionada de depresión y otras afecciones psiquiátricas en un mamífero, dicho polipéptido comprende la SEQ ID NO: 2 y con un método in vitro para modular la función del receptor de dopamina (DA) utilizando un polipéptido de 15 a 100 aminoácidos de longitud, dicho polipéptido comprende la SEQ ID NO: 2.

La presente invención proporciona compuestos, composiciones y métodos in vitro para modular la interacción de receptores D1-D2. Adicionalmente, la presente invención proporciona métodos para evitar y/o tratar enfermedades que implican niveles anormales de interacción y/o funcionalidad D1-D2.

De acuerdo con la presente invención como se describe, pero no se reivindica, proporciona un método para modular la función del receptor de dopamina (DA) en un mamífero en necesidad de dicho tratamiento que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente que interrumpe el acoplamiento D1-D2 en el mamífero. En una realización preferida, que no significa que sea limitante de alguna forma, el agente es un péptido o polipéptido.

En una realización, el agente es un anticuerpo que se une a una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80% idéntica a la secuencia de una cualquiera de las secuencias seleccionadas de D2_{IL3-29} (SEQ ID NO:1), D2_{LIL3-29-2} (SEQ ID NO:2), D2_{IL3-L} (SEQ ID NO:3), y D1_{CT} (SEQ ID NO:4). En una realización adicional, la secuencia de aminoácidos es idéntica a la secuencia de D2_{IL3-29} (SEQ ID NO:1), D2_{LIL3-29-2} (SEQ ID NO:2), D2_{IL3-L} (SEQ ID NO:3), o D1_{CT} (SEQ ID NO:4).

En una realización, el agente es un ácido nucleico que codifica un polipéptido de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 140 aminoácidos y que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80% idéntica a la secuencia de una cualquiera de las secuencias seleccionadas de D2_{IL3-29} (SEQ ID NO:1), D2_{LIL3-29-2} (SEQ ID NO:2), D2_{IL3-L} (SEQ ID NO:3) D1_{CT} (SEQ ID NO: 4). El polipéptido, en algunas realizaciones, puede ser idéntico a una secuencia de D2_{IL3-29} (SEQ ID NO:1), D2_{LIL3-29-2} (SEQ ID NO:2), D2_{IL3-L} (SEQ ID NO:3) y D1_{CT} (SEQ ID NO: 4).

En realizaciones adicionales, el agente puede ser un polipéptido de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 140 aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos que es entre aproximadamente 80% y aproximadamente 100% idéntica a una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste de D2_{IL3-29} (SEQ ID NO:1), D2_{LIL3-29-2} (SEQ ID NO:2), D2_{IL3-L} (SEQ ID NO:3), y D1_{CT} (SEQ ID NO:4). El polipéptido, en dichas realizaciones, puede ser idéntico a una secuencia de D2_{IL3-29}

(SEQ ID NO: 1), D2_{LIL3-29-2} (SEQ ID NO: 2), D2_{LIL3-L} (SEQ ID NO: 3) y D1_{CT} (SEQ ID NO: 4).

5 El método anterior puede ser para prevenir y/o tratar una enfermedad seleccionada del grupo que consiste de depresión, que incluye depresión y enfermedad depresiva mayor en trastorno bipolar y afecciones psiquiátricas que requieren tratamiento con medicamentos antipsicóticos, que incluyen esquizofrenia, psicosis en trastorno bipolar e intoxicación con fármacos estimulantes.

10 Como un aspecto adicional de la invención, se proporciona un polipéptido de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 140 aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos es entre aproximadamente 80% y aproximadamente 100% idéntica a la secuencia de D2_{LIL3-29} (SEQ ID NO:1), D2_{LIL3-29-2} (SEQ ID NO:2), D2_{LIL3-L} (SEQ ID NO:3), y D1_{CT} (SEQ ID NO:4).

15 El polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos que es entre aproximadamente 80% y 100% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de D2_{LIL3-29} (SEQ ID NO:1), D2_{LIL3-29-2} (SEQ ID NO:2), D2_{LIL3-L} (SEQ ID NO:3) y D1_{CT} (SEQ ID NO: 4). Más específicamente, el polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos que es idéntica a D2_{LIL3-29} (SEQ ID NO:1), D2_{LIL3-29-2} (SEQ ID NO:2), D2_{LIL3-L} (SEQ ID NO:3) o D1_{CT} (SEQ ID NO: 4).

20 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un ácido nucleico que codifica un polipéptido de entre 3 y 140 aminoácidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que es entre aproximadamente 80% idéntica y 100% idéntica a la secuencia de D2_{LIL3-29} (SEQ ID NO:1), D2_{LIL3-29-2} (SEQ ID NO:2), D2_{LIL3-L} (SEQ ID NO:3), y D1_{CT} (SEQ ID NO:4).

25 El ácido nucleico puede codificar un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos es entre 80% y 100% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de D2_{LIL3-29} (SEQ ID NO:1), D2_{LIL3-29-2} (SEQ ID NO:2), D2_{LIL3-L} (SEQ ID NO:3) y D1_{CT} (SEQ ID NO: 4). En una realización adicional, el ácido nucleico codifica un polipéptido que es idéntico a una secuencia seleccionada de D2_{LIL3-29}(SEQ ID NO:1), D2_{LIL3-29-2}(SEQ ID NO:2), D2_{LIL3-L} (SEQ ID NO:3) y D1_{CT} (SEQ ID NO: 4).

30 Un dominio de transducción de proteína se puede fusionar o ligar a cualquier compuesto químico de molécula pequeña, polipéptido, ácido nucleico o combinación de los mismos, utilizado en el contexto de la presente invención. En determinados ejemplos representativos no limitantes, el dominio de transducción de proteínas se selecciona del grupo que consiste de TAT y SynB1/3Cit. También, otras proteínas, portadores de no proteínas u otras macromoléculas se pueden unir o conjugar al compuesto, polipéptido, ácido nucleico descrito anteriormente.

35 La presente invención como se describe pero no se reivindica también proporciona un equipo que comprende cualquier componente o combinación de componentes como se mencionó o describió.

40 Como se describe aquí, una interacción directa entre los receptores D1 y D2, se ha identificado y la presente invención proporciona agentes que interrumpen específicamente esta interacción. Adicionalmente, la presente invención proporciona métodos para identificar agentes que interrumpen la interacción entre los receptores D1 y D2.

Este resumen de la invención no necesariamente describe todas las características de la invención.

45 Breve descripción de los dibujos

Estas y otras características de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción en la que se hace referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

50 La figura 1A muestra el resultado de un análisis de transferencia Western en el que el CO-IP del receptor D1 mediante el receptor D2 (anticuerpo) tejido estriado de rata solubilizado;

55 La figura 1B muestra los resultados de un análisis de transferencia Western en el que el receptor D2 es específicamente bajado mediante GST-D1_{CT} en extractos detergentes de cuerpo estriado de rata, pero no GST-D1_{LIL3} (tercer bucle intracelular) o GST solo;

La figura 1C muestra los resultados de un análisis de transferencia Western en el que el receptor D1 fue específicamente bajado mediante GST-D2_{LIL3-L} en extractos detergentes de cuerpo estriado de rata, pero no GST-D2_{LIL3-S} o GST solo;

60 Figura 1C muestra los resultados de un análisis de transferencia Western en el que el receptor D1 fue específicamente bajado GST-D2_{LIL3-L} en extractos detergentes de cuerpo estriado de rata, pero no GST-D2_{LIL3-S} o GST solo;

65 La figura 1D muestra los resultados de un análisis de transferencia Western en el que el receptor D1 fue específicamente bajado mediante GST-D2_{LIL3-L} y GST-D2_{LIL3-29} en extractos detergentes de cuerpo estriado de rata, pero no GST-D2_{CT}, GST-D2_{LIL3-S} o GST solo;

La figura 1E muestra los resultados de un análisis de transferencia Western en el que el receptor D1 fue específicamente bajado mediante GST-D2_{IL3-29-2}, pero no GST-D2_{IL3-29-1} o GST solo;

5 La figura 1F se muestra los resultados de un análisis de transferencia Western de un ensayo de unión in vitro, en el que una sonda de cola S³⁵-D1 se une específicamente con el fragmento D1 GST-D2_{IL3-29}, pero no con GST-D2_{IL3-29-1} o GST solo;

10 La figura 1G muestra los resultados de un análisis de transferencia Western de CO-IP competitivo en cuerpo estriado de rata. La capacidad del receptor D1 para coimmunoprecipitar con el receptor D2 se inhibe mediante la adición de GST-D2_{IL3-29-2} en concentración en forma dependiente;

15 La figura 2A muestra los resultados de un curso de tiempo de 2 μm de fluorescencia Fluo-4AM, que corresponde a un aumento en los niveles Ca²⁺ intracelulares en células HEK-293T que coexpresan los receptores D1 y D2, luego de activación simultánea mediante 10 μm de SKF81297 y quinpirol. Se monitorizan los valores de fluorescencia utilizando un fluorómetro de placa multipozo de PerkinElmer, recolectado en intervalos de 3s durante 150s. (A.F.U.: unidades de fluorescencia arbitraria). La curva mostrada es representativa de tres réplicas de mediciones realizadas;

20 La figura 2B muestra la medición de la fluorescencia, que corresponde a los niveles Ca²⁺ intracelulares en células HEK-293T que coexpresan los receptores D1 y D2 tratados con 10 μm SKF81297, 10 μm de quinpirol o ambos. **Grupo significativo vs control (p <0.01). Grupo significativo vs SKF+Quin (#, p<0.05; ##, p<0.01). Los datos son representativos de tres réplicas de mediciones realizadas. Los datos se analizan mediante un ANOVA de una vía, seguido por prueba Newman-Keuls;

25 La figura 3A muestra mediciones de fluorescencia para células HEK-293T que coexpresan receptores D1 y D2 y se pretratan con 10 μm de racloprida o SCH23390. Las células se estimulan con 10 μm de SKF81297 y 10 μm de quinpirol. Grupo significativo vs control (*, p<0.05; **, p<0.01). ### grupo significativa vs SKF+Quin (p <0.001) los datos son representativos de tres réplicas de mediciones realizadas. Se analizan los datos mediante ANOVA de una vía, seguido por prueba de Newman-Keuls;

30 La figura 3B muestra mediciones de fluorescencia para células HEK-293T que coexpresan los receptores D1 y D2 y se pretratan con 10 μm de U73122 (inhibidor PLC). Las células se estimulan con 10 μm de SKF81297 y 10 μm de quinpiro. Grupo significativo vs control (**, p<0.01). ### grupo significativo vs SKF+Quin (p 0.001). Los datos son representativos de tres réplicas de mediciones realizadas. Se analizan los datos mediante ANOVA de una vía, seguido por prueba Newman-Keuls;

35 La figura 3C muestra mediciones de fluorescencia para células HEK-293T que coexpresan los receptores D1 y D2 en la presencia de minigenes D1_{CT} o D5_{CT} y estimuladas con una concentración de 10 μm de SKF81297 y quinpirol. *, ** Significativamente del grupo de control (p <0.05; p <0.01). # Significativamente del grupo SKF+Quin (p <0.05). Los datos son representativos de tres réplicas de mediciones realizadas. Los datos se analizan mediante ANOVA de una vía, seguido por prueba Newman-Keuls;

45 La figura 4 muestra los resultados de caracterización de la interacción de D1-D2 en cerebros post mortem. Muestras de cerebro post mortem estriados (control, esquizofrenia, bipolar y depresión; 15 muestras en cada grupo), obtenidas de Stanley Foundation, se incubaron con anticuerpos de receptor anti D2 para experimentos de coimmunoprecipitación. Las proteínas precipitadas se sometieron a SDS-PAGE; se inmunotifieron con anticuerpo D1. La coimmunoprecipitación de D1 mediante el anticuerpo D2 se incrementó significativamente en cerebros con depresión comparado con los controles. Se analizaron los datos mediante ANOVA de una vía seguido por prueba SNK post-hoc (* P <0.05, n=15);

50 La figura 5 ilustra los resultados de un análisis de interacción de D1-D2, en el que se muestra que el tratamiento antidepresivo crónico resulta en una reducción en la interacción D1-D2. Las ratas se tratan con imipramina (IMI, 10 mg/kg/día) o solución salina durante 14 días. En el día 14, se sacrifican las ratas, se extraen rápidamente los cerebros y se disecciona el cuerpo estriado para análisis bioquímico. (A) el cuerpo estriado se solubiliza y utiliza en experimentos de coimmunoprecipitación para examinar la coprecipitación del receptor D1 con el receptor D2. Las ratas sometidas a imipramina crónica (IMI) exhibieron una reducción en la interacción D1-D2, como se cuantifico de las transferencias Western de muestra de coimmunoprecipitación (*, p <0.05, t-prueba, n=5). La cuantificación de las transferencias Western del control (Con) y las muestras IMI no reveló diferencias significativas en los niveles del receptor D1 (B), o niveles de receptores D2 (C) (n=5). Se utiliza tubulina como controles de carga;

60 La figura 6 ilustra los resultados de un estudio de ratas sometidas a indefensión aprendida (LH), en el que se muestra un aumento en la interacción D1-D2. Las ratas que se someten a LH se compararon contra ratas de control. (A) El cuerpo estriado se solubiliza y utilizo en experimentos de coimmunoprecipitación para examinar la coprecipitación del receptor D1 con el receptor D2. Las ratas exhibieron un aumento en la interacción D1-D2 después de LH, como se cuantifico a partir de transferencias Western de muestra de coimmunoprecipitación (**, p <0.01 n=5, t-prueba). (B) se solubilizo corteza prefrontal (PFC) y se utilizó en experimentos de coimmunoprecipitación para examinar la coprecipitación del receptor D1 con el receptor D2. Las ratas exhibieron un aumento en la interacción D1-D2 después de LH, como se cuantifica a partir de transferencias Western de muestras coimmunoprecipitación (*, p <0.05, n=5, t-prueba);

5 La figura 7 ilustra los resultados de un estudio de ratas sometidas a estrés leve crónico (CMS), en el que se muestra una interacción de D1-D2. Las ratas que se someten a CMS se compararon contra ratas de control. Se solubilizo la corteza prefrontal y se utilizó en experimentos de coimmunoprecipitación para examinar la coprecipitación del receptor D1 con el receptor D2. Las ratas exhibieron un aumento en la interacción D1-D2 después de CMS, como se cuantifico a partir de trasferencias Western de muestras de coimmunoprecipitación (*, p <0.05, n=5, t-prueba).

10 La figura 8 ilustra los resultados de un estudio de ratas sometidas a pruebas de natación forzada (FST), en el que se muestra un aumento de la interacción D1-D2. Las ratas se sometieron a pruebas de natación forzada fueron comparadas contra ratas de control para cambios en los receptores D1 y D2. (A) se solubilizo cuerpo estriado de rata y se utilizó en experimentos de coimmunoprecipitación para examinar la coprecipitación del receptor D1 con el receptor D2. Las ratas exhibieron un aumento en la interacción D1-D2 3 horas o 3 días después de ensayos FST, como se cuantifico a partir de trasferencias Western de muestras de coimmunoprecipitación (*, p<0.05, n=4, ANOVA post hoc SNK). La cuantificación de trasferencias Western del control (Con) y muestras FST no revelaron diferencias significativas en los niveles del receptor D1 (B), o los niveles de receptores D2 (C) (n=4). Se utilizó tubulina como control de carga;

20 La figura 9 muestra trasferencias Western que ilustran una reducción significativa en la formación de complejos de receptor D1-D2 en ratas con tratamiento antipsicótico crónico (panel inferior) (al bombear 0.25 mg/kg/día durante 2 semanas), mientras que los receptores D2 inmunoprecipitados permanecen sin cambio (panel superior);

25 La figura 10 ilustra los resultados de un estudio en el que la interrupción de la interacción D1-D2 conduce a cambios de comportamiento en ratas sometidas a pruebas de natación forzada. La administración intra-PFC de TAT-D2L_{IL3-29-2}, pero no TAT solo, redujo las frecuencias de inmovilidad de ratas y aumento las frecuencias de comportamientos de ratas en natación y escalada en una prueba de natación forzada de 5 min. Cada valor es la media ± S.E.M. para un grupo de 6 ratas. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA).

30 La figura 11 muestra la secuencia de proteína de D2R-L humano. La región I₂₅₆-V₂₇₀ mostró que es importante para la unión D1-D2 que esta subrayada.

La figura 12 muestra la secuencia de ADN que codifica el D2R-L humana.

35 La figura 13 muestra la secuencia de proteína de D1R humana. En negrilla se muestra el D1_{CT} (A₃₃₂-T₄₄₆), mientras que el tercer bucle intracelular D1_{IL3} (R₂₁₉-K₂₇₂) se subraya en la secuencia D1.

La figura 14 muestra la secuencia de ADN que codifica el D1R humano.

Descripción detallada

40 La siguiente descripción es de una realización preferida.

45 La presente invención proporciona un método para modular la función del receptor dopamina (DA), parcialmente como un resultado de identificar una interacción directa entre los receptores D1 y D2 (véanse los ejemplos). Los agentes que interrumpen específicamente la interacción del receptor D1-D2 y los métodos para identificar los agentes que interrumpen esta interacción se proporcionan en forma correspondiente. La formación del complejo D1-D2 se ha mostrado aquí que ocurre a niveles elevados en individuos que sufren de depresión. Más aún, se muestra la interrupción de la formación de complejos e interacción D1-D2 que reducen o alivian los síntomas de la depresión utilizando modelos animales de depresión. De acuerdo con lo anterior, modular la función del receptor DA a través de la interrupción del complejo D1-D2 puede ser efectivo para evitar y/o tratar una variedad de afecciones y trastornos neurológicos, por ejemplo, pero no limitado a, depresión, que incluye enfermedad depresiva mayor y depresión en trastorno bipolar, esquizofrenia, síntomas sicóticos de esquizofrenia, y otras afecciones psiquiátricas que requieren tratamiento con medicamentos antipsicóticos, tal como psicosis en trastorno bipolar, e intoxicación por fármacos estimulantes.

55 Al interrumpir el acoplamiento D1-D2 un agente puede por ejemplo inhibir la unión o evitar de otra forma la asociación o interacción entre el receptor D1 y D2.

60 El método para modular la función del receptor DA puede implicar administrar el agente de interrupción D1-D2 en una cantidad terapéuticamente efectiva. Dicha cantidad puede variar dependiendo de la enfermedad o trastorno que se va a tratar, así como otros factores farmacológicos conocidos por aquellos expertos en la técnica.

65 "Agente" o "agentes" significa cualquier compuesto químico de molécula pequeña, polipéptido, ácido nucleico o cualquier combinación de los mismos que pueden modular la función del receptor DA. "Modular la función del receptor DA" significa una alteración de la función, por ejemplo mediante inhibición de la activación DA y/o función de señalización, al interrumpir el acoplamiento D1-D2. Un polipéptido puede ser de cualquier longitud a menos que se especifique de otra forma e incluye, por ejemplo y sin limitación, anticuerpos, enzimas, receptores, transportadores,

receptor D2, fragmento receptor D1 o derivados. Un fragmento es cualquier polipéptido o ácido nucleico que es más corto que su polipéptido de ocurrencia natural correspondiente o ácido nucleico, respectivamente. Un derivado es cualquier polipéptido o ácido nucleico que se altera con respecto a un polipéptido de referencia o ácido nucleico, respectivamente e incluye, por ejemplo fragmentos o mutantes.

5 De acuerdo con lo anterior, en una realización preferida, la presente invención proporciona un polipéptido de menos de 140 aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80% idéntica a la secuencia de D2_{IL3-29} (SEQ ID NO:1), D2L_{IL3-29-2} (SEQ ID NO:2), D2_{IL3-L} (SEQ ID NO:3), y D1_{CT} (SEQ ID NO:4), o un fragmento de una
10 cualquiera de la misma. En una realización preferida el polipéptido está en aproximadamente 4 y aproximadamente 140 aminoácidos, por ejemplo, pero no limitado a 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90 o 100 aminoácidos. En una realización alterna, el polipéptido está entre aproximadamente 3 y 100 aminoácidos, por ejemplo, pero no limitado a 5 y 100 aminoácidos, 7 y 100 aminoácidos, 9 y 100 aminoácidos, 11 y 100 aminoácidos, 13 y 100 aminoácidos o 15 y aproximadamente 140 aminoácidos, por ejemplo.
15 Sin embargo, cabe entender que el tamaño del péptido se puede definir mediante un rango de cualquiera de los dos valores enumerados anteriormente o cualquier valor entre ellos. También, en una realización alterna, que no significa que sea limitante ninguna forma, la presente invención contempla polipéptidos como se definió anteriormente que comprende más de 140 aminoácidos.

20 Cabe entender que el polipéptido como se describió anteriormente no consiste de la secuencia de aminoácidos completa de de cualquier receptor D1 o D2 de ocurrencia natural, o cualquier variante alélica de ocurrencia natural de la misma

25 Las secuencias de D2L_{IL3-29-2} (SEQ ID NO:2), D2_{IL3}-(SEQ ID NO:3), y D1_{CT} (SEQ ID NO:4) son como sigue, con referencia específica a la numeración de las secuencias de aminoácidos de longitud completa de D1 y D2 mostradas en las figuras 11 y 13:

Péptidos D2

D2_{IL3-29} G₂₄₂-V₂₇₀ (SEQ ID NO:1)
GNCTHPEDMKLCTVIMKSNNGSFPVNR

D2L_{IL3-29-2} I₂₅₆-V₂₇₀ (SEQ ID NO:2)
IMKSNNGSFPVNR

D2_{IL3-L} K₂₁₁-Q₃₇₃ (SEQ ID NO:3)

KIYIVLRRRRKRVTNKRSSRAFRAHLRAPLKGNCCTHPEDMKLCTVIMKSNNGSFPVNRVRAA
RRAQELEMMLSSSTSPPERTRYSPIPSHHQTLDPDPSHHGLHSTPDSPAKPEKNGHAKDHPKIA
KIFEIQTMPNGKTRTSLKTSRRKLSQQKEKKATQ

30 Péptidos D1

D1_{CT} A₃₃₂-T₄₄₆ (SEQ ID NO:4)
AFNADFRKAFSTLLGCYRLCPATNNAIETVSINNNGAAMFSSHHEPRGSI SKECNLVY
LI PHAVGSSSEDLKKEEAAGIARPLEKLS PALS VILDYDTDVSLEKI QPITQNGQHPT

35 La presente invención también contempla polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que comprenden 80% 81% 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con las secuencias amino descritas anteriormente. Adicionalmente, los polipéptidos se pueden definir ya que comprenden un rango de identidad de secuencia definida mediante cualquiera de los dos valores enumerados anteriormente.

40 En una realización de la presente invención, que no significa que sea limitante, se proporciona un polipéptido de D2L_{IL3-29-2} que comprenden o consiste de la secuencia de aminoácidos IMK, MKS, KSN, SNG, NGS, GSF, SFP, FPV, PVN, VNR, NRR, RRR, o RRV. Adicionalmente, el polipéptido puede comprender o consistir de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos que incluyen uno o más aminoácidos secuenciales unidos al terminal N, terminal C o ambos de cualquiera de las secuencias proporcionadas anteriormente que se encuentran en el receptor D2 de ocurrencia natural o cualquier variante alélica del mismo

45 En una realización adicional de la presente invención, se proporciona un polipéptido que comprende o que consiste de la secuencia de aminoácidos D1_{CT} que comprende o que consiste de AFN, FNA, NAD, ADF, DFR, FRK, RKA, KAF, AFS, FST, STL, TLL, LLG, LGC, GCY, CYR, YRL, RLC, LCP, CPA, PAT, ATN, TNN, NNA, NAI, AIE, IET, ETV, TVS, VSI, SIN, INN, NNN, NNG, NGA, GAA, AAM, AMF, MFS, FSS, SSH, SHH, HHE, HEP, EPR, PRG, RGS, GSI, SIS, ISK, SKE, KEC, ECN, CNL, NLV, LVY, VYL, YLI, LIP, IPH, PHA, HAV, AVG, VGS, GSS, SSE, SED, EDL, DLK, LKK, KKE, KEE, EEA, EAA, AAG, AGI, GIA, IAR, ARP, RPL, PLE, LEK, EKL, KLS, LSP, SPA, PAL, ALS, LSV, SVI, VIL, ILD, LDY, DYD, YDT, DTD, TDV, DVS, VSL, SLE, LEK, EKI, KIQ, IQP, QPI, PIT, ITQ, TQN, QNG, NGQ, GQH, QHP, y HPT.
50 Adicionalmente, el polipéptido puede comprender o consistir de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos que

incluyen uno o más aminoácidos secuenciales unidos en el terminal N, terminal C o ambos de cualquiera de las secuencias proporcionadas anteriormente que se encuentran en un receptor D1 de ocurrencia natural o una variante alélica del mismo.

5 La presente invención también proporciona un ácido nucleico que codifica polipéptidos como se definió anteriormente. Por ejemplo, la presente invención contempla un ácido nucleico que codifica un polipéptido de entre aproximadamente 3 y menos de 140 aminoácidos, por ejemplo, pero no limitado entre 10 y 135 aminoácidos, entre 10 y 100 aminoácidos, entre 15 y 109 aminoácidos o entre 15 y 100 aminoácidos y que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80% de identidad con las secuencia D2_{L_{IL3-29-2}} (SEQ ID NO:2), D2_{L_{IL3}} (SEQ ID NO:3), y D1_{CT} (SEQ ID NO:4). En una realización alterna, la presente invención contempla ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos como se describió anteriormente pero que codifican más de 140 aminoácidos. Dichos ácidos nucleicos se pueden derivar de las secuencias de aminoácidos anteriores, o de las secuencias de ácidos nucleicos de longitud completa correspondientes del receptor D1 y/o D2 que codifican las secuencias mostradas en las figuras 12 y 14

15 Por "porcentajes idénticos" o "porcentajes de identidad" significa uno o más de un ácido nucleico o secuencias de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a una secuencia de codificación o secuencia de aminoácidos de péptidos que pueden interrumpir el acoplamiento D1-D2. "Sustancialmente idéntico" significa cualquier subsecuencia de nucleótidos con similitud a la secuencia genética de un ácido nucleico de la invención, o un fragmento o un derivado del mismo. El término "sustancialmente idéntico" también se puede utilizar para describir la similitud de las secuencias de polipéptidos. Por ejemplo, se contemplan secuencias de nucleótidos o secuencias de polipéptidos que son por lo menos 70% 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 98% o 99% idénticas a la secuencia de codificación de receptor D1 o D2, o polipéptido codificado respectivamente, o fragmentos derivados de los mismos, y aún retener la capacidad para afectar el acoplamiento D1-D2.

25 Para determinar si un ácido nucleico exhibe identidad con las secuencias presentadas aquí, se pueden utilizar algoritmos de alineación de oligonucleótidos, por ejemplo, pero no limitado a un BLAST (GenBank URL: www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/, utilizando parámetros predeterminados: programa: blastn; base de datos: nr; Esperado 10 filtro: predeterminado; alineación: en forma de pares; códigos genéticos de consulta: estándar (1)), BLAST2 (EMBL URL: <http://www.embl-heidelberg.de/Services/index.html> utilizando parámetros determinados: matriz BLOSUM62; filtro: predeterminado, ecofiltro: on, Esperado: 10, corte: predeterminado ;cadena: ambas ; descripciones: 50, alineaciones:50), o FASTA, búsqueda, utilizando parámetros predeterminados. También están disponibles los algoritmos de alineación de polipéptidos, por ejemplo, sin limitación, secuencias BLAST2 (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html, utilizando parámetros predeterminados programa: blastp; matriz: BLOSUM62; penalidades de espacio abierto (11) y espacio de extensión (1); espacio x_disminución: 50; Esperado 10; tamaño de palabra: 3; filtro: predeterminado).

Una indicación alterna de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos secuencias se hibridan entre sí bajo condiciones moderadamente rigurosas o preferiblemente rigurosas. La hibridación para las secuencias unidas a filtro bajo condiciones moderadamente rigurosas puede, por ejemplo, ser realizada en NaHPO₄ 0.5 M, sulfato dodecil sodio (SDS) al 7%, EDTA 1 mM a 65°C, y lavado en 0.2 x SSC/SDS al 0.1% a 42°C durante por lo menos 1 hora (véase Ausubel, et al. (eds), 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., New York, at p. 2.10.3). Alternativamente, la hibridación para las secuencias unidas a filtro bajo condiciones rigurosas puede, por ejemplo, ser realizada en NaHPO₄ 0.5 M, SDS al 7%, EDTA 1 mM a 65°C, y lavado en 0.1 x SSC/SDS al 0.1% a 68°C durante por lo menos 1 hora (véase Ausubel, et al. (eds), 1989, supra). Las condiciones de hibridación se pueden modificar de acuerdo con métodos conocidos dependiendo de la secuencia de interés (véase Tijssen, 1993, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology – Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, New York). En general, pero deseando no limitar, se seleccionan condiciones rigurosas que son aproximadamente 5°C menores que el punto de fusión térmico para la secuencia específica en un pH y resistencia iónica definidas.

Por dominio de transducción de proteína significa una secuencia de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido, o una secuencia de aminoácidos que comprenden el polipéptido en el que el polipéptido facilita la localización a un tamaño particular, por ejemplo una célula o similar, o puede facilitar el transporte a través de una membrana o bicapa de lípido. Los polipéptidos y ácidos nucleicos de la presente invención se pueden fusionar a un dominio de transducción de proteína para facilitar el tránsito a través de bicapas lipídicas o membranas. También la presente invención contempla que todos los polipéptidos como se describen aquí se pueden vincular o unir a un soporte o macromolécula, un portador de una proteína o un portador de proteína opcionalmente a través de un compuesto separador, molécula o similar.

60 Muchos polipéptidos y ácidos nucleicos no cruzan eficientemente la bicapa lipídica de la membrana de plasma, y por lo tanto ingresan en las células a baja velocidad. Sin embargo existen determinados polipéptidos de ocurrencia natural que pueden transitar a través de las membranas independientemente de cualquier transportador específico. Antennapedia (*Drosophila*), TAT (HIV) y VP22 (Herpes) son ejemplos de dichos polipéptidos. Se ha mostrado que fragmentos de estos y otros polipéptidos retienen la capacidad de tránsito a través de las membranas de lípidos de forma independiente del receptor. Estos fragmentos, denominados dominios de transducción de proteínas, tienen generalmente de 10 a 27 aminoácidos de longitud, poseen múltiples cargas positivas, y en muchos casos se han predicho que son anfipáticos.

Los polipéptidos y ácidos nucleicos que normalmente son ineficientes o incapaces de cruzar una bicapa de lípidos, se pueden hacer para transitar la bicapa al fusionarse a un dominio de transducción de proteína.

La publicación Estadounidense 2002/0142299 describe una fusión de TAT con beta-glucuronidasa humana. Esta proteína de fusión transita fácilmente dentro de diversos tipos de células tanto in vitro como in vivo. Adicionalmente, se ha observado que las proteínas de fusión TAT cruzan la barrera hematoencefálica Frankel et al. (Patente Estadounidense No. 5,804,604, Patente Estadounidense No. 5,747,641, Patente Estadounidense No. 5,674,980, Patente Estadounidense No. 5,670,617, y Patente Estadounidense No. 5,652,122); y también ha demostrado transporte de una proteína (beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano) dentro de una célula al fusionar la proteína con los aminoácidos 49-57 de TAT.

La publicación PCT WO01/15511 describe un método para desarrollar dominios de transducción de proteína utilizando una colección de visualización de fagos. El método comprende incubar una célula objetivo con una colección de de visualización de péptidos y aislar péptidos internalizados del citoplasma y núcleos de las células e identificar los péptidos. El método comprende adicionalmente ligar los péptidos identificados a una proteína e incubar el complejo de péptido-proteína con una célula objetivo para determinar si se facilita la absorción. Utilizando este método se puede desarrollar un dominio de transducción de proteína para cualquier tipo de célula o tejido. La Publicación Estadounidense 2004/0209797 muestra que los isómeros inversos de diversos péptidos identificados mediante lo anterior también pueden funcionar como dominios de transducción de proteína.

La publicación PCT WO99/07728 describe la linealización de protegrina y taquiplesina, de origen natural como una estructura de tipo horquilla mantenida por puentes disulfuro. La reducción irreversible de puentes disulfuro genera péptidos que pueden transitar fácilmente las membranas celulares, solas o fusionadas a otras moléculas biológicas. La Publicación Estadounidense 2003/0186890 describe derivados de protegrina y taquiplesina que fueron denominados SynB1, SynB2, SynB3, etc. Estos péptidos SynB se optimizaron adicionalmente para significar hidrofobicidad por residuo, momento hidrófobo helicoidal (anfipaticidad), o momento hidrófobo beta. Se mostraron diversos péptidos análogos SynB anfipáticos optimizados para facilitar la transferencia de la doxorubicina a través de las membranas celulares. Adicionalmente, la doxorubicina se conecta a un análogo SynB que se observó penetra la barrera hematoencefálica a 20 veces la velocidad de la doxorubicina sola.

Los dominios de transducción de proteínas descritos en los párrafos anteriores son sólo unos pocos ejemplos de los dominios de transducción de proteína disponibles para facilitar el tránsito de ácidos nucleicos, polipéptidos y moléculas pequeñas por la membrana. Otros ejemplos son transportan, W/R, AlkCWK18, DipaLytic, MGP, o RWR. Los expertos en la técnica también pueden reconocer otros ejemplos.

Un dominio de transducción de proteína y un agente de la presente invención se pueden colocar juntos en proximidad suficiente y mantenerse juntos durante un tiempo suficiente para permitir que el dominio de transducción de proteína inflencie el desempeño del producto farmacéutico del agente. Las asociaciones contempladas de dominios de transducción de proteína y agente incluyen, por ejemplo y sin limitación: asociaciones no covalentes, tales como interacciones electrostáticas, uniones de hidrógeno, enlaces iónicos o complejos, enlaces de Van der Waals; enlaces covalentes, tales como métodos convencionales de entrecruzamiento; enlaces que se activan, in vitro y/o in vivo mediante radiación electromagnética; cualquier enlace covalente tal como un enlace péptido; cualquier interacción bioquímica conocida por los bioquímicos de proteínas, tal como biotina/estreptavidina, níquel/histidina, glutatión/glutatión S-transferasa, o antígeno/anticuerpo; asociaciones físicas dentro de las estructuras de matriz o sistemas de encapsulación; etc.

La presente invención proporciona un agente que puede ser cualquier compuesto químico de molécula pequeña, polipéptido, ácido nucleico, o cualquier combinación de los mismos que pueden modular la funcionalidad del receptor DA través de la interrupción del acoplamiento D1-D2. De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona un polipéptido de aproximadamente 3 a menos de aproximadamente 140 aminoácidos, preferiblemente de 7 a 109 aminoácidos, más preferiblemente 15 a 100 aminoácidos y que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80% idéntica, por ejemplo, pero no limitada a 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a la secuencia de la D2_{IL3-29} (SEQ ID NO:1), D2_{LIL3-29-2} (SEQ ID NO:2), D2_{LIL3-L} (SEQ ID NO:3), o D1_{CT} (SEQ ID NO:4). La presente invención también proporciona un ácido nucleico que codifica un polipéptido de aproximadamente 3 a menos de aproximadamente 140 aminoácidos, preferiblemente aproximadamente 10 a aproximadamente 109 aminoácidos, más preferiblemente aproximadamente 15 a aproximadamente 100 aminoácidos y que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80% idéntica, por ejemplo, pero no limitado a 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a la secuencia de D2_{IL3-29} (SEQ ID NO:1), D2_{LIL3-29-2} (SEQ ID NO:2), D2_{LIL3-L} (SEQ ID NO:3), o D1_{CT} (SEQ ID NO:4). El ácido nucleico o polipéptido se puede fusionar opcionalmente a un dominio de transducción de proteína.

Un polipéptido de la invención se puede sintetizar in vitro o suministrar a una célula in vivo por cualquier método convencional. Como un ejemplo representativo de un método in vitro, el polipéptido se puede sintetizar químicamente in vitro, o se puede sintetizar enzimáticamente in vitro en un sistema de expresión biológico adecuado, tal como, sin limitación, extracto de germen de trigo o lisato de reticulocitos de conejo. Como ejemplo representativo de un método in vivo, una molécula híbrida de ADN, ARN, o ADN/ARN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un

polipéptido de la invención se introduce en un animal, y la secuencia de nucleótidos se expresa dentro de una célula de un animal.

5 La secuencia de nucleótidos se puede ligar operablemente a elementos reguladores con el fin de alcanzar expresión preferencial en momentos deseados o en tipos de células o tejidos deseados. Adicionalmente, como lo sabrá el experto en la técnica, otras secuencias de nucleótidos, que incluyen, sin limitación, región 5' no traducida, regiones 3' no traducidas, estructura de tapa, cola poli A, iniciadores de traducción, secuencias que codifican péptidos de señalización u orientación, mejoradores de traducción, mejoradores de transcripción, terminadores de traducción, terminadores de transcripción, promotores de transcripción, se pueden ligar funcionalmente con la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido (véase un ejemplo representativo "Genes VII", Lewin, B. Oxford University Press (2000) or "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 3rd edition (2001)). Una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido o un polipéptido de fusión que comprende un agente de polipéptido y un dominio de transducción de proteína se puede incorporar en un vector adecuado. Los vectores se pueden obtener comercialmente de compañías tales como Stratagene o InVitrogen. Los vectores también se pueden construir o modificar individualmente utilizando técnicas de biología molecular estándar, como se destaca, por ejemplo, en Sambrook et al. (Cold Spring Harbor Laboratory, 3ª edición (2001)). Un vector puede contener cualquier número de secuencias de nucleótidos que codifican elementos deseados que se pueden ligar operablemente a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido o polipéptido de fusión que comprende un dominio de transducción de proteína. Dichas secuencias de nucleótidos que codifican elementos deseados, incluyen, pero no se limitan a, promotores de transcripción, mejoradores de transcripción, terminadores de transcripción, iniciadores de traducción, terminadores de traducción, sitios de unión a ribosomas, región 5' no traducida, región 3' no traducida, estructura de tapa, cola poli A, origen de replicación, marcadores detectables, etiquetas de afinidad, péptido objetivo o de señal, los expertos en la técnica reconocerán que la selección y/o construcción de un factor adecuado puede depender de diversos factores, que incluyen, sin limitación, el tamaño del ácido nucleico que se va a incorporar en el vector, el tipo de elementos de control de transcripción y traducción deseados, el nivel de expresión deseado, el número de copias deseadas, si se desea integración cromosómica, el tipo de proceso de selección que se desea, o la célula anfitriona o el rango anfitrión que se pretende sea transformado.

30 La molécula híbrida de ADN, ARN, o ADN/ARN se puede introducir intracelularmente, extracelularmente en una cavidad, espacio intersticial, en la circulación de un organismo, por vía oral, o mediante cualquier otra ruta estándar de introducción para moléculas terapéuticas y/o composiciones farmacéuticas. Los métodos físicos estándar de introducción de ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, inyección de una solución que comprende híbridos de ARN, ADN, o ARN/ADN, bombardeo de partículas recubiertas por ácidos nucleicos, el baño de una célula u organismo en una solución de ácido nucleico, o electroporación de membranas celulares en presencia de ácido nucleico.

35 Un ácido nucleico se puede introducir en células eucarióticas adecuadas ex vivo y las células que albergan el ácido nucleico se pueden insertar luego en una ubicación deseada en un animal. También se puede utilizar un ácido nucleico para transformar células procarióticas y luego las células procarióticas transformadas se pueden introducir en un animal, por ejemplo, a través de una ruta oral. Aquellos expertos en la técnica reconocerán que un ácido nucleico se puede construir en tal forma que las células procarióticas transformadas pueden expresar y secretar un polipéptido de la invención. Preferiblemente, las células procarióticas hacen parte de la microflora intestinal endógena de un animal. Con respecto a los ejemplos humanos de microflora endógena están, sin desear limitarlos, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, y *Bifidobacterium bifidum*. También se puede insertar un ácido nucleico en un vector vírico y empacar en partículas víricas para suministro y expresión eficiente.

45 Formas de dosificación

50 Un agente de la presente invención, por ejemplo, polipéptidos D1 o D2 o ácidos nucleicos que codifican estos polipéptidos o anticuerpos o moléculas pequeñas capaces de interrumpir el acoplamiento D1-D2, se pueden formular en cualquier forma de dosificación conveniente. La forma de dosificación puede comprender, pero no se limita a una forma de dosificación oral en la que el agente se disuelve, suspende o similar, en un excipiente adecuado tal como, pero no limitado a agua. Adicionalmente, el agente se puede formular en una forma de dosificación que se puede aplicar por vía tópica o se puede administrar mediante inhalador, o mediante inyección ya sea por vía subcutánea, en órganos, o en circulación. Una forma de dosificación inyectable puede incluir otros portadores que pueden funcionar para mejorar la actividad del agente. Se puede utilizar cualquier portador adecuado conocido en la técnica. También, el agente se puede formular para uso en la producción de un medicamento. Muchos métodos para la producción de formas de dosificación, medicamentos, o composiciones farmacéuticas son bien conocidos en la técnica y se pueden aplicar fácilmente a la presente invención por los expertos en la técnica.

60 Se contempla la terapia de combinación con agentes de la presente invención u otros agentes útiles para prevenir y/o tratar enfermedades o trastornos neurológicos. Con respecto a las formas de dosificación adecuadas de terapia de combinación de nuevo incluyen cápsulas, comprimidos, y similares, preferiblemente para administración oral, aunque se contempla cualquier forma de dosificación, por cualquier ruta de administración. Se puede administrar terapia de combinación como entidades separadas, por ejemplo, dos comprimidos u otras formas, cada una contiene un agente, o se puede administrar como una única forma de dosificación que contiene fármacos, o uso concomitante.

En el caso de la administración oral de dos o más agentes diferentes, la dosis única puede ser, pero no se limita a una cápsula, comprimido o solución oral, y esta también puede contener componentes inactivos que son necesarios para formar el sistema de suministro individual.

5 Las medicaciones de terapia de combinación de la presente invención se pueden administrar mediante cualquier ruta deseada, por ejemplo, sin limitación, la administración puede ser transdérmica (parche), bucal, sublingual, tópica, nasal, parenteral (subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica), rectal, vaginal. También se contemplan diversas combinaciones de liberación de liberación rápida/controlada.

10 Tratamiento

Los métodos y compuestos de la presente invención son útiles para prevenir y/o tratar enfermedades que se caracterizan por niveles anormales de interacción D1-D2 o formación de complejos. Los siguientes son algunos ejemplos no limitantes de dichas enfermedades: depresión, que incluye enfermedad depresiva mayor y depresión en trastorno bipolar, y afecciones psiquiátricas que requieren tratamiento con medicación antipsicótica, que incluyen esquizofrenia, psicosis en trastorno bipolar, intoxicación por fármacos estimulantes, delirio, síndrome de Tourette, ansiedad o una combinación de los mismos.

20 Enfermedades neurológicas, neuropsiquiátricas

La depresión se caracteriza por profunda tristeza, cambios pronunciados en el sueño, apetito y energía. Pensamientos recurrentes de muerte o suicidio, síntomas físicos persistentes que no responden a tratamiento, tales como jaquecas, trastornos digestivos y dolor crónico son algunos de los síntomas de la depresión mayor. La depresión mayor es una depresión unipolar, mientras que el trastorno bipolar (depresión maníaca) implica tanto la depresión como la manía. La identificación y tratamiento temprano de la depresión se requiere para minimizar el riesgo de suicidio y lesiones autoinfligidas. El método y los compuestos de la presente invención son útiles para reducir el acoplamiento D1-D2 y se pueden utilizar para prevenir y/o tratar la depresión.

30 De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona métodos para modular la funcionalidad DA al interrumpir el acoplamiento D1-D2 en un mamífero. Cualquier mamífero, que incluye, sin limitación, humano, rata, vaca, cerdo, perro, o ratón, se puede tratar con los agentes y métodos de la presente invención.

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes ejemplos.

35 Experimentos:

Experimento 1. El complejo del receptor D1-D2 se facilita por la cola de carboxilo D1R (CT) y el tercer bucle intracelular (IL3) de D2R.

40 Para confirmar los informes anteriores de un complejo de receptor D1-D2 se utilizó cuerpos estriados de rata en experimentos de coimmunoprecipitación (co-IP). Como se muestra en la Figura 1A, el D1R fue capaz de coprecipitarse con el D2R, confirmando la presencia de un complejo de receptor D1-D2. En un intento para definir la base estructural para el acoplamiento de D1-D2 observado, se llevó a cabo purificación por afinidad utilizando proteínas de fusión de GST (glutación-S-transferasa) que codifican el D1_{CT} y el tercer bucle intracelular (D1_{IL3}), ya que ambos D1_{CT}: A₃₃-T₄₄₆ y D1_{IL3}: R₂₁₉-K₂₇₂ contienen secuencias consenso putativas para la fosforilación del receptor, la desensibilización y posibles sitios de unión para diversas proteínas de señalización importantes (por ejemplo, las proteínas G, receptor NMDA NR1 de subunidades NR2A)⁸¹⁻⁸². Como se muestra en la Figura 1B, el GST-D1_{CT}, pero no el GST-D1_{IL3} o GST solo, D2R estriado precipitado solubilizado como se ilustra por el anticuerpo D2 inmunomarcado con inmunotransferencia de Western, indican que el D1R puede interactuar con D2R través de la región D1_{CT}. Para ubicar el sitio de interacción en D2R, las proteínas de fusión GST que codifican IL3 tanto del D2 corto (D2S) como el D2 largo (D2L) (GST-D2_{IL3-L}: K₂₁₁-Q₃₇₃, GST-D2_{IL3-S}: K₂₁₁-Q₃₁₅) se utilizaron en ensayos de purificación por afinidad. Como se muestra en la Figura 1C, GST-D2_{IL3-L}, pero no GST-D2_{IL3-S} o GST solo era capaz de desplegar los receptores D1. Debido a que D2L y D2S se diferencian por el aminoácido 29 adicional dentro del tercer bucle intracelular, el hecho de que sólo D2L pero no D2S interactúe con D1R nos hizo sospechar que este aminoácido 29 específico puede contener el sitio de interacción D1-D2.

55 Los resultados de afinidad "desplegable" revelaron que la secuencia codificada por el D2_{IL3-29} facilita la interacción entre los receptores D1 y D2 ya que sólo GST-D2_{IL3-L} y GST-D2_{IL3-29}: G₂₄₂-V₂₇₀ pero no GST-D2_{IL3-S}, GST-D2_{CT}: T₃₉₉-C₄₁₄ o GST solo fue capaz de desplegar los receptores D1 (Figura 1D). Experimentos adicionales utilizando fragmentos de D2_{IL3-29} muestran que GST-D2_{IL3-29-2}: I₂₅₆-V₂₇₀, pero no el GST-D2_{IL3-29-1}: G₂₄₂-V₂₅₅ o GST, pueden desplegar con éxito D1R del cuerpo estriado de rata solubilizada (Figura 1E). Por otra parte, el ensayo de unión in vitro sugirió la interacción directa entre D1R y D2R (Figura 1F). Estos resultados proporcionan evidencia de que la interacción directa D1-D2 depende de secuencias localizadas en la región de I₂₅₆-V₂₇₀ de D2R. Adicionalmente, como se muestra en la Figura 1G, la preincubación de GST-D2-IL3-29-2 inhibe la interacción D1-D2 que se indexa mediante la coimmunoprecipitación de una forma dependiente de concentración.

65 Experimento 2. La coactivación del receptor D1-D2 induce un aumento de Ca²⁺ intracelular mediado por la activación de la fosfolipasa C.

Para investigar la implicación funcional del acoplamiento de D1-D2, se examinó la capacidad de este complejo para promover señalización Gq/11 que se indexa por los cambios en los niveles de Ca^{2+} intracelular⁸³⁻⁸⁵. En las células HEK-293T cotransfectadas con D1R y D2R se examinaron los cambios en los niveles intracelulares de Ca^{2+} cuando se trató conjuntamente con SKF81297 10 μM y quinpirol 10 μM . Las células que se trataron con ambos agonistas exhibieron un aumento rápido y significativo en los niveles de Ca^{2+} intracelular que alcanzó su pico máximo 30 segundos después de la adición de agonistas (Figura 2A). Sin embargo, las células tratadas con cualquiera de SKF81297 o quinpirol solo no tuvieron cambio en los niveles de Ca^{2+} en comparación con células de control no tratadas (Figura 2B). El aumento en los niveles de Ca^{2+} se podría bloquear por el tratamiento previo con cualquiera de racloprida 10 μM (antagonista D2) o SCH23390 10 μM (antagonista D1), como se muestra en la Figura 3A. Adicionalmente, esta señalización dependiente de co-activación de D1-D2 único está mediada por la activación de la fosfolipasa C (PLC), ya que el tratamiento previo con el inhibidor U73122 de PLC (10 μM) inhibe el aumento en los niveles de Ca^{2+} inducido por la co-activación de D1R y D2R (Figura 3B). Estos datos están en línea con los estudios anteriores que muestran que esta señalización probablemente recluta Gq/11 luego de co-activación de los receptores DA, lo que lleva a la activación en dirección 3' de PLC⁸³⁻⁸⁵.

Experimento 3. La interrupción de acoplamiento de D1-D2 neutralizó la coactivación de D1-D2 inducida por el aumento en el Ca^{2+} intracelular.

Nuestros datos preliminares han mostrado que la coexpresión de GST-D1_{CT} es capaz de desplegar por afinidad el D2R (Figura 1B). Por lo tanto, para probar si el acoplamiento de D1-D2 es necesario para los aumentos inducidos por coactivación de D1-D2 en el Ca^{2+} intracelular, se examinaron los cambios en los niveles de Ca^{2+} intracelulares cuando se cotrató con SKF81297 10 μM y quinpirol 10 μM en las células HEK-293T cotransfectadas con minigenes que codifican D1_{CT}, D5_{CT} junto con D1R y D2R. Como se muestra en la Figura 3C, la coexpresión del minigen D1_{CT} pero no del minigen D5_{CT} neutralizó los aumentos inducidos por coactivación de D1-D2 en el Ca^{2+} intracelular lo que sugiere que el acoplamiento de D1-D2 puede ser responsable de los aumentos observados en el Ca^{2+} intracelular inducido por coactivación de D1/D2.

Experimento 4. El acoplamiento de D1-D2 se regula por aumento en el tejido cerebral post-mortem de pacientes con depresión.

Tanto D1R con D2R han sido implicados en la patología de las enfermedades psiquiátricas tales como la esquizofrenia. Para probar si el acoplamiento de D1-D2 se altera en la enfermedad, se llevaron a cabo experimentos de coimmunoprecipitación en una forma doble ciego en 60 muestras de cuerpo estriado cerebral post-mortem de la Fundación Stanley, que incluye 15 muestras de cada uno de cuatro grupos: control, esquizofrenia, trastorno bipolar y depresión severa. Los cuatro grupos fueron emparejados por edad, sexo, raza, intervalo post-mortem, pH, lado del cerebro, y calidad de mRNA por el banco de cerebros la Fundación Stanley. La misma cantidad de proteína de cada muestra se incubó con anticuerpo del receptor anti-D2 y de la proteína A/G agarosa. Las proteínas precipitadas se dividieron en dos grupos antes de ser sometidas a SDS-PAGE y a inmunotransferencia con ya sea anticuerpo D1 o anticuerpo D2. Cada transferencia Western incluye 3 muestras de cada grupo y la intensidad de cada banda de proteína se cuantificó mediante densitometría (software: AIS de Imaging Research Inc). Cada muestra se presenta como el porcentaje de la media de tres muestras de control en la misma transferencia. Como se muestra en la figura 4A, la coimmunoprecipitación de D1 por el anticuerpo receptor D2 fue significativamente mayor en las muestras de cerebro post mortem de depresión en comparación con los cerebros de control. Los niveles de los receptores D2 directamente inmunoprecipitados no fueron significativamente diferentes entre los grupos de control y de depresión (datos no mostrados). Por lo tanto, la regulación al alza de acoplamiento de D1-D2 observada vista en las muestras de cerebro con depresión puede ser un aspecto primario de la fisiopatología de la depresión. Sin embargo, somos conscientes de que pueden haber dos asuntos que pueden haber influido en los resultados: (i) No tenemos antecedentes de uso de antidepresivos del paciente, y (ii) que algunos de los pacientes con depresión tenían antecedentes de abuso de drogas (5 de 15) y/o abuso de alcohol (10 de 15), lo que puede explicar el gran error estándar en nuestros resultados. Dada la compleja naturaleza de los datos que afectan el tejido cerebral humano, hemos confirmado que el acoplamiento de D1-D2 se mejora en las con comportamientos similares a depresivos inducidas por tres diferentes paradigmas de estrés incontrolables.

Experimento 5. El tratamiento antidepresivo crónico lleva a una reducción en el acoplamiento de D1-D2.

Si los aumentos observados en el acoplamiento de D1-D2 en el tejido cerebral post-mortem de pacientes con depresión era de hecho parte de la base patológica de la depresión, uno se imagina que el tratamiento antidepresivo crónico podría corregir dicho cambio en el acoplamiento de D1-D2. Para probar esta hipótesis, se inyectaron por vía subcutánea ratas con 10 mg/kg/día de imipramina, un TCA, durante un período de 14 días. En el día 14^{avo}, las ratas se sacrificaron, se diseccionó el cuerpo estriado y se procesaron para ensayos de co-IP y transferencias Western. Los experimentos de coimmunoprecipitación revelaron que el tratamiento con antidepresivos crónico condujo a una reducción en el acoplamiento de D1-D2 (Figura 5A). Adicionalmente, esta reducción en el acoplamiento de D1-D2 no se puede atribuir a cambios en los niveles del receptor, ya que las transferencias Western no revelaron ningún cambio significativo en los niveles de D1R y D2R cuando se comparan ratas tratadas crónicamente con ratas de control (Figura 5B, C).

Experimento 6. El acoplamiento de D1-D2 se regula por aumento en animales con comportamientos de tipo depresivo

5 Esto fue probado mediante coimmunoprecipitación de D1R por el anticuerpo primario D2R de las proteínas solubilizadas
 10 extraídas del cuerpo estriado, PFC de ratas de los dos modelos animales con comportamientos similares a depresivos
 15 en comparación con los grupos de control. En pocas palabras, se incubó el anticuerpo anti-D2 con proteína solubilizada
 durante 4 horas seguida por la adición de perlas de proteína A/G. La incubación con perlas de proteína A/G continúa
 durante la noche seguida de lavados de alta rigurosidad. Las proteínas inmunoprecipitadas se eluyen a partir de las
 perlas y se sometieron a SDS-PAGE para análisis de transferencia Western. Se llevan a cabo simultáneamente los
 experimentos de control sin el anticuerpo D2. Las proteínas coimmunoprecipitadas se inmunotransfirieron con el
 anticuerpo D1 y la intensidad de cada banda de proteína se cuantificó mediante densitometría. Cada
 coimmunoprecipitación está en paralelo con el análisis de transferencia Western de los niveles iniciales de la proteína
 solubilizada y las proteínas inmunoprecipitadas directamente. Como se muestra en la Figura 6, 7, el cuerpo estriado
 (modelo LH) y PFC de ratas (modelo LH y el modelo de CMS) mostraron un aumento significativo en el acoplamiento de
 D1-D2 en comparación con las ratas de control ($n=5$ $p < 0.05$). Adicionalmente, no hubo ningún cambio significativo en
 los niveles de proteína de D1R o D2R (datos no mostrados).

Experimento 7. Modelo de animal # 1: Indefensión aprendida inducida por choque ineludible

20 El procedimiento de indefensión aprendida consiste en dos sesiones de estrés separadas. El día 1, los animales se
 colocan en cajas operantes con sonido atenuado (Med Associates, St. Albans, VT), donde reciben choques ineludibles,
 con luces apagadas y no hay palancas presentes. El choque se suministra como una corriente de 0.8 mA por impulsos
 25 codificados a través de barras de metal del piso. La duración del choque en la caja y los intervalos entre ensayos se
 varían aleatoriamente (1.5-60 s y 1-30 segundos, respectivamente), para una exposición de choque total de 25 min. En
 el día 2, las ratas se colocan en cajas operantes, y se les da exactamente 15 ensayos de choque ineludible, con una
 30 duración de un máximo de 60 segundos, con un intervalo entre ensayos fijo de 24 segundos. La iniciación de choque
 (0.8 mA) se acompaña con el inicio de una señal de luz roja colocada directamente encima de una palanca que cuando
 se presiona detiene el choque y apaga la luz blanca. Una luz casera externa de la cámara inmediata se mantiene
 durante todo el ensayo. Una presión en las barras dentro de los primeros 20 segundos del inicio del choque se registró
 como una respuesta de escape. Una respuesta entre 20-60 segundos se clasifica como fracaso para escapar. Después
 35 de 60 segundos, el choque se termina automáticamente y el ensayo se considera como un fracaso. El rendimiento de
 escape y la latencia de escape se registran para cada animal durante los 15 ensayos. Los animales se clasifican como
 indefensión aprendida (LH) si no logran escapar en 10 o más de los 15 ensayos. Las ratas que no escapan en 5 o
 menos de los 15 ensayos se denominan resistentes o sin indefensión aprendida (nLH)⁸⁶⁻⁸⁷. Los animales que fallan 5-10
 veces se consideran el límite. Adicionalmente a los controles de la jaula hogar, se puede colocar otro grupo en las cajas
 en día 1 sin recibir ningún choque. En el día 2 este grupo recibe choques evitables. Esto sirve sólo como un control de
 40 comportamiento, al demostrar que las ratas de control pueden aprender a escapar durante los 15 ensayos. Para cada
 afectación de tratamiento, 8 LH, 8 nLH y 8 controles en jaula se sacrificaron 24 horas después de la sesión de choque
 evitable mediante decapitación. Los cerebros, se disecaron y se congelaron rápidamente en hielo seco. Todas las
 muestras se mantienen a -80°C para análisis de bioquímica y de farmacología.

Experimento 8. Modelo de animal # 2: Estrés leve crónico

45 Primero se entrenan ratas para que beban una solución de sacarosa al 1%, al exponerlas a la sacarosa en lugar de
 agua durante 48 horas. Luego, reciben una serie de pruebas de preferencia de sacarosa, precedido por 23 h de
 privación de alimentos y agua, donde se presenta a cada animal de forma simultánea 2 botellas, una que contiene
 sacarosa al 1% y la otra agua. La posición de las 2 botellas (derecha/izquierda) se varía aleatoriamente de ensayo a
 ensayo y, dentro de cada ensayo, se contrabalancea a través de los animales en cada grupo. Durante la prueba, las dos
 botellas se retiran después de 30 min para pesaje, y se sustituyen por un segundo par de botellas previamente pesadas
 50 (con las posiciones de las 2 botellas invertidas), que se retiraron y se pesaron a los 60 min. Las pruebas se programaron
 al comienzo del ciclo de oscuridad (1800-1900 h) para la mitad de los animales y en la primera mitad del ciclo de luz
 (1000-1100 h) para la otra mitad. Después de la prueba de valor inicial final, cada grupo de animales se dividió en 2
 subgrupos, emparejados con base en su ingesta de sacarosa total (60 min) en la prueba de valor inicial final. Un par de
 subgrupos estará expuesto a CMS durante 6 semanas; no se estresaron los subgrupos de control, diferente a la
 55 privación de alimentos/agua que precede a cada prueba de preferencia sacarosa. En cada una de las cuatro primeras
 semanas, el programa de CMS (adoptado de la ref. 88) constará de los siguientes elementos: Alojamiento pareado
 martes a las 1900-miércoles a las 1000 h (nuevo socio); iluminación estroboscópica miércoles a las 1000-1800 h (en la
 oscuridad); privación de alimento miércoles a las 1800- jueves a las 1000 h en jaula sucia (agua en aserrín); inclinación
 de jaula 45° jueves a las 1000-1800 h; jaula de ratón jueves a las 1800-viernes a las 1000 h; alojamiento pareado
 60 viernes a las 1000-1800 (nuevo socio); privación de agua viernes a las 1800-sábado a las 1000; iluminación
 estroboscópica sábado a las 1000-1800 h (en la oscuridad); luz encendida sábado a las 1800-domingo a las 0600 h;
 iluminación intermitente domingo a las 0600-1800 h (encendido/apagado cada 2 h); privación de alimentos y agua por
 23 h lunes a las 1100 o 1900 h; prueba de ingesta de sacarosa de 1 h martes a las 1000 o 1800 h. En las últimas dos
 65 semanas, el programa CMS se reordenará, con alojamiento pareado (noche de lunes) y privación de alimentos/agua
 (martes en la noche) inmediatamente antes de la prueba de ingesta de sacarosa. El peso corporal se monitorizará
 diariamente. Después de la última prueba de preferencia sacarosa, los animales se dejan reposar hasta la mañana
 siguiente durante cuándo van a ser decapitados.

Experimento 9. Aumento en el acoplamiento de D1-D2 en ratas sometidas a ensayos de natación forzada (FST)

Para investigar la posibilidad de que el acoplamiento de D1-D2 cumpla una función en la patología de la depresión, se examinó el acoplamiento de D1-D2 utilizando el anticuerpo D1R para co-IP del D2R de los cuerpos estriados de ratas sometidas a FST. La FST (o desesperación conductual) es un buen modelo para probar la eficacia de los fármacos antidepresivos. Como se muestra en la Figura 8A, el estriado de ratas sacrificadas 3 horas o 3 días después de la última prueba FST exhibió un aumento significativo en el acoplamiento de D1-D2 en comparación con las ratas control. Adicionalmente, no hubo cambios en los niveles de proteína D1R o D2R que pudieran explicar el aumento en la formación del complejo D1-D2 (Figura 8B, C). Sorprendentemente, las ratas sacrificadas 3 días después de la última prueba FST exhibieron un mayor aumento en el acoplamiento de D1-D2 en comparación con las ratas sacrificadas 3 horas después de la última prueba FST y sugirieron que ocurren cambios a largo plazo después de los ensayos FST.

Experimento 10. Interrupción del complejo de proteína D1-D2 en el tejido cerebral esquizofrénico

Para identificar la relevancia fisiológica para la formación del complejo del receptor D1-D2 y específicamente el efecto de la medicación antipsicótica, llevamos a cabo experimentos de coimmunoprecipitación en una forma doble ciego con 60 muestras post mortem de cuerpo estriado del cerebro de la Fundación Stanley, que incluye 15 muestras de cada uno de los cuatro grupos: control, esquizofrenia, trastorno bipolar y depresión severa. Los cuatro grupos se emparejaron por edad, sexo, raza, intervalo post mortem, pH, lado del cerebro, y calidad de mRNA por el banco de cerebros. La misma cantidad de proteína de cada muestra se coimmunoprecipitó con el anticuerpo del receptor D2. Las proteínas precipitadas se dividieron en dos grupos y se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpo D1 o anticuerpo D2. De acuerdo con nuestra hipótesis, el D1 coimmunoprecipitó con el anticuerpo del receptor D2 se redujo significativamente en las muestras de cerebro post mortem de pacientes con esquizofrenia y bipolares en comparación con el grupo control (Figura 4). Los niveles de D2 directamente inmunoprecipitado no fueron significativamente diferentes entre los cuatro grupos (datos no mostrados). Curiosamente, todas las muestras de la esquizofrenia y 12 de 15 de las muestras bipolares fueron de pacientes tratados con antipsicóticos, lo que indica que el déficit de interacción de D2-D1 observado visto en pacientes con esquizofrenia no puede ser un aspecto primario de la fisiopatología de la esquizofrenia, en realidad puede reflejar el farmacológica efectos de los antipsicóticos/antagonistas D2. Por lo tanto, hemos probado adicionalmente la formación de complejos proteína D1-D2 en ratas tratadas crónicamente con haloperidol, un antipsicótico clínico, así como un antagonista D2 (Mediante bomba de 0.25 mg/kg/día durante 2 semanas, para obtener ocupación clínica continua⁸⁹). Como se muestra en la Figura 9, mientras que los receptores D2 inmunoprecipitados directos permanecen sin cambios (panel superior), la formación del complejo del receptor de D1-D2 se reduce de manera significativa en ratas con tratamiento antipsicótico crónico (panel inferior), lo que sugiere que antagonizar la función D2 interrumpe el acoplamiento del receptor D1-D2.

Experimento 11. El péptido de proteína de interferencia que es capaz de interrumpir el acoplamiento de D1-D2 ejerce un efecto antidepresivo en la prueba de natación forzada.

La FST es un modelo de estrés comúnmente utilizado para la prueba de la eficacia de los fármacos antidepresivos. Por lo tanto examinaremos el efecto de los péptidos TAT de interferencia en ratas utilizando la FST, desarrollado por Porsolt y colegas¹⁴⁶. La fase 1 de la FST se compone de un periodo de acondicionamiento previo en el que las ratas se ven obligadas a nadar en un recipiente de agua cerrado (altura del recipiente, 40 cm; diámetro del recipiente, 20 cm; altura de agua, 13 cm; temperatura, 25°C) durante 15 minutos sin una forma de escapar. En esta situación, las ratas responderán quedándose inmóviles. Veinticuatro horas después de haber sido retiradas del recipiente, cada rata será devuelta al agua para una prueba de 5 min (fase 2), y el comportamiento se registrará por una cámara de vídeo desde el lado del cilindro. El comportamiento de la rata se clasificará por cada 5 segundos y se asigna a diferentes categorías de acuerdo con un estándar descrito anteriormente⁹⁰ (escalada, buceo, natación, inmovilidad y la latencia a inmovilidad) de cintas de video por un observador entrenado cegado a las condiciones experimentales). Para examinar el potencial efecto antidepresivo del péptido de interferencia, TAT-D2_{LIL3-29-2} (5 pmol) y el péptido TAT solo se les dio ICV tres veces similar a los fármacos antidepresivos: 1 hr y 5 horas después de la prueba de natación previa (fase 1), respectivamente, y 1 hora antes de la prueba de natación (fase 2). Como se muestra en la Figura 10, la administración intra-PFC de TAT-D2_{LIL3-29-2}, pero no solo TAT, redujo las frecuencias de la inmovilidad de la rata y aumentó las frecuencias de natación de la rata y los comportamientos de escalada en una prueba de natación forzada de 5 minutos. Cada valor es la media ± S.E.M para un grupo de 6 ratas. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA).

Se ha descrito a modo de ejemplo una o más de las realizaciones actualmente preferidas. Será evidente para los expertos en la técnica que se puede hacer un número de variaciones y modificaciones sin apartarse del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

Referencias:

1. Missale, C., S.R. Nash, S.W. Robinson, M. Jaber, and M.G. Caron, (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 78(1): 189-225.

2. Picetti, R., A. Saiardi, T. Abdel Samad, Y. Bozzi, J.H. Baik, and E. Borrelli, (1997) Dopamine D2 receptors in signal transduction and behavior. *Crit Rev Neurobiol.* 11(2-3): 121-42.
- 5 3. Park, S.K., M.D. Nguyen, A. Fischer, et al., (2005) Par-4 links dopamine signaling and depression. *Cell.* 122(2): 275-87.
4. Canadian Community Health Survey Mental Health and Well-being 2002.
- 10 5. Dewa, C.S., P. Goering, and E. Lin, (2000) Bridging the worlds of academia and business: exploring the burden of mental illness in the workplace.. *The Economics of Neuroscience.* 2(6): 47-9.
6. Stephens, T. and N. Joubert, (2001) The economic burden of mental health problems in Canada. *Chronic Dis Can.* 22(1): 18-23.
- 15 7. Baldessarini, R.J., (2006), Drug therapy of depression and anxiety disorders, in Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, L.L. Brunton, Editor. McGraw-Hill.
8. Nestler, E.J., M. Barrot, R.J. DiLeone, A.J. Eisch, S.J. Gold, and L.M. Monteggia, (2002) Neurobiology of depression. *Neuron.* 34(1): 13-25.
- 20 9. Vaidya, V.A. and R.S. Duman, (2001) Depression--emerging insights from neurobiology. *Br Med Bull.* 57: 61-79.
10. Beninger, R.J. and R. Miller, (1998) Dopamine D1-like receptors and reward-related incentive learning. *Neurosci Biobehav Rev.* 22(2): 335-45.
- 25 11. Hagan, J.J., D.N. Middlemiss, P.C. Sharpe, and G.H. Poste, (1997) Parkinson's disease: prospects for improved drug therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 18(5): 156-63.
12. Hollerman, J.R., L. Tremblay, and W. Schultz, (1998) Influence of reward expectation on behavior-related neuronal activity in primate striatum. *J Neurophysiol.* 80(2): 947-63.
- 30 13. Iversen, S.D., (1995) Interactions between excitatory amino acids and dopamine systems in the forebrain: implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *Behav Pharmacol.* 6(5 And 6): 478-491.
- 35 14. Schultz, W., (1997) Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Curr Opin Neurobiol.* 7(2): 191-7.
15. Watanabe, M., T. Kodama, and K. Hikosaka, (1997) Increase of extracellular dopamine in primate prefrontal cortex during a working memory task. *J Neurophysiol.* 78(5): 2795-8.
- 40 16. Tremblay, L.K., C.A. Naranjo, L. Cardenas, N. Herrmann, and U.E. Busto, (2002) Probing brain reward system function in major depressive disorder: altered response to dextroamphetamine. *Arch Gen Psychiatry.* 59(5): 409-16.
17. Kapur, S. and J.J. Mann, (1992) Role of the dopaminergic system in depression. *Biol Psychiatry.* 32(1): 1-17.
- 45 18. Anisman, H., J. Irwin, and L.S. Sklar, (1979) Deficits of escape performance following catecholamine depletion: implications for behavioral deficits induced by uncontrollable stress. *Psychopharmacology (Berl).* 64(2): 163-70.
19. Anisman, H., G. Remington, and L.S. Sklar, (1979) Effect of inescapable shock on subsequent escape performance: catecholaminergic and cholinergic mediation of response initiation and maintenance. *Psychopharmacology (Berl).* 61(2): 107-24.
- 50 20. D'Aquila, P.S., M. Collu, G.L. Gessa, and G. Serra, (2000) The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. *Eur J Pharmacol.* 405(1-3): 365-73.
- 55 21. Basso, A.M., K.B. Gallagher, N.A. Bratcher, et al., (2005) Antidepressant-like effect of D(2/3) receptor-, but not D(4) receptor-activation in the rat forced swim test. *Neuropsychopharmacology.* 30(7): 1257-68.
22. Cervo, L., G. Grignaschi, and R. Samanin, (1990) The role of the mesolimbic dopaminergic system in the desipramine effect in the forced swimming test. *Eur J Pharmacol.* 178(1): 129-33.
- 60 23. Gambarana, C., O. Ghiglieri, I. Taddei, A. Tagliamonte, and M.G. De Montis, (1995) Imipramine and fluoxetine prevent the stress-induced escape deficits in rats through a distinct mechanism of action. *Behav Pharmacol.* 6(1): 66-73.
24. Hirano, S., S. Miyata, K. Onodera, and J. Kamei, (2007) Involvement of dopamine D1 receptors and alpha-adrenoceptors in the antidepressant-like effect of chlorpheniramine in the mouse tail suspension test. *Eur J Pharmacol.* 562(1-2): 72-6.
- 65

25. Muscat, R., D. Sampson, and P. Willner, (1990) Dopaminergic mechanism of imipramine action in an animal model of depression. *Biol Psychiatry*. 28(3): 223-30.
- 5 26. Nikulina, E.M., J.A. Skrinskaya, and N.K. Popova, (1991) Role of genotype and dopamine receptors in behaviour of inbred mice in a forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)*. 105(4): 525-9.
27. Renard, C.E., A.J. Fiocco, F. Clenet, M. Hascoet, and M. Bourin, (2001) Is dopamine implicated in the antidepressant-like effects of selective serotonin reuptake inhibitors in the mouse forced swimming test? *Psychopharmacology (Berl)*. 159(1): 42-50.
- 10 28. Rogoz, Z. and G. Skuza, (2006) Mechanism of synergistic action following co-treatment with pramipexole and fluoxetine or sertraline in the forced swimming test in rats. *Pharmacol Rep*. 58(4): 493-500.
- 15 29. Sampson, D., P. Willner, and R. Muscat, (1991) Reversal of antidepressant action by dopamine antagonists in an animal model of depression. *Psychopharmacology (Berl)*. 104(4): 491-5.
30. Vaugeois, J.M., D. Pouhe, F. Zuccaro, and J. Costentin, (1996) Indirect dopamine agonists effects on despair test: dissociation from hyperactivity. *Pharmacol Biochem Behav*. 54(1): 235-9.
- 20 31. Wang, W.F., Y.P. Lei, T. Tseng, W.Y. Hsu, C.F. Wang, C.C. Hsu, and Y.J. Ho, (2007) Effects of apomorphine on the expression of learned helplessness behavior. *Chin J Physiol*. 50(2): 63-8.
- 25 32. Yamada, J., Y. Sugimoto, and S. Yamada, (2004) Involvement of dopamine receptors in the anti-immobility effects of dopamine re-uptake inhibitors in the forced swimming test. *Eur J Pharmacol*. 504(3): 207-11.
- 30 33. Learned-Coughlin, S.M., M. Bergstrom, I. Savitcheva, J. Ascher, V.D. Schmith, and B. Langstrom, (2003) In vivo activity of bupropion at the human dopamine transporter as measured by positron emission tomography. *Biol Psychiatry*. 54(8): 800-5.
34. Meyer, J.H., V.S. Goulding, A.A. Wilson, D. Hussey, B.K. Christensen, and S. Houle, (2002) Bupropion occupancy of the dopamine transporter is low during clinical treatment. *Psychopharmacology (Berl)*. 163(1): 102-5.
- 35 35. Corrigan, M.H., A.Q. Denahan, C.E. Wright, R.J. Ragual, and D.L. Evans, (2000) Comparison of pramipexole, fluoxetine, and placebo in patients with major depression. *Depress Anxiety*. 11(2): 58-65.
36. Goldberg, J.F., M.A. Frye, and R.T. Dunn, (1999) Pramipexole in refractory bipolar depression. *Am J Psychiatry*. 156(5): 798.
- 40 37. Perugi, G., C. Toni, G. Ruffolo, F. Frare, and H. Akiskal, (2001) Adjunctive dopamine agonists in treatment-resistant bipolar II depression: an open case series. *Pharmacopsychiatry*. 34(4): 137-41.
- 45 38. Post, R.M., R.H. Gerner, J.S. Carman, J.C. Gillin, D.C. Jimerson, F.K. Goodwin, and W.E. Bunney, Jr., (1978) Effects of a dopamine agonist pibedil in depressed patients: relationship of pretreatment homovanillic acid to antidepressant response. *Arch Gen Psychiatry*. 35(5): 609-15.
39. Sitland-Marken, P.A., B.G. Wells, J.H. Froemming, C.C. Chu, and C.S. Brown, (1990) Psychiatric applications of bromocriptine therapy. *J Clin Psychiatry*. 51(2): 68-82.
- 50 40. D'Haenen H, A. and A. Bossuyt, (1994) Dopamine D2 receptors in depression measured with single photon emission computed tomography. *Biol Psychiatry*. 35(2): 128-32.
41. Ebert, D., H. Feistel, T. Loew, and A. Pirner, (1996) Dopamine and depression--striatal dopamine D2 receptor SPECT before and after antidepressant therapy. *Psychopharmacology (Berl)*. 126(1): 91-4.
- 55 42. Klimke, A., R. Larisch, A. Janz, H. Vosberg, H.W. Muller-Gartner, and W. Gaebel, (1999) Dopamine D2 receptor binding before and after treatment of major depression measured by IBZM SPECT. *Psychiatry Res*. 90(2): 91-101.
43. Parsey, R.V., M.A. Oquendo, Y. Zea-Ponce, et al., (2001) Dopamine D(2) receptor availability and amphetamine-induced dopamine release in unipolar depression. *Biol Psychiatry*. 50(5): 313-22.
- 60 44. Shah, P.J., A.D. Ogilvie, G.M. Goodwin, and K.P. Ebmeier, (1997) Clinical and psychometric correlates of dopamine D2 binding in depression. *Psychol Med*. 27(6): 1247-56.
- 65 45. Marinelli, M. and P.V. Piazza, (2002) Interaction between glucocorticoid hormones, stress and psychostimulant drugs. *Eur J Neurosci*. 16(3): 387-94.

46. Oswald, L.M., D.F. Wong, M. McCaul, et al., (2005) Relationships among ventral striatal dopamine release, cortisol secretion, and subjective responses to amphetamine. *Neuropsychopharmacology*. 30(4): 821-32.
- 5 47. Steinbush, H.W.M., (1984), Serotonin-immunoreactive neurons and their projections in the CNS: classical transmitters and transmitter receptors in the CNS, part II, in *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, A. Bjorklund, T. Hokfelt, and M.J. Kuhar, Editors. Elsevier. 68-125.
- 10 48. Gerson, S.C. and R.J. Baldessarini, (1980) Motor effects of serotonin in the central nervous system. *Life Sci*. 27(16): 1435-51.
49. Prisco, S., S. Pagannone, and E. Esposito, (1994) Serotonin-dopamine interaction in the rat ventral tegmental area: an electrophysiological study in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*. 271(1): 83-90.
- 15 50. Andreasen NC Pieces of the schizophrenia puzzle fall into place. *Science* 275: 1587-1593 [1997].
51. Flaum M & Schultz, S.K. The core symptoms of schizophrenia. *Ann. of Med*. 28: 525-531[1996]
- 20 52. Hietala, J., and Syvalahti, E. (1996) Dopamine in schizophrenia. *Ann Med* 28(6), 557-61.
53. Seeman, P. & Lee, T. Antipsychotic drugs: direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons. *Science* 188, 1217-9 (1975).
- 25 54. Creese, I., Burt, D. R. & Snyder, S. H. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science* 192, 481-3 (1976).
55. Kapur, S. & Mamo, D. Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D2 receptors. *Prog. Neuro. Biol. Psy*. 27: 1081- 1090 (2003).
- 30 56. Davis, K. L., Kahn, R. S., Ko, G. & Davidson, M. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry* 148, 1474-86 (1991).
- 35 57. Weinberger, D. R., Berman, K. F. & Chase, T. N. Mesocortical dopaminergic function and human cognition. *Ann N Y Acad Sci* 537, 330-8 (1988).
58. Laruelle, M., Kegeles, L. S. & Abi-Dargham, A. Glutamate, dopamine, and schizophrenia: from pathophysiology to treatment. *Ann N Y Acad Sci* 1003, 138-58 (2003).
- 40 59. Knable, M. B. & Weinberger, D. R. Dopamine, the prefrontal cortex and schizophrenia. *J Psychopharmacol* 11, 123-31 (1997).
60. Hall, H. et al. Distribution of D1- and D2-dopamine receptors, and dopamine and its metabolites in the human brain. *Neuropsychopharmacology* 11, 245-56 (1994).
- 45 61. Lidow, M. S., Goldman-Rakic, P. S., Gallager, D. W. & Rakic, P. Distribution of dopaminergic receptors in the primate cerebral cortex: quantitative autoradiographic analysis using [3H]raclopride, [3H]spiperone and [3H]SCH23390. *Neuroscience* 40,657-71 (1991).
- 50 62. Okubo, Y. et al. Decreased prefrontal dopamine D1 receptors in schizophrenia revealed by PET. *Nature* 385, 634-6 (1997).
63. Abi-Dargham, A. et al. Prefrontal dopamine D1 receptors and working memory in schizophrenia. *J Neurosci* 22, 3708-19 (2002).
- 55 64. Williams, G. V. & Goldman-Rakic, P. S. Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Nature* 376, 572-5 (1995).
65. Goldman-Rakic, P. S., Muly, E. C., 3rd & Williams, G. V. D(1) receptors in prefrontal cells and circuits. *Brain Res Brain Res Rev* 31, 295-301 (2000).
- 60 66. Castner, S. A., Williams, G. V. & Goldman-Rakic, P. S. Reversal of antipsychotic-induced working memory deficits by short-term dopamine D1 receptor stimulation. *Science* 287, 2020-2 (2000).
- 65 67. Davidson, M. et al. Effects of the D-1 agonist SKF-38393 combined with haloperidol in schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry* 47, 190-1 (1990).

68. Muller, U., von Cramon, D. Y. & Pollmann, S. D1- versus D2-receptor modulation of visuospatial working memory in humans. *J Neurosci* 18, 2720-8 (1998).
- 5 69. Seeman, P., Niznik, H. B., Guan, H. C., Booth, G. & Ulpian, C. Link between D1 and D2 dopamine receptors is reduced in schizophrenia and Huntington diseased brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 10156-60. [1989] .
70. Calabresi, P., R. Maj, N.B. Mercuri, and G. Bernardi, (1992) Coactivation of D1 and D2 dopamine receptors is required for long-term synaptic depression in the striatum. *Neurosci Lett.* 142(1): 95-9.
- 10 71. Castellano, C., S. Cabib, A. Palmisano, V. Di Marzo, and S. Puglisi-Allegra, (1997) The effects of anandamide on memory consolidation in mice involve both D1 and D2 dopamine receptors. *Behav Pharmacol.* 8(8): 707-12.
72. Gerfen, C.R., K.A. Keefe, and E.B. Gauda, (1995) D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons. *J Neurosci.* 15(12): 8167-76.
- 15 73. Hyman, S.E., R.C. Malenka, and E.J. Nestler, (2006) Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci.* 29: 565-98.
- 20 74. Keefe, K.A. and C.R. Gerfen, (1995) D1-D2 dopamine receptor synergy in striatum: effects of intrastriatal infusions of dopamine agonists and antagonists on immediate early gene expression. *Neuroscience.* 66(4): 903-13.
75. Sugahara, M. and H. Shiraishi, (1999) Dopamine D1 and D2 receptor agents and their interaction influence the synaptic density of the rat prefrontal cortex. *Neurosci Lett.* 259(3): 141-4.
- 25 76. Tang, Y.P., Y. Noda, and T. Nabeshima, (1997) A synergistic interaction between dopamine D1 and D2 receptor subtypes in the memory impairments induced by concussive brain injury (CBI) in mice. *Behav Brain Res.* 83(1-2): 189-93.
- 30 77. Lee, S. P., C. H. So, et al. (2004). "Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal." *J Biol Chem* 279(34): 35671-8.
78. Rashid, A.J., C.H. So, M.M. Kong, et al., (2007) D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104(2): 654-9.
- 35 79. Surmeier DJ, Reiner A, Levine MS, Ariano MA. Are neostriatal dopamine receptors co-localized? *Trends Neurosci* 16:299-305. (1993).
80. Vincent SL, Khan Y, Benes FM. Cellular colocalization of dopamine D1 and D2 receptors in rat medial prefrontal cortex. *Synapse* 19:112-120. (1995).
- 40 81. Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., and Caron, M. G. (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological reviews* 78, 189-225
- 45 82. Lee, F.J., S. Xue, L. Pei, et al., (2002) Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell.* 111(2): 219-30.
83. Rashid, A. J., So, C. H., Kong, M. M., Furtak, T., El-Ghundi, M., Cheng, R., O'Dowd, B. F., and George, S. R. (2007) D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 654-659
- 50 84. Lee, S.P., C.H. So, A.J. Rashid, et al., (2004) Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J Biol Chem.* 279(34): 35671-8.
- 55 85. So, C.H., V. Verma, B.F. O'Dowd, and S.R. George, (2007) Desensitization of the dopamine D1 and D2 receptor hetero-oligomer mediated calcium signal by agonist occupancy of either receptor. *Mol Pharmacol.* 72(2): 450-62.
86. Edwards, E., Johnson, J., Anderson, D., Turano, P., and Henn, F. A. (1986) Neurochemical and behavioral consequences of mild, uncontrollable shock: effects of PCPA. *Pharmacol Biochem Behav* 25, 415-421
- 60 87. Setnik, B., de Souza, F. G., d'Almeida, V., and Nobrega, J. N. (2004) Increased homocysteine levels associated with sex and stress in the learned helplessness model of depression. *Pharmacol Biochem Behav* 77, 155-161
88. D'Aquila, P., Monleon, S., Borsini, F., Brain, P., and Willner, P. (1997) Anti-anhedonic actions of the novel serotonergic agent fibanserin, a potential rapidly-acting antidepressant. *Eur J Pharmacol* 340, 121-132
- 65

89. Kapur, S., VanderSpek, S. C., Brownlee, B. A., and Nobrega, J. N. (2003). Antipsychotic dosing in preclinical models is often unrepresentative of the clinical condition: a suggested solution based on in vivo occupancy. *J Pharmacol Exp Ther* 305, 625-631
- 5 90. Detke, M. J., Wieland, S., and Lucki, I. (1995) Blockade of the antidepressant-like effects of 8-OH-DPAT, buspirone and desipramine in the rat forced swim test by 5HT1A receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berl)* 119, 47-54

Listado de secuencias

<110> Centro para la Salud Mental y Adicción

5 <120> Composiciones y Métodos para Modular la Interacción y Función del Receptor de Dopamina D1-D2

<130> 08911412WO

<140> aún no se conoce

10

<141> 2009-06-12

<150> US 61/060,948

15

<151> 2008-06-12

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

20

<210> 1

<211> 29

25

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 1

30

```
Gly Asn Cys Thr His Pro Glu Asp Met Lys Leu Cys Thr Val Ile Met
 1           5             10         15
```

```
Lys Ser Asn Gly Ser Phe Pro Val Asn Arg Arg Arg Val
           20             25
```

<210> 2

35

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

40

<400> 2

```
Ile Met Lys Ser Asn Gly Ser Phe Pro Val Asn Arg Arg Arg Val
 1           5             10         15
```

45

<210> 3

<211> 163

<212> PRT

50

<213> Homo Sapiens

<400> 3

ES 2 613 866 T3

Lys Ile Tyr Ile Val Leu Arg Arg Arg Arg Lys Arg Val Asn Thr Lys
 1 5 10 15

Arg Ser Ser Arg Ala Phe Arg Ala His Leu Arg Ala Pro Leu Lys Gly
 20 25 30

Asn Cys Thr His Pro Glu Asp Met Lys Leu Cys Thr Val Ile Met Lys
 35 40 45

Ser Asn Gly Ser Phe Pro Val Asn Arg Arg Arg Val Glu Ala Ala Arg
 50 55 60

Arg Ala Gln Glu Leu Glu Met Glu Met Leu Ser Ser Thr Ser Pro Pro
 65 70 75 80

Glu Arg Thr Arg Tyr Ser Pro Ile Pro Pro Ser His His Gln Leu Thr
 85 90 95

Leu Pro Asp Pro Ser His His Gly Leu His Ser Thr Pro Asp Ser Pro
 100 105 110

Ala Lys Pro Glu Lys Asn Gly His Ala Lys Asp His Pro Lys Ile Ala
 115 120 125

Lys Ile Phe Glu Ile Gln Thr Met Pro Asn Gly Lys Thr Arg Thr Ser
 130 135 140

Leu Lys Thr Met Ser Arg Arg Lys Leu Ser Gln Gln Lys Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Ala Thr Gln

5 <210> 4

<211> 115

<212> PRT

10

<213> Homo Sapiens

<400> 4

ES 2 613 866 T3

Ala Phe Asn Ala Asp Phe Arg Lys Ala Phe Ser Thr Leu Leu Gly Cys
 1 5 10 15

Tyr Arg Leu Cys Pro Ala Thr Asn Asn Ala Ile Glu Thr Val Ser Ile
 20 25 30

Asn Asn Asn Gly Ala Ala Met Phe Ser Ser His His Glu Pro Arg Gly
 35 40 45

Ser Ile Ser Lys Glu Cys Asn Leu Val Tyr Leu Ile Pro His Ala Val
 50 55 60

Gly Ser Ser Glu Asp Leu Lys Lys Glu Glu Ala Ala Gly Ile Ala Arg
 65 70 75 80

Pro Leu Glu Lys Leu Ser Pro Ala Leu Ser Val Ile Leu Asp Tyr Asp
 85 90 95

Thr Asp Val Ser Leu Glu Lys Ile Gln Pro Ile Thr Gln Asn Gly Gln
 100 105 110

His Pro Thr
 115

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido de 15 a 100 aminoácidos en longitud para uso en modular la función del receptor de dopamina (DA) para evitar y/o tratar una enfermedad seleccionada de depresión y otras afecciones psiquiátricas en un mamífero, dicho polipéptido comprende la SEQ ID NO:2.
- 10 2. El polipéptido de la reivindicación 1 para uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad seleccionada de depresión y otras afecciones psiquiátricas, en el que el polipéptido consiste de la SEQ ID NO:2.
- 15 3. El polipéptido de la reivindicación 1 para uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad seleccionada de depresión y otras afecciones psiquiátricas, que comprende adicionalmente un dominio de transducción de proteína fusionado al polipéptido.
- 20 4. El polipéptido de la reivindicación 3 para uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad seleccionada de depresión y otras afecciones psiquiátricas, en el que el dominio de transducción de proteína se selecciona del grupo que consiste de Activador Trans de Transcripción (TAT), y SynB1/3Cit.
- 25 5. El polipéptido de la reivindicación 1 para uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad seleccionada de depresión y otras afecciones psiquiátricas, en la que la depresión se selecciona de enfermedad depresiva mayor y depresión en trastorno bipolar.
- 30 6. El polipéptido de la reivindicación 1 para uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad seleccionada de depresión y otras afecciones psiquiátricas, en las que las afecciones psiquiátricas se seleccionan de esquizofrenia, sicosis en trastorno bipolar, intoxicación por drogas estimulantes, delirio, síndrome de Tourette, ansiedad o una combinación de las mismas.
7. Un método in vitro para modular la función del receptor de dopamina (DA) utilizando un polipéptido de 15 a 100 aminoácidos en longitud, dicho polipéptido comprende la SEQ ID NO:2.

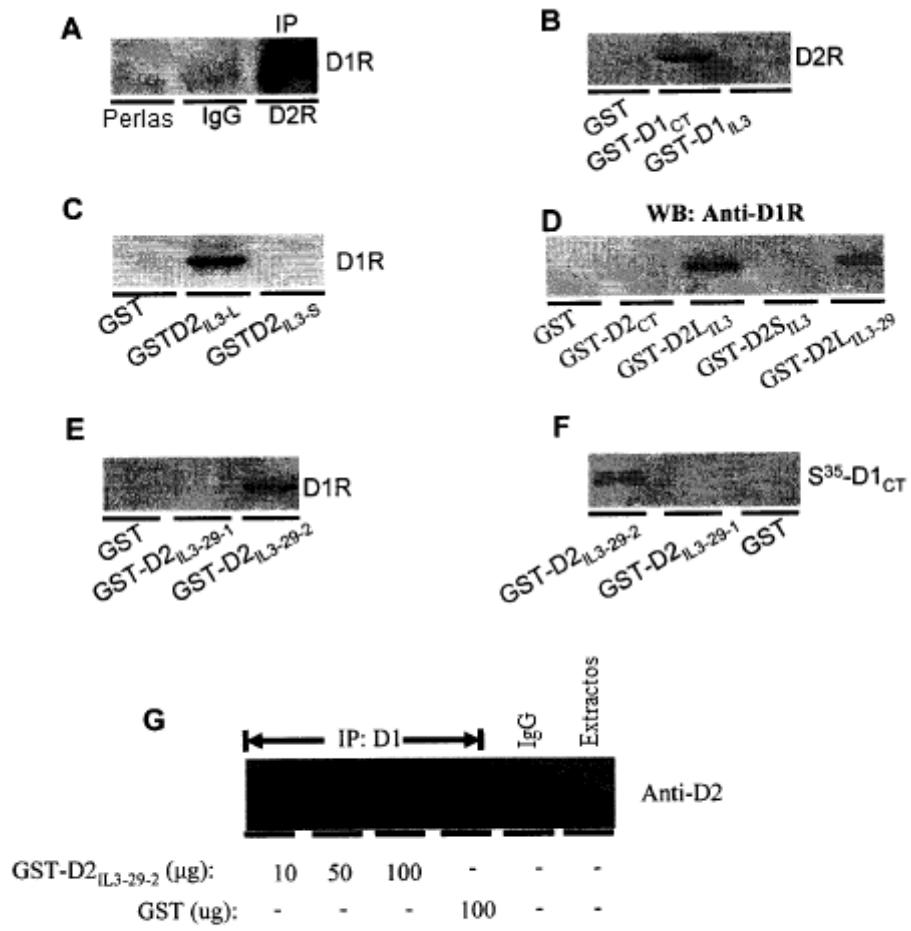


Figura 1

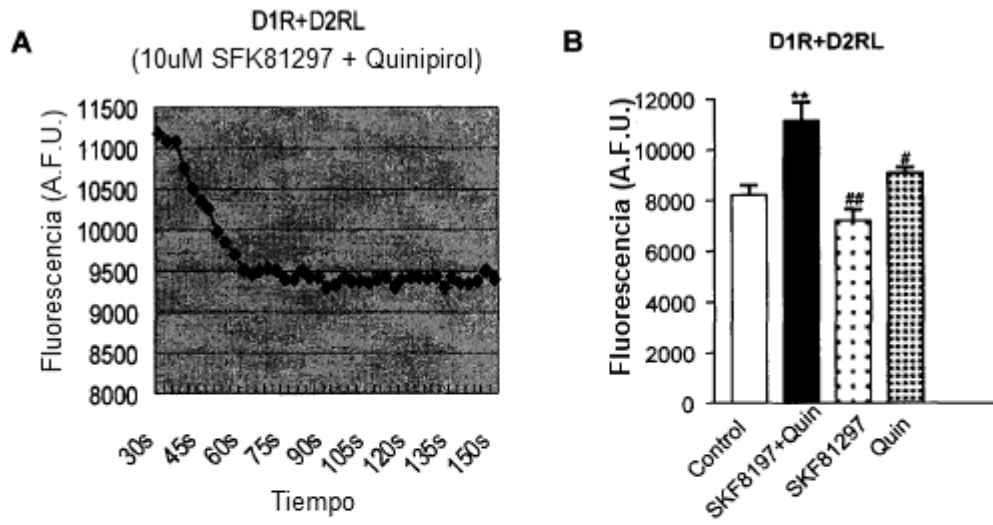


Figura 2

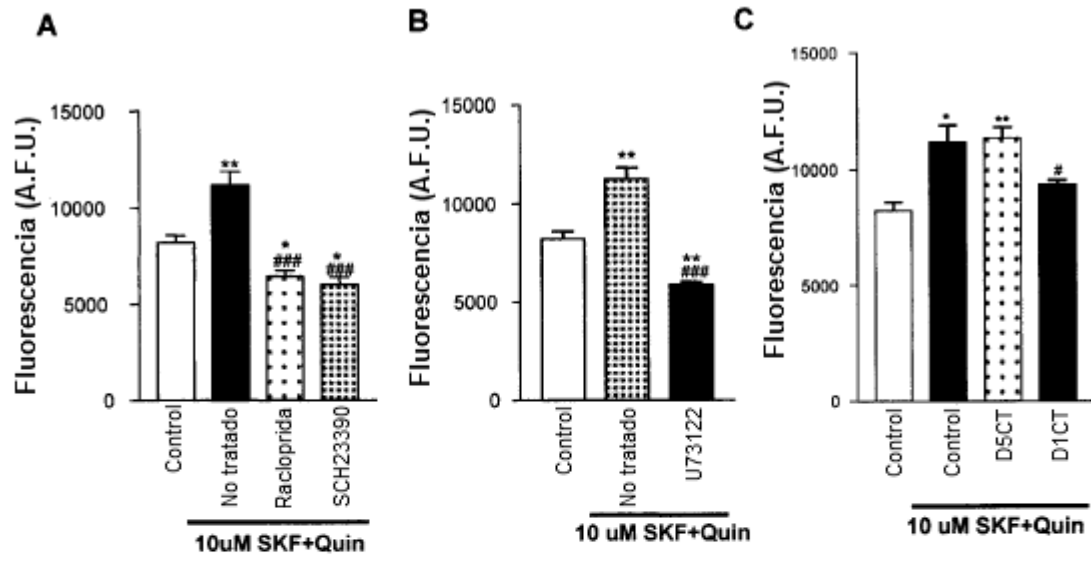


Figura 3

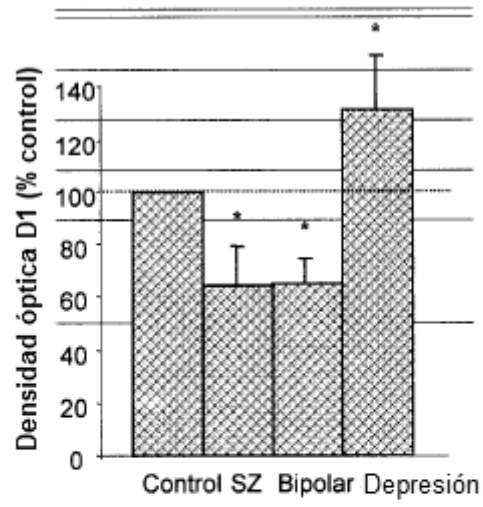


Figura 4

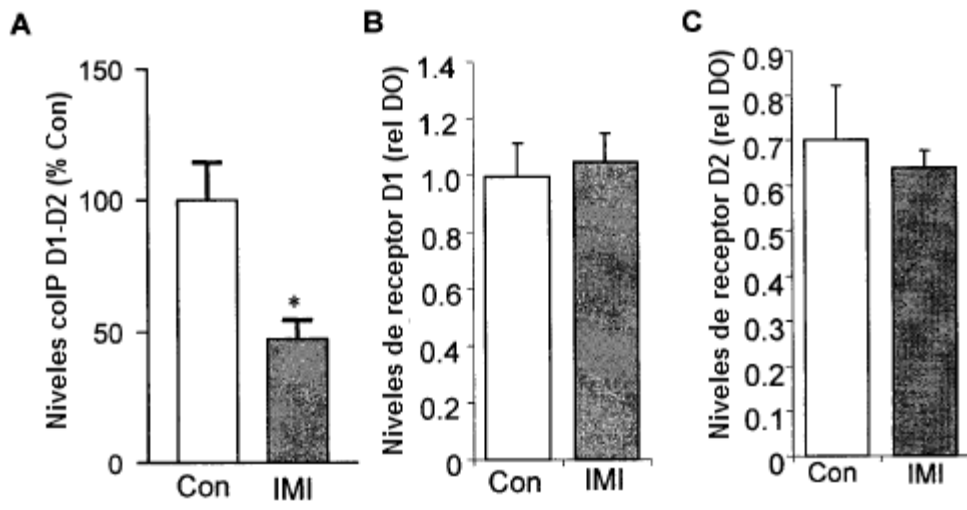


Figura 5

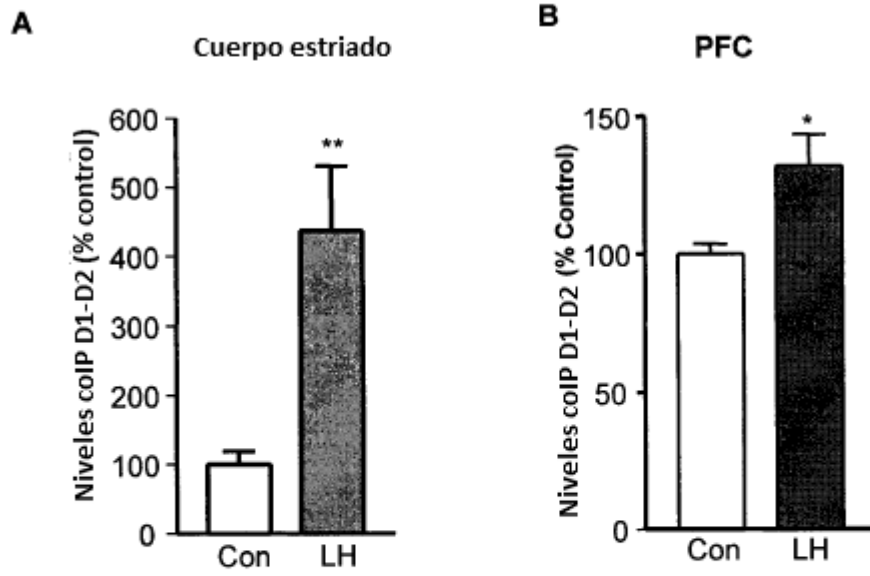


Figura 6

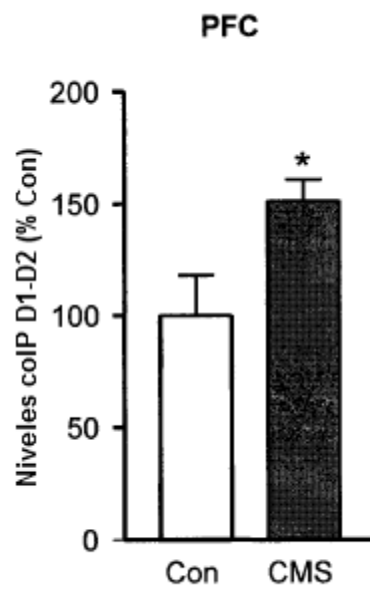


Figura 7

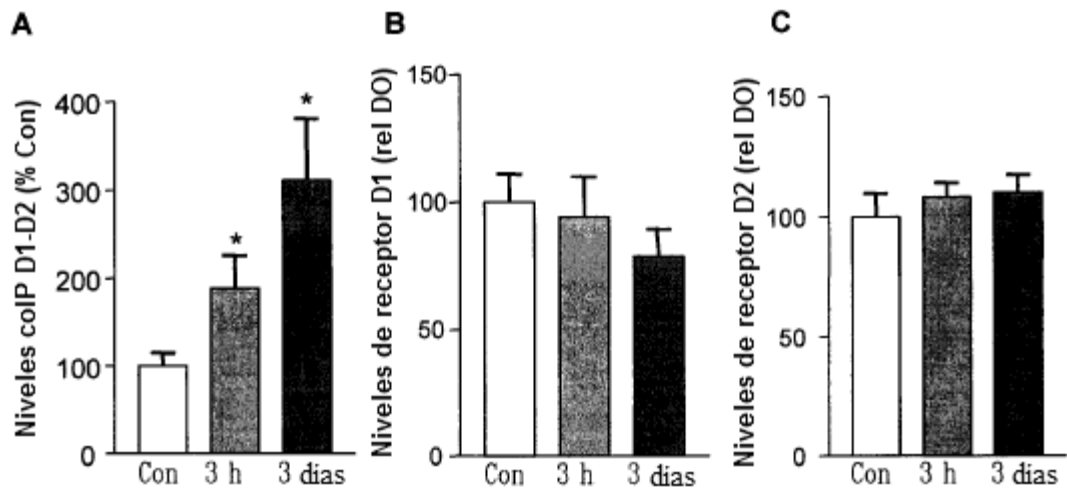


Figura 8

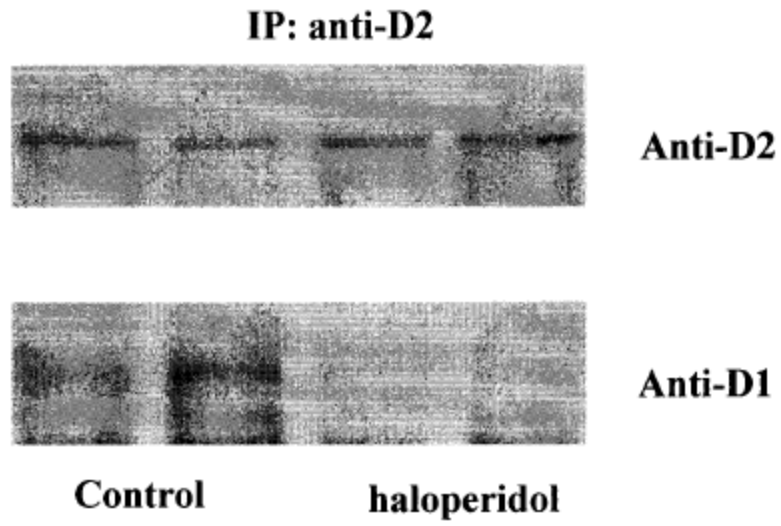


Figura 9

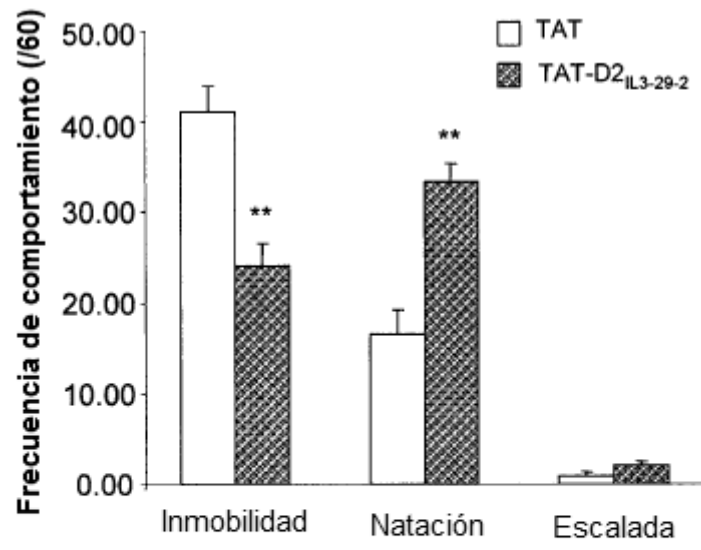


Figura 10

MDPLNLSWYD	DDLERQNWSR	PFNGSDGKAD	RPHYNYATL	LTLIAVIVF	50
GNVLVCMAS	REKALQTTN	YLIVSLAVAD	LLVATLVMPW	VVYLEVVGW	100
KFSRIHCDIF	VTLDVMMCTA	SILNLCAISI	DRYTAVAMP	LYNTRYSSKR	150
RVTVMISIVW	VLSFTISCPL	LFGLNNADQN	ECIIANPAFV	VYSSIVSFYV	200
PFIIVTLLVYI	KIYIVLRRRR	KRVNTRRSSR	AFRAHLRAPL	KGNCTHPEDM	250
KLCTVIMKSN	<u>GSFPVNR</u> RRRV	EAARRAQELE	MEMLSSTSP	ERTRYSPIPP	300
SHHQLTLPDP	SHHGLHSTPD	SPAKPEKNGH	AKDHPKIAKI	FEIQTMPNGK	350
TRTSLKTMSR	RKLSQQKEKK	ATQMLAIVLG	VFIICWLPFF	ITHILNIHCD	400
CNIPPVLYSA	FTWLGYNVSA	VNPIIYTTFN	IEFRKAFLKI	LHC	443

Figura 11

```

atggatccac tgaatctgtc ctggtatgat gatgatctgg agaggcagaa ctggagccgg 60
cccttcaacg ggtcagacgg gaaggcggac agacccact acaactacta tgccacactg 120
ctcaccctgc tcatcgtctgt catcgtcttc ggcaacgtgc tgggtgtgcat ggctgtgtcc 180
cgcgagaagg cgctgcagac caccaccaac tacctgatcg tcagcctcgc agtggccgac 240
ctcctcgtcg ccacactggg catgcccctgg gttgtctacc tggaggtggg aggtgagtgg 300
aaattcagca ggattcactg tgacatcttc gtcactctgg acgtcatgat gtgcacggcg 360
agcatcctga acttgtgtgc catcagcctc gacaggtaca cagctgtggc catgcccctg 420
ctgtacaata cgcgctacag ctccaagcgc cgggtcaccg tcatgatctc catcgtctgg 480
gtcctgtcct tcaccatctc ctgcccactc ctcttcggac tcaataacgc agaccagaac 540
gagtgcacca ttgccaaccc ggcttcgtg gtctactcct ccatcgtctc cttctacgtg 600
cccttcattg tcacctgtct ggtctacatc aagatctaca ttgtcctccg cagacgccgc 660
aagcgagtca acaccaaagc cagcagccga gctttcaggg cccacctgag ggctccacta 720
aagggcaact gtactcaccg cgaggacatg aaactctgca ccgttatcat gaagtctaat 780
gggagtttcc cagtgaacag gcggagagtg gaggtgccc ggcgagccc ggagctggag 840
atggagatgc tctccagcac cagcccaccg gagaggaccg ggtacagccc catcccaccg 900
agccaccacc agctgactct ccccgaccgg tcccaccatg gtctccacag cactcccgac 960
agccccgcca aaccagagaa gaatgggcat gccaaagacc accccaagat tgccaagatc 1020
tttgagatcc agaccatgcc caatggcaaa acccggacct cctcaagac catgagccgt 1080
aggaagctct cccagcagaa ggagaagaaa gccactcaga tgctcgccat tgttctcggc 1140
gtgttcatca tctgctggct gcccttcttc atcacacaca tcctgaacat acactgtgac 1200
tgcaacatcc cgcctgtcct gtacagcgcc ttcacgtggc tgggtatgt caacagcgcc 1260
gtgaacccca tcatctacac caccttcaac attgagttcc gcaaggcctt cctgaagatc 1320
ctccactgct ga 1332

```

Figura 12

MRTLNTSAMD	GTGLVVERDF	SVRILTACFL	SLILSTLLG	NTLVCAAVIR	50
FRHLRSKVTN	FFVISLAVSD	LLVAVLVMPW	KAVAEIAGFW	PFGSFCNIWV	100
AFDIMCSTAS	ILNLCVISVD	RYWAISSPFR	YERKMPKAA	FILISVAWTL	150
SVLISFIPVQ	LSWHKAKPTS	PSDGNATSLA	ETIDNCSSSL	SRTYAISSSV	200
ISFYIPVAIM	IVTYTRIYRI	AQKQIRRIAA	LERAHVHAKN	CQTTTGNGKP	250
VECSQPESSE	KMSEKRETKV	LKTLVIMGV	FVCCWLPFFI	LNCILPFCGS	300
GETQPCIDS	NTFDVFWFG	WANSSLNPII	YAFNADFRKA	FSTLLGCYRL	350
CPATNNAIET	VSINNGAAM	FSSHHEPRGS	ISKECNLVYL	IPHAVGSSED	400
LKKEEAAGIA	RPLEKLSPAL	SVILDYDTDV	SLEKIQPITQ	NGQHPT	446

Figura 13

ES 2 613 866 T3

```

atgaggactc tgaacacctc tgccatggac gggactgggc tggtagtgga gagggacttc 60
tctgttcgta tctcactgc ctgttctctg tcgctgctca tctgtccac gctcctgggg 120
aacacgctgg tctgtgctgc cgttatcagg ttccgacacc tgcgggccaa ggtgaccaac 180
ttctttgtca tctccttggc tgtgtcagat ctcttgggtg ccgtcctggg catgccctgg 240
aaggcagtgg ctgagattgc tggttctctg cctttgggtt ccttctgtaa catctgggtg 300
goccttgaca tcatgtgctc cactgcatcc atcctcaacc tctgtgtgat cagcgtggac 360
aggtattggg ctatctccag cctttcccg tatgagagaa agatgacccc caaggcagcc 420
ttcctcctga tcagtgtggc atggacctg tctgtactca tctccttcat cccagtgcag 480
ctcagctggc acaaggcaaa acccacaagc cctctgatg gaaatgccac ttccctgget 540
gagaccatag acaactgtga ctccagcctc agcaggacat atgccatctc atcctctgta 600
ataagctttt acatccctgt ggccatcatg attgtcacct acaccaggat ctacaggatt 660
gtccagaaac aaatacggcg cattgcccgc ttggagaggg cagcagtgca cgccaagaat 720
tggcagacca ccacaggtaa tggaaagcct gtcgaatgtt ctcaaccgga aagtctcttt 780
aagatgtcct tcaaaagaga aactaaagtc ctgaagactc tgcgggtgat catgggtgtg 840
tttgtgtgct gttggctacc tttcttcatc ttgaactgca ttttgccctt ctgtgggtct 900
ggggagacgc agcccttctg cattgattcc aacacctttg acgtgtttgt gtggtttggg 960
tgggctaatt catccttgaa ccccatcatt tatgccttta atgctgattt tcggaaggca 1020
ttttcaaccc tcttaggatg ctacagactt tgcctgcca cgaataatgc catagagacg 1080
gtgagtatca ataacaatgg ggccgcatg ttttccagcc atcatgagcc acgaggctcc 1140
atctccaagg agtgcaatct ggtttacctg atcccacatg ctgtgggctc ctctgaggac 1200
ctgaaaaagg aggaggcagc tggcatcgc agacccttgg agaagctgtc cccagcccta 1260
tcagtcatat tggactatga cactgacgtc tctctggaga agatccaacc catcacacaa 1320
aacggtcagc acccaacctg a 1341

```

Figura 14