

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 038**

51 Int. Cl.:

**A61K 49/00** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/567** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2007 E 13163588 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2659913**

54 Título: **Método para identificar moduladores de p11**

30 Prioridad:

**13.06.2006 US 813170 P**

**05.01.2007 US 878730 P**

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

**09.01.2018**

73 Titular/es:

**THE ROCKEFELLER UNIVERSITY (100.0%)  
1230 York Avenue Founders Hall 502  
New York, NY 10021, US**

72 Inventor/es:

**SVENNINGSSON, PER y  
GREENGARD, PAUL**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 649 038 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

Método para identificar moduladores de p11

5 **Campo de la invención**

La presente invención introduce una asociación biológica entre p11 y los receptores 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>4</sub>, proporcionando el uso de p11 en detecciones para tratar la enfermedad asociada a la expresión de p11.

10 **Antecedentes de la invención**

Los fármacos antidepresivos y ansiolíticos actualmente disponibles se dirigen a las rutas operativas, de degradación y biosintéticas de neurotransmisores monoamina como norepinefrina, dopamina y, en especial, serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT). La serotonina, descubierta por primera vez a finales de los años 40, desempeña un papel crucial en la modulación de numerosas funciones en el cuerpo que incluyen el estado de ánimo, el sueño, el apetito y las actividades sexuales. Actúa tanto como neurotransmisor dentro del sistema nervioso central como también como modulador de la señal periférica. Por consiguiente, las alteraciones en la actividad y disponibilidad de la serotonina se han asociado a la depresión, trastornos alimentarios (p.ej., bulimia), trastorno obsesivo compulsivo (TOC), adicción a las drogas, trastorno por déficit de atención (TDA), trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), síndrome premenstrual, trastornos de ansiedad, agresión, trastornos del sueño, disfunción sexual, trastornos gastrointestinales (p.ej. síndrome del intestino irritable), manía, migraña y trastorno bipolar. Los antidepresivos convencionales generalmente regulan la transmisión de la señal mediante (1) la prevención de la degradación de serotonina inhibiendo la monoaminooxigenasa o (2) el aumento del transporte neuronal de serotonina inhibiendo la recaptación de serotonina por las neuronas presinápticas. Sin embargo, a pesar de más de medio siglo de estudio intensivo de las rutas de la serotonina, la comprensión de estas rutas es incompleta y no existen pruebas diagnósticas o biomarcadores basados de manera bioquímica para la disfunción de las rutas de la serotonina.

Los receptores 5-HT (serotonina) son heterogéneos y se encuentran en la superficie de varias células. El receptor 5-HT<sub>1B</sub> es uno de los 14 subtipos de receptores de serotonina y se encuentra de manera abundante a lo largo del sistema nervioso central. La estructura, distribución y función aparente de los receptores 5-HT<sub>1B</sub> son muy similares en roedores y seres humanos. Este receptor se ha asociado a un intervalo diverso de funciones fisiológicas y comportamientos que incluyen estado de ánimo, cognición, agresión, adicción, sueño y alimentación. Los receptores 5-HT<sub>1B</sub> se encuentran en neuronas que contienen serotonina y que no contienen serotonina. Los receptores 5-HT<sub>1B</sub> se encuentran predominantemente en la parte presináptica de la neurona, donde actúan como autorreceptores terminales implicados en la regulación de liberación de serotonina por las neuronas. Cuando se estimulan mediante enlace a serotonina, inhiben la liberación de serotonina adicional por la neurona; cuando no se estimulan, aumenta la liberación de serotonina. De este modo, el bloqueo de estos receptores 5-HT<sub>1B</sub> tiende a aumentar los niveles de serotonina. Existen pruebas de que los receptores 5-HT<sub>1B</sub> son heterorreceptores, implicados en el control de la liberación de otros neurotransmisores, como acetilcolina, glutamato, dopamina, norepinefrina y ácido gamma aminobutírico, así como serotonina. Algunos receptores 5-HT<sub>1B</sub> se encuentran también de manera postsináptica. El receptor 5-HT<sub>4</sub> se encuentra en el sistema gastrointestinal, donde interviene en la motilidad gastrointestinal, así como el sistema nervioso central. Mientras que 5-HT<sub>1B</sub> se asocia generalmente a la disminución en AMPc, el receptor 5-HT<sub>4</sub> se asocia al aumento en la actividad de AMPc. Los receptores 5-HT<sub>4</sub> en el cerebro modulan la liberación de neurotransmisores (acetilcolina, dopamina, serotonina y GABA) y mejoran la transmisión sináptica. También desempeñan un papel en la mejora de la memoria, fomentando la liberación de proteína precursora del amiloide soluble no amiloidogénica (sAPP<sub>α</sub>, en inglés). Puesto que se considera ampliamente que la enfermedad de Alzheimer es mediada por la deposición de formación de placas de beta amiloide, aumentar la función del receptor 5-HT<sub>4</sub>, aumentando así la liberación de sAPP<sub>α</sub>, representa un método potencial para el tratamiento o profilaxis de la enfermedad de Alzheimer.

La proteína p11 es miembro de la familia de proteínas S100 mano-EF. p11 también se conoce como cadena ligera de anexina II, cadena ligera de lipocortina II, cadena ligera de calpactina I, 42C o proteína relacionada con S-100 y estos términos pueden usarse aquí de manera intercambiable. R. Donato, *Biochim. Biophys. Acta*, 1450, 191 (1999). Está presente en varias células independientemente o como un heterotetrámero. El heterotetrámero se compone de dos copias de p36, también conocidas como cadena pesada de calpactina I o anexina II, y dos copias de p11. Dentro de la célula, el heterotetrámero se sitúa en la superficie citoplasmática de la membrana plasmática en el citoesqueleto submembranoso y se sugiere que el complejo puede desempeñar un papel en los eventos de tráfico como exocitosis, endocitosis y adhesión célula-célula. Se ha afirmado que p11 interviene en la invasión de células tumorales, crecimiento tumoral y metástasis. US 2004/0142897A1. No se ha identificado previamente la implicación de p11 con los receptores 5-HT o trastornos psiquiátricos.

El documento WO2005/066317 desvela métodos para predecir y superar la resistencia a la quimioterapia en cáncer de ovario y para predecir la aparición de cáncer de colon asociado a la expresión de p11.

65

X-L. Huang (J. Biol Chem., (2002) 277,41, p38431-38440 desvela que EGF induce la expresión de p11 a través de la activación de EGF del receptor tirosina quinasa EGF y la activación de p44/42, p38 y cPLA<sub>2</sub>. SVENNINGSOSON PER et al (Curr. Opin. Pharmacol., (2007), 1, p 27-32) describe p11 (S100A10) como una proteína adaptadora inducible que modula funciones neuronales. Sharp (Science, (2006) 311, 5757, p 45-46) y Andujar, G. (Biofutur, (2006), 264 p 13-14) analizan el papel de p11 en la depresión.

### Sumario de la invención

Los solicitantes han descubierto de manera sorprendente que la proteína p11 interactúa específicamente con receptores 5-HT<sub>1B</sub> y parece que ayuda a regular la señalización de la serotonina química mensajera del cerebro, una diana clave de numerosos agentes psicoterapéuticos. Svenningsson et al., *Science* (2006) 331:77-80; Svenningsson et al., *Current Opinion in Pharmacology* (2006), 6:1-6 (ambos incorporados en el presente documento por referencia). p 11 parece desempeñar un papel crucial en el reclutamiento de receptores 5-HT<sub>1B</sub> hacia la membrana plasmática neuronal donde son más funcionales. Además, los solicitantes han descubierto que p11 también interactúa con receptores 5-HT<sub>4</sub>. Los solicitantes han demostrado que los niveles p11 pueden estar implicados directamente en el desarrollo de la depresión, trastornos de ansiedad y enfermedades psiquiátricas similares que se cree que implican receptores de serotonina defectuosos. La comparación de niveles de p11 en los cerebros de sujetos deprimidos (seres humanos y modelos de ratones deprimidos) con los de aquellos de sujetos no deprimidos (seres humanos y ratones de control no deprimidos) muestra un nivel sustancialmente inferior de p11 en sujetos deprimidos en comparación con sujetos no deprimidos. Además, los niveles p11 tienden a ser superiores en sujetos tratados con diversos tipos de antidepresivos, incluyendo antidepresivos tricíclicos, inhibidores de monoaminooxidasa (MAOI) y terapia electroconvulsiva. Existe una sobreexpresión de p11 en animales tratados con antidepresivos. Por ejemplo, hemos observado que los monos que reciben el inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina fluoxetina muestran un aumento significativo (más del doble) en la expresión de p11 en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y se han demostrado efectos similares en los cerebros de ratones que reciben fluoxetina. De modo similar, los modelos animales con un gen p11 *knock-out* o desactivado presentan menos receptores 5-HT<sub>1B</sub> en la membrana plasmática neuronal, presentan señalización de serotonina reducida y muestran un fenotipo similar a la depresión. De manera interesante, la expresión de p11 disminuye en respuesta a niveles excesivos de hormonas glucocorticoides, que se liberan a menudo en respuesta al estrés, que teniendo en cuenta el trabajo de los solicitantes, proporciona una posible explicación bioquímica para la conexión observada entre la depresión y los eventos altamente estresantes. Basándose en estos sorprendentes descubrimientos por parte de los Solicitantes, p11 ha mostrado ser una diana de diagnóstico adecuada así como una diana del fármaco y herramienta de exploración para el desarrollo de tratamientos para trastornos previamente asociados a receptores 5-HT<sub>1B</sub> o 5-HT<sub>4</sub>, o con la función de la serotonina (o falta de la misma).

La frase "trastornos relacionados con el receptor p11/5-HT" como se usa en el presente documento incluye cualquier trastorno mediado por, asociado a, provocado por, afectado por, activado por lo que implica la movilización (o la carencia de movilización) de los receptores 5-HT, por ejemplo, receptores 5-HT<sub>1B</sub> o 5-HT<sub>4</sub>, por la proteína p11. Los trastornos relacionados con el receptor p11/5-HT pueden incluir, pero no se limitan a, trastornos psiquiátricos (por ejemplo, depresión, trastornos de ansiedad, agresión, manía, trastorno bipolar, trastorno de déficit de atención, trastorno hiperactivo de déficit de atención, adicción a drogas y trastorno obsesivo compulsivo y enfermedad de Alzheimer), trastornos del sueño (por ejemplo insomnio), trastornos de la alimentación (por ejemplo bulimia), disfunción sexual y trastornos gastrointestinales (por ejemplo síndrome de colon irritable); especialmente depresión.

La invención proporciona de esta manera, entre otros:

1. Métodos para identificar compuestos útiles en el tratamiento de trastornos relacionados con el receptor p11/5-HT.

### Descripción detallada de la invención

De esta manera la invención proporciona métodos como se definen por las reivindicaciones adjuntas.

En una realización, la invención se refiere a un método para identificar moduladores de p11 útiles para el tratamiento o mejora de trastornos relacionados con el receptor p11/5-HT que comprende realizar ensayos para detectar la capacidad de un modulador candidato a regular (aumentar o disminuir) la expresión de p11 o actividades de p11 asociadas a receptores 5-HT (método 1).

Por lo tanto, el método 1 incluye

- 1.1. Un método para identificar moduladores de p11 útiles para tratar o mejorar trastornos relacionados con el receptor p11/5-HT comprende las etapas de proporcionar una primera muestra y una segunda muestra, en el que la muestra comprende células mononucleares de sangre periférica, p.ej., un cultivo celular o muestra de tejido o célula, que contienen cantidades equivalentes de producto génico de p11 (p.ej., proteína o ARNm); poner en contacto la primera muestra con el modulador de p11 candidato; y determinar si las cantidades de producto génico de p11 en la primera muestra han cambiado, donde un aumento de cantidad de producto génico indica

que los moduladores candidatos pueden ser útiles para tratar o mejorar trastornos asociados a un nivel anormalmente bajo de p11 mientras que un descenso en la cantidad indica que los moduladores candidatos pueden ser útiles para tratar o mejorar trastornos asociados a un nivel anormalmente alto de p11.

La memoria descriptiva enseña además métodos para fines de fondo o comparativos, tales como:

- 5 1.2. Un método para identificar moduladores de p11 útiles para tratar o mejorar trastornos relacionados con el receptor p11/5-HT que comprende las etapas de proporcionar una primera muestra y una segunda muestra que contengan un número equivalente de receptores 5-HT<sub>1B</sub> y/o 5-HT<sub>4</sub> en la superficie celular; poner en contacto la primera muestra con el modulador de p11 candidato; y determinar si el número de receptores 5-HT<sub>1B</sub> y/o 5-HT<sub>4</sub> en la superficie celular de la primera muestra ha cambiado en comparación con la segunda muestra, donde un aumento en el número de receptores 5-HT<sub>1B</sub> y/o 5-HT<sub>4</sub> en la superficie celular indica que los moduladores candidatos pueden ser útiles para tratar o mejorar trastornos asociados a un nivel anormalmente bajo de p11, mientras que un descenso en el número de receptores 5-HT<sub>1B</sub> y/o 5-HT<sub>4</sub> en la superficie celular indica que los moduladores candidatos pueden ser útiles para tratar o mejorar trastornos asociados a un nivel anormalmente alto de p11.
- 10 1.3. Un método para identificar moduladores de p11 que comprende poner en contacto un modulador de p11 candidato con una célula que comprende un gen indicador enlazado de forma operativa a un promotor de p11 y usar el nivel de expresión del gen indicador como una referencia para la expresión de p11.
- 15 1.4. Un método para identificar moduladores de p11 útiles para tratar o mejorar trastornos asociados a niveles bajos de p11, que comprenden realizar ensayos para detectar la capacidad de un modulador candidato para aumentar la expresión de p11 o aumentar las actividades de p11 asociadas a 5-HT<sub>1B</sub> y/o 5-HT<sub>4</sub> para reclutar receptores 5-HT<sub>1B</sub> y/o 5-HT<sub>4</sub> en la neuronal.
- 20 1.5. Un método según cualquiera de los métodos 1-1.4 donde los trastornos asociados a niveles anormalmente bajos de p11 se eligen entre depresión, trastorno obsesivo compulsivo, adicción a las drogas, trastornos alimentarios, trastorno por déficit de atención o trastorno por déficit de atención e hiperactividad y enfermedad de Alzheimer.
- 25 1.6. Un método según cualquiera de los métodos precedentes 1-1.5 donde el trastorno es la depresión.
- 1.7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1 - 1.6 donde un modulador de p11 se usa como un control positivo.
- 30 1.8. Un método según el método 1.6 donde el modulador de p11 se selecciona entre antidepresivos tricíclicos, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, triptanos e inhibidores de monoaminooxidasa.
- 1.9. Un método según el método 1.8 donde el modulador de p11 es un antidepresivo tricíclico seleccionado entre amitriptilina (nombre de marca: Elavil), desipramina (nombre de marca: Norpramin), imipramina (nombre de marca: Tofranil) y nortriptilina (nombre de marca: Aventyl, Pamelor)
- 35 1.10. Un método según el método 1.8 donde el modulador de p11 es imipramina.
- 1.11. Un método según el método 1.8 donde el modulador de p11 es un inhibidor de monoaminooxidasa (MAOI), p.ej., seleccionado entre isocarboxazida (nombre de marca: Marplan); fenzelzina (nombre de marca: Nardil) y tranilcipromina (nombre de marca: Parnate)
- 40 1.12. Un método según el método 1.11 donde el MAOI es tranilcipromina.
- 1.13. Un método según el método 2.8 donde el modulador de p11 es un inhibidor selectivo de recaptación de serotonina, p.ej., seleccionado entre citalopram (nombre de marca: Celexa); escitalopram (nombre de marca: Lexapro); fluoxetina (nombre de marca: Prozac); paroxetina (nombre de marca: Paxil, Pexeva); sertralina (nombre de marca: Zoloft).
- 45 1.14. Un método para identificar moduladores de p11 útiles para tratar o mejorar trastornos asociados con altos niveles de p11, que comprende realizar ensayos para detectar la capacidad de un modulador candidato para disminuir la expresión de p11 o inhibir o reducir las actividades de p11 asociadas a 5-HT<sub>1B</sub> y/o 5-HT<sub>4</sub> para reducir o inhibir la capacidad de p11 de reclutar receptores 5-HT<sub>1B</sub> y/o 5-HT<sub>4</sub> para la membrana plasmática neuronal.
- 50 1.15. Un método según 1.14 donde los trastornos asociados a altos niveles de p11 incluyen, sin carácter limitativo, manía, trastorno bipolar, trastornos de ansiedad, agresión, trastornos del sueño, disfunción sexual y trastornos gastrointestinales.
- 1.16. Un método según 1.15 para identificar moduladores de p11 útiles para tratar o mejorar trastornos asociados a altos niveles de p11, donde dichos moduladores se seleccionan entre ARNsi, oligonucleótidos antisentido y anticuerpos monoclonales para p11.
- 55 1.17. Un método según cualquiera de los métodos 1-1.16 donde los compuestos supresores de p11 seleccionados entre ARNsi, oligonucleótidos antisentido y anticuerpos monoclonales para p11 se usan como controles o comparadores.
- 1.18. Un método, p.ej., según cualquiera de los métodos 1-1.17 para identificar miméticos de p11 útiles para tratar o mejorar trastornos asociados a un nivel anormalmente bajo de p11, que comprende realizar ensayos para detectar la capacidad de un mimético de p11 candidato para asociarse o interactuar con receptores 5-HT<sub>1B</sub> y/o 5-HT<sub>4</sub> para reclutar receptores 5-HT<sub>1B</sub> y/o 5-HT<sub>4</sub> hacia la membrana plasmática neuronal.
- 60 1.19. Un método según el método 1.18 para identificar miméticos de p11 útiles para tratar o mejorar la depresión que comprenden realizar ensayos para detectar la capacidad de un mimético de p11 candidato de reclutar receptores de 5-HT<sub>1B</sub> y/o 5-HT<sub>4</sub> hacia la membrana plasmática neuronal.
- 1.20. El método según cualquiera de los métodos anteriores donde el trastorno relacionado con el receptor p11/5-HT es un trastorno relacionado con el receptor p11/5-HT<sub>1B</sub>.
- 65 1.21. El método según cualquiera de los métodos precedentes donde el trastorno relacionado con el receptor p11/5-HT es un trastorno relacionado con el receptor p11/5-HT<sub>4</sub>.

- 1.22. Una célula que comprende un gen indicador enlazado de manera operable a un promotor de p11.  
 1.23. Uso de una célula según 1.22 en un método según cualquiera de los métodos 1-1.21.

- 5 Como su uso aquí y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", y "el", "la" incluyen referencia al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, la referencia al "anticuerpo", por ejemplo, es una referencia a uno o más anticuerpos y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, etc. El tratamiento de "un" trastorno mediado por el receptor p11/5-HT<sub>1B</sub> puede incluir el tratamiento de múltiples de dichos trastornos.
- 10 El término "p11" se refiere aquí a cualquiera o todas las formas de polipéptido de p11, incluyendo, sin carácter limitativo, formas parciales, isoformas, formas precursoras, polipéptido de longitud completa, proteínas de fusión que contienen la secuencia de p11 o fragmentos de cualquiera de los anteriores, de seres humanos o cualquier otra especie.
- 15 La frase "trastornos relacionados con el receptor p11/5-HT" en el presente documento se refiere a cualquier trastorno mediado por, asociado a, causado por, afectado por, provocado por lo que implica a la proteína p11 y su movilización de receptores 5-HT, especialmente los receptores 5-HT<sub>1B</sub> o 5-HT<sub>4</sub>. Los trastornos relacionados con el receptor p11/5-HT pueden incluir, sin carácter limitativo, trastornos psiquiátricos (p.ej., depresión, trastornos de ansiedad, agresión, manía, trastorno bipolar, trastorno por déficit de atención, trastorno por déficit de atención e hiperactividad, enfermedad de Alzheimer, adicción a las drogas y trastorno obsesivo compulsivo), trastornos del sueño (p.ej., insomnio), trastornos alimentarios (p.ej., bulimia), disfunción sexual y trastornos gastrointestinales (p.ej., síndrome del intestino irritable). "Trastornos asociados a un nivel anormalmente bajo de p11" hace referencia aquí a trastornos como la depresión, trastorno obsesivo compulsivo, adicción a las drogas, trastornos alimentarios, trastorno por déficit de atención o trastorno por déficit de atención e hiperactividad o enfermedad de Alzheimer, especialmente depresión. Del mismo modo, los "trastornos asociados a niveles anormalmente elevados de p11" hacen referencia a trastornos como manía, trastorno bipolar, trastornos de ansiedad, agresión, trastornos del sueño, disfunción sexual y trastornos gastrointestinales.
- 20 La frase "modulador de p11" hace referencia a cualquier sustancia o compuesto (p.ej., pequeñas moléculas o polipéptidos según se describe aquí) o métodos de tratamiento (p.ej., terapia electroconvulsiva) capaces de cambiar (aumentar o disminuir) la expresión de un gen que codifica la proteína p11, transcripción de un gen p11 o ADNc en un ARNm, la traducción de un ARNm de p11 en proteína, modificación postraducciona de una proteína p11, localización celular o extracelular de una proteína p11, o cantidad de p11 localizada en o sobre la membrana celular o dentro de la célula, en comparación con la actividad de p11 en células similares. El término "modulador de p11" hace referencia también a cualquier sustancia capaz de afectar (positiva o negativamente) la capacidad de las proteínas p11 para reclutar los receptores 5-HT<sub>1B</sub> hacia la membrana plasmática neuronal. Los ejemplos de moduladores de p11 útiles para tratar los trastornos asociados a niveles anormalmente bajos de p11 como depresión incluyen antidepresivos tricíclicos (p.ej., imipramina (Tofranil®), amitriptilina (ELAVIL®, ENDEP® TRYPTANOL®), clomipramina (ANAFRANIL®), desipramina (NORPRAMIN®, PERTOFRANE®), lofepramina (GAMANIL®, LOMONT®), nortriptilina (PAMELOR®), trimipramina (SURMONTIL®)). Otros moduladores útiles para tratar o mejorar trastornos asociados a un nivel bajo de p11 (p.ej., depresión) incluyen inhibidores de monoaminoxidasa (MAOI) (p.ej., tranilcipromina (Parnate), isocarboxazida (Marplan), moclobemida (Aurorix, Manerix, MOCLODURA®) o fenelzina (Nardil)), e inhibidores de recaptación de la serotonina selectivos (p.ej., citalopram (nombre de marca: Celexa); escitalopram (nombre de marca: Lexapro); fluoxetina (nombre de marca: Prozac); paroxetina (nombre de marca: Paxil, Pexeva); sertralina (nombre de marca: Zoloft)).
- 30 Los ensayos de exploración convencionales (tanto *in vitro* como *in vivo*) pueden usarse para identificar moduladores que inhiben o inducen actividad de p11 y/o expresión de gen p11. Dicho ensayo es un ensayo indicador de gen, donde las células transfectadas con un constructo indicador que comprende un gen marcador (p.ej., luciferasa o proteína verde fluorescente (GFP)) secuencia abajo de un sitio de enlace de p11 entra en contacto con un compuesto modulador candidato y los cambios en la expresión de la proteína marcadora se miden y comparan con una muestra de célula transfectada que no está en contacto con ningún modulador. Los moduladores candidatos que inhiben o inducen la expresión de proteína marcadora se identifican como fármacos útiles para el tratamiento de trastornos relacionados con el receptor p11/5-HT. Los moduladores candidatos que inhiben la expresión de proteínas marcadoras serían candidatos de fármacos útiles para el tratamiento de trastornos asociados a un nivel anormalmente alto de p11 mientras que un modulador candidato que induce la expresión de proteína marcadora serían candidatos de fármacos útiles para el tratamiento de trastornos asociados a un nivel anormalmente bajo de p11.
- 35 Los moduladores de p11 pueden incluir, p.ej., compuestos químicos naturales o no naturales, en forma libre o forma de sal aceptable desde un punto de vista farmacéutico, oligonucleótidos p11 sentido o antisentido, anticuerpos inhibidores de p11, péptidos de bloqueo de receptor de p11, antagonistas de p11, ARNsi, ADN de triple hélice, ribozimas, aptámeros de ARN y/o ARN de doble cadena. El término "antisentido" según su uso aquí hace referencia a secuencias de nucleótidos que son complementarias a una secuencia de ADN o ARN específica. Por lo tanto, "polinucleótido antisentido de p11" se refiere a cualquier secuencia de nucleótido que es complementaria a una secuencia de ADN o ARN de p11. Funcionalmente, el polinucleótido antisentido p11 es capaz de disminuir la
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

expresión de proteína p11 en una célula. El término "hebra antisentido" se usa en relación con una hebra de ácido nucleico que es complementaria a la hebra "sentido". Las moléculas antisentido pueden producirse por cualquier método, que incluye síntesis ligando el gen o genes de interés en una orientación inversa a un promotor viral que permita la síntesis de una hebra complementaria. Una vez introducida en una célula, esta hebra transcrita combina secuencias naturales producidas por la célula para formar dúplex. Estos dúplex bloquean entonces la mayor transcripción o traducción. La designación "negativo" se usa a veces en relación con la hebra antisentido y "positivo" se usa a veces en relación con la hebra sentido. De modo similar, el término "sentido" aquí usado, hace referencia a secuencias de nucleótido que pueden traducirse para producir un polipéptido específico o fragmento del mismo. Por tanto, un "polinucleótido sentido de p11" hace referencia a cualquier secuencia de nucleótido que puede traducirse para producir polipéptido de p11 o fragmento del mismo. Funcionalmente, el polinucleótido sentido de p11 es capaz de aumentar la expresión de proteínas p11 en una célula.

De manera específica, las sustancias que inhiben la expresión de p11 al nivel de ácido nucleico pueden incluir ribozimas, oligonucleótidos antisentido, ADN de triple hélice, aptámeros de ARN y/o ARN de doble hebra dirigidos a una secuencia de nucleótidos apropiada del ácido nucleico p11. Estas moléculas inhibitoras pueden crearse usando técnicas convencionales por aquellos con experiencia en la técnica sin experimentación o carga indebida. Por ejemplo, las modificaciones (p.ej., inhibición) de expresión de genes pueden obtenerse mediante el diseño de moléculas antisentido, ADN o ARN, para las regiones de control de los genes que codifican los polipéptidos aquí analizados, es decir, promotores, potenciadores e intrones. Por ejemplo, pueden usarse los oligonucleótidos derivados del sitio de iniciación de la transcripción, p.ej., entre posiciones -10 y +10 desde el sitio de inicio. No obstante, todas las regiones del gen pueden usarse para diseñar una molécula antisentido para crear aquellas que dan una hibridación más fuerte al ARNm y dichos oligonucleótidos antisentido adecuados pueden producirse e identificarse mediante procedimientos de ensayo estándares conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Del mismo modo, la inhibición de la expresión del gen puede lograrse usando metodología de apareamiento de bases de "triple hélice". Gee, J.E. et al. (1994) In: Huber, B.E. y B. I. Carr, *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N.Y.). Estas moléculas pueden diseñarse también para bloquear la traducción de ARNm evitando que los transcritos se unan a ribosomas. Pueden usarse también ribozimas, moléculas de ARN enzimático para inhibir la expresión de genes catalizando la escisión específica de ARN. El mecanismo de acción de las ribozimas implica hibridación específica de la secuencia de la molécula de ribozima a ARN diana complementario, seguido de escisión endonucleolítica. Los ejemplos que pueden usarse incluyen moléculas de ribozima de motivo de "horquilla" o "martillo" diseñadas por ingeniería genética que pueden diseñarse para catalizar de manera eficiente y específica la escisión endonucleolítica de secuencias de genes, por ejemplo, el gen para p11. Los sitios de escisión de ribozima específicos dentro de cualquier diana de ARN potencial se identifican inicialmente mediante exploración de la molécula diana para localizar los sitios de escisión de ribozima que incluyen las siguientes secuencias: GUA, GUU y GUC. Una vez identificados, las secuencias cortas de ARN de entre 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del gen diana que contiene el sitio de escisión pueden evaluarse para analizar las características estructurales secundarias que pueden hacer que los oligonucleótidos sean inoperables. Grassi y Marini, 1996, *Annals of Medicine* 28: 499-510; Gibson, 1996, *Cancer and Metastasis Reviews* 15: 287-299; Cotten et al., 1989 *EMBO J.* 8:3861-3866. Los aptámeros de ARN también pueden introducirse en o expresarse en una célula para modificar la abundancia o actividad del ARN. Los aptámeros de ARN son ligandos de ARN específicos para proteínas, como para ARN de Tat y Rev (Good et al., 1997, *Gene Therapy* 4: 45-54) que pueden inhibir específicamente su traducción. La inhibición gen-específica de la expresión de genes puede lograrse también utilizando tecnologías de ARN de doble hebra convencionales. Puede encontrarse una descripción de dicha tecnología en WO 99/32619.

Las moléculas antisentido, ADN de triple hélice, aptámeros de ARN y ribozimas de la presente invención pueden prepararse por cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de moléculas de ácido nucleico. Estos incluyen técnicas para sintetizar químicamente oligonucleótidos como la síntesis química en fase sólida de la fosforamidita. De modo alternativo, las moléculas de ARN pueden generarse mediante transcripción *in vivo* e *in vitro* de secuencias de ADN que codifican los genes de los polipéptidos aquí analizados. Dichas secuencias de ADN pueden incorporarse en una amplia variedad de vectores con promotores de ARN polimerasa adecuados como T7 o SP6. Alternativamente, los constructos de ADNc que sintetizan ARN antisentido de manera constitutiva o inducible pueden introducirse en líneas celulares, células o tejidos.

Las moléculas de ARNsi pueden generarse mediante apareamiento de dos moléculas de ARN de una sola hebra complementarias (una de las cuales coincide con una parte del ARNm diana) (Fire et al., pat. estadounidense nº 6.506.559) o mediante el uso de una molécula de ARN de horquilla sencilla que se dobla sobre sí misma para producir el requisito de parte de doble hebra (Yu et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:6047-52). Las moléculas de ARNsi pueden sintetizarse químicamente (Elbashir et al. (2001) *Nature* 411:494-98) o producirse mediante la transcripción *in vitro* usando plantillas de ADN de una sola hebra (Yu et al., supra). Alternativamente, las moléculas de ARNsi pueden producirse biológicamente, de manera transitoria (Yu et al., supra; Sui et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:5515-20) o estable (Paddison et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:1443-48), usando vectores de expresión que contienen las secuencias de ARNsi sentido y antisentido. Recientemente, la reducción de niveles de ARNm diana en células humanas primarias, de manera específica de la secuencia y eficiente, se demuestra usando vectores adenovirales que expresen ARN en horquilla, que se procesan en ARNsi (Arts et al.

(2003) *Genome Res.* 13:2325-32).

Según su uso aquí, la expresión "actividades de p11" hace referencia a cualquier actividad bioquímica directa de p11 o actividad indirecta asociada a p11 para afectar (positiva o negativamente) la interacción de p11 con receptores 5-HT<sub>1B</sub>. Los moduladores que aumentan actividades de p11 con receptores 5-HT<sub>1B</sub> pueden ser cualquier sustancia que aumenta la asociación de p11 a receptores 5-HT<sub>1B</sub> para aumentar la capacidad de proteínas p11 de reclutar receptores 5-HT<sub>1B</sub> hacia la membrana plasmática neuronal. Por el contrario, los moduladores que inhiben o reducen las actividades de p11 con receptores 5-HT<sub>1B</sub> pueden ser cualquier sustancia que bloquea o reduce la interacción entre p11 y los receptores 5-HT<sub>1B</sub> para reducir la capacidad de las proteínas p11 de reclutar receptores 5-HT<sub>1B</sub> hacia la membrana plasmática neuronal.

El término "mimético de p11" hace referencia a una sustancia o polipéptido natural o no natural o cualquier fragmento de los mismos que imita a la proteína p11 en estructura, función, propiedad y/o actividad, modulando, regulando o aumentando así la disponibilidad del receptor 5-HT<sub>1B</sub> en la membrana plasmática neuronal. El mimético de p11 puede imitar a p11 en su totalidad o en parte.

El término "sujeto" hace referencia a cualquier organismo humano o no humano.

Un "sujeto de control" hace referencia a cualquier organismo humano o no humano que no tiene y/o no se sospecha que tenga un trastorno, síndrome, enfermedad, afección y/o síntoma de trastornos relacionados con el receptor p11/5-HT.

La frase "muestra biológica" puede incluir cualquier muestra que comprenda células mononucleares de sangre periférica, incluyendo material biológico obtenido de por ejemplo un organismo, un fluido corporal, un producto de deshecho, una línea celular, una biopsia, un cultivo tisular u otra fuente que contenga una proteína p11, un polipéptido, un oligonucleótido, un ARNm o un polinucleótido o cualquier fragmento de cualquiera de los anteriores.

Un "diagnóstico positivo" de un trastorno relacionado con el receptor p11/5-HT hace referencia a una afección donde el sujeto que se está examinando presenta un nivel anormal de p11 en comparación con un sujeto de control que no presenta y/o no se sospecha que presente un trastorno relacionado con el receptor p11/5-HT. Un nivel anormal hace referencia a un nivel que es superior o inferior al del sujeto de control. Por ejemplo, un sujeto con un diagnóstico positivo de depresión presenta un nivel deprimido de p11 comparado con un sujeto de control que no tiene y/o no se sospecha que tenga depresión y/o síntomas de la misma. Por otro lado, un sujeto con un diagnóstico positivo de estados de trastornos de ansiedad presenta una expresión de p11 elevada en comparación con un sujeto de control que no tiene y/o no se sospecha que tenga trastornos de ansiedad y/o síntomas del mismo.

El nivel de p11 puede determinarse mediante ensayo de proteínas p11 en una muestra de tejido o células obtenidas de un sujeto de un tipo que exprese p11. Por ejemplo, pueden usarse monocitos y/o linfocitos. Del mismo modo, el nivel de p11 puede determinarse también mediante ensayo para determinar el nivel de ARNm de p11 en la muestra. La expresión del gen p11 (p.ej., niveles de ARNm) puede determinarse usando métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, análisis Northern convencional o micromatrices disponibles en el mercado. Además, el efecto de la inhibición de los compuestos de prueba de p11 y/o niveles de proteína reguladora relacionada puede detectarse con un ensayo basado en anticuerpos ELISA o ensayo de reacción de marcación con fluorescencia. Un nivel anormal de ARNm o proteína p11 en un sujeto comparado con una referencia, p.ej., un sujeto de control o población de control (o un estándar de referencia basado en mediciones anteriores en una población de control) constituye un diagnóstico positivo de trastornos relacionados con el receptor p11/5-HT. Por lo tanto, un nivel elevado de p11 en un sujeto comparado con la referencia constituye un diagnóstico positivo de trastornos asociados a niveles altos de p11, p.ej., manía, trastorno bipolar, trastornos de ansiedad, trastorno agresivo, trastornos del sueño, disfunción sexual y trastornos gastrointestinales (p.ej., enfermedad intestinal inflamatoria o IBD). Por otro lado, un nivel deprimido o reducido de p11 en un sujeto comparado con el del sujeto de control constituye un diagnóstico positivo de trastornos asociados con niveles bajos de p11, p.ej., depresión, trastorno obsesivo compulsivo, adicción a las drogas, trastornos alimentarios, trastorno por déficit de atención o trastorno por déficit de atención e hiperactividad. En un modo de realización preferido, la invención abarca un método de diagnóstico en un sujeto que padece depresión, que comprende detectar el nivel de p11 en dicho sujeto y comparar dicho nivel al nivel de p11 en un sujeto de control, donde un nivel deprimido de p11 en dicho sujeto comparado con el de un sujeto de control constituye un diagnóstico positivo de depresión.

Según su uso aquí, el término "anticuerpo" hace referencia a moléculas intactas así como fragmentos de las mismas, como Fa, F(ab')<sub>2</sub>, y Fv, que son capaces de unirse al determinante epitópico. Los anticuerpos que se unen a polipéptidos de p11 pueden prepararse usando polipéptidos intactos o fragmentos que contengan pequeños péptidos de interés como el antígeno inmunizante. Los péptidos o polipéptidos utilizados para inmunizar un animal pueden derivarse de la traducción de ARN o sintetizarse químicamente y pueden conjugarse a una proteína portadora, si se desea. Los portadores comúnmente utilizados se acoplan químicamente a péptidos que incluyen albúmina de suero bovino y tiroglobulina. El péptido acoplado se usa entonces para inmunizar a un animal (p.ej., un ratón, una rata o un conejo).

Los factores a considerar para la optimización de una terapia para un paciente incluyen la afección concreta que se está tratando, el mamífero concreto que se está tratando, la condición clínica del paciente específico, el lugar de administración del compuesto activo, el tipo concreto de compuesto activo, el método de administración, el régimen de administración y otros factores conocidos por los profesionales sanitarios. La cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto activo a administrar se regirá por dichas consideraciones y es la cantidad mínima necesaria para el tratamiento de trastornos mediados por p11, preferiblemente, la depresión.

Los anticuerpos adecuados para p11 o proteínas reguladoras relacionadas pueden obtenerse de una fuente comercial o producirse según métodos convencionales. Por ejemplo, se describen aquí métodos para la producción de anticuerpos capaces de reconocer de manera específica uno o más epítomos de genes expresados de manera diferenciada. Dichos anticuerpos pueden incluir, sin carácter limitativo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAbs), anticuerpos humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) y fragmentos de enlace al epítomo de cualquiera de los anteriores.

Para la producción de anticuerpos para polipéptidos de p11 aquí analizados, pueden inmunizarse diversos animales hospedadores mediante inyección con los polipéptidos, o una parte de los mismos. Dichos animales hospedadores pueden incluir, sin carácter limitativo, conejos, ratones y ratas. Pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmune, dependiendo de la especie hospedadora, incluyendo, sin carácter limitativo, adyuvantes de Freund (completo e incompleto), geles minerales como hidróxido de aluminio, sustancias tenso-activas como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles como BCG (Bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivados del suero de animales inmunizados con un antígeno, como producto génico diana, o un derivado funcional antigénico del mismo. Para la producción de anticuerpos policlonales, los animales hospedadores como aquellos descritos arriba, pueden inmunizarse por inyección con los polipéptidos, o una parte de los mismos, complementado con adyuvantes como se ha descrito también arriba.

Los anticuerpos monoclonales, que son poblaciones homogéneas de anticuerpos para un antígeno específico, puede obtenerse por cualquier técnica que facilita la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo, como métodos bien conocidos en la técnica. Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina que incluye IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas, preferiblemente IgG. El hibridoma o línea celular transformada que produce el mAb de esta invención puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*. Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla pueden adaptarse para producir anticuerpos de una sola cadena de gen expresado de manera diferenciada. Los anticuerpos de una sola cadena se forman enlazando fragmentos de cadena ligera y pesada de la región Fv mediante un puente de aminoácido, resultando en un polipéptido de una sola cadena.

La detección de los anticuerpos descritos aquí puede lograrse usando análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), ELISA estándar y técnicas de obtención de imágenes estándares usadas *in vitro* o *in vivo*. La detección puede facilitarse acoplando (es decir, uniendo físicamente) el anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radioactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, 3-galactosidasa o acetilcolinesterasa. Los ejemplos de complejos de grupo prostético adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina. Los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina. Un ejemplo de material luminiscente incluye luminol. Los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina. Los ejemplos de material radioactivo adecuado incluyen <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>35</sup>S, <sup>3</sup>H.

Por ejemplo, en un ensayo avanzado típico se inmoviliza un anticuerpo no marcado sobre un sustrato sólido y se pone en contacto la muestra a ensayar con la molécula unida. Tras un periodo de incubación adecuado, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo binario anticuerpo-antígeno, se añade un segundo anticuerpo, marcado con una molécula indicadora capaz de inducir una señal detectable, y se incuba durante el tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo ternario de anticuerpo-antígeno- anticuerpo marcado. A continuación, se quita mediante lavado cualquier material no reaccionado y se determina la presencia del antígeno mediante observación de una señal, o puede cuantificarse mediante comparación con una muestra de control que contenga cantidades conocidas de antígeno. Las variaciones del ensayo avanzado incluyen el ensayo simultáneo, en el que se añaden la muestra y anticuerpo simultáneamente al anticuerpo enlazado, o un ensayo inverso en el que el anticuerpo marcado y una muestra a ensayar se combinan primero, se incuban y se añaden al anticuerpo no marcado unido a la superficie. Estas técnicas son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica y la posibilidad de variaciones menores será fácilmente evidente. Según su uso aquí, "ensayo tipo sándwich" abarcará todas las variaciones en la técnica básica de doble anticuerpo. Para los inmunoensayos de la presente invención, el único factor limitador es que el anticuerpo marcado sea un anticuerpo que sea específico para el polipéptido p11 o

proteína reguladora relacionada o fragmentos de los mismos.

Las moléculas indicadoras más utilizadas comúnmente son enzimas, moléculas que contienen fluoróforo o radionucleido. En el caso de un inmunoensayo con enzimas, se conjuga una enzima al segundo anticuerpo, normalmente por medio de glutaraldehído o periodato. Sin embargo, como se reconocerá fácilmente, existe una amplia variedad de técnicas de enlace diferentes, que resultan conocidas a aquellos con experiencia en la técnica. Las enzimas comúnmente utilizadas incluyen peroxidasa de rábano, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa y fosfatasa alcalina, entre otros. Los sustratos a utilizar con las enzimas específicas se utilizan generalmente para la producción de un cambio de color detectable con la hidrólisis por la enzima correspondiente. Por ejemplo, p-nitrofenilfosfato es adecuado para su uso con conjugados de fosfatasa alcalina; para conjugados de peroxidasa, se usan comúnmente 1,2-fenilendiamina o toluidina. También es posible emplear sustratos fluorogénicos, que arrojan un producto fluorescente en lugar de los sustratos cromogénicos apuntados arriba. Después, se añade una solución que contiene el sustrato apropiado al complejo terciario. El sustrato reacciona con la enzima enlazada al segundo anticuerpo, dando una señal visual cualitativa, que puede cuantificarse en mayor medida normalmente por espectrofotometría, para dar una evaluación de la cantidad de polipéptido o fragmento de polipéptido de interés que está presente en la muestra de suero.

Alternativamente, los compuestos fluorescentes, como fluoresceína y rodamina, pueden unirse químicamente a anticuerpos sin alterar su capacidad de enlace. Cuando se activa por iluminación con luz de una longitud de onda determinada, el anticuerpo marcado con fluorocromo absorbe la energía luminosa, induciendo un estado de excitabilidad en la molécula, seguido de la emisión de la luz a una longitud de onda mayor característica. La emisión aparece como un color característico visualmente detectable con un microscopio óptico. Las técnicas de inmunofluorescencia e inmunoensayo enzimático se encuentran ambas establecidas en la técnica y se prefieren específicamente para el presente método. Sin embargo, pueden emplearse también otras moléculas indicadoras, como radioisótopos, moléculas quimioluminiscentes o bioluminiscentes. Será evidente para aquellos expertos en la técnica la variación del procedimiento para adecuarse al uso requerido.

Cuando los anticuerpos se destinan a usos terapéuticos, se prefiere que tengan una región constante humana para minimizar su inmunogenicidad. Los anticuerpos quiméricos se hacen mediante corte y empalme (*splicing*) de ADN que codifica la región variable de una molécula de anticuerpo donante de especificidad del antígeno apropiada junto con ADN que codifica la región constante de una molécula de anticuerpo humana. Los anticuerpos pueden modificarse en mayor medida para proporcionar anticuerpos humanizados, que se modifican además para eliminar residuos no humanos. Por lo general, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos casos, residuos de la región estructural (FR, del inglés *framework region*) Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por residuos no humanos correspondientes. El anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias estructurales o CDR importadas. Estas modificaciones se realizan para optimizar y refinar en mayor medida el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de manera óptima al menos una parte de una región o dominio constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente aquel de una inmunoglobulina humana. Alternativamente, los anticuerpos derivados de fuentes no humanas, pero que usan genes de inmunoglobulina completamente humanos puede producirse, p.ej., usando técnicas de expresión en fago o animales transgénicos, p.ej., ratones transgénico que tienen genes IgC e IgV humanos, y dichos anticuerpos deberían presentar un inmunogenicidad mínima.

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" según su uso aquí se refiere a una cantidad de fármaco suficiente para tratar o mejorar los efectos patológicos de trastornos relacionados con el receptor p11/5-HT. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente efectiva de modulador de p11 suficiente para tratar o mejorar los efectos patológicos de un trastorno relacionado con el receptor p11/5-HT es una cantidad suficiente para inducir o inhibir la expresión de p11 o regular (aumentar o disminuir) los niveles de receptores 5-HT<sub>1B</sub> en la membrana plasmática neuronal. Por lo tanto, una cantidad terapéuticamente efectiva de modulador de p11 suficiente para tratar o mejorar los efectos patológicos de la depresión es una cantidad suficiente para inducir la expresión de p11 o aumentar la capacidad de p11 de reclutar receptores 5-HT<sub>1B</sub> hacia la membrana plasmática neuronal. Por el contrario, una cantidad terapéuticamente efectiva de modulador de p11 suficiente para tratar o mejorar los efectos patológicos de trastornos de ansiedad sería una cantidad suficiente para inhibir la expresión de p11 o disminuir los receptores 5-HT<sub>1B</sub> en la membrana plasmática neuronal. El modulador de p11 puede administrarse por cualquier método conocido en la técnica incluyendo la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, transdérmica o intracerebral. La administración puede ser rápida, como por inyección, o durante un periodo de tiempo, como mediante infusión lenta o administración de una formulación de liberación lenta.

La expresión "p11 *knock-out* o desactivado" hace referencia a una secuencia de ADN que tiene un defecto, alteración o mutación total o parcial o está desprovisto o es deficiente en el gen p11. Un "ratón con p11 desactivado"

o "ratón p11 *knock-out*" o "ratón transgénico p11 *knock-out*" se refiere, por tanto, a un ratón donde el ADN introducido en dicho ratón contiene un defecto, deficiencia, mutación o alteración en el gen que expresa proteínas p11. Como resultado del defecto o deficiencia en el gen p11, un ratón p11 *knock-out* tiene menos receptores 5-HT<sub>1B</sub> en la membrana plasmática neuronal y/o presenta reducidos receptores 5-HT<sub>1B</sub> o ninguno en la membrana plasmática neuronal, presentando así un fenotipo similar a la depresión en comparación con el ratón de tipo salvaje. El término "*knock-out*" (desactivado) puede referirse a una desviación cualquiera a partir de 1 nucleótido hasta la eliminación del gen completo en comparación con el gen original. Los ratones *knock-out* pueden generarse usando cualquier técnica conocida en el sector como la recombinación homóloga específica.

El término "recombinante" se refiere al ADN que ha sido aislado de su fuente nativa o endógena y modificado químicamente o mediante enzimas para eliminar nucleótidos flanqueadores de origen natural o proporcionar nucleótidos flanqueadores que no se producen de manera natural. Los nucleótidos flanqueadores son aquellos nucleótidos que se encuentran secuencia arriba o secuencia abajo de la secuencia o subsecuencia de nucleótidos descrita.

Según su uso aquí, un "vector" es algo que administra un ácido nucleico recombinante a una célula o tejido deseado, por ejemplo, un virus que puede infectar, transfectar o transducir de manera permanente o transitoria una célula. Se reconoce que un vector puede ser un ácido nucleico desnudo o un ácido nucleico formando un complejo con proteína o lípido. El vector comprende opcionalmente proteínas y/o membranas y/o ácidos nucleicos virales o bacterianos (p.ej., una membrana celular, una envoltura lipídica viral, etc.). Para los fines de esta solicitud, un vector puede ser también una célula que comprende el ácido nucleico recombinante. Se reconoce que los vectores incluyen normalmente un casete de expresión que sitúa el ácido nucleico de interés bajo el control de un promotor, o pueden incluir simplemente un promotor flanqueado por secuencias dirigidas para lograr la inserción secuencia arriba del gen cuya expresión se desea. Los vectores incluyen, sin carácter limitativo, replicones (p.ej., plásmidos, bacteriófagos) a los que pueden unirse fragmentos de ADN y replicarse. De este modo, los vectores incluyen, sin carácter limitativo, ADN circular autorreplicativo y autónomo (plásmidos) e incluyen tanto los plásmidos de expresión como de no expresión. Cuando un cultivo celular o microorganismo recombinante se describe como que alberga un "vector de expresión", éste incluye tanto ADN circular extracromosómico como ADN que se ha incorporado al cromosoma huésped. Cuando un vector está siendo mantenido por una célula huésped, el vector puede replicarse de manera estable por las células durante la mitosis como una estructura autónoma, o puede incorporarse en el genoma del huésped.

La frase "secuencia de ácido nucleico que codifica" se refiere a un ácido nucleico que contiene codones que, cuando se transcriben y/o traducen, expresan una proteína o péptido específico. La secuencia de ácido nucleico puede comprender además secuencias flanqueadoras, intrones y/o secuencias que codifican péptidos que se escinden posteriormente después de la traducción. Las secuencias de ácido nucleico incluyen tanto la secuencia de cadena de ADN que se transcribe en ARN y la secuencia de ARN que se traduce en proteína. Las secuencias de ácido nucleico incluyen tanto las secuencias de ácido nucleico de longitud completa como las secuencias no completas derivadas de las secuencias de longitud completa. Se entenderá además que la secuencia incluye la secuencia nativa así como las secuencias que utilizan codones degenerados, p.ej., para adaptar la secuencia a la preferencia de codón en una célula huésped específica.

"Ácidos nucleicos", según su uso aquí, pueden ser ADN o ARN. Los ácidos nucleicos pueden incluir también nucleótidos modificados que permiten la lectura correcta mediante una polimerasa y no altera la expresión de un polipéptido codificado por ese ácido nucleico.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ejemplo y algunos de los ejemplos son meramente para fines de referencia:

### Ejemplo 1 - Análisis de doble híbrido en levadura

Para comprender mejor la función de receptores 5-HT<sub>1B</sub>, el tercer bucle intracelular de este receptor se usa como cebo en un análisis de doble híbrido en levadura. El tercer bucle intracelular del receptor 5-HT<sub>1B</sub> de rata (aminoácidos 226-311) es amplificado por PCR a partir de una biblioteca de ADNc de cerebro de rata de longitud completa y subclonado en los sitios Nco I/Sal de un vector derivado de pAS2 cebo, para la expresión como una proteína de fusión del dominio de unión a ADN de GAL4. El plásmido cebo-receptor 5-HT<sub>1B</sub> se transforma, usando el método del acetato de litio, en levadura cepa CG1945. El tamaño y nivel de expresión de la proteína de fusión se comprueba mediante inmunotransferencia usando un anticuerpo de dominio de unión a ADN anti-GAL4. La biblioteca de ADNc cerebral de rata de pACT2 se transforma en levadura cepa Y187. Los transformantes cebo y presa se unen en medio YPD y se colocan en placa en medio (-LWH) selectivo para la expresión del gen indicador de histidina. Se analizan 244 x 106 clones diploides de la biblioteca de ADNc de cerebro de rata de pACT2. Tras el crecimiento en este medio, se llevó a cabo un ensayo de revestimiento de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactósido. Más de 300 clones crecieron en medio selectivo y fueron positivos para el gen indicador de β-galactosidasa. Los extractos de levadura se prepararon de clones positivos dobles. Los elementos de presa se amplifican por PCR (5'-

CGCGTTT GGAATCACTACA GGGATG-3' y 5'-GAAATTGA GATGGTGCACGATGCAC-3') y son secuenciados usando un oligonucleótido de vector presa (5'-GGCTTACCCATAC GATGTTC-3'). p11 se identifica como la presa mayor mediante una búsqueda BLAST. Los clones de plásmido de presa p11 se rescatan de manera selectiva de la levadura, transformados en *Escherichia coli* para la amplificación de ADN y retransformados en la levadura cepa Y187 con (i) el vector cebo-receptor 5-HT<sub>1B</sub> original, (ii) el vector de control cebo para probar la transactivación, (iii) otros dos constructos de cebo irrelevantes, pRP21 y CΔ115, o (iv) constructos de cebo correspondientes a los terceros bucles intracelulares de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>5A</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, D<sub>1</sub> o D<sub>2</sub> para probar la especificidad de la interacción. Los cebos correspondientes a receptores 5-HT<sub>1A</sub> (aminoácidos 218-345), 5-HT<sub>2A</sub> (aminoácidos 236-302), 5-HT<sub>5A</sub> (aminoácidos 233-295), 5-HT<sub>6</sub> (aminoácidos 209-265), D<sub>1</sub> (aminoácidos 256-312) y D<sub>2</sub> (aminoácidos 211-343), respectivamente, se producen mediante amplificación por PCR a partir de biblioteca de ADNc de cerebro de rata y subclonando en el vector derivado de pAS2. Cada uno de estos cebos se cotransforma en levadura con el constructo presa de p11 y la interacción se analiza usando medio -LW o -LWH y un ensayo de revestimiento de X-gal. Todos los cotransformantes se cultivaron en las placas de control de medio (-LW) no selectivo. En el medio selectivo (-LWH), se detectó una interacción positiva de p11 con receptores 5-HT<sub>1B</sub>, pero no con ningún otro cebo.

Veintiséis de los 29 clones de presa doble positivos codifican el gen para p11. p11 interactúa con receptores 5-HT<sub>1B</sub> en este ensayo pero no con receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>5A</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, dopamina D<sub>1</sub> o dopamina D<sub>2</sub>, dos cebos irrelevantes (Cdelta115 y pRP21), o el plásmido vacío, lo que demuestra la especificidad de la asociación de p11 con el receptor 5-HT<sub>1B</sub>.

### Ejemplo 2 - Coimmunoprecipitación.

Células HeLa, que contienen p11 endógeno (S1), se cultivan en medio DMEM hasta una confluencia del 60 % y son transfectadas con *pcDNA3.1-5-HT1BR-V5* o constructos de plásmido vacío con Lipofectamine según el protocolo del fabricante. Tras la transfección, los extractos de células se solubilizan a 4°C (en 50 mM Tris, pH 7,4/150 mM NaCl/2 mM EDTA/2 mM EGTA/0,1 % Triton e inhibidores de proteasa). Los extractos celulares son inmunoprecipitados con un anticuerpo monoclonal contra V5, incubados con proteína G y lavados meticulosamente. En otros experimentos, el tejido cerebral de la corteza cerebral de ratones p11 KO y de tipo salvaje es homogeneizado en tampón de solubilización a 4°C. Los extractos cerebrales son inmunoprecipitados con un anticuerpo policlonal del receptor 5-HT<sub>1B</sub>, incubados con proteína A y lavados meticulosamente. Los inmunoprecipitados de las células y los tejidos cerebrales se sitúan en un gel SDS-PAGE y se transfieren a membranas de PVDF. Se lleva a cabo la inmunotransferencia usando un anticuerpo monoclonal de ratón contra p11 (1/100). El enlace del anticuerpo se detecta mediante incubación con un anticuerpo unido a peroxidasa de rábano secundario dirigido contra IgG de ratón y quimioluminiscencia aumentada.

p11 coimmunoprecipita con receptores 5-HT<sub>1B</sub> en células HeLa y tejido cerebral.

### Ejemplo 3 - Inmunofluorescencia.

Se transfectaron células HeLa con constructos *pcDNA3.1-5-HT1BR* o *pcDNA3.1-V5*. Treinta y seis horas después de la transfección se fijaron células con paraformaldehído 4 %/0,01 M PBS durante 10 minutos. Se bloqueó la tinción no específica mediante incubación con BSA 10 % en PBS. Se visualizaron los receptores 5-HT<sub>1B</sub> y p11 mediante incubación con anticuerpo anti-V5-FITC (1/500) y anticuerpo anti-p11 de ratón (1/1000) seguido de anticuerpos secundarios de cabra anti-ratón marcados con Alexa Fluor 568 (1/500). Tras lavado en PBS, se montan los cubreobjetos sobre portaobjetos usando Gel/Mount. Las imágenes de proteínas fluorescentes se adquieren usando un microscopio de barrido láser.

La inmunofluorescencia muestra una colocalización prominente entre p11 y receptores 5-HT<sub>1B</sub> en la superficie celular.

### Ejemplo 4 - Experimentos de hibridación *in situ*.

Todos los experimentos con animales se llevan a cabo de acuerdo con las directrices de los comités institucionales del cuidado de animales en la Rockefeller University, el Karolinska Institute y los National Institutes of Health. Se usaron cerebros de ratas adultas macho Sprague Dawley para determinar la distribución regional de la expresión del gen p11 y su codistribución con la expresión del gen receptor 5-HT<sub>1B</sub>. Para algunos experimentos se usaron cerebros de ratones p11 KO y sus homólogos de tipo salvaje. Para estudiar los efectos del tratamiento de fármacos psicoactivos en la expresión de ARNm de p11, se trataron ratones C57B16 adultos macho de tipo salvaje con una sola inyección o repetidas inyecciones (una al día durante 14 días) de vehículo, imipramina (10 mg/kg, i.p.), haloperidol (1 mg/kg, i.p.), diazepam (5 mg/kg, i.p.), tranilcipromina (10 mg/kg, i.p.) o risperidona (1 mg/kg, i.p.). Se mató a los animales 1 hora después de la última inyección. Para estudiar el efecto del tratamiento electroconvulsivo (ECT) en la expresión de p11, se expuso a las ratas macho Sprague Dawley (200 gramos) a ECT diario mediante electrodos tipo clip de oreja (45 mA; 0,3 s) durante 10 días y se mató a las ratas 18 horas tras la última estimulación. Los animales de control recibieron tratamiento simulado en el que los electrodos se colocaban en las orejas de las ratas pero no se aplicaba ninguna corriente.

Existe un aumento de ARNm de p11 en el cerebro anterior tras el tratamiento de 14 días con imipramina y con tranilcipromina, y tras la terapia electroconvulsiva repetida, pero no con haloperidol, risperidona o diazepam.

#### **Ejemplo 5 - Niveles de proteína p11 en modelos de depresión en ratón y en seres humanos sanos y deprimidos.**

Se trataron ratones C57B16 macho adultos de tipo salvaje una vez al día durante 14 días con vehículo o imipramina (10 mg/kg, i.p.) y se mató a los ratones 1 hora tras la última inyección. Se expuso a las ratas macho Sprague Dawley a ECT diario mediante electrodos tipo clip de oreja (45 mA; 0,3 s) durante 10 días y se mató a las ratas 18 horas tras la última estimulación. Se sacrificaron los ratones hembra adultos H/Rouen indefensos y NH/Rouen no indefensos. De estos 3 grupos de tratamiento diferentes y sus correspondientes controles, se diseccionaron cortezas frontales y se congelaron.

El tejido congelado fresco de la corteza cingulada humana de controles sanos y pacientes que padecen depresión grave se obtiene del Stanley Foundation Neuropathology Consortium. Las cortezas congeladas se sonicaron en 1 % SDS y se hirvieron durante 10 minutos. Se retuvieron pequeñas alícuotas del homogeneizado para la determinación de proteínas mediante el método de ensayo de proteínas del ácido bicinónico.

Se procesaron cantidades iguales de proteína usando geles de acrilamida con gradiente 10-20 %. Se lleva a cabo la inmunotransferencia con anticuerpos policlonales o monoclonales contra p11 (1/1000 para las muestras humanas y 1/200 para las muestras de roedores) y antisueros policlonales contra actina (1/1000). La unión de anticuerpo se detecta mediante quimioluminiscencia y se cuantifica mediante densitometría, usando el software de National Institutes of Health IMAGE 1.63. El nivel de p11 se normaliza al nivel de actina. Todos los datos se presentan como niveles normalizados.

Para estudiar la regulación de ARNm de p11 en un modelo de ratón genético de depresión, se compara tejido del cerebro anterior de ratones hembra y macho adultos H/Rouen indefensos y NH/Rouen no indefensos. La proteína y ARNm de p11 son notablemente inferiores en ratones H/Rouen. Se encontraron resultados similares con los dos géneros.

Se obtuvieron secciones de corte del criostato de cuarenta  $\mu\text{m}$  de grosor de la corteza cingulada humana de controles sanos y pacientes que padecen depresión grave del Stanley Foundation Neuropathology Consortium. Las muestras analizadas son de ambos géneros (6 hembras y 9 machos tanto en el grupo normal como el deprimido) y de 29-68 años (sanos) y 30-65 años (depresión). La duración de la enfermedad entre los pacientes deprimidos varía de 1 a 42 años. Siete de los sujetos deprimidos murieron por suicidio. Los intervalos post mortem del tejido cerebral antes de congelarse son de 8-42 (sano) y 7-47 (depresión) horas y el pH del tejido 5,8-6,6 (sano) y 5,9-6,5 (depresión). Las sondas de hibridación *in situ* se fabrican mediante amplificación por PCR de nucleótidos 1159-1420 de la secuencia de codificación del gen receptor 5-HT<sub>1B</sub> de rata, nucleótidos 1-293 de la secuencia de codificación de los genes p11 humanos o de ratón y nucleótidos 1-287 de la secuencia de codificación del gen p11 de rata, respectivamente. Los fragmentos de PCR diferentes se subclonan en el vector pCRII-TOPO. Con excepción de los estudios sobre tejido humano, se realizaron secciones del criostato de 12  $\mu\text{m}$  para todos los estudios. Las secciones se hibridan con ribosonda marcada con [ $^{35}\text{S}$ ]UTP reparado por transcripción *in vitro* a partir de ADNc correspondiente al gen receptor 5-HT<sub>1B</sub> de rata, gen p11 humano o de rata o ratón, como se ha descrito previamente (S5). Tras la hibridación, las secciones se exponen a película Biomax MR durante un plazo de 7 a 24 días y se analizan usando el software de NIH Image 1.63. A menos que se indique, los análisis se realizan en la corteza cingulada anterior/prelímica. Algunas secciones se sumergen en emulsión Ilford K5 para el análisis celular. Tras 8 semanas, las secciones fueron desarrolladas, teñidas con la técnica Nissl y montadas.

Del modo similar a los ratones H/Rouen, proteína y ARNm de p11 disminuyen en la corteza cingulada anterior en pacientes que han padecido trastorno por depresión grave unipolar.

#### **Ejemplo 6 - Experimento de cotransfección de receptor p11/5-HT<sub>1B</sub>.**

Las células COS 7, que contienen poco p11 nativo, en caso de contener, se transfectan con p11 (pcDNA3.1-p11), con 5-HT<sub>1B</sub> (pcDNA3.1-5-HT<sub>1B</sub>R-V5), con receptores de dopamina D<sub>1</sub> (pcDNA3.1-D1R-V5) o plásmido vacío. Las células COS 7 colocadas en placas se incuban con medio que contiene 1 mg/ml Sulfo-NHS-LC-Biotina durante 30 minutos en hielo. Las células se enjuagaron en TBS para atenuar la reacción de biotina. Las células son lisadas en 300  $\mu\text{l}$  de tampón RIPA modificado (1 % Triton X-100, 0,1 % SDS, 0,5 % ácido deoxicólico, 50 mM NaPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, 10 mM pirofosfato de sodio, 1 mM ortovanadato sódico, 1 mM PMSF y 1 mg/ml leupeptina). Los homogeneizados se centrifugan a 14.000 g durante 15 min a 4°C. Se eliminan quince  $\mu\text{l}$  del sobrenadante para medir los niveles totales de receptores 5-HT<sub>1B</sub>. El sobrenadante restante se incubaba con 100  $\mu\text{l}$  de 50 % Neutravidina-agarosa durante 3 h a 4°C y se centrifuga brevemente. Se recoge el sobrenadante, que contiene receptores 5-HT<sub>1B</sub> citosólicos. A continuación, se lavaron las perlas de agarosa 3 veces con tampón RIPA y, tras la breve centrifugación final, se resuspenden las proteínas enlazadas en 40  $\mu\text{l}$  de tampón de muestra SDS y se hierven. Se llevaron a cabo análisis western blot cuantitativos sobre las proteínas biotiniladas (superficie) y citosólicas totales usando anticuerpos anti-V5 (para detectar receptores 5-HT<sub>1B</sub>; 1:1000) y anti-p11 (1:1000). Se

detectan bandas inmunorreactivas mediante quimioluminiscencia aumentada seguido por autorradiografía. La intensidad de las bandas se cuantifica usando software Image 1.63 de NIH. La proporción superficie/total se calcula por cada pocillo. Los experimentos de control confirman que la proteína intracelular actina no es biotinilada en este ensayo.

5 Las células cotransfectadas con receptores 5-HT<sub>1B</sub> y p11 presentan más 5-HT<sub>1B</sub> en la superficie celular que las células transfectadas solo con receptores 5-HT<sub>1B</sub>. Por el contrario, la proporción de superficie a total de receptores de dopamina D<sub>1</sub> es similar en presencia de ausencia de p11.

#### 10 **Ejemplo 7 - Mediciones de AMPc en células COS 7.**

Se transfectan células COS 7 cultivadas en medio DMEM con receptores 5-HT<sub>1B</sub> y/o p11. Treinta y seis horas después, las células son pretratadas con teofilina (5 mM) y pargilina (10 µM) durante 15 min. Después, se añade vehículo o forskolina (10 µM) con o sin serotonina (10 µM) durante otros 15 minutos. Al final del tratamiento, el medio que contiene el fármaco se elimina, los pocillos se enjuagan en PBS y se recogen las células. La formación de AMPc se cuantifica mediante un kit de inmunoensayo enzimático de AMPc directo según las instrucciones del fabricante. Los experimentos de control muestran que la serotonina no altera la formación de AMPc en las células COS 7 no transfectadas.

20 La capacidad de la serotonina (10 mM) de contrarrestar la formación de AMPc inducida por forskolina en células COS 7 transfectadas con el receptor 5-HT<sub>1B</sub> aumenta en presencia de p11 cotransfectado. No hay diferencia significativa en las respuestas de AMPc a la forskolina con o sin p11. Los datos se normalizan a condiciones estimuladas con forskolina, con o sin p11, y representan medias T SEM.

#### 25 **Ejemplo 8 - Generación y análisis de ratones transgénicos que sobreexpresan p11.**

Los ratones transgénicos con sobreexpresión de p11 regulable por doxiciclina bajo el promotor de proteína quinasa II (CamKII) dependiente de calmodulina/calcio. El p11 de ratón se fusiona con una etiqueta de epítipo Myc usando PCR y subclonado en sitios Sal I/Hind III de pTet-splice (S6). Este plásmido (pTetOp-p11-Myc) es transfectado en las células CHO que expresan tTA (amable regalo del Dr Patrick Allen). La expresión de Myc a partir de extractos de estas células se confirma por inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-Myc (1:1000). Tras la confirmación de que el p11-Myc está expresado, se linealiza un fragmento de ADN (que contiene pTetOp-p11-Myc, intrón SV40 y señal poli(A) +), se purifica mediante electroelución y se microinyecta en los pronúcleos de oocitos de ratones C57BL6 y se implanta en ratones C57BL6/CBA pseudopreñados (Rockefeller University Transgenic Facility). Se analiza ADN de la cola para detectar el transgen por PCR (5'-TATAGTCGACATGATGCCATCCC AAATGG-3' y 5'-TATAAAGCTTCTAC AAATCTTCTCAGAAATCAATTTT TGTTGAGATTTCTCCCTTCTG-3'). Los ratones fundadores positivos para el constructo pTetOp-p11-Myc se cruzaron con ratones C57B16 para generar ratones F1. Los ratones transgénicos pTetOp-p11-Myc F2 homocigotos se obtuvieron mediante cruce de hermanos F1. (El genotipo homocigoto se confirma cruzándolos con ratones de tipo salvaje.) Estos ratones se cruzan con ratones C57B16 que expresan tTA bajo el promotor CamKII (S7). Se determina el genotipo de los ratones mediante PCR con los cebadores arriba mencionados (para detectar p11-Myc) y 5'-GAGCTGCTTAATGAGGTCG GAATC-3' y 5'-TCTAAAGGGCAAAAGTGAGTATGG-3' (para detectar tTA). La sobreexpresión de p11-Myc en ratones doble transgénicos se confirma mediante inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-Myc y mediante hibridación *in situ* frente al gen p11 de ratón (Fig. S2). La expresión de tTA impulsada por CamKII se detecta usando hibridación *in situ* con una ribosonda frente a la región codificante de tTA (amable regalo del Dr Alexei Morozov, Columbia University) (Fig. S2). En los experimentos de comportamiento, se comparan los ratones doble transgénicos con ratones de la misma camada que expresan uno o ninguno de los transgenes que actúan como ratones de control. Algunos ratones doble transgénicos recibieron doxiciclina 50 mg/l en su agua potable durante 18 días antes del experimento.

50 En ausencia de doxiciclina, los ratones transgénicos tienen p11 elevado en neuronas que no contienen serotonina en el cerebro anterior, pero no en neuronas con serotonina en los núcleos del rafe. Estos ratones presentan aumento de receptores 5-HT<sub>1B</sub> funcionales en la sustancia negra y presenta tigmotaxis reducida (un índice de angustia relacionada con la ansiedad) y una actividad horizontal aumentada en el ensayo de campo abierto. También muestran una inmovilidad reducida en la prueba de suspensión por la cola (un índice de estados similares a la depresión). De este modo, los ratones que sobreexpresan p11 actúan como si estuvieran tratados con antidepresivos, aunque un factor de confusión es que parecen estar generalmente hiperactivos. Los ratones transgénicos tratados con doxiciclina presentan expresión de p11 normalizada (fig. S4) y no presentan alteraciones significativas de tigmotaxis, inmovilidad o actividades horizontales.

#### 60 **Ejemplo 9: Generación y análisis de ratones p11 knock-out**

**Generación y análisis de ratones p11 KO.** Mediante el uso de una sonda de la secuencia de codificación de p11 de rata, se aíslan 6 clones genómicos a partir de un análisis de biblioteca de BAC. Un fragmento BamHI de 13,7 kb se subclona a partir de un Clon BAC y se mapea mediante análisis de la enzima de restricción. El gen p11 de ratón contiene un exón que contiene ATG, un intrón de 3,5 kb, seguido de otro exón con el codón de terminación. Un

vector dirigido de 11,3 kb (5' Hinc II-Bgl II + [Bam HI-loxP- NeoloxP-Kpn I]+Apa I\*-Eco RV 3') que abarca el exón que contiene ATG del gen p11 se produce en pBSK(-). El vector dirigido es electroporado en células ES 129SvEv y seleccionado para clones recombinantes por G418. Los clones ES se identifican como positivos para recombinación homóloga mediante transferencia Southern usando sondas externas 5' y 3' (fragmento de 300-pb de Bam HI/Bsp M1 y fragmento de 285-pb de Bam HI/Sca I, respectivamente) en un análisis de ADN de células ES digerido con Spe I y Bam HI/Sal I, respectivamente. Los clones positivos se inyectan en blastocistos C57BL/6 y los machos quiméricos se reproducen con hembras C57BL/6 para obtener la transmisión de la línea germinal. La descendencia heterocigota se aparea para generar ratones *knockout* y de tipo salvaje. El análisis transferencia Southern del ADN de la cola confirmó que ambos alelos están mutados en ratones p11 KO. La ausencia del gen p11 en los ratones p11 *knockout* se confirma también usando hibridación *in situ* con una sonda contra el gen p11 de ratón (Fig. S5). Se desarrolla un procedimiento de PCR, usando los siguientes oligonucleótidos, 5'-CATTGAGAGGTGAACCCTGCTGAGGG-3', 5'-CCTGTCAGCCACTCTATAT GCTCCTAATC-3' y 5'-GGCCAGCTCATTCTCCC ACTCATG-3', para distinguir los ratones *knockout* y heterocigotos y de tipo salvaje (Fig. S5). Este método basado en PCR se utiliza para la determinación del genotipo rutinaria. Excepto los estudios con cultivos corticales primarios, todos los experimentos se llevan a cabo en ratones de tipo salvaje y p11 KO de la misma camada generados a partir de la reproducción entre heterocigotos. El apareamiento heterocigoto x heterocigoto arrojó un 29 % de ratones de tipo salvaje, 53 % heterocigotos para p11 y un 18 % de ratones p11 KO. No está claro por qué hay menos ratones KO, pero se ha descubierto que p11 está implicado en la implantación embrionaria temprana (S8). Los ratones heterocigotos para p11 son retrocruzados dos generaciones con ratones C57B16. La determinación de genotipo de microsatélites, usando 104 marcadores específicos de C57B16 (Rockefeller University Genomics Resource Center), muestra que los ratones heterocigotos para p11 usados para el apareamiento de animales experimentales tienen un origen C57B16 en un 74 ± 2,8 %.

**Autorradiografía cuantitativa de receptores.** Se hacen cortes criostáticos 12 µm de grosor) de ratones de tipo salvaje y p11 KO. Los receptores 5-HT<sub>1B</sub> se detectan mediante incubación de los cortes en 170mM Tris/150mM NaCl pH 7,4 (25°C) que contienen el antagonista [<sup>125</sup>I]cianopindolol (0,3, 1, 3, 10, 30, 100 pM; 2200 Ci/mmol), 100 nM 8-OH-DPAT como bloqueador de 5-HT<sub>1A</sub>, y 30 µM isoproterenol, como bloqueador de receptores adrenérgicos β, durante dos horas (S9). Se determina el enlace no específico mediante mediciones en presencia de 100 µM serotonina. En los experimentos de desplazamiento, se incuban concentraciones crecientes de serotonina (0, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 10000 nM) con 10 pM [<sup>125</sup>I]cianopindolol como se ha descrito arriba. Los receptores 5-HT<sub>1B</sub> también se detectan mediante incubación de los cortes en 9 170mM Tris/4mM CaCl<sub>2</sub>/0,1 % ácido ascórbico, pH 7,4 (25°C) con el antagonista [<sup>3</sup>H]GR125743 (0,3, 1, 3, 10, 30 nM; 80 Ci/mmol; GE Healthcare) durante dos horas. Se determina el enlace no específico mediante mediciones en presencia de 100 µM de serotonina. Los receptores 5-HT<sub>1A</sub> se detectan mediante incubación de los cortes en 50 mM Tris pH 7,4, 4 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> y 0,1 % albúmina de suero bovino (25°C) con agonista [<sup>3</sup>H]8-hidroxi-2-(di-*n*-propilamino)-tetralin ([<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT; 10 nM; 125 Ci/mmol; GE Healthcare), 300 nM SB-269970, como un bloqueador de receptor 5-HT<sub>7</sub>, durante una hora. Se determina el enlace no específico mediante mediciones en presencia de 100 µM de serotonina. Los receptores tipo D1 se detectan mediante incubación de los cortes en 25 mM Tris/100 mM NaCl/1 mM MgCl<sub>2</sub>/1 µM pargilina/20 nM mianserina/0,001 % ácido ascórbico que contienen el antagonista [<sup>3</sup>H]7-cloro-2,3,4,5-tetrahidro-3-metil-5-fenil-1H-3-benzazepina-7-ol ([<sup>3</sup>H]SCH 23390; 2nM; 87,0 Ci/mmol) durante 2 horas. Se determina el enlace no específico mediante mediciones en presencia de 100 µM de SKF82958. Los receptores tipo D2 se detectan mediante incubación de los cortes en 170 mM Tris/120 mM NaCl/5 mM KCl/2 mM CaCl<sub>2</sub>/1 mM MgCl<sub>2</sub>/10 µM GTP/0,001 % ácido ascórbico que contienen el antagonista [<sup>3</sup>H]racloprida (5 nM; 72 Ci/mmol) durante una hora. Se determina el enlace no específico mediante mediciones en presencia de 100 µM de quinpirol. Al final de todos los experimentos autorradiográficos, se enjuagan los cortes 2x5 min en sus correspondientes soluciones amortiguadoras de unión frías, se sumergen en agua destilada a 4 °C y se secan con aire frío. Los cortes se ponen en contacto con películas Biomax MR durante 3-5 días ([<sup>125</sup>I]cianopindolol) o 4-10 semanas ([<sup>3</sup>H]GR125743, [<sup>3</sup>H]8-OHDPAT, [<sup>3</sup>H]SCH23390, [<sup>3</sup>H] racloprida) junto con microescalas [<sup>3</sup>H] o [<sup>125</sup>I]. Se obtienen mediciones de densidad óptica en diversas regiones del cerebro con el sistema de análisis de imágenes Image 1.63 de NIH. El enlace específico se calcula mediante la sustracción digital del marcaje no específico del enlace total. Las curvas estándares generadas a partir de microescalas [<sup>3</sup>H] o [<sup>125</sup>I] se usan para convertir las densidades ópticas a femtomoles por miligramo de proteína. Los datos obtenidos a partir de los experimentos de saturación y desplazamiento se analizaron usando ecuaciones de regresión no lineal.

Los experimentos de unión a ligandos autorradiográficos mostraron que hay menos sitios de unión para los radioligandos antagonistas de receptor 5-HT<sub>1B</sub> [<sup>125</sup>I]iodocianopindolol y [<sup>3</sup>H]GR125743 en el globo pallidus en ratones p11 KO que en ratones de tipo salvaje. Del mismo modo, el enlace de [<sup>125</sup>I]iodocianopindolol es menor en sustancia negra para reticulata en ratones p11 KO que en ratones de tipo salvaje (77,3 ± 5,8 frente a 98,8 ± 6,2 fmol/mg proteína; P < 0,05 prueba t de Student). No existe diferencia en la afinidad de la serotonina para desplazar [<sup>125</sup>I]iodocianopindolol unido entre los ratones p11 KO y tipo salvaje [valores de concentración eficaz mediana (EC50): 57 frente a 52 nM]. No se detectan diferencias en las cantidades de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, D<sub>1</sub> o D<sub>2</sub> entre los ratones p11 KO y de tipo salvaje. La unión de [<sup>125</sup>I]iodocianopindolol también es reducida en ratones H/Rouen frente a ratones NH/Rouen.

**Unión a [<sup>35</sup>S]GTPγS en respuesta a estimulación de receptor 5-HT<sub>1A</sub> o 5-HT<sub>1B</sub>.** Se preincubaron cortes criostáticos frescos (12 µm) de ratones de tipo salvaje, p11 KO y p11 transgénicos durante 30 min en Tris-HCl 50

mM (pH 7,4) complementado con 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM EGTA, 2 mM GDP y 1 U/ml adenosina-desaminasa para eliminar la adenosina endógena. A continuación, se incuban los cortes durante dos horas a 25°C en la misma solución que contiene 40 pM [<sup>35</sup>S]GTP S, con (condición de estimulación) o sin (condición basal) 50 μM del agonista del receptor 5-HT<sub>1A</sub>, 8-OH-DPAT o el agonista del receptor 5-HT<sub>1B</sub>, anpirtolina. El marcaje no específico (fondo) se determina en autorradiografías de cortes adyacentes incubados con 10 μM de GTP S no marcado. Los cortes se enjuagan dos veces (3 min cada uno) en 50 mM tampón Tris- HCl, una vez (30 s) en agua destilada para eliminar las sales amortiguadoras, y se secan al aire. Las autorradiografías se obtienen mediante exposición de 2-4 días en película Biomax MR. Las mediciones de densidad óptica se obtienen en diversas regiones del cerebro con el sistema de análisis de imágenes Image 1.63 de NIH.

El reducido número de receptores 5-HT<sub>1B</sub> en la membrana celular en ratones p11 KO se refleja en la reducida capacidad del agonista del receptor 5-HT<sub>1B</sub> anpirtolina para aumentar el enlace de [<sup>35</sup>S]guanosina 5'-O-(3'-tiotriofosfato (GTP-- S) en el globus pallidus en estos ratones. Por el contrario, no hay diferencia en el enlace de [<sup>35</sup>S]GTP--S por 8-OH- DPAT [(+/-)-8-hidroxi-2-(di-*n*-propilamino) tetralin], un agonista del receptor 5-HT<sub>1A</sub>, en ratones tipo salvaje y p11 KO (6,0 ± 2,1 frente a 5,0 ± 2,0 unidades de densidad óptica). El número reducido de receptores 5-HT<sub>1B</sub> funcionales en la superficie celular de ratones p11 KO se refleja también en una pérdida de la capacidad de serotonina y de anpirtolina para disminuir los niveles de fosfo-Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>- ERK1/2 (quinasas extracelulares reguladas por señal) en cultivos corticales primarios de ratones p11 KO y de anpirtolina para disminuir fosfo-Ser<sup>9</sup>-sinapsina I, un sitio fosforilado por proteína cinasa dependiente de AMPc, en cortes estriatales de ratones p11 KO.

**Transferencia Western para detectar ERK1/2 fosforilada en cultivos corticales primarios.** Se extraen las cortezas de ratones E18 generados mediante cruce WT (tipo salvaje) x WT o p11KO x p11KO, son tripsinizadas (0,25 %), disociadas mediante trituración y colocadas en placas de seis pocillos recubiertas con poli-L-lisina (1 mg/ml). Los cultivos (500.000 células/ml) se cultivan en medio que contiene DMEM con 5 % suero fetal bovino, 4 mM L-glutamina, complemento nutriente B-27, penicilina (5 U/ml), y estreptomycin (5μg/ml). Tras dos semanas, los cultivos se tratan con vehículos, serotonina (10 μM) o anpirtolina (10 μM) durante 15 minutos. Al final del tratamiento, se elimina el medio que contiene el fármaco, los pocillos se enjuagan en PBS helado, las neuronas se extraen mediante raspador celular y se congelan en nitrógeno líquido. Las muestras celulares son sonicadas en 1 % SDS y se hierven durante 10 minutos. Se retienen pequeñas alícuotas del homogeneizado para la determinación de proteínas mediante el método de ensayo de proteínas del ácido bicinonínico. Se procesan cantidades iguales de proteína usando 10 % geles de acrilamida, como se describe (S10). Se lleva a cabo la inmunotransferencia con un anticuerpo específico del estado de fosforilación contra fosfo-Thr202/Tyr204-ERK1/2 o un anticuerpo que no es específico del estado de fosforilación contra ERK1/2 total. La unión de anticuerpo se detecta mediante aumento de quimioluminiscencia y se cuantifica mediante densitometría, usando el software del National Institutes of Health IMAGE 1.63. El nivel de la forma fosforilada de ERK1/2 está normalizado a su nivel total. Todos los datos se presentan como niveles normalizados.

**Transferencia Western para detectar sinapsina I fosforilada en cortes cerebrales.** Se preparan cortes (300 μm) del striatum a partir de ratones de tipo salvaje y p11 KO como se ha descrito (S10). Se preincuban los cortes en tampón de Krebs (118 mM NaCl/4,7 mM KCl/1,5 mM Mg2SO4/1,2 mM KH2PO4/25 mM NaHCO3/11,7 mM glucosa/1,3 mM CaCl2) a 30°C bajo oxigenación constante (95 % O2/5 % CO2) durante 60 min, con un cambio de tampón tras 30 min. Se tratan los cortes con vehículo o anpirtolina (50 μM) durante 2 min. Tras el tratamiento con fármaco, se elimina el tampón, los cortes se congelaron rápidamente en hielo seco, son sonicados en 1 % SDS y se hierven durante 10 minutos. Se retienen pequeñas alícuotas del homogeneizado para la determinación de proteínas mediante el método de ensayo de proteínas del ácido bicinonínico. Se procesaron cantidades iguales de proteína usando geles de acrilamida 10 %. Se llevó a cabo inmunotransferencia con un anticuerpo policlonal de conejo específico del estado de fosforilación dirigido contra fosfo-Ser9- sinapsina I, un sitio que es fosforilado por PKA y CamKII, o un anticuerpo de sinapsina policlonal de conejo que no es específico del estado de fosforilación. La unión de anticuerpo se detecta mediante quimioluminiscencia aumentada y se cuantifica mediante densitometría, usando el software de National Institutes of Health IMAGE 1.63. El nivel de la forma fosforilada de sinapsina está normalizado a su nivel total. Todos los datos se presentan como niveles normalizados.

**Electrofisiología.** Se decapitó a los ratones macho de tipo salvaje y p11 KO (de 4 a 7 semanas de edad) con anestesia fluorothane. Se extrajeron rápidamente los cerebros y se prepararon cortes cerebrales coronales (400 μm de grosor), que contienen el núcleo accumbens con un instrumento de microcorte. Se incuban los cortes, durante al menos 1h, a 32°C en líquido cefalorraquídeo artificial oxigenado (aCSF, en inglés) (95 % O<sub>2</sub> + 5 % CO<sub>2</sub>) que contiene (en mM): 126 NaCl, 2,5 KCl, 1,2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,3 MgCl<sub>2</sub>, 2,4 CaCl<sub>2</sub>, 10 glucosa and 26 NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,4. Se transfieren los cortes a una cámara de registro montada sobre un microscopio vertical y se perfunden de manera continua con aCSF oxigenado a 28°C. Se registran potenciales de campo extracelular usando una micropipeta de vidrio con aCSF situado en la superficie del corte en el núcleo accumbens. Se amplifican las señales 500 veces mediante un amplificador Axopatch 200B adquirido a 10 kHz, se filtran a 2kHz y se registra en un ordenador usando software de análisis de datos pClamp9 y adquisición. Se provocan respuestas sinápticas con un electrodo de estimulación bipolar concéntrica situado cerca del electrodo de registro en la superficie del corte. La dependencia de la intensidad de la estimulación aplicada al corte en la amplitud del fEPSP es similar en ratones WT y p11 KO, lo que demuestra que la transmisión sináptica glutamatérgica no difiere entre ratones WT y p11 KO. Se aplican

estímulos individuales (0,1 ms de duración) cada 15 s a una intensidad que arroja el 50-70 % de respuesta máxima evaluada por una curva estímulo/respuesta establecida para cada corte examinado midiendo la amplitud del potencial de campo provocado por intensidad de estímulo creciente. Para evaluar el efecto de la activación del receptor de serotonina en la transmisión sináptica glutamatérgica, se aplica serotonina en la solución de perfusión mientras se mide la amplitud de fEPSP/PS. La serotonina (50  $\mu$ M; en presencia de 10  $\mu$ M fluoxetina) reduce la amplitud de la fEPSP/PS en cortes de ratones WT (72  $\square$  2,7 % de valor de base) y su efecto se suprime en cortes de ratones p11 KO (98  $\square$  3,6 % de valor de base). Los valores numéricos se expresan mediante  $\square$ SEM. Se aplican fármacos en la solución de perfusión cambiando una llave de tres conductos.

La serotonina, a través de receptores 5-HT<sub>1B</sub>, reduce la liberación de glutamato en terminales de neuronas que se originan en la corteza cerebral e inhiben la transmisión sináptica en las sinapsis corticoestriatales. Se monitoriza la amplitud de potenciales postsinápticos excitatorios (fEPSP, en inglés) provocada por la breve estimulación eléctrica de fibras glutamatérgicas y registrada extracelularmente en el núcleo accumbens. El fEPSP es mediado por receptores AMPA activados por el glutamato endógeno liberado por la estimulación eléctrica del corte tanto en ratones de tipo salvaje como en ratones p11 KO [f EPSP / reducción de 77 y 81 % de pico de población (PS, en inglés) respectivamente, comparado con la base, 15 min tras el antagonista del receptor AMPA 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX)]. Cuando se aplica en la solución de perfusión, la serotonina reduce la amplitud del f EPSP/PS en los cortes de ratones de tipo salvaje, pero no de ratones p11 KO.

**Contenido tisular de monoaminas y metabolitos.** Se sacrifican ratones tipo salvaje, heterocigotos p11 y p11 KO macho (n= 8 por genotipo) mediante irradiación de microondas concentrada y se diseccionan el hipocampo, las cortezas y striata y se congelan en hielo seco. A continuación, las muestras tisulares son sonicadas en 10 volúmenes de 0,1N TCA, se agitan y centrifugan a 12.000 g durante 2 min. Los sobrenadantes se recogen y analizan para detectar serotonina y el metabolito de serotonina ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) usando HPLC junto con detección electroquímica (HPLC-EC). Se separa la serotonina y 5-HIAA con una columna analítica C18 Hypersil 5 $\mu$ m de sílice desactivada para bases (4,6 x 150 mm) con una fase móvil que consta de 75mM fosfato de sodio monobásico, 350 mg/L ácido 1-octanosulfónico sal sódica, 0,5 mM EDTA, 0,8 % tetrahidrofurano (grado HPLC, sin inhibidor) y 8 % acetonitrilo, pH 3 (ajustado con ácido fosfórico), a una velocidad de flujo de 1,2 ml/min. Se usa un detector electroquímico con electrodos de carbono vítreo duales (electrodo 1 = 680 mV, intervalo, 0,5 nA; electrodo 2 = -100 mV, intervalo, 0,2 nA). Se recogen los datos usando software EZChrom que calculó las alturas de picos y concentraciones de muestras. La sensibilidad para serotonina y 5-HIAA es 0,1 pmol/ml.

Los receptores 5-HT<sub>1B</sub> actúan como autorreceptores e inhiben la liberación de serotonina. Puesto que p11 se expresa en los núcleos del rafe, las cantidades de serotonina y su metabolito principal ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) se miden en áreas de proyección, a saber, corteza, striatum e hipocampo en ratones de tipo salvaje y p11 KO. Según una regulación de la renovación de 5-HT y/o metabolismo por receptores 5-HT<sub>1B</sub>, y un papel potenciador de p11 en la función del receptor 5-HT<sub>1B</sub>, los ratones p11 KO presentan niveles aumentados de metabolismo y/o renovación de serotonina.

**Análisis de comportamiento - Análisis de campo abierto.** Se miden las actividades horizontales durante 30 minutos (se analizan los resultados cada periodo de 5 min) durante el día en un sistema de detección del movimiento sensible a infrarrojos y a luz roja, multijaula y computerizado. Los valores de actividad periférica se dividen 13 por los valores de actividad horizontal totales para determinar la tigmotaxis. En los experimentos con anpirtolina (5 mg/kg, i.p.), se somete a pruebas a animales 15 min tras la inyección. Algunos ratones tratados con anpirtolina habían recibido inyecciones diarias con imipramina (10 mg/kg, i.p.) durante 4 semanas hasta el día antes del experimento.

**Análisis de comportamiento - Prueba de suspensión por la cola.** La prueba de suspensión por la cola, un modelo de actividad similar al antidepressivo, se lleva a cabo como se ha descrito (S11) y es una versión modificada de la validada para ratones C57B16 (S12) y NMRI (S13). Los ratones son suspendidos individualmente por la cola en una barra horizontal (la distancia al suelo es de 35 cm) usando cinta adhesiva (la distancia desde la punta de la cola es de 2 cm). Normalmente, los ratones mostraron diversos comportamientos orientados a escapar intercalados con ratos temporalmente crecientes de inmovilidad. Se graba en vídeo una sesión de prueba de 6 min y se puntúa por un observador que desconoce el genotipo. El parámetro registrado es el número de segundos que estuvo inmóvil. En los experimentos con anpirtolina (5 mg/kg) e imipramina (10 mg/kg), se somete a pruebas a los animales 15 minutos tras la inyección.

**Análisis de comportamiento - Prueba de consumo de sacarosa.** Se usa un procedimiento de una sola botella en ratones de tipo salvaje y ratones p11 KO alojados de manera individual para analizar el consumo de sacarosa. Se mide el consumo de una solución de sacarosa al 2 % en agua durante un periodo de 96 horas. En un experimento posterior, se mide el consumo de agua durante el mismo periodo de tiempo.

Para evaluar los efectos del comportamiento de deleción de p11, se compara la tigmotaxis en ratones de tipo salvaje y ratones p11 KO en condiciones basales y en respuesta a anpirtolina en ratones que no han recibido fármaco y en ratones que han sido tratados a largo plazo con imipramina. En animales tratados con imipramina, la anpirtolina causa una reducción significativa en tigmotaxis en ratones de tipo salvaje, pero no en ratones p11 KO (Fig. 4G).

Además, hay menos tigmotaxis en ratones de tipo salvaje que ratones p11 KO a los que se ha inyectado solución salina (Fig. 4G). Los ratones p11 KO y de tipo salvaje que no han recibido fármaco presentan tigmotaxis similar en ausencia o presencia de anpirtolina. Existe una inmovilidad aumentada en la prueba de suspensión por la cola en ratones p11 KO en comparación con ratones de tipo salvaje, tanto en condiciones base como tras un tratamiento agudo con anpirtolina o imipramina (Fig. 4H). Estos resultados de comportamiento indican que los ratones p11 KO presentan un fenotipo similar a la depresión y que p11 media las respuestas de comportamiento a imipramina a través de receptores 5-HT<sub>1B</sub>. En apoyo también de un fenotipo similar a la depresión de ratones p11 KO, los ratones p11 KO consumen menos de una solución de sacarosa 2 % sabrosa que sus compañeros de camada de tipo salvaje ( $1,74 \pm 0,07$  frente a  $2,17 \pm 0,11$  ml/g peso corporal por día;  $P < 0,05$  test t de Student), lo que indica una reacción disminuida a recompensas dulces. La ingesta de agua es similar en los ratones p11 KO y sus compañeros de camada de tipo salvaje ( $1,51 \pm 0,05$  frente a  $1,42 \pm 0,05$  ml/g peso corporal por día), lo que descarta un papel de equilibrio de fluido alterado en este comportamiento.

#### Ejemplo 10: Detección de p11 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas

Se recoge sangre completa (10-15 ml) en un tubo heparinizado. Un ml de sangre arrojará aproximadamente 1 milj de células mononucleares, aunque el número varía considerablemente entre sujetos. La sangre se diluye 1:1 en solución salina fosfatada (PBS). Se añade 2,5 ml de lymphoprep (nº cat. Medinor 1114547) a tubos de 15 ml y se colocan cuidadosamente 10 ml de sangre diluida encima. Se giran los tubos 20 minutos a 1800 rpm y a temperatura ambiente. Usando una pipeta Pasteur, se recogen PBMC de dos tubos en un tubo de 15 ml limpio. Este tubo se llena con PBS y se centrifuga a 1500 rpm durante 10 minutos. A continuación, se lavan las células dos veces en PBS (elimina las plaquetas sanguíneas así como el lymphoprep). Para contar, las PBMC se diluyen en 1 ml de medio (90 % suero fetal de ternera/10 % DMSO) por 10 ml de volumen de sangre completa original. (Dilución para recuento 1:10 en Trypan Blue). Se congelan las PBMC a -80°C (hielo seco) o más frío, y se almacenan y administran a -80°C. Se añade 0,5 milj PBMC por pocillo a placas de 96 pocillos. La placa se gira y se descarta el sobrenadante. Las células se fijan en tampón de fijación BD (BD Biosciences, del nº de kit de cat. 554715). Se añade el tampón de permeabilización del mismo kit y se lavan las células. Ahora las células están listas para tinción intracelular. Se diluye anticuerpo de p11 (BD Biosciences; 2,5ug/ml) en el tampón de permeabilización y se añade a los pocillos. Se usa un pocillo para control de IgG1. Se suspenden las células mediante pipeteado. Se incuban las células durante 30 minutos y se lavan en tampón de permeabilización. El anticuerpo secundario (conjugado con PE anti-ratón de cabra) se diluye en tampón de permeabilización y se añade a cada pocillo. Se suspenden las células y se incuban durante 30 minutos. Se lavan dos veces con tampón de permeabilización y una vez con PBS-1 % FCS. Para doble tinción, se bloquea el anticuerpo secundario mediante lavado una vez con 100ul PBS-1 %FCS-1 %NMS (suero de ratón sano). El paso de bloqueo es necesario para evitar el enlace de anticuerpos posteriores a cualquier anticuerpo secundario restante. Para teñir los marcadores superficiales, se añade PBS que contiene CD14-PerCP (para distinguir monocitos) o CD3-Per-CP y CD56-PE (para distinguir células T y células NK) o CD19-FITC (para distinguir células B) a cada pocillo. Se suspenden las células mediante pipeteado y se incuban 10 minutos en el refrigerador. A continuación, se lavan una vez con 200 ul PBS-1 % FCS. Se usa un procedimiento FACS estándar para determinar la tinción de p11 en diferentes tipos de células mononucleares. p11 se expresa altamente en algunos glóbulos blancos, monocitos, células asesinas NK y células T CD-8 positivas.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Rockefeller University  
 <120> Nuevos Productos y Métodos Terapéuticos y Diagnósticos  
 <130> PG430028EPA  
 <140> PCT/US2007/013948  
 <141> 2007-12-21  
 <150> US 60/813,170  
 <151> 2006-06-13  
 <150> US 60/878,730  
 <151> 2007-01-05  
 <160> 10  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 649 038 T3

<220>  
 <223> Cebador

5 <400> 1  
 cgcgtttggga atcactacag ggatg 25

10 <210> 2  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Cebador

15 <400> 2  
 gaaattgaga tggatgcacga tgcac 25

20 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Cebador

25 <400> 3  
 ggcttaccca tacgatgttc 20

30 <210> 4  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Cebador

35 <400> 4  
 tatagtcgac atgatgccat cccaaatgg 29

40 <210> 5  
 <211> 61  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Cebador

50 <400> 5  
 tataaagctt ctacaaatct tcttcagaaa tcaatttttg ttcagatttc ttccccttct 60  
 g 61

55 <210> 6  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Cebador

60 <400> 6  
 gagctgctta atgaggtcgg aatc 24

65 <210> 7  
 <211> 24  
 <212> ADN

# ES 2 649 038 T3

<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador

5

<400> 7  
tctaaagggc aaaagtgagt atgg 24

<210> 8  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Cebador

15

<400> 8  
cattcagagg tgaaccctgc tgaggg 26

20

<210> 9  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25

<220>  
<223> Cebador

30

<400> 9  
cctgtcagcc actctatag tcctaatac 29

<210> 10  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35

<220>  
<223> Cebador

40

<400> 10  
ggccagctca ttctcccac tcatg 25

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para identificar los moduladores de la proteína p11 (también conocida como S100-A10) útiles para tratar o aliviar trastornos relacionados con el receptor p11/5-HT, comprendiendo el método:

5 (A) identificar moduladores de p11, que comprende las etapas de proporcionar una primera muestra y una segunda muestra, en donde la muestra comprende células mononucleares de sangre periférica que contienen cantidades equivalentes de producto génico p11 (por ejemplo, proteína o ARNm); poner en contacto la primera muestra con el modulador de p11 candidato; y determinar si las cantidades de producto génico p11 en la primera muestra han cambiado, en donde una cantidad aumentada de producto génico indica que los moduladores candidatos pueden ser útiles para tratar o aliviar trastornos asociados a un nivel anormalmente bajo de p11 mientras que una cantidad disminuida indica que los moduladores candidatos pueden ser útiles para tratar o aliviar trastornos asociados a un nivel anormalmente alto de p11, o

10 (B) identificar moduladores de p11, que comprende poner en contacto un modulador de p11 candidato con una muestra que comprende células mononucleares de sangre periférica que comprenden un gen indicador unido funcionalmente a un promotor p11 y usar el nivel de expresión génica del indicador como un proxy para la expresión de p11, en donde una cantidad aumentada del producto génico del indicador indica que los moduladores candidatos pueden ser útiles para tratar o aliviar trastornos asociados a un nivel anormalmente bajo de p11 mientras que una cantidad disminuida indica que los moduladores candidatos pueden ser útiles para tratar o aliviar trastornos asociados al nivel anormalmente alto de p11.

2. Un método según la reivindicación 1, en el que un modulador de p11 se usa como un control positivo.

3. Un método según la reivindicación 2, en el que el modulador de p11 se selecciona de antidepresivos tricíclicos, inhibidores de la recaptación selectiva de serotonina, triptanos e inhibidores de la monoamina oxidasa.

4. El método según las reivindicaciones 1-3, en el que los niveles de expresión de p11 se miden en una muestra de sangre.